

# Evaluación fitoquímica del follaje de **Gliricidia sepium**

Silvia María Soto Córdoba\*

**S**e realizó un estudio fitoquímico sobre los follajes de **Gliricidia sepium** recolectados en cinco zonas ecológicas del país: Grecia, Guanacaste, Guápiles, Santa Ana y San Carlos. Se encontró que las hojas de todas las muestras presentaban como compuestos mayoritarios: 2H-1-benzopirano-2-ona (cumarina) y el flavonoide Kaemferol- 3 - O -  $\alpha$  - L - ramnopiranosil - (1-6) -  $\beta$ - D- galactopiranosido- 7- O - $\alpha$ - L- ramnopiranosido más conocido como robinina, en concentraciones que variaban entre 0,2 - 0,4 % y 5 - 8 % respectivamente, mientras que los tallos tiernos acumularon el ácido melilótico en cantidades que variaron del 0,7 al 0,9 %.

Estos metabolitos secundarios fueron identificados mediante análisis de sus datos espectroscópicos de Absorción Ultravioleta (UV), absorción infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear protónica ( $^1\text{H-RMN}$ ), resonancia magnética nuclear de carbono  $^{13}\text{C-RMN}$  y por comparación con modelos estructurales análogos reportados en la literatura.

## Introducción


**Gliricidia sepium** es una leguminosa arbórea que se ha adaptado a diferentes zonas ecológicas dentro del trópico del viejo y nuevo mundo. En nuestro país se le encuentra desde el nivel del mar hasta los 2000 m, en regiones con temperaturas medias anuales comprendidas entre los 22 y 30°C, con precipitaciones que varían entre los 800 y 3000 mm por año (1).

Es un árbol que puede alcanzar alturas hasta de 15 metros, con ramas delgadas y flexibles. Se le conoce con diversos nombres, entre los cuales se pueden mencionar: bala, bien vestido, madero negro, flor de San José, mata ratón, palo vivo, ratonera y madre cacao. (2,3)

Es originario de México y América Central, sin embargo ha sido introducido rápidamente en la parte norte de América del Sur, el Caribe, Africa Occidental, India, Indonesia y Australia (4).

**Gliricidia sepium** se ha convertido en una de las especies forestales de mayor aceptación para ser usada por los agricultores como cerca viva y como poste en el cultivo de la pimienta negra y el ñame, debido a su alta capacidad de rebrote, gran resistencia al pudrimiento, fácil propagación por medio de estacas y por suministrar eficientemente nitrógeno al suelo (5, 6, 7), utilizándose además como:

\* Departamento de Química, Instituto Tecnológico de Costa Rica



fuente de energía (8), alimento para rumiantes (9), sombra en plantaciones (5), fuente de madera para durmientes de ferrocarril (7) y soporte de plantas trepadoras (10, 11).

Estudios previos han mostrado que los extractos de las hojas y tallos son un excelente recurso alelopático para el control de malezas comunes de los cultivos de maíz y frijol (12). Inostroza y Fournier (13), encontraron que los extractos derivados de la corteza y las hojas de *Gliricidia sepium*, inhiben la germinación de las semillas de *Bidens pilosa* y *Lycopersicon esculentum* y disminuyen el crecimiento de plántulas comunes que se desarrollan alrededor del árbol.

Una práctica tradicional muy común es la utilización de las hojas frescas para evitar las pulgas, colocando las hojas debajo de los colchones de la cama, asimismo debajo de los nidos en los gallineros para eliminar los parásitos comunes de las gallinas.

Para evitar las pulgas y piojos en los perros e inclusive en el ganado, se les da un baño con las hojas machacadas en agua caliente.

También es común la utilización como un veneno para ratas, constituido por las hojas molidas y cocinadas con maíz

Estudios fitoquímicos previos en las hojas han mostrado, mediante la técnica de cromatografía en papel, la probable presencia de cumarina, ácido melilótico y ácido orto cumárico (14).

Otros compuestos encontrados son: en las flores el flavonoide 3-glucósido-quercetina (15), en la madera el sepiol (16), el 2'-O-metilsepiol y la 3'-4'-7'-trihidroxiflavona (17), gliricidin, sepinol y III gliricidol (18).

En virtud de la gran cantidad de usos encontrados para las hojas de *Gliricidia sepium*, se procedió al estudio del follaje y los tallos tiernos de esta planta.

## Materiales y métodos

Se recolectó material fresco del follaje de *Gliricidia sepium* entre los meses de junio y noviembre en cinco zonas del país; San Carlos, Santa Ana, Grecia, Guanacaste y Guápiles.

Cada material fue sometido al proceso de extracción descrito por Soto (19).

En las hojas, los extractos de diclorometano y el residual etanol agua (Hidroalcohólico), mostraron la presencia de metabolitos de interés.

El extracto de diclorometano se estudió utilizando métodos cromatográficos (19) y de recristalización con una mezcla constituida por diclorometano-metanol (30:70), lográndose separar un compuesto cristalino blanco con punto de 66-68°C denominado GS-1, que representó un 0,2-0,4% del total de sólidos extraídos.

En el extracto hidroalcohólico después de varios días precipitó un sólido amarillo, que mediante técnicas cromatográficas y de cristalización fue purificado; este compuesto posteriormente fue hidrolizado en medio ácido (20) y finalmente se le realizó el correspondiente derivado acetilado (19). Este sólido amarillo se denominó GS-2, y representó de un 5 a un 8% de la cantidad de sólidos extraídos.

Por su parte en el extracto hidroalcohólico de los tallos tiernos precipitó un sólido cristalino incoloro denominado GS-3, que fue recristalizado utilizando una mezcla de metanol-agua (90:10), este compuesto se acumuló en cantidades que variaban desde un 0,7 a un 0,9% de la cantidad de sólidos extraídos.

## Resultados

El compuesto GS-1 exhibe en UV dos máximos centrados en 275 nm y 310 nm típicos de un sistema aromático, el espectro <sup>1</sup>H-RMN exhibe señales centradas en 6,40 ppm (d, J=9,70 Hz), 7,70 ppm (d,

J=9,70 Hz) las cuales fácilmente pueden ser atribuibles a protones *trans* de un doble enlace y la señal centrada en 7,40 ppm que se presenta como un multiplete puede atribuirse a un sistema aromático poco sustituido; el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN exhibe señales que son idénticas a la cumarina; Cuadro 1 (21).

400 nm, esto indica la presencia de quelatos con aluminio 3+, la adición de ácido clorhídrico a la mezcla anterior no varió el patrón de absorción lo que evidencia que los quelatos formados eran del tipo hidroxilo-carbononilo; es despreciable la variación al adicionar acetato de sodio 265 nm, 325 nm, 355 nm y finalmente la adición de acetato de sodio-ácido bórico prácticamente no varía el patrón de absorción inicial 265 nm, 350 nm.

**Cuadro 1.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) para el compuesto GS-1, comparados con los reportados para la cumarina (21).

GS-1	Cumarina	Carbono
160,6	160,4	C-2
153,9	153,9	C-4
143,4	143,6	C-8a
131,7	131,8	C-7
127,9	128,1	C-5
124,3	124,4	C-6
118,8	118,8	C-4a
116,6	116,4	C-8
116,5	116,4	C-3

En el compuesto GS-2 se determinó la presencia de los azúcares D-galactosa ( $R_f=0,30$ ) y L-ramnosa ( $R_f=0,75$ ) por comparación cromatográfica contra patrones de dos azúcares puros (20).

El espectro UV exhibe dos máximos de absorción centrados en 265 nm y 350 nm, la posición de estos máximos de absorción evidencia la presencia de compuestos tipo flavonoide, a su vez se observan cambios batocrómicos al adicionar hidróxido de sodio 260 nm y 400 nm, lo cual indica la presencia de hidroxilos libres; la adición de cloruro de aluminio provocó por su parte cambios batocrómicos a 275 nm, 350 nm,

El espectro  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ), exhibe a campo bajo dos señales en doblete centradas en 8,10 ppm y 6,90 ppm ( $J=8,80$  Hz) que integran para cuatro protones; otras dos señales en doblete a 6,80 ppm y 6,40 ppm ambas con constante de acoplamiento  $J=1,90$  Hz. Estas señales fácilmente se asocian a los protones unidos a los anillos aromáticos

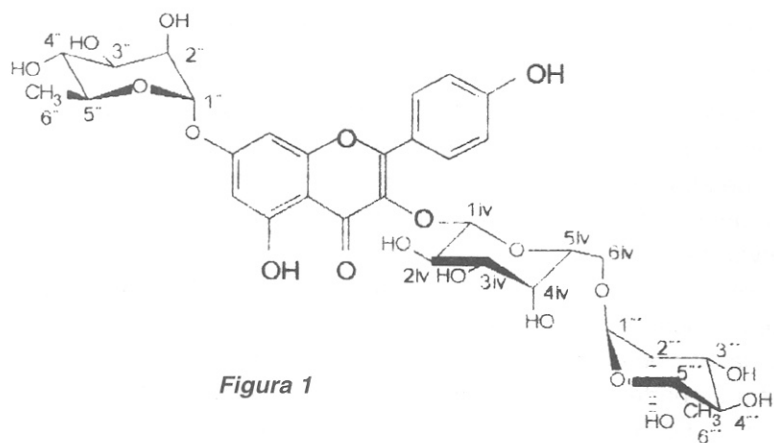
Centradas en 5,30 ppm ( $J=7,60$  Hz), 5,20 ppm ( $J=4,60$  Hz) y 5,10 ppm ( $J=4,40$  Hz) se observan dobletes característicos de protones anoméricos de monosacáridos, y a campo bajo se observan dos dobletes con desplazamientos de 1,10 ppm ( $J=6,10$  Hz) y 1,00 ppm ( $J=6,0$  Hz).

El resto de señales en 12,60 ppm (s) y 10,20 ppm (s) son atribuibles a hidroxilos libres, mientras que las siguientes señales son atribuibles a los protones de los azúcares 4,95 ppm (t,  $J=5,40$  Hz,  $J=5,60$  Hz), 4,38 ppm (d,  $J=5,60$  Hz), 4,44 ppm (s, 2H), 3,83 ppm (s), 3,59 ppm (m, 3H), 3,06 ppm (m). La correspondiente asignación se observa en el Cuadro 2.

El  $^1\text{H}$ -RMN (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del derivado acetilado por su parte mostró las siguientes señales: dos dobletes 6,80 ppm y 7,20 ppm ambos con  $J=2,60$  Hz, otros dos dobletes en 8,10 ppm y 7,20 ppm ambos con  $J=8,79$  Hz, entre 5,5 ppm y 3,0 ppm un multiplete muy complejo, dos dobletes en 1,10 ppm ( $J=6,60$  Hz) y 1,20 ppm ( $J=5,70$  ppm) y un multiplete centrado en 2,00 ppm que integró para 30 protones.

**Cuadro 2.** Datos de  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ) del compuesto GS-2 y su derivado acetilado GS-2A (90 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ).

Protón	GS-2	GS-2A
<b>Aglicona</b>		
OH- 5	12,65 (s)	
OH-4'	10,22 (s)	
H-6	6,44 (d, J=1,9 Hz)	6,8 (d, J=2,6 Hz)
H-8	6,80 (d, J=1,9 Hz)	7,2 (d, J=2,6 Hz)
H-2' y H-6'	8,09 (d, J=8,8 Hz)2H	8,1 (d, J=8,79 Hz)
H-5' y H-3'	6,86 (d, J=8,8 Hz)2H	7,2 (d, J=8,79 Hz)
<b>Azúcares</b>		
Protones Anoméricos	5,35 (d, J=7,6 Hz) 5,20 (d, J=4,6 Hz) 5,15 (d, J=4,40 Hz)	
Resto de Señales	4,93 (t, J=5,4 Hz, J= 5,6 Hz) 4,45 (d, J=5,6 Hz) 4,38 (s) 2H 3,84 (s) 3,58 (m) 3H 3,34 (m) 3,08 (m)	
Protones asociados a los metilos de las ramnosas	1,11 (d, J=6,1 Hz) 1,05 (d, J=6,0 Hz)	1,1 (d, J=6,6 Hz) 1,2 (d, J=5,7 Hz)
Protones unidos al acetilo		2,03 (m) 30 H



El  $^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) para el compuesto GS-2 brindó gran información referente al número de azúcares presentes en la molécula por las 19 señales comprendidas entre 101,9 ppm y 18,0 ppm, según se observa en el Cuadro 3 (22, 23).

El modelo propuesto para el compuesto es el de la robinina (Figura 1).

Finalmente el compuesto GS-3, fue identificado como el ácido melilótico.

**Cuadro 3.** Datos de  $^{13}\text{C}$ -RMN (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ) del compuesto GS-2, su derivado acetilado GS-2A y dos modelos análogos A y B. (Gal= galactosa, Glu = Glucosa) (22,23).

Carbono	GS-2	GS-2A	A	B
<b>Aglicona</b>				
2	156,1	150,5	156,0	156,0
3	133,5	133,6	133,7	133,6
4	177,7	171,8	177,6	177,7
5	161,7	160,8	160,9	161,6
6	99,4	99,4	99,5	
7	160,9	158,9	161,7	160,8
8	94,7	95,6	94,6	94,8
9	157,1	152,1	157,1	157,1
10	105,6	112,6	105,8	105,7
1'	120,7	127,9	120,8	120,7
2', 6'	131,2	130,3	130,7	131,1
4'	160,2	155,3	159,1	160,1
3',5'	115,2	121,1	115,1	115,2
<b>Azúcares</b>				
Ramnosa 7	99,4	97,5	98,9	98,5
2''	*		70,0	70,0
3''	*		70,6	78,7
4''	*		71,9	71,8
5''	*		69,8	69,7
6''	18,0	17,2	17,5	18,1
Ramnosa 6'''	100,1		100,6	100,1
2'''	*		70,3	70,5
3'''	*		70,8	70,5
4'''	*		72,1	72,5
5'''	*		68,1	68,5
6'''	18,0	17,9	17,5	18,1
Gal o Glu 3 <sup>iv</sup>	101,9	101,7	101,4(Glu)	102,1(Gal)
2 <sup>iv</sup>	*		74,2	71,3
3 <sup>iv</sup>	*		76,6	73,2
4 <sup>iv</sup>	*		70,2	68,4
5 <sup>iv</sup>	*		76,0	73,8
6 <sup>iv</sup>	65,3			65,6

(\*) La cercanía entre las señales hace imposible su asignación directa a cada carbono, por lo cual se indica con un asterisco. Las señales son: 101,9 ppm, 100,1 ppm, 99,4 ppm, 98,4 ppm, 94,7 ppm, 77,7 ppm, 73,0 ppm, 72,0 ppm, 71,8 ppm, 71,1 ppm, 70,6 ppm, 70,5 ppm, 70,3 ppm, 70,1 ppm, 69,9 ppm, 68,3 ppm, 68,0 ppm, 65,3 ppm.

## Conclusiones

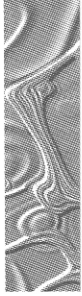
Se encontró que las hojas de *Gliricidia sepium* procedentes de muestras botánicas recolectadas en diferentes regiones del país, elaboraban principalmente la cumarina y la robinina, esta última en cantidades poco usuales del orden del 5 a 8 % del total de sólidos extraídos. Por su parte los tallos tiernos acumularon preferentemente el ácido melilótico.

Es importante destacar que muchas de las propiedades biológicas atribuidas a *Gliricidia sepium* pueden ser relacionadas con la presencia del flavonoide robinina y con la presencia de la cumarina, por ejemplo se ha encontrado que los derivados del Kaempferol ejercen un fuerte efecto alelopático (24), además se les ha encontrado significativas propiedades antiinflamatorias (25, 26), lo que podría explicar el uso tradicional de las hojas en forma de compresas para evitar dolores por torceduras. La actividad rodenticida puede ser explicada por la presencia de cumarina ya que es bien conocido que este compuesto se transforma en dicumarol, el cual es un reconocido agente rodenticida (27).

Finalmente, la gran producción de robinina, permite pensar en una futura explotación de este material botánico, ya sea para utilizar directamente este flavonoide, o como producto de partida para diferentes síntesis de otros flavonoides con actividad biológica.

## Bibliografía

1. Standley, P.C. *Flora de Costa Rica II*. Chicago, 1937. p 540.
2. Morton, J.F. *Atlas of Medicinal Plant of Middle America Bahamas to Yucatan*. USA: Charles C. Thomas Publisher, 1981.
3. Little, E.L.; Wadsworth, F and Marrero, J. *Arboles comunes de Puerto Rico y las Islas Vírgenes*, 1967, p277.
4. Huges, C.E. "Biological considerations in designing a seed collection strategy for *Gliricidia sepium*". *Com. Forest. Rev.* 66: 31-48, 1, 1987.
5. Picado, W.; Salazar, R. "Producción de biomasa y leña en cercas vivas de *Gliricidia sepium* de dos años de edad en Costa Rica". *Silvoenergía*. 1, 1984 .
6. Daccarett. M.; Blyndenstein, J. "La influencia de los árboles leguminosos y no leguminosos sobre el follaje que crece bajo de ellos", *Turrialba* (CR), 40:405-408, 8, 1968.
7. Ducca. E, Tesis, *Crecimiento de dos leguminosas forrajeras tropicales*, CATIE-UCR, 1986.
8. Delizo, R.L.; Del Fierro, V.F. "The vegetative propagation of *Gliricidia sepium* by cutting alphanaphaline acetic acid". *Arnetta Research Journal*, 21: 20-30, 1974.
9. Araya, J.F, Tesis, *Efecto del Madero Negro, como abono verde en un sistema de maíz y frijol, en relevo en Acosta Puriscal*, CATIE, Costa Rica, 1987, pp 92-93.
10. Alcornero, R.; Stone, E.G.; Cairns, J.R. "Intensive cultivation of vainilla in Uganda". *Journal or Agronomy*, 65 : 44-46, 1973.
11. Mora, E, Tesis, *Introducción al estudios de la variabilidad fenotípica del Madero Negro*, CATIE (CR), 1983, 45p.
12. Obando, L, Tesis, *Potencial alelopático de *Gliricidia sepium* sobre cultivos de maíz y frijol y la maleza predominante*, CATIE-UCR, 1987.
13. Inostroza, I., Tesis, *Efectos alelopáticos de *Gliricidia sepium**, Escuela de Biología, UCR, 1981.
14. Griffiths, L.A. "On the co-occurrence of coumarin, o-cumaric acid and melilotic acid in *Gliricidia sepium* and *Dipteryx adorata*". *Journal Experimental Botanic*, 13 (38): 169-175, 1962.
15. Nair, A.G.; Sancana, "Flavonoids of the flowers of *Dombeya calantha* and *Leucaena glauca*". *Current Science*. 31: 504-506, 1962.
16. Jurd, L. *Tetrahedron Letters*, 21: 1741-1744, 1976.

- 
17. Jurd, L.; Manners, D. "Isoflavene, isoflavananol constituents of *Gliricidia sepium*". *Journal of Agricultural food Chemistry*. 25: 723-726, 4, 1977.
  18. Manners, G.D.; Jurd, L. "Isoflavene, isoflavanol and flavonoid constituents of *Gliricidia sepium*". *Phytochemistry*, 18: 1037-1042, 6, 1979.
  19. Soto, S.M. Tesis, *Evaluación fitoquímica del follaje de Gliricidia sepium*, Escuela de Química, UCR, 1994.
  20. Ravn, H.; *et al.* "Phenolic compounds from plantago asiatica". *Phytochemistry*, 29: 3627-3631, 1, 1990.
  21. Breitmair, E.; Voelter, W. *Carbon 13C-NMR Spectroscopy*. 3 ed. Germany: VCH, 1990, p 445.
  22. Markhan, K.R.; Ternai, B. *Tetrahedron*, 34: 1389, 1978.
  23. Wenkert, E.; Guttlieb, H.E. "Carbon-13 nuclear magnetic spectroscopy of flavonoids and isoflavonoids compounds" *Phytochemistry*, 16: 1811, 1977.
  24. Harbone, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry H. *The flavonoids*, London: Chapman and Hall, 1975.
  25. Moroz *et al.*, 1984, *Chemical Abstracts*, V: 100, 171764q, citado indirectamente del Chemical Abstracts.
  26. Pathak, D.; Singla, A.K. "Flavonoids as Medicinal agents. Recent advances". *Fitoterapia*. LXII: 371-389, 5, 1991.
  27. Murray, R.D.H.; Mendez, J.; Brown, S.A. *The natural coumarins*, New York: John Wiley & Sons Ltd, 1982.