

ESPECTROSCOPIA RMN COMO HERRAMIENTA EN LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COUMARINAS 3(1', 1'-DIMETILALIL) SUSTITUIDAS AISLADAS DE *ESEMBECKIA ALATA* (KARST & TRIANA) TR. & PL. (RUTACEAE)

RMN SPECTROSCOPY AS TOOL IN STRUCTURAL ELUCIDATION OF SUBSTITUTED COUMARINS 3(1', 1'-DIMETHYLALLYL) ISOLATED FROM *ESEMBECKIA ALATA* (KARST & TRIANA) TR. & PL. (RUTACEAE)

Olimpo J. García-Beltrán^{1,2}, Luis E. Cuca-Suárez^{1,3}

Resumen

De las hojas y corteza de *Esembeckia alata* se identificaron dos coumarinas 3(1',1'-dimetilalil) sustituidas; sus estructuras se elucidaron utilizando 1D y 2D RMN (COSY H-H, JMOD, DEPT, HMQC Y HMBC).

Abstract

From leaves and bark of *Esembeckia alata* two rare substituted coumarins 3(1',1'-dimethylallyl) were identified; their structures were elucidated using 1D and 2D RMN (COSY H-H, JMOD, DEPT, HMQC Y HMBC).

Palabras clave. Coumarinas 3(1',1'-dimetilalil), *Esembeckia alata*, Rutaceae, RMN

Key words: Coumarins 3(1',1'-dimethylallyl), *Esembeckia alata*, Rutaceae, Rutacultin, NMR

INTRODUCCIÓN

El género *Esembeckia* incluye 38 especies de árboles y arbustos distribuido en el neotrópico (Gentry, 1993), el estudio realizado en este género ha sido muy limitado. De *E. alata* se han aislado e identificado lignanos, furanocoumarinas, cromanonas, amidas alifáticas, esteroides y coumarinas 3-(1',1'-dimetilalil) sustituidas (García y Cuca, 2004). En este trabajo se analiza el empleo de la resonancia magnética nuclear para elucidar la estructura de estas últimas sustancias, habida cuenta de la complejidad estructural de este sustituyente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se tomaron en un equipo de 300 MHz o de 600 MHz, CDCl₃, TMS como referencia interna.

Material vegetal. *Esembeckia alata* (Karst & Triana) Tr. & Pl. (Rutaceae) fue colectada en el noroccidente de Colosó (Sucre), Colombia, e identificada por los biólogos Zaleth Cordero y Olimpo García del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, voucher COL 481090.

¹ Laboratorio de Productos Naturales Vegetales, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Correos electrónicos: ² <ojgarciab@unal.edu.co>; ³ <leluca@unal.edu.co>.

Extracción y fraccionamiento. Hojas de *E. alata* (2.411 g) fueron secadas a temperatura ambiente, se sometieron a extracción por maceración en frío con EtOH al 96%, obteniéndose 370,5 g de extracto seco. A este material seco se le realizó un fraccionamiento utilizando solventes de polaridad creciente, obteniéndose 97,2 g secos de la fracción en éter de petróleo. Posteriormente, se le realizó un estudio por CCD y CC repetitiva utilizando como sistema de elusión éter de petróleo, acetato de etilo, obteniéndose la sustancia (**1**) (55 mg).

Por el método de maceración en frío con EtOH al 96 % fueron sometidos a extracción 1757,9 g de corteza de *E. alata* secados a temperatura ambiente, resultando 96 g de extracto seco, 90 g. extracto fueron fraccionados con solventes de polaridad creciente, de la fracción con éter de petróleo se obtuvieron 25 g, monitoreados CCD y purificados por CC repetitivas como sistema de elusión éter de petróleo: acetato de etilo, obteniéndose la sustancia (**2**) (16 mg).

Características espectroscópicas de las sustancias.

Sustancia 1. RMN ¹H (CDCl₃): 300 MHz: d 7.5 (s, 1H, H-4), d 6.83 (s, 1H, H-5), d 6.8 (s, 1H, H-8), d 3.88 (s, 3H, H-1'), d 3.9 (s, 3H, H-2'), d 6.15 (dd, J = 17.8, 10.3 Hz, 1H, H-2''), d 5.04 (d, J = 10.4 Hz, 1H, H-3''), d 5.08 (d, J = 2.9 Hz, 1H, H-3''), d 1.45 (s, 6H, H-4'').

RMN ¹³C (CDCl₃): 75 MHz: C2 (d 160), C3 (d 132), C4 (d 137.6), C5 (d 107), C6 (d 148.9), C7 (d 146), C8 (d 99.2), C9 (d 151.9), C10 (d 111.6), C1' (d 56.2), C2' (d 56.2), C1'' (d 40.3), C2'' (d 145.4), C3'' (d 112), C4'' (d 25)

Sustancia 2. RMN ¹H (CDCl₃): 300 MHz: d 7.47 (s, 1H, H-4), d 7.1 (s, 1H, H-5), d 6.78 (s, 1H, H-8), d 4.4 (dd, J = 7.7, 2.2 Hz, 1H, H-2'), d 2.9 (dd, J = 7.3, 2.6 Hz, 1H, H-3'), d 2.95 (dd, J = 11.1, 7.0 Hz, 1H, H-3'), d 4.87 (s, 1H, H-5'), d

5.0 (s, 1H, H-5), d 1.8 (s, 3H, H-6'), d 6.15 (dd, J = 17.8, 10.3 Hz, 1H, H-2''), d 5.04 (d, J = 5.62 Hz, 1H, H-3''), d 5.08 (s, 1H, H-3''), d 1.5 (s, 6H, H-4'').

RMN ¹³C (CDCl₃): 75 MHz: C2 (d 160.9), C3 (d 131.7), C4 (d 138.2), C5 (d 130.3), C6 (d 123.4), C7 (d 159.3), C8 (d 104.1), C9 (d 154.4), C10 (d 113.0), C2' (d 78.0), C3' (d 38.0), C4' (d 146.4), C5' (d 111.8), C6' (d 18.6).

RESULTADOS

Sustancia 1. El espectro de RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃; TMS como referencia interna), muestra señales en la región alifática, vinílica y aromática, para un total de 18 protones. Este muestra una señal a d 1.45 (s, 6H), presencia de dos grupos metilos equivalentes, soportados sobre un carbono cuaternario.

A campo más bajo se encuentran dos señales en d 3.88 (s, 3H) y d 3.9 (s, 3H), por su tipo de multiplicidad y desplazamiento se trata de dos grupos metoxilo. Se observan además señales en d 5.04 (d, J = 5.6 Hz, 1H), d 5.08 (d, J = 1 Hz, 1H) y d 6.15 (dd, J = 17.8 y 10.3 Hz, 1H), característica de un sistema ABX unido a un carbono cuaternario (Ngadjui et al., 1989).

En la región aromática del espectro de RMN ¹H hay tres señales desplazadas a d 7.5 (s, 1H), d 6.83 (s, 1H) y d 6.8 (s, 1H), protones que se encuentran aislados en dos anillos (Ngadjui et al., 1989).

El espectro de RMN ¹³C muestra señales de cuatro carbonos aromáticos que presentan oxigenación desplazados a d 160.1, d 151.9, d 148.9 y d 146. El carbono en d 160.1 es señal característica de un carbonilo coumarinas (Crews et al., 1998), los tres carbonos oxigenados con desplazamiento d 151.9, d 148.9 y d 146 se encuentran sobre anillo aromático. La señal a d 7.5 (s, 1H), se asigna al H-4 del anillo a-pirona (Ngadjui et al., 1989), d 6.83 (s, 1H) y d 6.8 (s, 1H) se debe a protones aromáticos en posición *para* (Silverstein, 1996).

De acuerdo al experimento DEPT 135, se observan cuatro señales de carbonos metínicos d 145.4, d 137.6, d 107.8 y d 99.1, además de una señal de metileno exocíclico en d 112. Adicionalmente en d 56.2 aparecen dos señales asignadas a los dos metoxilos, el experimento DEPT 135 muestra señal a d 40.3 de un carbono cuaternario alifático que soporta dos grupos metilo que se desplazan en d 25.9 asignada a los dos metilos. De esta manera se elucidó la estructura para la sustancia A, conocida en la literatura como rutacultina (Steck *et al.*, 1971) (figura 1).

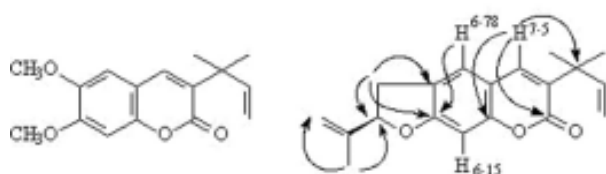


Figura 1. Coumarinas de *Esenbeckia alata*, rutacultina y exo-dehidrochalepina

Sustancia 2. El espectro de RMN ^1H muestra señales en la región alifática, vinílica y aromática, para un total de 20 protones. En d 1.5 (6H) hay una singlete correspondiente a un par de metilos que se encuentran unidos a un carbono cuaternario; así mismo en d 1.8 (3H) hay otro singlete que también debe estar unido a un carbono cuaternario, para un total de nueve hidrógenos.

A campo un poco más bajo se observan dos señales a d 2.9 (dd, $J = 2.6$ y 7.7 Hz, 1H) y d 2.95 (dd, $J = 4.1$ y 7.7 Hz, 1H), característica de protones diastereotópicos de un metileno y que se encuentran acopladas con la señal de d 4.4 (dd, $J = 2.2$ y 7.7 Hz, 1H), según se deduce del espectro COSY ^1H - ^1H .

En d 4.87 (s, 1H) y d 5.0 (s, 1H) se encuentran dos singletes de un sistema vinílico AB que integran cada una para un protón, y que corresponden a un metileno exocíclico (Garg *et al.*, 1978). Las señales en d 5.04 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), d 5.08 (s, 1H) y d 6.15 (dd, $J = 17.8, 10.35$ Hz, 1H) corresponden a un sistema ABX unido a un carbono cuaternario, de acuerdo

al experimento COSY. A campo bajo se observan otras tres señales en la región aromática a d 7.5 (s, 1H), d 6.83 (s, 1H) y d 6.8 (s, 1H). Estos protones se encuentran aislados, lo que implica que se encuentran en anillos diferentes en la molécula (Ngadjui *et al.*, 1989). La multiplicidad de los protones en la región aromática se explica debido a la sustitución del anillo piránico, apareciendo una señal a d 7.5 (s, 1H) asignado a H-4 del anillo coumarico; los desplazamientos d 6.83 (s, 1H) y d 6.8 (s, 1H), se debe a los protones en posición *para* H-5 y H-8 en el anillo aromático.

El espectro de RMN ^{13}C , experimento JMOD, muestra un total de 19 carbonos; cuando se compara con el experimento DEPT 135 se diferencian fácilmente los tipos de carbono que tiene la molécula: 8 carbonos cuaternarios, 5 metinos, 3 metilenos y 3 metilos. Uno de los carbonos cuaternarios, desplazado en d 160.9, es característico de un carbonilo de coumarina; otros dos son oxigenados (d 159.3 y d 154.4).

En la región aromática del experimento DEPT 135, se observan carbonos cuaternarios no oxigenados en d 146.4, d 131.7, d 123.4 y d 113, además de metinos en d 146, d 130.3, d 130.2 y d 104.4 y dos metilenos vinílicos en d 112 y d 111.4 de. En la región alifática se observa un metino oxigenado en d 78.0 y en d 40.7 un carbono cuaternario, además de un metileno en d 38.0 y metilos en d 26.55, d 26.53 y 18.6.

El experimento HMQC, presenta conectividades de los protones del singlete en d 1.5 (6H) con los carbonos de d 26.55 y d 26.53, como también los protones del metilo d 1.8 con el carbono de d 18.6. Se determinaron igualmente las conectividades de los protones en d 2.90 y d 2.95 con el carbono d 38.0 De esta manera se confirmó que los protones son diastereotópicos y según el análisis del espectro de RMN ^1H se encuentran acoplados con el protón desplazado a d 4.4 el cual esta unido a un carbono metínico oxigenado d 78.0 de acuerdo al HMQC.

Al analizar el espectro HMBC (figura 1), se distinguen las conectividades a larga distancia del protón δ 1.8 con los carbonos δ 78.0, δ 111.8, δ 146.4. De igual manera los protones en δ 2.90 y δ 2.95 del metileno se encuentran conectados a larga distancia con los carbonos δ 78, δ 123.4, δ 130.3 y 159.3; también el protón de δ 6.78 correlaciona con los carbonos en δ 113, δ 123.4, δ 154.4 y δ 159.3. Se observa las conectividades a tres enlaces del protón en δ 7.5 con los carbonos δ 40.7, δ 130.3, δ 154.4 y δ 160.9, determinando así que este se encuentra en la posición C-4 de la molécula. De esta manera se elucida la estructura de la

sustancia (**2**), conocida con el nombre de exo-dehidrochalepina, aislada de *Ruta graveolens* (Reisch y Podpetschnig, 1988).

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación en Productos Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), Colombia. Al Prof. Winston Quiñones de la Universidad de Antioquia (Medellín), Colombia, y a Patricia Alba de la Fundación Instituto de Inmunología.

REFERENCIAS

- Crews P, Rodríguez J, Jaspere M.** 1998. *Organic Structural Analysis*. Oxford University Press. Oxford.
- García OJ.** 2004. Estudio fitoquímico de los extractos etanólicos de hojas corteza y madera de *Esenbeckia alata* (Rutaceae), evaluación de actividades biológicas y etnobotánica de cinco familias de Montes de María. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C., Colombia.
- Garg S, Gupta S, Sharma N.** 1978. Apiumetin a new furanocoumarin from the seeds of *Apuim graveolens*. *Phytochemistry*, 17:2135-2136.
- Gentry W.** 1993. Plantas maderables del noroeste de Suramérica. Conservación Internacional. Washington D. C.
- Ngadjui B, Ayafor J, Sondengam B, Connolly J.** 1989. Coumarins from *Clausena anisata*. *Phytochemistry*, 28:585-589.
- Reisch J, Podpetschnig E.** 1988. Exo-dehydrochalepin the roots the *Ruta graveolens*. *Sci. Phar.* 56:171.
- Silverstein RM, Bassier GC, Morrill TC.** 1996. *Identificación Espectrométrica de Compuestos orgánicos*. Jhon Wiley Pub. California.
- Steck W, Bailey R, Shyluk J, Gamborg O.** 1971. Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 10:191-194.