

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES MUTAGÉNICOS DE LAS HOJAS DE *Ruta Graveolens* L. POR MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS UV-IR

JOSÉ AMIEL PÉREZ; CÉSAR FUERTES RUITÓN*; DAVID ANTONIO AMIEL PEÑA

* Instituto de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los alcaloides de las hojas de *Ruta graveolens* L., y relacionar sus estructuras químicas con la actividad mutagénica de las hojas, demostrada en un trabajo anterior. Se aislaron 4 alcaloides, denominados "A", "1", "2" y "3", que fueron elucidados estructuralmente mediante espectroscopía UV e IR, además de sus constantes físicas y reacciones químicas. El alcaloide "A" fue identificado como alcaloide acridónico, los alcaloides 1 y 2 fueron identificados como alcaloides furoquinolínicos y el alcaloide "3" fue considerado como alcaloide quinolónico. Debido a su alto rendimiento y estructura química, se considera al alcaloide "A" como el principal responsable de la actividad mutagénica de las hojas de *Ruta graveolens* L., mientras que los alcaloides "1" y "2", debido al bajo rendimiento, posiblemente no participen en la mutagenicidad del extracto por ausencia de pruebas sobre su estructura.

SUMMARY

The purpose of this research has been to isolate and identify the alkaloids from the leaves of *Ruta graveolens* L., and to relate their chemical structure with the mutagenic activity of the leaves, which was demonstrated in a previous report. It were isolated four alkaloids named "A", "1", "2" and "3" which were structurally elucidated by their melting point, chemical reactions and by UV and IR spectroscopy. The alkaloid "A" was identified as acridone alkaloid, and the alkaloid "1" and "2" were identified as furoquinoline alkaloids. The remaining one, alkaloid "3" was considered as quinolone alkaloid. Due to its high amount and chemical structure, the alkaloid "A" was considered as the main responsible of the mutagenic activity of the leaves of *Ruta graveolens* L., while alkaloids "1" and "2" probably do not participate in the mutagenicity of the extract owing to their amount. Finally, the alkaloid "3" was not considered in the mutagenicity analysis on account of the absence of data about its structure.

INTRODUCCION

La especie vegetal *Ruta graveolens* L., conocida como "ruda", es una especie de amplia difusión y consumo, utilizada por sus propiedades emenagogas, antiespasmódicas y vermífugas, entre otras.

En el trabajo de investigación realizado por Callapiña y Jaimes (1997) (1), se demostró la actividad mutagénica del extracto acuoso de hojas de *Ruta graveolens* L. mediante el Test de Ames.

En los trabajos realizados por Paulini y Col. (1989-1991) (2,3), se ha reportado la actividad mutagénica de alcaloides aislados en la raíz de *Ruta graveolens* L.; dicha actividad guardaba relación con la mutagenicidad del extracto, determinada posteriormente.

En consecuencia, nuestra investigación estuvo orientada en aislar dichos alcaloides u otras estructuras químicas relacionadas en las hojas de ruda cultivada en nuestro país, recordando que la composición química de una planta varía de acuerdo a la región y clima donde habita.

PARTE EXPERIMENTAL

La especie vegetal en estudio fue recolectada en el mes de Setiembre de 1998 en la Provincia de Lima, en la localidad de Lurín, y fue clasificada en el Museo de Historia Natural Javier Prado de la UNMSM de Lima, Perú.

Se realizaron las determinaciones físicas, químicas y espectroscópicas. El punto de fusión fue determinado en un Aparato de Punto de Fusión Kofler Modelo Reichert. La actividad óptica fue medida en un Polarímetro Carl Zeiss 103176 y los espectros UV e IR de las muestras fueron determinados en un Espectrofotómetro UV Hewlett Packard y en un Espectrofotómetro IR (FT-IR) Modelo Impact 410.

Para la realización del estudio, se preparó un extracto diclorometánico a partir de 200 g. de polvo de hojas de ruda. Se confirmó la presencia de alcaloides en las hojas mediante una cromatografía preliminar, utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff. Posteriormente se efectuó una cromatografía en columna utilizando sucesivamente los siguientes sistemas de solventes: I) Cloroformo; II) Cloroformo/Metanol 100: 2 v/v; III) Cloroformo/Metanol 95: 5 v/v y IV) Cloroformo/Metanol 90: 10 v/v.

Se obtuvieron 4 fracciones alcalóidicas "A", "1", "2" y "3". Estas fracciones fueron purificadas por cromatografía a escala preparativa, utilizando en el caso de la fracción "A" los siguientes sistemas de solventes: I) Cloroformo/Metanol 20: 1 v/v; II) Cloroformo/Metanol 98 : 2 v/v; III) Benceno/Acetato de etilo 4 : 1; IV) Tolueno/acetato de etilo/ Acido fórmico 5 : 4 : 1 v/v; V) Tolueno/Acetato de etilo/iso-propanol 5 : 4 : 1 v/v y VI) Cloroformo/iso-propanol 95 : 5 v/v.

En el caso de las fracciones "1", "2" y "3", se utilizaron los siguientes sistemas de solventes: I) Cloroformo/Metanol 20 : 1 v/v; II) Cloroformo/Metanol 98 : 2; y III) Benceno/Acetato de etilo 4 : 1.

La elucidación estructural de los cuatro compuestos aislados se realizó mediante la determinación del Punto de Fusión, espectroscopía UV y espectroscopía IR. El alcaloide "A" dio reacción negativa con la solución de bromo en tetracloruro de carbono y tampoco dio lectura en el polarímetro.

RESULTADOS

Los resultados están expresados en las tablas y figuras.

TABLA I: Características Físicas y Químicas del Alcaloide «A»

Rendimiento	50%
Aspecto	Cristales acicularres largos, de color amarillo
Movilidad Cromatográfica (Rf)	0.93
Punto de Fusión	169 °C
Rotación Optica	0 °C T = 18 °C Solvente: Metanol
Ensayo del Bromo en tetracloruro de carbono	Negativo

TABLA II: Características Físicas y Químicas del Alcaloide «1»

Rendimiento	10%
Aspecto	Cristales acicularres largos, incoloros
Movilidad Cromatográfica (Rf)	0.94
Punto de Fusión	164 °C

TABLA III: Características Físicas y Químicas del Alcaloide «2»

Rendimiento	10%
Aspecto	Cristales acicularres largos, incoloros
Movilidad Cromatográfica (Rf)	0.90
Punto de Fusión	173 °C

TABLA IV: Características Físicas y Químicas del Alcaloide «3»

Rendimiento	30%
Aspecto	Cristales acicularres cortos, de color blanco
Movilidad Cromatográfica (Rf)	0.69
Punto de Fusión	185 °C

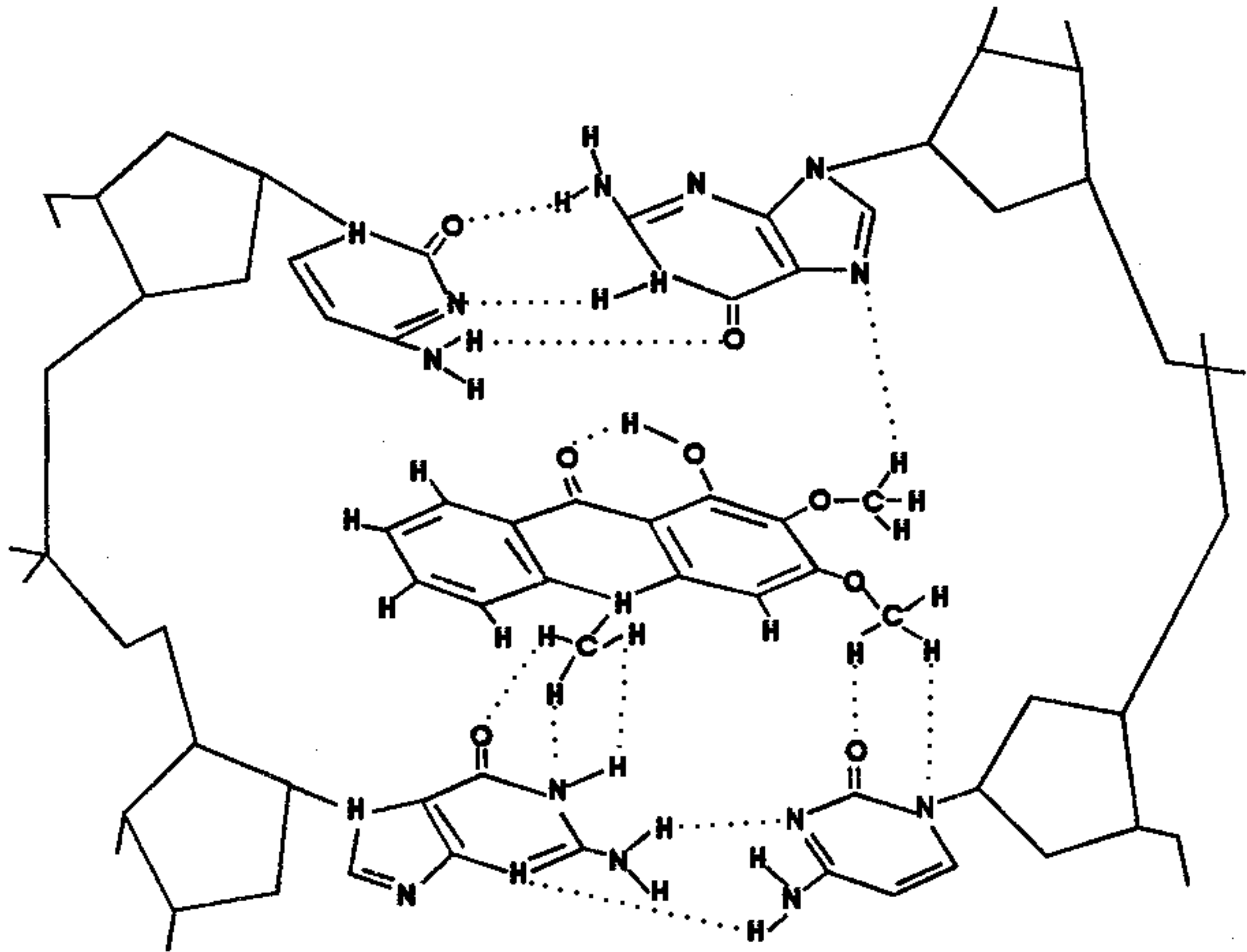
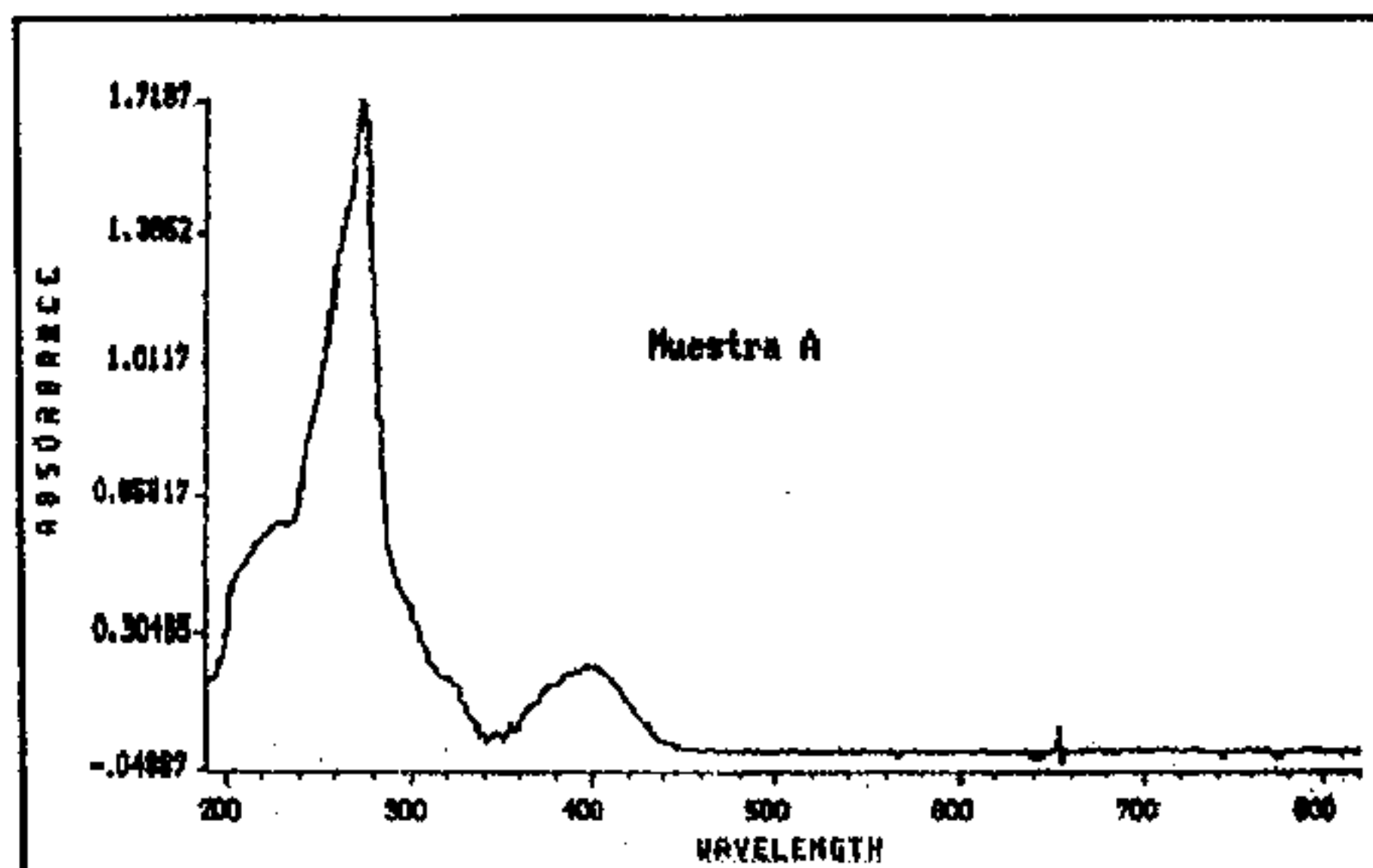
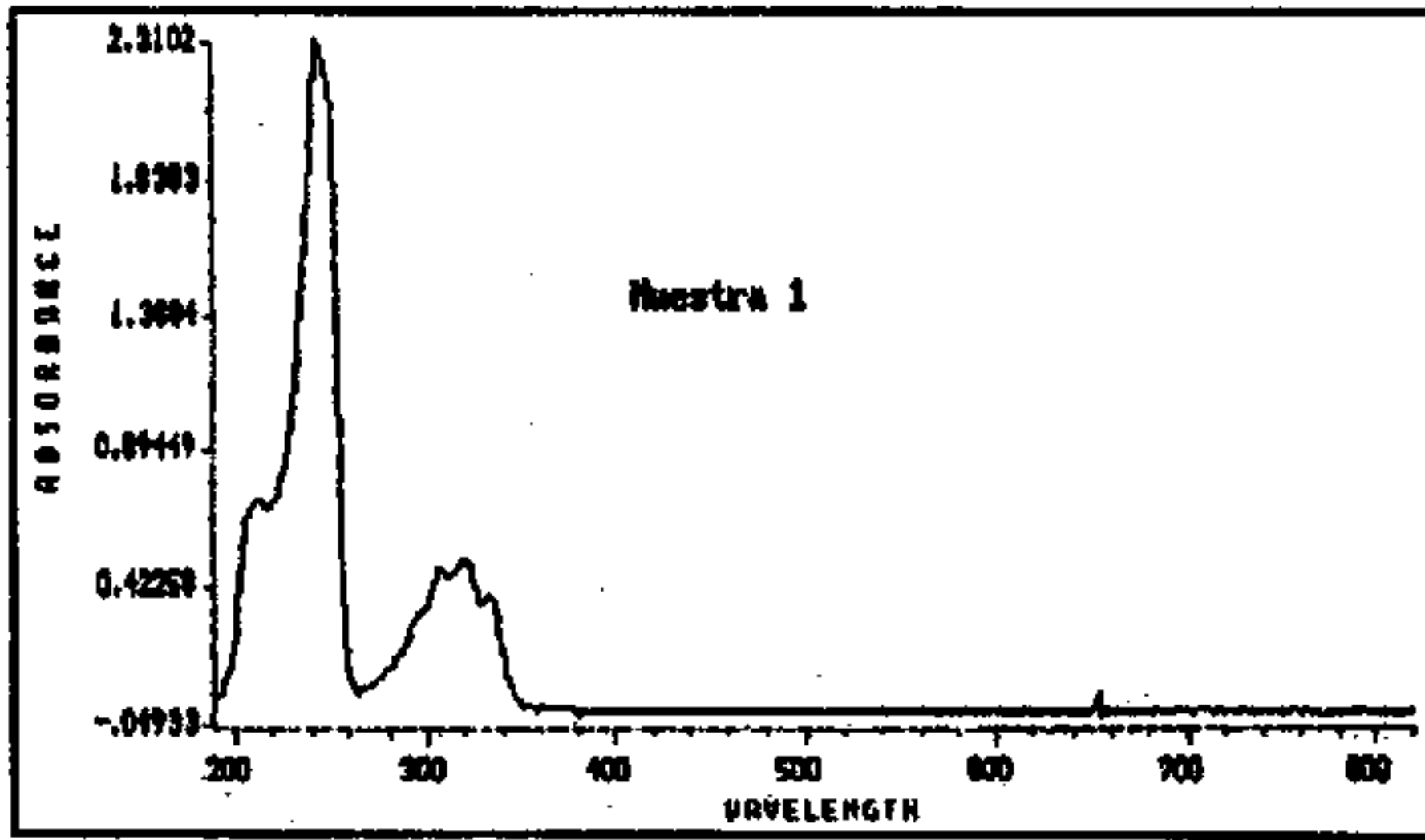


FIGURA N° 1: Modelo Teórico de Intercalación entre dos Pares de Bases del Alcaloide Acridónico "Arborinina".



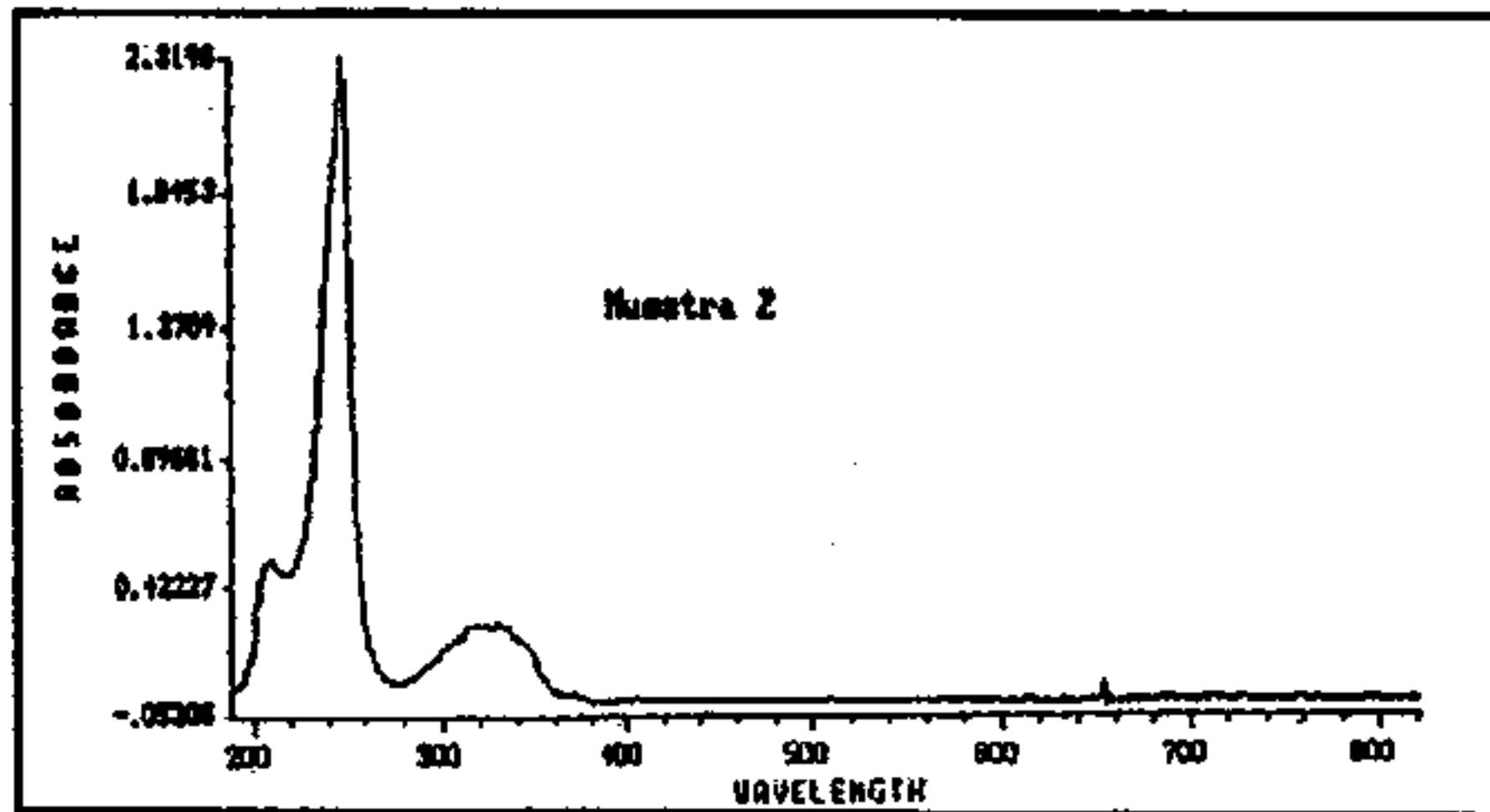
A: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 228, 274, 324 y 400

FIGURA N° 2: Espectro Ultravioleta del Alcaloide "A".



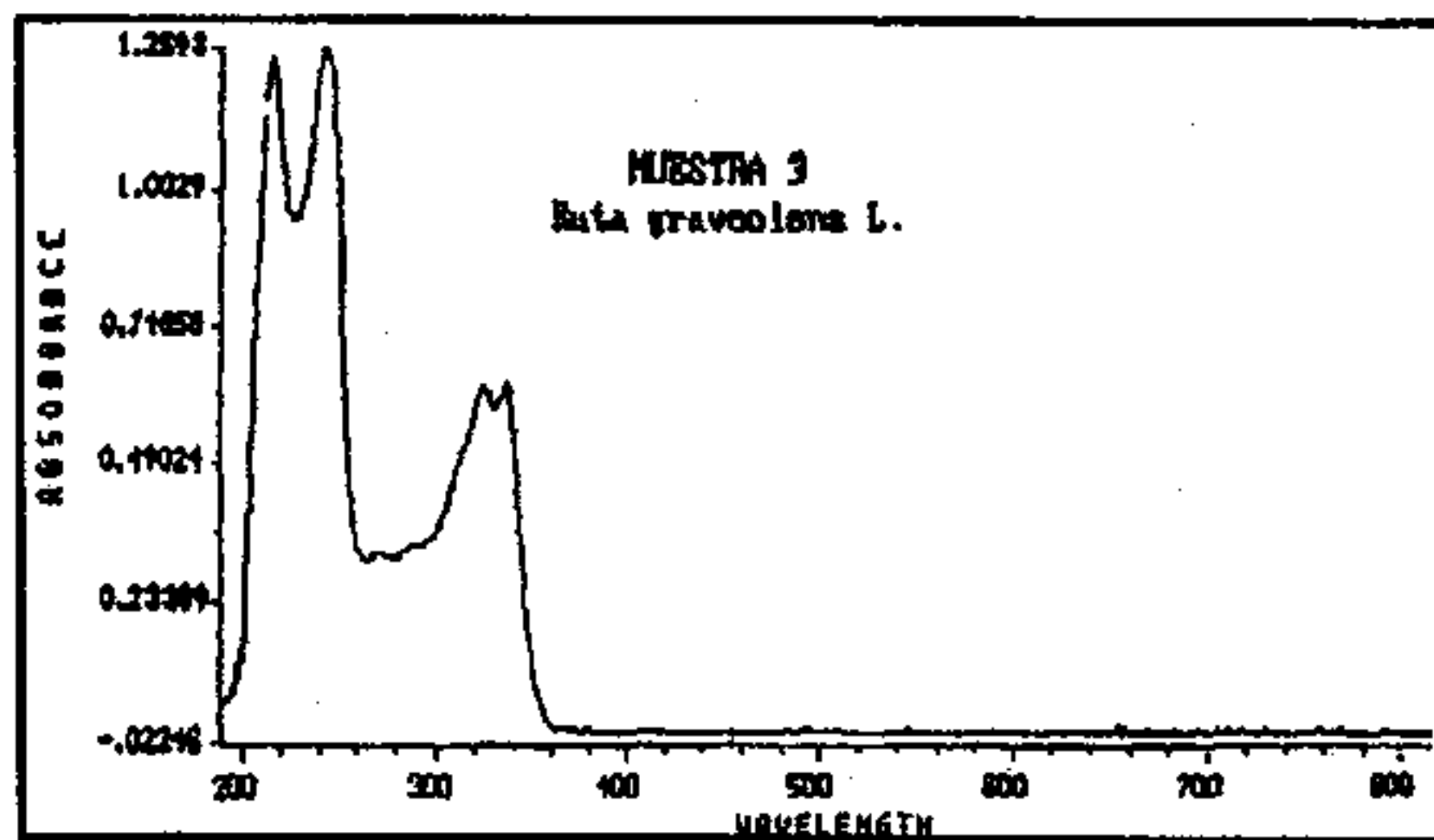
1: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 244,308,322 y 334 nm.

FIGURA N° 3: Espectro Ultravioleta del Alcaloide "1".



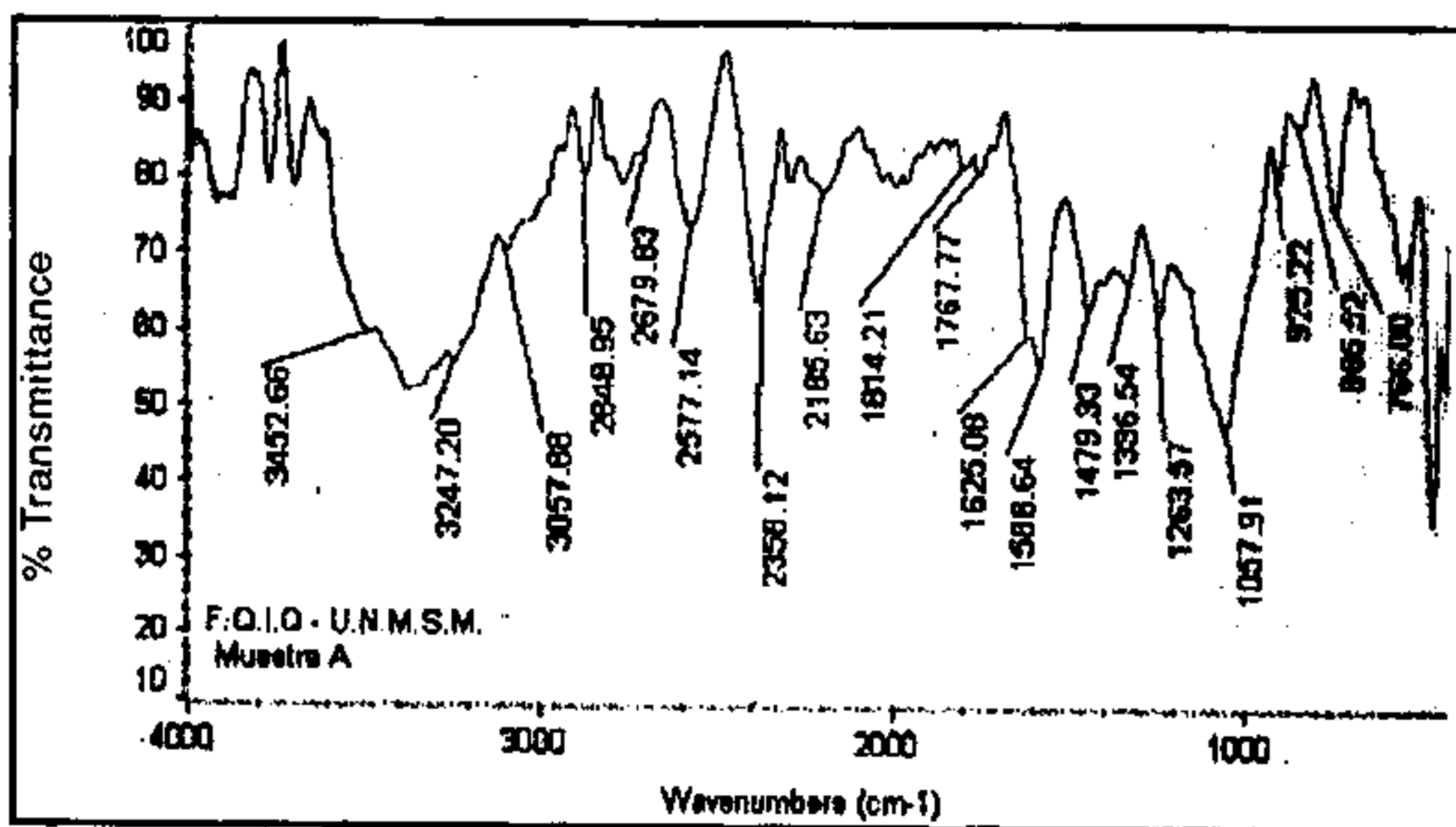
2: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 248,320 y 333 nm.

FIGURA N° 4: Espectro Ultravioleta del Alcaloide "2".

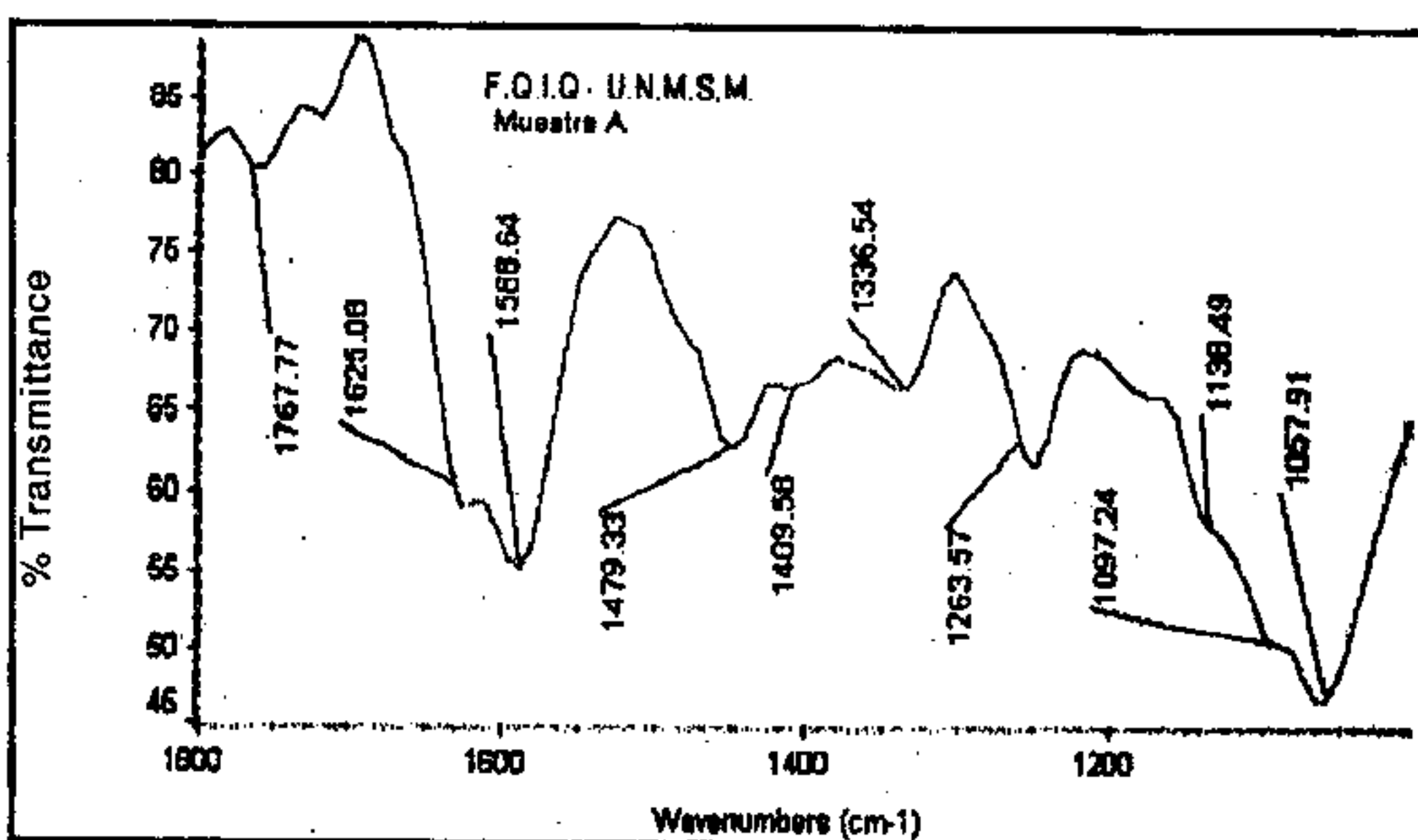


3: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 216,244,272,288,324 y 336 nm.

FIGURA N° 5: Espectro Ultravioleta del Alcaloide "3".



a



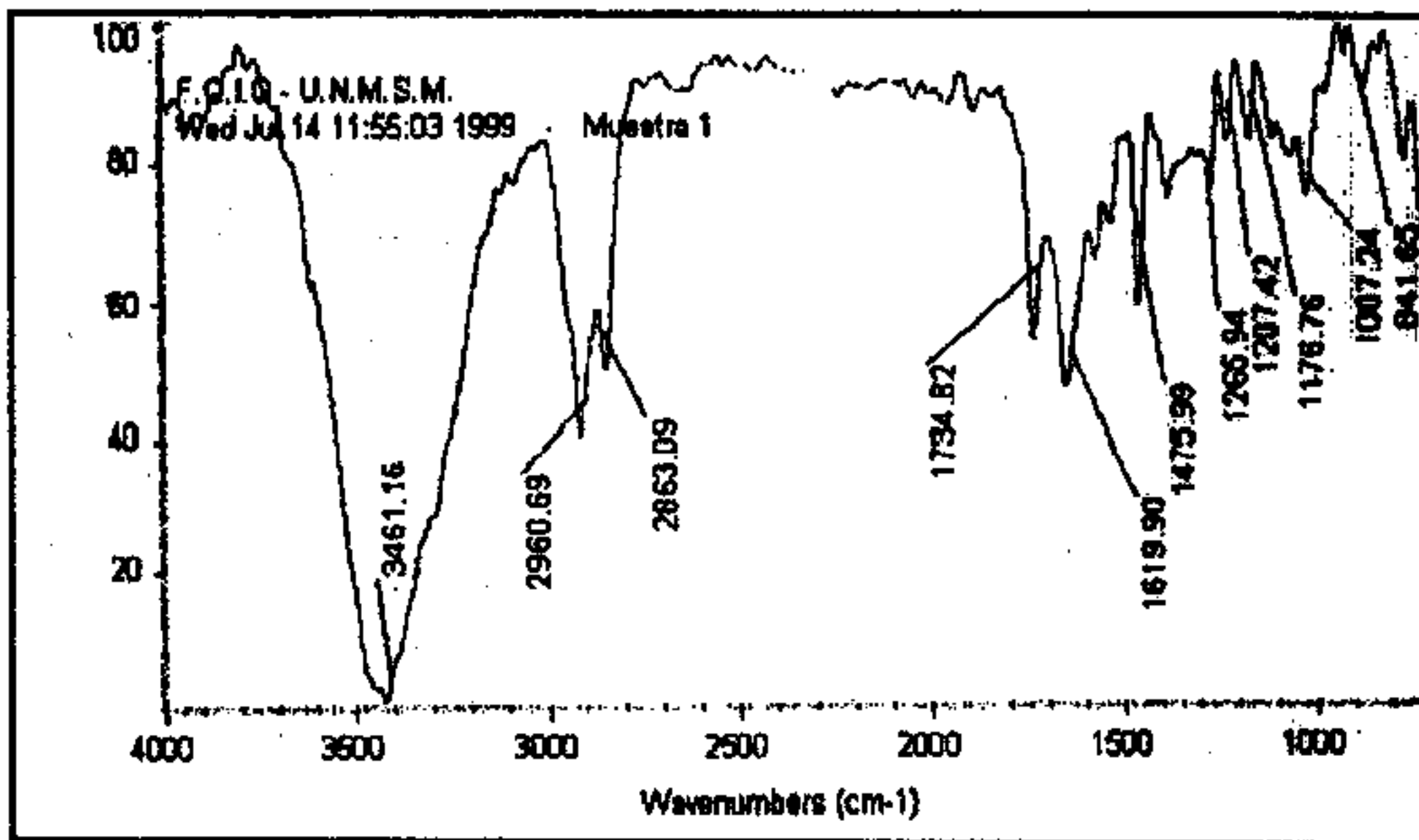
b

A: $\nu_{\text{KBr}} = 3350, 3057.88, 2950, 1625.08, 1588.64, 1479.33,$
 $1336.54, 1263.57, 1057.91, 865.52 \text{ y } 766 \text{ cm}^{-1}$

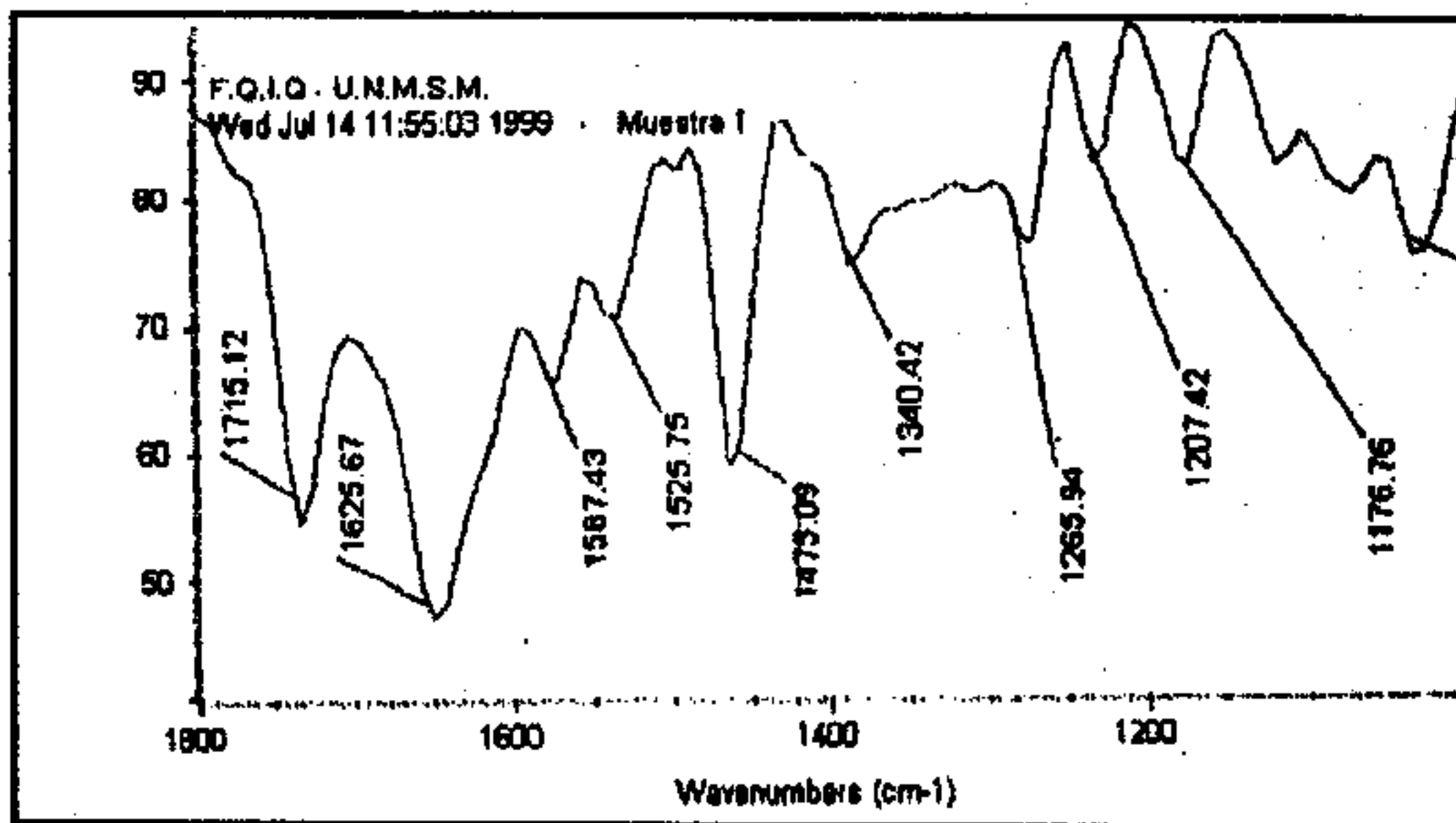
FIGURA N° 6: Espectro Infrarrojo del Alcaloide "A".

a) Lectura de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

b) Lectura de $1800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$



a



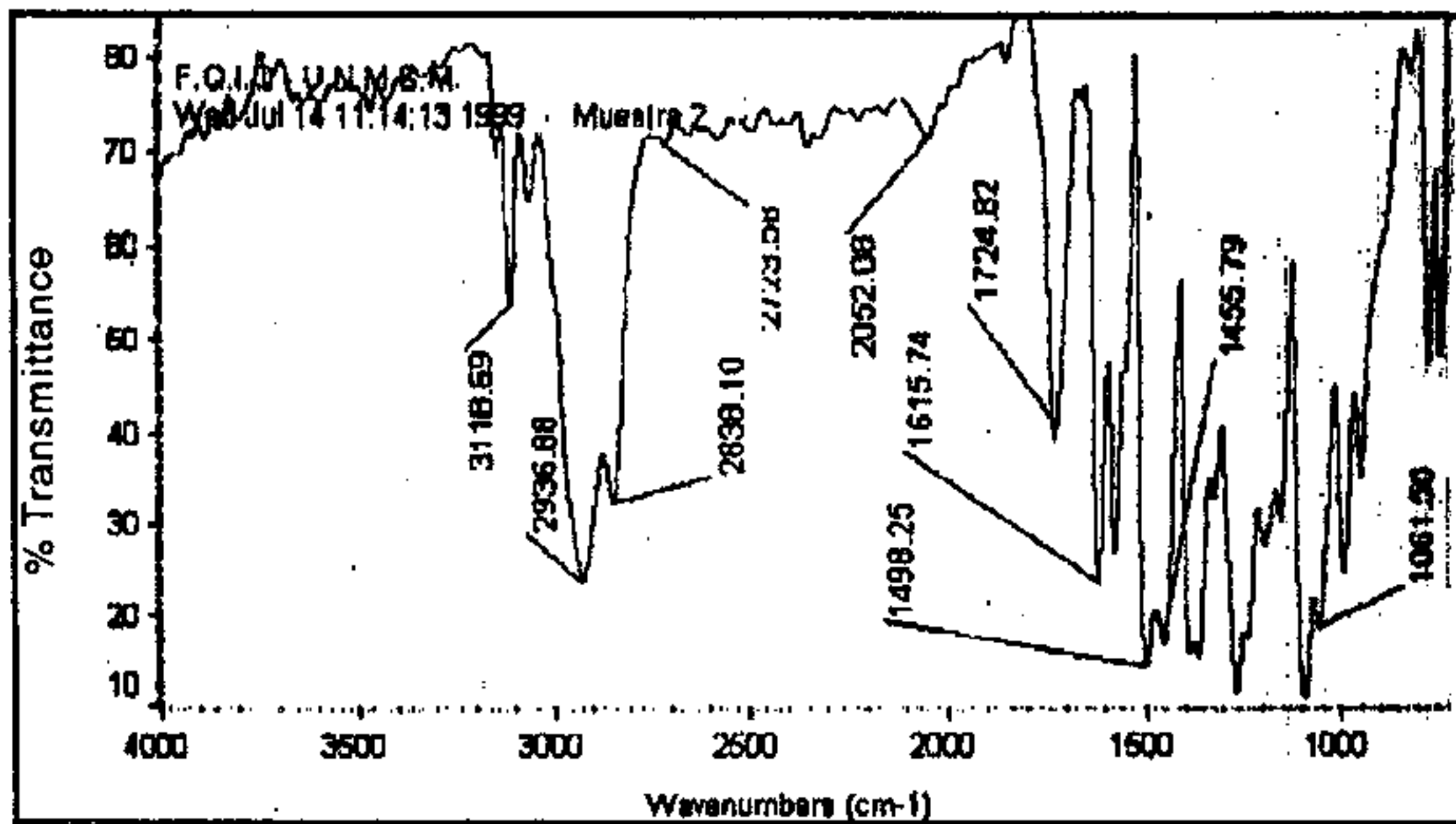
b

1: $\nu_{\text{KBr}} = 3461.16, 3095, 2960.69, 1625.67, 1587.43, 1525.75, 1475.09$ y 1265.94 cm^{-1}

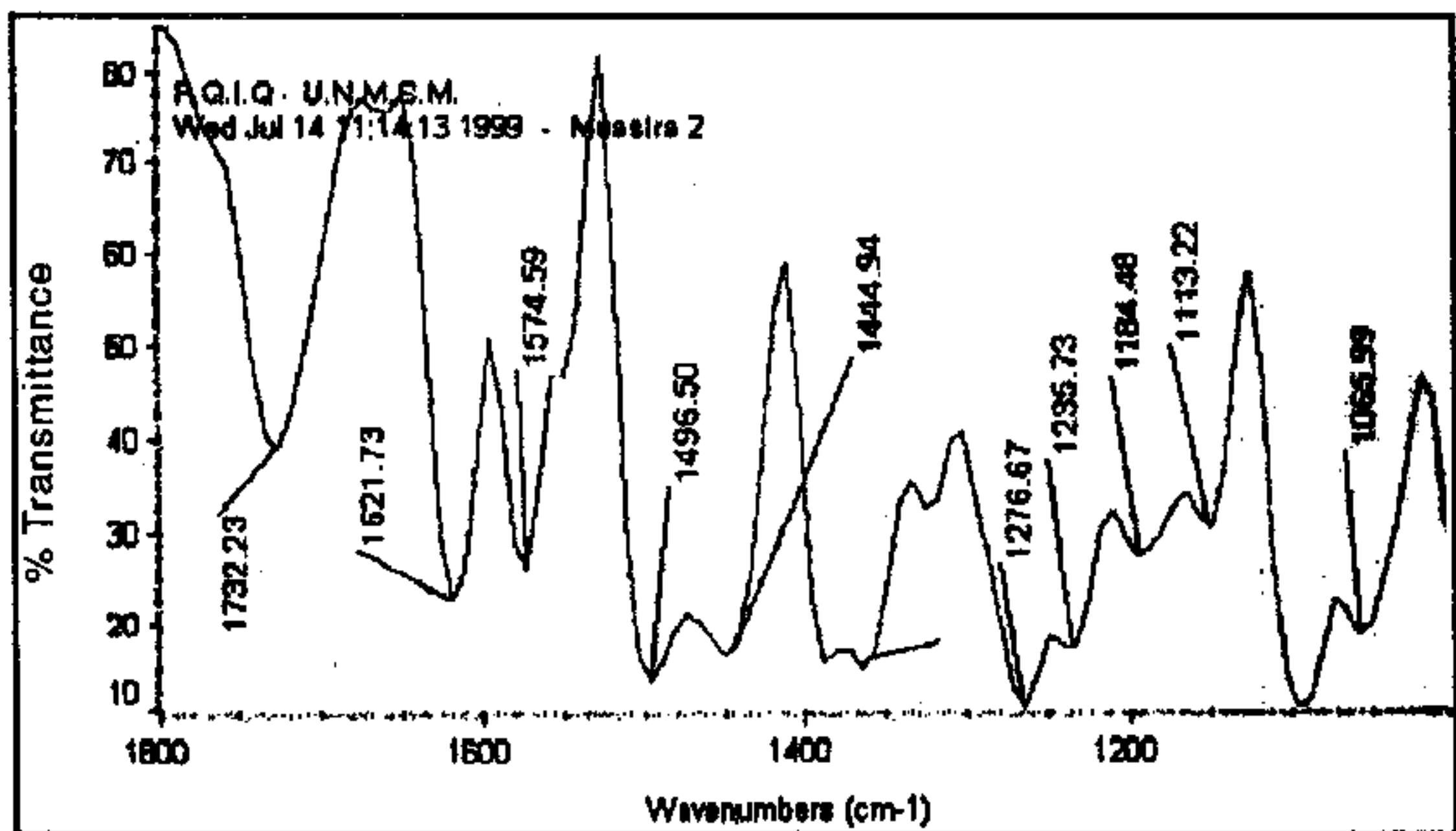
FIGURA N° 7: Espectro Infrarrojo del Alcaloide "1".

a) Lectura de 4000 - 400 cm^{-1}

b) Lectura de 1800 - 1000 cm^{-1}



a



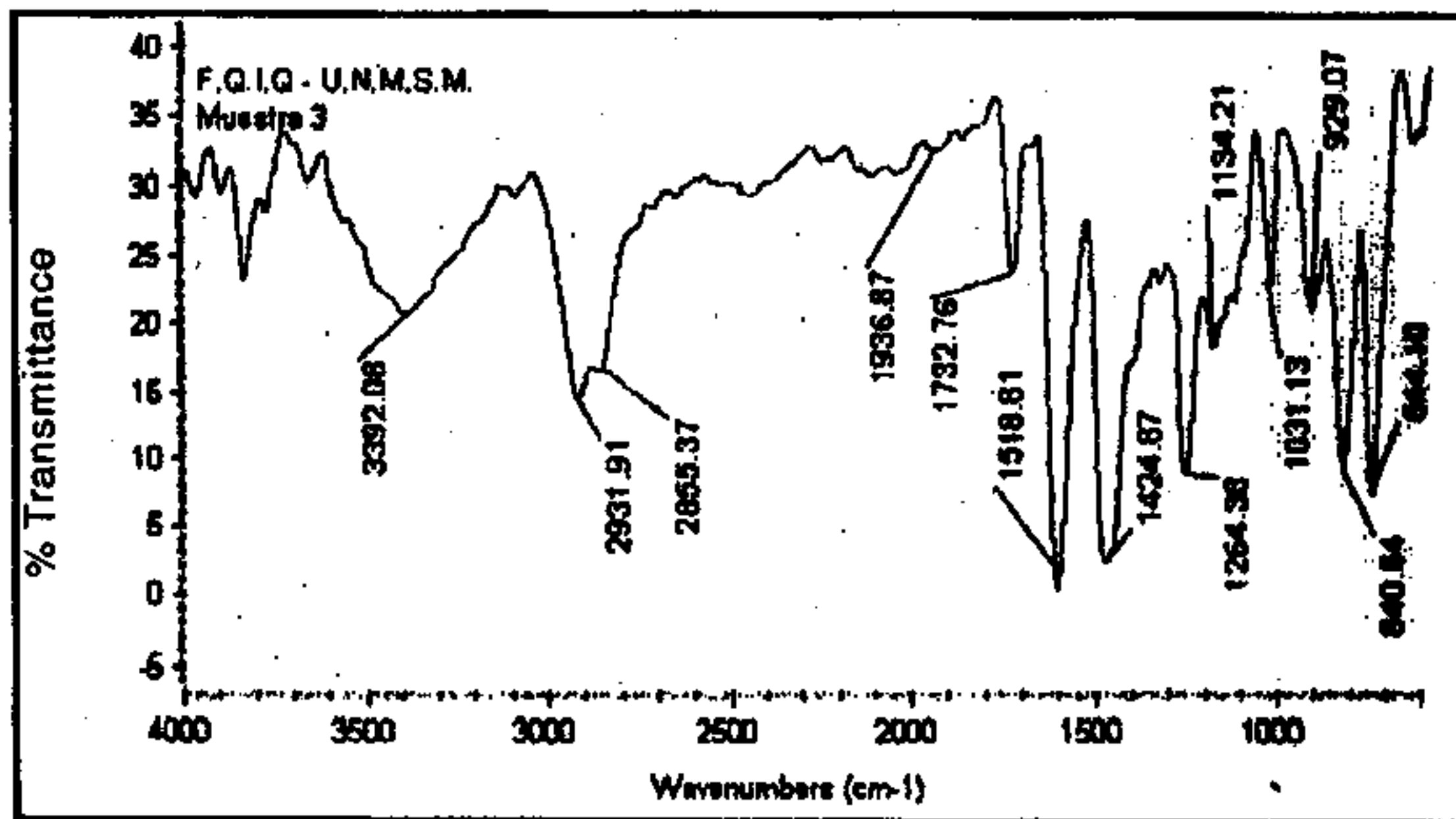
b

2: $\nu_{\text{KBr}} = 3118.69, 2936.88, 1621.73, 1574.59, 1496.50$ y 1276.67 cm^{-1}

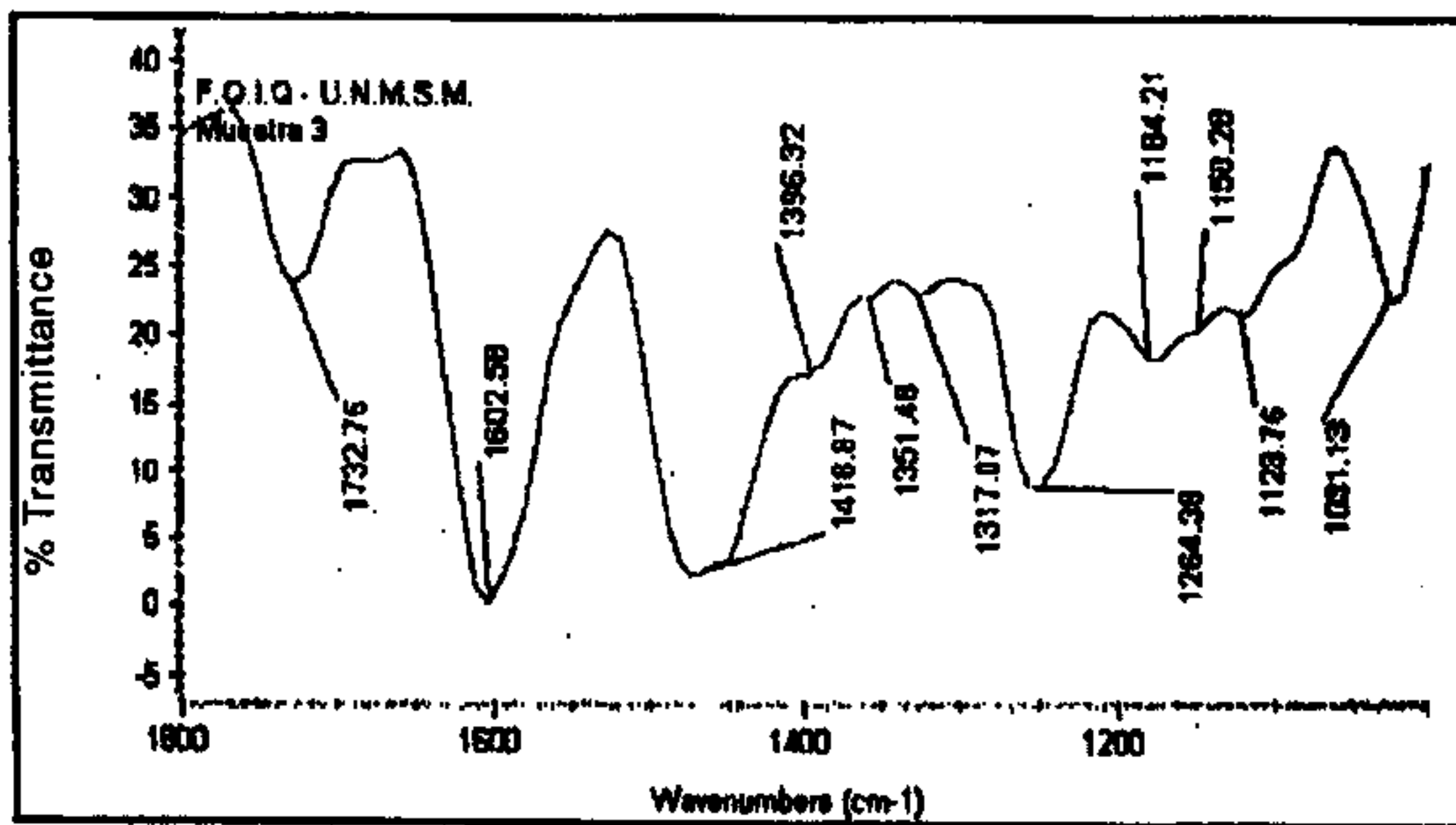
FIGURA N° 8: Espectro Infrarrojo del Alcaloide "2".

a) Lectura de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

b) Lectura de $1800 - 1000 \text{ cm}^{-1}$



a



b

3: $\nu_{\text{KBr}} = 3100, 2931.91, 1602.58, 1418.87, 1264.18, 929.67 \text{ y } 840.64 \text{ cm}^{-1}$

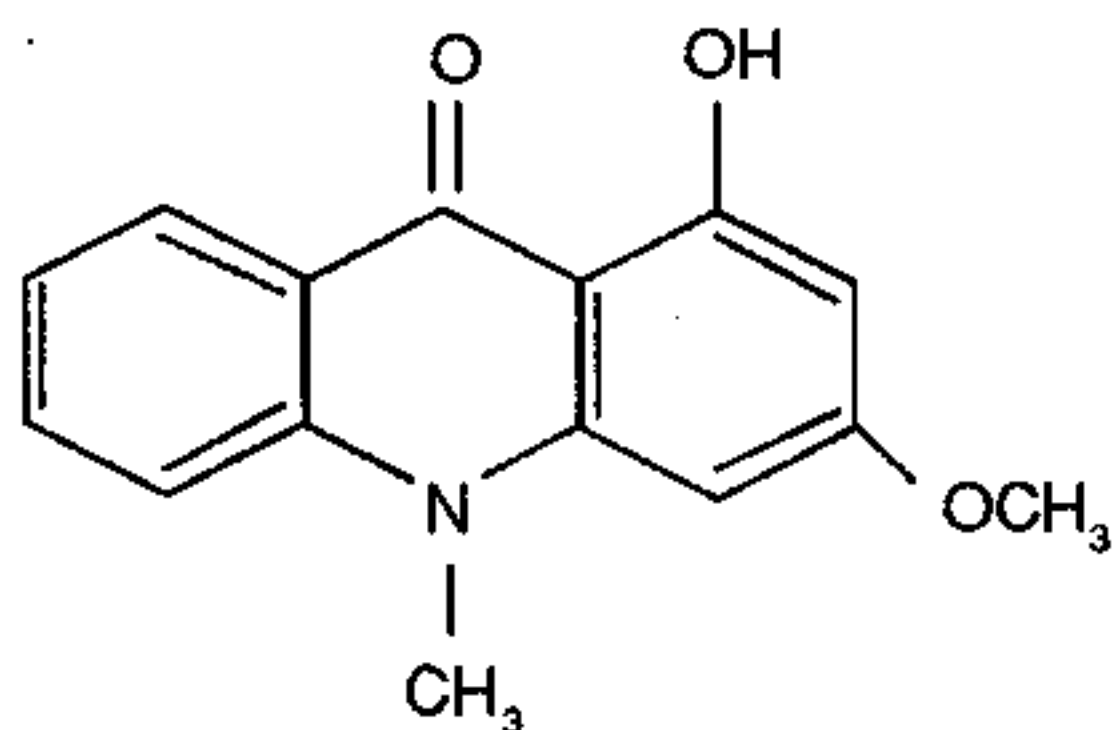
FIGURA Nº 9: Espectro Infrarrojo del Alcaloide "3".

a) Lectura de 4000 - 400 cm^{-1}

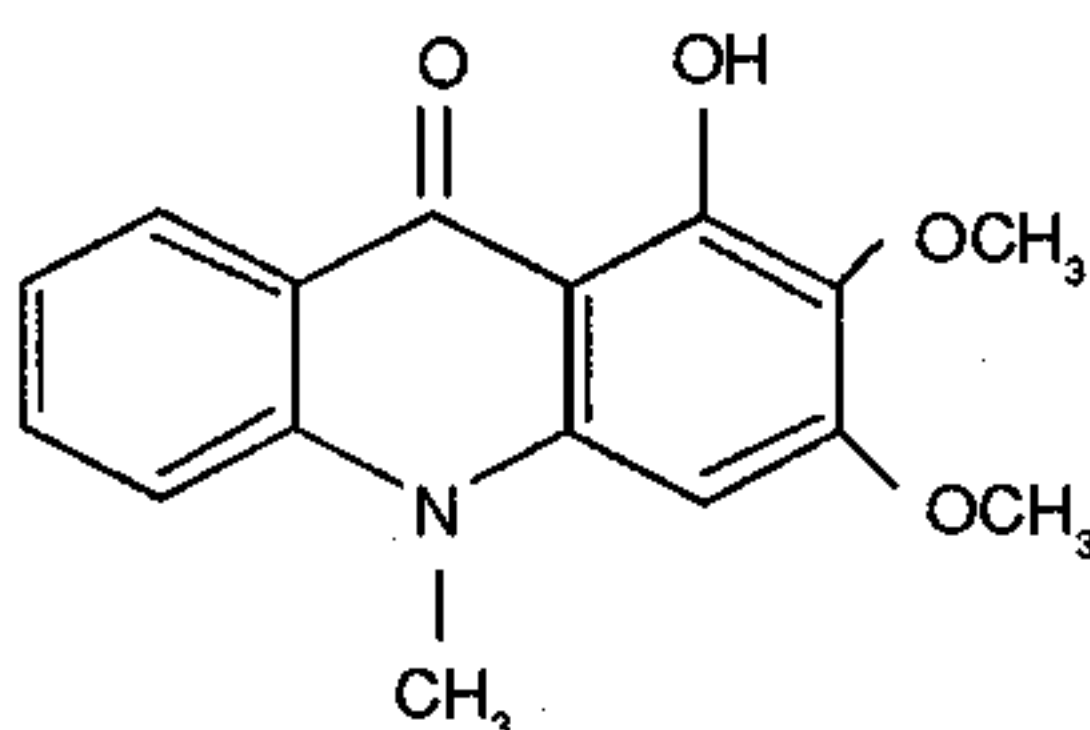
b) Lectura de 1800 - 1000 cm^{-1}

DISCUSION

En el presente trabajo, logramos aislar 4 alcaloides a partir del extracto diclorometánico de las hojas de *Ruta graveolens L.* El alcaloide "A" fue identificado como acridónico debido a su coloración amarilla y a las características de su espectro UV, que nos muestra la presencia de picos que corresponden a las tres bandas de grupo reportadas para los alcaloides acridónicos. Así tenemos que el pico a 274 nm corresponde a la banda III comprendida entre 240 a 280 nm, el pico a 324 corresponde a la banda II comprendida entre 280 a 330 nm y con apariencia de un hombro, y finalmente el pico a 400 nm, que corresponde a la banda I comprendida entre 380 a 430 nm. En el caso de la espectroscopía IR, los grupos reportados corresponden al grupo acridónico, destacándose la presencia del pico a 3350 cm^{-1} indicando grupo hidroxilo, el pico a 1625 cm^{-1} indicando grupo carbonilo aromático conjugado a dobles enlaces adyacentes y los picos a 1588 cm^{-1} y 1479 cm^{-1} , correspondientes al doble enlace C - C del sistema de anillos aromáticos de la molécula. Las estructuras propuestas son las que señalamos a continuación:



1 - hidroxí - 3 - metoxi - N - metil - acridona
(Ruta).



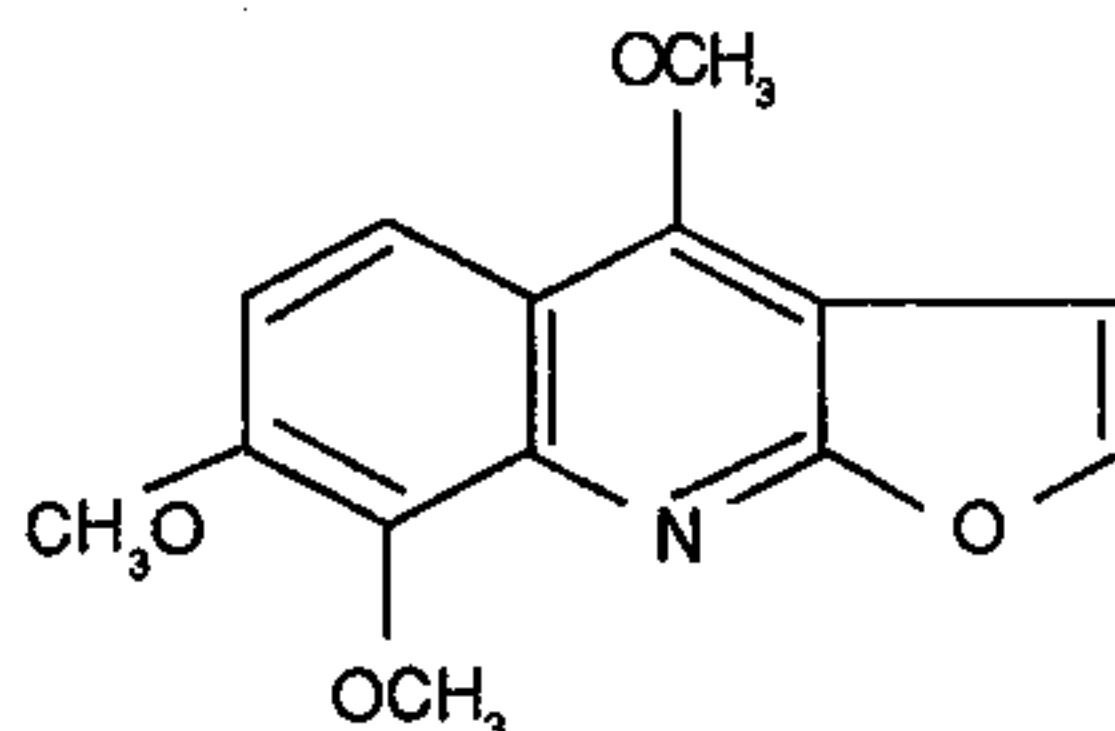
Arborinina
(Ruta).

Los alcaloides "1" y "2" fueron identificadas como furoquinolínicos debido a sus constantes físicas y las características de su espectroscopía UV e IR. En el caso del espectro ultravioleta, el alcaloide "1" muestra un pico a 244 nm y el alcaloide "2" a 248 nm, luego, ambos alcaloides muestran una banda ancha entre 290 a 330 nm. Este espectro es característico del grupo furoquinolínico, pues su compuesto más simple, denominado "dictamnina", tiene un espectro similar que es considerado el espectro patrón de este grupo de alcaloides, con un pico a 245 nm y una banda ancha entre 290 a 330 nm, con picos diminutos que constituyen una estructura fina. La espectroscopía IR señala la presencia de picos comunes a ambos compuestos.

Los picos a 1625 cm^{-1} y 1621 cm^{-1} (alcaloide "1" y "2", respectivamente) indican presencia del doble enlace N - C del anillo furano, que aparece como una banda aguda ubicada entre $1639\text{-}1616\text{ cm}^{-1}$ y que aparece en todos los compuestos que presentan dicho grupo. Los picos a 1587 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} y 1475 cm^{-1} en el caso del alcaloide "1", y los picos a 1574 cm^{-1} y 1496 cm^{-1} en el caso del alcaloide "2", corresponden al doble enlace C - C aromático presente en la molécula. Los picos a 1265 cm^{-1} y 1276 cm^{-1} (alcaloide "1" y "2", respectivamente) corresponden tanto a la presencia de aril-aquil

éteres como al enlace C - O - C que se observa en la fracción correspondiente al anillo furano.

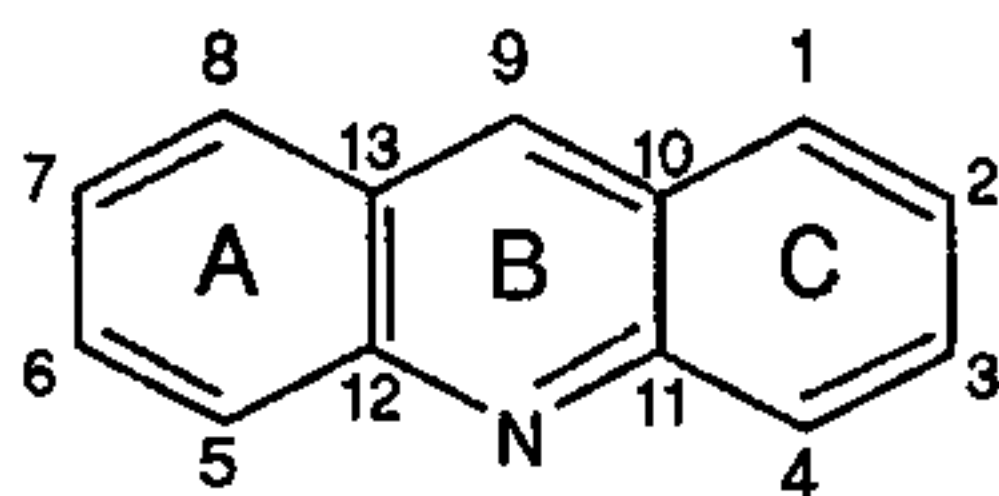
Debido a la presencia del pico a 3461 cm^{-1} del alcaloide "1", sugerimos que su estructura corresponda a un alcaloide furoquinolínico hidroxilado, careciendo de datos adicionales que permitan determinar en forma más completa su estructura. A diferencia de este caso, el alcaloide "2" ha sido identificado como el alcaloide furoquinolínico denominado "skimmianina", debido a la similitud de sus datos correspondientes al punto de fusión (Skimmianina = $176\text{ }^{\circ}\text{C}$; alcaloide "2" = $173\text{ }^{\circ}\text{C}$), espectroscopía ultravioleta y espectroscopía IR. La estructura propuesta la presentamos a continuación:



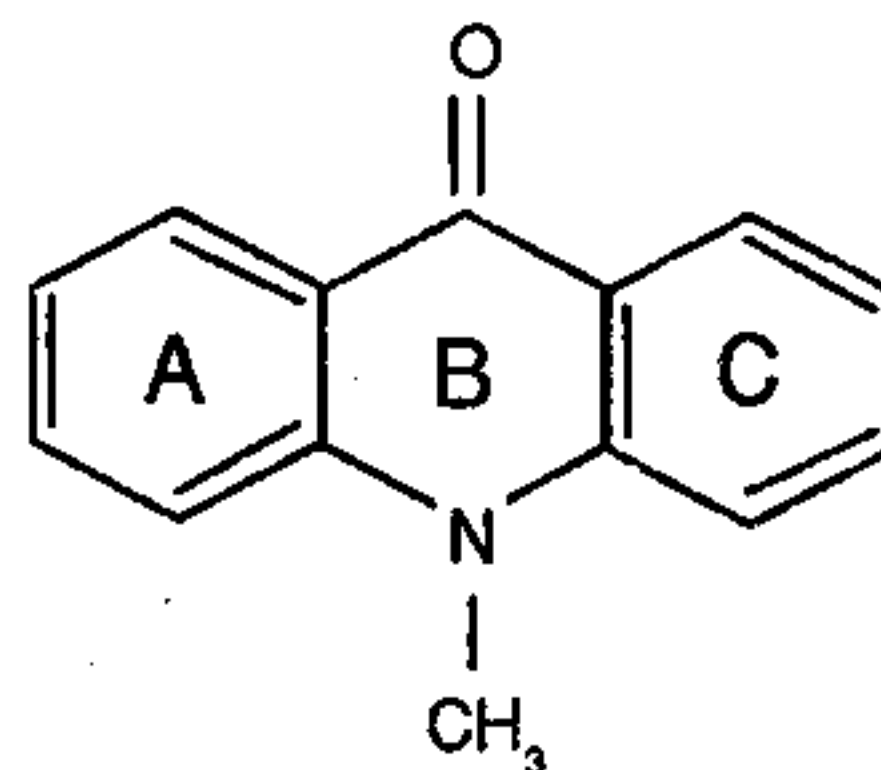
En el caso del alcaloide "3", éste fue identificado como alcaloide quinolónico, de acuerdo a los datos obtenidos en el espectro UV e IR. Sin embargo, no fue considerado en el estudio por ausencia de otros datos que ayuden a sugerir la posible estructura.

En el trabajo realizado por Callapiña y Jaimes (1), se demostró con claridad el efecto mutagénico del extracto acuoso de hojas de *Ruta graveolens* L. mediante el ensayo de Ames, y la mutación observada era correspondiente al corrimiento del marco de lectura. Este tipo de mutaciones es inducido por compuestos aromáticos, planares y policíclicos que, en razón de su estructura, tienen la facilidad de intercalarse entre dos pares de bases del ADN. La acridina y estructuras relacionadas son agentes mutagénicos clásicos debido a su naturaleza tricíclica aromática planar, cuya área es casi igual a la existente entre dos pares de bases del ADN (4,5).

De los alcaloides aislados, el alcaloide "A" es el que se aisló en mayor cantidad en el presente trabajo de investigación y fue identificado como acridónico. Este núcleo es un sistema policíclico relacionado a la acridina, como se indica a continuación:



Acridina.



N - metil - acridona

Por lo que reúne las características estructurales que le permiten intercalarse con facilidad entre dos pares de bases del ADN y consecuentemente inducir mutaciones. En la figura 1 (mostrada en la sección de resultados), ilustramos un modelo tridimensional donde se observa la intercalación de un alcaloide acridónico (Arborinina) entre dos pares de bases del ADN (C – G, G – C). En este modelo teórico podemos observar la formación de puentes de Hidrógeno entre los átomos de Hidrógeno de la molécula intercalada y los átomos de Nitrógeno y Oxígeno de las bases. Además, de acuerdo al modelo teórico de intercalación se debe producir la interacción entre los orbitales pi del sistema de anillos aromáticos y de los dobles enlaces de los pares de bases. De esta manera ilustramos la intercalación del núcleo acridónico como un acontecimiento teóricamente posible y que sustenta la reactividad con el ADN de estos compuestos. El modelo está basado en el modelo de intercalación de Lerman (1963) (6).

Existen varios reportes que señalan la reactividad de este grupo de alcaloides con el ADN, exhibiendo una diversidad de efectos relacionados, ya sea mutagénicos, antitumorales y antivirales (3). El hecho de haber aislado un compuesto con estas características lo señalan como una estructura con altas probabilidades de ser reactivo con el ADN. En los estudios de mutagenicidad realizados con alcaloides acridónicos de *Ruta graveolens* L., los alcaloides isogravacridoncloro y rutacridona epóxido, que se encuentran en la raíz, exhiben mutagenicidad en el Test de Ames correspondiente al corrimiento del marco de lectura y sin activación metabólica, exactamente igual a la mutagenicidad del extracto acuoso de hojas de *Ruta graveolens* L.; en tanto que el alcaloide rutacridona, que la literatura reporta se halla en las hojas, exhiben mutagenicidad en el Test de Ames, por corrimiento del marco de lectura, pero sin activación metabólica. Ninguno de los tres compuestos mencionados fueron aislados en nuestro trabajo, lo que sugeriría la existencia de otra estructura acridónica, con poder mutagénico potencial dadas las características estructurales, pero aún por confirmar experimentalmente.

Con relación a los alcaloides "1" y "2", ambos identificados como furoquinolónicos, su acción enzimática sería inducida principalmente por la luz ultravioleta (fotomutagenicidad) debido a la presencia del doble enlace en la porción furano de su estructura, que forma un enlace covalente fotoinducido luego de la irradiación UV. En nuestro trabajo, el alcaloide "2" fue identificado como skimmianina, el cual tiene actividad fotomutagénica comprobada (6 y 7) y produce mutaciones por sustitución de bases en el ensayo de mutagenicidad del test de Ames. Este alcaloide, al igual que el alcaloide "1" tuvieron un rendimiento bajo, sin embargo queda abierta la posibilidad de que en un ensayo de esta naturaleza pueda detectarse la actividad fotomutagénica.

A diferencia de los grupos alcaloides antes mencionados, no se conocen estudios de mutagenicidad en alcaloides quinolónicos, por lo que no existen pruebas suficientes como para hacer una evaluación del poder mutagénico del alcaloide "3", identificado como graveolina debido a sus constantes físicas y espectroscopía UV e IR.

CONCLUSIONES

De las hojas de *Ruta graveolens* L., se ha aislado un alcaloide acridónico, identificado como arborinina, el cual se presenta en mayor cantidad, y cuya estructura, al cumplir con el modelo de intercalación de Lerman, está relacionada a actividad mutagénica.

Se han aislado 2 alcaloides furoquinolínicos, uno de ellos hidroxilado, y el otro identificado como skimmianina, de los cuales el último posee actividad mutagénica y fotomutagénica comprobada.

Se ha aislado un alcaloide quinolónico identificado como graveolina, presente en cantidad apreciable, pero se carece de datos suficientes para deducir su posible efecto mutagénico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CALLAPIÑA, M.; JAIMES, N.; CRISPIN, V.; AMIEL, J. Actividad Mutagénica de los Extractos Acuosa de *Ruta graveolens* L. (Ruda) y *Spartium junceum* L. (Retama). Revista de la Academia Peruana de Farmacia, Vol. XI, XII y XIII: 26 – 32. Enero 1996 – Diciembre 1998.
2. PAULINI, H.; SCHIMMER, O. Mutagenicity Testing of Rutacridone epoxide and Rutacridone alkaloids in *Ruta graveolens* L. Using the Salmonella-Microsome Assay. *Mutagenesis* 4(1): 45 – 50, 1989.
3. PAULINI, H.; POPP, R.; SCHIMMER, O.; RATKA, O., RODER, E. Isogravacridonchlorine: A Potent and Direct Acting Frameshift Mutagen from the Roots of *Ruta graveolens* L. *Planta Médica* 57 (11): 59 – 61, 1991.
4. ROTH, J. Frameshift Mutations. *Annual Review of genetics*, 8: 319-346, 1974.
5. AMES, B.; DURSTON, W.; YAMASAKI, E.; LEE, F. Carcinogens are Mutagens: A simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington D.C.* 70 (8): 2281 – 2285, 1973.
6. LERMAN, L. The Structure of the DNA-Acridine-Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington D.C.* 49: 94-102, 1963.
7. PAULINI, H.; EILERT, U.; SCHIMMER, O. Mutagenic Compounds in an Extract from *Rutae Herba* (*Ruta graveolens* L.). I. Mutagenic Compounds in an Extract from *Rutae Herba* (*Ruta graveolens* L.) I. Mutagenicity is Partially Caused by Furoquinoline Alkaloids. *Mutagenesis* 2(4): 271 – 273, 1987.
8. SCHIMMER, O.; KUHNE, I. Mutagenic Compounds in an Extract from *Rutae Herba* (*Ruta graveolens* L.) II. UV-A Mediated Mutagenicity in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* by Furoquinoline Alkaloids and Furocoumarins Present in a Commercial Tincture from *Ruta Herba*. *Mutation Research* 243 (1): 557-62, 1990.