

Caracterización química y actividades biológicas de lapachol aislado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos

Miguel Martínez¹, Claudia Mancuello¹, Fanny Brítez¹, Claudia Pereira¹, Juliana Arrúa¹, Griselda Franco¹, Mirla Conteiro¹, Vanina Iañez¹, Fidelina González¹, Bonifacia Benítez¹, Tomás López², Samuel Pérez¹, Francisco Ferreira³

¹Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales – Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

²Laboratorio de Mutagénesis Ambiental – Departamento de Biología – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

³Laboratorio de Análisis Instrumental – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción.

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Caracterización química y actividades biológicas de lapachol aislado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. En el presente trabajo fue aislado uno de los metabolitos secundarios mayoritarios de la especie vegetal *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, que posteriormente fue purificado por el método de recrystalización. El mencionado metabolito mayoritario es el 2- hidroxi - 3 - (3-metil-butenil)-nafto-1,4-diona, denominado lapachol. Su pureza, testada por el método HPLC, arrojó un resultado del 100%, con posterior confirmación de su peso molecular (242 g.mol^{-1}) por el método de GC-MS. Se llevó a cabo la identificación botánica y la morfoanatomía de la especie vegetal en estudio, con el fin de comprobar su autenticidad. El ensayo de toxicidad sobre *Daphnia magna* a las 48 horas generó una DL_{50} de 24,08 ppm. El Screening antibacteriano efectuado, utilizando el método de difusión en disco, sobre las cepas *S. aureus*; *S. epidermidis*; *E. coli* y *Salmonella sp.* generó halos de inhibición de entre 15 mm a 31 mm para la concentración de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, presentando mejor actividad sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*. El poder termicida del lapachol fue estudiado por medio de dos bioensayos, el de confinamiento y el selectivo, además de la prueba por contacto. El método selectivo demostró que las termitas tuvieron preferencia por el papel control antes que por cada papel impregnado con la íesima concentración de lapachol. Lo mismo sucedió en la prueba de confinamiento, en la que el porcentaje de termitas muertas se elevó en casi todas las concentraciones del experimento, siendo las más efectivas las de 0,5 y 2,5 mg.mL^{-1} , en referencia al control.

Palabras Claves: *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos – *Daphnia magna* – Isoptera

Chemical characterization and biological activities of isolated lapachol from *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. In the present work one of the major secondary metabolites of the plant species *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, which was isolated and subsequently purified by recrystallization method. The major metabolite mentioned is termed lapachol (2 - hydroxy - 3 - (3-methyl-butenyl)-naphtho-1, 4-dione), which purity was tested by HPLC method, which showed a purity of 100%, with latter confirmation of its molecular weight (242 g.mol^{-1}) through the GC-MS method. Morphology, anatomy and botanical identification of the plant species studied were conducted in order to verify its authenticity. The toxicity test on *Daphnia magna* at 48 hours produced an LD_{50} of 24, 08 ppm. Antibacterial screening performed using the disk diffusion method on strains *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* and *Salmonella sp.* generated inhibition halos from 15 mm to 31 mm for the concentration of $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, showing improved activity against *S. aureus* and *S. epidermidis* with inhibition zones of 31 mm and 30 mm respectively. The termiticide power of lapachol was studied through two bioassays, the confinement and the contact bioassay. The selective method showed that termites had a preference for control over the paper impregnated paper for each i-th concentration of lapachol. The same occurs in the confinement test, in which the percentage of dead termites was high

in almost all the concentrations in the experiment, being 0,5 and 2,5 mg. mL⁻¹ the most effective, in relation to the control.

Keywords: *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos – *Daphnia magna* – Isoptera

INTRODUCCIÓN

El uso extensivo de químicos no sólo causa problemas ambientales, sino también desarrollo de resistencia contra los mismos (Zoberi, 1995). Por otro lado, Milner y Staples (1996) señalan que las demandas actuales de la sociedad a nivel mundial tienden hacia la no utilización de productos químicos para el control de termitas. Sin embargo, las termitas, no son buenos candidatos para el control biológico clásico, ya que la mayoría de ellas son nativas y que su distribución y abundancia dependen más del tipo de suelo, clima y disponibilidad de alimento que de sus enemigos naturales. El término “control”, debe estar bien claro por sobre todo en termitas; usualmente control significa matar, pero en termitas, el control químico algunas veces actúa más como repelente que como tóxico. De aquí que el control de termitas es la reducción de los daños a niveles tolerables (Arcos Roa, 1999).

El control de termitas en la actualidad tiende a excluir los productos químicos; sin embargo, en Paraguay, aún se los sigue utilizando. Una alternativa muy prometedora a nivel mundial es el uso de productos vegetales o sus metabolitos secundarios, que son más fácilmente biodegradables (Arcos Roa, 1999).

Un serio problema a nivel mundial, es la aparición de cepas resistentes y la capacidad de producir enfermedades serias, ambas fuertemente relacionadas con el amplio uso de los antibióticos y el enorme potencial para desarrollar resistencia. Las infecciones

estafilocócicas más serias, pueden incluso ocasionar la muerte (Lowy F., 2003). Al igual que los microorganismos mencionados con anterioridad, especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*, en la mayoría de las veces, provenientes de alimentos contaminados y la falta de higiene por parte de los manipuladores pueden ocasionar infecciones serias e incluso hasta la muerte en algunos casos (Albarado L. et al., 2005).

Por lo expuesto anteriormente se ha incrementado el interés por la actividad antimicrobiana de derivados de plantas medicinales, como alternativa de tratamiento de infecciones microbianas (Pantoja et al, 2007). Para tal efecto, se testó la actividad del lapachol sobre bacterias Gram (+) y Gram (-).

Resulta importante además de conocer sus actividades biológicas, tener conocimiento sobre su toxicidad, ya que según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, el 80% de la población en el mundo utiliza la medicina natural. Considerando lo dicho, se enfocó en la realización de la evaluación toxicológica mediante un nuevo micro-bioensayo estático, para determinar la dosis letal media (DL₅₀), sobre la población de *Daphnia magna* utilizada en el experimento (Silvia Martínez et al, 2010).

El presente trabajo tuvo como objetivo principal extraer y purificar la molécula de lapachol, proveniente de la corteza de la especie vegetal *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos y posteriormente investigar sobre su actividad termicida, antimicrobiana y su toxicidad sobre *Daphnia magna*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Equipos

Revelador con luz UV de 264 y 366 nm de la línea Spectroline Q-22NF de Spectronics Corporation. Espectrofotómetro UV-Vis modelo Shimadzu serie 160 A. Cromatógrafo gaseoso acoplado a masas modelo 2010. Microscopio óptico marca OLYMPUS serie BH2. Cámara digital MOTICAM 352. Equipo HPLC marca Shimadzu Prominence UFLC. Autoclave Vz Argentina. Incubadora Model 310.

Reactivos químicos

Agua calidad destilada y desionizada. Los reactivos grado pro-análisis utilizados fueron: etanol, metanol, acetato de etilo, hexano, carbonato de sodio, ácido clorhídrico, Agar Mueller Hinton para bacterias. Los reactivos de grado cromatográfico fueron: metanol y acetonitrilo. Las placas con base de aluminio utilizadas fueron de Silica gel 60F₂₅₄ previamente recubiertas, de la marca Merck.

Materiales biológicos

Cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.*

Neonatos de *Daphnia magna*
Termitas (Isóptera)

Colecta del espécimen vegetal en estudio

La especie vegetal estudiada fue colectada en la ciudad de Quiindy del Departamento Paraguari con coordenadas geográficas 25°58'27.36"S, 57°14'12.91"O, durante la estación de verano.

Preparación de especímenes "voucher" como material de herbario

El secado, envenenado y montaje del ejemplar fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes. El espécimen voucher fue depositado en el Herbario FACEN, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Identificación taxonómica y descripción del espécimen vegetal

La identificación correcta del material vegetal, con ayuda de un botánico, es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico, para garantizar la autenticidad de la especie utilizada en la investigación (Hostettmann K. et. al., 2008).

La identificación se realizó utilizando claves de identificación taxonómica de Gentry (1992) y a través de la comparación con material de herbario identificado.

Caracterización morfológica

Se siguió la metodología convencional de caracterización morfológica, con observación directa y al microscopio estereoscópico (Argüeso, 1986).

Caracterización anatómica

El material fue hidratado con agua destilada por 4 horas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada del tallo, que fueron clarificados con solución de Hipoclorito de sodio 2,5% y posteriormente se aplicó tinción directa con safranina. Las láminas fueron montadas con la técnica gelatina-glicerina (Argüesso, op. cit.) y depositadas en el herbario FACEN. Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

Preparación del material vegetal para la extracción y uso del lapachol

El material vegetal utilizado en este trabajo fue secado a temperatura ambiente, con escasa aireación y bajo sombra, para evitar la acción del oxígeno, la luz, la temperatura y microorganismos; factores que podrían transformar los compuestos originales en artefactos (Hostettmann et. al.; 2008).

Molienda del vegetal seco

La molienda se realizó con la ayuda de una máquina trituradora de madera, perteneciente a una aserradora de la ciudad de Quiindy, hasta la obtención de un polvo fino.

Determinación del porcentaje de lapachol en el tronco de la especie vegetal en estudio

Se pesó aproximadamente 20g de muestra (polvo), se transvasó

cuantitativamente a un balón de 500 mL de capacidad y se agregaron 150 mL de cloroformo. La mencionada preparación se sometió a una extracción a reflujo por 8 horas. La solución resultante fue filtrada y se acidificó lentamente hasta obtener un precipitado de color amarillo intenso. El precipitado obtenido de esa manera fue separado de la solución por filtración. La masa bruta obtenida fue cuantitativamente sometida a una recrystalización, obteniéndose de esa manera la masa de lapachol purificado; con el cual se procedió a los cálculos correspondientes para obtener el porcentaje del mismo en la muestra.

*Extracción y purificación de la molécula de lapachol del tronco de la especie vegetal *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos (Lapacho)*

Para la extracción de la sustancia en estudio, se utilizó como materia prima la corteza y madera del lapacho (especie nativa de Paraguay). Se introdujo una cantidad adecuada de polvo previamente obtenido, dentro de un balón de 1000 mL de capacidad, se adicionó 400 mL de cloroformo y se llevó a reflujo durante 8 horas. Se observó que se forma una solución extractora marrón, cuyo color disminuye en intensidad durante el proceso de extracción. Cuando la solución mencionada resultó ser incolora, se detuvo la extracción y se filtró. Se procedió a mezclar el filtrado con una solución acuosa de carbonato de sodio al 5% (m/v) y se agitó enérgicamente, separando la fase acuosa en un vaso de precipitados. Se repitió la extracción exhaustivamente hasta que la fase orgánica de la última extracción quedó de un color

rosa pálido a incolora. Ésta se acidificó débilmente hasta la aparición de un precipitado amarillo; que posteriormente se filtró, se lavó y se secó. El producto amarillo se disolvió en etanol y se purificó por recristalización.

Observación de los cristales de lapachol purificado al microscopio

Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico modelo OLYMPUS BH2 y editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

Testeo de la pureza del lapachol obtenido por HPLC

Se pesaron aproximadamente 10 mg de lapachol purificado y se diluyó a 50 mL con acetonitrilo grado HPLC. La disolución obtenida se filtró a través de un Minisart SRP 15-PTPE-membrana 0,45 µm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo:agua proporción 60:40 pH = 4,10 ajustado con Ácido Fosfórico; Columna RP18, detector UV en modo barrido espectral de 190 nm a 350 nm, flujo de 0,8 mL/min; horno de columna a 40 °C. El ensayo fue realizado por triplicado con dos inyecciones cada uno.

Obtención de la masa molar de la molécula de lapachol purificado por GC-MS

Condiciones cromatográficas:

Inyector: 200 °C. Detector: 250 °C. Programa de Separación de Columna: 100 °C por 2 min, luego a razón de 4 °C hasta 220°C y luego a temperatura final por 2 min.

Columna: DB5ms 30 x 0,25 x 0,25 µm. Cantidad Inyectada: 1µL. Barrido en Modo Scan 200 -260.

Ensayo in vitro de toxicidad aguda del lapachol frente a neonatos de Daphnia magna Strauss (Cladóceras)

Es muy conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes la utilizan (Mesa, 1988) tanto por ingestión como por contacto. Por esta razón es importante realizar investigaciones sobre la toxicidad del lapachol.

Se determinó la toxicidad aguda de la sustancia mediante la inhibición de la movilidad del crustáceo *D. magna* tras 48 horas de exposición; según el procedimiento establecido en la norma ISO 6341:1996, la Environmental Protection Agency (EPA, 2002).

Los individuos utilizados para los bioensayos, se mantuvieron en cultivos discontinuos a base de agua dura reconstituida (APHA, 1998), en envases de vidrio de 5 litros, con una densidad de 12 hembras adultas/litro, alimentadas con la microalga *Chlorella sp.* Las microalgas: a su vez se mantuvieron en medio de cultivo Bristol (Starr y Zeikus, 1987), con fotoperiodo similar al de *D. magna*. La alimentación se realizó en forma diaria con una concentración de $1,5 \times 10^6$ células de *Chlorella \times Daphnia*/día; la cuantificación de microalgas fue realizada con la ayuda de una cámara de Neubauer (Morales 2004). Las condiciones de mantenimiento para *D. magna* y *Chlorella sp.* fueron de un fotoperiodo de luz/oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de 20 °C, pH 7-8, y una

dureza de 160-180 mg CaCO₃.L⁻¹ (NMX-AA-087-SCFI-2010).

La prueba de toxicidad aguda del lapachol se evaluó con dos controles y nueve concentraciones de la sustancia: 100 mg.L⁻¹, 80 mg.L⁻¹, 60 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 10 mg.L⁻¹, 5 mg.L⁻¹, 2.5 mg.L⁻¹ y 2 mg.L⁻¹ (tratamientos), siguiendo un Diseño de Bloques Completo al Azar (DBCA) de 9×3; las diluciones fueron preparadas con agua dura reconstituida (APHA, 1998) y carbonato de sodio (1%). Por cada tratamiento, se prepararon 3 réplicas, cada una con 20 mL de la muestra y 10 neonatos menores a 24 horas de nacidos vivos.

Como control positivo se utilizó Dicromato de potasio; y como control negativo, agua dura reconstituida y carbonato de sodio en concentraciones menores a 1%. Para el primero se utilizaron concentraciones de 0,3 a 2,5 mg.L⁻¹ de Dicromato de potasio. El bioensayo se considera o queda validado cuando la DL₅₀ del control positivo toma valores que se encuentran entre 0.6 mg.L⁻¹ y 1,7 mg.L⁻¹ de dicromato de potasio.

Transcurridas las 48 horas, se procedió al conteo de organismos muertos o inmovilizados en cada uno de los viales en que se encontraban en contacto con las diferentes concentraciones de lapachol. Previo al conteo, se agitó suavemente por 10 segundos cada vial, y posteriormente se contabilizaron los organismos inmóviles por cada réplica. Una vez obtenida la mortalidad a cada concentración, se determinó la DL₅₀, por el método Probit, mediante el software SPSS 17.0, y Microsoft Excel 2007.

Actividad antimicrobiana del lapachol

La actividad antimicrobiana del lapachol frente a bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), así como sobre bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *Salmonella sp.*), fue determinada utilizando el método de difusión en agar con discos de papel de filtro estéril (Lima et al., 1993; Moura Mendes et al., 2012).

Se usaron 20 mL de Agar Mueller Hinton (AMH), fundidos a 45°C, que fueron asépticamente mezclados con 1 mL de la suspensión bacteriana (1 x 10⁸ UFC/mL) en placas petri de 90 mm x 15 mm. Después de la solidificación del medio, un disco de papel empapado con 10 µL de la disolución de lapachol en las diferentes concentraciones (1000, 500, 250, 125 y 62,5 µg.mL⁻¹) fue colocado en la superficie del medio de cultivo, en el centro de la placa. (Bauer et al, 1966; Cleeland & Squires, 1991).

Se incubó a 35 – 37 °C durante 24 a 48 horas, posteriormente, se realizó la lectura, registrando el diámetro de los halos de inhibición. Los ensayos fueron realizados por duplicado. La actividad antibacteriana de la disolución de lapachol se consideró positiva cuando los halos de inhibición alcanzaron valores mayores o iguales a 10 mm de diámetro, por lo menos, en el 50% de todas las cepas probadas (Souza et al, 2007; Moura Mendez et al, 2012).

Efecto termicida del lapachol

Colecta de las termitas (Isóptera)

Las termitas silvestres fueron colectadas en el Campus de la Universidad Nacional de Asunción de la Ciudad de San Lorenzo, con

referencias geográficas 25°19'55.10"S y 57°31'7.31"O.

Mantenimiento de las termitas

Una vez colectadas las termitas, fueron mantenidas en el laboratorio por un periodo de una semana anterior a la prueba, con el fin de lograr una aclimatación a las condiciones de laboratorio y poder trabajar con ellas (Arcos Roa, 2007). Las termitas fueron mantenidas durante el periodo de aclimatación en vasos de plástico de 5 cm de diámetro (Figura 1), acondicionadas en su interior con círculos de papel de filtro (5 cm de diámetro), el cual sirvió de alimentos a las termitas. Los vasos de plástico con las termitas se mantuvieron en la estufa a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa ambiente controlada y completa oscuridad.

Tratamientos

Se prepararon disoluciones acuosas de lapachol de las siguientes concentraciones: 0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 2,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, colocándolas en vasos de plástico, donde fueron sumergidos los discos de papel de filtro de 5 cm de diámetro durante 5 minutos, secándolos posteriormente al aire libre durante 24 horas. Los discos de papel sin lapachol (control) solo fueron sumergidos en una disolución de carbonato de sodio al 0,1%, por ser ésta el solvente utilizado para la realización de las disoluciones de lapachol.

Pruebas experimentales sobre papel de filtro

Prueba selectiva

La prueba selectiva consistió en colocar dentro de cada placa de petri un papel de filtro impregnado con T_0 sin tratar y T_i con el i -ésimo tratamiento ($i = 1, 2, 3, 4, 5$), con la finalidad de observar cual es la preferencia de la alimentación (Figura 1). Para el mencionado fin, se cortaron discos de papel de filtro en dos partes iguales, impregnando una sección con una concentración de disolución de lapachol y la otra con una disolución carbonato de sodio 0,1% (Control) y se agregaron 25 termitas ninfas en cada cápsula.

Prueba de confinamiento

El método de confinamiento consistió en que las ninfas únicamente tenían papel impregnado con el i -ésimo tratamiento (0, 1, 2, 3, 4, 5) para alimentarse (Figura 1). Para ello se colocó en cada placa de petri un disco de papel de filtro impregnado con cada una de las concentraciones de lapachol (0,025; 0,05; 0,1; 0,5; 2,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o con disolución de carbonato de sodio 0,1% para el control y se agregaron 25 termitas.

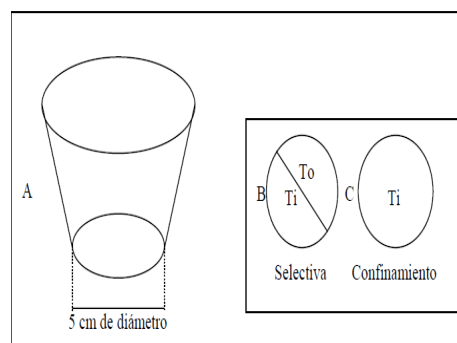


Figura 1. A: Contenedor plástico para mantener las termitas en experimentos. B: Papel de filtro para la prueba selectiva. C: Papel filtro para la prueba de confinamiento

Efecto insecticida de contacto

De forma adicional y con el objeto de probar el efecto insecticida de contacto, se asperjaron 10 (diez) termitas en cinco repeticiones con las diferentes concentraciones del lapachol y se colocaron en placas de petri con papel sin impregnar, observando el comportamiento de las termitas y tomando la mortalidad cada 30 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y descripción taxonómica de del espécimen vegetal Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos

Hoja: compuesta, digitada, peciolo largos de hasta 5 cm de largo, folíolos lanceolados, ligeramente acuminado, cuneado en la base, con los bordes aserrados, con 5 a 7 folíolos por cada hoja. Los folíolos laterales son más pequeños que los demás. De consistencia cartácea (Figura 2). *Tallo:* tronco cilíndrico, con la corteza grisácea, con surcos longitudinales profundos (Figura 3). *Inflorescencia:* panícula terminal. *Flores:* ejemplar observado con flores de 6 cm de largo, tubular-campanulada, 5 lobado, simetría cigomorfa, de color rosado, con estambres didínamos (Figura 4).

Fruto: cápsula cilíndrica lineal o alargada, de 15 cm de largo, de color castaño. Semillas planas y aladas.

Usos: para mueblería, construcciones, medicinal, ornamental.



Figura 2: Hoja de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos



Figura 3: Tallo cortado de *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos



Figura 4: Flores *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos

Caracterización anatómica de Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos

Caracterización anatómica caulinar

En sección transversal el tallo es circular, la epidermis es uniestratificada, por debajo de ella, se encuentra la corteza constituida por bandas continuas de colénquima, seguida de varios estratos de parénquima en los cuales se insinúan casquetes de fibras esclerenquimáticas. En la parte central del tallo, rodeado por los haces vasculares se encuentra la médula constituida por células parenquimáticas (Figuras 5, 6, 7, 8)

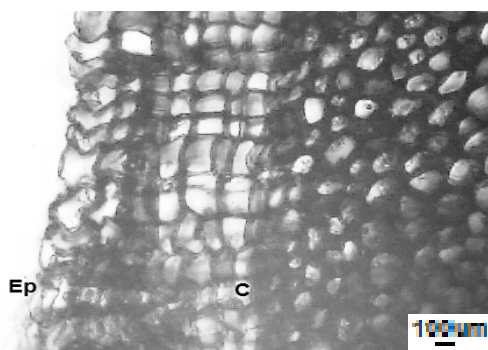


Figura 5: Vista del tallo en sección transversal.

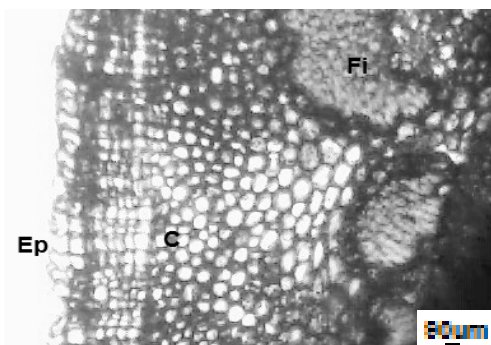


Figura 6: Vista del tallo en sección transversal.

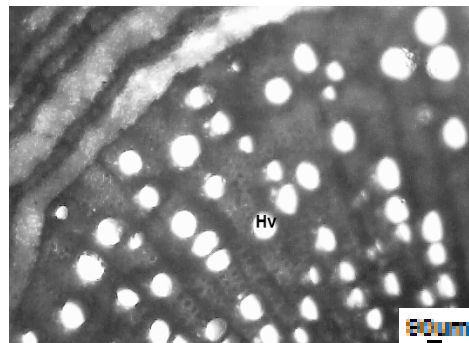


Figura 7: Vista del tallo en sección transversal.

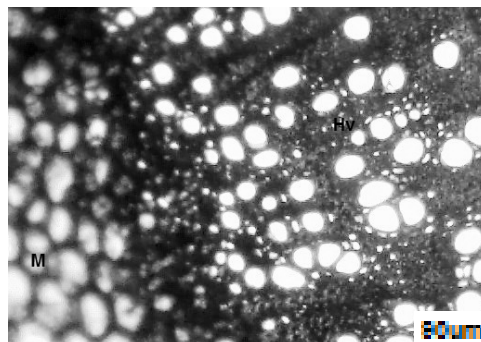


Figura 8: Vista del tallo en sección transversal. Referencias: E: epidermis; C: corteza; Fi: Fibras; M: Médula.

Determinación del porcentaje de lapachol en el tronco de la especie vegetal en estudio

El ensayo fue realizado por duplicado, obteniéndose un valor promedio de 1,94 g de lapachol por cada 100 g de muestra (% p/p). La cantidad de lapachol obtenida fue suficiente para la realización de los ensayos expuestos en el presente trabajo.

Observación de los cristales de lapachol purificado al microscopio

Los cristales observados al microscopio presentaron en algunos casos formas

perfectamente rectangulares (Figura 9), pero en su mayor parte formas irregulares (Figura 10), color amarillo intenso al igual que al observarlos macroscópicamente.

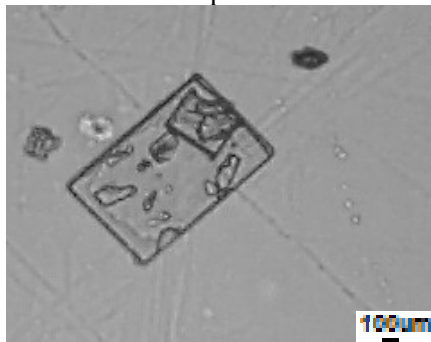


Figura 9: Cristal de lapachol observado al microscopio.

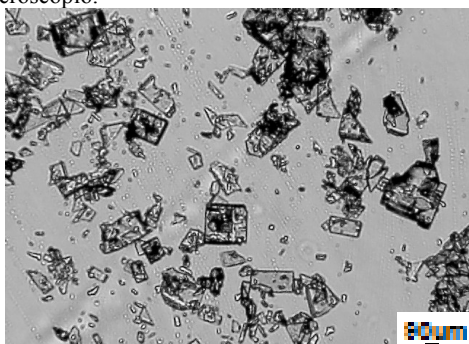


Figura 10: Cristales de lapachol observados al microscopio.

Testeo de la pureza del lapachol obtenido por HPLC

Las disoluciones de lapachol fueron inyectadas en un equipo HPLC, el cual proporcionó cromatogramas del barrido espectral, en las que se observó un pico dominante bien definido perteneciente al lapachol, pero con otros picos menores (impurezas) (Figura 11), por lo que se procedió a la realización de una segunda recristalización, obteniéndose cromatogramas los que aparece un solo pico

bien definido de la sustancia de interés (Figura 12), así como la de sus espectros planar (Figura 13) y 3D (Figura 14) en ultravioleta (UV) “ON LINE”, a través del detector diode-array. La confirmación de que el pico proporcionado en el cromatograma de HPLC pertenecía al lapachol, fue por medio de la determinación de su masa molar (242 g.mol^{-1}), obtenida a través el método GC-MS, modo scan de 180-250 uma, columna polar DB-5ms; método que confirmó su identidad y su excelente pureza, con mínimas probabilidades de encontrarse mezclado con otros tipos de sustancias, ya que se obtuvo un único pico perteneciente al lapachol, como lo muestran además los valores de la tabla 1, tabla 2 y tabla 3 correspondientes a las muestras 1, 2 y 3 respectivamente, obtenidas por HPLC, además de la tabla 4 obtenidas del espectro UV “ON LINE”, que delata un pico distinto al del lapachol, pero de área insignificante en comparación con la de él.

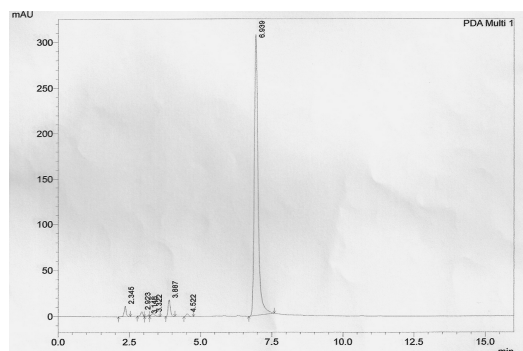


Figura 11: Cromatograma de lapachol después de su primera recristalización. Se observan impurezas (picos) al lado izquierdo del pico mayor bien definido del lado derecho.



Figura 12: Cromatograma de lapachol después de su segunda recristalización, donde ya no se observan las impurezas de la Figura 11

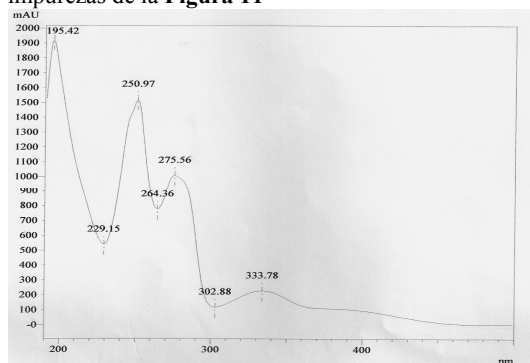


Figura 13: Espectrograma planar del lapachol obtenido por barrido espectral ultravioleta (UV) "ON LINE", a través del detector diode-array.

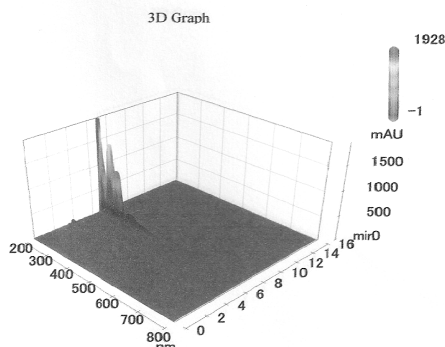


Figura 14: Espectrograma 3D del lapachol obtenido por barrido espectral ultravioleta (UV) "ON LINE", a través del detector diode-array

Tabla 1: Tiempo de retención, área y porcentaje de área obtenidos para la disolución 1 de lapachol.

Peak	Ret. Time	Área	Área%
1	6,930	34193866	100,0
Total		34193866	100,0

Tabla 2: Tiempo de retención, área y porcentaje de área obtenidos para la disolución 2 de lapachol.

Peak	Ret. Time	Área	Área%
1	6,938	34028442	100,0
Total		34028442	100,0

Tabla 3: Tiempo de retención, área y porcentaje de área obtenidos para la disolución 3 de lapachol.

Peak	Ret. Time	Área	Area %
1	6,927	34185769	100,0
Total		34185769	100,0

Tabla 4: Tiempo de retención, área y porcentaje de área obtenidos para la disolución de lapachol e impurezas, por medio del espectro UV "ON LINE" del HPLC.

Peak	Ret. Time	Área	Área%
1	6,945	9956925	99,228
2	3,987	46235	0,464
Total		9956925	100

Como puede observarse en la figura 15, los picos máximos obtenidos por medio de un barrido espectral entre 200-400 nm en un espectrofotómetro, generaron los mismos máximos que el espectro UV "ONLINE", obtenidos a través del detector diode-array del HPLC.

Bandas de absorción de la molécula de lapachol obtenidas por espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta

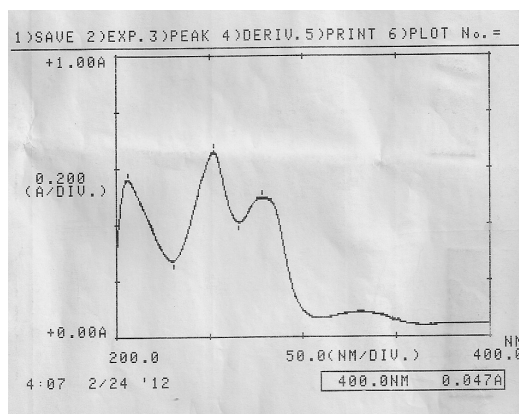


Figura 15: Espectro de absorción molecular ultravioleta de la molécula de lapachol

Ensayo in vitro de toxicidad aguda del lapachol frente a neonatos de Daphnia magna Strauss (Cladóceras)

La prueba de sensibilidad de *D. magna*, frente al dicromato de potasio, arrojó como resultado una DL_{50} de $0,62 \text{ mg.L}^{-1}$. Este valor se encuentra dentro de los límites que establecen normas como la NMX-AA-087-SCFI-2010, que recomiendan aceptar los valores de DL_{50} entre $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ y $2,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicromato de potasio. Por su parte en el control negativo a base de agua dura reconstituida y disolución de carbonato de sodio, no produjo inmovilidad en los organismos, con un 100% de supervivencia al final del bioensayo.

En el conteo final de vivos y muertos, realizado a las 48 horas, se obtuvieron los resultados resumidos en la tabla 5. La DL_{50} para el lapachol a este tiempo se estimó en $24,08 \text{ mg.L}^{-1}$, con límites de confianza al 95 %, comprendido entre $20,929$ y $27,621 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 5: Resultados de los nueve tratamientos y los controles a las 48 horas.

Tratamientos	Concentración (mg/l)	N de sujetos ^a	Mortalidad a las 48 horas (%)
1	100	10	100
2	80	10	100
3	60	10	100
4	40	10	93
5	20	10	23
6	10	10	10
7	5	10	10
8	2.5	10	0
9	2	10	0
CN ^b	0	10	0
CP ^c	0,62	10	5

^a10 individuos por réplica, ^bControl Negativo con disolución de Na_2CO_3 al 0,1%, ^cControl Positivo disolución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

La relación entre el Probit calculado y la concentración de cada tratamiento (\log_{10}) (Figura 16) muestra que existe una relación lineal, entre ambas variables, con una $R^2 = 0,9705$

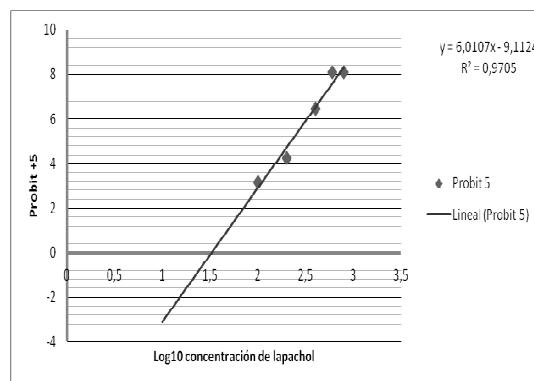


Figura 16: Relación entre el probit calculado y el \log_{10} de la concentración de cada tratamiento.

Actividad antimicrobiana del lapachol

Los resultados de la actividad antimicrobiana están expresados en la tabla 6. Las bacterias *S. aureus* y *S. epidermidis* se presentaron más sensibles al lapachol, ya que sus halos de inhibición fueron mayores.

También es posible observar una actividad dependiente de la concentración, esto es, al disminuir la concentración de lapachol también se redujeron los diámetros de los halos de inhibición.

La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos. Estas moléculas inhiben el desarrollo de insectos (Stamp et al, 1997; Zhang et al, 1999), nemátodos (Blum, 1996), hongos (Oliva et al, 1999) y bacterias (Grayer y Harborne, 1994), mejorando el crecimiento de la planta y su consistencia; razón por la cual los metabolitos secundarios se tornaron objeto de estudio dentro de diversas ramas de la ciencia. Varios factores ambientales influyen en la producción de esos metabolitos; por esa razón la misma sustancia puede presentar variabilidad en sus actividades (Kobayashi, 2004). Por ejemplo, Antunes et al, (2006) refirieron que el lapachol a una concentración de 200 mg.mL⁻¹, presentó halos de inhibición que variaron de entre 9 a 11 mm de diámetro sobre cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, halos menores que los expuestos en este trabajo de investigación. Sin embargo Oliveira et al (2001), reportaron que el lapachol no presentó actividad sobre *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. Cabe resaltar que los resultados también pueden variar de acuerdo con la virulencia de las cepas. Además de esos reportes, se encuentran diversos otros sobre la actividad antifúngica y antibacteriana del lapachol y sus derivados, siendo este trabajo un aporte más sobre la mencionada actividad (Medeiros et al., 2010; Oliveira et al, 2001).

Tabla 6: Halos de Inhibición del lapachol sobre cepas de bacterias Gram positivas y negativas

Lapachol (µg/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>
1000	31 mm	30mm	24m	29 mm
500	23 mm	22mm	18m	20 mm
250	21 mm	25mm	17m	15 mm
125	20 mm	20mm	15m	15 mm
62,5	20 mm	20mm	15m	15 mm

Efecto termicida del lapachol

Al asperjar una zona del termitero con 50 mL de una disolución de lapachol de concentración 2,5 mg.mL⁻¹, se observó la muerte casi instantánea de las termitas. Como puede observarse las termitas no volvieron a reconstruir su termitero sobre la zona asperjada (agujero) con lapachol, hasta 2 meses después, tiempo en que se ha ido observando el termitero con una frecuencia de dos días, lo que lleva a suponer que el lapachol actúa como repelente.



Figura 17: Termitero, zona asperjada (agujero) con una disolución de lapachol de 2,5 mg.mL⁻¹

Los datos se analizaron por medio del software estadístico SPSS, según el modelo de combinación lineal probit. A la vista de los resultados (Tabla 7), se observa que existe evidencia estadística de la relación entre la proporción de termitas muertas y el nivel de concentración del lapachol con el parámetro B_1 estadísticamente significativo con $p \ll 0,0001$, luego del conteo de termitas vivas y muertas a las 48 horas en la prueba de confinamiento.

A medida que aumentó la concentración de lapachol, se observó que existió también un aumento en la cantidad de termitas muertas, durante las 48 horas que duró el experimento (Figura 18).

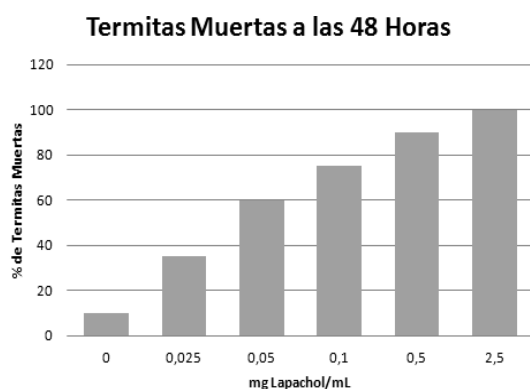


Figura 18: Relación entre la concentración de lapachol y el porcentaje de termitas muertas, obtenida por medio del modelo probit.

Al llevarse a cabo el segundo método, que fue el selectivo, se observó con facilidad que las termitas tuvieron preferencia por el papel control por sobre cada papel impregnado con la iésima concentración de lapachol, sucediendo lo mismo en la prueba de confinamiento, en la que el porcentaje de termitas muertas se elevó en casi todas las concentraciones de

lapachol utilizadas, siendo las concentraciones más efectivas las de 0,5 y 2,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, en referencial al control.

Tabla 7: Relación entre la proporción de termitas y el nivel de concentración del lapachol

Observación	Modelo	Sig. B_1
A las 24 horas	Probit(p) = 0,364 – 0,121 \log_{10} (mg lapachol /mL)	0,508
A las 48 horas	Probit(p) = 1,224 + 1,762 \log_{10} (mg lapachol /mL)	0,000
A las 72 horas	Probit(p) = 2,036 + 3,663 \log_{10} (mg lapachol /mL)	0,001

Efecto insecticida de contacto

Durante el desarrollo de este ensayo adicional, se pudo observar que cuando las termitas entraban en contacto directo con las disoluciones de lapachol (aspersión), ellas empezaron a moverse con más rapidez como síntoma de desesperación y en aproximadamente 7 minutos, murieron todas aquellas que fueron asperjadas con la concentración de 2,5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, al igual que las demás termitas asperjadas con concentraciones menores de lapachol pero en un tiempo más prolongado, algunas hasta en un par de horas.

CONCLUSIONES

El lapacho posee flores de 6 cm de largo, tubulares-campanuladas, 5 lobadas, simetría cigomorfa, de color rosado, con estambres didínamos; muy utilizado, además de la construcción de muebles y con fines paisajísticos, como medicinal, ya que su

tronco, posee propiedades farmacológicas interesantes (antiséptico, antiviral, antineoplásico, antileishmania, antimicrobiano, antiulceroso, analgésico y antiinflamatorio), debido a que en él se encuentra una molécula denominada lapachol, objeto de este estudio. El lapachol de aspecto cristalino, obtenido en este trabajo de investigación, presentó un color amarillo intenso, cuya observación al microscopio delató que presenta formas totalmente irregulares y en algunos casos cristales de gran tamaño de forma perfectamente rectangular. La pureza del lapachol obtenido fue de 100% según el cromatograma obtenido por HPLC, luego de la segunda recrystalización, eliminando las impurezas encontradas después de la primera recrystalización.

Considerando la importancia clínica y epidemiológica representada por las bacterias con las cuales fue probada la actividad antimicrobiana, se puede concluir que el lapachol podría ser usado como una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de las infecciones bacterianas, en dosis adecuadas. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre esta actividad.

La toxicidad aguda determinada, expresada como DL_{50} fue de 24, 08 mg. L^{-1} (20,92- 27,62) con límites de confianza para el 95%. La sustancia posee una toxicidad considerable comparando con la DL_{50} de sustancias como el fenol (9,1 mg. L^{-1}), y el ácido acético con (10 mg. L^{-1}), pero la toxicidad sería muy baja con respecto a otras sustancias como el paratión, con una DL_{50} de 0,0022 mg. L^{-1} .

El efecto termicida de la molécula en estudio fue muy satisfactorio, debido a que durante la prueba de confinamiento se

observó que además de la preferencia de las termitas por el papel control, las que se encontraban en presencia de los papeles impregnados con la i-ésima concentración de lapachol no se alimentaban de él y morían dentro de las 48 horas. Los resultados de esta prueba fueron fortalecidos con los obtenidos en la prueba selectiva donde las termitas permanecían cerca de la mitad del papel que no se encontraba impregnado por la i-ésima concentración de la sustancia (control), y alejadas de la otra mitad impregnada con lapachol. La prueba por contacto, consolida lo expuesto con anterioridad, ya que por medio en ésta se observó que las termitas morían en un corto periodo de tiempo, además de la prueba de aspersión *in Vivo* que demostró que las termitas asperjadas entraban en desesperación cayendo de su termitero al suelo, algunas muriendo en un corto lapso, lo que además permitió corroborar que actúa como repelente debido a que las termitas no volvieron a reconstruir su termitero en la zona asperjada.

BIBLIOGRAFÍA

- Agresti, A. 1990. Categorical Data Analysis. Florida: John Wiley & Sons, Inc.
- Albarado, L.; Yoli, G.; Militza, G.; José, B. 2005. *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. associated with acute diarrheic syndrome from children under six year of age. *Kasmera* 33(2):132-141.
- Antunes, R.M.P.; Lima, E.O.; Pereira, M.S.V.; Camara, C.A.; Arruda, T.A.; Catão, R.M.R.; Barbosa, T.P.; Nunes, X.P.; Dias, C.S.; Silva, T.M.S. 2006. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória

- mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16(4): 517-524.
- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition. American Public Health Association, Washington, D.C
- Arcos-Roa, J.; Méndez-Montiel, J. T.; Campos-Bolaños R. 2007. Efecto del aceite de nim *Azadirachta indica* a. juss., sobre la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (latreille) (ISOPTERA: KALOTERMITIDAE). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 17(3): 373-377.
- Argüeso, A. D'A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Bauer A.W.; Kirby W.M.M.; Sherris J.C.; Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45: 493 - 496.
- Blum U. 1996. Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal of Nematology* 28: 259-267.
- Castillo Morales, G. 2004. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones - México: IMTA.
- Castro, R. 2006. Efecto Biocida de los extractos vegetales de *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb. México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Cleeland, L.; Squires, E. 1991. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: V.M.D. Lorian. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams e Wilkins.
- EPA OPPTS 850.1010. 2002. Ecological Effects Test Guidelines - Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- Gentry, A. H. 1992. Bignoniaceae – Part II. (Tribe Tecomeae). In: Flora Neotropica, New York: Botanical Garden Press.
- Guilhermino, L.; Diamantino, T.; Carolina Silva, M.; Soares, A.M. V.M. 2000. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46(3): 357-362.
- Grayer, R.J. & Harborne, J.B. 1994. A survey of antifungal compound from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37: 19-31
- Hostettmann, K. 2008. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello.
- ISO 6341:1996. Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* Straus (Cladóceras, Crustáceo) – Ensayo de toxicidad aguda. Norma Europea. Versión Española. Comité Europeo de Normalización (CEN).
- Krishnaraju, A.V.; Rao, T.V.N.; Sundararaju, D.; Vanisree, M.; Tsay, H-S.; Subbaraju, G.V. 2006. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp test). *Journal of Applied Science and Engineering* 4 (2): 115-125.

- Lima, E.O.; Gompertz, O.F.; Giesbrecht, A.M.; Paulo, M.Q. 1993. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses* 36: 333 – 336.
- López, M. 2006. Eliminación del pigmentos del extracto acuoso termiticida *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq). Griseb., México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de grado.
- Lowy, F. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* 111 (9):1265–1273.
- Martínez, S.; Vela, A.; Botero, A., Arandia, F., Mollinedo, P. 2010. Nuevo Micro-Bioensayo de Ecotoxicidad de Extractos Acuosos de Plantas Medicinales sobre *Daphnia magna* sp. *Revista Boliviana de Química* 27 (1): 29-32.
- Medeiros, C.S.; Pontes-Filho, N.T.; Camara, C.A.; Lima-Filho, J.V.; Oliveira, P.C.; Lemos, S.A.; Leal A.F.G.; Brandão J.O.C.; Neves R.P. 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43(4): 345-349.
- Mesa, J. T. R. 1988. *Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba*. La Habana: Editorial Científico Técnico.
- Milner, R.J. 2003. Application of biological control agents in mound building termites—experiences with *Metarhizium* in Australia. *Sociobiology* 41: 419–428.
- Milner, R.J.; Staples, J.A. 1996. Biological control of termites: results and experiences within a CSIRO project in Australia. *Biocontrol Science and Technology* 6: 3–9.
- Milner R.J.; Staples J.A.; Lenz, J.A.; Lutton M.; McRae, G.G.; Watson, J.A.L. 1997. Insect pest control. US Patent #5,595,746.
- Milner, R.J.; Staples, J.A.; Lutton, G.G.; 1998. The selection of anisolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for the control of termites in Australia. *Biological Control* 11: 240–247.
- Milner, R.J. & Staples, J.A. 1996. Biological control of termites: results and experiences within a CSIRO project in Australia. *Biocontrol Science and Technology* 6: 3-9.
- Motic China Group. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopia digital.
- Moura Mendez, J.; Sarmento Guerra, F.Q.; de Oliveira Pereira, F.; Pereira de Sousa, J.; Nogueira Trajano, V.; de Oliveira Lima, E. 2012. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales* 11(3): 208-217.
- MX-AA-087-SCFI-2010. Norma Mexicana de Análisis de Agua y Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna*. Straus (Cladocera, Crustacea). Secretaría de Economía.
- Oliva, A.; Lahoz, E.; Contillo, R.; Aliota, G. 1999. Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its

- allelochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 25: 519-526.
- Oliveira, C.G.T.; Miranda, F.F.; Ferreira, V. F.; Freitas, C.C.; Rabello, R.F.; Carballido, J.M.; Corrêa, L.C.D. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 3-Hydrazino-Naphthoquinones as Analogs of Lapachol. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12 (3): 339-345.
- Pantoja, Y.; Angulo-Escalante, M.; Martínez-Rodríguez, C.; Soto-Beltrán, J.; Chaidez-Quiroz, C. 2007. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y Venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica* 32(4): 117 – 125
- Pardo, A. & Ruiz, M.A. 2002. SPSS 11. Guía para el análisis de datos. Madrid: McGRAW-HILL.
- San Feliciano, A.; Pérez, A.L.; Fernández, E.O. 2008. Manual de determinación estructural de compuestos naturales. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Stamp, N.E.; Yang, Y.; Osier, T.P. 1997. Response of an insect predator to prey fed multiple allelochemicals under representative thermal regimes. *Ecology*, 78: 203-214.
- Starr, R.C. & Zeikus, J.A. 1987. UTEX-The Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 23 (suppl.): 1-47.
- Solis, P. N.; Wright, C.W.; Anderson, M.M.; Gupta, M.P.; Phillipson, J.D. 1993. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica* 59 (3): 250-252.
- Souza, E.L.; Stamford, T.L.M.; Lima, E.O.; Trajano, V.N. 2007. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control* 18: 409 - 413.
- World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva-Suiza.
- Zhang, G.; Zhang, W.; Lian, B.; Gu, L. 1999. Insecticidal effects of extracts from two rice varieties to brown plant hopper *Nilaparvata lugens*. *Journal of Chemical Ecology* 25: 1843-1853.
- Zoberi, M. H. 1995. *Netarhizium aoisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Mycology* 87 (3): 354-359.