

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO QUASINOIDE A PARTIR DEL EXTRACTO EN DICLOROMETANO DE SEMILLAS DE *SIMABA CEDRON* PLANCH

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL QUASSINOID COMPOUND FROM DICHLOROMETANE EXTRACT OF *SIMABA CEDRON* PLANCH SEEDS

Shirley Osorio-Herrera¹, Ricardo Gaitán-Ibarra¹, Fredyc Díaz-Castillo¹, Dionisio Olmedo, Mahabir Gupta²

Resumen

En el presente trabajo se describe el estudio químico del extracto parcial en diclorometano de la semilla de *Simaba cedron* Planch. (Simaroubaceae). Para la preparación de los extractos, la semilla molida se sometió a extracción a temperatura ambiente con etanol hasta su total agotamiento; la solución obtenida de este proceso fue concentrada a presión reducida en un rotavapor hasta 500 ml, obteniendo el extracto etanólico total. Este extracto fue sometido a partición líquido-líquido con hexano y diclorometano; los extractos en hexano y etanol fueron conservados para estudios posteriores. El extracto seco en diclorometano fue sometido a fraccionamiento cromatográfico en columna abierta (CC), con un gradiente de polaridad creciente desde EP:CH₂Cl₂ (8:2) hasta AcOEt:MeOH (9:1). Se obtuvieron 59 fracciones, las cuales fueron monitoreadas por CCF; las fracciones que presentaron perfil cromatográfico similar fueron reunidas. A partir de la fracción codificada como SO-I-21B18A, se obtuvieron cristales de un compuesto puro, cuya estructura fue caracterizada empleando métodos espectroscópicos convencionales, tales como, IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT-135, HMBC, HSQC, NOESY y espectrometría de masas de baja y alta resolución. Dicha estructura correspondió a un nuevo quasinoide del tipo cedronolactona C-19, denominado en este estudio como 1,4-dehidrocedronolactona A.

Palabras clave: 1,4-Dehidrocedronolactona A, quasinoídes, *Simaba cedron*, Simaroubaceae.

Abstract

In this paper we describe the chemical study of the dichloromethane extract of *Simaba cedron* Planch (Simaroubaceae) seeds. For the extracts preparation, ground seeds were full extracted with ethanol at room temperature; the solution obtained by this process was concentrated in vacuum until 500 ml of the total ethanol extract. This was further submitted to liquid-liquid partition using hexane and dichloromethane as solvents. Hexane and ethanol extracts were stored for further chemical studies. The dried dichloromethane extract was submitted to open column chromatographic separation (CC) using gradient from EP:CH₂Cl₂ (8:2) until OEtAc:MeOH (9:1). 59 fractions were obtained and monitored by TLC. Crystals of a pure compound were obtained from fraction SO-I-21B18A and its structure was characterized by conventional spectroscopic methods, such as, IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT-135, HMBC, HSQC, and NOESY, and by low and high resolution mass spectrometry. The structure of this pure compound was established as the new C-19 quassinoid 1,4-dehidrocedronolactone A.

Key words: 1,4-Dehidrocedronolactone, quassinoids, A, *Simaba cedron*, Simaroubaceae.

¹ Grupo de Productos Naturales (GPNUC-LIFFUC), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Cartagena. Cartagena (Bolívar) Colombia. Correos electrónicos respectivos: <seoh13@yahoo.com.mx>, <rigaitan2003@yahoo.es>, <fredycdiazcastillo@yahoo.com>.

² Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAM), Facultad de Farmacia. Universidad de Panamá. Panamá. Correos electrónicos: <dionisioa@excite.com>, <Ciflorp2@ancon.up.ac.pa>.

INTRODUCCIÓN

A pesar de la gran biodiversidad de la flora colombiana son muy pocas las investigaciones Fitoquímicas y la farmacognósticas comparadas con la de otros países, que sin contar con tanta biodiversidad, son protagonistas en el área de la investigación sobre productos naturales. Debido a la actividad biológica que se les ha atribuido, al uso medicinal que se les ha dado a través del tiempo y a la gran variedad de compuestos que poseen, las plantas han sido objeto de investigaciones en diferentes áreas del conocimiento científico a nivel mundial. *Simaba cedrón* Planch. (Simaroubaceae) ha sido empleada en medicina tradicional en muchos lugares del mundo. Esta planta ha sido usada por la comunidad de la costa Atlántica colombiana, contra los dolores de estomago, especialmente de origen nervioso, contra la mala digestión, ventosidades, sustos, decaimiento, falta de ánimo, tristeza, abatimiento nerviosismo, arteriosclerosis, enfermedades del corazón, desmayos, opresiones y mordeduras de animales venenosos (García, 1992; Clarke, 2000). La curarina es un producto comercial producido por un laboratorio local de la ciudad de Cartagena (Bolívar), Colombia, el cual es usado ampliamente y en grandes cantidades en nuestra región para tratar algunas de las molestias anteriormente citadas. Este producto comercial está constituido por el material pulverizado de cuatro especies de plantas, dentro de las que se incluyen *Aristolochia cordiflora*, *Aristolochia longifolia*, *Aristolochia maxima* y *Simaba cedron*. Como parte de un convenio interdisciplinario entre nuestro Grupo de Productos Naturales de la Universidad de Cartagena, Cartagena (Bolívar), Colombia, y la empresa local, "Laboratorios Román S. A." fabricante de la curarina, se realizó el estudio fitoquímico y biológico de los extractos de semillas de *S. cedron*. En este artículo reportamos la elucidación estructural de un nuevo quasinoide aislado y caracterizado a partir del extracto en diclorometano de semillas de esta especie vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los extractos, fracciones y compuestos obtenidos fueron concentrados a presión reducida en rotovapores. El etanol empleado para realizar la extracción fue de grado técnico, siendo necesario destilarlo. Los análisis de Rotación Óptica, Puntos de Fusión (pf), los espectros de RMN e IR, fueron realizados en los laboratorios del Centro de Investigación Farmacognóstica de la Flora Panameña en la Universidad de Panamá. Los espectros de RMN se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Avance (300 MHz), empleando metanol deuterado como solvente y como referencia interna se usó tetrametilsilano. El espectro infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1310. La rotación óptica del compuesto fue obtenida en un polarímetro Perkin-Elmer 141. El punto de fusión se determinó sin corrección en un fusiómetro Thomas Hoover. Las columnas cromatográficas se empacaron empleando Silica gel 60 MERCK (70-230 Mesh). El monitoreo cromatográfico en capa fina se realizó empleando cromatoplasmas de Silica gel 60 F₂₅₄ (20 x 20, 0,2 mm de espesor). Los solventes hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol utilizados en el desarrollo de esta investigación, fueron de grado reactivo. Las semillas secas y molidas de *S. cedron*. (2.850 g) fueron suministradas por Laboratorios Román S.A. Un voucher (HUA 135827) del material vegetal fue depositado en el herbario de la Universidad de Antioquia, Medellín (Antioquia), Colombia. Para la preparación de los extractos, las semillas de *S. cedron* previamente secadas y molidas (2.850 g), fueron sometidas a extracciones sucesivas con etanol (3 l) a temperatura ambiente, separando por filtración la solución etanólica del marco vegetal. La solución fue concentrada a presión reducida en un rotavapor obteniéndose el extracto total en etanol (SO-I-21C). Este extracto total fue sometido a particiones continuas con hexano y diclorometano, obteniéndose de esta manera los extractos parciales en hexano (SO-I-21A), diclorometano (SO-I-21B) y etanol (SO-I-21C). El extracto parcial en diclorometano (SO-I-21B, 4 g) fue disuelto en una

mezcla de CH_2Cl_2 y MeOH. Posteriormente, adsorbido en 4 g de silica gel y secado a temperatura ambiente; luego se sometió a separación por cromatografía de columna abierta (85 cm x 5 cm) empleando silica gel 60 (260 g) suspendida en hexano como fase estacionaria. La columna se eluyó con gradiente de polaridad creciente desde EP: CH_2Cl_2 (8:2) finalizando con AcOEt:MeOH (9:1). Se obtuvo un total de 59 fracciones (500 ml cada una). La fracción SO-I-21B18A (65,8 mg), presentó cristales polimorfos incoloros, los cuales fueron lavados sucesivamente con CH_2Cl_2 obteniéndose cristales de un compuesto puro SO-I-21B19 (58,3 mg). Los cristales fueron monitoreados por CCF utilizando diferentes fases móviles y empleando como revelador solución de H_2SO_4 al 10% en etanol y calentamiento, mostrándose la banda como una mancha café. Estos cristales dieron positivo a la prueba de Goding (vainilla 1% en EtOH, HClO_4 3% en agua, H_2SO_4 10% en EtOH) para quasinoídes. La pureza de los cristales se evaluó realizando un monitoreo en CCF con diferentes sistemas de solventes, obteniéndose los siguientes resultados para una sola banda en la placa cromatográfica: EP: AcOEt (9:1), $R_f = 0,25$; AcOEt:EP (9:1), $R_f = 0,36$; AcOEt:MeOH (9:1), $R_f = 0,52$, lo cual indica la presencia de un compuesto puro.

RESULTADOS

El compuesto SO-I-21B-19, exhibió las siguientes propiedades físicas y espectrales: cristales polimorfos incoloros, $\text{mp } 242\text{-}244^\circ\text{C}$; IR ν_{max} 3520, 3460, 2864, 1774, 1422 cm^{-1} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.81$ (c 1.000, MeOH); RMN- ^1H (300 MHz MeOD) δ 4.58 (1H, d, $J = 2.88$ Hz, H-18b), 4.57 (1H, d, $J = 3.57$ Hz, H-7), 4.34 (1H, m, H-1), 3.79 (1H, m, H-11), 3.67 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-2), 3.54 (1H, d, $J = 1.56$ Hz, H-18a), 3.17 (1H, d, $J = 8.85$ Hz, H-12), 2.73 (1H, s, H-14), 1.95 (1H, m, H-5), 1.90 (1H, d, $J = 2.61$ Hz, H-6b), 1.85 (1H, d, $J = 5.13$ Hz, H-9), 1.81 (1H, m, H-3b), 1.62 (1H, m, H-3a), 1.60 (1H, m, H-4), 1.43 (3H, s, Me-19), 1.42 (1H,

m, H-6a), 1.40 (3H, s, Me-17), 0.96 (3H, d, $J = 7.59$ Hz, Me-16); RMN- ^{13}C (90 MHz, CDCl_3) δ 175.15 (C-15), 88.35 (C-13), 85.93 (1), 85.88 (12), 76.51 (C-18), 72.43 (C-11), 72.15 (C-7), 69.42 (C-2), 60.70 (C-14), 57.21 (C-10), 48.28 (C-8), 46.13 (C-9), 42.05 (C-5), 40.86 (C-3), 35.37 (C-4), 34.30 (C-6), 21.48 (C-19), 16.20 (C-17), 16.07 (C-16); LREIMS m/z 350 ($\text{M}^+ - 18$), 332, 173, 105, 69; HRFABMS m/z 369.19078.

El compuesto SO-I-21B19 fue aislado inicialmente por columna cromatográfica en silica gel 60 como una mezcla en la fracción SO-I-21B18A y purificado posteriormente por recristalización con CH_2Cl_2 , como cristales polimorfos incoloros. El espectro IR mostró una banda de absorción típica de una α -lactona (1774 cm^{-1}) y una banda a 3460 cm^{-1} , correspondiente a grupos hidroxilos. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C indicaron la presencia de un esqueleto quasinoide, característico de los quasinoídes del tipo C-19, previamente reportadas en la literatura (Polonsky, 1973; Handa et al., 1981; Arisawa et al., 1983a, 1983b; Moretti et al., 1986; Ozeki et al., 1998). El espectro RMN- ^1H mostró la presencia de un doblete integrando para tres protones a δ 0.96 y dos singletes integrando para tres protones cada uno, a δ 1.40 y δ 1.43. En el espectro RMN- ^{13}C se observa la presencia de 19 carbonos, cuyas señales a 16.01, 16.20, y 21.48 ppm fueron adjudicadas a los carbonos metílicos C-16, C-17 y C-19, como se demuestra en el espectro DEPT-135 de este compuesto. De igual manera, los carbonos C-3, C-6 y C-18 (a 40.80, 34.23 y 76.52 ppm, respectivamente) correspondieron a grupos metílicos, mientras que las señales a 85.94, 69.42, 35.37, 42.05, 72.15, 46.13, 72.44, 85.33 y 60.70 ppm, se adjudicaron a los carbonos metínicos C-1, C-2, C-4, C-5, C-7, C-9, C-11, C-12 y C-14, respectivamente. La presencia de dos multipletes a 1.62 (H-3a) y 1.81 (H-3b) ppm correspondieron a la absorción de los protones heterotópicos del metileno sobre el carbono C-3 (δ 40.80), lo cual fue evidenciado a partir de los espectros bidimensionales HSQC y HMBC. En el

espectro de HMBC pudieron observarse claramente las correlaciones entre estos protones (H-3a y H-3b) con los carbonos a δ 85.94 (C-1), δ 69.42 (C-2), δ 35.37 (C-4) y δ 16.01 (CH₃-16). De igual forma en el espectro de HSQC, los multipletes a 1.42 y 1.90 ppm y a 3.54 y 4.58 ppm, fueron localizados sobre los carbonos C-6 (34.23ppm) y C-18 (76.52 ppm), respectivamente. Como se observa en el espectro HMBC, los protones H-6a y H-6b presentan correlaciones con los carbonos a δ 48.29 (C-8), δ 42.06 (C-5) y δ 57.21 (C-10). La posición del metilo sobre el carbono C-4 fue establecida mediante la correlación a largo alcance entre los protones a δ 0.96 y los carbonos a δ 35.37 (C-4) y δ 40.80 (C-3) observada en el espectro bidimensional HMBC. De igual forma se observaron en este espectro las correlaciones entre los protones metílicos a δ 1.40 y los carbonos C-5 (δ 42.05) y C-9 (δ 46.13), y aquellos a δ 1.43 y los carbonos C-14 (δ 60.70), C-12 (δ 85.33) y C-13 (δ 88.35). La absorción a campos bajos del carbono C-18 evidencia la presencia de un grupo oximetileno en la estructura del compuesto SO-I-21B19, sobre el cual se encuentran unidos directamente un par de protones metilénicos heterotópicos (H-18a y H-18b). La localización del puente oximetilénico sobre los carbonos C-8 y C-13 fue evidenciada por las correlaciones a largo alcance en el espectro de HMBC entre los protones metilénicos heterotópicos H-18a y H-18b, con los carbonos C-8 (δ 48.29), C-13 (δ 88.35) y C-14 (δ 60.70).

Con el fin de asignar en lo posible, una estereoisomería a la estructura del compuesto SO-I-21B19, se tuvieron en cuenta las diferentes correlaciones espaciales de los protones de este compuesto, usando para ello el espectro de RMN ¹H-¹H en dos dimensiones a través del espacio (NOESY); adicionalmente, se hizo una revisión bibliográfica de los compuestos quasinoídes relacionados con la estructura propuesta para el compuesto SO-I-21B19, para verificar si la posición a del protón H-9, sugerida en este estudio para dicho compuesto, coincidía con la de aquellos quasinoídes previamente reportados (Ozeki *et al.*, 1998). Adicionalmente, se

recurrió al uso de cálculos de mecánica molecular, (Burkert y Allinger, 1982; Rappé y Casewit, 1997) a un nivel MM3 con la ayuda del programa CaChe 5.0 versión 2002, dirigidos por rotaciones de 7.5° alrededor del enlace presente entre los átomos H-9 y C-10. Los resultados obtenidos confirmaron que la ubicación del protón H-9 se encontraba en posición a, con un ángulo de -53.85°, de acuerdo con los resultados provenientes del análisis del espectro NOESY realizado a dicho compuesto.

El análisis del espectro NOESY del compuesto SO-I-21B19, mostró correlaciones en la zona correspondiente a la absorción de grupos metilos; se observó que la señal a 0.96 ppm (Me-16) muestra una correlación con un singlete que integra para tres protones a 1.40 ppm (Me-17), con dos multipletes a 1.81 (H-3b) y 3.79 ppm (H-11). La señal correspondiente al Me-17 (1.40 ppm) mostró correlaciones con los multipletes a 1.81 (H-3b), 2.73 (H-14), 3.79 (H-11) y 4.34 (H-1) ppm y con un doblete que integra para un protón a 4.57 ppm (H-7). Por último la señal a δ 1.43 (Me-19) mostró correlación con los multipletes a 2.73 (H-14) y 3.79 ppm (H-11) ppm. Debido a la ausencia de correlaciones entre las señales a 0.96 (Me-16), 1.40 (Me-17) y 1.43 ppm (Me-19) con la señal correspondiente al protón H-9 que aparece a δ 1.85, se puede concluir que esos grupos metilos se disponen en posición beta con relación a dicho protón en la molécula. Así mismo, en este espectro NOESY del compuesto SO-I-21B19, se encontró que el protón H-9 mostró correlación con señales correspondientes a los protones H-6a, H-12 y H-18b que aparecen a 1.42, 3.17 y 4.58 ppm, respectivamente. Otras correlaciones importantes encontradas en el espectro NOESY son las correspondientes a la señal que integra para un protón a 2.73 ppm (H-14), con los protones Me-17 (1.40 ppm), Me-19 (1.43 ppm), H-18a (3.54 ppm) y H-11 (3.79 ppm). Esto sin lugar a dudas, nos permite sugerir la estructura que aparece en la (figura 1) para el compuesto SO-I-21B19. El espectro de masas de impacto electrónico de baja resolución del compuesto SO-I-21B19, mostró un pico a *m/z* 350, sugiriendo la

pérdida de una molécula de agua a partir de las posiciones C-1 y C-2 de la estructura propuesta para el ión molecular esperado para este compuesto (368 uma); otros fragmentos en el espectro a m/z 332, 173, 105, y 69, fueron característicos de compuestos quassinoides del tipo cedronolactonas previamente reportados en la literatura (Ozeki *et*

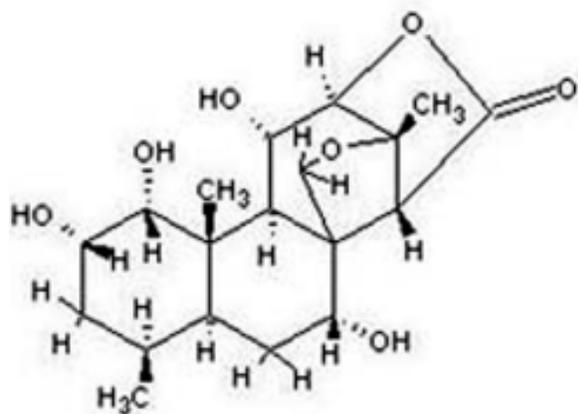
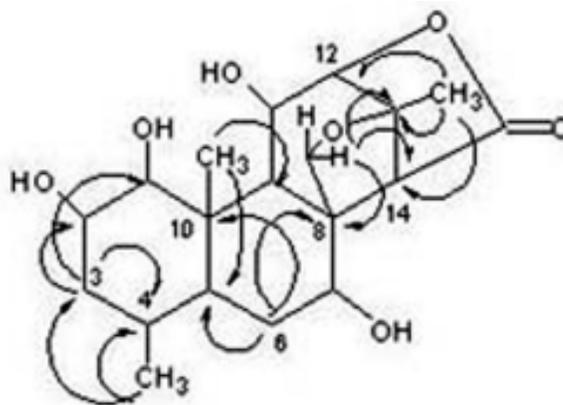


Figura 1. Estructura propuesta para el compuesto SO-I-21B19 (corresponde a la fórmula molecular $C_{19}H_{29}O_7$).

al., 1998; Hitotsuyanagi *et al.*, 2001). En el espectro de masas de alta resolución, se encontraron picos a m/z 369, 19078 y 391.1770, atribuidos al ión molecular más una unidad (M+H) y más 23 unidades (M+Na), lo cual permitió confirmar que la estructura propuesta (figura 1) para el compuesto SO-I-21B19 corresponde a la fórmula molecular $C_{19}H_{29}O_7$.



AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo agradecen su colaboración a Laboratorios Román S. A., por su soporte financiero y suministro de las semillas de *Simaba cedron*, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Cartagena (Colom-

bia) y al Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAM) de la Universidad de Panamá (Panamá), por el uso de sus instalaciones para el desarrollo exitoso de este trabajo y al Dr. Arturo San Feliciano de la Universidad de Salamanca (España), por la realización de los experimentos.

REFERENCIAS

- Arisawa M, Kinghorn AD, Cordell GA, Farnsworth NR.** 1983. Plant anticancer agents, XXIII, 6-á-seneciolyoxychaparrin, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. *Journal of the Natural Products*, 46:218-221.
- Arisawa M, Kinghorn AD, Cordell GA, Farnsworth NR.** 1983. Plant anticancer agent XXIV, alkaloid constituents of *Simaba multiflora*. *Journal of the Natural Products*, 46:222-225.
- Burkert U, Allinger N.** 1982. *Molecular Mechanics*. ACS Monograph 177. American Chemical Society. Washington, D. C.
- Clarke J.** 2000. *Materia Medica*. Ed. Medi-T.
- García-BH.** 1992. *Flora Medicinal de Colombia*. Tomo I. Ed. Tercer Mundo. Colombia.
- Handa SS, Kinghorn AD, Cordell GA, Farnsworth NR.** 1981. Plant anticancer agent XXV. Constituents of *Saulamea soulameoides*. *Journal of the Natural Products*, 46:359-364.
- Hitotsuyanagi Y, Ozeki A, Itokawa H, de Mello Alves S, Takeya K.** 2001. Cedronolactone E, a novel C_{19} quassinoid from *Simaba cedro*. *Journal of the Natural Products*, 46:1583-1584.
- Moretti C, Bhatnagar S, Beloeil JC, Polonsky J.** 1986. Two new quassinoids from *Simaba multiflora*

fruits. *Journal of the Natural Products*, 49:440-444.

Ozeki A, Hitotsuyanagui Y, Hashimoto E, Itokawa H, Takeya K, de Mello Alves S. 1998. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. *Journal of the Natural Products*, 61:776-780.

Polonsky J. 1973. Quassinoid bitter principles. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, 30:102-150.

Rappé C, Casewit C. 1997. *Mechanics across chemistry*. University Science Books, Sulito.