

TESIS PREMIADA ESCUELA QUIMICA **AISLAMIENTO, VERIFICACION E IDENTIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO
RESPONSABLE DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LAS HOJAS DE *Bixa orellana*
(ACHIOTE)**Johanna Chew de Campos¹
Aura Padilla Arreaga²**I. SUMARIO**

Cuatro compuestos de tipo flavonoide se aislaron de la fracción antifúngica activa de las hojas de *Bixa orellana*. Estos flavonoides se identificaron como:

- Compuesto 1: Quercetina-3-O-rutinoside
- Compuesto 2: Quercetina-3-O-robinobioside
- Compuesto 3: Isoramnetina-3-O-rutinoside
- Compuesto 4: Isoramnetina-3-O-robinobioside.

El aislamiento de los compuestos presentes en las hojas de *B. orellana* se logró luego de un fraccionamiento fitoquímico en columna abierta con Sephadex LH-20 como fase estacionaria y metanol como eluyente, seguido por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa en una columna WATERS μ -Bondapak C-18 y una mezcla de metanol-agua 50:50 como eluyente.

La elucidación estructural de los compuestos se realizó por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C e ¹H y de Espectrometría de Masas de Rápido Bombardeo Atómico (FABMS) (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry); gracias al apoyo del Dr. Luca Rastrelli de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno, Italia.

El aislamiento e identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica de las hojas de *B. orellana* (objetivo general de la investigación) se alcanzó al obtener las estructuras y nombres de los compuestos presentes en la fracción con actividad antifúngica positiva.

Las pruebas químicas vía húmeda y el análisis por cromatografía en capa fina (CCF) permitieron establecer la probabilidad que en la fracción activa

hubieran compuestos de tipo flavonoide.

Los análisis por RMN de ¹³C e ¹H, Espectrometría de Masas y Cromatografía de Gases, confirmaron que los compuestos presentes en la fracción activa eran flavonoides.

II. INTRODUCCION

La planta *Bixa orellana* (achiote) ha sido fuente de muchos estudios, principalmente farmacológicos (1-5) los que le han atribuido a esta planta el calificativo de "medicinal", lo cual ha venido a realizar la importancia que tiene dentro del reino vegetal. Esta investigación derivó del estudio hecho por Salvador AL, en donde se comprobó la actividad antifúngica del achiote, principalmente de las hojas y el tallo.

Se ha reportado que las hojas de *B. orellana*, contienen leucocianidina, ácido elágico y algunos flavonoides no identificados (6). Otros trabajos indican la presencia de ácido tormentósico (7), un sesquiterpeno tetracíclico para el cual se sugirió el nombre de bixaganeno (8); un hidrocarburo sesquiterpénico llamado ishwarano (9) y tres flavonas bisulfato (10): 7-bisulfato de apigenina, 7-bisulfato de luteolina y 8-bisulfato de hipolaetina.

El objetivo principal de este trabajo consistía en aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad antifúngica de las hojas de *B. orellana* por medio de análisis químicos e instrumentales.

III. MATERIALES Y METODOS

1.) Material vegetal: las hojas y el extracto etanólico de *B. orellana* fueron proporcionados por FARMAYA. Se utilizaron 500 g de hojas secas para realizar las

¹Licenciada en Química²Licenciada en Química

Todas estas fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina con los disolventes mencionados, con lo cual se determinó cuáles eran iguales, llegando a un total de 9 fracciones. A éstas se les hizo una nueva corrida en cromatoplasas en las mismas condiciones anteriores, llegando al final a 4 fracciones:

Cuadro No. 1. Fracciones iguales de la fracción activa de *B. orellana*.

Bo. 1-Bo. 4	I
Bo. 5	II
Bo. 6-Bo. 7	III
Bo. 8-Bo. 9	IV

Tabla No. 1. Pruebas químicas vía húmeda realizadas a las fracciones I a IV y sus resultados.

NOMBRE DE PRUEBA	CARACTERIZA A:	REACCION POSITIVA	RESULTADO			
			I	II	III	IV
Shinoda	flavonoides	formación de tonos rojos	-	+	+	-
Erdman	alcaloides	producción de color rojo	-	-	-	-
Borntrager	antraquinonas, naftoquinonas	color rojo en la capa acuosa	-	-	-	-
Lieberman-	saponinas	producción de color	-	-	-	-
Burchard		azul o violeta				
Kedde	glicósidos cardíacos	producción de color azul	-	-	-	-
FeCl ₃	anillos fenólicos	producción de color azul	-	+	+	-

1. Para saponinas esteroidales
2. Para saponinas triperpénicas

De la purificación por HPLC de la fracción activa se obtuvieron 4 compuestos:

Tabla No. 2. Cantidades y tiempos de retención de los compuestos presentes en la fracción activa.

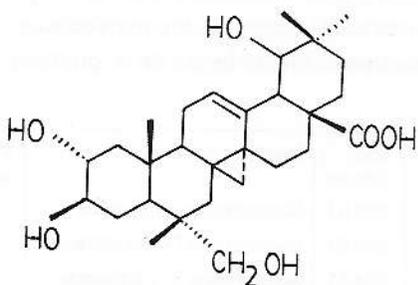
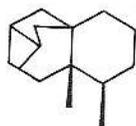
Compuesto	Peso (mg)	Tiempo de Retención
1	45	13.5min
2	35	15.5 min
3	28	21 min
4	48	23 min

Identificación de los compuestos puros por espectrometría de masas (FABMS) y por resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C. El análisis por FABMS y RMN de ¹H y ¹³C reveló la presencia de los siguientes compuestos:

Tabla No. 3. Fórmulas moleculares y nombres comunes de los metabolitos encontrados en las hojas de *B. orellana*.

Comp.	Fórmula molecular	PM (g/mol)	Nombre Común	Estructura ver fig. 1
1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.51	Quercetina-3-O-rutinoside	1
2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.51	Quercetina-3-O-robinobioside	2
3	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.51	Isoramnetina-3-O-rutinoside	3
4	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.51	Isoramnetina-3-O-robinobioside	4

Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de la fracción antifúngica de las hojas de *B. orellana*.



La fracción activa fue necesario refraccionarla, debido a que no hubo una buena separación inicialmente. Este nuevo fraccionamiento se realizó en la misma columna empacada con Sephadex LH-20 y metanol como eluyente, la que previamente fue lavada con diferentes disolventes hasta que quedó limpia y de nuevo con metanol. Se colocaron 1.72 g de fracción activa (12) disuelto en la menor cantidad de metanol posible y evitando hacer alteraciones en la superficie del empaque de la columna.

Cuando el extracto empezó a eluir a través de la columna se pudieron observar bandas bien definidas con coloraciones que iban del amarillo al verde, algunas anaranjadas. Si la separación fue efectiva es posible que cada banda representara un compuesto diferente.

El color no es un factor que determine hasta dónde se recolectaba una fracción (12), por lo que para saber cuáles fracciones eran iguales se llevó a cabo un seguimiento de lo que se obtenía de la columna por cromatografía en capa fina (CCF). Cada vez que se colectaban 3 ml de extracto se cambiaba tubo de ensayo, para luego puntear todas las fracciones en cromatoplasas. Setenticinco fracciones se recogieron de la fracción activa.

El análisis por CCF permitió, mediante la comparación de las manchas y de los valores de R_f , establecer cuáles fracciones eran iguales y por lo tanto podían unirse. Después de esto se reunieron 9 fracciones. Una nueva CCF en las mismas condiciones de la anterior de estas 9 fracciones permitió hacer un reagrupamiento de las mismas. De las 9 fracciones se observó que las primeras 4 presentaban manchas de igual color y con los mismos valores de R_f , estas se agruparon en una sola (I). Las siguientes en II, las otras dos en III y por último las restantes en IV.

La revelación de esta última placa con solución de sulfato de cerio en ácido sulfúrico, indicó que en I sólo habían compuestos de tipo carbohidratos, los cuales no presentan valor fitoquímico, mientras que en II y III estaban concentrados los compuestos de tipo flavonoide que se esperaban. Más de 33 diferentes actividades biológicas han sido reportadas para alrededor de 30 de 137 flavonoides naturales conocidos hasta el año de 1955. Existen varios estudios publicados

sobre las actividades biológicas y su lugar de acción de los flavonoides en la terapia de drogas. Reportes más recientes concernientes a acciones antivirales, antiinflamatorias y dicotóxicas demuestran su importancia como fitoconstituyentes con actividad biológica (13).

Las pruebas químicas vía húmeda confirmaron la presencia de los flavonoides en las fracciones II y III, pero especialmente en la III donde la intensidad de las manchas indicaba su mayor concentración.

La purificación por HPLC semipreparativa permite cuantificar y tener una idea de los compuestos presentes. La columna que se utilizó para la separación fue una WATERS μ -Bondapak C-18, la cual tiene un empaque de sílica gel, la que tiene un recubrimiento de un hidrocarburo C-18, lo que invierte la fase ya que cubre los grupos -OH de la sílica y la convierte en un absorbente apolar, lo que permite una separación muy eficaz de los compuestos polares. Al invertir la fase se cambian completamente las propiedades físicas del absorbente y se pasa de una cromatografía de adsorción a una de fase inversa.

La interpretación de los espectros se describe a continuación:

Compuesto 1:

El espectro FABMS del compuesto 1 mostró un ión molecular [M-H]⁻ a una relación masa-carga (m/z)=609. Con los datos de la masa y de los espectros ¹³C y ¹³C DEPT RMN se obtuvo la fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₆.

El análisis por cromatografía de gases del compuesto 1 después de la hidrólisis ácida mostró la presencia de dos moléculas de azúcar: glucosa y ramnosa. Los tiempos de retención de los carbohidratos presentes en este compuesto fueron iguales a aquellos de los trisil-azúcares originales.

El espectro por RMN de ¹H (potencia del aparato=500 MHz) indicaba la presencia de una señal de un grupo metilo de ramnosa a σ 1/15 (3H, J=6 Hz), un protón anomérico de una α -ramnosa a σ 4.55 (1H, d, J=1.5 Hz) y a una señal σ 5.55 (1H, d, J=7.5 Hz) en acuerdo con un protón anomérico de una β -glucosa (14) (tabla No. 4).

La zona aromática mostraba señales protónicas a σ =7.64 (dd, J=8.5 Hz, J=2 Hz, H-6'), a σ =6.89 (d, J=8.5 Hz, H-5') y a σ =7.70 (d, J=2 Hz, H-2') todos estos datos juntos mostraron la presencia de un anillo aromático 3', 4' disustituido (tabla No. 5).

Las 5, 7 disustituciones del anillo A quedaron demostradas con la presencia de 2 H meta-acoplados a σ =6.41 (d, J=2 Hz, H-8).

Con el análisis de todos estos datos se pudo establecer para el compuesto 1, la **aglicona quercetina-3-O-sustituida** con un disacárido.

La sustitución del C-6 de glucosa con ramnosa fue demostrada por un desplazamiento a campo bajo de 7.2 ppm en el espectro de ¹³C en comparación del correspondiente C-6 (σ =61.3) de la quercetina-3-O-glucosídico (15).

De la unión de todos los datos y de la confrontación de los mismos con los de la literatura (15) fue posible identificar el compuesto 1 como: **quercetina-3-O-rutinoside**.

Compuesto 2:

El compuesto 2 mostraba en el FABMS el mismo ión molecular de 1 a una relación m/z=609. De los datos de FABMS, ¹³C, ¹³C DEPT RMN se pudo asignar a 2 la fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₆.

El análisis por cromatografía de gases del compuesto hidrolizado mostraba la presencia de galactosa-ramnosa. Los datos de ¹H, ¹³C de RMN (tablas 4 y 5) para la aglicona del compuesto 2 eran parecidos a aquellos del compuesto 1 (14). La diferencia entre los compuestos 1 y 2 radicaba principalmente en las cadenas disacarídicas, de hecho el compuesto 2 mostraba la presencia de las señales típicas de una galactosa-6-O-sustituida (16), confirmado como se dijo antes por cromatografía de gases. En base a estas observaciones se estableció para el compuesto 2 la estructura de quercetina-3-O-robinobioside.

Compuestos 3 y 4:

Estos compuestos mostraban en el espectro FABMS el mismo ión molecular a m/z=623. El análisis

Tabla No. 4. Desplazamiento químico de RMN 130 para los compuestos 1 a 4.

Carbono	DEPT	1	2	3	4
1	-	-	-	-	-
2	C	159.3	159.0	158.8	158.8
3	C	135.6	135.3	135.5	135.4
4	C	179.2	179.4	179.3	179.4
5	C	162.1	162.9	162.9	162.9
6	CH	98.6	99.5	100.0	98.8
7	C	166.2	166.4	166.2	166.2
8	CH	94.2	94.9	95.0	93.6
9	C	158.5	158.5	158.8	158.4
10	C	105.5	105.9	105.6	105.5
1'	C	123.1	123.1	124.0	123.0
2'	CH	116.4	116.1	114.6	114.6
3'	C	145.8	145.7	150.8	150.8
4'	C	149.8	149.9	148.3	148.3
5'	CH	117.3	117.9	116.1	115.8
6'	CH	122.3	127.8	124.0	122.8
Glu 1	CH	103.7		104.5	
2	CH	75.1		75.9	
3	CH	79.3		78.2	
4	CH	72.5		71.6	
5	CH	78.3		77.3	
6	CH2	68.5		68.5	
Gal 1	CH		101.9		101.3
2	CH		73.9		73.2
3	CH		75.2		74.3
4	CH		70.2		70.4
5	CH		75.4		75.0
6	CH2		67.6		68.8
Ram 1	CH	101.2	100.1	102.4	100.5
2	CH	71.0	72.1	72.1	70.8
3	CH	71.0	72.4	72.3	71.1
4	CH	73.2	73.9	73.9	72.7
5	CH	70.2	69.7	69.7	68.8
6	CH3	17.0	17.9	17.9	18.1
OCH3				56.8	55.6

Tabla No. 5. RMN 1H de compuestos 1 a 4 y valores de J (en paréntesis) expresados en H2.

Protón	1	2	3	4
H-6	6.22 (2) d	6.22 (2) d	6.17 (2) d	6.22 (2) d
H-8	6.41 (2) d	6.41 (2) d	6.35 (2) d	6.41 (2) d
H-2	7.69 (2) d	7.91 (2) d	7.93 (2) d	8.04 (2) d
H-5	6.89 (8.5) d	6.90 (8.5) d	6.88 (8.5) d	6.92 (8.5) d
H-6	7.64 (8.5, 2) dd	7.62 (8.2, 2) dd	7.59 (8.5, 2) dd	7.61 (8.5, 2) dd
H-1 Glu	5.14 (7.5) d		5.22 (7.5) d	
H-1 Gal		5.09 (7.5) d		5.24 (7.5) d
H-1 Ram	4.58 (1.5) d	4.55(1.5) d	4.51 (1.5) d	4.55 (1.5) d
Me Ram	1.16 (6) d	1.20 (6) d	1.09 (6) d	1.20 (6) d
OCH3			3.93 s	3.99 s