

INVESTIGACION PRELIMINAR DEL LAPACOL EN CORTEZAS DE PAI O DE ARCO *

Ma. Cecilia B. de Domínguez

INTRODUCCION.

En los últimos 14 años la búsqueda de drogas anticancerígenas ha adquirido una gran importancia, utilizando como fuente natural las plantas y según publicaciones ha sido considerablemente exitosa.

Cerca de 1.200 especies de plantas de las que se han preparado extractos crudos, han sido activas en la inhibición del crecimiento cancerígeno en animales de Laboratorio y un gran número de ellas prometen ser drogas potencialmente útiles en el futuro.

Tal como lo exponen los botánicos Perdue y Hartwell (7). en una publicación: "Varias quinonas han demostrado su actividad contra el cáncer. La más notable de ellas es el LAPACOL, actualmente en proceso clínico. El Lapacol fué aislado en pequeña cantidad como un constituyente activo de unas raíces de la India (*Stereospermum Suaveolens* DC); pero revisando la bibliografía se encontró que la mejor fuente, por contenerlo en gran abundancia, es la madera del Lapacho (*Tabebuia*) de la América Tropical (América Central y del Sur).

En el Brasil, se prepara una infusión (tipo té) de la *Tabebuia*

* "Trabajo llevado a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Fitoquímicas, dirigido por el Dr. Eduardo Calderón Gómez. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia."

y es ampliamente utilizada por médicos y en medicina popular para el tratamiento del cáncer. Como un caso raro, se ha comprobado en animales de experimentación, que el compuesto es más activo cuando se administra por vía oral que por vía intraperitoneal."

"Cantidades de Lapacol pueden encontrarse en un gran número de bignoniáceas (Tecoma, Tabebuia, Paratecoma); también se ha aislado de una Avicennia cultivada (de las berbenáceas). Aparte de esto, su presencia en otras plantas es incierta. Pueden existir otras naftoquinonas en las plantas, pero no se presentan como sólidos visibles, aunque pueden colorear los tejidos. El Lapacol es por tanto único en este caso. (Anatomy of the Monocotyledons, Oxford 1950)".

"El Lapacol fué obtenido por Arnaudon (1), de la madera del árbol Lapaco (Sur América), por Stein de la madera corazón verde y por Creene y Hooker de la madera Bethaberra (Africa)".

Como en Colombia se vende popularmente en droguerías la corteza de palo de arco (Bignoniácea) en trozos o en polvo; resolvimos iniciar un estudio analítico comparativo en tres muestras diferentes con el fin de establecer cuál ó cuales contenían un principio colorante quinónico (el Lapacol), sustancia química ya sintetizada y a la cual según la bibliografía se le atribuyen propiedades anticancerígenas comprobadas clínicamente.

El objeto de nuestro estudio es el de establecer un método de extracción adecuado para el Lapacol (colorantes quinónicos), lograr una purificación por diversos tratamientos con solventes y por cromatografía; y una vez obtenido el principio en forma pura, identificarlo por Espectrofotometría (ultravioleta, infrarro-

jo etc.) y por sus propiedades físicas.

Los métodos aplicados en nuestro estudio, pueden dar una base para trabajos posteriores sobre colorantes naturales con estructuras similares. Igualmente, se determinó cuantitativamente el contenido de Lapacol en las cortezas.

En el caso de nuestra investigación nos fué imposible conseguir el material botánico adecuado para la clasificación de las plantas, ya que inclusive una de las muestras fué entregada en polvo. Para obviar en parte esta dificultad, se llevaron al Herbario del Instituto de Ciencias Naturales muestras de las tres cortezas, con el fin de que en estudios posteriores sobre las mismas especies se pueda complementar el estudio taxonómico. Por otra parte, es bien conocido que de acuerdo a la Quimio-taxonomía vegetal se pueden clasificar las plantas (al menos la familia), por las características moleculares de sus constituyentes químicos; y debido a que una gran cantidad de especies de plantas han sido extinguidas, se siguen proponiendo "sistemas naturales" fundados en relaciones reales con las que se puedan efectuar clasificaciones por un sistema verdaderamente "Filogenético".

Más aún, debido a los métodos analíticos modernos, los compuestos pueden aislarse en forma pura y analizarse estructuralmente por las técnicas cromatográfica, espectrofotométrica etc.

MATERIAL Y METODOS

Descripción. -

Sinónimos del Lapacol: Tecominó, Acido Taignico, 2 hidroxi-3 (3-metil-2 butenil)-1,4 naftoquinona.

Fórmula: $C_{15}H_{14}O_3$. P.M. 242,26

Características de las Muestras Investigadas:

Procedencia:

Muestra A. - Procedente del Amazonas (Leticia).

Muestra B. - Procedente del Amazonas.

Muestra C. - Existente en el archivo de Drogas crudas del Laboratorio de Farmacognocia en el Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional.

Aspecto de las Cortezas:

Muestra A. - Trozos gruesos cubiertos por una delgada capa de color más oscuro. El color de la corteza es pardo rojizo.

Muestra B. - Fué entregada ya molida en forma de polvo grueso; de color pardo-rojizo.

Muestra C. - Láminas muy delgadas pegadas unas con otras; de color rojo-ladrillo.

I. - Extracción del Lapacol.

Al consultar la bibliografía, no se encuentran muchos métodos de extracción; se resolvió comprobarlos todos para observar cuál daba mejores resultados, al tiempo que pueda ser de alguna utilidad en posteriores trabajos para la extracción de colorantes naturales.

Método 1. - "De acuerdo a Paternó; (1) la materia colorante se extrae de la madera por medio de una solución de carbonato de sodio, el producto es precipitado del extracto con ácido clorhídrico y luego purificado por extracción con una solución de hidróxido de bario y reprecipitación con ácido. El producto se obtiene fácilmente en estado puro por cristalización con benceno".

Se ensayó el método citado, con las tres cortezas.

Al tratar el polvo de las cortezas con solución saturada de Na_2CO_3 las muestras A y B dieron soluciones de color rojo intenso y fué necesario efectuar 8 tratamientos con la solución alcalina para agotar completamente el material. Con la muestra C se obtuvo sólo una solución de color naranja. Al agregar HCl concentrado, las soluciones procedentes de A y B dan masas resinosas de color pardo-amarillento; después de tratar estos precipitados con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (solución saturada) se obtienen soluciones de color rojo vino tinto.

En la cristalización final con benceno, sólo se obtienen unos pocos cristales de color blanco rosáceo, que no responden a las pruebas para el Lapacol; no dan ninguna coloración con soluciones alcalinas.

Se concluye que el colorante es poco soluble en benceno.

Método 2. - Extracción con alcohol en caliente, (2). "Tomar 50 g. de la madera molida y extraer con alcohol de 85%, concentrar hasta cerca de 100 ml. los filtrados combinados. Enfriar, lavar los cristales con alcohol frío y evaporar el filtrado hasta consistencia de pasta, extraer luego con solución amoniacal (20%) hervir y filtrar para separar el residuo

resinoso. Acidificar con HCl concentrado el filtrado amoniacoal, extraer de nuevo con alcohol y evaporar el solvente.

Para las muestras A y B, por este método de extracción se obtienen muy buenos resultados; pero se presenta el inconveniente que las resinas son bastante difíciles de eliminar y los cristales del colorante quedan cubiertos por una delgada película de color pardo negruzco brillante. Por éste motivo, fué necesario hacer algunas adiciones a las condiciones de extracción, con el fin de purificar el colorante.

Se efectuó un ensayo teniendo en cuenta que las resinas son solubles en alcohol pero con el agua precipitan, por tanto al rebajar el grado alcohólico quedan en forma insoluble y se pueden separar por filtración; al tiempo que este porcentaje de alcohol debe disolver el colorante. Se encontró que con alcohol del 80% y por tratamiento por repetidas veces con éste solvente seguido de filtración, se consiguió eliminar las resinas casi en su totalidad.

Con el fin de eliminar las trazas de resinas, se pasó el último extracto alcohólico a un separador y se trató con CCl_4 (disolvente de resinas) por tres veces consecutivas. Se llevó después el extracto alcohólico a pH 5 y se diluyó con agua, con lo cual el colorante se precipitó. Se centrifugó y decantó el precipitado y se obtuvo una masa de color pardo claro, que se disolvió después en alcohol del 85%, se filtró y se evaporó el solvente.

Comentarios :

El método de extracción con alcohol en caliente y realizando luego la purificación de resinas por técnica modificada, da muy buenos resultados.

La primera extracción puede hacerse en un extractor continuo (soxhlet) o por calentamiento a reflujo por varias horas del material con alcohol, filtración del extracto, nuevo calentamiento con alcohol y así sucesivamente hasta extracción completa del colorante.

Método 3 .- Revisando la literatura, dice que el Lapacol es soluble en benceno y algunos autores recomiendan su extracción con ese solvente. Por esto se ensayó el método utilizando un extractor soxhlet.

Se sometió el material de las 3 cortezas al proceso de extracción continua por 16 horas.

En los tres casos, al evaporar el solvente sólo se obtiene una película brillante de color oscuro casi negro, que corresponde a un residuo resinoso, que no responde a las pruebas en ninguna de las muestras.

Esto confirma una vez más que el Lapacol es casi insoluble en benceno.

Método 4.- Extracción por arrastre con vapor de agua,

" Se ha propuesto la extracción del Lapacol de la corteza finamente dividida, por destilación con arrastre de vapor de agua" (3).

" Por este método fué aislada la Lapaconona de la madera finamente dividida del Paratecoma alba". (4) También se encontró que, "La madera finamente dividida del Tabebuia flavescens, da al someterla a un arrastre de vapor, el Lapacol y la Lapaconona, que luego se separan por tratamiento con solución de carbonato de sodio y éter de petróleo" (5).

Al ensayar el método con las muestras en estudio, tan solo se obtienen líquidos claros de color ligeramente rosado, los cuales al agregarles una solución de NaOH no presentan cambio de coloración (prueba para Lapacol). Parece que se

extrae una pequeñísima cantidad de Lapacol con el agua; esto es debido posiblemente a que el colorante no es arrastrable por el vapor de agua.

En Conclusión, el único método de extracción para el Lapacol es el que utiliza el alcohol de 85% y posterior purificación de las resinas; ya que parece que el mejor solvente para este colorante es el alcohol etílico, La técnica puede llevarse a cabo por extracción continua en soxhlet ó por maceración en caliente y filtración.

II. - Purificación del Colorante por Cromatografía en Capa Delgada. -

Con el fin de tener la sustancia en forma pura, para determinar las propiedades físicas y los espectros, se decidió emplear la cromatografía en capa delgada.

- 1) "Meckel y sus colaboradores sugirieron para separar colorantes de la madera y celulosa, el siguiente método: (6). - Utilizar capas de sílica gel G alcalina (sílica gel G en agua que contiene el 2,5% de CaCO_3); también utilizaron como adsorbente Alúmina G, pero llegaron a la conclusión de que las separaciones se efectuaban mejor sobre sílica gel G alcalina. Como sistema solvente emplearon una mezcla recientemente preparada de Acetato de butilo-Piridina-Agua (50:45:25)".

Se ensayó la técnica anterior con las muestras A y B (con sus soluciones alcohólicas).

Ensayo del Método :

Espesor de la capa de sílica: 250 μ .

Activación de las placas a 120°C : 1 hora

Saturación de la cámara : 2 horas

Recorrido del solvente : 15 cm.

Cantidad de muestra : 2 μ l (soluciones al 0.2% de A y B)

Se corrió el cromatograma, y al observarlo después de dejar secar, las manchas del colorante en las dos muestras permanecen en el punto de partida; luego no hay arrastre del material.

El método utilizado para colorantes en madera, no es aplicable en nuestro caso.

2) Aprovechando las experiencias realizadas con algunos colorantes, en las que se ensayaron mezclas de solventes por cromatografía en papel; se resolvió utilizar las mezclas de solventes, pero empleando la cromatografía en capa delgada.

Ensayos de las mezclas de solventes :

Espesor : 250 μ .

Activación a 120°C: 1 hora

Saturación de las cámaras : 2 horas

Recorrido del solvente : 15 cm

Muestras : 2 μ l (de soluciones al 0,2%)

Mezclas de solventes utilizadas aparecen relacionadas en el cuadro N° 1; a partir del cual se puede observar que no hay separación del colorante en medio alcalino.

En vista de los resultados anteriores, se resolvió ensayar solventes en estado puro con el objeto de saber cuá

les arrastraban el material en mayor o menor grado, para lo cual se empleó la microcromatografía. (Cuadro N° 2).

Reactivos y Equipo :

Sílica gel G

Activación a 120°C : 15 minutos

Espesor : 250 μ .

Placas de vidrio de 2,5 cm X 7,5 cm

Cámaras pequeñas (saturación con 5 ml. por media hora).

Recorrido 6,5 cm

De acuerdo a los resultados obtenidos con los solventes puros, se procedió a hacer mezclas entre los que arrastran el colorante y los que lo retienen. En todos los ensayos siguientes, se empleó también la micro cromatografía. (Cuadro N° 3) .

CUADRO 1

SOLVENTE	SEPARACION
Piridina-Amoníaco(25%)-Alcohol Isoamílico (13:10:10)	No
N-Butanol-Agua-Amoníaco(25%)-Etanol(95%) (33.5:8.7:0.3:7.5)	Regular
Amoníaco (28%)-Isobutanol-Agua (2:2:96)	No
Piridina-Alcohol Isoamílico-Amoníaco(25%) (1.3:1:1)	No
Acetato de Etilo-Isopropanol-Amoníaco-Agua (35:35:20:10)	No
N-Butanol-Piridina-Agua (1-1-1)	Regular
N-Butanol-Acetato de Etilo-Metil Etil Cetona- (80:80:88:1) Agua	Regular
Benceno-Metanol-Amoníaco (65:30:4)	Regular
Benceno-Isopropanol-Amoníaco (60:30:10)	No
Acetato de Etilo-Agua-Etanol-Amoníaco (12:60:25:3)	No

CUADRO 2

SOLVENTE	SEPARACION
Etanol	Regular
Metanol	Regular
Acetona	No
Butanol	No
Acetato de Butilo	No
Piridina	Si
Alcohol Isoamílico	No
Dimetil Formamida *	Si
Eter de Petróleo **	Regular
Alcohol Bencílico **	Regular
Alcohol Amílico **	No
Alcohol Isoamílico **	No
Alcohol Isopropílico *	Regular
Alcohol Isobutílico **	Regular
Alcohol Butílico **	No
Ciclohexano **	No
Acido Acético	Si
Metanol *	Regular
Benceno **	Regular
Acetato de Butilo **	No
Etanol *	Regular
Tolueno **	No
Piridina *	Si
Acetato de Etilo **	No
Eter Etílico **	No
Tetracloruro de Carbobo **	Regular
Cloroformo **	No
Propanol *	Regular
Acetil-Acetona **	Regular
Amoníaco *	No

* Con un 10% de agua.

** Saturado con agua.

CUADRO 3

SOLVENTE	SEPARACION
Dimetilformamida - N- Butanol (60:40)	No
Dimetilformamida - Acetato de Butilo (70:30)	Regular
Dimetilformamida - Cloroformo (80:20)	No
Dimetilformamida - Alcohol Isopropilico - Acetato de Butilo (60:20:20)	Regular
Dimetilformamida - Piridina - N- Butanol (1. 2:0. 6:0. 2)	Regular
Dimetilformamida - Piridina - Acetato de (1. 4:0. 4:0. 2) Butilo	Regular
Dimetilformamida - Piridina - Acetato de (42. 5:5:2. 5) Butilo	Regular
Dimetilformamida - Ciclohexano - Metanol (34:2:4)	Regular
Dimetilformamida - Acetato de Butilo - Acido Acético Glacial - Metanol (2: 1:0. 8:1)	Si
Dimetilformamida - Acetato de Butilo - Acido Acético Glacial - Metanol (1:2:0. 5:2)	No
Dimetilformamida - Acetato de Butilo - Acido Clorhídrico - Metanol (2:1:0. 5:1)	Si
Dimetilformamida - Etanol - Acido Acético Glacial - Tetracloruro de Carbono (1. 5:2:1:1. 5)	No
Dimetilformamida - Etanol - Acido Acético Glacial - Tetracloruro de Carbono (1:2:1:2)	No

En conclusión, en vista de que el colorante no se separa con solventes alcalinos, se decidió emplear mezclas cuaternarias ácidas.

Al desarrollar los cromatogramas y revelarlos colocando sobre vapores de NH_3 se obtienen manchas bien definidas de color rojo vino tinto con dos tipos de solventes.

Para el solvente: Dimetil formamida-Acetato de butilo-Acido clorhídrico concentrado. - Metanol (2:1: - 0.5:1) se obtiene un $R_f \times 100$ de 83; pero se presenta el inconveniente que al efectuar la elución, se obtienen cristales de color anaranjado oscuro que se descomponen fácilmente por el oxígeno del aire dando una masa de color negro.

En consecuencia, el solvente adecuado para este tipo de colorantes es: Dimetil formamida-Acetato de butilo-Acido acético glacial-Metanol (2:1:0.8:1) empleando como adsorbente sílica gel C en agua.

El $R_f \times 100$ para los casos A y B es de 83.

Cromatografía preparativa usada en la purificación:

Reactivos y Equipo :

Se utilizaron placas cubiertas con sílica gel G , con un espesor de 500μ , activación a 120°C por una hora. Recorrido : 15 cm.; Tiempo, 2 horas.

Se empleó como eluente alcohol del 85% en caliente, luego se centrifugó, se evaporó el solvente y se obtuvieron para las muestras A y B cristales de color anaranjado oscuro. Con éstos cristales se efectuaron los ensayos y determinaciones físicas y espectrofotométricas.

III. - Propiedades Físicas. -

Es necesario aclarar que las muestras A y B contienen un colorante que responde a las pruebas para el Lapacol y que tienen exactamente las mismas propiedades. La muestra C no contiene ninguna materia colorante, que se pueda extraer con alcohol; sólo deja un residuo resinoso, de color pardo-negruzco, que no responde a las pruebas para el Lapacol.

Por lo expuesto anteriormente, las propiedades se resumen en un solo grupo.

Aspecto: Cristales de color rojo ladrillo brillante. Son solubles en EtOH y de Na₂CO₃ y en AcOH. Lige-
ramente solubles en benceno, cloroformo, éter
etílico, éter de petróleo y en agua caliente. Insolubles en agua fría, tetracloruro de carbono.

Punto de Fusión : 138°C.

Pruebas Cualitativas para el Lapacol :

- a) Con soluciones alcalinas y en presencia de vapores de amoníaco intenso color rojo vino tinto. (1)
- b) Con FeCl₃ al 2% en agua, los colorantes procedentes de las muestras A y B dan coloración verde. (Compuestos quinónicos).

IV. - Identificación de la Estructura Quinónica por Espectrofotometría. -

Uno de los métodos que ayuda a identificar los compuestos es la Espectrofotometría y la interpretación de los espectros da una idea clara de la estructura de aquellos.

1) Espectro U. V.

Espectrofotómetro Beckman-DBG. 100 m.v. -1 pulgada por minuto. Provisto de registro.

Celdas de vidrio de 1 cm

Concentración de las soluciones: (en alcohol del 85%)

Para las muestras A y B: 10 ppm

Las dos muestras presentan dos máximos de absor-bancia, a 230 y 295 nm (bandas características pa-
ra quinonas).

2) Espectro Visible. -

Dilución de las muestras A y B: 20 ppm

Se obtienen 2 máximos; a 470 y a 492 nm

De ellos el más característico es el que se presenta
a 478 nm

3) Espectro IR. -

Se corrieron espectros en fase sólida con K Br -
(300 mg y 1 mg de colorante). Se utilizó el Espectro
fotómetro Perkin-Elmer, modelo 187, (Fig.1)

Igualmente se corrieron espectros en fase sólida y
en película (Fig.2), utilizando como solvente alco-
hol etílico absoluto (muestra A). Se usó el aparato
Perkin-Elmer modelo 700, el cual tiene una mayor
resolución en la región comprendida entre 4.000 y
1.900 cm^{-1} .

Interpretación de los Espectros: Al analizar los es-
pectros, se encontraron para las dos muestras exac-
tamente las mismas bandas. A la longitud de onda
de 2,95 micras ó 3.400 cms^{-1} ; de la banda caracte-
rística del OH de tipo fenólico.

A 6,1 micras ó 1.630 cms^{-1} ; da la banda caracterís-
tica de las quinonas (-C=C).

Las bandas a 6,6 micras (1.520 cm^{-1}) y 6,9 micras
(1.450 cms^{-1}) corresponden a enlaces conjugados.

En el espectro tomado en película (etanol absoluto), para la muestra A, se observan unas pequeñas bandas entre 11 y 15 micras.

4) Espectrofluorimetría. -

Espectrofluorómetro Perkin-Elmer, provisto de registro.

Concentración de las soluciones en etanol absoluto: 1 ppm (para las dos muestras).

Espectro de Emisión : (Se utilizó sensibilidad de 6).
Presenta un máximo de 440 nm, en los 2 casos.

Espectro de Excitación: (Se utilizó sensibilidad de 3).
Presenta un máximo a 399 nm en los dos casos.

Se concluye, por el estudio de los espectros, que el compuesto aislado de las 2 cortezas presenta: al U.V. los máximos característicos de las quinonas; al I.R. las bandas corresponden a la estructura 1,4 quinona con un OH fenólico; y si bien es cierto que la espectrofluorimetría nos sirve muy poco para caracterizar un compuesto, si se sabe que las moléculas con enlaces conjugados (como es el caso de las quinonas) presentan fluorescencia.

V. - Determinación del Contenido de Lapacol en las Cortezas.

El método utilizado para la determinación cuantitativa fué gravimétrico, por pesada de los residuos obtenidos por extracción con alcohol del 85% y posterior purificación.

Corteza A. - 4%

Corteza B. - 6,8%

VI. - Ensayo Potenciometrico del Colorante. -

Con este ensayo, se pretendía comprobar la utilidad que podría tener el Lapacol en la química Analítica por su uso como indicador en titulaciones ácido-base, ya que precisamente una de las pruebas para el Lapacol es el viraje que presenta en medio ácido y en medio alcalino.

Se prepararon soluciones de los colorantes A y B al 0,5% en alcohol de 95%.

Se efectuaron titulaciones de ácido fuerte contra base fuerte, de ácido débil contra base fuerte y de base débil contra ácido fuerte utilizando como indicador interno 5 gotas de cada una de las soluciones de colorante.

Las titulaciones se hicieron potenciométricamente con el fin de observar los rangos de pH en los cuales se pudiera notar un viraje nítido dentro de la solución. El colorante da en medio ácido, color amarillo y en medio alcalino, color rojo.

En todos los casos, al ir agregando titulante, el potenciómetro va marcando los valores de pH respectivos, pero en ningún momento de la titulación se observa cambio apreciable en el color de la solución, pues va virando del amarillo a anaranjado (ácido a alcalino), y de rojo a anaranjado (alcalino a ácido); sin dar un punto final que sea visible.

Por tanto, no es recomendable el uso del Lapacol, como indicador de titulaciones de ácidos contra bases fuertes y viceversa, de ácidos débiles contra bases fuertes ni de bases débiles contra ácidos fuertes; ya que no da viraje nítido en el punto final.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados anteriormente expuestos señalan algunos puntos a discutir en el estudio analítico del Lapacol.

Se sigue el orden por capítulos, tal como está dividido el trabajo:

I. En los métodos de extracción ensayados se observa que con las técnicas propuestas por los diversos autores, solo obtuvimos resultados satisfactorios con la que utiliza alcohol del 85% en caliente y posterior eliminación de resinas (Método 2-); ya que se comprobó experimentalmente que para el tipo de colorante (quinónico con un OH fenólico) en estudio, el solvente más adecuado es el Etanol; pues el benceno tan solo lo disuelve ligeramente, así como no es lógico pensar que el compuesto sea arrastrable por el vapor de agua.

Fué necesario adicionar algunos pasos al método, con el fin de eliminar las resinas las cuales son bastante persistentes en los extractos. De esta forma, se hacen necesarios varios tratamientos con alcohol de un grado más bajo al usado en la extracción, para precipitar las resinas. Despúes se efectúan lavados del extracto alcohólico con tetracloruro de carbono.

Por otra parte, no solo se comprobó por los residuos obtenidos en la extracción, sino también por todas las experiencias analíticas realizadas posteriormente sobre los compuestos aislados; que las muestras A y B contienen el mismo colorante y que la muestra C no contiene ningún compuesto colorante que se pueda extraer con alcohol.

II. Para obtener el colorante en forma pura, se empleó la cromatografía preparativa en capa delgada utilizando sílica gel G en agua y una mezcla de solventes ácida. Para llegar a establecer las condiciones adecuadas fué necesario reali-

zar numerosas experiencias; pues lo descrito por Stahl para colorantes en madera y las mezclas alcalinas comúnmente utilizadas para colorantes (se ensayaron 10 mezclas), no tienen aplicabilidad en nuestro caso ya que no hay separación del compuesto en medio alcalino. Esto debe tenerse en cuenta para otros colorantes naturales con estructuras similares (quinonas, fenoles) y que sean insolubles en agua.

Así, después de haber realizado cromatografías con 30 solventes puros y escogidos los que desplazaban en su totalidad y en poca cantidad el material, se hicieron ensayos con 3 mezclas binarias, 5 mezclas ternarias y 4 cuaternarias ácidas, obteniéndose la combinación adecuada.

III. Las propiedades físicas que presentan los colorantes aislados, se identifican con las del Lapacol.

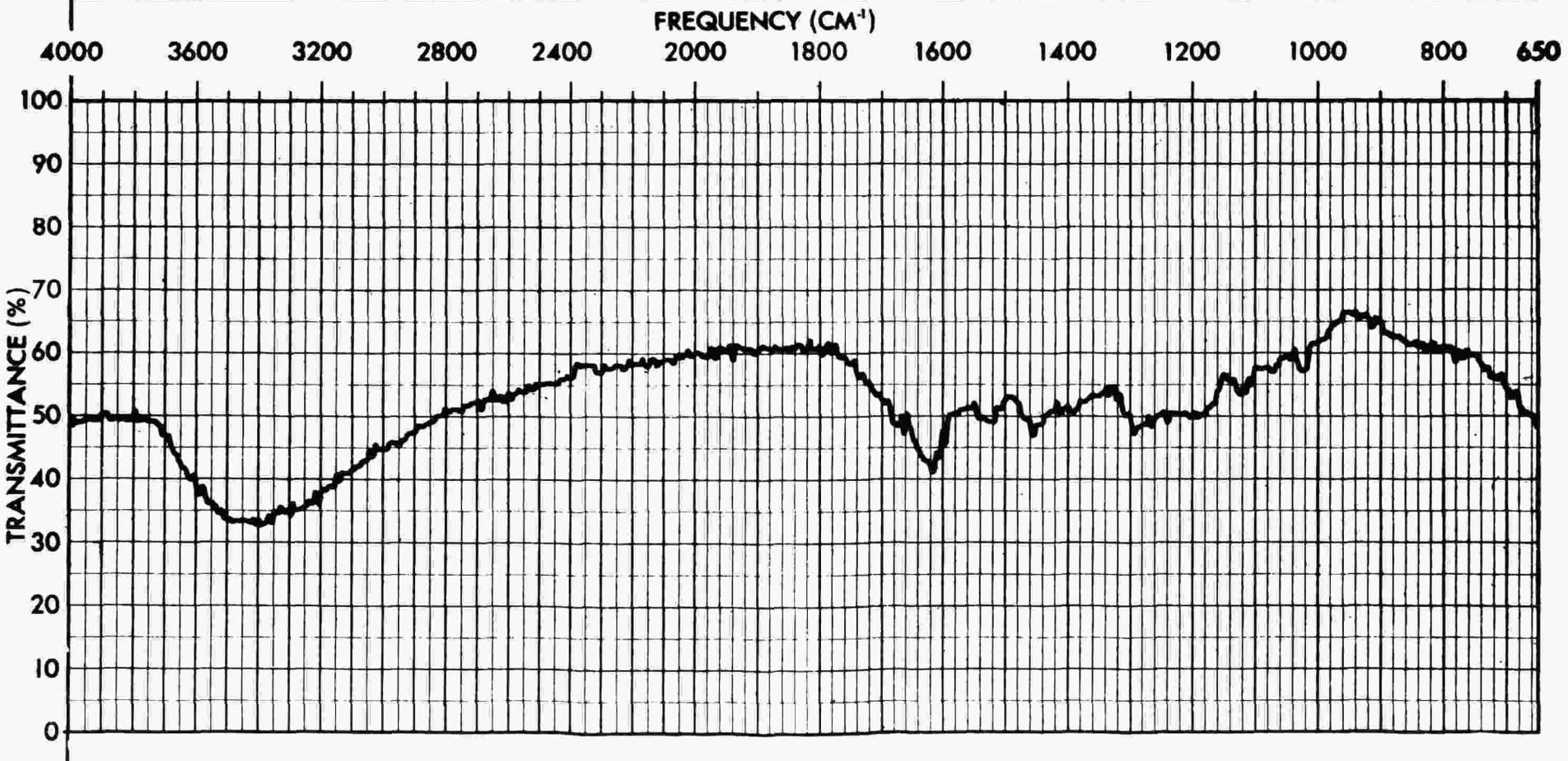
Otras Pruebas: Comportamiento del Lapacol frente a las soluciones alcalinas y coloración de las quinonas y fenoles con el cloruro férrico.

IV. Por la interpretación de los espectros se identifica el compuesto. Los máximos de U.V. son característicos de las quinonas; al visible presenta 2 máximos por sus características como colorante; en el I.R. se presentan bandas que indican una estructura 1,4 Quinona con OH fenólico. Los enlaces conjugados dan fluorescencia (Espectrofluorimetría).

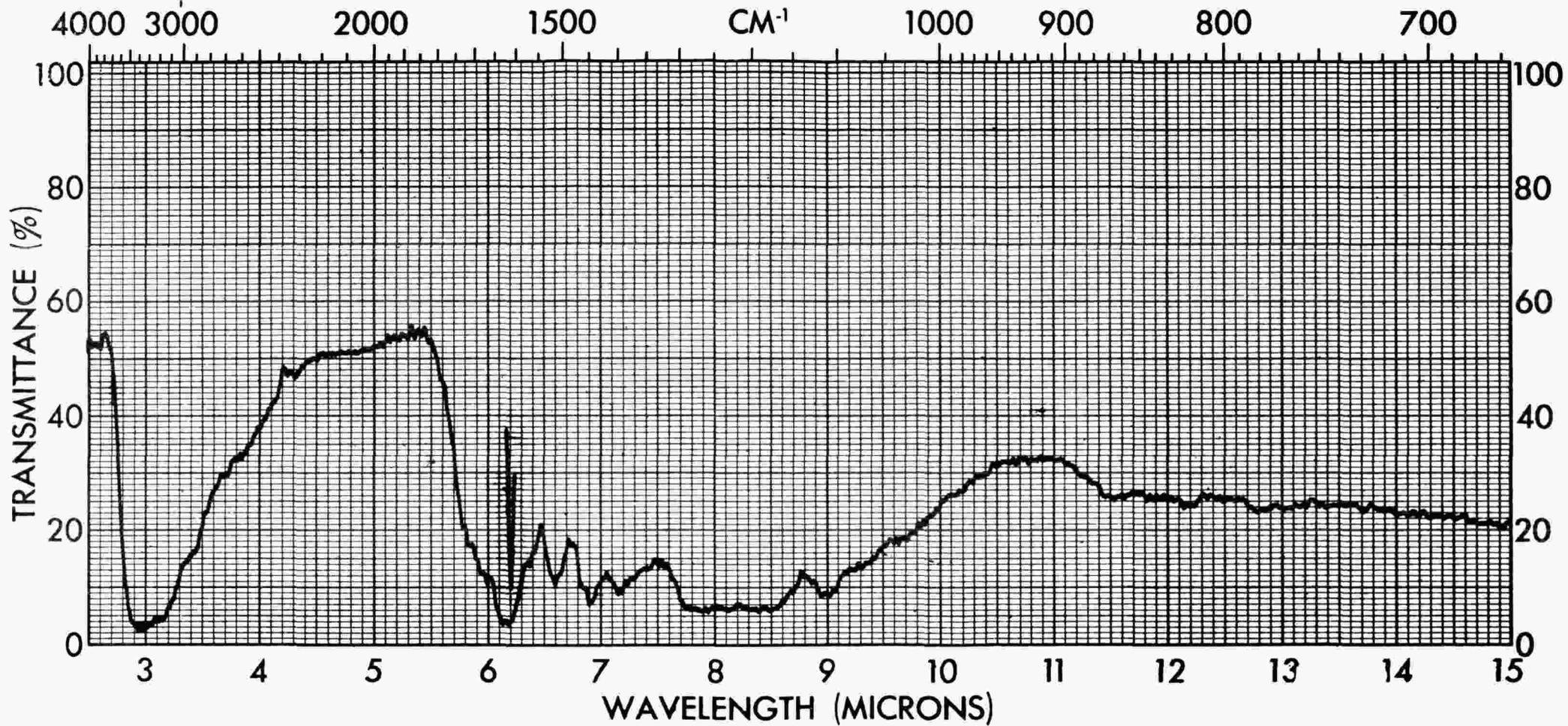
V. El contenido del colorante en las cortezas es alto.

VI. Se efectuó un ensayo potenciométrico, por una posible utilidad del compuesto en Química Analítica; pero se comprobó que no puede aplicarse como indicador interno en titulaciones ácido-base, por cuanto no da viraje nítido en el punto final.

REMARKS	ORIGIN <u>Cortezza (Muestra A)</u>	PERKIN-ELMER MODEL 700	
	_____		SPECTRUM NO. _____
	PURITY _____		SAMPLE 1 <u>LAPACOL</u>
	_____		_____
	PHASE <u>Película en Etanol Absolu-</u> to.		_____
	CONCENTRATION _____		SAMPLE 2 _____
	THICKNESS _____		_____
DATE <u>Septiembre 7/71.</u>	_____		
OPERATOR _____	_____		



SAMPLE _____
SPECTRUM NO. _____



SPECTRUM NO. _____	ORIGIN <u>Corteza (Mues-</u>	LEGEND _____	REMARKS _____
SAMPLE <u>LAPACOL</u>	<u>tra A)</u>	1. _____	_____
_____	PURITY _____	2. _____	_____
_____	PHASE <u>Sólida (KBr: 300</u>	DATE <u>Septiembre 7/71.</u>	_____
_____	<u>mg. Sustancia lmg.</u>	OPERATOR <u>C.B. de D.</u>	_____
_____	THICKNESS _____	_____	_____

SPECTRUM NO. _____
SAMPLE _____

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. De las 3 cortezas investigadas; dos de ellas contienen un colorante que tiene las mismas características y da idénticas reacciones.

2. El único método de extracción que da buenos resultados, es el que utiliza alcohol del 85% en caliente por maceración o en extractor soxhlet. Se eliminan las resinas por tratamientos con alcohol del 80% y luego con tetracloruro de carbono. El método puede ser aplicable a extracción de otros colorantes naturales.

3. Después de un prolongado estudio cromatográfico y por un detenido análisis sobre los resultados obtenidos con solventes alcalinos y luego por experimentación de solventes puros; se ensayaron mezclas binarias, ternarias, y cuaternarias; se concluye que para purificación de colorantes con estructura quinónica o fenólica se puede emplear la cromatografía en capa delgada con las siguientes condiciones:

Adsorbente: Sílica gel G en agua; Solvente: Dimetil formamida-acetato de butilo-ácido acético-metanol (2:1:0,8:1).

Eluente : Alcohol del 85%.

4. Las propiedades físicas (aspecto, solubilidad y punto de fusión; 138°C, coinciden con las del Lapacol.

5. La corteza A contiene 4% de colorante.

La corteza B contiene 6,8% de colorante.

6. Identificación de la estructura quinónica por Espectrofotometría: Al U. V. dos máximos (a 230 y 295 nm) características de las quinonas; al visible; 392 y 478 nm; al I. R. las bandas a 2,95 micras (OH fenólico), a 6,1 micras (1,4 quinonas), a 6,6 y 6,9 micras (enlaces conjugados).

dos; Espectrofluimetría; Espectro de excitación: máximo a 399 nm, Espectro de emisión: máximo a 440 nm. (La fluorescencia puede deberse a enlaces conjugados).

7. El colorante no tiene utilidad en Química Analítica como indicador interno en titulaciones ácido-base.

8. En conclusión; las cortezas A y B contienen un colorante que responde a las pruebas para el LAPACOL
La corteza C no contiene este colorante.

1. BIBLIOGRAFIA

1. GREENE y HOOKER, Amer.Chem J. 11, 267, 1889
2. T.H. LEE, "Note on Tecomin, a colouring matter derived from the heart wood of bignonia tecoma". Chem. Soc. 79, 284, 1901.
3. R.LIVINGSTONE and M.C. WHITING, Chem.Soc., 7, 3631, 1955.
4. R.LIVINGSTONE and M.C. WHITING., Chem.Abs., 50, 9397c, 1956,
5. ORTH H., Chem.Abs., 54, 25802c, 1960.
6. STAHL E., "Thin layer Chromatography" , Springer Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 346, 1965
7. PERDUE Jr. E. and HARTWELL Jr., "The search for plant sources of anticancer drugs", Morris Arboretum Bulletin of the University of Pennsylvania, The Morris Arboretum, 20, 3, 35, 1969.