



ROTENOIDES BIOACTIVOS DE LA RAÍZ DE *Lonchocarpus pentaphyllus*

Marcelino Gutiérrez G¹, Haydée Watson-Samudio¹, Eligio Vega A¹, Luis Cubilla R².

¹Departamento de Química Orgánica, Universidad de Panamá.

²Laboratorio de Bioorgánica Tropical, VIP Universidad de Panamá

e-mail: lucr@ancon.up.ac.pa

RESUMEN

Mediante el fraccionamiento bio-dirigido del extracto hexánico de las raíces del *Lonchocarpus pentaphyllus* se aislaron cuatro rotenoides conocidos: milletona (**1**), milletosina (**2**), deguelina (**3**) y tephrosina (**4**). Estos compuestos fueron aislados por medio de técnicas cromatográficas e identificados por espectrometría de RMN mono y bidimensional, MS, IR, UV. Se reporta su actividad biológica frente a *Aedes aegypti* y se discuten las variaciones observadas desde el punto de vista estructura-actividad en el ensayo de *A. salina*.

PALABRAS CLAVES

Lonchocarpus pentaphyllus, Leguminosae, rotenoides, *Aedes aegypti*, *A. salina*.

ABSTRACT

The bioassay-guided fractionation of the n-hexane extracts from the roots of *Lonchocarpus pentaphyllus* led to the isolation of four known rotenoids: milletonone (**1**), milletosine (**2**), degueline (**3**) and tephrosine (**4**). These compounds were isolated using chromatographic techniques and their chemical structures were assigned by 1D, 2D-NMR spectrometry and EIMS, IR, UV spectra. Their activity against *Aedes aegypti* is reported and its structure-activity relationship in the *A. salina* bioassay is discussed.

KEYWORDS

Lonchocarpus pentaphyllus, Leguminosae, rotenoids, *Aedes aegypti*, *A. salina*.

INTRODUCCIÓN

Existen cerca de 175 especies de *Lonchocarpus* en Centro y Sur América, Indias Orientales, África y Australia (Woodson, R.F. & R.W. Schery 1965); en Panamá se encuentran 18 especies distribuidas a lo largo del territorio nacional (Correa et al., 2004). Algunas especies de este género han sido utilizadas dentro de la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, tales como la epilepsia, artritis y desordenes intestinales (García 1974, Chabra & Uiso 1984, Neuwinger 1996). Las especies de *Lonchocarpus* son también utilizadas por los indígenas de regiones tropicales para fabricar el barbasco, el cual es usado por sus propiedades ictiotóxicas e insecticida (Moretti & Grenand 1982, Prance & Krukoff 1972, Bernal & Correa 1992). Estas propiedades se deben principalmente a la presencia de rotenoides en estas plantas (Yamatomo 1970, Donnelly & Boland 1995, Kole et al., 1992, Birch et al., 1985, Alkofahi et al., 1989).

En este artículo se reporta el aislamiento, caracterización y la evaluación de la actividad biológica; contra las larvas del mosquito *Aedes aegypti* y el crustáceo marino *Artemia salina*, de 4 rotenoides aislados de la raíz de *Lonchocarpus pentaphyllus* (Willd) H.B.K. (Leguminosae), el cual fue colectado en la ciudad de Panamá. Estos rotenoides, conocidos, son reportados por primera vez como constituyentes en esta planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los espectros $^1\text{H-NMR}$ y $^{13}\text{C-NMR}$ se utilizaron los espectrómetros Bruker Avance 400 MHz DRX y Bruker WP-200-SY (200 MHz); las muestras se disolvieron en CDCl_3 con señales 7,26 ppm para ^1H y 77,0 ppm para ^{13}C . Los espectros IR, se obtuvieron en un Bomem FTMB-100 sobre película de NaCl. Los espectros de masas se midieron en un aparato Shimadzu QP-5000, con ionización electrónica de 70 ev. Los espectros ultravioleta, se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS Metrolab 1700. Los poderes rotatorios fueron determinados en un polarímetro JASCO DIP-370 digital, los

puntos de fusión en un aparato de punto de fusión n Electrothermal 9100.

Material vegetal

La planta usada en este trabajo fue colectada en la localidad de Chepo, Panamá y fue identificada por comparación con especímenes depositados (PMA 9311) en el herbario de la Universidad de Panamá por el profesor Aristides Martínez.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

2,294 kg de la raíz seca y pulverizada de *Lonchocarpus pentaphyllus* fueron extraídos por maceración durante 24 horas a temperatura ambiente, por gradiente de polaridad usando n-hexano, acetato de etilo y metanol, para dar 17,6 g; 44,6 g y 50,3 g de cada extracto respectivamente. Cada extracto fue sometido a pruebas preliminares de bioactividad con *Artemia salina* y *Aedes aegypti*. El extracto hexánico fue seleccionado por mostrar la mayor actividad en ambos ensayos y se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 7 GF (J T Baker) eluyendo con mezclas de benceno y acetato de etilo de polaridad creciente obteniendo 102 fracciones de 5 cm³, cada una. Las fracciones 18-48 se mezclaron para obtener el compuesto **1**; las fracciones 78-90 se mezclaron para obtener el compuesto **2**; de las fracciones 96-99 se obtuvo el componente **3** y de las fracciones 100 y 101, se obtuvo el componente **4**. La purificación final de estos compuestos se hizo mediante cromatografía de capa delgada preparativa.

Todos los compuestos aislados fueron evaluados por medio de ensayos de bioactividad contra *A. salina* y *A. aegypti* según los métodos descritos en la literatura. (Meyer et al., 1982, Organización Panamericana de la Salud 1991).

Copias de los espectros originales pueden obtenerse por la correspondencia del autor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extractos crudos la raíz, el tallo y las hojas de *L. pentaphyllus* (en total 9) fueron sometidos a pruebas de actividad biológica contra larvas de *Artemia salina* (Cuadro 1) y el mosquito *Aedes aegypti*.

Los extractos crudos resultaron activos contra *A. salina* observándose un marcado aumento de la actividad en los extractos del tallo y la raíz. De estos, el extracto hexánico de la raíz resultó con el valor de LC₅₀ más bajo (0.10 µg/cm³); y por consiguiente, con la mayor actividad biológica.

Para los ensayo con las larvas de *A. aegypti*, basados en experiencias previas, se efectuaron a una concentración de 1,92 µg/cm³; los mismos no se comportaron como larvicidas, sin embargo, mostraron un efecto leve inhibiendo la emergencia de mosquitos adultos y retardando el ciclo de vida de los mismos en el cuarto estadio larvario.

Cuadro 1. Ensayos iniciales de los extractos crudos contra *A salina*.

Parte de la planta	Extracto	LC ₅₀ (µg/cm ³)
Hojas	Hexano	411,21
Hojas	Acetato de etilo	63,69
Hojas	Metanol	128,75
Tallo	Hexano	0,75
Tallo	Acetato de etilo	12,84
Tallo	Metanol	50,40
Raíz	Hexano	0,10
Raíz	Acetato de etilo	0,31
Raíz	Metanol	48,54

El extracto hexánico de la raíz, por mostrar relativamente mejor actividad, en los bioensayos preliminares, fue fraccionado por cromatografía en columna. Los compuestos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna seguida por sucesivas cromatografías en capa delgada preparativa, obteniéndose los rotenoides: milletona (**1**), milletosina (**2**), deguelina (**3**) y tephrosina (**4**) cuyas estructuras fueron determinadas por técnicas espectroscópicas que incluían UV, IR, MS, así como espectros RMN monodimensionales y bidimensionales homonucleares y heteronucleares. La identificación fue confirmada por comparación de las propiedades físicas obtenidas experimentalmente con datos correspondientes reportados en la literatura (Luyengi et al., 1994, Konoshima et al., 1993, Andrei et al., 1997, Yenesew et al., 1998).

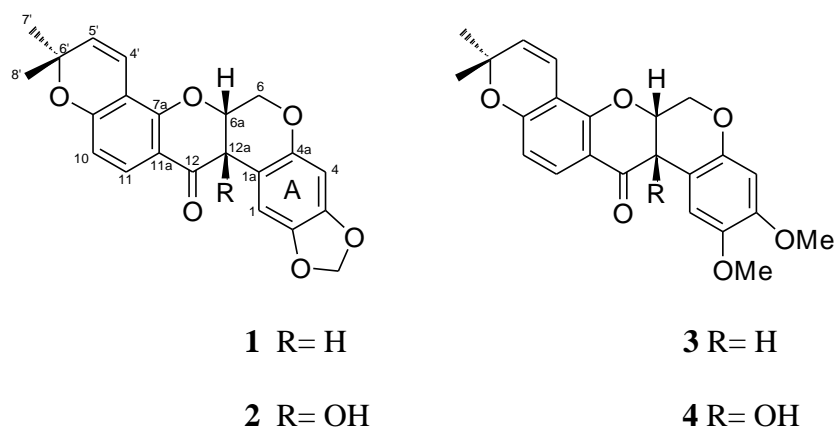


Fig. 1. Rotenoides aislados del *Lonchocarpus pentaphyllus*.

Estos rotenoides fueron sometidos a los ensayos de citotoxicidad contra *A. salina* donde los compuestos **4**, **1** y **3** exhibieron las actividades, relativamente, más sobresalientes (Cuadro 2) respectivamente. La tephrosina, que resultó con la mayor actividad citotóxica en este ensayo, también ha sido reportada con una notable actividad biológica en ensayos anticáncer (Konoshima et al., 1993).

En la evaluación del efecto de estos rotenoides contra las larvas de *A. aegypti*, los resultados fueron similares a los observados en los extractos crudos, no obstante, la milletosina resultó más activa que los otros rotenoides mostrando el mayor porcentaje de inhibición de emergencia y aumentando casi al doble el ciclo de vida de las larvas (Cuadro 3).

Cuadro 2. Pruebas de citotoxicidad de los rotenoides frente a *Artemia salina*.

Compuesto	LC ₅₀ µg/cm ³
1	6,6628
2	105,5819
3	12,5244
4	0,0185

Cuadro 3. Pruebas de bioactividad de los rotenoides a 1,92 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ frente a larvas (L-2/3) de *Aedes aegypti*.

Compuesto	N	CV (Días)	AE	IE (%)
1	50	13	26	48
2	50	19	17	66
3	50	15	24	52
4	50	15	25	50
Control	50	10	26	48

Los compuestos aislados en este trabajo se diferencian estructuralmente entre si por el grupo hidroxilo en el carbono 12a o bien por la presencia del grupo dioxometileno o el par de metoxilos aromáticos en el anillo A (Fig. 1). Ante estas diferencias estructurales se observan también cambios en la actividad biológica contra *A. salina*. Entre los derivados con el grupo dioxometileno (**1**, **2**), el compuesto hidroxilado es menos activo. Por otro lado, entre los derivados con los metoxilos aromáticos (**3**, **4**) el compuesto hidroxilado resultó más activo. De los 4 compuestos, la tephrosina (**4**) que tiene la combinación hidroxilo-metoxilos aromáticos en su estructura es el compuesto más activo y es probablemente el mayor responsable de la actividad biológica contra *Artemia salina* observada en el extracto hexánico del *L. pentaphyllus*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se desarrolló bajo el financiamiento del proyecto UNIPAN-BID. Se agradece al Dr. Julio Urones González y al Dr. Isidro Sánchez Marcos del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Salamanca por facilitar la realización de los espectros. Al Dr. Eligio Vega (q.e.p.d.), por su esfuerzo y contribución al desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

Alkofahi, A., J. K. Ruppert, J. E. Anderson, J. L. McLauhlin, K. L. Mikolajczak, & B. A. Scott. 1989. Insecticides of Plant Origin, American Chemical Society. Symposium, series 387: 28-29.

Andrei, C. C., P.C. Vierra, J.B. Fernández, M.F. Da Silva, E. Rodríguez. Dimethylchromene rotenoids from *Tephrosia candida*. *Phytochemistry*, 1997, 46: 1081- 1085.

Bernal, H.Y. & J.H. Correa. 1992. Especies Vegetales Promisorias de Los Países del Convenio Andrés Bello, Tomo VIII, Ed. Guadalupe Ltda. SECAB, 368-392.

Birch, N., L. Crombie & W. M. Crombie. 1985. Rotenoids of *Lonchocarpus salvadorensis*: Their effectiveness in protecting seeds against bruchid predation *Phytochemistry*, 24 : 2881- 2883.

Correa, A. M., C. Galdames & M. Staff. 2004. Catálogo de las plantas vasculares de Panamá. Novo art.

Chabra, S.C. & F.C. Uiso. 1984. Phytochemical screening of Tanzanian medicinal plants. I. *Journal of Ethnopharmacology*, 11: 157 – 179.

Donnelly, D. X. M. & G. M. Boland. 1995. Isoflavonoids and neoflavonoids: naturally occurring o-heterocycles. *Natural Product Report*, 12: 321- 328.

García Barriga, H. 1974. Flora Medicinal de Colombia, Universidad Nacional de Bogotá, tomo I, 505-508.

Kole, R. K., C. Satpathi, A. Chowdury, M. R. Ghosh & N.A. Dityachaudhury. 1992. Isolation of amorpholone, a potent rotenoid insecticide from *Tephrosia candida*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 40: 1208-1210.

Konoshima, T., H. Terada, M. Kokumai, M. Kozuca, M. Haruna, K. Ito, J.R. Estes, L. Li, H. K. Wang & K. H. Lee. 1993. Structural elucidation and chemical conversion of amorphispironoine, a novel spironone from *Amorpha fruticosa*, to rotenoids. *Chem. Pharm. Bull*, 41: 187 – 190.

Konoshima, T., H. Terada, M. Kokumai, M. Kozuca, H.M. Tokuda, K. Ito, L. Li, H.K. Wang, K.H. Lee. 1993. Studies inhibitors of skin tumor promotion, XII rotenoids from *Amorpha fruticosa*. *Journal of Natural products*, 56: 843 – 848.

Luyengi, L., I.S. Lee, W. Mar, H.H. Fong, J M. Pezzuto, & A.D. Kinghorn. 1994. Rotenoids and chalcones from *Mundulea sericea* that inhibit phorbol ester-induced ornithine decarboxilase activity. *Phytochemistry*, 36: 1523 – 1526.

Meyer, B.N., N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols & J.L. McLaughlin. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.

Moretti, C. & P. Grenand. 1982. Les *nivrées* ou plantes ichthyotoxiques de la Guyane française. *Journal of Ethnopharmacology*, 6: 139- 160.

Neuwinger, H.D. 1996. African Ethnobotany Poisons and Drugs, Chapman and Hall, 682-684.

Organización Panamericana de la Salud. 1991. Procedimiento para determinar la susceptibilidad o resistencia de las larvas a los compuestos organofosforados y a los carbamatos insecticidas. *Entomología con Énfasis en Control de Vectores*, Secretaría de Salud, Subsecretaría de Servicios de Salud, Dirección General de Medicina Preventiva, México, Volumen II: 633-640.

Prance, G. T. & B. A. Krukoff. 1972. An ethnobotanical comparison of four tribes of amazonian indians. *Acta Amazónica*, 2: 7-27.

Woodson, R.F. & R.W Schery. 1965. *Annals of The Missouri Botanical Garden "Flora of Panama"*, Vol. 52: 39-47.

Yamatomo, Y. 1970. Mode of action of pyrethroids, nicotinoids, and rotenoids. *Annual review of Entomology*, 15, 257- 270.

Yenesew, A., J.O. Midiwo & P.G. Waterman. 1998. Rotenoids, isoflavones and chalcones from the stem bark of *Millettia usaramensis* subspecies *usaramensis*. *Phytochemistry*, 47: 295- 300.

Recibido abril de 2004, aceptado diciembre de 2004.