

ALCALOIDES BENZOFENANTRIDINICOS DE *ZANTHOXYLUM QUINDUENSIS*

BENZOPHENANTHRIDINE ALKALOIDS FROM *ZANTHOXYLUM QUINDUENSIS*

Oscar J. Patiño-Ladino^{1,2}, Luis E. Cuca-Suárez^{1,3}

Resumen

Un nuevo alcaloide benzofenantridínico, llamado 8-hidroxi-2,3-metilenodioxi-9-metoxibenzofenantridina, ha sido aislado de la corteza de *Zanthoxylum quinduensis*, junto con otros compuestos conocidos tales como norchelerytrina, N-nornitidina, arnottianamida y lupeol. Sus estructuras fueron elucidadas por análisis detallado de espectros RMN, incluyendo técnicas bidimensionales, por comparación con muestras auténticas y datos de la literatura.

Palabras clave: 8-hidroxi-2,3-metilenodioxi-9-metoxibenzofenantridina, alcaloides, benzofenantridínicos, Rutaceae, *Zanthoxylum quinduensis*.

Abstract

A novel benzophenanthridine alkaloid, named 8-hydroxy-2,3-methylenedioxy-9-methoxybenzophenanthridine, was isolated from the bark of *Zanthoxylum quinduensis*, together with other known compounds such as norchelerytrine, N-nornitidine, arnottianamide, and lupeol. Their structures were elucidated by detailed analysis of NMR spectra, including 2D techniques and comparison with authentic samples and literature data.

Key words: 8-hydroxy-2,3-methylenedioxy-9-methoxybenzophenanthridine, alkaloids, benzophenanthridine, Rutaceae, *Zanthoxylum quinduensis*.

INTRODUCCIÓN

El género *Zanthoxylum* comprende unas 200 especies distribuidas a nivel mundial, especialmente en zonas pantropicales (Waterman, 1973). En Colombia, se encuentran reportadas hasta el momento 21 especies, repartidas en 23 de los 32 departamentos que conforman el territorio colombiano, siendo uno de los géneros con mayor distribución en el país (Angulo y Cuca, 2002).

Plantas de este género son muy empleados en la medicina tradicional, especialmente en Asia, África y América. La corteza de *Z. integrifoliolum* es utilizada en la medicina folklórica por aborígenes de la tribu Ya-Mei en la isla Lanyu de Taiwán, como un remedio para la mordedura de serpiente y dispepsia; y como un tónico aromático para la fiebre (Ross et al., 2004). En África, la corteza y hojas de *Z. xanthoxyloides* son muy usadas contra la tos, fiebre, dolor de muela y mordedura de serpientes

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. A. A. 14490. Bogotá, Colombia.

² Correo electrónico: <ojpatinol@unal.edu.co>.

³ Correo electrónico: <lecucas@unal.edu.co>.

(Ngassoum et al., 2003). La corteza de *Z. liebmannianum* es utilizado en la medicina tradicional mexicana, para el tratamiento de dolores estomacales, amebiasis, parásitos intestinales y como un analgésico local (Ross et al., 2004).

Sus especies y compuestos aislados de ellas, son importantes para el tratamiento de una gran variedad de desordenes causados por enfermedades humanas, pues presentan actividad biológica como antimicrobial (Ngassoum et al., 2003), antibacterial (Tatsadjieu et al., 2003; Matu y Staden, 2003), antifúngica (Tatsadjieu et al., 2003), antiinflamatoria (Matu y Staden, 2003), antiplasmódica (Ross et al., 2004), antitumoral (Sukari et al., 1999), y por sus efectos citotóxicos (Islam et al., 2001), entre otros.

Los alcaloides benzofenantridínicos son el tipo de alcaloides más reportados en el género y son de gran interés debido a que presentan actividades farmacológicas y fisiológicas como anticáncer, antiviral, antileucémica, antifúngica, efectos citotóxicos y cardiovasculares, entre otros (Sukari et al., 1999; Krane et al., 1984 y Addae-Mesah et al., 1989). También alcaloides quinolínicos (De Moura et al., 2002 y Diehl et al., 2000), lignanos furofuránicos (Chen et al., 1999 y Cuca et al., 1998), y dibencilbutirolactónicos (Cuca et al., 1999 y Adesina et al., 1997), amidas alifáticas (Adesina et al., 1997 y Chen et al., 1999) y aromáticas (Ross et al., 2004 y De Moura et al., 2002), son muy comunes y de gran importancia quimiotaxonómica para el género *Zanthoxylum* (Waterman y Grundon, 1983).

En este artículo se reporta el aislamiento y caracterización de un nuevo alcaloide benzofenantridínico, 8-hidroxi-2,3-metilenodioxi-9-metoxibenzofenantridina **1** y también el primer reporte en *Z. quinduensis* de alcaloides de este tipo como norqueletrina **2**, N-nornitidina **3**, arnottianamida **4** y un triterpeno, lupeol **5**. El aislamiento de este tipo de metabolitos es de gran importancia quimiotaxonómica para el género.

MATERIALES Y MÉTODOS

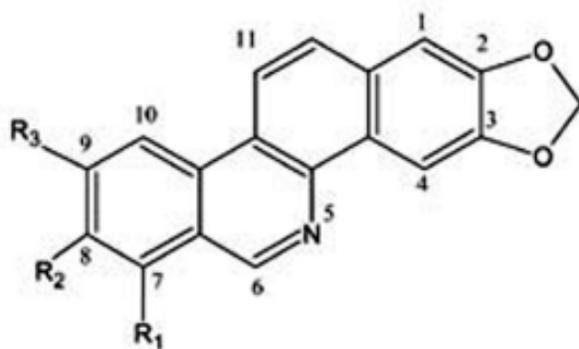
Los puntos fusión se tomaron en un fusiómetro MEL-TEMP. Los espectros IR se tomaron en película de KBr en un equipo Perkin Elmer FTIR panagon 500 serie 1000; los espectros RMN de ^1H y ^{13}C , junto con espectros en 2D (COSY, DEPT, HMQC, HMBC) son registrados en un equipo Bruker space 400, operando a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C , usando TMS como estándar interno; CC: sílica gel 60: sílica gel (kieselgel 60, Merck). CCF y CCFP (1mm de espesor): sílica gel 60 HF₂₅₄ (Merck). Las placas de CCF fueron visualizadas con luz UV, Reactivo de Liebermann-Burchard, reactivo de Dragendorff y expuestas a vapores de I_2 .

Material Vegetal. Una muestra de corteza de *Z. quinduensis* fue colectada en el municipio de Albán (Cundinamarca), Colombia, en enero del 2003 por el biólogo Olimpo García. Un espécimen reposa en el Herbario Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Extracción y aislamiento. La corteza seca y molida (670 g) fue sometida a extracción por percolación con isopropanol. Del residuo viscoso obtenido (15,5 g), se tomo una fracción de 12 g que se sometió a CC (sílica gel; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -EtOAc, en polaridad creciente), y se obtuvieron 25 fracciones. De la fracción 7, (1.080 mg), mediante lavados con acetona se obtuvo el compuesto **5** (670 mg). La fracción 8 y 9 (554 mg) se le sometió a CC sucesivas (sílica gel; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -EtOAc en polaridad creciente 95:5 a 7:3; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -(C_2H_5)₂O 9:1), luego una CCFP (sílica gel: $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -EtOAc 95:5) para obtener el compuesto **2** (6 mg). La fracción 13 y 14 (402 mg) fue sometida a CC repetitiva (sílica gel; CHCl_3 -MeOH 98:2) y dio como resultado la purificación de **3** (5 mg). A las fracciones 15-19 (868 mg) se les realizo CC sucesivas (sílica gel; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -EtOAc 7:3; $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ -MeOH 95:5; CH_2Cl_2 -MeOH 98:2), CCFP (sílica gel; CH_2Cl_2 -MeOH 98:2) para obtener así los compuestos **1** (3,5 mg) y **4** (7,4 mg).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del extracto isopropanólico de corteza de *Z. quin-duensis* fueron aislados e identificados cinco compuestos, cuatro alcaloides benzofenantridínicos y un triterpeno. De los cuatro alcaloides, tres de ellos han sido aislados en otras especies del género *Zanthoxylum* (Krane *et al.*, 1984), los cuales fueron caracterizados por métodos espectroscópicos como IR, RMN incluyendo técnicas bidimensionales, y comparación con los datos de la literatura; así fueron identificados norqueleritrina **2**, N-noritidina **3** y arnottianamida **4** (figura 1).



1: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = OCH₃

2: R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, R₃ = H

3: R₁ = H, R₂ = OCH₃, R₃ = OCH₃

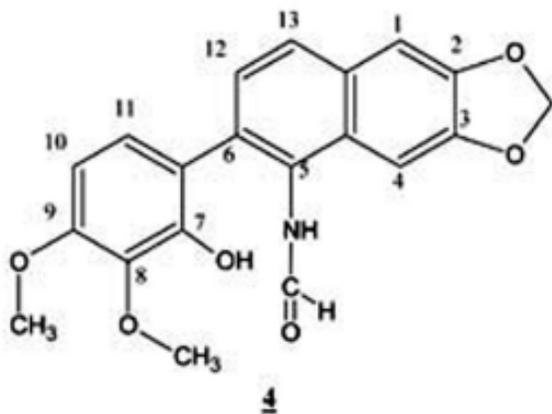


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados

La sustancia **5** es un sólido blanco con punto de fusión 113-115 °C (acetona), fue identificado como el triterpeno Lupeol de acuerdo al análisis de los datos espectroscópicos de RMN¹H, de la comparación con los datos de la literatura (Angulo, 2001) y por cocromatografía con una muestra auténtica. Este compuesto es muy común en el género *Zanthoxylum* en especies como *Z. setulosum* (Angulo y Cuca, 2002), *Z. culantrillo* (Cuca *et al.*, 1998) y *Z. monophyllum* (Cuca *et al.*, 1999), entre otros.

El nuevo compuesto **1**, es un sólido de color amarillo, con punto de fusión 220-223 °C, da prueba positiva al ensayo de Dragendorff en placa. Su espectro IR tomado en película muestra una banda ancha centrada en 3.411 cm⁻¹, típica de tensión O-H fenólico, que se corrobora con una señal hacia 1.260 cm⁻¹, debida a la tensión C-O; en 2.925 cm⁻¹ y 2.855 cm⁻¹, aparecen bandas de estiramiento C-H alifático; se observan en 1.666 cm⁻¹, 1.602 cm⁻¹, 1.498 cm⁻¹ y 1.463 cm⁻¹, señales agudas e intensas, características de la tensión C=C para compuestos aromáticos (Silverstein, 1991).

El análisis de RMN¹H, permite establecer la presencia de 13 protones, se destacan las señales en δ 4,12 (s, 3H), característica de protones de un grupo metóxilo sobre anillo aromático; una señal en δ 6,14 (s, 2H), típica de los protones de un grupo metilenodioxi; se observa a campo bajo en δ 8,28 (d, J = 9,2 Hz, 1H) y δ 7,83 (d, J = 8,8 Hz, 1H) señales de dos protones en posición orto sobre un anillo aromático tetrasustituido, lo que es corroborado por el espectro ¹H-¹H COSY, en donde se observa la correlación a través de los enlaces para las señales de estos dos protones. Otras señales presentes en la región aromática del espectro RMN¹H son δ 9,22 (s, 1H), δ 8,68 (s, 1H), δ 8,05 (s, 1H), δ 7,48 (s, 1H) y δ 7,27 (s, 1H), que por multiplicidad y desplazamiento sugieren que se deben a protones aislados y/o en posición 1,4 sobre anillos aromáticos. Aparece además una señal hacia δ 5,37 (s, 1H) que se debe al protón del grupo -OH fenólico, que confirma lo observado en IR (Silverstein, 1991).

Los espectros RMN¹³C, junto con los del experimento DEPT, muestran señales para un total de 19 carbonos, de los cuales diez son carbonos cuaternarios aromáticos con desplazamiento a 150,0, a 147,9, a 147,8, a 147,8, a 140,0, a 129,2, a 128,9, a 128,6, a 127,6 y a 119,4; los cuatro primeros son de carbonos aromáticos oxigenados. Siete carbonos son aromáticos de tipo metínico: a

149,3, a 125,9, a 118,1, a 106,8, a 105,1, a 103,9 y a 101,6; de los cuales la primera señal por su desplazamiento indica que este carbono debe estar unido a un nitrógeno. También se observa una señal en a 100,9, característica del carbono de un grupo metilenodioxi y en a 55,59, señal correspondiente al carbono de un grupo metóxilo (Silverstein, 1991). Todos los datos de RMN se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de RMN ¹H Y ¹³C del compuesto 1. CDCl₃ y (CD₃)₂CO

C	¹ H (ppm)	MULT	J (Hz)	¹³ C (ppm)	DEPT	HMQC	HMBC
1	7,27	s	-	103,9	CH	103,9	106,8; 125,9; 128,6; 147,8
2	-	-	-	147,8	C	-	-
3	-	-	-	147,8	C	-	-
4	8,68	s	-	101,6	CH	101,6	129,2; 147,8
4a	-	-	-	129,2	C	-	-
4b	-	-	-	140,0	C	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	9,22	s	-	149,3	CH	149,3	106,8; 121,6; 128,9; 140,0
6a	-	-	-	128,9	C	-	-
7	8,05	s	-	105,1	CH	105,1	119,4; 121,6; 147,9; 150,0
8	-	-	-	150,0	C	-	-
9	-	-	-	147,9	C	-	-
10	7,48	s	-	106,8	CH	106,8	128,9; 147,9; 150,0
10a	-	-	-	121,6	C	-	-
10b	-	-	-	119,4	C	-	-
11	8,28	d	9,2	118,1	CH	118,1	129,2; 140,0
12	7,83	d	8,8	125,9	CH	125,9	103,9; 119,4; 128,6
12a	-	-	-	128,6	C	-	-
OCH₂O	6,14	s	-	100,9	CH ₂	100,9	147,8
OCH₃	4,12	s	-	55,6	CH ₃	55,6	147,9
OH	5,37	s	-	-	-	-	-

Lo analizado hasta el momento, permite decir que el compuesto **1** contiene 19 carbonos, 13 hidrógenos, 4 oxígenos y 1 nitrógeno; lo que permite proponer la fórmula condensada C₁₉H₁₃O₄N, que tiene un IDH de 13. La sustancia **1** está formada por 4 anillos aromáticos fusionados en donde el nitrógeno hace parte del sistema aromático y donde los

grupos -OCH₃, -OCH₂O- y -OH, están como sustituyentes. Del análisis de las posibles estructuras, de acuerdo a los datos espectroscópicos vistos hasta el momento y en comparación con las sustancias aisladas en el género *Zanthoxylum* (Krane et al., 1984), se llega a la conclusión, de que el compuesto **1** presenta el núcleo de un alcaloide benzofenantridínico.

Del experimento HMQC, se tiene la conectividad exacta de cada hidrógeno sobre el carbono al cual esta unido, siendo una correlación importante la del protón en δ 9,22 (s, 1H), con el carbono δ 148,3, que por el gran desplazamiento mostrado en RMN de ^1H y ^{13}C , sugiere que el carbono debe estar unido al nitrógeno y por lo tanto corresponde al de la posición 6, lo que concuerda con lo reportado en la literatura para el desplazamiento del protón en esta posición para alcaloides de este tipo (Krane *et al.*, 1984; Addae-Mesah *et al.*, 1989). Otra correlación que se destaca es la del protón δ 8,68 (s, 1H) con el carbono en δ 101,6, cuyo protón también se encuentra afectado por la electronegatividad del nitrógeno y según comparaciones con la literatura corresponde al protón en la posición 4 (Krane *et al.*, 1984). Las demás conectividades para cada hidrógeno con su respectivo carbono se resumen en la tabla 1.

En HMBC se destacan las correlaciones a larga distancia de los protones los grupos $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{O}-$ con los carbonos al cual están unidos dichos grupo. Otra correlación importante es la del hidrógeno en posición 4 δ 8,68 (s, 1H) con el carbono en δ 147,8, el cual es uno de los carbonos donde esta unido el grupo metilendioxi, por lo que en la posición 2 y 3 del núcleo benzofenantridínico debe estar el grupo $-\text{OCH}_2\text{O}-$.

Entonces de acuerdo a las multiplicidades observadas en RMN ^1H , el grupo $-\text{OCH}_3$ y $-\text{OH}$, deben ubicarse en las posiciones 8 y 9; para la correcta

asignación de estos grupos son importantes las conectividades a larga distancia de los protones en posición 7 y 10. En lo que respecta el protón en 7, su desplazamiento químico exacto es dado por $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY, que muestra una correlación a través de los enlaces del protón en posición 6, δ 9,22 (s, 1H) y el protón en 7, δ 8,05 (s, 1H). En HMBC, se observan las correlaciones entre el protón en 7, δ 8,05 (s, 1H), a dos y tres enlaces respectivamente con los carbonos δ 150,0 y δ 147,9; las del protón en δ 7,48 (s, 1H) a dos y tres enlaces con los carbonos en δ 147,9 y δ 150,0; con esto se ubica el grupo $-\text{OH}$ en la posición 8 y el grupo $-\text{OCH}_3$ en 9. Las demás correlaciones a larga distancia se muestran en la tabla 1.

De esta forma el compuesto **1** corresponde al 8-hidroxi-2,3-metilenodioxi-9-metoxibenzofenantridina, del cual no se han encontrado reportes en la literatura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Departamento de Química y el Grupo de Investigación de Productos Naturales Vegetales, Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá (Colombia). Agradecemos al laboratorio de RMN de la Universidad Nacional de Colombia por la toma de los espectros y al biólogo Olimpo García por la recolección de la muestra.

REFERENCIAS

- Addae-Mesah I, Munenge R, Guantai AN.** 1989. Comparative examination of two *Zanthoxylum* benzophenanthridine alkaloids for fardiovascular effects in rabbits. *Phytotherapy Research*, 3:165-169.
- Adesina SK, Olugbade TA, Akinwusi DD, Von Willert DJ.** 1997. New Amides from *Zanthoxylum lemairie* Pericarps. *Planta Médica*, 63:286-287.
- Angulo AA, Cuca LE.** 2002. Nuevo esteroles y otros constituyentes de *Zanthoxylum setulosum*. *Revista Colombiana de Química*, 3:87-92.
- Angulo AA.** 2001. Estudio fitoquímico de *Zanthoxylum setulosum* (Rutaceae). Tesis de Magíster, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Chen I-S, Chen T-L, Chang Y-L, Teng C-M, Lin W-Y.** 1999. Chemical Constituents and Biological Activities of the Fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Journal of Natural Products*, 62:833-837.
- Chen I-S, Chen T-L, Lin W-Y, Tsai I-L, Chen Y-C.** 1999. Isobutylamides from the Fruit of *Zanthoxylum integrifoliolum*. *Phytochemistry*, 52:357-360.

- Cuca LE, Martínez JC, Monache FD.** 1998. 7, 9'-Epoxy lignan and other constituents of *Zanthoxylum culantrillo*. *Phytochemistry*, 47:1437-1439.
- Cuca LE, Martínez JC, Monache FD.** 1999. Constituyentes químicos de *Zanthoxylum monophyllum*. *Revista Colombiana de Química*, 27:1-11.
- De Moura NF, Morel AF, Dessoy EC, Zanatta N, Bürger MM, Ahlert N, Porto GP, Baldisserotto B.** 2002. Alkaloids, amides and antispasmodic activity of *Zanthoxylum hyemale*. *Planta Médica*, 68:534-538.
- Diehl EE, Lino G, Henriques AT.** 2000. Constituents of *Zanthoxylum rugosum* St.-Hil & Tul. *Biochemical Systematic and Ecology*, 28:275-277.
- Islam A, Sayeed A, Bhuiyan MSA, Mosaddik MA, Islam MAU, Khan GRM.** 2001. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. *Fitoterapia*, 72:428-430.
- Krane BD, Fagbule MO, Shamma M.** 1984. The benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 47:1-43.
- Matu EN, Staden J.** 2003. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:35-41.
- Ngassoum MB, Essia-Ngang JJ, Tatsadjieu LN, Jirovetz L, Buchbauer G, Adjoudji O.** 2003. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia*, 74:284-287.
- Ross SA, Sultana GN, Burandt CL, ElSohly MA, Marais JP, Ferreira D.** 2004. Syncarpamide, a new antiplasmodial (+)-Norepinephrine derivative from *Zanthoxylum syncarpum*. *Journal of Natural Products*, 67:88-90.
- Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC.** 1991. Spectrometric identification of organic compounds. Fifth edition, John Wiley & Sons, Inc., London.
- Sukari MA, Salim WSW, Ibrahim NH, Rahmani M.** 1999. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. *Fitoterapia*, 70:197-199.
- Tatsadjieu LN, Ngang JJ, Ngssoum MB, Etoa F-X.** 2003. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides*, and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. *Fitoterapia*, 74:469-472.
- Waterman PG.** 1973. New combination in *Zanthoxylum* L. *Taxon*, 24:361-363.
- Waterman PG, Grundon MF.** 1983. Chemistry and chemical taxonomy of the rutales. Academic Press, London.
- Tsai I-L, Lin W-Y, Teng C-M, Ishikawa T, Doong SL, Huang M-W, Chen Y-C, Chen I-S.** 2000. Coumarins and antiplatelet constituents from the root bark of *Zanthoxylum schinifolium*. *Planta Médica*, 66:618-623.