

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS, CORTEZAS Y SEMILLAS DE *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum.

Catalino De la Rosa. Torres* , Dency José Pacheco López** , Manuel Enrique Tabora Martínez** , Rita Luz Márquez Vizcaíno***

*Grupo de Investigación Fitoquímica, Departamento de Química, Universidad del Atlántico, Km 7 antigua vía a Puerto Colombia, A.A. 1890, Barranquilla, Colombia, cdelarosa@uniatlántico

**Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Magdalena

*** Departamento de Biología , Facultad de Educación y Ciencias, Universidad de Sucre, fitorita@yahoo.es

Resumen. Los constituyentes determinados en el análisis preliminar fitoquímico fueron glucósidos cardotiónicos, flavonoides, triterpenos y esteroides en las hojas, corteza y semillas de *Thevetia peruviana*. De las semillas de *Thevetia peruviana* se aislaron cinco compuestos previamente conocidos. La separación cromatográfica (HRGC-FID) del extracto etéreo de las semillas, presentó un rendimiento individual de los constituyentes Ácido oleico (46 %), Ácido palmítico (23,4 %), Ácido linoleico (17 %), Ácido esteárico (9,4 %) y Ácido arachídico (1,8 %). Los extractos no presentaron potente actividad antifúngica.

Palabras Claves: *Thevetia peruviana*; *Mycosphaerella fijiensis*; Apocynaceae; Thevetina A y B; Triterpenos; Flavonoides

Abstract. The analysis preliminary phytochemical determined as constituents main glycosides cardiotonic, flavonoids, triterpenoids and steroids in leaves , barks and seeds of *Thevetia peruviana*. From the seeds of *Thevetia peruviana* five previously known compounds have been isolated. Chromatographic separation (HRGC-FID) of the petrol extract of seeds, yielded the individual constituents, oleic (46 %), palmitic (23,4 %), linoleic (17 %), stearic (9,4 %) and arachidic (1,8 %) acid. The extracts commonly not have potent antifungal activity.

Key-Words: *Thevetia peruviana*; *Mycosphaerella fijiensis*; Apocynaceae; Thevetine A and B; Triterpenoids ; Flavonoids.

1. Introducción

Colombia, en particular, tiene un amplio potencial como fuente de principios activos contra las enfermedades que afectan a la humanidad, pues se calcula que en nuestro país hay entre 35.000 y 50.000 especies vegetales, de las 350.000 a 500.000 existentes en el mundo, y de éstas, aproximadamente 5.000 han sido utilizadas por nuestros indígenas y campesinos para combatir el amplio espectro de enfermedades a que se ven sometidos. Sobre esto último existen estudios

etnobotánicos que demuestran la amplia variedad de plantas medicinales existentes en nuestros suelos [1,2,3,4,5,6,7]. Con base en lo anterior, el Ministerio de Salud elaboró un listado de plantas medicinales de venta libre en Colombia, avalado por la Comisión Revisora de Productos Farmacéuticos, de la cual hacen parte varias universidades del país[8].

Se plantea, entonces, la necesidad de complementar el saber popular con estudios fitoquímicos y fitoterapéuticos, con el fin de optimizar el uso que se le ha venido dando a las plantas medicinales razón por la cual la Universidad colombiana está llamada a ser el ente que dinamice el proceso investigativo.

Este es el marco referencial en el que se ubica el presente trabajo con cuya realización se pretende contribuir al conocimiento y la investigación científica de la Flora Colombiana, especialmente de la subregión de Santa Marta, Costa Norte de Colombia. Asimismo evitar la pérdida de la sabiduría tradicional de la medicina popular, practicada por sus pobladores prístinos, divulgar el buen uso de dicho saber ancestral combinado con el científico que se ha logrado acumular a través de diversas generaciones de investigadores.

La especie vegetal seleccionada para el estudio fue *Thevetia peruviana* a la cual se le determinó, en forma cualitativa, la presencia de metabolitos secundarios en semilla, corteza y hojas; se realizó también un perfil de ácidos grasos del aceite obtenido de la semilla y se evaluó la actividad antifúngica de los extractos etéreos y etanólicos de semillas, hojas y corteza, frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la sigatoka negra del plátano.

2. Propiedades y Usos Medicinales[9]

En Colombia y Perú la tintura de la corteza se ha utilizado como febrífugo, purgativo y emético [10] ; para tal fin se usa también la decocción de las hojas [11]. En Ecuador, se aplica el látex directamente sobre heridas o úlceras para evitar infecciones. Existe la tradición que el látex aplicado sobre muelas cariadas produce la caída de las mismas. La decocción de las hojas tiene efecto cardiotónico. En México las semillas se usan en homeopatía por su efecto analgésico en hemorroides. El látex se emplea para las hemorroides, sarna, úlceras y llagas; el extracto de toda la planta sirve como antimálarico [12]

2.1. Farmacología y Actividad Biológica

Varios de los principios activos, entre ellos neriifolina, peruvósido, ruvósido, thevetina A y B, producen efectos inotrópicos positivos y dosis altas, en animales de laboratorio, producen paro cardiaco. El látex puede causar dermatitis y se ha utilizado como vesicante [13]. Extractos acuosos crudos de hojas cortezas y semillas se ensayaron en ratas albinas y produjeron síntomas marcados de envenenamiento que culminaron con la muerte. Los síntomas indicaron mal funcionamiento cardiaco, neuromotor y mental y se manifestó taquicardia, arritmia, parálisis, ataxia y desorientación[14] .

Extractos acuosos de los cotiledones tienen actividad larvicida contra *Culex quinquefasciatus* [15]. El fruto fresco en extracto $EtOH - CHCl_3$, ha demostrado efecto promotor de tumores en ratas [16]. El aceite de la semilla mostró actividad antibacteriana contra *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Stathylococcus*, *Aureus* y *Vibro cholerae* [17,18,19]. Las semillas son tóxicas y a veces son utilizadas para cometer suicidios [20] causan vómito, mareos, diarrea, dolor abdominal, cambios en el electrocardiograma y pueden ocasionar la muerte [21]. Glicósidos, flavonoles y flavanonas aislados de las hojas, mostraron actividad inhibitoria sobre las enzimas transcriptasa e integrasa del virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1 [22]. En un trabajo muy reciente [5], se estudió las propiedades antifúngicas fotoactiva de extractos de semillas (n-hexano y CH_2Cl_2) y sus fracciones contra el hongo *Cladosporium cucumerinum*, la fracción mas fotoactiva contenía mayoritariamente Terpenos y ácidos grasos y sus derivados. Los terpenos parecen ser las sustancias con mayor actividad antifúngica..

2.2. Experimental

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar está acorde con la quimiotaxonomía de la familia a la que pertenece la especie estudiada (Apocynaceae), por cuanto reveló la presencia de glicósidos cardiotónicos en todas las estructuras analizadas; así como flavonoides, triterpenoides y esteroides.

Un gran porcentaje del peso de la semilla, de la especie vegetal *T. peruviana*, corresponde a un aceite fijo, el cual contiene ácidos grasos de 14 hasta 24 átomos de carbono. Por el elevado rendimiento en su extracción y por las características fisicoquímicas de sus ácidos grasos, este aceite podría ser explotado a nivel industrial en la elaboración de jabones, pinturas y detergentes, así como en la industria farmacéutica, de cosméticos y de lubricantes.

Tomando como base que casi las dos terceras partes de su contenido corresponde a ácidos grasos insaturados, podría servir como aceite comestible, aunque para ello debe someterse a un tratamiento previo que permita eliminar metabolitos, tales como glicósidos cardiotónicos, que pueden resultar tóxicos.

La planta objeto de esta investigación, como lo demuestran los estudios etnobotánico tiene una amplia distribución en la zona tropical, es de crecimiento rápido y una vez llega a la madurez sexual, florece durante todo el año, produciendo frutos con semillas de tamaño apreciable; además resiste condiciones ambientales adversas. Los anterior permitiría realizar cultivos de este arbusto que seria productivo en corto tiempo, lo cual sustenta aun más los posibles usos del aceite extraído de la semilla.

Los extractos etéreos y etanolicos de hojas, corteza y semillas no presentan actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, no se descarta que posean esta actividad contra hongos menos resistentes, pero igual de importantes por el perjuicio que pueda causar al humano. Son necesario entonces ensayos tendientes a evaluar propiedades antimicrobianas de los extractos de esta planta, en los que sea posible emplear alternativas metodológicas que incluyan, por ejemplo, bioensayos de fitoactividad antifúngica, pues como se ha demostrado en



Figura 1: Flor de la *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum

otros estudios, extractos de esta especie vegetal presentan actividad microbiana frente a varias especies de hongos y bacterias patógenas.

2.3. Material Vegetal

Corteza fue recolectadas entre los meses de junio y julio del 2002 y finales del mismo año, en la ciudad de Barranquilla (Atlántico). Identificada botánicamente por el Botánico Eduino Carbone docente de la Universidad del Magdalena . Se recolecto la parte aérea, corteza del fruto. Después de un período de secado al sol se molió en un molino tipo Willey.

El material seco y molido se extrajo con disolventes de polaridad creciente: éter de petróleo , metanol y agua. Los extractos se concentraron en un rota evaporador tipo flash (marca Buchii) a presión reducida. Los principios activos se separaron por cristalización fraccionada, métodos cromatográficos (columna, capa delgada) y por partición usando solventes de variada polaridad.

2.4. Extracción y Aislamiento

A 82 g de corteza, 170 g de semillas y 180 g de hojas secas y molidas se les realizaron sendas extracciones tipo soxhlet con éter de petróleo y etanol.

Los extractos resultantes colocados en un rotaevaporador fueron concentrados a mínimo volumen, a presión reducida. El proceso de extracción se monitorio mediante cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas de vidrio, Silica-gel como fase estacionaria, $CHCl_3$ como fase móvil; el revelado se realizó con vapores de yodo.

2.5. Ácidos Grasos del Aceite de Semilla

Del extracto etéreo de semilla (aceite) se tomaron 60 mg y adicionaron 5 mL de solución del complejo trifluoruro de boro al 12% (w/v) en metanol. La mezcla, con agitación magnética, fue sumergida en un baño de aceite a 85-90° C. durante una hora hasta desaparición de la fase lipídica

Finalizada la reacción, se realizó la extracción de los derivados metil ésteres de los ácidos grasos con 1mL x 3 mL de n-heptano. El extracto orgánico obtenido, se tomaron 0.5 mL y se aforó a 1 mL con n-heptano; un μ l de esta solución fue inyectado para su análisis cromatográfico en un cromatógrafo de gases de alta resolución con detector de ionización En llama (HRGC-FID), marca Hewlett Packard, modelo HP5890A Serie II Este análisis se realizó en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga), bajo los siguientes parámetros analíticos:

CG Modelo : HP 5890A Serie II (Hewlett-Packard, Palo Alto California, USA).

Detector : FID Temperatura: 280°C

Horno: Temperatura inicial: 100°C Tiempo inicial: 0 min.

A 2°C/min hasta 136°C durante 1 min.

A 7°C/min hasta 250°C durante 25 min.

Columna Longitud (m) 60 d.i (mm) 0,25

Fase DB WAX Espesor(um) 0.25

Velocidad del gas de arrastre: 1,5 mL/(70°C)

Presión de entrada de columna: 200 kPa

Inyector Manual ___ Automático: HP-7683

Split: 21,4 mL/min Splitless: — Relación split 14 : 1

Temperatura (°C) : 250

Volumen de inyección (μ l) 1,0

Gases Carrier: Helio (99,995%) Nitrógeno (mL/min) : 25

Aire (mL/min) : 397 ___ Mezcla Ar/CH₄(mL/min) : _____

Hidrógeno (mL/min) : 43

3. Resultados

Las pruebas de caracterización química dieron positivo para glicósidos cardiotónicos, flavonoides, triterpenoides y esteroides en las tres estructuras vegetales estudiadas, cortezas, hojas y semillas. Estos resultados son consistentes con la quimiotaxonomía de la familia Apocynaceae, la cual, según la literatura consultada se caracteriza por producir una amplia variedad de alcaloides y glicósidos cardiotónicos. El análisis de ácidos grasos del aceite fijo de semilla, se llevó a cabo mediante la preparación y cuantificación de sus metilesteres según las normas ISO 5509 (“Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparations of Methyl Ester of Fatty Acids”) y 5508 (“Animal and vegetable Fats and Oils – Analysis by Gas Chromatography of Methyl Ester Fatty Acids”), respectivamente. Para la identificación de los metil ésteres de ácidos grasos presentes en la muestra, se utilizó el método de comparación de sus tiempos de retención con los de los

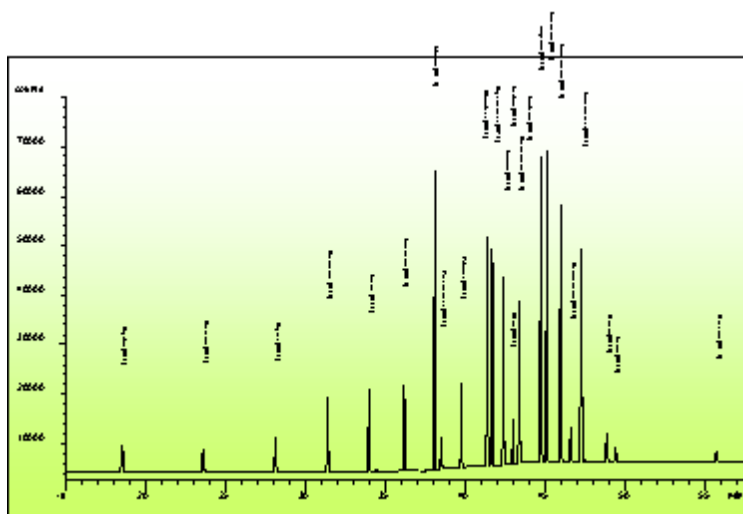


Figura 2: Cromatograma de los tiempos de retención de la mezcla de estándares de Metilesteres de ácidos grasos.

patrones certificados de metil ésteres de ácidos grasos (mezcla de estándares GLC-10 GLC-50, GLC 70, GLC 80, GLC 100, Matreya Inc Pensilvana, USA), analizados con las mismas condiciones cromatograficas (Tabla 1. y Figura 2.)

Tabla 1.
Cantidad Relativa (%) de ácidos grasos del aceite de semilla de *T. peruviana*

ACIDOS	MEDICIÓN	MEDICIÓN	PROMEDIO
Mirístico	0,190	0,190	0,20
Pentadecanoico	0,030	0,030	0,10
Palmítico	23,46	23,39	23,4
Palmitoleico	0,200	0,190	0,20
Heptadecanoico	0,100	0,080	0,10
Esteárico	9,350	9,360	9,40
Oleico	46,04	46,03	46,0
Linoleico	17,00	17,02	17,0
Nonadecanoico	0,030	0,030	0,10
Linolénico	0,030	0,030	0,10
Araquídico	1,770	1,780	1,80
Eicosenoico	0,490	0,500	0,50
Behénico	0,620	0,630	0,60
Nervónico	0,040	0,040	0,10

3.1. Evaluación de actividad antifúngica

La totalidad de los extractos en sus diferentes concentraciones, dieron resultados negativos en las prueba de actividad antifungicas contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad Sigatoka Negra. No hubo diferencia en cuanto al crecimiento del hongo, entre el control negativo, (Vehículo) y los tratamiento a diferentes concentraciones de los extractos.

4. Discusión de los Resultados

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar está acorde con la quimiotaxonomía de la familia a la que pertenece la especie estudiada (Apocynaceae), por cuanto reveló la presencia de glicósidos cardiotónicos en todas las estructuras analizadas; así como flavonoides, triterpenoides y esteroides.

Un gran porcentaje del peso de la semilla, de la especie vegetal *T. peruviana*, corresponde a un aceite fijo, el cual contiene ácidos grasos de 14 hasta 24 átomos de carbono. Por el elevado rendimiento en su extracción y por las características fisicoquímicas de sus ácidos grasos, este aceite podría ser explotado a nivel industrial en la elaboración de jabones, pinturas y detergentes, así como en la industria farmacéutica, de cosméticos y de lubricantes.

Tomando como base que casi las dos terceras partes de su contenido corresponde a ácidos grasos insaturados, podría servir como aceite comestible, aunque para ello debe someterse a un tratamiento previo que permita eliminar metabolitos, tales como glicósidos cardiotónicos, que pueden resultar tóxicos.

La planta objeto de esta investigación, como lo demuestran los estudios etnobotánico tiene una amplia distribución en la zona tropical, es de crecimiento rápido y una vez llega a la madurez sexual, florece durante todo el año, produciendo frutos con semillas de tamaño preciable; además resiste condiciones ambientales adversas. Los anterior permitiría realizar cultivos de este arbusto que seria productivo en corto tiempo, lo cual sustenta aun más los posibles usos del aceite extraído de la semilla.

Aunque los extractos etéreos y etanólicos de hojas, corteza y semillas no presentan actividad antifúngica contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, no se descarta que posean esta actividad contra hongos menos resistentes, pero igual de importantes por el perjuicio que pueda causar al humano. Son necesario entonces ensayos tendientes a evaluar propiedades antimicrobianas de los extractos de esta planta, en los que sea posible emplear alternativas metodológicas que incluyan, por ejemplo, bioensayos de fitoactividad antifungica, pues como se ha demostrado en otros estudios, extractos de esta especie vegetal presentan actividad microbiana frente a varias especies de hongos y bacterias patógenas.

5. Conclusiones

El análisis fitoquímico preliminar determinó como constituyente principales glicósidos cardiotónico, flavonoides, triterpenoides y esteroides en hojas, cortezas y

semillas de *T.peruviana*. Al aceite fijo extraído de la semilla se le realizó un perfil de ácidos grasos en un cromatógrafo de gases de alta resolución con detector de ionización en llama (HRGC-FID) , Los componentes mayoritarios fueron los ácidos oleico (46 %), palmítico (23.4 %), linoleico (17 %), esteárico (9,4 %) y araquídico (1.8 %). La actividad antifúngica de los extractos etéreos y etanólico dieron resultados negativos; sin embargo, no se descarta que posea esta propiedad contra hongos menos resistentes.

6. Agradecimientos

A la Universidad del Atlántico, por la financiación que presto al proyecto. Pontificia Universidad Javeriana por los análisis fitoquímicos preliminares, a la Universidad del Magdalena por permitirnos cualificar en la especialización en Química Orgánica, a los docentes , compañeros que nos colaboraron y animaron para la culminación de este trabajo.

Referencias

- [1] Bonzani, R. 1999. Medicinal use of plants by the peasant community of San Jacinto, Northern Colombia. *Caldasia* 21(2): 203-218.
- [2] Correa, J. y Bernal, H. 1989. Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. 1° Edición. Editorial Guadalupe. Bogotá. Tomo I. 379-399.
- [3] García-Barriga, H. 1986. Aplicabilidad de las plantas medicinales en la Terapéutica moderna. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 16(61): 79-97.
- [4] Gata-Goncalves, L., Nogueira, J.M.F., Matos, O. And Bruno de Sousa, R. 2003. Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology.* 70(1):51-54.
- [5] Giraldo-Tafur, C. 1996. Medicina Tradicional de las mujeres Siona del resguardo de Buenevista en el Río Putumayo. *Caldasia* 18(2): 227-238.
- [6] Hayes, G.. D. 19387. Manual de datos para Ingeniería de Alimentos. Acribia. Zaragoza. 91-92.
- [7] Saxena, V. K. 1990. *Thevetia peruviana* kernel oil: a potencial bactericidal agent. *Fitoterapia* 61(4): 348-349.
- [8] Fonnegra, R y Jiménez, S. 1996. Plantas medicinales de venta libre en Colombia. *Cespedesia* 21(67): 337-346.
- [9] Abe, F., Yamauchi, T., Yahara,S y Nohara, T. 1995. Minor iridoids from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry* 38(3): 793-794.

- [10] Bonzani, R. 1999. Medicinal use of plants by the peasant community of San Jacinto, Northern Colombia. *Caldasia* 21(2): 203-218.
- [11] García-Barriga, H. 1986. Aplicabilidad de las plantas medicinales en la Terapéutica moderna. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 16(61): 79-97.
- [12] Mendieta, R. M. Y S. Del Amo. 1981. Plantas medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Ed. Continental. México. 336.
- [13] Schultes, R. 1987. Ethnopharmacology of the Northwest Amazon: Unexpected chemical discoveries. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 16 (62): 85-92.
- [14] Oji, O. And Okafor, Q.E. 2000. Toxicological studies on stem bark, leaf and seed kernel of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Phytoter Res.* 14 (2): 133-135.
- [15] Evans, D.A. y Ray, R.K. 1998. Extracts of Indian plants as larvicides. *Indian J. Med. Res.* 88(1): 38-41.
- [16] Caldwell, M.E. y Brewer, W.R. 1983. Plants whit potencial to enhance significant tumor growth. *Cáncer Res.* 43(12): 5775-5777.
- [17] Basile, A., Giordano, S y Castaldo-Gobianchi, R. 1993. Antibiotic activity in *Thevetia neriifolia* and *Thevetia peruviana* (Apocinaceae). *Pharm. Res.* 27(1): 99-100.
- [18] Naovi, S. A., Khan, M. S. y Vohora, S. B: 1991. Antibacterial, antifungal and antihelmintic investigations on Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 63(2): 221-228.
- [19] Saxena, V. K. 1990. *Thevetia peruviana* kernel oil: a potencial bactericidal agent. *Fitoterapia* 61(4): 348-349.
- [20] Eddleston, M. 1999. Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree (*Thevetia peruviana*) in Northern Sri Lanka. *Trop. Med. Int. Health.* Citado en <http://www.biomednet.com> con acceso 25.04.2003.
- [21] Salam, A. 1995. Poisonous Plants of Malaysia. Tropical Press Sdn. Bhd. Kuala Lumpur. Malaysia. 11-12.
- [22] Tewtrakul, S., Nakamura, N., Hattori, M., Fujiwara, T y Supavita, T. 2002. Flavanone and Flavonol glycosides from leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. *Chem. Pharm. Bull.* 50(5): 630-635.