

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE HOJAS Y FLORES DE *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh var. *bicapsularis*

PHYTOCHEMICAL STUDIES OF LEAVES AND FLOWERS ON *Senna bicapsularis* (L)
Roxburgh var. *bicapsularis*

Rubén Torrenegra¹ y Rubén Jiménez²

Resumen

El estudio fitoquímico de las hojas y flores de *Senna bicapsularis* dio como resultado el aislamiento de un flavonoide (luteolina), un alcohol (eicosanol) y una mezcla de los esteroides (estigmasterol y dehidroestigmasterol).

Palabras clave: *Senna bicapsularis*, Caesalpinaceae, mezcla de stigmasterol-dehidroestigmasterol, flavonoide, luteolina, eiconasol.

Abstract

Phytochemical studies on *Senna bicapsularis* from flowers and leaves have resulted in the isolation of a flavonoid (luteolin), one alcohol (eicosanol) and mixture of two sterols (stigmasterol-dehidrostigmasterol).

Key words: *Senna bicapsularis*, Caesalpinaceae, stigmasterol-dehidrostigmasterol mixture, flavonoid, luteolin, eiconasol.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de principios activos de origen vegetal utilizables con fines terapéuticos constituye uno de los propósitos más valiosos en la investigación de productos naturales en el mundo. Cada día se estudian nuevos exponentes de la flora en procura de la droga ideal, para el tratamiento de cuadros patológicos de clara etiología.

Los vegetales producen variados grupos de compuestos químicos, como terpenos (mono, di), sesquiterpenlactonas, flavonoides, cumarinas, etc., que presentan actividades biológicas. Algunos son diuréticos, y los hay desinflamatorios, vermífugos, antibióticos, antineoplásicos, antirreumáticos, antiofídicos, insecticidas, hemostáticos, emenagogos, etc. (Domínguez, 1973).

Nuestro interés en realizar un estudio fitoquímico de la especie *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh de la familia Caesalpinaceae, que crece abundantemente en la costa Atlántica y específicamente en el departamento del Atlántico, es que esta especie no había sido estudiada antes. Folclóricamente se le atribuye actividad antibiótica, antipirética y purgante (García y Forero, 1968). Otras especies de este género (*Senna*, *Cassia*) han sido estudiadas químicamente en otros países y se han aislado metabolitos secundarios tipo esteroides, antraquinonas y flavonoides con actividad biológica, especialmente antimicrobiana (Correa y Bernal, 1990), motivo por el cual quisimos contribuir al estudio de este género.

Recibido: junio de 2001; aprobado para publicación: noviembre de 2001.

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. E-mail: rtorrene@javercol.javeriana.edu.co.

²Departamento de Química y Biología, Fundación Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. E-mail: rjimenez@guayacan.uninorte.edu.co.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron técnicas de análisis químico, físico y espectroscópico en fitoquímica. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de fitoquímica de la Universidad del Norte y el laboratorio de fitoquímica de la Universidad Javeriana. El material vegetal de *S. bicapsularis* se recolectó en época de floración en el margen izquierdo de Lagos de Caujaral, ubicado en el kilómetro 12 en la vía que va de Barranquilla al munic-

pio de Puerto Colombia, por la carretera vieja. Se hizo la determinación taxonómica en el herbario de la Universidad Tecnológica del Magdalena, donde la especie se encuentra radicada bajo el # 2326 UTMC (figura 1). Posteriormente, se seleccionaron del material seco los órganos a estudiar (hojas y flores), se sometieron a molienda y se realizó la extracción con éter de petróleo y luego con EtOH (etanol) en frío, obteniéndose los extractos respectivos.

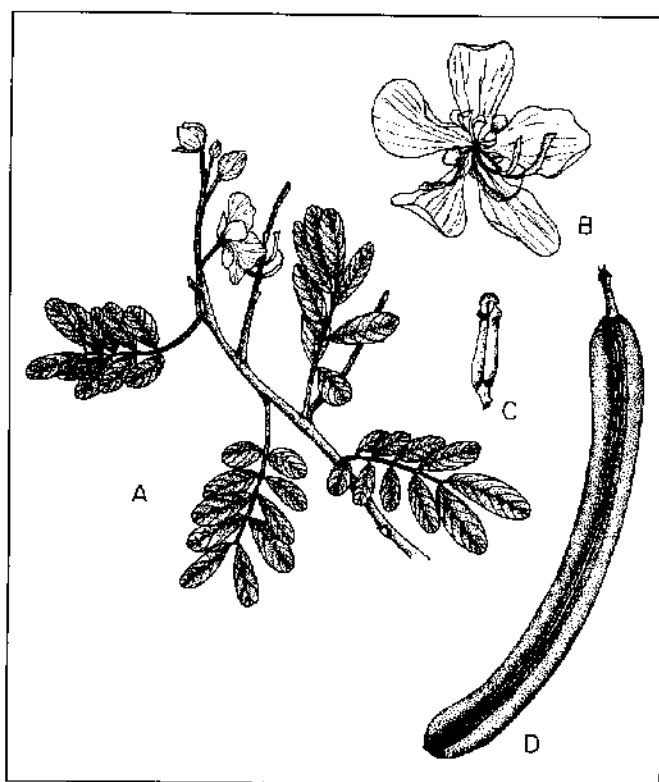


Figura 1. *Senna bicapsularis* o *Cassia bicapsularis*: a. Hojas, b. Flores, c y d. Frutos (tomado de García y Forero, 1968)

Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida en un rotavapor tipo flash. Posteriormente, los extractos etéreos se concentraron y flocularon con EtOH, para precipitar hidrocarburos de baja polaridad; las partes eluidas se evaporaron hasta sequedad y se pasaron por columnas con sílica gel 60 G Merck, eluidas con solventes de polaridad creciente. Los extractos etanólicos se flocularon con agua y se sometieron a fraccionamiento.

La separación y purificación de los metabolitos secundarios de cada extracto fue realizada utilizando cromatografía de capa delgada (CCD), cromatografía en papel (CP), cromatografía en columna (CC) y cromatografía preparativa (Hostettman y Hostettman, 1963; Bolliger y Brenner, 1965).

Para la CCD se usaron placas de sílica gel 60 G Merck de 3 x 5 y de 10 x 10 cm. Como reveladores

de las cromatoplasmas se utilizaron soluciones de cloruro de cobalto en ácido sulfúrico, solución de vainillina en ácido sulfúrico y vapores de yodo. Las cromatografías en papel se realizaron en papel Whatman 2 y 3, y, como reveladores, vapores de amoníaco y luz ultravioleta (lámpara UV Cavitró-Burton, modelo 0315010). Para determinar el tipo de metabolito aislado se realizaron las siguientes pruebas químicas cualitativas:

Esteroles: Lieberman-Burchard, Salkowski

Flavonoides: Shinoda, cloruro férrico

Glicósidos de antraquinonas: antrona

Antraquinonas: Borntrager-Krauss

Para determinar las estructuras de los metabolitos aislados se tuvieron en cuenta las siguientes constantes físicas y métodos espectroscópicos:

Relación de frente (Rf): se determinó en los cromatogramas de las sustancias puras utilizando diferentes solventes.

Punto de fusión (mp): se realizó en un fusímetro Mel Laboratory Devices (Cooper, 1980; Gómez y Moreno, 1988).

Espectroscopía infrarroja (IR): los espectros IR fueron tomados en fase sólida en pastillas de KBr, utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer 710B (Cooper, 1980; Calderón, 1985).

Espectroscopía ultravioleta: los espectros UV se tomaron en un espectrofotómetro Spectronic 2000 con registrador X-Y incorporado.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR): los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (¹HNMR) se tomaron en un JEOL 90Q a 90 MHz; utilizando como solventes CDCl₃, d₆-DMSO y TMS como referencia interna (Martínez, 1976; Correa y Bernal, 1990).

Tratamiento de los extractos

Extracto etéreo. Las hojas de *S. bicapsularis* se secaron y molieron, y luego fueron maceradas con éter de petróleo en frío durante 72 horas. El extracto obtenido se concentró a presión reducida en un rotavapor tipo flash hasta un volumen mínimo. Este extracto fue floculado con EtOH por 48 horas para precipitar los hidrocarburos de baja polaridad. Posteriormente se filtraron y la parte líquida se concentró nuevamente dejándola secar, para luego pesarla.

Del extracto total de hojas se percolaron 5.4 g a través de una columna de vidrio empacada con 150 g de sílica gel 60 G para columna y se eluyó con petrol; luego, con mezclas cada vez más polares de petrol: AcOEt (9:1, 8:3, 1:1, AcOEt puro y después EtOH). Se recolectaron fracciones de 25 ml. Hasta aproximadamente veinte fracciones de cada mezcla de solvente se concentraron y cromatografiaron uniendo las que revelaron igual.

Las fracciones 11 a 15 eluidas con petrol: AcOEt 8:3 dejaron un residuo negro que se lavó con petrol y se obtuvo un sólido cristalino en forma de agujas blancas que reveló una mancha en CCD. De esta sustancia se obtuvieron 170 mg. Se denominó SbH-1.

Del extracto total de flores se percolaron 2.3 g a través de una columna de vidrio empacadas con 65 g de sílica gel 60 G para columna y se eluyó con petrol; luego, con mezclas cada vez más polares de petrol: AcOEt (9:1, 8:2, 1:1, AcOEt puro y después EtOH). Se recolectaron fracciones de 25 ml hasta cerca de quince fracciones de cada mezcla de solvente, que se concentraron y cromatografiaron uniendo las que revelaron igual. Las fracciones 9 a 14 eluidas con petrol acetato 9:1 dejaron un residuo amarillo que se lavó con éter y se obtuvo un sólido blanco que reveló una mancha en CCD. De esta sustancia se obtuvieron 180 mg. Se denominó SbF-1.

Extracto etanólico. El material vegetal desengrasado fue sometido a una extracción con EtOH durante 72 horas en frío. El extracto obtenido se concentró a presión reducida en rotavapor tipo flash hasta mínimo volumen, se floculó con agua y después de 24

horas se filtró. La parte líquida obtenida se trató luego por fraccionamiento líquido/líquido (L/L) con éter de petróleo, y luego CH_2Cl_2 y AcOEt. De la fracción etérea de hojas 5 a 7 eluidas con la mezcla petrol: AcOEt 7:3 se extrajo un sólido cristalino anaranjado que se lavó con petrol y petrol: AcOEt 7:3. Se obtuvieron 55 mg y se denominó SbH-2.

Del extracto etanólico del marco I de flores que se sometieron a fraccionamiento (L/L) se tomó la fracción etérea cuyo extracto seco se sometió a CC y de la quinta fracción eluida con AcOEt se obtuvo un sólido amarillo que fue lavado con petrol y petrol: AcOEt 7:3. La cantidad obtenida fue 26 mg. El compuesto se denominó SbF-2.

RESULTADOS

Las sustancias obtenidas en el estudio fitoquímico de hojas de *S. bicapsularis* se denominaron SbH-1 y SbH-2. En flores, SbF-1 y SbF-2. De ellas, SbH-1 pertenece al grupo de los esteroides y SbF-2 es una antraquinona. El compuesto SbF-1 es un alcohol y el SbF-2 es una flavona. Para la identificación de dichos compuestos se tuvo en cuenta lo siguiente: propiedades físicas: color y punto de fusión; cromatografía; eluentes, coloración y revelador; pruebas químicas cualitativas: espectroscopía UV, IR, ¹HNMR.

Compuestos aislados de hojas

El compuesto SbH-1 se obtuvo en las fracciones 11 a 15, de la columna percolada con petrol: AcOEt 8:3, con estos resultados: *características físicas*: cristales aciculares de color blanco, solubilidad en CHCl_3 y AcOEt, punto de fusión entre 137 y 138 °C. *Pruebas químicas cualitativas de identificación*: Lieberman-Burchard, positiva; y Salkowski, positiva. *Datos espectroscópicos*: peso del SbH-1 obtenido: 170 mg; rendimiento del proceso: 3.15 %. ¹HNMR (90 MHz en CDCl_3 , TMS como referencia interna) (señal) 0.73 (1H, s, C-18); 0.87 (2H, d, C-26); 0.89 (2H, d, C-21); 1.2 (1H, s, C-19); señales 1.5 (1H, s); 1.7 (1H, s); 2.2 (1H, s) correspondientes a cadenas de alquilo y alqueno presentes en la cadena lateral; 5 (3H, t, C-22); 5.3 (2H, d, C-23).

Interpretación del espectro del compuesto SbH-1

El ¹HNMR presenta una extensa banda en la región 2.3-0.7 ppm correspondiente a los protones metílicos en C-18 y C-19. Las señales de 5.3 a 5 ppm corresponden a los protones vinílicos. Los datos físicos y espectroscópicos comparados con la referencia (Domínguez, 1973) y un espectro patrón ¹HNMR del grupo de investigación de la Universidad Javeriana, nos sugieren que el compuesto aislado es una mezcla de estigmasterol y dehidroestigmasterol.

El compuesto SbH-2 se obtuvo de la fracción etérea del fraccionamiento (L/L) del extracto etanólico del marco I. Se tomaron las fracciones 5 a 7 de la columna percolada con petrol: AcOEt 7:3. Los resultados fueron: *características físicas*: cristales de color anaranjado, solubilidad en AcOEt, acetona y EtOH, punto de fusión 248 °C. *Espectroscopía UV*: fluorescencia café, vapores de NH_3 , color rojo. *Pruebas químicas cualitativas de identificación*: reacción de Borntrager-Krauss, positiva; prueba de antrona, negativa; solución concentrada NaOH, positiva; solución concentrada H_2SO_4 , positiva. (Nota: la estructura del compuesto SbH-2 no se determinó debido a que se aisló como una mezcla de difícil separación. Se determinó que es principalmente una antraquinona no glucosilada).

Compuestos aislados de flores

El compuesto SbF-1 se obtuvo del extracto etéreo de flores en las fracciones 9-14 de la columna percolada con petrol: AcOEt 9:1. Solidifica en forma de polvo blanco con un punto de fusión entre 70 y 72 °C. Dio negativa la prueba para esteroides, flavonoides, antraquinonas y alcaloides. No presentó fluorescencia en el UV. *Características fisicoquímicas*: polvo amorfo de color blanco, solubilidad en CHCl_3 y CH_2Cl_2 , punto de fusión entre 70 y 72 °C. *Espectroscopía ultravioleta*: negativa. *Pruebas químicas cualitativas de identificación*: Lieberman-Burchard, negativa; Salkowsky, negativa.

Interpretación de los espectros del compuesto SbF-1

El espectro IR presenta absorción a 3.400 del estiramiento O-H, absorciones a 2.900 y 2.800 de las vibraciones de estiramiento C-H y absorción a 1.800 del estiramiento CH₂OH.

El ¹HNMR presenta un (t) a 3.6 ppm de 2H del grupo CH₂OH, un (s) a 1.3 ppm que integra para 36H y un (t) a 0.88 ppm, que corresponde a un metilo. Los resultados físicos y espectroscópicos comparados con los obtenidos por Rodríguez (1991) permiten determinar que el compuesto SbF-1 es el eicosanol.

El compuesto SbF-2 se obtuvo del extracto etanólico del marco I de flores que se sometió a fraccionamiento (L/L), del cual se tomó la fracción etérea, cuyo extracto seco se sometió a C.C. y de la quinta fracción eluida con AcOEt se obtuvo de un sólido amarillo que presentó un punto de fusión de 320 °C y dió positiva la prueba para flavonoides. *Características fisicoquímicas*: polvo de color amarillo, solubilidad en AcOEt, petrol AcOEt y MeOH, punto de fusión 320°C. *Espectroscopía ultravioleta*: café, vapores de amoníaco café. *Pruebas químicas cualitativas de identificación*: Shinoda, positiva; cloruro férrico, positiva; H₂SO₄ concentrado, positiva; prueba de antrona, negativa. *Datos espectroscópicos*: UV en MeOH, máx. nm: 253-267-291 Sh y 350; (AlCl₃) 274-300 Sh 356-406; (AlCl₃-HCl) 263 Sh-274-296 Sh-356-387; (NaOMe) 267.6-330 Sh-403; (NaOAc) 265-386; (NaOAc-H₃BO₃) 268-384.

Interpretación de los espectros UV del SbF-2

El espectro UV presenta una banda I a 350 nm, una banda IIa a 267 nm y una banda IIb a 250 nm. La banda se encuentra en el rango de las flavonas y flavonoles (3-hidroxi sustituido). Al adicionar AlCl₃ se presenta un efecto batocrómico en las bandas, lo que indica posible existencia de hidroxilo libre en C-5 o en C-3 o en posición orto en los anillos A y/o B. Al agregar HCl se produce un efecto ipsocrómico parcial con referencia al producido por el AlCl₃, lo cual indica hidroxilos libres en posición C-5 y en posiciones orto. Cuando a la muestra se le agrega MeONa se produce un efecto batocrómico y hiper-

crómico en la banda Ia, lo cual indica hidroxilos libres en C-4' y no en el C-3, por lo que no es un flavonol o puede estar sustituido el hidroxilo en C-3. Al agregar a la muestra AcONa sólido se produjo un efecto batocrómico en ambas bandas, lo cual indica hidroxilos libres en C-7. Al adicionar H₃BO₃ se produce un efecto batocrómico de 30 nm en la banda Ia, lo que señala hidroxilos en posición orto en el anillo B. Los datos físicos y espectroscópicos comparados con las referencias (Mabry, 1970) y un espectro UV patrón del grupo de investigación fitoquímica de la Universidad Javeriana, nos sugiere que el compuesto aislado es la luteolina (3', 4', 5, 7-tetrahidroxiflavona).

DISCUSIÓN

Entre los metabolitos secundarios aislados de las hojas y flores de *S. bicapsularis* se encontraron mezclas de esteroides y dos quinonas, flavonoides y alcoholes compuestos significativos en el crecimiento, metabolismo y ecología de la planta.

Biogenéticamente los esteroides provienen del ácido mevalónico, que por su constitución pueden derivarse de la condensación "cabeza cola" de seis unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) por ciclación, oxidación y eliminación de grupos metilo. Según las correlaciones descritas se encuentran distribuidas en el género *Senna* (Correa y Bernal, 1990).

Las quinonas provienen de dos vías alternas: la del ácido shiquímico y la de las acetogeninas. Éstas contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales, son importantes por sus cualidades tintóreas y algunas poseen un principio purgante y actividades antimicrobianas y antitumorales. En el género *Senna* se han aislado muchas antraquinonas: fision, crisofanol, emodina, aloe-emodina y reina, entre otras.

Los flavonoides que provienen de las acetogeninas son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado (C₆-C₃-C₆) y su localización se haya en numerosos grupos de plantas. El flavonoide aislado es la luteolina, que pertenece al grupo de las flavonas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en el género *Senna*.

REFERENCIAS

- Bolliger HR, Brenner M.** 1965. *Thin layer chromatography*. Laboratory Handbook, Springer, Verlag, Berlín.
- Calderón C.** 1985. *Manual para la interpretación de espectros infrarrojos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cooper J.** 1980. *Spectroscopic techniques for organic chemistry*. John Wiley and Sons, New York.
- Correa J, Bernal H.** 1990. *Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello*. Tomo III. Secab, Bogotá. pp. 253-321, 397, 401.
- Domínguez XA.** 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa, México.
- García Barriga H, Forero González F.** 1968. *Catálogo ilustrado de las plantas de Cundinamarca. Las leguminosas Mimosaceae, Caesalpiniaceae, Papilionaceae*. Volumen III. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 47 p.
- Gómez J, Moreno P.** 1988. *Manual de prácticas de análisis orgánico*. Universidad Nacional de Colombia.
- Hostettmann K, Hostettmann MM.** 1963. *Preparative chromatography techniques. Applications in natural products isolation*. Springer, Verlag, Berlín.
- Mabry TJ.** 1970. *The systematic identification of flavonoids*. Springer, Verlag, Berlín.
- Martínez JC.** 1976. *Aspectos fundamentales de la resonancia magnética nuclear*. Universidad Nacional de Colombia.
- Martínez JC.** 1986. *Evolución de los métodos para la determinación estructural de compuestos orgánicos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Rodríguez OE.** 1991. Estudio fitoquímico de la *Diplostegium phylloides* (HBK) Wedd. Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana.