

CITOTOXICIDAD DE LOS COMPONENTES DE *Palicourea ovalis*

*Lucía Arteaga de García**, *Carlos Francisco Tobón** y *Campo Elías Mora**.

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. A.A 14490. Bogotá. Colombia.
E-Mail larteaga@ciencias.ciencias.unal.edu.co.

RESUMEN

De las flores y frutos de *Palicourea ovalis* se aislaron 4 alcaloides, uno de los cuales se identificó como calicantina, un derivado de la isoquinolina. Calicantina se identificó inequívocamente mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos. La citotoxicidad de los alcaloides se determinó en células VERO-YARU y se encontró que presentan una citotoxicidad comparable a la del 2,4-dinitrofenol.

Palabras o Frases Claves: Calicantina –Alcaloides– Citotoxicidad-*Palicourea ovalis*

SUMMARY

CITOTOXICITY OF THE CONSTITUENTS OF *Palicourea ovalis*.

Calycanthine an isoquinoline alkaloid, as well as other three non identified alkaloids were isolated from the flowers and fruits of *Palicourea ovalis*. Calycanthine was unequivocally identified by means of spectroscopic methods, being the first time that the data on ¹³C nmr are reported. Citotoxicity of the alkaloids was determined on VERO-YARU cells, showing some of the alkaloids a citotoxicity comparable with 2,4-dinitrophenol.

Key Word or Phrases: Calycanthine-Alkaloids-Citotoxicity-*Palicourea ovalis*

INTRODUCCION

Las plantas del género *Palicourea* al cual pertenece *P. ovalis* contienen alcaloides derivados del indol y de la quinolina y presentan potencial como antiparasitarios y citotóxicos (1,2). Por esta razón, dentro del proyecto de plantas antiparasitarias y citotóxicas se escogió esta planta por la correlación quimitaxonómica que presenta alcaloides de tipo quinolínicos y por ser un género no muy abundante en Cundinamarca. En el presente trabajo

se realizó el aislamiento y caracterización de la fracción alcaloidal y se evaluó la toxicidad en células VERO-YARU de extractos, fracciones y compuestos puros.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

La planta se recolectó en el Km. 40 de la carretera Bogotá- La Vega y un espécimen se clasificó en el Instituto de Ciencias Naturales. Herbario Nacional colombiano de la Universidad Nacional de Colombia como *Palicourea ovalis*. Un ejemplar de la planta se encuentra depositado en el Herbario. La planta se secó en una estufa de aire circulante a 40°C, se molió y empacó en un frasco hermético protegido de la luz.

Extracción y aislamiento de los alcaloides.

Antes de la extracción se determinó la presencia de alcaloides en las hojas, las flores y los frutos de la planta, mediante pruebas de gota con reactivo de Dragendorff y cromatografía en capa delgada (CCD) sobre sílica gel, utilizando CHCl₃: MeOH, NH₄OH al 25% (9:1:0.1) como eluyente y Reactivo de Dragendorff como revelador. Las flores y frutos mostraron presencia de alcaloides, con una composición semejante. Por este motivo se seleccionaron estas partes de la planta para la extracción de los alcaloides. El material vegetal pulverizado se desengrasó mediante extracción exhaustiva con éter de petróleo. El residuo desengrasado de la extracción se humedeció con NH₄OH al 25% y se extrajo con 3 porciones de CHCl₃. La fase clorofórmica se extrajo con 3 porciones de HCl al 5%. La fase ácida se alcalinizó con NH₄OH al 25% hasta pH 10 y se extrajo nuevamente con 3 porciones de CHCl₃. La fase clorofórmica se secó por adición de Na₂SO₄ anhidro. El cloroformo se evaporó en un evaporador rotatorio, obteniéndose una fracción cruda de alcaloides. El rendimiento con respecto al peso de planta seco fue de 0.77%.

Recibido para su publicación: 4 de septiembre de 1997

Aprobada su publicación: 12 de septiembre de 1997

Los alcaloides se separaron en una columna abierta de sílica gel G 60, eluyendo con mezclas de solventes de polaridad creciente desde éter de petróleo (1:1) hasta CHCl_3 : MeOH (7:3). Las fracciones se monitorearon por CCD en sílica gel utilizando como eluyente CHCl_3 : MeOH, NH_4OH al 25% (8:2:0.1). Se obtuvieron 5 fracciones, las cuales se purificaron mediante la preparación de los clorhidratos, haciendo pasar HCl gas seco a una solución en éter etílico de los alcaloides. Los clorhidratos cristalinos formados se separaron por filtración, se disolvieron en agua, y las bases libres se regeneraron por adición de NH_4OH al 25% hasta pH 10. y posterior extracción con CHCl_3 , secado con Na_2SO_4 y evaporación del CHCl_3 . Una de las 5 fracciones separadas, contenía un sólo alcaloide, las otras fracciones eran mezclas de por lo menos 3 alcaloides. El alcaloide se identificó por medio de sus espectros ir y uv, ^1H , ^{13}C nmr, DEPT y em.

Determinación de la citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó sobre células VERO-YARU (fibroblastos de riñón de mono verde africano) obtenidas de Yale Arbovirus Research Unit. New Heaven, Connecticut. Las células se mantuvieron en el laboratorio en fase logarítmica de crecimiento en medio MEM Dulbecco's con 10% de suero fetal bovino (SFB) a pH 7.2. y se subcultivaban tres veces por semana. Para el ensayo, se obtuvo una suspensión de células por tripsinización de la monocapa. Se contaron las células en una cámara de Neubauer utilizando azul de Tripán y se ajustó el número a 600 000/mL, de modo que el número de células por pozo en el ensayo fuera de 30 000. Las sustancias a ensayar, se dispensaron en los pozos en 8 concentraciones (500, 250, 125, 62,5... ,3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cada una con tres réplicas, 3 columnas se dosificaron con solvente a las mismas concentraciones utilizadas en las muestras y tres con 2, 4-dinitro fenol a concentraciones de 500 a 3,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el cual fué usado como control positivo. Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C, luego se retiró el medio de cada pozo, la monocapa celular se lavó 3 veces con 100 μL PBS y luego se añadió a cada pozo 200 μL de solución de Rojo Neutro (RN) que contenía 70 mg/mL. Después de 3 horas de incubación a 37°C se retiró la solución de RN de los pozos, se lavaron 3 veces con PBS y se adicionó a cada pozo 200 μL de ácido acético al 1% en etanol, para solubilizar el RN retenido por las células viables. Se midió la absorbancia a 540 nm en un Multiskan

MCC/340 y en una curva de calibración previamente establecida se calculó el número de células viables en cada concentración y la CL_{50} con 95% de confianza, utilizando un programa PROBIT. Los experimentos se llevaron a cabo en tres días diferentes y la correlación fue siempre buena. (3)

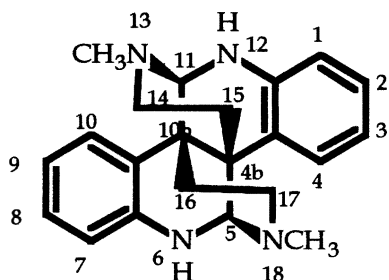
RESULTADOS Y DISCUSION

De una de las fracciones de los alcaloides purificados fue posible identificar uno de los alcaloides presentes como calicantina [1]. Para este compuesto el espectro ir mostró bandas asignadas a N-H (3417 cm^{-1}), C-H aromático (3022, 3050, 1605, 1583 y 1495 cm^{-1}), C-H alifático (2800, 2849, 2927, 1443 cm^{-1}). El espectro de rnm de ^1H mostró una señal para N-H a δ 4,3 ppm, un singlete a δ 2.4 ppm debido al grupo N- CH_3 , varias señales que integran para 5 protones entre δ 2,4 a 3 ppm y entre δ 6 a 7.1 señales para 4 protones aromáticos. Los espectros de rnm ^{13}C y DEPT de [1] mostraron un grupo metilo a δ 42.5, correspondiente al N- CH_3 , dos metilenos a δ 31.8 (C15 y C16) y 46.5 (C14 y C17), un metino a 71.1 (C5 y C11) y un carbono sp^3 cuaternario a δ 36 ppm (C4b y C10b), cuatro C-H sp^2 a 126.69, 124.12, 116.43 y 112.12 correspondientes a los 4 C aromáticos y dos C cuaternarios a δ 145.58 (C6a y C12a) y 125,21 (C4a y C10a) ppm. (4)

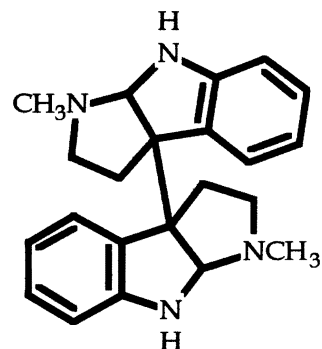
El em mostró un ión molecular de 376 um, lo que corresponde a la fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4$. Sin embargo, en el espectro de ^{13}C sólo se observan señales para 11 carbonos, lo que indica que la molécula es simétrica y cada señal en rnm ^{13}C corresponde a dos carbonos.

Las dos estructuras más probables con esas características espectroscópicas son calicantina [1] y chimonantina [2]. Mediante el em fue posible identificar el alcaloide como calicantina, ya que el pico base es el ión molecular y el M-173 no es significativo. El em de chimonantina muestra un ión molecular de baja intensidad y el pico M-173 es el pico base. Estas diferencias son debidas a la facilidad de ruptura entre los dos carbonos cuaternarios en la molécula de chimonantina, lo cual no es posible en calicantina. (5)

Los ensayos de citotoxicidad mostraron los siguientes resultados: La CL_{50} del extracto alcohólico de *P. ovalis* fue $112 \pm 26.9 \mu\text{g}/\text{mL}$, calicantina $125.8 \pm 25.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ y uno de los alcaloides (no identificado todavía) $71.0 \pm 37.6 \mu\text{g}/\text{mL}$, 2,4-dinitrofenol $76 \pm 33 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados indican que la citotoxicidad del extracto de *P. ovalis* es debida en gran medida a uno de los alcaloi-



[1]



[2]

des presentes, mientras que la calicantina es menos tóxica. También es posible inferir que estos compuestos presentan una toxicidad alta, lo cual los hace poco útiles como candidatos a estudios antimaláricos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al programa de investigación "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas" financiado por COLCIENCIAS, por el apoyo para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. J.D. Phillipson, and M.H. Zenk "Indole and Biogenetically Related Alkaloids". Academic Press. 1980 p 67-83,

2. W. Hui and C. Yee, *Phytochemistry*. **6** 441-442 (1967).
3. B.L. García y B.C. Quevedo. Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de extractos vegetales con actividad antimalárica. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Departamento Farmacia, Bogotá, 1989, 80 pp.
4. F. Libot, C. Miet, N. Kunesch, J.E. Poisson, J. Pusset et T. Sévenet, *J. of Nat. Prod.* **50**(3) 467-473 (1987).
5. H. Budzikiewicz, C. Djerassi and D. Williams, "Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry" Holden Day Inc., 1964, Vol 1, p. 162-172.