

Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth.

(Study of the chemical compounds of the leaves and stems of *Cestrum buxifolium* Kunth)

Carlos Ciangherotti, Diolimar Buitrago y Antonio Morales

Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes.
Mérida-Venezuela. E-mail: diolbui@ula.ve

RESUMEN

Las partes aéreas, hojas y tallos, del *Cestrum buxifolium* Kunth., se extrajeron por separado con alcohol isopropílico en un soxhlet. Los extractos alcohólicos concentrados fueron sometidos a cromatografía en columna al vacío, usando como solvente inicial *n*-hexano y luego mezclas de acetato de etilo y metanol en polaridad creciente. De las fracciones eluidas con *n*-hexano:acetato de etilo (70:30) del extracto alcohólico de las hojas se aisló el ácido 3-*a*-hidroxi-12-ursen-28-oico (ácido epiursólico, sólido **1**). Del extracto alcohólico de los tallos, se separó de las fracciones eluidas con *n*-hexano:acetato de etilo (90:10) la 3-friedelanona (friedelina, sólido **2**). Ambos compuestos aislados por primera vez de una especie del género *Cestrum*.

PALABRAS CLAVES

Solanaceae, *Cestrum buxifolium*, triterpenes.

ABSTRACT

Leaves and stems, from *Cestrum buxifolium* Kunth, were extracted separately with isopropilic alcohol in a soxhlet. The concentrated extracts were submitted to vacuum chromatography, using *n*-hexane as a initial solvent and then mixtures of ethyl acetate and methanol in increasing polarity. The leave extracts yielded fractions containing 3-*a*-hydroxy-12-ursen-28-oic acid (epiursolic acid, **1**) upon elution with *n*-hexane:ethyl acetate (70:30). From the stem alcoholic extracts, fractions eluted with *n*-hexane:ethyl acetate (90:10), friedelan-3-one (friedelin, **2**) was isolated. This is the first time that both compounds have been isolated from a species of *Cestrum*.

KEYWORDS

Solanaceae, *Cestrum buxifolium*, triterpenes.

AGRADECIMIENTO

Al Prof. Pablo Meléndez por su colaboración en la identificación del material botánico, al Prof. Alí Bahsas por su valiosa ayuda en la realización de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y al Prof. Alfredo Usubillaga, por su ayuda en la realización de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

INTRODUCCIÓN

El género *Cestrum* L, pertenece a la familia Solanaceae, dividida en dos subfamilias: Solanoideae formada por 7 tribus, 36 géneros y cerca de 1400 especies y Cestroideae formada por 5 tribus, 24 géneros y aproximadamente 413 especies (Hunziker, 1976). En Venezuela este género está representado por 32 especies distribuidas en los estados: Amazonas, Apure, Barinas, Táchira, Aragua, Bolívar, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Portuguesa, Sucre, Nueva Esparta, Trujillo, Distrito Capital, Zulia, Carabobo, Cojedes, Monagas, Yaracuy y Miranda (Benitez y William, 1998). Algunas especies de *Cestrum* L., son interesantes desde el punto de vista químico, caracterizándose por presentar compuestos fenólicos, sapogeninas esteroidales, monoterpénos, sesquiterpenos, triterpenos y otros metabolitos secundarios (Catalán y Tomasini, 1992; Buchbaver y Jirovetz, 1995; Haraguchi *et al.*, 2000; Mimaki *et al.*, 2001). Algunas especies de *Cestrum* presentan actividades biológicas, tal es el caso del *C. diurnum* que contiene derivados de la vitamina D₃ como el glicósido 1,25-dihidroxi Vit D₃, al que se le atribuye el mantenimiento de la homeostasis del calcio y fósforo en animales (Wasserman *et al.*, 1976; Prema y Raghuramulu, 1994) y el *C. parqui*, que posee propiedades antiinflamatorias e inhibidoras de la agregación plaquetaria (Darakhshanda *et al.*, 1999). Como continuación de los trabajos iniciados por nuestro grupo de investigación, acerca de la flora andina venezolana y debido a la importancia que presenta el género *Cestrum* L, emprendimos el estudio

de *Cestrum buxifolium* Kunth., que crece en forma silvestre en gran parte del páramo merideño y es conocido comúnmente como "uvito morado".

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos: Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrómetro FT-IR Shimadzu, modelo 8300, tipo Hyper IR. Para la obtención de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C se utilizó un espectrómetro Bruker Advance DRX-400 de 400 MHz, usando como disolventes CDCl_3 y DMSO. Los puntos de fusión se determinaron sin corregir en un aparato Fischer-Johns. Para el análisis de la Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM), se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett Packard HP6890 modelo GC System Mass Selective Detector 5973.

Material botánico: Las partes aéreas de *C. buxifolium* Kunth., fueron recolectadas a orillas de la carretera Mérida-Santo Domingo, Estado Mérida-Venezuela. Un ejemplar *voucher* fue depositado bajo el número N° DBB007 en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, Mérida, Edo. Mérida-Venezuela.

Extracción, separación y purificación: El material botánico fue secado en una estufa a 45 °C y luego molido (980 g hojas y 785 g tallos). Posteriormente fue sometido a extracción en un soxhlet con alcohol isopropílico durante 3 días. Los extractos se concentraron al vacío (20 g hojas y 17 g tallos) y se sometieron a la separación de sus componentes por cromatografía de columna al vacío, utilizando silica gel como fase estacionaria y como fase móvil *n*-hexano, acetato de etilo y metanol en mezclas de polaridad creciente. De las fracciones eluidas con *n*-hexano-acetato de etilo (70:30) de la cromatografía de columna al vacío del extracto alcohólico de hojas se obtuvo un sólido **1**, el cual se purificó mediante sucesivas recristalizaciones con metanol y acetona (1,825g; 0,19%). Asimismo, un sólido **2** fue obtenido de la cromatografía de columna al vacío del extracto alcohólico de tallos, el cual fue eluido de las fracciones con *n*-hexano-acetato de etilo (90:10) y purificado por cristalización con metanol (0,25g; 0,03%). Estudios espectroscópicos fueron realizados para elucidar la estructura química de estos compuestos. Para el análisis del compuesto **1**, por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, fue necesaria la metilación del mismo mediante el empleo de diazometano, usando como generador de este último a la nitrosometilurea (Vogel, 1956).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuesto 1:

Sólido blanco, pulverulento, de punto de fusión de 255-257 °C, puro en cromatografía de gases con tiempo de retención de 38,77. Su espectro IR, muestra una banda a 3400 cm^{-1} característica de un grupo hidroxilo alcohólico, una banda ancha entre 3100-2700 cm^{-1} atribuida a la presencia de un grupo carboxílico, una banda intensa a 1710 cm^{-1} para un carbonilo y una absorción débil a 1650 cm^{-1} a la presencia de un doble enlace. En el espectro RMN ^1H , se observa la presencia de una señal ancha a δ 11,95 la cual corresponde al protón del hidroxilo de un grupo ácido. Asimismo, se observa un triplete a δ 5,12 ($J=3,5$ Hz) perteneciente a un protón de un carbono olefínico, un doblete a δ 4,31 ($J=4,0$ Hz) atribuido al protón de un grupo hidroxilo y un triplete a δ 2,99 ($J=4,5$ Hz) correspondiente al protón del carbono terciario unido al grupo hidroxilo (C-3), lo que indicaría que el -OH se encuentra en posición a (epi). Además, presenta siete señales que corresponden a los protones de siete grupos metilos, siendo cinco de ellas singuletes a δ 0,67; δ 0,74; δ 0,86; δ 0,89; δ 1,04 y las otras dos señales aparecen como dobletes a δ 0,81 ($J=7$ Hz) y δ 0,90 ($J=8$ Hz). Adicionalmente, se observa una señal a δ 0,65 ppm que se atribuye a un protón de un carbono terciario (H-5). Su espectro DEPT, muestra la presencia de 30 señales atribuidas a los carbonos de un compuesto de naturaleza triterpénica. Estas señales se pueden discriminar en siete carbonos primarios (- CH_3), nueve carbonos secundarios (- CH_2), siete carbonos terciarios (-CH) y siete carbonos cuaternarios (-C). En el espectro HMQC, se aprecia la correlación de un carbono terciario a 52,4 ppm con su protón que aparece como una señal de doblete a δ 2,11 ($J=11$ Hz), lo que correspondería al -CH que se encuentra entre los anillos D y E de un triterpeno pentacíclico (C-18). En el espectro de HMBC, se puede observar el acoplamiento del carbono terciario que aparece a 76,9 ppm (C-3) con los protones a δ 0,67 y δ 0,89 pertenecientes a los metilos de los C-24 a 15,24 ppm y C-23 a 28,28 ppm, del anillo A. Además se evidencia la correlación entre el carbono cuaternario del grupo carboxilo (178,3 ppm) y el protón a δ 2,11 unido a un carbono terciario (52,4 ppm), común para los anillos D y E de un esqueleto triterpénico pentacíclico; además, se aprecia que el protón a δ 2,11 se correlaciona con un carbono cuaternario olefínico a 138,20 ppm y este a su vez se correlaciona con el metilo que se encuentra a 23,29 ppm (metilo presente entre los anillos C y D del esqueleto triterpénico pentacíclico). El espectro de masas del compuesto **1** metilado muestra un ión molecular de 470 m/e que concuerda con la fórmula molecular $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$ y fragmentos significativos a 262 m/e, 203 m/e, 175 m/e característicos de

fragmentaciones de sustancias triterpénicas con esqueleto tipo ursano. Según los datos espectroscópicos analizados y la comparación de los valores de RMN ¹³C con los reportados en la literatura para el compuesto metilado del ácido ursólico (Tabla I) (Seo *et al.*, 1975), nos llevan a identificar al compuesto **1** como el ácido 3-a-hidroxi-12-ursen-28-oico (ácido epiursólico) (Fig. 1).

Tabla 1. Desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C asignados al compuesto **1**

N°	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹³ C *
1	0,91 (m), 1,51 (m)	38,26 (t)	38,80
2	1,47 (m)	27,00 (t)	27,30
3	2,99 (t)	76,90 (d)	78,80
4	-	38,40 (s)	38,80
5	0,65 (m)	54,80 (d)	55,40
6	1,28 (m), 1,48 (m)	18,02 (t)	18,40
7	0,89 (m), 1,23 (m)	32,73 (t)	33,00
8	-	36,60 (s)	39,60
9	1,45 (m)	46,84 (d)	47,50
10	-	36,62 (s)	37,00
11	1,84 (m)	22,87 (t)	23,30
12	5,12 (t)	124,60 (d)	125,50
13	-	138,20 (s)	138,00
14	-	41,66 (s)	42,00
15	1,30 (m), 1,79 (m)	27,56 (t)	28,20
16	1,52 (m), 1,80 (m)	23,83 (t)	24,30
17	-	47,04 (s)	48,10
18	2,09 (d)	52,40 (d)	52,80
19	0,90 (m)	38,52 (d)	39,10
20	1,52 (m)	38,47 (d)	38,80
21	1,42 (m)	30,21 (t)	30,70
22	1,57 (m)	36,34 (t)	36,70
23	0,89 (s)	28,28 (q)	28,20
24	0,67 (s)	15,24 (q)	15,20
25	0,86 (s)	16,10 (q)	15,70
26	0,74 (s)	16,93 (q)	16,90
27	1,03 (s)	23,29 (q)	23,60
28	-	178,3 (s)	177,7
29	0,81 (d, J= 6)	17,03 (q)	16,90
30	0,90 (d, J= 8)	21,10 (q)	21,20

* Ursolato de metilo (Seo, et al., 1975)

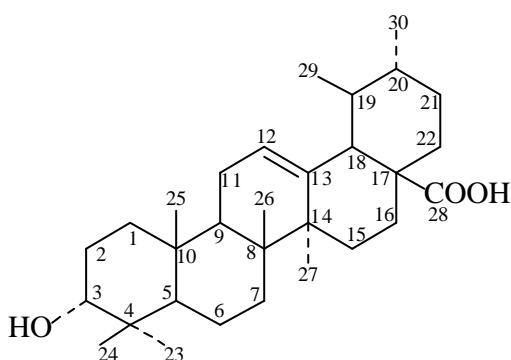


Figura 1. Estructura química del ácido epiursólico.

Compuesto 2:

Sólido blanco cristalino, en forma de agujas con punto de fusión de 286-288 °C. Este compuesto se presentó como puro al ser analizado por cromatografía de capa fina y cromatografía de gases (una señal con un tiempo de retención de 35,77 min). El espectro IR presenta una banda a 1720 cm⁻¹, atribuida a un grupo

carbonilo. En su espectro de RMN- ¹H, se observan siete singuletes a d 0,70; d 0,84; d 0,93; d 0,97; d 1,02; d 1,15 y d 1,18, los cuales se atribuyen a las señales de los protones de siete grupos metilos; además se observa un doblete a d 0,85 (J=7 Hz) que se atribuye a un octavo grupo metilo acoplado a un protón de un carbono terciario (-CH). El espectro de RMN ¹³C, presenta 30 carbonos, lo que indica que el compuesto es de naturaleza triterpénica; por otra parte, el experimento DEPT permite discriminar ocho señales de carbonos primarios (-CH₃), once señales de carbono secundarios (-CH₂) y cuatro señales de carbono terciario (-CH), por lo que las restantes señales que muestra el espectro de RMN ¹³C se pueden atribuir a siete carbonos cuaternarios, una de estas señales a 212 ppm en el espectro HMBC, se atribuye al carbono de un grupo cetónico, el cual se acopla a tres enlaces con los protones de un grupo metilo y a dos enlaces a un protón de carbono terciario. El espectro de masas muestra un ión molecular de 426 m/e, para una sustancia de fórmula molecular C₃₀H₅₀O con fragmentos significativos a 411 m/e, 341 m/e, 302 m/e y 273 m/e característicos de fragmentaciones de compuestos de naturaleza triterpénica con esqueleto friedelano. La comparación de los datos espectroscópicos anteriores con los reportados en la literatura (Tabla II) (Akihisa *et al.*, 1992), junto a los de la base de datos del Espectrómetro de Masas acoplado al Cromatógrafo de Gases, nos llevan a identificar al compuesto **2** como 3-friedelanona (friedelina) (Fig. 2).

Tabla 2. Desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C asignados al compuesto **2**

N°	RMN ¹ H	RMN ¹ H*	RMN ¹³ C	RMN ¹³ C *
1	1,65 (m), 1,95 (m)	1,69 (m), 1,97 (m)	22,26 (t)	22,30
2	2,33 (m), 2,39 (m)	2,31 (m), 2,39 (m)	41,51 (t)	41,50
3	-	-	212,0 (s)	213,20
4	2,22 (m)	2,25 (m)	58,19 (d)	58,20
5	-	-	42,13 (s)	42,10
6	1,26 (m), 1,74 (m)	1,29 (m), 1,75 (m)	41,25 (t)	41,30
7	1,35(m), 1,49 (m)	1,38 (m), 1,49 (m)	18,21 (t)	18,20
8	1,38 (m)	1,41 (m)	53,06 (d)	53,10
9	-	-	37,41 (s)	37,40
10	1,52 (m)	1,55 (m)	59,43 (d)	59,40
11	1,32 (m), 1,42 (m)	1,26 (m), 1,46 (m)	35,59 (t)	35,60
12	1,33 (m)	1,34 (2H,m)	30,48 (t)	30,50
13	-	-	39,66 (s)	39,70
14	-	-	38,26 (s)	38,30
15	1,29 (m), 1,52 (m)	1,32 (m), 1,51 (m)	32,38 (t)	32,40
16	1,40 (m), 1,52 (m)	1,39 (m), 1,59 (m)	35,97 (t)	36,00
17	-	-	29,97 (s)	30,00
18	1,55 (m)	1,56 (m)	42,74 (d)	42,80
19	1,18 (m), 1,40 (m)	1,21 (m), 1,38 (m)	35,31 (t)	35,30
20	-	-	28,15 (s)	28,10
21	1,25 (m), 1,45 (m)	1,28 (m), 1,43 (m)	32,72 (t)	32,70
22	0,90 (m), 1,50 (m)	0,95 (m), 1,53 (m)	39,22 (t)	39,20
23	0,85 (d, J=7)	0,88 (d,7)	6,81 (q)	6,80
24	0,70 (s)	0,73 (s)	14,63 (q)	14,60
25	0,84 (s)	0,87 (s)	17,93 (q)	17,90
26	1,02 (s)	1,01 (s)	20,24 (q)	20,20
27	1,15 (s)	1,05 (s)	18,66 (q)	18,60
28	1,18 (s)	1,18 (s)	32,07 (q)	32,10
29	0,93 (s)	0,95 (s)	35,01 (q)	35,00
30	0,97 (s)	1,00 (s)	31,76 (q)	31,80

* Friedelina (Akihisa et al., 1992)

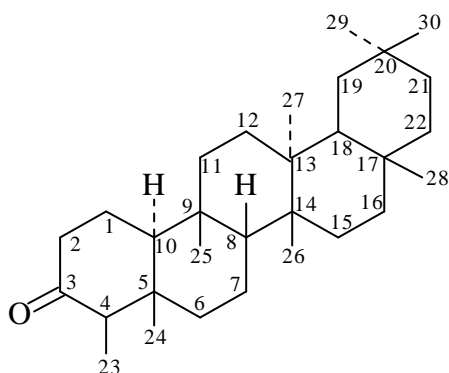


Figura 2. Estructura química del 3-friedelanona (friedelina).

CONCLUSIONES

- Del *C. buxifolium* Kunth se aislaron e identificaron dos compuestos de naturaleza triterpénica pentacíclica con esqueleto ursano y friedelano (compuestos **1** y **2** respectivamente).

- El producto aislado de las hojas corresponde al ácido epiursólico (compuesto **1**) y el producto aislado de los tallos del *C. buxifolium* es la friedelina (compuesto **2**).

- El compuesto **1** se encuentra en mayor proporción (1,825g; 0,19%) en relación al compuesto **2** (0,25g; 0,03%).

- El ácido epiursólico (compuesto **1**), caracterizado por la orientación axial (α) del grupo hidroxilo en posición 3, es aislado por primera vez dentro del género *Cestrum* L.

- La friedelina (compuesto **2**), también es aislada por primera vez del género *Cestrum* L.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akihisa, T., Yamamoto, K., Tamura, T., Kimura, Y., Iida, T., Nambara, T. and Chang, F. C. 1992. **Triterpenoid Ketones from *Lingnania chungii* Mc Clure: Arborinone, Friedelin and Glutinone.** Chem. Pharm. Bull. Vol. 40 (3): 789-791.

Benitez, C. and William, G. 1998. **The General**

***Cestrum* and *Sessea* (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela.** Ann. Missouri. Bot. Gard. Vol. 35: 273-351.

Buchbaver, G and Jirovetz, L. 1995. **Volatiles of the Absolute of *Cestrum nocturnum* L.** J. Essential Oil Res. Vol. 7: 5-9.

Catalán, C. and Tomasini, S. 1992. **Triterpenoids and Sterols from *Cestrum kunthii*.** Fitoterapia. Vol. LXIII (6): 551.

Darakhshanda, S., Faiza, H., Fehmida, T. and Viqar, U. 1999. **Effect of the Crude Extract of *Cestrum parqui* on Carrageenin-induced Rat Paw Oedema and Aggregation of Human Blood Platelets.** Phytoter. Res. Vol.13: 445-447.

Haraguchi, M., Mimaki, Y., Motidome, M., Morita, H., Takeya, K., Itokawa, H., Yokosuka, A and Sashida, Y. 2000. **Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum sendtnerianum*.** Phytochemistry. Vol. 55: 715-720.

Hunziker, A. 1976. **South American Solanaceae: A Sinoptic Survey.** In: Hawkes, J (ed): The Biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linnean Society Symposium, Serie N° 7. Academic Press. New York. P. 49-85.

Mimaki, Y., Watanabe, K., Ando, Y., Sakuma, C., Sachida, Y., Furuya, S and Sakagami, H. 2001. **Flavonol Glycosides and Steroidal Saponins from the Leaves of *Cestrum nocturnum* and Their Cytotoxicity.** J. Nat. Prod. Vol. 64: 17-22.

Prema, T.P. and Raghuramulu, N. 1994. **Free Vitamin D3 Metabolites in *Cestrum diurnum* Leaves.** Phytochemistry. Vol. 37: (3) 677-681.

Seo, B.S., Tomita, Y. and Tori, K. 1975. **Biosyntheses of Ursene-Type Triterpenes from Sodium [1,2-¹³C] Acetate in Tissue Cultures of *Isodon japonicus* Hara and Re-assignments of ¹³C N.m.r Signals in Urs-12-enes.** J. Chem. Soc. Chem. Commum. 954-955.

Vogel, A. 1956. **Practical Organic Chemistry.** Third Edition. Longmans. London. P. 967-973.

Wasserman, R., Corradino, R., Krook, L., Hughes, M. and Haussler, M. 1976. **Studies on the 1 α , 25-dihidroxycholecalciferol Activity in a Calcigenic Plant, *Cestrum diurnum*, in the chick.** Journal of Nutrition. Vol. 106: 457-465.