

METABOLITOS SECUNDARIOS EN EL GUAYACÁN AMARILLO Y EN EL GUAYACÁN ROSADO

Secondary metabolites in the yellow guayacán and in the pink guayacán

RESUMEN

Se extraen los metabolitos secundarios del guayacán amarillo (*tabebuia chrysantha jacq. Nicholson, Bignoniaceae*) y guayacán rosado (*tabebuia rosea bertol. Dc*) bajo técnicas de sonicación, ultrasonido y extracción en fase sólida. La purificación de los metabolitos se realiza por medio de extracción en fase sólida (SPE) que se compone de tres apartados que son: la lixiviación, la extracción y la microextracción en fase sólida. Se observa la presencia del núcleo γ -benzo pirona y leucoantocianinas, de flavonoides; γ - lactonas α,β -insaturadas y desoxiazucares, de glicósidos cardiotónicos, lactona α,β -insaturadas, de sesquiterpenlactonas. Se pudo comprobar la ausencia en las flores de guayacán amarillo y guayacán rosado del ion flavilio, taninos, glicosidos cinogenéticos, coumarinas, esteroides, quinonas, saponinas y de alcaloides. La cromatografía en columna se utilizó para purificar las muestras.

Palabras clave: guayacán amarillo, guayacán rosado, apamate, metabolitos secundarios, sonicación, extractos vegetales.

ABSTRACT

Secondary metabolites are extracted from the yellow guayacán (Tabebuia chrysantha Jacq. Nicholson) and pink guayacán (Tabebuia rosea Bertol. Dc) under sonication techniques, ultrasound and solid phase extraction. The purification of the metabolites is performed by solid phase extraction (SPE) which consists of three sections that include leaching, extraction and phase microextraction sólida. Note the presence of γ -benzo pyrone nucleus and leucoantocianinas, flavonoids, γ -lactones α , β -unsaturated and desoxiazucares, cardiac glycosides, lactone α , β -unsaturated, of sesquiterpene lactone. We noted the absence guayacán flowers pink yellow and ion guayacán flavilio, tannins, cinogenéticos glycosides, coumarins, sterols, quinones, saponins and alkaloids. Column chromatography was used to purify the samples.

Keywords: Yellow guayacán, Pink Guayacán, Apamate, Sonication, Plant Extracts.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, por su biodiversidad y riqueza en metabolitos secundarios, proporcionan una interesante fuente de posibles sustancias activas contra muchas bacterias. Por esto, en los últimos años hay un creciente interés en centros de investigación de todo el mundo en búsqueda de efectos antibacterianos de extractos de múltiples especies vegetales.

El guayacán amarillo es originario de Colombia y Venezuela en este último es el árbol nacional; esta variedad tiene una amplia distribución en Colombia. En los bosques puede alcanzar 35 m de altura y 1 m de diámetro en el tronco. En la ciudad no pasa de 25 m de alto y 0,6 m de diámetro. Es un árbol de crecimiento rápido al aire libre y vida larga. Su madera es muy apetecida por ser dura y pesada. Se usa para pisos,

JUAN SEBASTIÁN MARTÍNEZ ARBELÁEZ
Químico

JORGE IVÁN SIERRA ACEVEDO

Químico, M.Sc.(c)
profesor programa de Química
investigador del grupo de
investigación QIDEA
jorgesieraaavedo@gmail.com
jisierra@uniquindio.edu.co

ROBERTO CARLOS ARRUBLA JARAMILLO
Químico.

PEDRO NEL MARTÍNEZ YEPES

Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D.
profesor Titular programa de
Química
Director grupo de investigación
QIDEA
pedronelmartinez@uniquindio.edu.co

construcciones, cabos de herramientas, chapas decorativas, postes, implementos agrícolas, etcétera. El tinte de su madera se usa para teñir algodón. Es una especie que contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios, estos metabolitos son usados como compuestos activos para combatir muchas patologías [1] [2]. El guayacán rosado es nativa de América continental y es común en las tierras altas húmedas hasta tierras bajas secas, desde el sur de México hasta Venezuela y la costa de Ecuador. Las especies se pueden encontrar esencialmente puros, ya que son arboles aislados, en un bosque mixto. Es una especie de árboles ornamentales y maderables de la familia Bignoniaceae. El *Tabebuia rosea* (Bertol.) A. DC., es el apamate, el árbol emblema del estado Cojedes, Venezuela [3] [4].

Para la extracción de metabolitos secundarios a partir de materiales vegetales, las técnicas clásicas con solventes

se basan en la correcta elección del solvente y condiciones como temperatura y agitación. En estudios previos se demostró que la extracción por solvente de compuestos orgánicos en materiales vegetales es significativamente más eficiente utilizando el ultrasonido de poder [5].

2. METODOLOGÍA

Recolección y adecuación del material vegetal:

- Las flores de la especie de guayacán amarillo se recolectaron en el centro recreacional Combafalco, municipio de la Tebaida, Quindío, Colombia; estas se limpian, se separarán las de buen estado, se envuelven en papel periódico, se secan a de 40°C durante 72 horas, luego se cortan, y se almacenan para la obtención de los extractos.
- Las flores de la especie de guayacán rosado se recolectaron en la antigua instalación de Bavaria, municipio de Armenia, Quindío, Colombia.

La extracción por sonicación fue realizada en un equipo ULTRASONIC PROCESSOR. El material vegetal el cual fue pesado utilizando una balanza GIBERTINI modelo E50S. El procedimiento, el de la figura 1a, se empleó para las muestras de guayacán amarillo seco, guayacán amarillo húmedo, guayacán rosado seco y guayacán rosado húmedo.

La extracción por ultrasonido fue realizada en un baño ultrasónico BRANSON 3510 el cual presenta las siguientes especificaciones: (a) El control de tiempo: mecánico, presenta un tamaño general. 16"x12"x14.5", (b) Tamaño de tanque 11.5"x6"x6", (c) Peso: 12 libras, (d) Frecuencia: 40 KHz, (e) Voltaje: 120V. El procedimiento se tiene en la figura 1b.

Para la concentración de las fracciones obtenidas por sonicación y radiación por ultrasonido se uso un destilador a micro escala. Las fracciones fueron concentradas hasta un volumen de 30 mL, posteriormente estas fueron almacenadas a una temperatura de 12°C en nevera.

Para la extracción en fase sólida (SPE) se utilizó un cartucho de C-18, que presenta características específicas, es no polar, es un absorbente hidrofóbico, fabricado con silano trifuncional y una capa final que ayuda a reducir las interacciones polares secundarias asociadas con los grupos silanol de la superficie, presenta un tamaño de poro de 60-80 Å.

Para la purificación (ver la figura 1c) de las fracciones obtenidas por los dos métodos de extracción empleados se utilizó un cartucho comercial Resprep C-18 el cual se acopla a un kitasato que está a su vez conectado a una bomba de vacío la cual genera una presión de -18 psi; para la activación del cartucho de C-18 se adicionan 40 mL de metanol al 99,8% de pureza y se acciona la bomba

de vacío para que el metanol recorra todo el cartucho y lo active, luego de la activación se hacen pasar las fracciones concentradas por el cartucho y se recolectan las fracciones resultantes para ser almacenadas. Posteriormente se hacen pasar 40 mL de una mezcla de solventes la cual está constituida por acetona-metanol en una proporción de (3:1) en volumen, inmediatamente esta se hace pasar por el cartucho y la fracción resultante es almacenada. Por el mismo cartucho se hace pasar 40 mL de acetato de etilo al 99,92% de pureza y se recolecta la fracción resultante para ser almacenada. Las fracciones son almacenadas a una temperatura de 12°C en nevera para ser concentradas posteriormente hasta un volumen de 10 mL cada fracción.

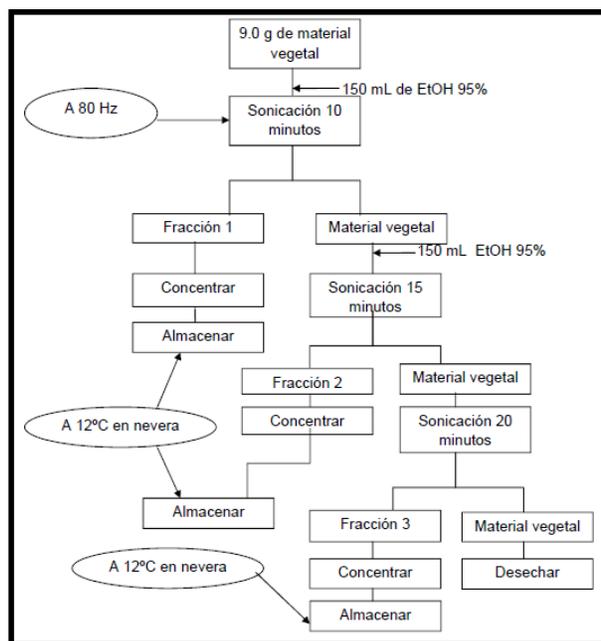


FIGURA 1. (a) Diagrama de flujo de la extracción por sonicación empleada para la extracción de los metabolitos.

Para los diversos extractos obtenidos se tienen los siguientes análisis:

- Análisis fitoquímico preliminar:
 - Reacciones de reconocimiento de Flavonoides: (a) Prueba de la Cianidina o Shinoda, es conocida también como reacción de Willstätter, (b) Prueba de leucoantocianidinas, (c) Prueba de Rosenheim.
 - Análisis de taninos: (a) Prueba de gelatina-sal, (b) Prueba de tricloruro férrico al 1%, (c) Prueba de acetato de plomo.
 - Análisis de Saponinas: (a) Prueba de Molish, (b) Prueba de Hemólisis, (c) Prueba de Antrona.
 - Reacciones de reconocimiento de sesquiterpenlactonas: Prueba de hidroxamato férrico.
 - Reacciones de reconocimiento de Glicósidos Cardiotónicos: (a) Prueba de Keller-killiani, (b)

Prueba de legal, (c) Prueba de Kedde, (d) Prueba de Baljet.

- Reacciones de alcaloides: (a) Bouchardat, (b) Dragendorff modificado, (c) Mayer.

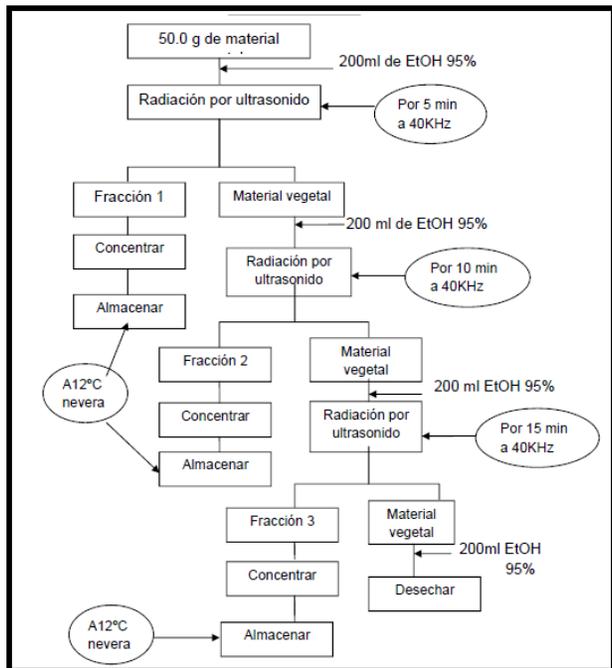


FIGURA 1. (b) Diagrama de flujo para la extracción por radiación por ultrasonido. [2].

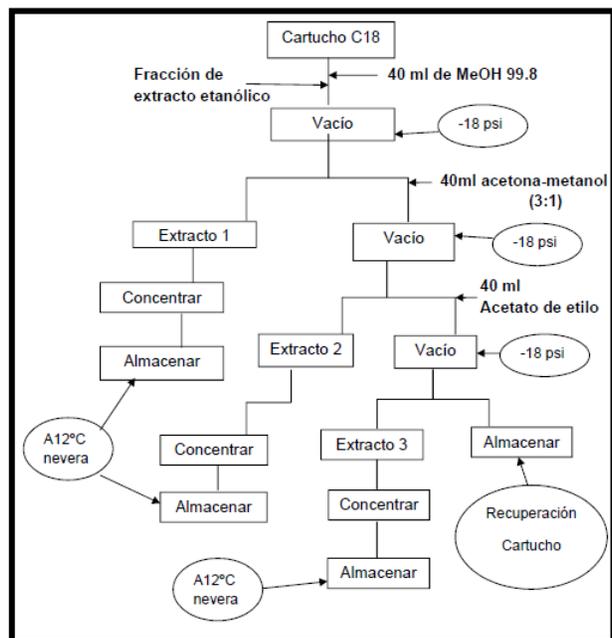


FIGURA 1 (c). Diagrama de flujo para la extracción en fase sólida (SPE) [2].

- Análisis de las muestras por métodos instrumentales:
 - Análisis ultravioleta visible (Uv-vis): se empleó un equipo de ultravioleta visible HEWLETT PACKARD 8453, barrido de onda entre 190 a

1100 nm y menos de 0,03% de la luz difusa es estándar.

- Análisis por espectroscopia de absorción en el infrarrojo: Se empleó un equipo THERMO NICOLET AVATAR 320 FT-IR que posee un rango espectral 4000 – 400 cm⁻¹, presenta un divisor de haz de KBr, un detector DTGS y una resolución óptica de 1 cm⁻¹.
- Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia: Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) AGILENT 11000 con detector AD, utilizando las siguientes condiciones de corrida: Se empleo una columna LiChrosorb fase-reversa de 7 µm C18, los análisis fueron realizados isocroticamente empleando como fase móvil metanol-agua (6:4) con un índice de flujo de 1 mL/min, la inyección fue de 20µL y se empleo una longitud de onda de detección de 254 nm.

3. RESULTADOS

La sonicación es el procedimiento más efectivo, comparado con el de ultrasonido, debido a que la sonda de inmersión tiene un contacto directo con la muestra.

En las fracciones obtenidas:

- Se observa la presencia del núcleo γ -benzopirona.
- Se pudo comprobar la ausencia del ion flavilio.
- Hay ausencia de taninos.
- La prueba de Keller-killiani confirma la presencia preliminar de desoxi-azuceres.
- Se confirma la presencia preliminar de γ -lactonas α – β - insaturadas.
- Hay presencia preliminar de glicósidos cardiotónicos.
- Hay presencia preliminar de sesquiterpenlactonas.
- Hay ausencia de alcaloides en las flores de guayacán amarillo y guayacán rosado.

El análisis por cromatografía en capa delgada ratifica la presencia de sesquiterpenlactonas. La cromatografía en columna se utilizó para purificar las muestras más significativas de cada método de extracción, para esto se empleo como eluente una mezcla de solventes la cual está conformada por MeOH:CHCl₃ (5.5:2.5). Los extractos fueron sometidos al análisis de cromatografía HPLC, figura 2a y 2b, con detector ultravioleta.

Resultados de los espectros ultravioleta visibles (UV-vis): (a) Se observa una banda que presenta una fuerte intensidad a los 237 nm la cual posee una absorbancia de 0,38637; esta banda es característica de los sistemas ciclopentanonas, (b) Asumiendo las reglas de Woodward podemos obtener el valor teórico del ester cíclico de cinco miembros. (C) Con base a los datos suministrados

proponemos dos posibles estructuras que corresponde a la figura 3.

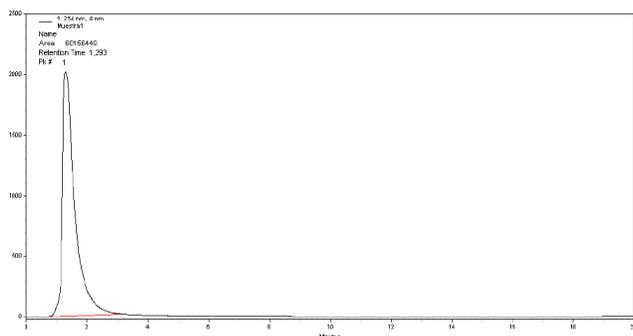


Figura 2a. Cromatograma HPLC, guayacán rosado seco 15 min ultrasonido Tr 1,293 min

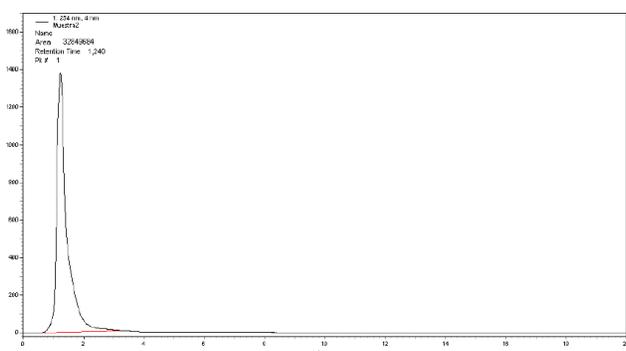


Figura 2b. Cromatograma HPLC, HPLC guayacán amarillo seco 10 min ultrasonido Tr 1,240 min

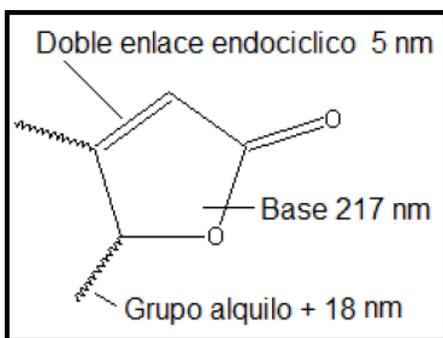


FIGURA 3. (a) Posible estructura 1, Valor exp. 237 nm, valor teórico 240 nm. [2].

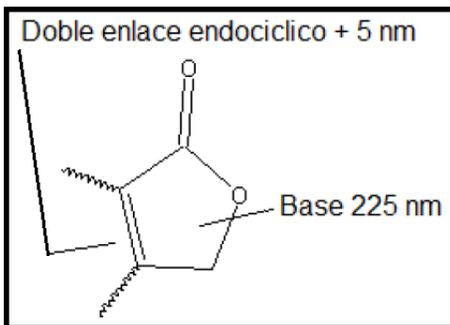


FIGURA 3. (b) Posible estructura 2 Valor exp. 237 nm, valor teórico 230 nm[2].

Resultados de los espectro infrarrojos (IR): el comportamiento de los espectrogramas de las diferentes muestras representativas todas ellas presentan un comportamiento similar, como el siguiente: (a) Banda a $3405,84 \text{ cm}^{-1}$ y $632,57 \text{ cm}^{-1}$, son generadas por vibraciones de tensión de los enlaces de los grupos hidroxilo (OH) presentes en la muestra, son producidas por interacciones moleculares de tensión causadas por puentes de hidrógeno, (b) Banda $2939,13 \text{ cm}^{-1}$, Se observa una banda producida por vibraciones de tensión asimétrica que son características de los enlaces formados entre carbono e hidrógeno (C-H), esta banda podemos decir que puede pertenecer a un anillo cíclico debido a su forma así como esta también se presentan las bandas ubicadas a $1403,99$ y $1284,42 \text{ cm}^{-1}$ las cuales son características de estos grupos anteriormente mencionados, (c) Banda $2352,85 \text{ cm}^{-1}$, esta es característica del CO_2 presente en el medio ambiente, (d) Banda $1720,28 \text{ cm}^{-1}$, región que comprende la flexión del enlace C-O con hibridación sp^2 , (e) Banda $1664,3 \text{ cm}^{-1}$ esta región comprende la flexión del enlace C-O con hibridación sp^3 , (f) Banda $1056,85 \text{ cm}^{-1}$ generalmente indicadora de presencia la tensión y flexión que son característicos de las lactonas.

Porcentaje del rendimiento de extracción: Con el método de sonicación fue del 2,31 %, y con el de ultrasonido fue del 1,17 %.

4. CONCLUSIONES

La utilización de los métodos de sonicación y ultrasonido generan una ganancia significativa en ahorro de tiempo y gasto de solventes a la hora de ser utilizados como métodos de extracción, y el porcentaje de rendimiento de estas extracciones es ideal lo que demuestra que estos métodos de extracción son magníficos para obtener resultados más eficientes. Se observa que la eficiencia de la extracción por sonicación es mayor, comparándola con la extracción por radiación con ultrasonido lo que puede ser causado, por que la sonicación tiene un contacto directo con la muestra por la sonda de inmersión lo que genera un rompimiento de las paredes celulares más eficiente.

Para las especies *Tabebuia chrysanha jacq Nicholson* y *Tabebuia rosea (Bertol) DC* se determinó por análisis de gota la presencia moderada de flavonoides en la flores de estas especies.

Se determinó la ausencia de alcaloides en el análisis preliminar de las fracciones significativas de las extracciones de las especies de *Tabebuia chrysanha jacq Nicholson* y *Tabebuia rosea (Bertol) DC* lo cual fue confirmado con la utilización de diferentes reactivos de precipitación.

El análisis preliminar de la especie *Tabebuia chrysantha* Jacq Nicholson y *Tabebuia rosea* (Bertol) DC determinó la presencia de Glicosidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas siendo estas últimas las que se encuentran en mayor proporción.

Mediante un seguimiento realizado a los diferentes métodos de extracción por análisis con ultra violeta se observa que tanto los cromatogramas de la primera extracción así como los del compuesto purificado son similares lo que indica que el compuesto extraído es el mismo de principio a fin del estudio.

Los resultados de los extractos etanólicos de las muestras representativas separados por extracción en fase sólida y cromatografía en columna usando cloroformo-metanol, apoyados en análisis instrumentales demuestran que el compuesto extraído es probablemente una lactona sesquiterpénicas.

5. AGRADECIMIENTOS

Este artículo es resultado de investigación del grupo de investigación QIDEA (Grupo Químico de Investigación y Desarrollo Ambiental, categoría C en COLCIENCIAS) en fitoquímica. La investigación se realizó en la Universidad del Quindío en los “Laboratorios de Química” del programa de Química (en la Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías), y en el “Laboratorio de Biomédicas” y en el “Laboratorio de Plaguicidas y Salud” (en la Facultad de Ciencias de la Salud).

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] CASTILLO, L.E. (2008). “Estudio Fitoquímico Preliminar, Extracción y Caracterización de Metabolitos Secundarios y Pruebas de Bioensayo de Guayacán Amarillo (*Tabebuia chrysantha* Jacq. Nicholson, Bignoniaceae)”. Proyecto de Grado, Programa de Química, Universidad del Quindío, Colombia.
- [2] MARTÍNEZ A., J. S. (2010). “Principios activos en el Guayacán Amarillo (*Tabebuia chrysantha* Jacq. Nicholson, Bignoniaceae) y en el Guayacán Rosado (*Tabebuia rosea* bertol. DC)”. Proyecto de Grado, programa de Química, Universidad del Quindío, Colombia.
- [3] SALAS, A. (2006). “Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro”. Universidad Autonoma de Queretaro, Universidad Autonoma de Zacatecas: Queretaro, Zacatecas, Mexico.
- [4] (2004). “*Tabebuia rosea* (Bertol.)DC, Apamate. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela No. 7”. Revista Facultad de Farmacia, 46 (1), Universidad de Los Andes, DC, Venezuela.
- [5] AZUOLA R., V.P. (2007). “Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (eua)” . Tecnología en Marcha, 20-4: p. 30-40.