

Aislamiento de la 16- α -hidroxidormantinona y del dormantinol, a partir de las hojas del *Cestrumtaylori* Britt & Wills

Isolation 16- α -hidroxidormantinona and dormantinol, from leaves Cestrumtaylori Britt & Wills

Dr. Anselmo E. Ferrer-Hernández^I, Dr. Francisco Coll-Manchado^{II}, Dr. Carlos Pérez-Martínez^{II}, Dr. Pedro Ortiz-del-Toro^{II}, Dr. Victor Fuentes-Fiallo^{III}, Dr. Paulo Teixeira-de-Souza^{IV}, MSc. Carlos Adriano-Parizotto^{IV}, Julio S. Teixeira-Militão^I, Lic. Mabel Torres-Ferrer^I, Lic. María E. Aiardes-Ferrer^I

ansenrique@yahoo.com

^IUniversidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brasil; ^{II}Facultad de Química, Universidad de la Habana, Cuba; ^{III}Estación Experimental de Plantas Medicinales, "Dr. Tomás Roig", MINSAP, Cuba; ^{IV}Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brasil

Recibido: 14 de enero de 2015

Aprobado: 22 de mayo de 2015

Resumen

De las hojas del *Cestrumtaylori* Britt & Wills fueron aislados e identificados dos esteroides, que se identificaron a partir de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H , RMN ^{13}C y de espectroscopia de masa, como 16- α -Hidroxidormantinona e Dormantinol.

Palabras clave: *Cestrumtaylori* Britt & Wills, esteroides, nuevos compuestos.

Abstract

From the leaves of *Cestrum taylori* Britt & Wills they were isolated and identified two sterols, which were identified from their spectroscopic data from proton NMR and carbon thirteen, and mass spectroscopy as 16- α -Hidroxidormantinona- and Dormantinol.

Keywords: *Cestrumtaylori* Britt & Wills, sterols, new compounds.

Introducción

El género *Cestrum* L. pertenece a las solanáceas, típica sub-familia *Cestreaetribu, Cestroideae* [1]. Estas plantas presentan una toxicidad significativa al ganado bovino [2]. Este género está compuesto por arbustos, árboles jóvenes de hasta 2 metros de altura, entre otras características, flores con corola tubular - infundir buliforme. Sus especies se distribuyen a lo largo de las Américas tropicales y subtropicales, y son pioneros en el proceso de sucesión ecológica, que tienen importancia en los programas de restauración ambiental [3].

El *Cestrumtaylori*Britt&Wills, es una planta endémica de Cuba, donde crece principalmente en el este del país; fue colectada en la provincia de Santiago de Cuba para el estudio [3]. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis fitoquímico de las hojas de *Cestrumtaylori*Britt&Wills para extraer los principios activos.

Materiales y métodos utilizados

Las hojas de esta planta se recogieron en la provincia de Santiago de Cuba en la Granja de Fernandina, en la Gran Piedra. La planta fue identificada por el doctor Víctor Fuentes Fiallo, como *Cestrumtaylori*Britt&Wills, planta endémica de Cuba. Una copia de este ejemplar fue depositada en el Herbario de la Estación Experimental de Plantas Medicinales "J. T. Roig", con el N ° 4198.

Método de extracción de metabolitos secundarios

Las hojas se prepararon para la extracción y se secaron a 40-50 °C, luego fueron molidas hasta un polvo fino. Para realizar el estudio se aplicó la técnica de extracción descrito por Wall *et al.*, 1952 [4], utilizando etanol al 95 % como disolvente. El proceso se repitió cuatro veces durante cuatro horas. Los extractos de etanol se concentraron por destilación a vacío en un evaporador rotatorio para dar un extracto final.

Más tarde fue desengrasada utilizando n-heptano mediante la repetición cuatro veces con 100 mL. El extracto acuoso ácido se hidroliza durante tres horas con HCl 1,5 M. El producto de la hidrólisis fue adicionado sobre una mezcla de hielo/agua, y el sólido formado se dejó precipitar, el cual luego fue separado por centrifugación (tabla 1).

TABLA 1. RESULTADOS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE LAS HOJAS DE *Cestrumtaylori* Britt & Wills

Especie y órgano estudiado	Material seco (kg)	Rendimiento/MS			
		Glicósidos (g)	%	Aglicona (g)	%
<i>C. Taylori</i> (hojas)	0,32	11,5	(3,5)	5,4	(1,7)

Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

El crudo de esteroide bruto obtenido se purificó y fue aislado en sus componentes por técnicas cromatográficas. Se realizó una cromatografía en columna de gel de sílice Merck, y se utilizaron como eluyentes cloroformo, metanol y mezclas de los mismos disolventes. A continuación, las fracciones de dos o más compuestos se separaron, usando una nueva cromatografía en columna o cromatografía en capa fina preparativa.

La tabla 2 resume los resultados del estudio de la cromatografía en una columna primaria, que se preparó por el método húmedo, utilizando una columna de 46 cm de longitud y 5 cm de diámetro. El adsorbente utilizado fue gel de sílice Merck (malla 70-230) y como eluente, cloroformo y cloroformo/metanol en diversas concentraciones.

TABLA 2. COMPUESTOS ESTEROIDALES AISLADOS E IDENTIFICADOS DE LAS HOJAS DE *Cestrumtaylori* Britt & Wills

Compuestos	Hojas (g)	Rf
CT-1 (Yucagenina)	0,047	0,55 (a)
CT-2 (Yamogenina)	0,068	0,66 (a)
CT-3 E1 (Esterol I)	0,031	0,30 (a)
CT-4 E2 (Esterol II)	0,015	0,45 (a)

Eluyentes en la cromatografía de capa delgada: a) = CHCl₃/MeOH (95:5)

Resultados y discusión

CT-1 (YUCAGENINA)

Se aisló de *Cestrum taylori* Britt & Wills (0,047 % hojas). Se eluyó con CHCl₃/MeOH (90:10) v/v y se recristalizó en acetona para dar un sólido cristalino TF = 246-245 °C. En la cromatografía de capa fina usando gel de sílice 60 F254 (0,25 mm), fase móvil CHCl₃/MeOH (95: 5) mostró un Rf = 0,53.

IR em KBr: max. cm⁻¹: 3 450 a 3 350 γ (OH), 1040 γ(C = O) 988, 923, 900 (f) 880 y 840 (espirostano 25R) [4].

MS IE m/e (% I Relativo): M + 430 (5), 361 (2), 358 (7), 301 (6), 287 (22), 283 (5), 269 (4), 139 (100) PB, 115 (22).

RMN ^1H CDCl_3/TMS (ppm): 0,76 (s, C-18), 0,86 (s, C-19), 0,96 (d, J = 6,2 Hz, C-21), 0,78 (d, J = 6, 2 Hz, C-27), 3,45 (m, 3 α -H) 4,40 (m, H-16 α) 5,4 (m, H-6).

RMN ^{13}C CDCl_3/TMS (ppm): 1 (45,2) 2 (72,7) 3 (76,4) 4 (40,9) 5 (139,5) 6 (122,2) 7 (32,0) 8 (30,9) 9 (50,1) 10 (38,0) 11 (21,0) 12 (39,8) 13 (40,3) 14 (56,5) 15 (31,9) 16 (80,8) 17 (62,3) 18 (16,3) 19 (20,5) 20 (41,7) 21 (14,5), 22 (109,3) 23 (31,5) 24 (28,9) 25 (30,4) 26 (66,9) 27 (17,1).

Preparación de acetato de yucagenina

200 mg del compuesto yucagenina se disuelven en 4 mL de piridina recientemente destilada, y se trata con 4 mL de anhídrido acético y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 24 h. Después se vierte sobre una mezcla de agua-hielo (40 mL), y el precipitado se extrae con éter etílico. La fase orgánica se lava con agua, secándose con sulfato de sodio anhidro, y luego se destila a presión reducida. El sólido resultante se recristaliza de acetona, obteniéndose un sólido de TF 178-179 °C.

IR: KBr, max. cm^{-1} : 1750 γ [(C = O), 1 050 γ C-O], 1240 γ (C-O) éster 990 925 (f) 900 y 860 (espirostano 25S) [4].

El espectro IR en pastillas de KBr muestra bandas a 3 450-3 350 cm^{-1} γ (OH) y banda a 1 040 cm^{-1} γ (CO). También aparece en la zona de 1 000-850 cm^{-1} , las bandas características de sapogeninaesteroidales. Estas bandas 988, 923, 900 (f), 880 y 840 cm^{-1} indican que el compuesto es una sapogeninaesteroidal de la serie (25R) [4]. El espectro de masas por impacto electrónico muestra el ion molecular M^+ (m/e) 430 y el pico base (m/e) 139 y los iones fragmentos (m/e) 412 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 358, 301, 287, 283, 269, 126 y 115.

El espectro de RMN ^1H muestra los desplazamientos químicos del compuesto, y cuando se compara con los datos reportados para la yucagenina [5], no hay diferencias significativas para los grupos metilo angulares.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto mostró desplazamientos químicos de los 27 átomos de carbono, que se compararon con los datos reportados para la diosgenina [5]; se observa que coincidió con excepción de los valores del anillo A. Al realizar el análisis del C-2 se puede ver el desplazamiento químico que aparece en el espectro en

72,7 ppm, que es característica de un átomo de carbono unido al grupo OH, lo que sugiere que nuestro compuesto es la yucagenina.

La estructura se confirmó por el punto de fusión mixto con una muestra auténtica de yucagenina aislado de *CestrumLaurifolium L`Herit* [5], sin mostrar disminución. Además, se obtuvo el derivado acetilado, cuyos valores de TF 178-179 °C están de acuerdo con los descritos para dicho compuesto. Para estos datos, se concluye que el compuesto es yucagenina (figura 1).

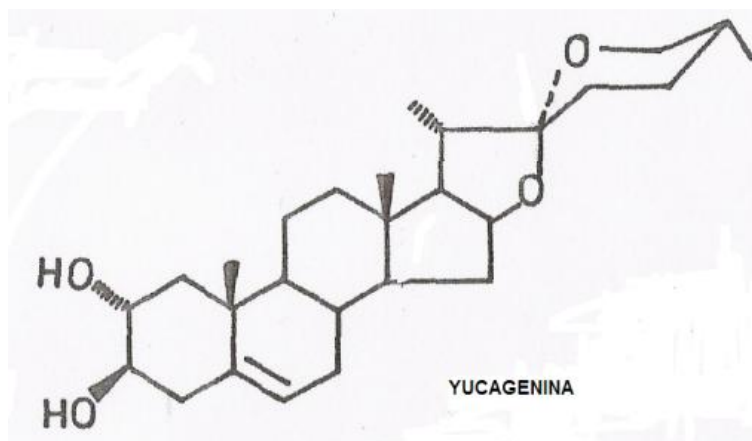


Figura 1. Estructura de la yucagenina

CT-2 (yamogenina)

Fue aislado de *Cestrumtaylori* Britt & Wills (0,058 % de hojas). Se res cristalizó de acetona, produciendo un sólido cristalino TF = 185-188 °C. En la cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice 60 F254 (0,25 mm) y como fase móvil CHCl₃/MeOH (95: 5) mostró un R_f = 0,65

IR en KBr: max. cm⁻¹: γ 3450 (OH), 1060 γ (C-O), 986, 926 (f) y 903 870 (espirostanos 25S) [4].

MS IE m/e (% I Relativo): M⁺ 414 (21), 139 (100) PB, 399 (8), 395 (13), 355 (6), 345 (7), 342 (13), 300 (8), 205 (13) 282 (84), 271 (24), 267 (14), 253 (6), 115 (19).

RMN H¹CDCl₃/ TMS (ppm): 0,78 (s, C-18), 0,86 (s, C-19), 0,98 (d, J = 5,0 Hz, C-27), 1,05 (d, J = 7, 0 Hz, C-21), 3,00 (m, 3α-H) 4,45 (m, 16 H) 5,35 (m, H-6).

RMN C¹³ CDCl₃ / TMS (ppm): 1 (37,2) 2 (31,6) 3 (71,7) 4 (42,3) 5 (140,9) 6 (121,2) 7 (32,0) 8 (31,4) 9 (50,1) 10 (36,6) 11 (20,9) 12 (39,8) 13 (40,2) 14 (56,6) 15 (31,8) 16 (80,9) 17 (62,0) 18 (16,2) 19 (19,4) 20 (42,2) 21 (14,3), 22 (109,8) 23 (26,0) 24 (25,8) 25 (27,1) 26 (65,1) 27 (16,0).

Preparación de acetato de yamogenina

Se preparó el derivado acetilado, y se obtuvo un sólido de TF = 184 -187 ° C.

IR en KBr: max. cm^{-1} : γ 1730 (C = O), γ 1045 (C-O), γ 1245 (C-O) éster, 998, 925 (f) 905 y 860 (espiroetano 25S).

El espectro IR en pastillas de KBr muestra bandas a 3 400 cm^{-1} γ OH-1 y 1 060 cm^{-1} γ CO. Además de las bandas características de las sapogeninas esferoidales en 986, 925, 903 y 870 cm^{-1} con la banda en 925 de mayor intensidad, se puede suponer que la sapogenina es de la serie 25S [4].

El espectro de masas por impacto electrónico muestra el ion molecular M^+ (m/e) 414 y el pico base (m/e) 139, y un patrón de fragmentación típico de las sapogeninas esteroidales [4], y un grupo de iones fragmentos encontrados en (m/e) 399, 396, 355, 345, 342, 300, 285, 271, 253 y 115. La comparación con los datos de la fragmentación de la diosgenina puede demostrar que son similares [6].

EL espectro de ^{13}C RMN muestra los desplazamientos químicos, los cuales, cuando se compara con los reportados para la diosgenina por Bird *et al.* [7], se corresponde perfectamente con los anillos A, B, C, D y E, pero no los valores para el anillo F que difieren de la señal de metilo 27, que se redujo significativamente a 16,0 ppm, caracterizado por un grupo metilo axial. Por lo tanto, se considera que el compuesto es el isómero de la diosgenina, la yamogenina.

El compuesto fue acetilado, obteniéndose un sólido TF= 184-187 °C. El espectro IR mostró la banda en 1 730 cm^{-1} C = O γ y la desaparición de la banda en la región de 3,400 a 3 300 cm^{-1} grupo OH, que está de acuerdo con los datos reportados para la yamogenina [5] (figura 2).

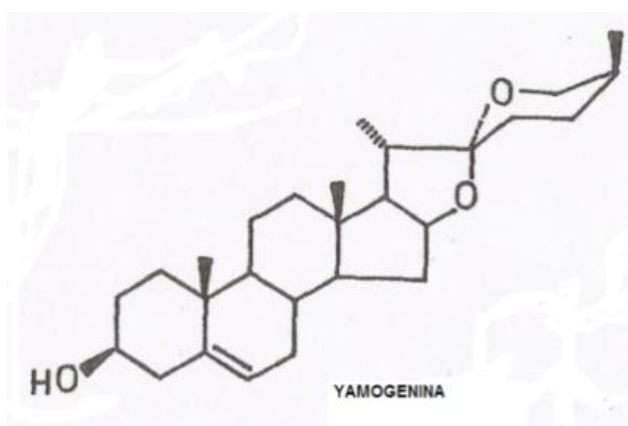


Figura 2. Estructura de la Yamogenina

CT-E1 (esterol I)

Se aisló a partir de las hojas de *Cestrumtaylori* Britt & Wills (0,031 %) a partir de fracciones 38-40 de la columna por elusión con CHCl₃ / MEOH (90:10). Se recrystalizó en acetona, para dar un sólido TF = 150-151 °C. En la cromatografía de capa fina, usando gel de sílice 60 F254 (0,25 mm), fase móvil CHCl₃/MeOH (95: 5) mostró un R_f = 0,30.

IR en KBr: max. en cm⁻¹: γ 3 400-3 200 (OH), 1 030 γ (CO) γ 1 705 (C = O).

MS: EI 70 eV. m / e (% I Relativo): M⁺ 432, (M + - H₂O), 414, 398 (3), 384 (2), 300 (5,3) 285 (6,6), 282 (7), 273 (60,9) 271 (17,5) 267 (12,5) 253 (7,3), 157 (27,6) 155(22,9) 144 (68,8) 143 (20,6), 126 (100)PB, 117 (17,9) 115 (16,2), 107(26,5), 105 (42,1) 97 (72,9), 91 (41,9), 81 (28,7), 71 (22,8), 69 (66,7), 55 (66,2), 43 (50,7) y 41 (67,7).

RMN H ¹CDCl₃ / CD₃OD/TMS (ppm): 0,677 (s, C-18), 1,005 (s, C-19), 0,91 (d, J = 6,0 Hz, C-27), 1,08 (d, J = 6,0 Hz, C -21), 3,80 (m, 16 H-β) 5,35 (m, H-6).

RMN C¹³ CDCl₃ / CD₃OD / TMS (ppm): 1 (37,3) - 2 (31,4) - 3 (71,6) + 4 (42,1) - 5 (141,1) + 6 (121,3) + 7 (31,8) - 8 (31,5) + 9 (50,2) + 10 (36,7) 11 (20,4) - 12 (38,4) - 13 (73,8) 14 (53,8) + 15 (36,3) - 16 (74,4) 17 (61,2) 18 (14,5) 19 (19,4) 20 (46,0) 21 (16,6) 22 (213,8 ± 1,4) - 23 (36,8) - 24 (26,8) - 25 (35, 3) + 26 (67,4) + 27 (16,3).

El espectro de IR del compuesto E₁ muestra bandas en 3 400 – 3 200 cm⁻¹ debidas al estrechamiento de los grupos OH. Además, una banda en 1 705 cm⁻¹ típico del estrechamiento C=O, y la banda en 1 030 cm⁻¹ del estrechamiento C-O. El espectro de masa por impacto electrónico muestra el ion fragmento en m/e 414 (M⁺ - H₂O), y el pico base en m/e 126. Además, aparecen los iones fragmentos más importantes, los cuales pueden ser interpretados de acuerdo con el esquema de fragmentación mostrado en la figura 3.

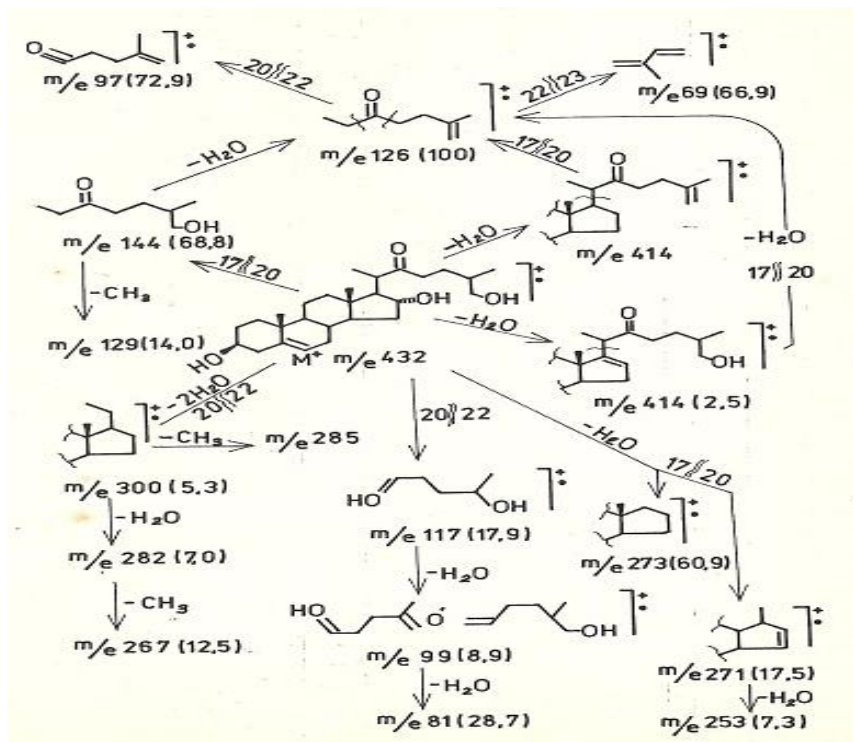


Figura 3. Esquema de fragmentación de 16 α - Hidroxi-Dormantinona

Como puede verse en el esquema anterior, la formación del ion fragmento en m/e 126, (pico base) está favorecida por la presencia de un grupo carbonilo en el átomo de C-22 y un grupo OH en el átomo de C-26, el cual se puede deshidratar fácilmente.

El espectro de RMN ^1H muestra un singlete en 0,95 ppm asignable al C-19 y otra señal en 5,35 ppm (m), asignable al protón vinílico, por lo cual se puede establecer que este compuesto es un Δ^5 3- β - Hidroxiesteroide [9]. Además, aparece otro singlete en 0,677 ppm asignable al C-18 y un multiplete 3,80 ppm asignable al H-16, lo cual indica que existe otro grupo OH en el átomo de C-16 en posición alfa [8].

El espectro de RMN ^{13}C mostró las señales de 26 átomos de carbonos, debido a que no se llegó hasta los valores de campo, donde deben aparecer los grupos C=O.

Todas las señales pudieron ser asignadas comparando los valores obtenidos con los reportados para el colesterol y, además, se realizó el cálculo a partir del colesterol más el efecto de un grupo OH en posición alfa, llegándose a la conclusión de que el núcleo esteroidal del compuesto E_1 es semejante al colesterol, pero con un grupo OH en posición alfa.

Posteriormente se calculó el valor posible para un grupo carbonilo en C-22, siguiendo la técnica de Bremser [8], encontrándose que este debe estar entre 213,8 +/- 1,4 ppm y el valor del C-23 alrededor de 40,4 ppm.

La asignación realizada para el C-24, C-25, C-26 y C-27 puede ser comparada con los datos reportados por Seo ⁹. Encontrándose que estos valores concuerdan con los valores experimentales del compuesto E₁, lo cual confirma la existencia de un grupo OH en el C-26.

De acuerdo con estos resultados, se da por el compuesto E₁ la estructura (20R, 25S)-3-β, 16-α, 26- Trihidroxi-colest-22-ona y como nombre 16 α-Hidroxi-Dormantinona (figura 4).

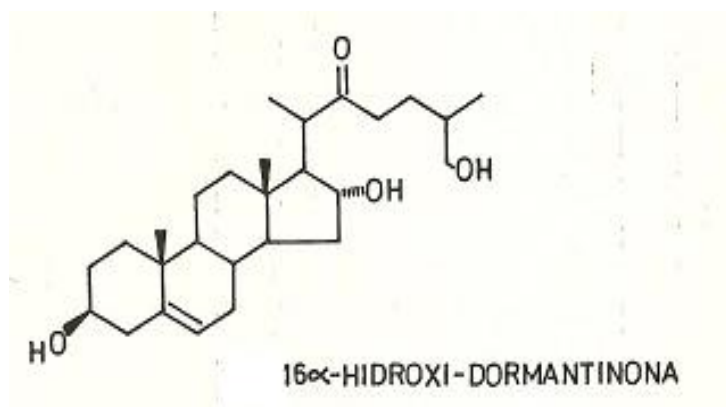


Figura 4. Estructura de la 16-alfa-Hidroxi – Dormantinona

Una estructura muy semejante fue aislada anteriormente por Kaneko y col. [10] a partir del cultivo de tejido del *Veratrumgrandiflorum*, sugiriendo que este compuesto era precursor de la biosíntesis de los compuestos esteroideos.

CT- 4 E2 (esterol II)

Se aisló a partir de hojas de *Cestrumtaylori* Britt & Wills (0,015 %) a partir de fracciones 45-47, eluyendo la columna con CHCl₃/MEC (90:10). Se recristalizó en acetona y se obtuvo un sólido TF = 229-230 °C. En la cromatografía de capa fina usando gel de sílice 60 F254 (0,25 mm), fase móvil CHCl₃/MeOH (95: 5) mostró R_f = 0,45.

IR en KBr: max. cm⁻¹: γ 3 400-3 200 (OH), 1 075, 1 050, 1 030, γ (CO).

MS EI m/e (% I relativo): M + 418, (M + - H₂O), 400 (3), (M + - 117) 301 (3,5), 285 (3), 269 (3,5) 213 (5,6) 150 (2), 120 (9), 117 (16), 105 (25), 99 (100) 81 (36), 71 (10), 69 (13,9) y 67 (15,1).

El espectro IR de este compuesto muestra bandas en 3 400 - 3 200 cm^{-1} de los grupos OH y bandas en 1 075, 1 050 y 1 030 cm^{-1} de los estrechamientos C-O.

El espectro de masa por impacto electrónico muestra el ion molecular M^+ en m/e 418, y el pico base en m/e 99. Además, se observan los iones fragmentos en m/e 400 ($M^+ - \text{H}_2\text{O}$), 301, 285, 269, 267, 213, 150, 117, y 81, los cuales pueden ser explicados de acuerdo con el esquema propuesto por Kaneko y col. [10], para el dormantinol (figura 5).

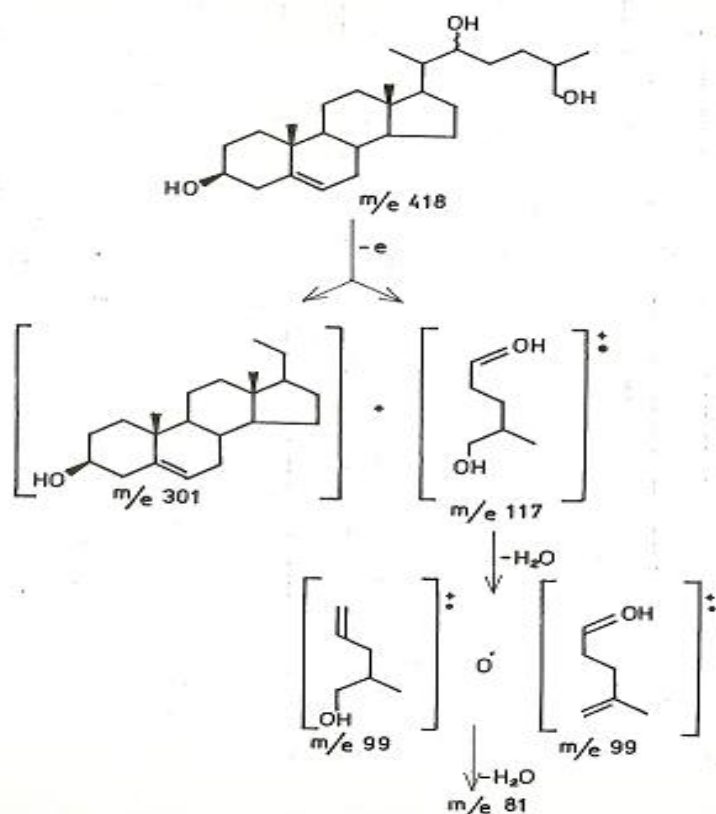


Figura 5. Esquema de fragmentación del dormantinol propuesto por Kaneko y col. [10]

Con los datos obtenidos, y teniendo en cuenta que junto a la dormantinona fue aislado un esteroide, el dormantinol, los cuales fueron propuestos como precursores del proceso de biosíntesis de los alcaloides y sapogenina esteroidales, sugerimos que E_2 pudiese ser el dormantino 1 (figura 6). De acuerdo con los datos obtenidos para esta estructura, será la primera vez que se aíslan estos dos compuestos (E_1 y E_2) de plantas del género *Cestrum*, lo que permitiría comprobar la ruta de biosíntesis de las sapogeninas y los alcaloides esteroidales.

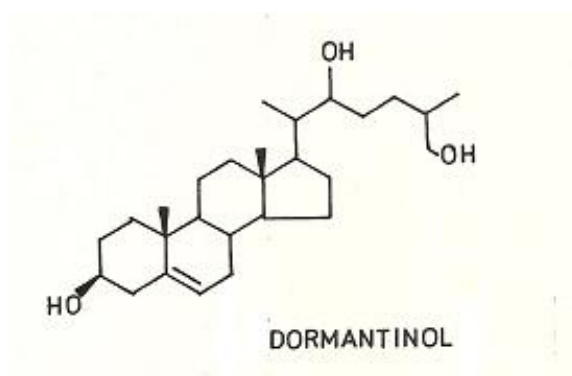


Figura 6. Estructura del dormantinol

Conclusiones

*Fueron aisladas e identificadas por primera vez de los extractos etanólicos de las hojas de *Cestrum taylori* Britt & Wills y a través de los métodos cromatográficos y espectroscópicos (IR, RMN y de masas), dos sapogeninas sesteroidales como yamogenina y yucagenina, y dos esteroides, que se identificaron como 16- α hidroxidormantinona y dormantinol, respectivamente.*

Referencias bibliográficas

1. CARVALHO SOARES, Edson Luís de; SILVA, Márcia Vignoli; MENTZ, Lilian Auler: Ogênero *Cestrum* l. (solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil; Pesquisa Botânica, 2007, N° 58: 263-282.
2. *Cestrum* – Wikipedia, la enciclopedia libre pt.wikipedia.org/wiki/estrum/ accesada 01-10-2014.,
3. HNO. LEÓN, F.S.C y HNO. ALAIN, F.S.C. *Flora de Cuba*, 1957. Vol. IV. Ed. P. Fernández y Cia., la Habana, Cuba.
4. WALL, M. E; EDDY, C. R; MCCLENNAN, M. L; KLUMP, M. E. "Detection and estimation of steroidal sapogenins in plant tissue". *Anal. Chem.*, 1952, 24, p. 1337-1341.
5. FERRER HERNÁNDEZ, A. E. Tesis de Doctorado, 1989. Universidad de la Habana, Cuba.

6. HOSTETTMANN, Kurt; DOUMAS, Jacques; HARDY, Michel. "Mass Spectrometry of Naturally Occurring Glycosides". *Helv. Chim. Acta*, 1981, 64, 297-303.
7. BIRD, G. J.; ROMANELLI, M. L.; COLLINS, D. J.; EASTWOOD, F. W.; EXNER, R. H.; SMALL, D. D. "The Synthesis of (25R)-22 α N-[15 ξ ,17 α -²H₂]-Spirosol-5-en-3 β -ol ([15 ξ ,17 α -²H₂] Solasodine) and Assignment of the ¹³C N.M.R. Spectra of Solasodine and its Derivatives". *Australian Journal of Chemistry*, 1979, 32, 786-796.
8. BREMSER, W.; FRANKE, B.; WAGNER, H. *Chemical Shift Ranges in Carbono-13 NMR Spectroscopy*. 1982, Wiley-VCH Verlag GmbH.
9. SEO, Shujiro; ALSUKO, Oumori; KEN'ICHIN, Takeda. "Observation of the mechanism of acid-catalized isomerization at C-25 of spirostanol". *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 3823.
10. KANEKO, Ko; MIKAKO Tanaka, MITSUHASHI, Hiroshi. "Dormantanol, a possible precursor in solanidine biosynthesis, from *Veratrumgrandiflorum*". *Phytochemistry*, 1977, 16(8), 1247-1251.