

**INTRODUCCION AL ESTUDIO FITOQUIMICO DE
CHLOROLEUCON MANGENSE**

(JACQ) BRIT & ROSE

Resumen del trabajo de tesis presentado por MARIO JARAMILLO C.,
como un requisito parcial para optar al grado de Doctor en
Farmacia.

Presidente de Tesis: Dr. JUAN F. THEILKUHLE.

INTRODUCCION

INTERES Y OBJETO DEL TRABAJO

El interés que nos ha inducido a realizar este modesto trabajo radica en las aplicaciones medicinales empíricas que de esta planta hacen en una extensa región que comprende parte de los departamentos de Norte de Santander y Magdalena.

Desde época difícil de precisar, la decocción de las hojas, ocasionalmente mezcladas con fragmentos de tallos jóvenes, flores o frutos, de esta planta, impropiaemente llamada dividivi, ha sido empleada por el pueblo en el tratamiento de las úlceras gástrica y duodenal, según se dice, con comprobada eficacia; se sostiene también que son numerosos los casos de cáncer del tracto gastrointestinal que han cedido plenamente con esta terapia.

Los frutos desecados y pulverizados, se aplican localmente en ulceraciones y heridas del ganado, con notable efecto cicatrizante.

Nuestro objeto de tratar algunos aspectos químicos de la planta, ha sido el de buscar principios activos que puedan ser responsables de las propiedades terapéuticas que se le atribuyen.

Expresamente hemos hecho énfasis, tanto en la parte teórica como en la experimental, en lo tocante a las saponinas, uno de los constituyentes de la planta, ya que varias investigaciones coinciden en este punto, dándole así apoyo a las virtudes medicinales de

que goza el dividivi. Al respecto nos referimos en el curso del presente trabajo.

Queremos, pues, con este mínimo aporte iniciar el estudio que permita apreciar en forma objetiva el valor terapéutico de la planta.

CHLOROLEUCON MANGENSE

(JACQ.) BRIT & ROSE

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

A) CLASIFICACIÓN.

B) CARACTERES.

C) HABITAT.

A) Clasificación.

Reino: Vegetal.

Clase: Angiospermae.

Subclase: Dicotiledoneae.

Orden: Rosales.

Familia: Leguminosae.

Subfamilia: Mimosoideae.

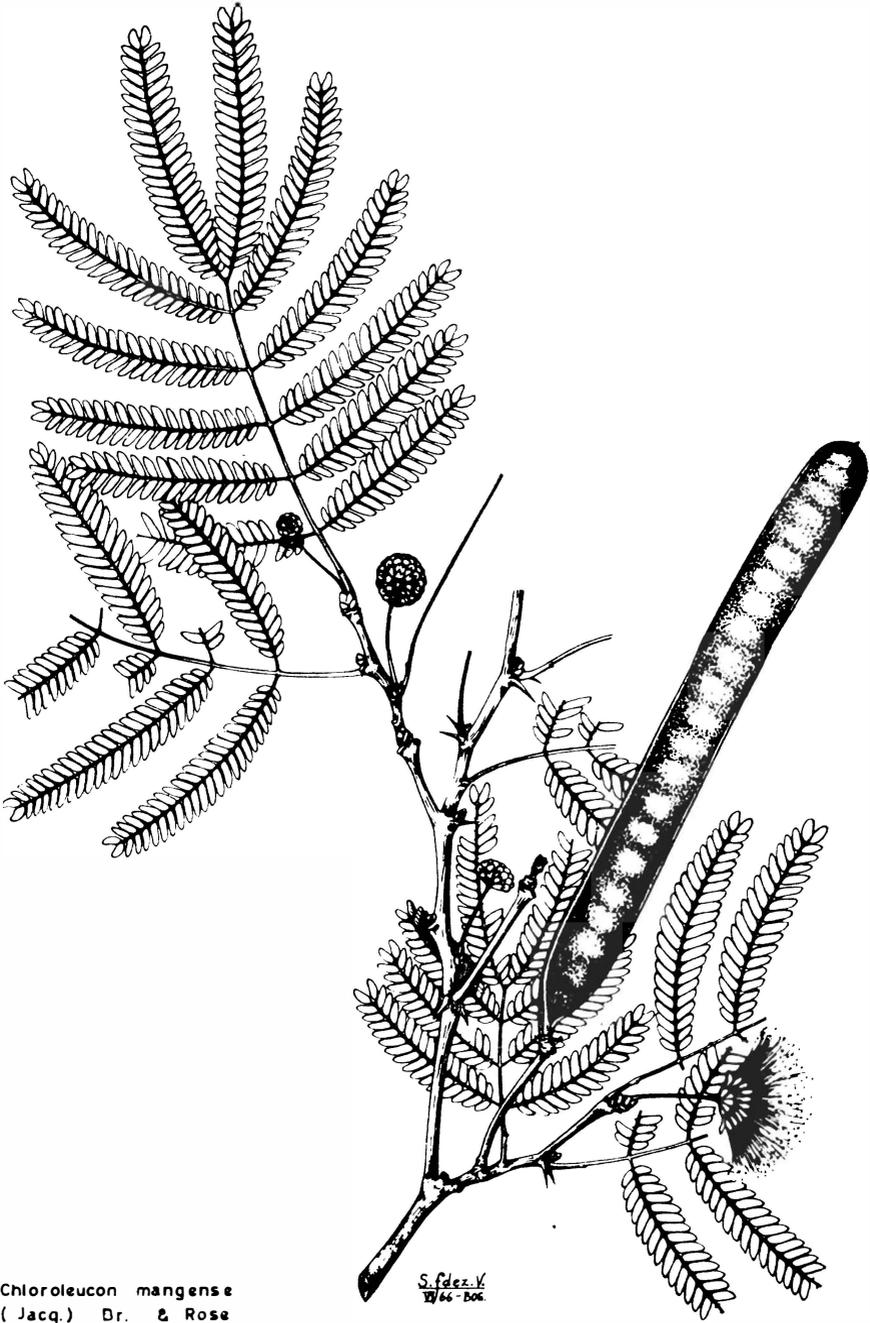
Género: Chloroleucon.

Especie: Chloroleucon mangense.

B) Caracteres.

Chloroleucon mangense (Jacq.) Brit & Rose, es un árbol de 4 a 10 metros de alto, de hojas alternas de 6-10 cm de largo; pinnas de 4 cm, paripinnadas; folíolos oblongos de 7 mm de largo, y 1,5 mm de alto; pecíolo glandular; espinas estipulares presentes. Frutos en legumbre, inflorescencias en cabezuelas densas de más o menos 1,5 cm de diámetro; los pedúnculos de la inflorescencia de 2 cm de largo; flores cortamente pediceladas.

Posee dos clases de flores: dos flores del centro de la cabezuela que presentan un tubo de estambres de 10 mm, y poseen las siguientes medidas: longitud del cáliz, 2,5 mm; longitud de la corola, 6,4 mm; longitud total de los filamentos, 13,8 mm. Tanto los sépalos como los pétalos están unidos. Tanto el cáliz como la



Chloroleucon mangense
(Jacq.) Dr. & Rose

FIGURA 1.

corola tienen 5 lóbulos o dientes. Posee 15-20 estambres. La longitud del ovario es de 1 mm, y la longitud del estilo es de 13 mm. La segunda clase de flores tiene las siguientes medidas: longitud del cáliz, 2 mm; longitud de la corola, 4 mm; longitud total de los filamentos, 13 mm. Tanto los sépalos como los pétalos están unidos. Tanto el cáliz como la corola tienen 5 lóbulos o dientes. Posee 15 estambres. La longitud del ovario es de 1,5 mm y la longitud del estilo es de 14 mm. (1).

La planta fue descrita por vez primera en el año de 1760 por el botánico Nicolás José Jacquin, bajo el nombre de *Mimosa mangensis*; más tarde, en el año de 1928, los botánicos Britton y Rose probaron que la planta no pertenecía al género *Mimosa* sino a *Chloroleucon*, y la transfirieron a este último género. De acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica que exige la conservación del epíteto específico (en este caso "mangense") cuando se traslada un nombre a otro género, el nombre definitivo y único de la planta es *Chloroleucon mangense* (Jacq.) Brit & Rose, y no *Mimosa mangensis*.

Otros sinónimos de la especie son: *Mimosa parvifolia*, *Inga mathae*, *Pithecolobium parvifolium* y *Enterolobium mangense*.

El género *Chloroleucon* está representado en Colombia únicamente por las especies *Chloroleucon mangense* y *Chloroleucon bogotense* (2).

C) *Habitat*.

Chloroleucon mangense está restringida a la costa del Caribe, en los Departamentos del Atlántico, Bolívar y Magdalena, y crece en los pisos térmicos comprendidos entre el nivel del mar y los 200 metros de altura. Se le conoce por los nombres vernáculos de "vainilla, carbonero, dividivi y hoyo de zorro" (2).

ASPECTOS FITOQUIMICOS

Operaciones preliminares.

Recolección. La planta (tallos jóvenes con hojas compuestas de raquis, raquillas y folíolos), fue recolectada en el punto de Pantanitos, entre los sitios de Platanal y Totumal en el Departamento del Magdalena.

Secamiento. Las hojas (raquis, raquillas y folíolos) parte empleada en el presente trabajo, se desprendieron de los tallos

jóvenes, se libraron de materias extrañas, y extendidas en bandejas se sometieron a secamiento en estufa, durante 52 horas a una temperatura promedio de 38° C.

Esta operación tuvo por objeto estabilizar el material y llevarlo a una consistencia apropiada para su molienda.

Molienda y tamizado. Los folíolos se molieron y tamizaron solos; los raquis y las raquillas se molieron y tamizaron en conjunto. La molienda se efectuó a mano en un molino corriente.

Después de las operaciones anteriores, se reunieron los dos polvos y se mezclaron bien. Para determinar el grado de finura del polvo resultante, se sometió a la prueba indicada por la U.S.P., edición XVI, página 932.

La prueba no reunió las exigencias para el polvo número 40 (moderadamente grueso), pues pasó más del 40% por el tamiz N° 80, por lo cual puede considerarse como ligeramente más fino.

Determinación de la humedad. Dos muestras, previamente pesadas, se sometieron a una temperatura de 45° C, al vacío, hasta peso constante (8 horas), dando una muestra 2% de humedad, y la otra 1,86%, lo que da un promedio de 1,93% de humedad.

Investigación de sustancias reductoras. Antes de efectuar la marcha analítica, se determinaron principios solubles en el agua, en este caso sustancias reductoras, a partir del material vegetal mezclado con agua previamente neutralizada, llevando a ebullición y filtrando. El filtrado presentó un color amarillo ambarino, de aspecto turbio y de olor sui géneris y dio un pH de 5,5 tomado con papel indicador universal.

En este filtrado se hizo el ensayo para azúcares por el método descrito por Calderón G. E. (3). Se efectuó el tratamiento ordenado con los acetatos de plomo neutro y básico, el resultado fue negativo tanto para azúcares reductores antes de la inversión como después de ella. Sin embargo, al efectuar solo la primera precipitación con acetato neutro de plomo se presenta reducción del reactivo de Fehling después de la inversión; de lo cual se puede deducir que, en el material vegetal ensayado no hay azúcares reductores ni disacáridos con unión dicarbonílica susceptibles de ser hidrolizados por el ácido clorhídrico al hacer la doble precipitación con las sales de plomo. En el segundo ensayo solo se hizo precipitación con la sal neutra y luego de hidrolizar con ácido clorhídrico, se presentó reducción, lo que indica la presencia de Heterósidos.

Marcha analítica

Para la marcha analítica se siguió el esquema propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el cual nos permitimos ampliar a partir del *Residuo B*. (4).

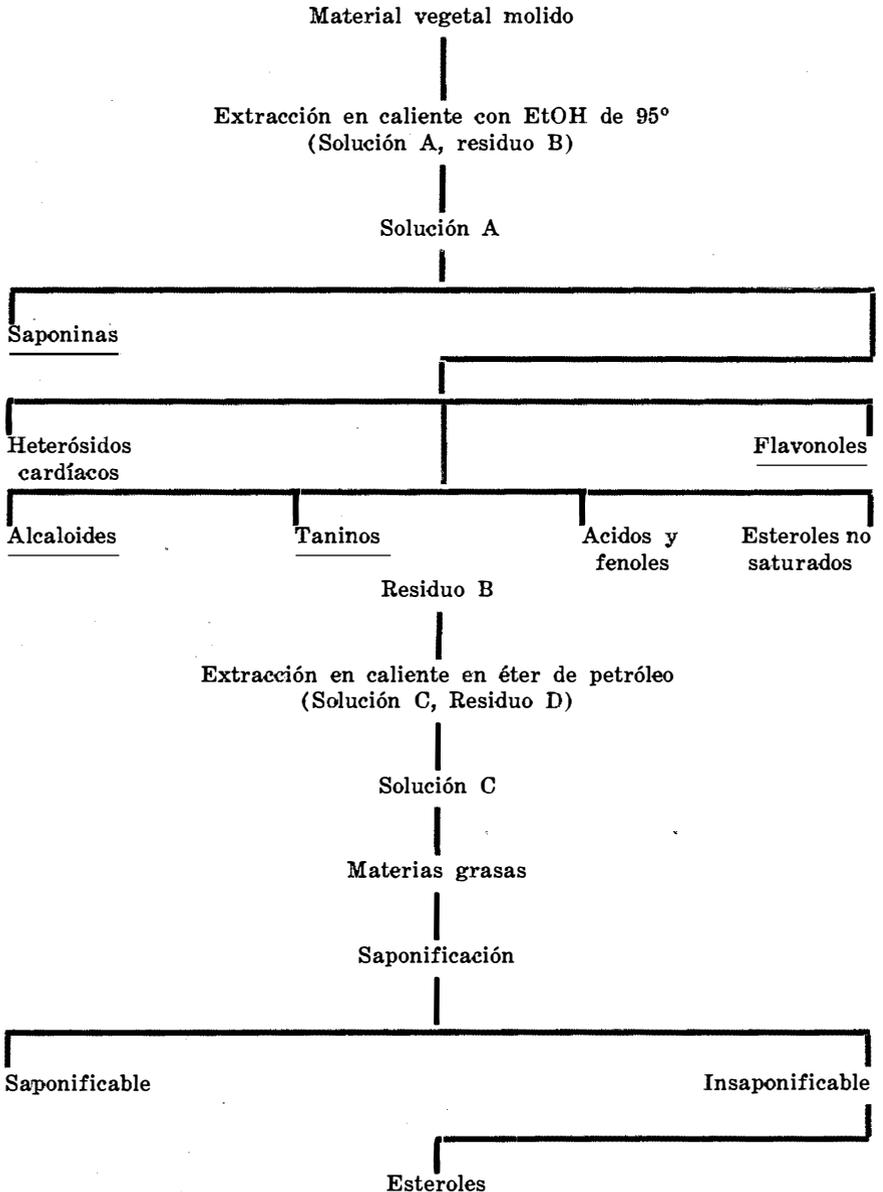


FIGURA 2.

Descripción del proceso.

Se investigaron los principios que en el esquema anterior aparecen subrayados.

Aunque los autores no explican el método utilizado, nosotros seguimos una modificación de la técnica propuesta por X. A. Domínguez, del Instituto Tecnológico de Monterrey, México (5).

Se tomaron 10 gm del material vegetal; se colocaron en un trozo de tela blanca (previamente lavada), de tamaño apropiado, la cual se cerró y amarró en forma de pequeña bolsa. En un matraz de Erlenmeyer de 300 cc, al cual se le unió un refrigerante, se colocaron 50 cc de etanol de 95°. La bolsita se suspendió dentro del matraz mediante una cuerda que iba al exterior a través del tubo del refrigerante. El etanol se calentó a ebullición y en ese momento se hizo descender la bolsita hasta colocarla dentro del líquido hirviente.

La ebullición se mantuvo durante 30 minutos, al cabo de los cuales se destapó con cuidado el matraz y se pasó el líquido de extracción a un matraz volumétrico de 200 cc.

En el primer matraz se colocaron 100 cc de etanol de 95°, y se repitió la operación durante otros 30 minutos. La nueva porción de líquido de extracción se reunió con la anterior. La bolsita se lavó con pequeñas porciones de etanol, que se pasaron al matraz volumétrico, cuyo contenido después de dejarlo enfriar, se completó a volumen, y se agitó invirtiendo varias veces el matraz tapado.

Investigación de saponinas.

Prueba de hemólisis.

Preparación de la suspensión de glóbulos rojos.

Se tomaron 2 cc de sangre fresca de conejo; se mezclaron con 1 cc de solución isotónica de citrato de sodio, como anticoagulante; se colocaron en un tubo de centrifuga con 10 cc de solución fisiológica, agitando suavemente, y se centrifugaron por unos minutos; se decantó el líquido sobrenadante. Se agregaron otros 10 cc de solución fisiológica, se agitó suavemente, y se volvió a centrifugar; se decantó el líquido sobrenadante. Se repitió la operación por tercera vez. Los glóbulos lavados se suspendieron en 40 cc de solución fisiológica. Se tomaron 2,5 cc de la suspensión de glóbulos rojos y se agitó suavemente, después de completar a 10 cc con solución fisiológica.

Esta suspensión se pasó a un tubo de ensayo; se agregó un cc del extracto alcohólico vegetal anteriormente descrito, se agitó suavemente, y se dejó el tubo en reposo. A los 5 minutos se colocó en un portaobjetos una gota de la mezcla y se observó al microscopio; se notó un ligero comienzo de hemólisis. Previamente se había observado una gota de la suspensión, al microscopio, y se encontraron los glóbulos en perfecto estado. A los 15 minutos se observó otra gota de la mezcla, encontrándose los glóbulos hemolizados.

Se repitió la prueba empleando otra dilución: se tomó un cc de la suspensión de glóbulos rojos; se completó a 10 cc con solución fisiológica y se agitó suavemente. Se pasó la suspensión a un tubo de ensayo; se agregó un cc del extracto alcohólico, se agitó suavemente y se dejó en reposo. A los 5 minutos se observó una gota al microscopio, hallándose los glóbulos totalmente hemolizados. Con el resultado *positivo* de esta prueba, se pone en evidencia la presencia de saponinas en el material vegetal (6).

Investigación de flavonoles.

Se efectuó el ensayo según Calderón G. E. (7) con resultado negativo.

Investigación de alcaloides.

Se destilaron 100 cc del extracto alcohólico con ayuda de vacío. Al residuo se agregaron 100 cc de ácido clorhídrico al 1%, se calentó casi hasta entrar en ebullición, se dejó enfriar y se filtró (4).

En el filtrado se efectuaron pruebas para alcaloides las cuales dieron los resultados siguientes:

Con reactivo de Mayer	++
” ” ” Hager	+
” ” ” Bouchardat	+++
” ” ” Dragendorff	++
” ” ” Bertrand	++

Nota: La preparación de los reactivos se llevó a cabo según está descrito por Calderón G. E. (8).

Para verificar los resultados anteriores se alcalinizó el líquido ácido sobrante con solución de hidróxido de sodio al 1% y se

efectuaron extracciones sucesivas con cloroformo y luego de nuevo con ácido clorhídrico al 1%. En esta porción ácida se desarrollaron las reacciones de precipitación y se obtuvieron los siguientes resultados:

Con reactivo de Mayer	++
” ” ” Hager	—
” ” ” Bouchardat	+++
” ” ” Dragendorff	++
” ” ” Bertrand	+

En relación con la prueba inicial, la intensidad de estas reacciones se redujo, aproximadamente, a la mitad.

Investigación de taninos.

Se tomaron 75 cc del líquido alcohólico y se destilaron, con ayuda de vacío. El residuo se disolvió en 50 cc de agua; se calentó casi hasta ebullición, se dejó enfriar la solución y se filtró. En 2 tubos de ensayo se colocaron 3 cc del filtrado, en cada uno. Al contenido de uno de los tubos se agregaron unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 1%: se produjo una coloración verdosa. Al contenido del otro tubo se agregaron unas gotas de solución de gelatina - cloruro de sodio (solución acuosa de gelatina al 1% y cloruro de sodio al 10%); no hubo cambio aparente (9).

Para comprobar los resultados anteriores se efectuó directamente con el material vegetal una decocción con agua y se filtró. En el filtrado se realizaron las reacciones siguientes:

- Con solución de cloruro férrico al 1%: dio una coloración gris - azulosa;
- Con 1 cc de bicromato de potasio al 5%: no hubo cambio aparente;
- Con 2 cc de solución de gelatina-cloruro de sodio: no hubo cambio aparente;
- Con 4 gotas de reactivo especial para taninos: dio un enturbiamiento apenas perceptible;
- Con 5 cc de reactivo de Mitchell: se presentó una coloración parduzca, sin precipitación. Se agregó luego 1 gm de acetato de sodio, se llevó a ebullición y se enfrió: no hubo precipitación (17).

La reacción a) usada comúnmente para detectar taninos, puede dar respuesta positiva en presencia de otros compuestos

fenólicos; lo mismo la reacción e). Las reacciones b) y c) fueron negativas, siendo especialmente la c) específica para taninos. La reacción d) puede considerarse negativa (22).

De las experiencias anteriores se puede deducir que en el material vegetal estudiado *están ausentes los taninos*.

Notas: El reactivo especial para taninos (22) tiene la siguiente composición (p/p): acetato de zinc, solución saturada 10; acetato de amonio al 30% 10; ácido acético glacial 1; hexametileno tetramina al 30% 10 (pH 5-6). El reactivo de Mitchell (23) tiene la siguiente composición: sulfato ferroso 0,1 gm; tartrato de sodio y potasio 0,5 gm; agua 100 cc.

Investigación de esteroides en el insaponificable.

La bolsita con el residuo B, procedente de la primera parte de la marcha analítica, se dispuso dentro de un dedal de papel; se colocó en un extractor de Soxhlet, y se extrajo durante 7 horas con éter de petróleo (p.e. 30-60°).

El extracto etéreo se pasó a un pequeño matraz, que se calentó en b.m. hasta evaporar el solvente. Al residuo, de aspecto grasoso, se agregaron 20 cc de S.R. de hidróxido de potasio alcohólico, y se calentó a reflujo, en b.m., durante una hora. Luego, destapado el matraz, se continuó calentando para evaporar el alcohol del reactivo. Se dejó enfriar el residuo; se agregaron 20 cc de agua; se removió el contenido y se pasó a una ampolla de separación; el primer recipiente se lavó con 20 cc de éter etílico que se pasaron a la ampolla; esta se agitó por unos minutos; se decantó la capa acuosa, y se recibió la capa etérea en un pequeño matraz, filtrándola por papel; el filtro se lavó con 10 cc de éter. La solución etérea se calentó ligeramente, para concentrarla, y efectuar las siguientes reacciones:

Reacción de Salkowski. Según Calderón G. E. (9). Apareció una coloración pardo-rojiza. A los 15-20 minutos la coloración (en la capa inferior) se tornó rojo-cereza. Se decantó la capa sulfúrica, y se vertió la capa clorofórmica (roja) en agua, produciéndose su decoloración.

Reacción de Liebermann-Bouchard. Citada por Calderón G. (9).

Se produjo una coloración azul-verdosa, fugaz. Se observó a los 2, 5, 20 y 60 minutos, presentando siempre una coloración pardo oscura.

Las respuestas a las reacciones precedentes se consideran *positivas*. La reacción de Liebermann-Bouchard es específica para los esteroides no saturados.

ESTUDIO PARTICULAR DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

De los compuestos investigados, cuyas reacciones de identificación inicialmente, en la marcha analítica, dieron positivas (saponinas, alcaloides y esteroides en el insaponificable), se hizo el estudio particular de las *saponinas* y de los *alcaloides*; no se entró en detalles acerca de los esteroides en el insaponificable, por considerarse que estos principios no están presentes en la decocción, forma en que es empleada la planta con fines terapéuticos.

SAPONINAS

Se efectuaron dos ensayos adicionales para detectar saponinas:
1º Prueba de la espuma, citada por Calderón G. E. (6), la cual dio resultado positivo.

2º En un matraz de Erlenmeyer se mezcló 1 gramo del material vegetal en polvo, con 50 cc de agua; se calentó casi hasta ebullición; se dejó enfriar y se filtró. El filtrado se pasó a una ampolla de separación y se extrajo con 2 porciones de n-butanol tibio, de 30 cc cada una, que se reunieron en un vaso de precipitados. Se calentó para evaporar el solvente; al residuo se le agregaron unas gotas de S. R. de tricloruro de antimonio, lo que dio reacción *positiva* al formarse una coloración amarilla en las zonas de contacto. (10).

Extracción de las saponinas.

La obtención de los saponósidos al estado puro es una labor delicada por la ausencia de criterios de pureza (estado cristalino, punto de fusión), y por la facilidad con que retienen materias colorantes y compuestos minerales. No existe un método general de obtención, y para su efecto nos hemos guiado por algunas de sus propiedades generales: solubilidad en el agua, los alcoholes y otros solventes.

Después de varios ensayos se desarrolló el siguiente método, que comprende dos modalidades, con resultados satisfactorios:

60 gm del material vegetal pulverizado se extrajeron con éter etílico en un aparato de Soxhlet hasta que el solvente pasó sin

coloración (aproximadamente 40 horas). El residuo vegetal se libró del solvente por exposición al aire. Se dispuso de nuevo en el Soxhlet y se extrajo con éter de petróleo (p.e 40-60°), aproximadamente por 8 horas. Se efectuó esta extracción con éter de petróleo con el fin de acabar de remover colorantes, materias grasas, etc., restantes en el material.

El residuo se expuso al aire para evaporar el solvente; se pasó a un matraz, se adicionó suficiente cantidad de etanol de 70°, y se calentó a reflujo durante 8 horas. Se filtró por papel y se lavó el residuo en el filtro repetidas veces con etanol de 70°. El filtrado se concentró calentando suavemente en una cápsula de porcelana, con lo cual precipitaron impurezas; se dejó enfriar y se filtró lavando el filtro con agua. Se repitió la operación. Se calentó de nuevo para reducir aún más su volumen; se pasó a una cápsula pequeña, tarada, que se calentó cuidadosamente casi hasta sequedad del residuo, y se terminó de desecar sobre cloruro de calcio hasta peso constante. El residuo que se presentó amorfo, higroscópico, de color ámbar oscuro, pesó 12,1 gm. Por tanto, el contenido de saponinas en el material vegetal seco es del 20,43%.

Determinación del índice de espuma.

Se siguió el método descrito por Calderón G. (11) y se obtuvo un resultado de $10.000/6 = 1.666$.

Determinación del índice de hemólisis.

La determinación del índice de hemólisis se realizó:

- a) Con las saponinas aisladas.
- b) Con "saponina purificada" J. T. Baker.

Solución amortiguadora e isotónica de fosfatos, pH 7,4.

Se preparó según la U.S.P. XV, revisión (12).

Solución de sangre. Se preparó según Calderón G. E. (13).

- a) Con las saponinas aisladas.

En una serie de tubos de hemólisis se introdujo en su orden:

1 cc de la solución de sangre
0,95 - 0,9 - 0,85 - 0,8 ... 0,05 - 0,0 cc de la solución amortiguadora e isotónica.

0,05 - 0,1 - 0,15 - 0,2 ... 0,95 - 1,0 cc de solución de las saponinas aisladas al 0,5% en solución amortiguadora.

Inmediatamente después de haber preparado la serie y 15 minutos más tarde, se agitaron los tubos y luego se dejaron en reposo, en la gradilla, a la temperatura ambiente. A las 12 horas se examinaron, observándose que el primer tubo en que se efectuó la hemólisis total fue el que contenía 0,55 cc de la solución de saponinas. Según la Tabla de O. Dafert, con este volumen y concentración de la solución, corresponde a las saponinas un *índice de hemólisis de 730* (13).

b) Con "saponina purificada" J. T. Baker.

Se siguió exactamente el método anterior, pero empleando una solución de "saponina purificada" J. T. Baker al 0,1% en solución amortiguadora e isotónica. A las 12 horas se observó que el primer tubo en que se produjo la hemólisis total fue el que contenía 0,45 cc de la solución de saponina. Según la tabla de O. Dafert, con este volumen y concentración de la solución, corresponde a la saponina un *índice de hemólisis de 4.400* (13).

Reacciones de identidad.

Con las saponinas aisladas se efectuaron las siguientes reacciones:

Reacción del ácido sulfúrico. A unos miligramos de las saponinas colocados en una cápsula de porcelana se les vertieron unas gotas de ácido sulfúrico concentrado: casi inmediatamente apareció una coloración pardo-rojiza, con un tono amarillo-verdoso en los bordes de la mezcla, que después de 30-40 minutos no cambió (14).

Reacción de Lafon. A unos miligramos de las saponinas colocados en una cápsula de porcelana se les agregó 1 cc de una mezcla, a partes iguales, de ácido sulfúrico concentrado y etanol de 96°: casi inmediatamente se presentó una coloración amarillo-verdosa, que no varió después; al agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 1%, la coloración viró a verde-pardusca (14).

Cromatografía de las saponinas.

Después de numerosas experiencias, en que se emplearon diferentes sistemas de solventes y varios reactivos reveladores, se obtuvieron resultados satisfactorios con el método siguiente:

Las saponinas aisladas se disolvieron en metanol y se colocaron 3 mcl en tiras de papel S & S 2043a. Se siguió la técnica ascendente; como solvente se empleó una mezcla de n-butanol/ácido acético (4:1).

Se revelaron por inmersión en solución de sangre de bovino desfibrinada, al 2% en solución amortiguadora e isotónica, de fosfatos, de pH 7,4. A los pocos minutos apareció en cada una de las tiras una sola mancha de color pardusco, con un Rf de 0,81. Por lo anterior se deduce que en el material vegetal existe *una sola saponina*.

Hidrólisis de la saponina.

Una porción de la saponina aislada se trató con ácido sulfúrico al 10%, y se calentó durante 2 horas al b.m. La solución, de color ambarino, en un principio límpida, se fue tornando turbia en el transcurso del calentamiento, hasta aparecer numerosos grupos de color pardo. Después de dejar enfriar, se filtró, y el residuo insoluble constituido por la *sapogenina*, se lavó con agua hasta que las aguas del lavado presentaron reacción neutra, al papel indicador.

Reconocimiento de las sapogeninas triterpénicas.

Con la sapogenina separada mediante la hidrólisis anteriormente descrita, se efectuaron las siguientes reacciones: (15).

a) Se colocaron unos miligramos de la sapogenina en un tubo de ensayo, se disolvieron en 2 cc de etanol de 95°, se agregaron unos cc de reactivo vainillín-clorhídrico (solución al 1% de vainillina en ácido clorhídrico): lentamente apareció una coloración pardo-verdosa. Al calentar la mezcla, la coloración se presentó con mayor rapidez e intensidad;

b) A unos miligramos de la sapogenina se agregó 0,5 cc de una solución de cloruro férrico al 0,01% en cloruro de tionilo: a los pocos minutos la mezcla tomó una coloración roja con un tono ligeramente amarillo;

c) A unos miligramos de la sapogenina, se agregó 0,5 cc de una solución de tricloruro de antimonio al 0,01% en cloruro de tionilo: a los pocos minutos se presentó una coloración pardusca que fue virando hasta dar un color rojo oscuro con visos azules.

Por las reacciones precedentes se deduce que la sapogenina es de naturaleza *triterpénica*.

Cromatografía de la fracción azúcar.

El filtrado proveniente de la hidrólisis ácida de la saponina, se neutralizó por adición de carbonato de calcio; se filtró y se concentró por calentamiento en b.m.; se filtró nuevamente y se continuó calentando en b.m. para reducir aún más su volumen.

Se efectuó una cromatografía ascendente, en papel S & S 2043a, colocando 2 ml del líquido anteriormente descrito, y de soluciones acuosas al 1% de galactosa, xilosa, glucosa y arabinosa, como testigos. Como solvente se empleó una mezcla de isopropanol/agua (8:2).

Se reveló con reactivo de ftalato de anilina (16), y se colocó en la estufa durante 5 minutos a una temperatura de 100-105° C.

En el cromatograma aparecieron las manchas correspondientes a las pentosas (xilosa y arabinosa) de color pardo-rosado claro, y las correspondientes a las hexosas (galactosa y glucosa) de color pardo más oscuro (16). La solución desconocida se resolvió en dos manchas, ambas de color pardo similar al de las hexosas. Los Rf correspondientes son los siguientes:

SOLUCIONES PATRONES:

Galactosa	0,396
Xilosa	0,528
Glucosa	0,410
Arabinosa	0,446

SOLUCION DESCONOCIDA:

Mancha inferior	0,410
Mancha superior	0,595

De lo anterior se puede deducir: La fracción azúcar de la saponina, obtenida por hidrólisis ácida, contiene 2 sustancias: la correspondiente a la mancha inferior, por la coloración tomada al revelar y por su Rf, se identifica como una *hexosa*. La de la mancha superior, cuya coloración es diferente a la de las pentosas y cuyo Rf está alejado del de las hexosas, es probablemente un ácido urónico (también detectable con el revelador empleado), compuesto frecuente de la fracción azúcar de las saponinas de estructura tri-terpénica.

Purificación de la sapogenina.

El residuo, que quedó en el filtro, proveniente de la hidrólisis de la saponina, se disolvió en etanol de 95°, se mezcló con carbón activado; se calentó en b.m. durante unos minutos, agitando con frecuencia; se dejó enfriar y se filtró por papel a un vaso de precipitados. El filtrado se calentó en b.m. hasta evaporar el etanol. El residuo se volvió a tratar en la misma forma anterior, dejando finalmente un residuo incoloro de aspecto cristalino.

La sapogenina obtenida es soluble en acetona, ligeramente soluble en cloroformo e insoluble en tetracloruro de carbono y bisulfuro de carbono.

Una gota de la solución alcohólica de la sapogenina, evaporada sobre un portaobjetos se presentó, observada al microscopio, en forma de microcristales.

Determinación del espectro de absorción al infrarrojo de la sapogenina.

Se determinó en un espectrofotómetro Perkin - Elmer para espectrofotometría al infrarrojo, con la sapogenina en fase sólida, empleando comprimido de bromuro de potasio. (Figura 3).

Comentario del espectrograma.

Los picos que muestra el espectrograma, correspondientes a grupos funcionales son los siguientes:

En 2,8 micras: grupo oxhidrilo de alcohol secundario (CH-OH)

En 3,4 micras: presencia de un grupo CH alifático.

En 5,9 micras: firme sospecha de un grupo carbonilo (—CO).

En 6,1 micras: presencia de un doble enlace.

En 7,3 micras: radical metilo (CH₃).

En 11,9 micras: doble enlace trisustituído.

$$\begin{array}{c} \text{R} & & \text{H} \\ & \searrow & / \\ & \text{C}=\text{C} & \\ & / & \searrow \\ \text{R} & & \text{R} \end{array}$$

Nota: Existe correspondencia entre el espectrograma de esta sapogenina y el de la escina, saponina triterpénica, principio activo de *Aesculus hippocastanum* (castaño de Indias), lo cual confirmaría la naturaleza triterpénica de la primera (18).

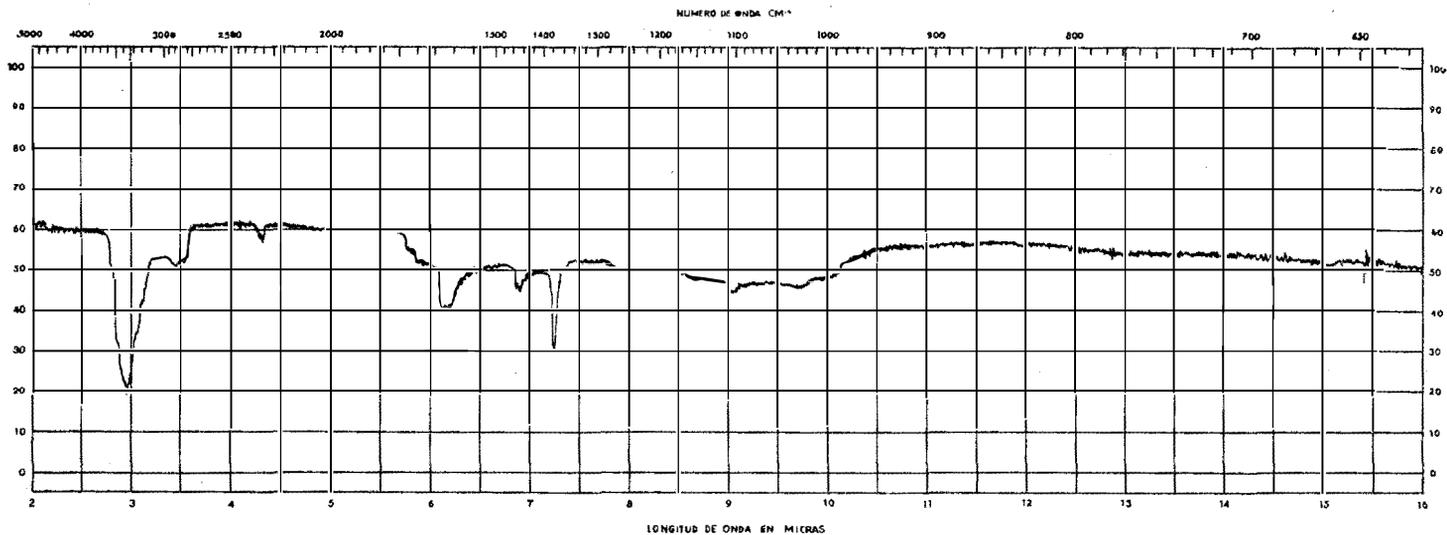


FIGURA 3. Espectrograma de absorción en el infrarrojo de la Sapogenina.

ALCALOIDES .

Las pruebas de investigación de alcaloides realizadas en la marcha analítica pusieron de manifiesto la presencia de estos principios en el material vegetal, pero al mismo tiempo revelaron su mínimo contenido reflejado en la baja intensidad de las respuestas frente a los reactivos empleados, lo cual hizo difícil su extracción y necesaria la aplicación de métodos de maceración, de percolación y de extracción continua en Soxhlet.

Ensayos preliminares indicaron que el método de percolación en medio ácido, precedida de una corta maceración con el mismo líquido, daba mejores resultados que los obtenidos con cualquiera de los otros métodos puestos en práctica.

Una cantidad conocida del material vegetal, pulverizado y seco, se dispuso convenientemente dentro de un percolador; se fue vertiendo con cuidado ácido sulfúrico 0,1 N hasta humedecer todo el polvo y dejar sobre el mismo una pequeña capa de líquido. Después de 24 horas de maceración, se comenzó a percolar a razón de 6-10 gotas por minuto. Se suspendió la percolación cuando unas gotas del líquido fluyente dieron reacción negativa con reactivo de Mayer. El líquido de percolación, se extrajo con 3 porciones de cloroformo de 20 cc cada una, después de alcalinizar con S.R. de amoníaco. Al agregar la solución de amoníaco se formaba un precipitado floculento (constituído probablemente por saponinas que precipitan de sus soluciones acuosas, en presencia de sulfato de amonio), el cual había que dejar separar. Las porciones clorofórmicas reunidas se extrajeron con ácido sulfúrico 0,1 N hasta agotar el alcaloide.

Las porciones ácidas reunidas se "lavaron" con cloroformo en una ampolla, desechando luego la capa del solvente, y se extrajeron por último, y después de alcalinizar con S.R. de amoníaco, con cloroformo. Las porciones clorofórmicas se recibieron en un recipiente tarado después de filtrarlas por papel; el filtro se lavó con cloroformo. El solvente se evaporó calentando cuidadosamente en b.m., y el residuo se terminó de desecar sobre cloruro de calcio, hasta peso constante.

El contenido de alcaloides en el material vegetal pulverizado y seco es de 40,52 mg por ciento.

Se practicaron otros métodos con resultados poco satisfactorios, como el de extracción en Soxhlet con cloroformo, previa maceración del material vegetal con solución de carbonato de sodio al 10% (20).

Cromatografía de los alcaloides.

Numerosas pruebas y métodos en que se emplearon diversos sistemas, y diferentes tipos de papel y de reactivos para revelado, fue necesario efectuar antes de hallar el método que ofreció mejores resultados, y que a continuación se describe:

En la línea de partida de tiras de papel Whatman N^o 1 se colocaron, mediante una micropipeta, 20 mcl de la solución clorofórmica de la fracción alcaloidal. Se siguió la técnica ascendente y se empleó como solvente una mezcla de n-butanol/ácido clorhídrico (98:2) saturada de agua. Los cromatogramas se dejaron secar al aire, y se revelaron por inmersión en reactivo yodo-platínico. En cada una de las tiras apareció una sola mancha, de color morado, sobre el fondo lila del papel impregnado de reactivo, con un Rf de 0,58. De la experiencia anterior se deduce que en la fracción alcaloidal aislada del material vegetal, *existe sólo un alcaloide*.

Notas:

1^a Como en ensayos previos se notó en algunos cromatogramas dificultad en la movilización del alcaloide (ocasionada posiblemente por trazas de sustancias extrañas), se optó por disolver el residuo alcaloidal en etanol de 95°, después de evaporar el cloroformo, y pasar esta solución alcohólica por una pequeña columna de alúmina neutra "Merck", para luego eluir con el mismo solvente, y después de evaporar el etanol en b.m. redissolver el residuo en cloroformo.

2^a La composición indicada para el reactivo yodo-platínico es la siguiente: solución de cloruro de platino al 5% 2,5 cc; solución de yoduro de potasio al 10% 22,5 cc; agua 50 cc (21).

Nosotros obtuvimos mejores resultados preparando este reactivo revelador con el *doble* de la cantidad de agua indicada, ya que así el papel presenta un fondo de tono más claro, sobre el cual contrasta mejor la mancha.

Fotomicrografías del sulfato, del clorhidrato y del alcaloide base.

Por evaporación espontánea sobre un portaobjetos de una gota de la extracción del alcaloide en medio ácido (con ácido sulfúrico), se obtuvieron numerosos cristales rectangulares, que se observan en la Figura 4.

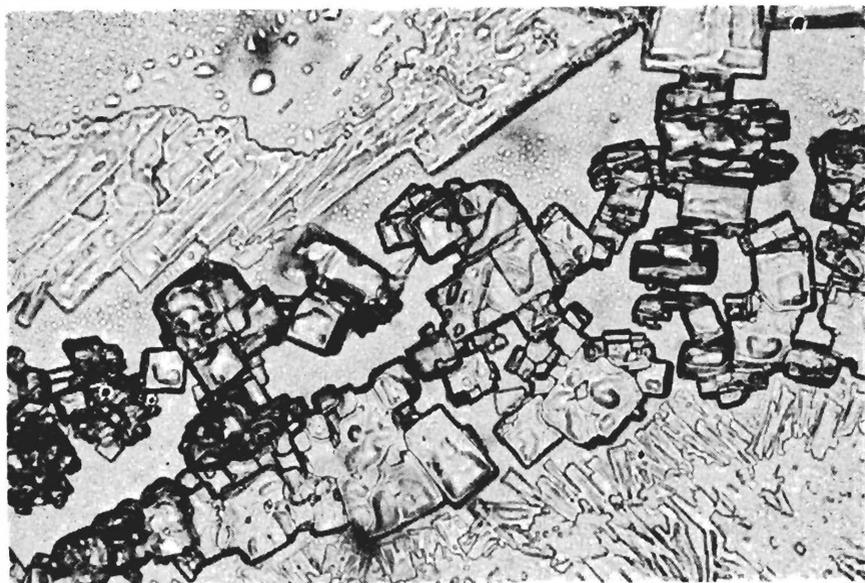


FIGURA 4. Cristales del sulfato del alcaloide.

Por evaporación sobre cloruro de calcio, en un portaobjetos, de una gota de la extracción del alcaloide en medio ácido (con ácido clorhídrico), se obtuvieron cristales rectangulares aislados, muy higroscópicos.

La solución clorofórmica procedente de la extracción del alcaloide, se sometió a liofilización. Del residuo redissuelto en cloroformo, se colocó una gota en un portaobjetos y se dejó evaporar el solvente espontáneamente; se observó al microscopio sin encontrar cristalización alguna. El mismo residuo que se observó, se mezcló con unas gotas de benceno (en el cual se mostró ligeramente soluble), y se dejó evaporar el solvente espontáneamente. Al observar al microscopio se encontraron numerosos cristales aciculares ramificados.

Determinación del espectro de absorción al infrarrojo del alcaloide.

Se determinó en un espectrofotómetro Beckman para espectrofotometría al infrarrojo, empleando el alcaloide base (obtenido por recrystalización en benceno del alcaloide liofilizado) en fase sólida, en comprimido de bromuro de potasio (véase Figura 5).

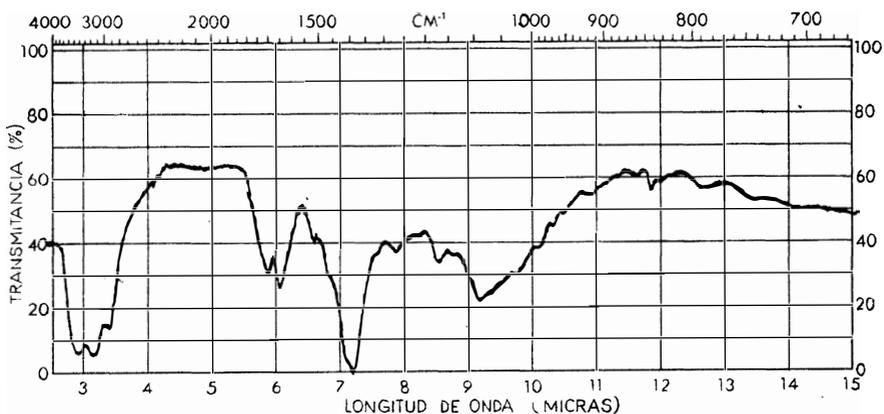


FIGURA 5. Espectrograma de absorción al infrarrojo, del alcaloide.

Comentario del espectrograma.

Los picos que exhibe el espectrograma corresponden a los grupos funcionales siguientes:

En 2,9 micras: grupo amina secundaria (— NH —)

En 3,5 micras: grupo CH₂.

En 6,1 micras: banda característica de los compuestos heterocíclicos, la cual se repite a menudo en 6,9 micras, como en este caso.

En 7,25 micras: radical metilo (— CH₃).

Nota: El espectrograma presenta características que, según parece, sitúan a este principio dentro del grupo de los compuestos indólicos.

DISCUSION

Existe una planta, llamada vernáculamente "dividivi", diferente del dividive (*Libidibia coriaria*) empleado como curtiente, cuyas hojas, en forma de decocción, se emplean empíricamente, en una región que comprende parte de los Departamentos de Norte de Santander y Magdalena, en el tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal y del cáncer gástrico.

Con una muestra de la planta se realizó su estudio botánico, y se clasificó como *Chloroleucon mangense* (Jacq.) Brit & Rose, de la familia de las Leguminosas, subfamilia de las Mimosoideas.

Con el presente trabajo se ha querido iniciar su estudio fitoquímico con el fin de determinar principios que pudiesen ser responsables de su actividad terapéutica.

Numerosas investigaciones coinciden en señalar como responsables de la actividad antitumoral a *saponinas* o *alcaloides*; de ahí que nuestro interés haya recaído en tales compuestos.

En lo que respecta a las propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, posible mecanismo a que pudiese ser atribuido su empleo en la terapia de la úlcera, existen estudios que señalan concretamente una *saponina* como factor responsable de tal efecto (24, 25).

Después de las operaciones preliminares de secamiento, molienda y tamizado, determinación de humedad e investigación de sustancias reductoras, del material vegetal (hojas, compuestas de raquis, raquillas y folíolos), se efectuó una marcha analítica siguiendo el esquema propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, ampliado, y una modificación de la técnica de X. A. Domínguez, del Instituto Tecnológico de Monterrey, México. Se investigaron saponinas, alcaloides, flavonoles, taninos y esteroides. Hubo respuesta positiva para saponinas, alcaloides y esteroides. Se hizo el estudio particular de las saponinas y de los alcaloides.

Para aislar las saponinas se desarrolló un método con dos modalidades, consistente la primera en extraer el residuo del material vegetal con etanol de 70° a reflujo, después de agotar con éter etílico; precipitar las saponinas por adición de éter; redissolver el residuo en metanol; volver a precipitar con éter; decantar y someter el residuo a liofilización o a desecación sobre cloruro de calcio.

La segunda, consistente en extraer el residuo del material vegetal con etanol de 70° a reflujo, después de agotar con éter etílico y éter de petróleo sucesivamente; evaporar el filtrado hasta sequedad y terminar de desecar sobre cloruro de calcio. Esta segunda modalidad ofreció mejor resultado en cuanto a la cantidad de saponinas obtenida.

Las saponinas se hallan en el material vegetal en proporción notable. Se determinó el índice de espuma y el de hemólisis. Se efectuó una cromatografía ascendente en papel, hallándose una sola saponina. Se hidrolizó ésta en medio ácido y se efectuó la cromatografía ascendente en papel, de la fracción azúcar poniéndose en evidencia una hexosa y otro compuesto probablemente ácido urónico. Con la saponina aislada se efectuaron reacciones que indicaron su naturaleza triterpénica. Se purificó la saponina y se determinó su espectro de absorción al infrarrojo, en

fase sólida, empleando comprimido de bromuro de potasio. El comentario del espectrograma puso de manifiesto la presencia de grupos funcionales orgánicos característicos y confirmó la constitución triterpénica de la sapogenina.

Cabe anotar aquí, que un grupo de investigadores de Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd., Osaka, Japón (26), aisló una sustancia activa contra el sarcoma de Yoshida, de la planta *Albizia julibrissin*, de la misma familia y subfamilia y de un género afín al de la planta tema de nuestro estudio.

Por el procedimiento de obtención descrito se deduce que tal principio es una *saponina*. La firma japonesa se negó a facilitarnos una copia del espectrograma de absorción al infrarrojo, del compuesto aislado.

Los alcaloides, cuya detección preliminar reveló su mínimo contenido, reflejado en la baja intensidad de las respuestas frente a los reactivos empleados, se extrajeron siguiendo varios métodos; siendo el más apropiado el de percolación con agua acidulada, precedida de una corta maceración con el mismo líquido; extracción del líquido de percolación con cloroformo, en ampolla de separación, después de alcalinizar; extracción del líquido clorofórmico con porciones ácidas; por último extracción con cloroformo después de alcalinizar, y evaporación del solvente en b.m.

Se realizó la cromatografía ascendente, en papel, de la fracción alcaloidal, probándose la presencia de un solo alcaloide.

Se introdujo una modificación satisfactoria en la preparación del reactivo yodoplatínico revelador.

Se tomaron fotomicrografías de cristales de sulfato, clorhidrato y alcaloide base. Se tomó el punto de fusión del alcaloide base: 184° C.

Se determinó el espectro de absorción al infrarrojo, del alcaloide base, en fase sólida, empleando comprimido de bromuro de potasio. El comentario del espectrograma, revela la presencia de grupos funcionales característicos de compuestos de naturaleza alcaloidal.

El alcaloide, por sus características de solubilidad y punto de fusión, no parece ser idéntico con ninguno de los alcaloides descritos de la familia de las Leguminosas; tales propiedades lo señalan como un probable derivado de aminoácido, compuestos frecuentes en numerosos géneros de dicha familia; al parecer, del grupo del indol.

CONCLUSIONES

La planta objeto del presente trabajo es *Chloroleucon mangense* (Jacq) Brit & Rose, de la familia de las Leguminosas, subfamilia de las Mimosoideas.

Contiene saponinas en proporción notable.

Contiene trazas de alcaloides.

Contiene un esteroI.

No contiene flavonoles ni taninos.

Contiene una sola saponina y un solo alcaloide, cromatográficamente demostrable.

Por hidrólisis ácida de la saponina se obtiene una sapogenina y una fracción azúcar. La cromatografía de la fracción azúcar pone en evidencia una hexosa y otro compuesto, probablemente ácido urónico.

Las reacciones efectuadas con la sapogenina indican su naturaleza triterpénica confirmada por el espectro de absorción al infrarrojo.

Consideramos a la saponina como el probable factor responsable de la presunta actividad terapéutica de la planta.

SUMMARY

Phytochemical studies on *Chloroleucon Mangense* (Jacq) Brit. & Rose, fam. Leguminosae, subfam. Mimosoidae, were performed.

Besides usual components, the presence of a saponin as well as an alkaloid is demonstrated chromatographically.

Acid hydrolysis of this saponin leads to a sapogenin, its triterpenic nature being confirmed by infrared absorption spectroscopy.

Further studies regarding the pharmacological properties of the saponin is suggested by the author.

R E S U M E

L'objet d'étude du travail est la plante *Chloroleucon mangense* (Jacq) Brit. & Rose, de la famille des Legumineuses, sub-famille des Mimosoideae.

La plante contient des saponines en proportion notable, un stéroI, des alcaloïdes en quantité négligéable et, elle n'a pas des flavonoles ni tanines.

Par chomatographie est décelée seulement une saponine et un

alcaloïde. La dégradation acide de la saponine forme deux fractions: celle de la sapogenine et celle d'un sucre. Cette dernière fraction, par chromatographie, montre en évidence une hexose et une autre substance, probablement un acide uronique.

Les réactions effectués avec la sapogenine indiquent une nature de triterpéne, ce qui est confirmé par son spectre d'absorption à l'infra-rouge.

On considère que la saponine est probablement le facteur responsable de la présumé activité thérapeutique.

BIBLIOGRAFIA

1. Observaciones realizadas por E. Forero. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.
2. Notas preparadas por A. Fernández P. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia.
3. CALDERÓN G. E., "Guía para Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica", Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1963, 9 - 10.
4. CALDERÓN G. E., Op. cit., 12 - 13.
5. CALDERÓN G. E., Op. cit. 14.
6. CALDERÓN G. E., Op. cit. 15.
7. CALDERÓN G. E., Op. cit. 19.
8. CALDERÓN G. E., Op. cit. 24 - 27.
9. CALDERÓN G. E., Op. cit. 20.
10. GONZÁLEZ E. E., DELGADO J. N., J. Pharm. Sci., 51, N° 8, 1962, 786 - 790.
11. CALDERÓN G. E., Op. cit., 141 - 142.
12. Farmacopea de los Estados Unidos de América, XV Revisión, 1955, 884.
13. CALDERÓN G. E., Op. cit. 143 - 146.
14. BRUNEL A., "Traité Pratique de Chimie Végétale", Imprimerie Georges Frère, Tourcoing (Nord), 1949, 263 - 278.
15. CALDERÓN G. E., Op. cit. 133.
16. CRAMER F., "Cromatografía sobre papel", Trad. de la 3ª Ed. Alemana por Keller G., Editorial Beta, Buenos Aires, 1958, 88.
17. SHELLARD E. J., "Practical Plant Chemistry for Pharmacy Students", Pitman Medical Publishing Co. Ltd., London., 1957, 54.
18. Sep. de Arzneim-Forsch 10, Heft 4 (1960).
19. PATT P., WINKLER W., Arzneim-Forsch 10, 4 (196).
20. FAHMY I. R., AHMED Z. F., RIZK A. M., J. Pharm. Sci., U.A.R., 1, 1960, 134
21. GOLDBAUM L. R., KAZYAK L., Anal. Chem., 28, N° 9, 1956, 1289.
22. SCHMIDT O., PEACH K., TRACEY M. V., "Modern Methods of Plant Analysis", Springer-Verlag, Berlin-Gottingem-Heidelberg, III, 522, 1955.
23. SHELLARD E. J., Op. cit. 126.
24. NITSCHKOFF, "Medizinische Monatsschrift", 8, 1954, 256 - 9.
25. MÖLLER G., ROTHENBURG W., Med. Welt, 1964, 1844 - 7.
26. WATANABE T., Al., Chem. Abs., 1961, 11770a.