

ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA CORTEZA DE *Rapanea guianensis* AUBL DET. WORDSCK

Ma. Teresa Reguero*
Jairo Calle*
Rachel Mata **

RESUMEN

De la corteza de *Rapanea guianensis* Aubl. det Wordsck se aislaron: embelina (Ia) y rapanona (Ib), las cuales fueron identificadas por sus constantes químicas y espectroscópicas y por la formación de derivados. Se probó la actividad antimicrobiana de la rapanona contra microorganismos Gram (+), Gram (-), *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Asimismo se realizó una prueba preliminar de su actividad antipalúdica "in vitro", utilizando una cepa de *Plasmodium falciparum*; F.C.B.1., resistente a cloroquina.

SUMMARY

The hidroxybenzoquinone derivatives in bark of *Rapanea guianensis* Aubl det. Wordsck were examined and the presence of embelin (Ia) and rapanone (Ib) were reported. Antimicrobial activity was investigated and showed activity against Gram (+), Gram (-) bacteria, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Besides a preliminar "in vitro" microtest for activity against *Plasmodium falciparum* F.C.B.1. resistant to chloroquine was made.

INTRODUCCION

La *Rapanea guianensis* Aubl det. Wordsck (Myrsinaceae) recibe los nombres de camaguillo, chagualito y cucharo en Colombia (1) y se le reporta uso en Medicina Popular como un eficiente antiséptico (2).

Taxonómicamente el género *Rapanea* se encuentra estrechamente relacionado con los géneros *Embelia*, *Myrsine*, *Ardisia* y *Maesa* (3,4). Desde el punto de vista fitoquímico no se ha descrito ningún trabajo previo para la *Rapanea guianensis*, sin embargo varias especies de la Familia Myrsinaceae, incluyendo

otras especies de *Rapanea*, han sido investigadas químicamente y la mayoría de estos trabajos describen el aislamiento e identificación de alquilhidroxibenzoquinonas como principales metabolitos secundarios presentes en estas especies. Ejemplos representativos de estas estructuras se ilustran en la Figura No. 1.

METODOLOGIA

Material vegetal

El material vegetal se colectó en la vereda de Bóchica alta, municipio de Fusagasugá, Colombia y un ejemplar reposa en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el voucher No. 243941.

Método de extracción.

676 g de corteza seca y finamente pulverizada se extrajeron con éter de petróleo hirviendo a reflujo y posteriormente con etanol, en las mismas condiciones.

Aislamiento y purificación del Producto I

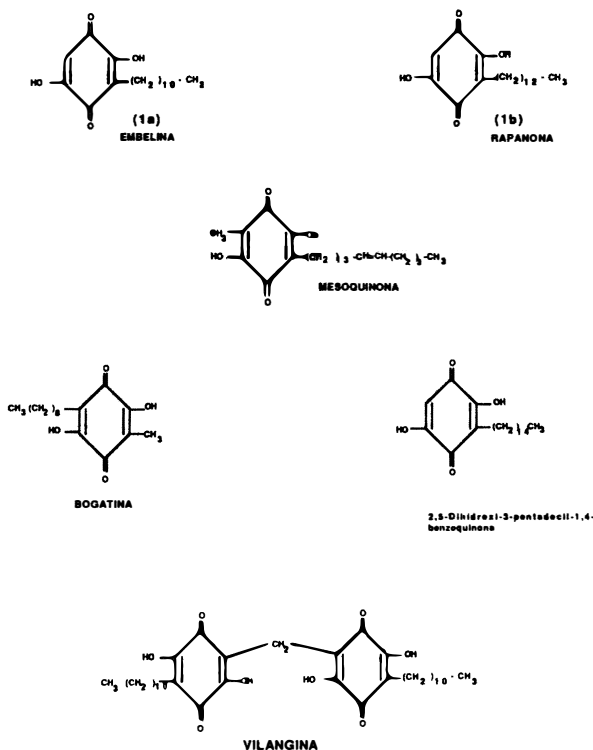
Del extracto de éter de petróleo, se obtuvo un producto I, como unos cristales en forma de agujas de color anaranjado. Este compuesto presentó un punto de fusión de 130–132°C y del cual se obtuvieron 2.81 g.

Del extracto etanólico se tomaron 41 g para efectuar una partición agua-acetato de etilo; agua-cloroformo y agua-benceno. Los sistemas disolventes para la extracción fueron seleccionados de acuerdo a la literatura (5,6). Del proceso de partición, el que se efectuó con acetato de etilo resultó el más adecuado, ya que al evaporar el disolvente se obtuvo un residuo color café-naranja, que al ser recrystalizado de benceno dió un sólido amarillo-naranja que fundió entre 130–132°C, de idénticas características tanto físicas como espectroscópicas al producto I.

* Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo No. 14490, Bogotá, Colombia.

** Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales, División de Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de México.

FIGURA No. 1 Hidroxibenzoquinonas aliladas de diferentes especies pertenecientes a la familia Myrsinaceae



Análisis cromatográficos.

Para realizar los análisis cromatográficos en capa delgada, se utilizaron diversos eluyentes (AcOEt - EtOH, 1:1; AcOEt - MeOH- H₂O, 77:13:10; AcOEt-EtOH-H₂O, 5:3:2; CHCl₃-ácido acético 9:1; benceno-CHCl₃-AcOEt- ácido acético 5:5:3:1; benceno-AcOEt 9:1; benceno), sulfato cérico amónico como agente cromogénico y placas de vidrio cubiertas con gel de sílice impregnadas o no con ácido oxálico.

Caracterización del producto I.

Al producto se le determinaron sus constantes físicas y espectroscópicas (IR, RMN¹H, UV, EM) y de acuerdo a la información obtenida de ellas se procedió a la obtención de derivados metilados (Producto II); acetilados a través de dos técnicas diferentes (Producto III y IV); dímero (Producto V) y oxidación (Producto VI). El diagrama general de los derivados del producto I puede observarse en la Figura No. 2.

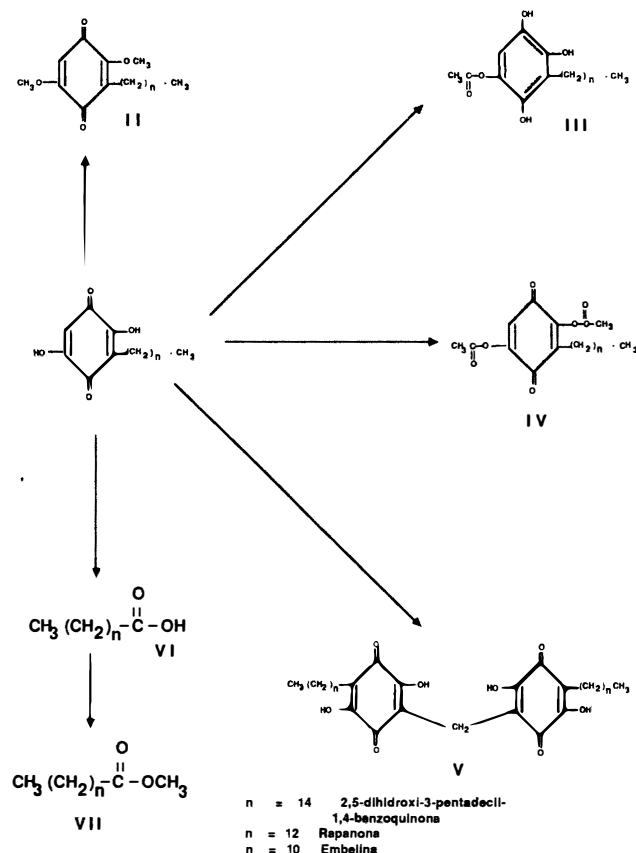
Obtención del derivado metilado: a 45 mg del producto I en 10 ml de éter etílico, se adicionó un exceso de solución etérea de diazometano. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 28 hr. Al cabo del tiempo señalado se obtuvieron 40 mg de un compuesto color amarillo claro (Producto II) en forma de agujas finas que funden entre 43-46°C.

Obtención del derivado acetilado: Método I. Se emplearon 0.5 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina por cada 50 mg de materia prima. La mezcla de reacción se dejó por 12 horas a temperatura ambiente. Al terminar la reacción, el crudo resultante se procesó de la manera habitual, obteniéndose 20 mg de un polvo amarillo (Producto III) de punto de fusión 51-53°C. **Método II.** A 100 mg del producto I se agregaron 2 ml de anhídrido acético y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La solución se hirvió a reflujo durante algunos minutos. El derivado acetilado fue separado con agua de hielo y extraído con éter etílico, obteniéndose 30 mg de polvo amarillo (Producto IV) y fundió a 48-50°C.

Formación del derivado dimérico. Se tomaron 100 mg del producto I y se disolvieron en 3 ml de ácido acético caliente. A la solución anterior se le adicionaron 0.6 ml de formaldehído (7), formándose de inmediato 31 mg de un sólido color amarillo naranja (Producto V) que fue recristalizado de dioxano. El producto obtenido se descompone a 220°C,

Oxidación. A una solución del producto I (50 mg) en KOH 1N, se adicionaron 4 ml de peróxido de hidrógeno, bajo calentamiento suave a baño de María. Después de 3 horas, la mezcla de reacción fue acidificada y extraída con éter etílico. La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Al evaporar el disolvente, se obtuvo un producto semisólido (Producto VI) el cual fue metilado posteriormente con diazometano (Producto VII).

FIGURA No. 2. DERIVADOS DE RAPANONA, EMBELINA Y 2,5-DIHIDROXI-3-PENTADECIL-1,4-BENZOQUINONA



Estudio microbiológico.

Paralelamente al estudio fitoquímico se efectuó una prueba biológica al producto I para constatar, que las propiedades antisépticas atribuidas a esta planta (2). Para tal efecto se realizó un estudio microbiológico, que incluyó utilizar como microorganismos de prueba un grupo de bacterias Gram (+) y un grupo de bacterias Gram (-), una levadura y un hongo. La metodología utilizada fue la reportada por Sannabria y colaboradores (8).

Prueba como antipalúdico.

Tomando en consideración los recientes informes (9) sobre la actividad antipalúdica de compuestos químicos como las hidroxinaftoquinonas, relacionados estructuralmente con los aislados en el presente trabajo, se decidió efectuar una microprueba preliminar para medir su actividad antipalúdica, utilizando *Plasmodium falciparum* F.C.B.1., como organismo de prueba y una microtécnica de cultivo "in vitro" reportada por Rieckman y colaboradores (10).

DISCUSION

El comportamiento cromatográfico del producto I, utilizando los distintos eluyentes, parecía indicar "a priori" la presencia de un solo compuesto. Su espectro de IR mostró bandas para grupos hidroxilo (3309 cm^{-1}), carbonilo de dicetona conjugada (1614 cm^{-1}), metilos y metilenos ($2920, 2849$ y 1464 cm^{-1}).

Los máximos de absorción en UV λ_{max} , en MeOH ($\log \epsilon$) nm: 206 (0.5757) 294 (0.60166), 498 (0.02719); la coloración observada al tratar el producto con un alcali, la solubilidad en benceno y la información del espectro de IR, sugirieron que el producto I, era de naturaleza hidroxibenzoquinoides.

La obtención de los derivados diacetilado IV y dimetilado II, confirmaron que el producto I era dihidroxilado, más específicamente 2,5-dihidroxilado, de acuerdo con los máximos de absorción observados en el UV. Las constantes espectroscópicas de los derivados se resumen en la Tabla No. 1 y sus estructuras en la Figura No. 2.

TABLA No. 1 . PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DE LOS DERIVADOS HIDROXIQUINOIDES

DERIVADO	PUNTO DE FUSION	RMN ^1H (80 MHz CDCl_3 , ppm)
METILADO (Producto II)	43-46°C	5.6 (s, 1H, H-6), 3.7 (2s, 6H, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 2.3 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.25 (s, 22H, $-\text{CH}_2-$), 0.8 (t, 3H, $-\text{CH}_3$)
ACETILADO (Producto III)	51-53°C	11 (s, 1H, OH), 7.20 (s, 1H, H-6), 2.3 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 2.3 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$), 1.25 (s, 22H, $-\text{CH}_2-$), 0.8 (t, 3H, $-\text{CH}_3$).
ACETILADO (Producto IV)	48-50°C	6.4 (s, 1H, H-6), 2.3 (t, 2H, $-\text{CH}_2-$), 2.3 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-COO-}$), 1.25 (s, 22H, $-\text{CH}_2-$), 0.8 (t, 3H, $-\text{CH}_3$)

Por lo que se refiere a la microprueba preliminar que se realizó para determinar su posible actividad antipalúdica, utilizando una cepa resistente a cloroquina de *Plasmodium falciparum* F.C.B.1, sincronizada en la fase de anillos, los resultados obtenidos en

este estudio indican que posee una muy débil actividad, cuando se emplea una dilución de 500 ug/ml por lo que no se justificó continuar el ensayo a diluciones menores.

BIBLIOGRAFIA

1. PEREZ ARBELAEZ E., "*Plantas Útiles de Colombia*", Contraloría General de la República., p. 340 Bogotá (1942).
2. PEREZ ARBELAEZ E., "*Plantas Medicinales y Venenosas de Colombia*", Hernando Salazar Edit., p. 420 Medellín (1975).
3. LAWRENCE G.M., "*Taxonomy of Vascular Plants*" The MacMillan Co, pág. 656, USA (1951).
4. BHARGAVA, S.K., DIXIT V.P., *Plant. Med. Phytother.*, 19, (1), 29 (1985).
5. DOMINGUEZ, X., "*Métodos de Investigación Fitoquímica*", Edit. Limusa, pag. 161 (1973).
6. OGAWA, H., NATORI, S., *Chem Pharm. Bull.*, 13, 511 (1965).
7. RAO, CH. B., VENKATESWARLU V., *Tetrahedron*, 18, 951 (1962).
8. SANABRIA, A., MANTILLA, J.R., *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, No. 15, 17 (1986).
9. "Scientific Working Group on the Chemotherapy of Malaria". Third Programme Review. World Health Organization, Geneva, 3-5 June (1985).
10. RIECKMAN, KH., SAX, L.J., CAMPBELL, G.H., MREMA, J.E., *Lancet*, 1, 22 (1978).