

METABOLITOS FENÓLICOS AISLADOS DE *Pilocarpus alvaradoi* Pittier (Rutaceae)

RESUMEN

Del extracto etanólico de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* Pittier (Rutaceae) se aislaron, purificaron e identificaron usando técnicas cromatográficas y espectroscópicas los siguientes compuestos de tipo fenólico: 7-hidroxi-6-rutenflavanona (1) y 3-metoxi-4-hidroxi-3',4'-metilenedioxi-[3,3,0]-bicyclooctanoepilignano (2). A los compuestos (1) y (2) y al extracto etanólico se les determinó la capacidad atrapadora de radicales libres por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

PALABRAS CLAVES: Flavonoides, Lignanos, *Pilocarpus alvaradoi*, Rutaceae.

ABSTRACT

From the ethanolic extract of leaves of *Pilocarpus alvaradoi* were isolated and identified a glycosilated flavonoid 7-hydroxy-6-rutenflavanone (1); a furofuranic lignan 3-methoxy-4-hydroxy-3',4'-methylenedioxy-[3,3,0]-bicyclooctanoepilignan (2); Antioxydant activity was evaluated on isolated compounds (1) and (2) and on the ethanolic extract of the leaves of *Pilocarpus alvaradoi*.

KEYWORDS: Flavonoids, lignans, *Pilocarpus alvaradoi*, Rutaceae, Antioxydant activity.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Pilocarpus* pertenece a la familia Rutaceae y es endémico de América, esta presente desde el sur de México hasta Paraguay. Se conocen 45 especies de este género de las cuales 4 se encuentran en Colombia¹. Las especies de *Pilocarpus* son comúnmente conocidas como la mayor fuente de pilocarpina², un alcaloide imidazólico usado en las formulaciones para el tratamiento de glaucoma, una enfermedad que causa la pérdida total de la visión en humanos y animales³. Además de alcaloides imidazólicos han sido aislados otro tipo de metabolitos secundarios como cumarinas con diversos patrones de sustitución⁴, triterpenos tetracíclicos derivados del damarano⁵, y flavonoides polimetoxilados⁶. En el presente trabajo se reportó el aislamiento y posterior elucidación estructural usando métodos cromatográficos (CC, CCP, CCD) y espectroscópicos (IR, UV, RMN uni y bidimensional) de dos metabolitos fenólicos y la determinación de su actividad antioxidante junto con la del extracto etanólico por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity).

2. CONTENIDO

2.1. Material vegetal

La muestra de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* fue recolectada en el corregimiento de Santa Isabel, municipio de Montería, Departamento de Córdoba, Colombia; por los profesores, Luis Enrique Cuca Suárez y Alberto Angulo. La especie fue determinada por el biólogo Álvaro Cogollo Pacheco del Jardín Botánico

MONICA CONSTANZA AVILA

Química Ms. Sc.
Estudiante de Doctorado en Química
Universidad Nacional de Colombia
mcavilam@unal.edu.co

LUIS ENRIQUE CUCA SUAREZ

Químico Ph.D.
Coordinador del grupo de investigación
lecucas@unal.edu.co
Universidad Nacional de Colombia
Productos Naturales Vegetales

“José Manuel Uribe” de la ciudad de Medellín, Colombia, donde se encuentra una muestra de herbario con el número JAUM - 040562

2.2. Extracción y Purificación

1250 gramos de hojas secas y molidas fueron extraídas por percolación con etanol obteniéndose 190 gramos de extracto etanólico. Este se fraccionó por Soxhlet con tres solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo; de la fracción de acetato de etilo se aisló el flavonoide glicosidado denominado 7-hidroxi-6-rutenflavanona (1), y de la fracción de cloroformo se aisló el lignano furofuránico 3-metoxi-4-hidroxi-3',4'-metilenedioxi-[3,3,0]-bicyclooctanoepilignano (2).

2.3. Actividad Antioxidante

El protocolo seguido para la realización del ensayo fue el reportado por Rice Evans et al.⁷, el ensayo se hizo con el extracto etanólico de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* y los compuestos 1 y 2.

2.4. Resultados y Discusión de Resultados

2.4.1 Elucidación estructural compuesto 1

El compuesto 1, un sólido color crema cuyo punto de fusión es 330°C, da positiva la prueba de Shinoda lo cual

es característico de un compuesto tipo flavonoide, el espectro IR muestra las señales en 3471 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} , 1277 cm^{-1} , características del estiramiento y flexiones del grupo OH alcohólico y fenólico, 1648 cm^{-1} característica del estiramiento C=O, 1607 y 1521 cm^{-1} características del estiramiento C-H en compuestos aromáticos. El espectro RMN ^1H muestra el perfil de un compuesto glicosídico por las señales presentes entre δ 3.0 y δ 5.0, en δ 4.52 (br s, 1H), y δ 4.9 (d, 7.5 Hz, 1H) se observan las señales características de dos protones anoméricos lo cual indica la presencia de dos unidades de azúcar en la molécula⁶. Las señales en δ 4.5, δ 3.6 – δ 3.7, δ 3.5, δ 3.4, δ 3.15, δ 1.07 son características de una unidad de ramnosa, la multiplicidad debida al protón anomérico de la ramnosa en δ 4.5 (br s, 1H) evidencia que la constante de acoplamiento de ese protón es menor a 1 Hz y por ende el enlace glicosídico formado por la unidad de ramnosa es de tipo α . Las señales en δ 4.9, δ 3.2, δ 3.1, δ 3.5 – δ 3.4, δ 3.78 corresponden a una unidad de glucosa, la constante de acoplamiento de la señal debida al protón anomérico de la glucosa en δ 4.9 (d, 7.5, 1H) indica que esta unidad de carbohidrato esta formando un enlace β -glicosídico. De acuerdo a las correlaciones vistas a larga distancia en el HMBC entre el carbono 6 de la glucosa y el protón anomérico de la ramnosa se evidencia la unión 1---6 de los dos azúcares, el disacárido formado es llamado comúnmente rutinosa⁸.

Las señales de la aglicona se presentan entre δ 5.5 y δ 7. La señal en δ 6.9 (m, 5H) corresponde a 5 protones aromáticos que por el tipo de señal son protones de un anillo aromático monosustituido que poseen cada uno un desplazamiento similar por lo que se origina una señal con esa multiplicidad. En δ 6.1 existen dos dobletes que integra cada uno para un protón con una constante de 2.1 Hz, por el valor de la constante se asume que estas señales doblete corresponden a dos protones que están acoplado entre si, están sobre un anillo aromático y deben estar en posición para. En δ 5.48 (dd, 12 y 3 Hz, 1H) característica del acoplamiento del protón 2 de un núcleo de flavanona y que permite diferenciar este núcleo de los demás núcleos flavonoides⁹. De acuerdo al análisis de RMN ^1H la flavanona esta disustituida en el anillo A del núcleo flavonoide, un sustituyente debe ser el disacárido y el otro sustituyente debe ser OH lo cual es concordante con las observaciones del IR. En los espectros de RMN no se observa claramente la unión del azúcar a la aglicona por lo cual se realizó un análisis por espectroscopia UV con reactivos de desplazamiento. El espectro UV del compuesto **1** tomado en metanol muestra dos máximos de absorción en λ 316 nm (banda I) y λ 247 nm (banda II), lo cual confirma que se trata de una flavanona como se observo en RMN ^1H , además de manera específica el desplazamiento de la banda II debida al fragmento Benzoil (anillo A) en λ_{max} 274 nm es característica de un flavonoide 6 ó 7 hidroxilado. La banda II sufre un desplazamiento batocrómico de 7 nm producido por el metóxido de sodio lo que confirma la hidroxilación sobre el anillo A. Al tratar el compuesto **1**

con ácido bórico la banda II sufre un desplazamiento batocrómico de 16 nm, lo que confirma la hidroxilación en la posición 7 del núcleo flavonoide. Por todo lo anterior se denomino el compuesto **1** como 7-hidroxi-6-rutenflavanona.

2.4.2. Elucidación estructural del compuesto 2

El compuesto **2** es un sólido blanco, con punto de fusión 166°C , y peso 354 uma según el EM-IE. El espectro IR muestra las señales en 3464 cm^{-1} (estiramiento OH), 2924 cm^{-1} , 1447 cm^{-1} , 1354 cm^{-1} (estiramiento y flexiones de metilos y metileno), 1654 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} (estiramiento del enlace C-H en compuestos aromáticos). El espectro de RMN ^1H muestra las señales en δ 6.82 (dd, 8 y 1.5 Hz, 1H); δ 6.87 (d, 1.5 Hz, 1H); δ 6.89 (d, 8 Hz, 1H), que corresponden a un anillo aromático con protones en un sistema orto, meta; δ 6.77 (m, 1H); δ 6.79 (m, 1H), δ 6.94 (d, 1.6 Hz, 1H) corresponde a otro anillo aromático con tres protones sobre su estructura; δ 5.90 (s, 2H), δ 5.55 (s, 1H), δ 3.90 (s, 3H), son desplazamientos característicos de los sustituyentes oxigenados metilendioxi, hidroxilo y metoxi sobre anillo aromático respectivamente¹⁰. Las señales en δ 2.87 (dd, 14 y 7 Hz, 1H), δ 3.3 (m, 2H), δ 3.8 (m, 2H), δ 4.1 (d, 9Hz, 1H), δ 4.42 (d, J= 7 Hz, 1H), δ 4.85 (d, 5.4 Hz, 1H), son en conjunto características del núcleo de un lignano furofuránico¹¹, en esta clase de metabolitos existen tres isómeros: axial, ecuatorial y epi, una herramienta útil e inequívoca para distinguir entre uno y otro es el número de señales de hidrógeno del núcleo furofuránico y el desplazamiento de estas, el isómero epi da 6 señales de hidrogeno distintas, y los isómero ecuatorial y axial dan tres señales de hidrogeno; de acuerdo con lo anterior el compuesto **2** corresponde a un isómero epi, es decir uno de los arilos sobre el núcleo del lignano esta axial y el otro ecuatorial.¹⁰

Para el caso del compuesto **2** según lo visto en RMN ^1H cada anillo aromático esta trisustituido, una sustitución en cada caso es la unión al núcleo furofuránico del lignano, los otros dos sustituyentes obedecen en un caso de un anillo aromático al grupo metilendioxi y en el caso del otro anillo a los sustituyentes metoxi, e hidroxilo. Para corroborar la posición del grupo –OH en el arilo se realizo el test de Gibbs comprobando así la ubicación del OH en la posición 4 a la cadena alifática, en este caso al núcleo del lignano. El análisis anterior permite denominar al compuesto **2** como 3-metoxi-4-hidroxi-3',4', metilendioxi-[3, 3,0]-bicyclooctano-epilignano.

2.4.3 Determinación de la actividad antioxidante

A los compuestos **1**, **2** y al extracto etanólico de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* se les determinó su capacidad como atrapadores de radicales libres por el método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) siguiendo el protocolo de Rice Evans et al⁷. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1, la actividad antioxidante se expreso como unidades TEAC en el caso de los

compuestos puros; y para el extracto crudo la actividad antioxidante como mmol trolox/g de extracto.

Sustancia Ensayada	A _{blanco} - A _{muestra}	mM de Trolox	Actividad antioxidante
Extracto etanólico	0.444	1.51	1.89
Compuesto 1	0.334	1.16	1.55
Compuesto 2	0.166	0.634	0.46
Ácido Ascórbico	0.288	1.01	1.01

Tabla 1. Resultados de la determinación de actividad antioxidante por el método TEAC de los compuestos 1,2 y el extracto crudo.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del extracto etanólico de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* se aislaron los siguientes metabolitos fenólicos: 7-hidroxi-6-rutenflavanona y 3-metoxi-4-hidroxi-3',4'-metilenedioxi-[3,3,0]-bicyclooctano epilignano, los cuales junto con el extracto etanólico de las hojas de *Pilocarpus alvaradoi* se sometieron al ensayo TEAC para determinación de su capacidad antioxidante dando muy buenos resultados el extracto etanólico y el flavonoide glicosidado en comparación con el ácido ascórbico el cual fue usado como patrón en el ensayo. Se recomienda seguir con el estudio de las demás fracciones para ver que otros compuestos aportan a la buena capacidad antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Pilocarpus alvaradoi*.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] <http://www.mobot.org> Abril de 2006
- [2] Dewick, P., (1997). Medicinal Natural Products. Jhon Willey, New York, p.p.379-380.
- [3] Andrade-Neto, M., Henriques, P., Rocha . E. "An imidazole alkaloid and other constituents from *Pilocarpus trachillophus*". *Phytochemistry*, **42**, 885-887, (1996).
- [4] Muller, A., Degaspari, L., Vieria, P." 3-Methoxyfuranocoumarins from *Pilocarpus riedelianus*". *Phytochemistry*, **34**, 585-586, (1993).
- [5] Andrade-Neto, M., Silveira E., Braz-Filho, R "24-metil-25-etildammarane derivares from *Pilocarpus spicatus*". *Phytochemistry*. **35**, 739-743, (1994).
- [6] Bertrand, Cédric., Fabre, N., Moulis C., "Constituents of *Pilocarpus trachylophus*" . *Fitoterapia*, **72**, 844-847, (2001).
- [7] Pellegrini, N., Proteggete, A., Pannala, A., Yang, N., Rice Evans, C., "Antioxidant activity applying a

improved ABTS radical cation decolorization assay", *Free radical, Biological Medicine*, **26**, 1231-1237, 1999.

- [8] Agrawal, P., "NMR Spectroscopy in the structural Elucidation of oligosacarides and Glycosides", *Phytochemistry*, 3307-3330, 1992.
- [9] Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H.,(1979) "The Flavonoids", Chapman and Hall, 46-74.
- [10] Ayres, D.C., Lqike, J.D.,(1992) "Lignans, Chemical, Bilogical and Clinical properties", Cambridge University, New York, 209.
- [11] Ahsan, M., Islaw, S., E(-)-Episesamine from *Boronia bowmanii*". *Fitoterapia*, **5**, 464-466, (1997).