

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE RAÍCES Y FRUTOS DE *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh var. *bicapsularis*

PHYTOCHEMICAL STUDIES OF ROOTS AND SEEDS ON *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh var. *bicapsularis*

Rafael Valiente<sup>1</sup> y Rubén Torrenegra<sup>2</sup>

### Resumen

La búsqueda de metabolitos secundarios de interés biológico, clínico o farmacéutico, en raíces y semillas de *Senna bicapsularis* (Caesalpinaceae), dio como resultado el aislamiento de 1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metil antraquinona (fisción), 1,8-dihidroxi-3-metil antraquinona (crisofanol) y una mezcla de estigmasterol y dehidroestigmasterol.

*Palabras clave:* *Senna bicapsularis*, Caesalpinaceae, antraquinonas, fisción, crisofanol y mezcla de estigmasterol-dehidroestigmasterol.

### Abstract

Search for secondary metabolites, of biological, clinical or pharmaceutical interest on the seeds and roots of *Senna bicapsularis* (Caesalpinaceae), resulted in the isolation of 1,8-dihydroxy-3-methoxy-6-methyl anthraquinone (physcion), 1,8-dihydroxy-3-methyl anthraquinone (crisophanol) and stigmasterol-dehidrostigmasterol mixture.

*Key words:* *Senna bicapsularis*, Caesalpinaceae, anthraquinones, physcion, crisophanol and stigmasterol-dehidrostigmasterol mixture.

## INTRODUCCIÓN

En el mundo se estudian cada día nuevos exponentes de la flora en procura de la droga ideal, para ser utilizada en la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades que aquejan a la población. El propósito de esta investigación es la búsqueda de principios activos de origen vegetal, en plantas de la costa Atlántica, que puedan poseer actividad biológica, farmacológica y clínica que contribuyan al fomento y desarrollo de la industria farmacéutica del país.

El género *Senna* se caracteriza por tener metabolitos secundarios muy importantes, entre ellos las antraquinonas glucosídicas, antraquinonas libres (emodina, aloe-emodina, fisción, crisofanol) y otros compuestos químicos como flavonoides, terpenos, galactomananos y fitosteroles.

El hecho de que esta especie no haya sido estudiada antes nos motivó a la realización de un estudio fitoquímico de la especie *Senna bicapsularis* (L) Roxburgh de la familia Caesalpinaceae, que crece en la costa Atlántica y específicamente en el departamento del Atlántico. El vulgo le atribuye actividad antibiótica, antipirética y purgante (García y Forero, 1968). Otras especies de este género (*Senna*, *Cassia*) han sido estudiadas en otros países desde el punto de vista químico y se han aislado metabolitos secundarios, tipo antraquinonas flavonoides y esteroides, con actividad biológica, especialmente antimicrobiana (Correa y Bernal, 1990).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el desarrollo de esta investigación fitoquímica se utilizaron técnicas de análisis químico, físi-

Recibido: mayo de 2003; aprobado para publicación: junio de 2003.

<sup>1</sup> Departamento de Química y Biología, Fundación Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. E-mail: rvalient@guayacan.uninorte.edu.co.

<sup>2</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. E-mail: rtorrene@javercol.javeriana.edu.co.

co y espectroscópico. 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 frutos, después de la floración, en la margen izquierda de Lagos de Caujaral, ubicado en el kilómetro 12, en la vía que va de Barranquilla al municipio de Puerto Colombia, por la carretera vieja.

Se realizó la determinación taxonómica en el herbario de la Universidad Tecnológica del Magdalena, donde la especie se encuentra radicada bajo el # 2326 UTM (figura 1). Posteriormente se seleccionaron del material seco los órganos para estudiar (raíces y frutos), se sometieron a molienda y se realizó la extracción con éter de petróleo y luego con EtOH (etanol) en frío, obteniéndose los extractos respectivos. Los extractos se concentraron a presión reducida en un rotavapor tipo flash. Después, los extractos etéreos se concentraron y flocularon con EtOH para precipitar los 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 la purificación de los metabolitos secundarios de cada extracto fueron realizadas utilizando cromatografía de capa delgada (CCD), cromatografía en papel (CP), cromatografía en columna (CC) y cromatografía preparativa (Hostettmann y Hostettmann, 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 Cavitro-Burton, modelo 0315010). Para determinar el tipo de metabolito secundario aislado se realizaron las siguientes pruebas químicas cualitativas: esteroides (Lieberman-Burchard, Salkowski), flavonoides (shinoda, cloruro férrico), glicósidos de



**Figura 1.** *Senna bicapsularis* o *Cassia bicapsularis*: a. hojas, b. flores, c y d. frutos. Fuente: García y Forero, 1968

antraquinonas (antrona), antraquinonas (Borntraeger-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 fusiómetro Mel Laboratory Devices) (Cooper, 1980; Gómez y Moreno, 1988); espectroscopia infrarroja (IR) (los espectros IR fueron tomados en fase sólida en pastillas de KBr, utilizando un espectrofotómetro Perkins Elmer 710B) (Cooper, 1980; Calderón, 1985), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR) (los espectros de resonancia magnética nuclear protónica,  $^1\text{H}$ NMR, se tomaron en un JEOL 90Qa 90 MHz, utilizando como solventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $d_6$ -DMSO y TMS, como referencia interna) (Martínez, 1976; Correa y Bernal, 1990)

### Tratamiento de los extractos

**Extracto etéreo.** Se secaron y molieron 1.000 g de raíces de *S. bicapsularis*, que 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 hasta sequedad para pesarla posteriormente. Del extracto total de raíces se percolaron 5.1 g a través de una columna de vidrio empacada con 150 g de sílica gel 60 G para columna y se eluyó con Petrol, y 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 aproximadamente veinte fracciones de cada mezcla de solvente, y se concentraron y cromatografiaron uniendo las que revelaron igual, con solución de vainillina en ácido sulfúrico. Las fracciones 3 a 12 eluidas con Petrol:AcOEt 8:2 dejaron un residuo amarillento que se lavó con Petrol y se obtuvo un sólido cristalino en forma de agujas blancas que reveló una mancha en CCD, con solución de vainillina en ácido sulfúrico. De esta sustancia se obtuvieron 25 mg, con punto de fusión 137-138 °C, y dio positiva la prueba para esteroides. Se le realizaron pruebas espectroscópicas de identificación (<sup>1</sup>HNMR) y se denominó SbR-1.

Del extracto total de raíces se percolaron 8 g a través de dos columnas de vidrio, empacadas con 150 g de sílica gel 60 G para columna y se eluyó con Petrol y luego con mezclas cada vez más polares de Petrol:AcOEt (9:1, 8:2, 1:1, AcOEt puro y después EtOH). Las fracciones 6 a 10 eluidas con Petrol:acetato 9:1 dejaron un residuo anaranjado, que se lavó con éter y se obtuvo un sólido anaranjado que reveló tres manchas en CCD, con solución de vainillina en ácido sulfúrico. Esta mezcla dio positiva para la prueba de antraquinonas Borntragen-Krauss. Se obtuvieron 32 mg y se le realizaron pruebas espectroscópicas (presentando fluorescencia amarilla con luz UV), IR y <sup>1</sup>HNMR. Se denominó SbR-2.

**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 con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt. De las fracciones 9-20 con la mezcla Petrol:AcOEt 9:1 se obtuvo una mezcla, que fue separada por cromatografía preparativa y de allí se aisló el compuesto anaranjado SbR-3, que presenta fluorescencia amarilla con luz UV y dio positiva para la prueba de antraquinonas Borntragen-Krauss. Se obtuvieron 36 mg y presentó un punto de fusión de 192-194 °C.

Las semillas se secaron a temperatura ambiente durante diez días, se molieron y se pesaron 600 g de material seco. Luego se extrajeron con éter de petróleo por maceración en frío, durante 72 horas. El extracto se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose 60 g. Seis gramos de extracto floculado se percolaron por CC, usando como solvente una mezcla de éter de petróleo:AcOEt 9:1. De las fracciones 8-11 se obtuvieron cristales anaranjados de un compuesto SbS-1, que dieron positivo para la prueba de antraquinonas Borntragen-Krauss. Se le realizaron pruebas espectroscópicas (presentando fluorescencia amarilla con luz UV), IR y <sup>1</sup>HNMR. Se denominó SbS-1 y se obtuvieron 30 mg, que resultaron ser la misma antraquinona obtenida de las raíces SbR-2. Del extracto etanólico del marco I de semillas que se sometió a fraccionamiento (L/L) se tomó la fracción etérea cuyo extracto seco se sometió a CC, usando como solvente una mezcla de éter de petróleo:AcOEt y se obtuvieron cristales anaranjados de un compuesto denominado SbS-2, que fue lavado con Petrol y Petrol:AcOEt 9:1. Presentó fluorescencia amarilla con luz UV y dio positiva para la prueba de antraquinonas Borntragen-Krauss. Se obtuvieron 34 mg y presentó un punto de fusión de 192-194 °C. Esta antraquinona resultó ser la misma SbR-3, aislada de las raíces.

## RESULTADOS

Las sustancias obtenidas en el estudio fitoquímico de raíces de *S. bicapsularis* se denominaron

SbR-1, SbR-2 y SbR-3. En semillas se obtuvo SbS-1 y SbS-2. De ellas, SbR-1 pertenece al grupo de los esteroides. SbS-1 resultó ser la misma SbR-2, y SbR-3 fue la misma SbS-2; son antraquinonas que pertenecen al grupo de las quinonas.

Para la identificación de dichos compuestos se tuvieron en cuenta las siguientes propiedades físicas: color y punto de fusión, cromatografía, eluentes, coloración y revelador. Las pruebas químicas cualitativas fueron: espectroscopia UV, IR, <sup>1</sup>HNMR.

**Compuestos aislados de raíces.** El compuesto SbR-1 se obtuvo en las fracciones 3 a 12, de la columna percolada con Petrol:AcOEt 8:2.

*Características físicas:* cristales aciculares de color blanco, solubles en CHCl<sub>3</sub> y AcOEt, con punto de fusión entre 137 y 138 °C. Pruebas químicas cualitativas de identificación: Lieberman-Burchard positiva y Salkowski: positiva.

*Datos espectroscópicos:* peso obtenido, 25 mg; rendimiento del proceso, 0.5%; <sup>1</sup>HNMR (90 MHz en CDCl<sub>3</sub>, 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 ppm (3H, t, C-22); 5.3 ppm (2H, d, C-23).

**Interpretación del espectro del compuesto SbR-1.** El <sup>1</sup>HNMR 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 <sup>1</sup>HNMR del grupo de Investigación de la Universidad Javeriana, sugieren que el compuesto aislado es una mezcla de estigmasterol y dehidroestigmasterol.

El compuesto SbR-2 se obtuvo de la fracción etérea del fraccionamiento (L/L) del extracto etanólico del marco I. Se tomaron las fracciones 6 a 10

de la columna percolada con Petrol:AcOEt 9:1. Peso del SbR-2 obtenido, 32 mg; rendimiento del proceso, 0.4%.

El compuesto SbR-3 se obtuvo del extracto en EtOH, fraccionamiento L/L del marco 1, en las fracciones 9 a 20, eluidas con Petrol:AcOEt. Peso del SbR-3 obtenido, 36 mg; rendimiento del proceso, 0.6%.

**Compuestos aislados de semillas.** El compuesto SbS-1 se obtuvo en las fracciones 8 a 11, del extracto etéreo de semillas, eluidas con Petrol:AcOEt 9:1. Peso, 6.2 mg; rendimiento del proceso, 0.1%.

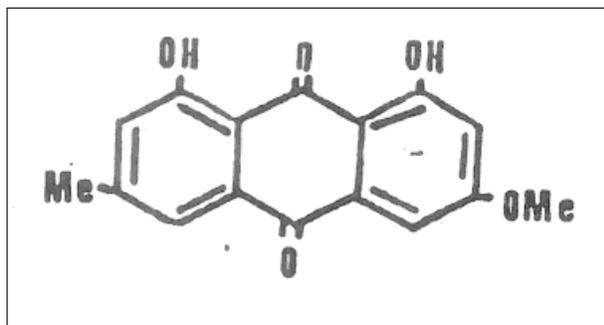
El compuesto SbS-2 se obtuvo en las fracciones 9-12 del extracto etanólico que se sometió a fraccionamiento (L/L), del cual se tomó la fracción etérea de semillas, eluidas con Petrol:AcOEt 9:1. Peso del SbS-2 obtenido, 30 mg; rendimiento del proceso, 0.5%.

**Compuestos SbR-2 y SbS-1.** *Características físicas:* cristales aciculares de color anaranjado, solubles en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona y AcOEt, punto de fusión entre 205 y 207 °C, UV fluorescencia amarilla, vapores de NH<sub>3</sub>, color rojo. *Pruebas químicas cualitativas de identificación:* reacción de Borntrager-Krauss positiva.

**Interpretación del espectro de los compuestos SbR2 y SbS-1.** El espectro IR presenta absorción a 3.400 cm<sup>-1</sup>, característica de las vibraciones de estiramiento O-H; a 2.950 cm<sup>-1</sup>, estiramiento C-H; a 1660 cm<sup>-1</sup>, estiramiento C=C; a 1.620 vibraciones de estiramiento, C=O; a 1.480, flexión C-H; a 1.320, flexión C-H.

El <sup>1</sup>HNMR se observa un (s) a 2.40 ppm, correspondiente a un grupo metilo (aromático); un (s) a 3.90 ppm, que corresponde a un grupo metoxilo; a 6.60 ppm, (d); a 7.1 ppm, 1 (s); a 7.2 ppm, (d); a 7.60 ppm, 1(s). Cada señal representa un hidrógeno ubicado en los anillos aromáticos. En 12.1 y 12.3 ppm, (s) de dos grupos OH. Los resultados espectroscópicos, las constantes físicas y las reacciones químicas comparados con las

referencias Maksut (1983), Kesava (1983), Suraj (1989), Medhi (1994), Harborne (1998), Thomson (1971) y Rodríguez (1991) y un espectro patrón  $^1\text{HNMR}$  del grupo de Investigación de la Universidad Javeriana, llevan a determinar que los compuestos SbR-2 y SbS-1 se tratan de una quinona del tipo antraquinona denominada fisción (figura 2).



**Figura 2.** Estructura de la antraquinona fisción

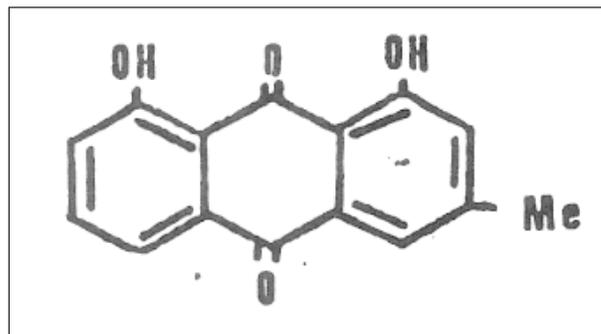
**Compuestos SbR-3 y SabS-2.** *Características fisicoquímicas:* cristales de color anaranjado, solubilidad en AcOEt, punto de fusión 192-194 °C. *Pruebas químicas cualitativas de identificación:* reacción de Borntrager-Krauss positiva.

**Interpretación de los espectros de los compuestos SbR-3 y SbS-2.** El  $^1\text{HNMR}$  presenta un (s) a 2:4 ppm, que corresponde a un grupo metilo; de 7 a 8 ppm, múltiples señales de los hidrógenos ubicados en los anillos aromáticos; en 12 y 12.1 ppm (s), correspondiente a los hidrógenos del grupo OH (aromáticos).

Los resultados físicos y espectroscópicos, las constantes físicas y las reacciones químicas comparadas con las referencias Maksut (1983), Kesava (1983), Suraj (1989), Medhi (1994), Harborne (1998) y Thomson (1971), llevan a determinar que el compuesto Sb-S2 es una quinona del tipo antraquinona, denominada crisofanol (figura 3).

## REFERENCIAS

**Bolliger HR, Brenner M.** 1965. *Thin layer chromatography: a laboratory handbook.* Springer, Verlag, Berlin.



**Figura 3.** Estructura de la antraquinona crisofanol

## DISCUSIÓN

En este estudio se encontraron entre los metabolitos secundarios aislados de las raíces y semillas de *Senna bicapsularis*, mezclas de esteroides y dos quinonas importantes (fisción y crisofanol), características de esta especie, que además son compuestos importantes en el crecimiento, el metabolismo y la ecología de la planta.

Biogénicamente 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, las 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: fisción, crisofanol, emodina, aloe-emodina y reína, entre otras.

**Calderón C.** 1985. *Manual para la interpretación de espectros infrarrojos.* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- 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, pp. 253-321, 397, 401. Ed. SECAB, Bogotá.
- Domínguez XA.** 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa, México.
- Duke JA.** 1992. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. Boca Raton, FL, CRC Press.
- García-Barriga H, Forero F.** 1968. *Catálogo ilustrado de las plantas de Cundinamarca. Las leguminosas Mimosaceae, Caesalpinaceae, Papilionaceae*. Vol. III, p. 47. Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Gómez Marco J, Moreno P.** 1988. *Manual de prácticas de análisis orgánico*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Harborne JB.** 1998. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Kluwer Academic Publishers. London, New York.
- Hostettmann K, Hostettmann MM.** 1963. *Preparative chromatography techniques applications in natural products isolation*. Springer, Verlag, Berlin.
- Kesava BR.** 1983. Anthraquinones in Ventilago species. *Phytochemistry* 22:2.583.
- Mabry TJ.** 1970. *The systematic identification of flavonoids*. Springer, Verlag, Berlin.
- Maksut C.** 1983. *Phytochemistry* N.º 23, p. 1.485. Anthraquinone glucoside from Phamnus Pallas.
- Martínez JC.** 1976. *Aspectos fundamentales de la resonancia magnética nuclear*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Martínez JC.** 1986. *Evolución de los métodos para la determinación estructural de compuestos orgánicos*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Medhi HK.** 1994. An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry* 35:761-763.
- Müller SO, Dekant W, Stopper H, Lutz WK.** 1997. Detection of the anthraquinones physcion and chrysophanol in vegetables, and mutagenicity in mouse lymphoma cells. *Fundam Appl Toxicol* 36 (suppl.):234.
- Rodríguez ÓE.** 1991. Estudio fitoquímico de la *Diplostephium phylloides* (HBK) Weed. Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Strasburger E.** 1974. *Tratado de botánica*. Edit. Marín, Barcelona.
- Suraj BK.** 1989. Structural elucidation in anthraquinone, using <sup>1</sup>HNMR, G1 and cosylation and alkylatio shifts. *Phytochemistry* 28:3.459.
- Thomson RH.** 1971. In naturally occurring quinines p. 388. 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press. New York.
- Yash K.** 1998. *Handbook of reference methods for plant analysis*. Editor Press CRC. New York.