

AISLAMIENTO DE FRIEDELINA Y FRIEDELINOL DE LA CORTEZA DE *Clusia ellipticifolia* Cuatr.

* Ahmed Mohamed Salama

Resumen:

De la corteza de *Clusia ellipticifolia* Cuatr. se aislaron friedelin (friedoleanan-3-ona) y epifriedelinol (friedoleanan-3 β -ol), los cuales fueron identificados por métodos químicos y espectroscópicos.

Summary:

Friedelin (friedoleanan-3-one) and epifriedelinol (friedoleanan 3 β -ol) were isolated from the stem bark of *Clusia ellipticifolia* Cuatr.; the isolated compounds were identified by chemical and spectroscopic methods.

INTRODUCCION

Dentro de la variada flora colombiana, se encuentra un gran número de especies pertenecientes a la familia Clusiaceae, cuyo género más representativo e importante por su uso medicinal es quizás el *Clusia*. Entre los usos más destacados de las especies de esta familia en medicina popular están: el tratamiento de la lepra, el de cefalalgias y en aplicaciones tópicas para cicatrizar el ombligo de los recién nacidos, cuando éste tiene tendencia a no sanar; algunas de estas especies producen resinas aromáticas, aceites y pigmentos (1). Recientemente se ha reportado su actividad en la inhibición de la monoaminoxidasa (2).

De algunas plantas de esta misma familia entre ellas *Garcinia morella*, se aislaron los antibióticos α -Guttiferina y β -Guttiferina, los cuales presentan acción específica contra bacterias gram-positivas, pero no actúan frente a bacterias gram-negativas, hongos, levaduras y antinomocetos (3). Las Clusiaceas se caracterizan por la presencia de xantonas; por ejemplo, Gottlieb et al

en 1966 (4) aislaron de *Kielmeyera petiolaris* las xantonas 2,8-dihidroxi-1-metoxi-xantona y 1,2-dimetoxi-8-hidroxi-xantona. En este mismo año Locksley et al aislaron las xantonas Sinfoxantona, Globuxantona, Euxantona y Ugoxantona de *Symphonia globulifera* (5, 6, 7). En 1966, Jackson et al aislaron Jacareubina de *Calophyllum sclerophyllum* (8); así mismo en 1971, 1972 se aislaron los flavonoides Volkensiflavona y Maringanina de la madera de *Garcinia volkensii* (9), y, Aromadendrina, Taxifolina y Maringenina de la madera de *Garcinia buchanii* y *Garcinia eugenifolia* (10). En 1975, Harborne reportó que los bisulfatos de flavonoles han sido detectados ocasionalmente en la familia Clusiaceae (11).

También se aislaron β -sitosterol, β -amirina, ácido betulínico (12) y estigmasterol (13) de varias especies de Clusiaceas; posteriormente, fué aislada la friedelin de la corteza de *Calophyllum cordato-oblongum* Thw (14) y de los frutos de *Clusia ellipticifolia* (15) y friedelin, β -friedelinol y ácido oleanólico de *Clusia rosea* (16).

PARTE EXPERIMENTAL

Técnicas Generales Utilizadas:

- Puntos de fusión: se determinaron en un fusiómetro marca Undra y están sin corregir.
- Espectros IR: Se efectuaron en un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer modelo 700.
- Espectros UV: Se corrieron en un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer modelo 552.
- Espectros RMN- 1 H: Para obtenerlos, se empleó un espectrómetro marca Nicolet NT 200 de 200 MHz, usando tetrametilsilano como referencia interna. En todos los casos, se usó cloroformo deuterado como solvente.

* Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá-Colombia.

- Espectros de masa: Se hicieron en un espectrómetro AEI MS 902 de alta resolución, por el sistema de entrada directa a 18 y 70 eV.

MATERIALES Y METODOS:

Para efectuar este estudio, se eligió la corteza de la planta, la cual fué recolectada en la región comprendida entre Fusagasugá y Bochica, en Agosto de 1980. La planta fué clasificada por el Dr. Hernando García Barriga del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia y un ejemplar de la misma, reposa en el Herbario Nacional Colombiano archivado bajo el número Col. 229095.

PREPARACION DE LA MUESTRA Y OBTENCION DE LOS EXTRACTOS:

La corteza de la planta se dividió en fragmentos pequeños y se secó a 50°C durante 4 días en un horno con aire circulante. Una vez seca, se redujo a partículas más pequeñas mediante molienda en un molino manual. Luego se pesaron 1.035 kg y se trajeron en soxhlet hasta agotamiento con éter de petróleo, 37-40°C (12 L). Una vez finalizada la extracción, se separó el extracto de éter de petróleo y se comenzó a extraer la muestra de nuevo con metanol (15 L). Tanto el extracto en éter de petróleo como el metanólico se filtraron y luego los solventes se evaporaron en rotavapor y los residuos pesaron 28.70 y 238.0 g, respectivamente. Se decidió iniciar el estudio con el extracto en éter de petróleo, es decir, los compuestos menos polares. El extracto metanólico se está estudiando en estos momentos.

SEPARACION Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS:

El extracto en éter de petróleo, (28.70 g) se fraccionó por cromatografía en columna (sílica gel 60, Merck, 0.063-0.200 mm, 630 g) eluyendo inicialmente con éter de petróleo (37-40°C) y aumentando posteriormente en forma gradual la polaridad mediante adición de acetato de etilo, hasta terminar con una mezcla de acetato de etilo-metanol (1:1). Se recogieron 282 fracciones de 125 ml. cada una. La columna se controló por cromatografía en capa fina de sílica gel 0.25 mm. de espesor (ciclohexano: acetato de etilo, 70:30), revelando las placas con ácido sulfúrico al 30% en etanol y sometiéndolas a posterior calentamiento a 110°C durante 5-10 minutos. Se reunieron las fracciones que resultaron cromatográficamente iguales y se concentraron en rotavapor. De esta forma, reuniendo las fracciones 13-21 y las fracciones 22-39 se aislaron por cristalización los compuestos Ia (764 mg), y Ib (227 mg) respectivamente.

COMPUESTO Ia:

Para purificar este compuesto se empleó cromatografía preparativa en capa fina (Sílica gel, 0.5 mm. de espesor). Las placas se desarrollaron en ciclohexano: acetato de etilo (98.5:1.5), siendo necesario efectuar 5 recorridos al cabo de los cuales, se recuperó el compuesto adsorbido en la Sílica y se cristalizó en acetato de etilo. El compuesto (394 mg) se obtuvo en forma de agujas, es soluble en cloroformo, ligeramente soluble en acetato de etilo e insoluble en etanol, metanol y agua; tiene un punto de fusión 268-270°C, Espectro Infrarrojo ν max (Nujol): 1708 ($\text{C}=\text{O}$), 1380 (Gem dimetilo) cm^{-1} , Espectro RMN-¹H (CDCL₃) δ TMS: 3.33 (2H, m, W_{1/2}¹, 13 Hz, H-2α y H-2β), 2.22 (1 H, q, J, 7.0 Hz, H-4α), 1.18 (3H, s, Me, C-13α), 1.04 (3H, s, Me, C-14β), 1.00 (6 H, s, 2XMe, C-20α y C-20β), 0.95 (3 H, s, Me, C-9β), 0.88 (3H, d, J, 7.0 Hz, Me, C-4β), 0.86 (3 H, s, Me, C-5β), 0.72 (3 H, s, Me, C-17β) Espectro de masa, m/e (%): 426 (M⁺, 44.6), 411 (16.0), 341 (10.0), 302 (42.0), 273 (60.7), 246 (41.0), 232 (38.0), 231 (30.0), 218 (54.0), 205 (55.0), 204 (24.9), 179 (55.0), 163 (39.0), 125 (100), 124 (33.8), 123 (57.7), 109 (43.0), 96 (90.0), 95 (35.7), 69 (26.0).

COMPUESTO Ib:

Este compuesto, una vez obtenido por cristalización en acetato de etilo de las fracciones 22-39 que eluyeron de la columna de cromatografía mostró por cromatografía en capa fina (ciclohexano-acetato de etilo, 98.5: 1.5, 5 recorridos) revelando las placas con ácido sulfúrico al 30% en etanol y sometiéndolas a posterior calentamiento a 110°C durante 5-10 minutos, que es muy puro. Los cristales obtenidos en forma de prismas blancos (227 mg) son ligeramente solubles en cloroformo, acetato de etilo, insolubles en metanol, etanol y agua, tienen un punto de fusión 286-289°C; Espectro Infrarrojo ν max (Nujol): 3325 (OH), 1380 (Gem dimetilo), 1123 (tensión-C-O) cm^{-1} ; Espectro Ultravioleta λ max (ciclohexano): 212 nm.

OBTENCION DEL COMPUESTO Ib ACE-TATO:

El compuesto Ib (78.0 mg) se acetiló por calentamiento a reflujo durante 4 horas con piridina-anhídrido acético. Despues del trabajo de rutina, se obtuvo el compuesto Ib-acetato (86.0 mg), el cual fué cristalizado en acetato de etilo. Los cristales obtenidos (73.0 mg) son solubles en cloroformo, ligeramente solubles en acetato de etilo, metanol e insolubles en agua; tienen un punto de fusión 302-304°C, Espectro Infrarrojo ν max (Nujol): 1735 (Acetoxi $\text{C}=\text{O}$), 1245 (-C-O), 1380 (Gem dimetilo) cm^{-1} ; Espectro RMN-¹H (CDCL₃) δ TMS: 4.88 (1 H, m, W_{1/2}¹, 6.0 Hz,

H-3 α , 2.04 (3H, s, Me, Acetoximetilo), 1.93 (1H, m), 1.86 (1H, t, J, 3.0 Hz), 1.74 (1H, t, J, 4.0 Hz), 1.72 (1H, t, J, 3.0 Hz), 1.17 (3H, s, Me, C-13 α), 0.99 (9H, s, 3XMe, C-14 β , C-20 α y C-20 β), 0.94 (3H, s, Me, C-5 β), 0.93 (3H, s, Me, C-9 β), 0.86 (3H, s, Me, C-17 β), 0.81 (3H, d, J, 7.0 Hz, Me, C-4 β); Espectro de masa, iones m/e (%): 470 (M $^+$, 10.6), 455 (M $^+$ -Me, 13.2), 410 (24.8), 395 (21.9), 346 (4.0), 317 (29.9), 290 (15.2), 275 (20.2), 259 (18.4), 257 (22.2), 231 (38.9), 218 (34.5), 205 (37.0), 191 (22.1), 189 (20.7), 179 (29.8), 177 (39.4), 175 (22.8), 163 (20.5), 137 (21.8), 125 (63.0), 109 (45.0), 96 (100), 69 (16.6).

CONVERSION DEL COMPUESTO Ib a Ia:

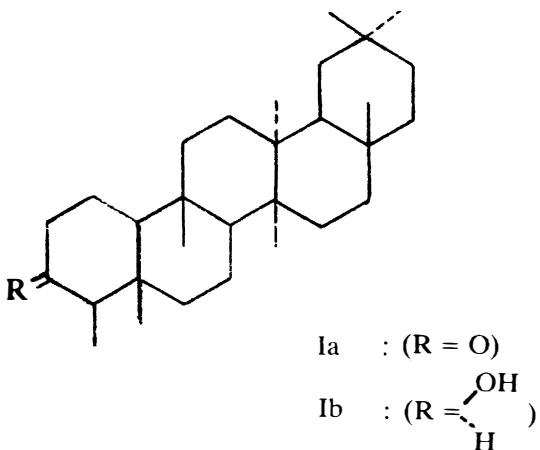
El compuesto Ib (2 mg) se disolvió en acetona (5 ml) y se tituló con el reactivo oxidante Cr₂O₃·H₂SO₄ (17), hasta la aparición de un color marrón persistente; luego se diluyó la solución con agua destilada (100 ml) y se extrajo con cloroformo (3 X 20 ml). El solvente fué evaporado en un rotavapor y el residuo se examinó por cromatografía en capa fina (Sílica gel 0.25 mm de espesor) comparándolo con los compuestos Ia y Ib; las placas fueron desarrolladas en ciclohexano: acetato de etilo (85:15), reveladas con ácido sulfúrico al 30% en etanol y sometidas a posterior calentamiento a 110°C durante 5-10 minutos.

El cromatograma mostró que el producto de la reacción consta de un compuesto idéntico en color y R_f al compuesto Ia aislado de la planta.

DISCUSION DE RESULTADOS:

El extracto en éter de petróleo de la corteza de *Clusia ellipticifolia* produjo al concentrarlo, un residuo amarillo aceitoso, el cual fué fraccionado por cromatografía en columna sobre sílica gel, aislándose friedelina y friedelan-3 β -ol, en un 0.038% y 0.022%, respectivamente.

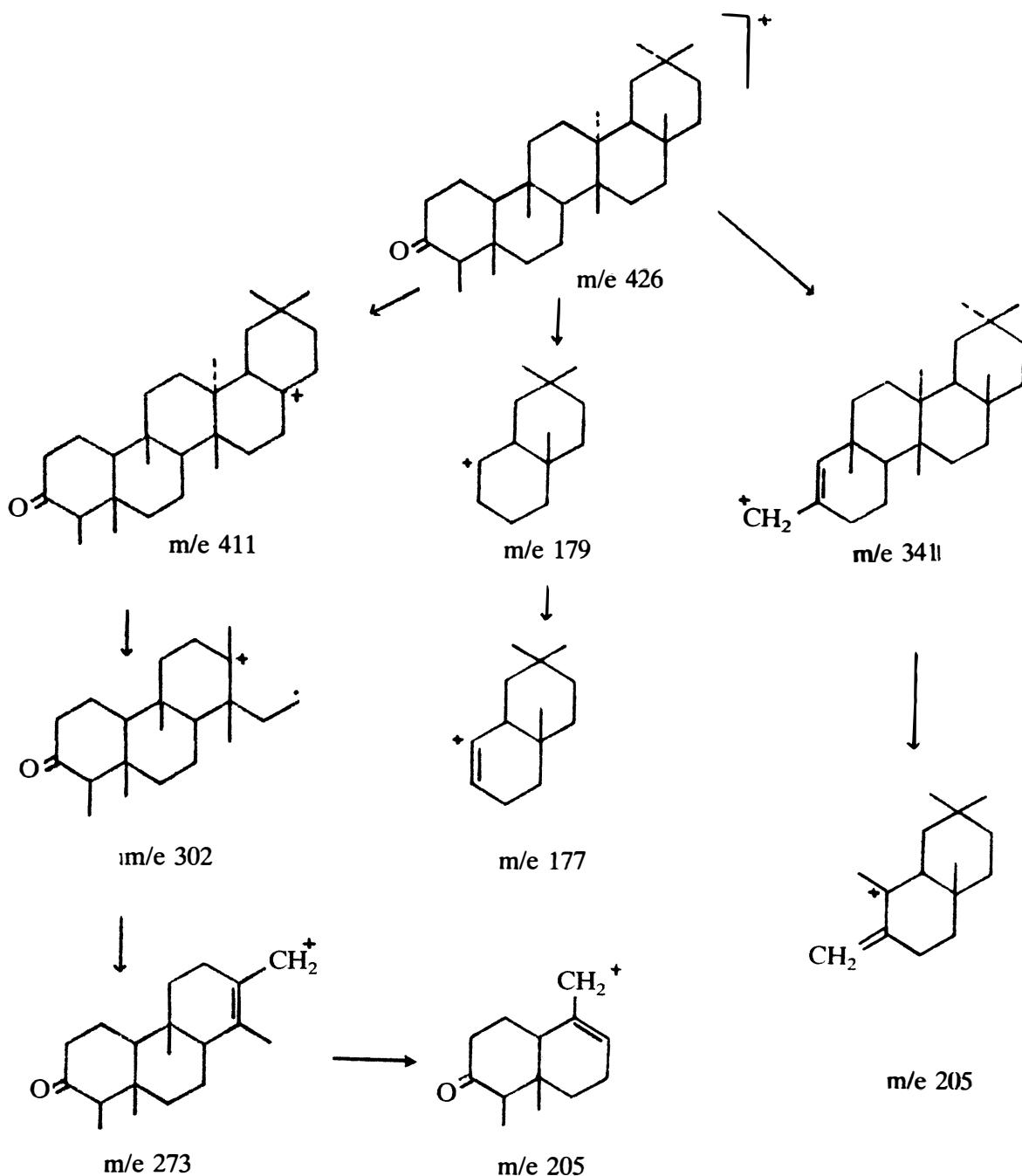
Con base en transformaciones químicas y evidencias espectroscópicas les fueron asignadas las estructuras Ia y Ib.



El compuesto Ia, p.f.; 268-270°C, fórmula molecular C₃₀H₅₀O, su espectro de masa mostró el ión molecular a m/e 426, peso éste que está de acuerdo con el aproximadamente esperado para un triterpeno. Además, este compuesto dió positiva la prueba de Liebermann-Burchardt. El patrón de fragmentación en el espectro de masa no mostró el pico correspondiente a la pérdida de una cadena lateral, demostrando que el compuesto Ia es un triterpeno pentacíclico, lo cual concuerda con su espectro de RMN-¹H, en el cual solamente se observa una señal doblete centrada en δ = 0.88 que integra para 3 protones con una constante de acoplamiento de 7.0 Hz típica de esta clase de protones. En este mismo espectro, se observan varias señales singuletes que aparecen entre 1.18 y 0.72 δ cuyas integrales muestra que son debidas a 21 protones, que en este caso, son los de 7 metilos. El espectro IR mostró una banda a γ max 1708 cm⁻¹ que puede asignarse para una cetona en un anillo saturado de seis miembros, posiblemente en el C-3 como se evidencia con la biogénesis de la mayoría de los triterpenos mono-oxigenados (18). Este hecho se puede comprobar con el espectro RMN-¹H, en el que se observan las señales características de los dos protones del carbono 2 (δ=3.33; y del protón en el carbono 4 (δ=2.22). Lo anterior fué confirmado por la presencia de los picos a m/e 302, 273 y 205 de los fragmentos que contienen el anillo A (figura 1) y por la obtención de Ia a partir de Ib (friedelin-3β-ol) por medio de oxidación con Cr₂O₃·H₂SO₄ (17). Más evidencias para la identificación del compuesto Ia, se lograron por su espectro de masa que es idéntico al espectro de-masa de la friedelina (19) y por el punto de fusión (268-270°C) el cual debido a la alta pureza del compuesto, mostró que es muy similar al más alto punto de fusión (266-269°C) reportado para la friedelina (20).

El segundo compuesto Ib que tiene un punto de fusión 286-289°C, fórmula molecular C₃₀H₅₂O, también dió positiva la prueba de Liebermann Burchardt. Su espectro IR en este caso mostró una banda en 3525 cm⁻¹ que debe ser ocasionada por un grupo hidroxilo, lo cual se puede comprobar en la región de 1123 cm⁻¹ en el mismo espectro y además mediante la reacción de acetilación a que fué sometido. El derivado acetilado (Ib-acetato) obtenido tiene un punto de fusión 302-304°C, una fórmula molecular C₃₂H₅₄O₂; su espectro de masa mostró el ión molecular a m/e 470. Al igual que el compuesto Ia, éste no mostró tampoco en el espectro de masa el pico correspondiente a la pérdida de una cadena lateral, demostrando así que el compuesto Ib es un triterpeno pentacíclico, que además en el carbono 4 tiene solamente un metilo como se puede comprobar con el espectro de RMN-¹H de Ib-acetato, en el cual se observa un doblete centrado a δ = 0.81 que integra para 3 protones con

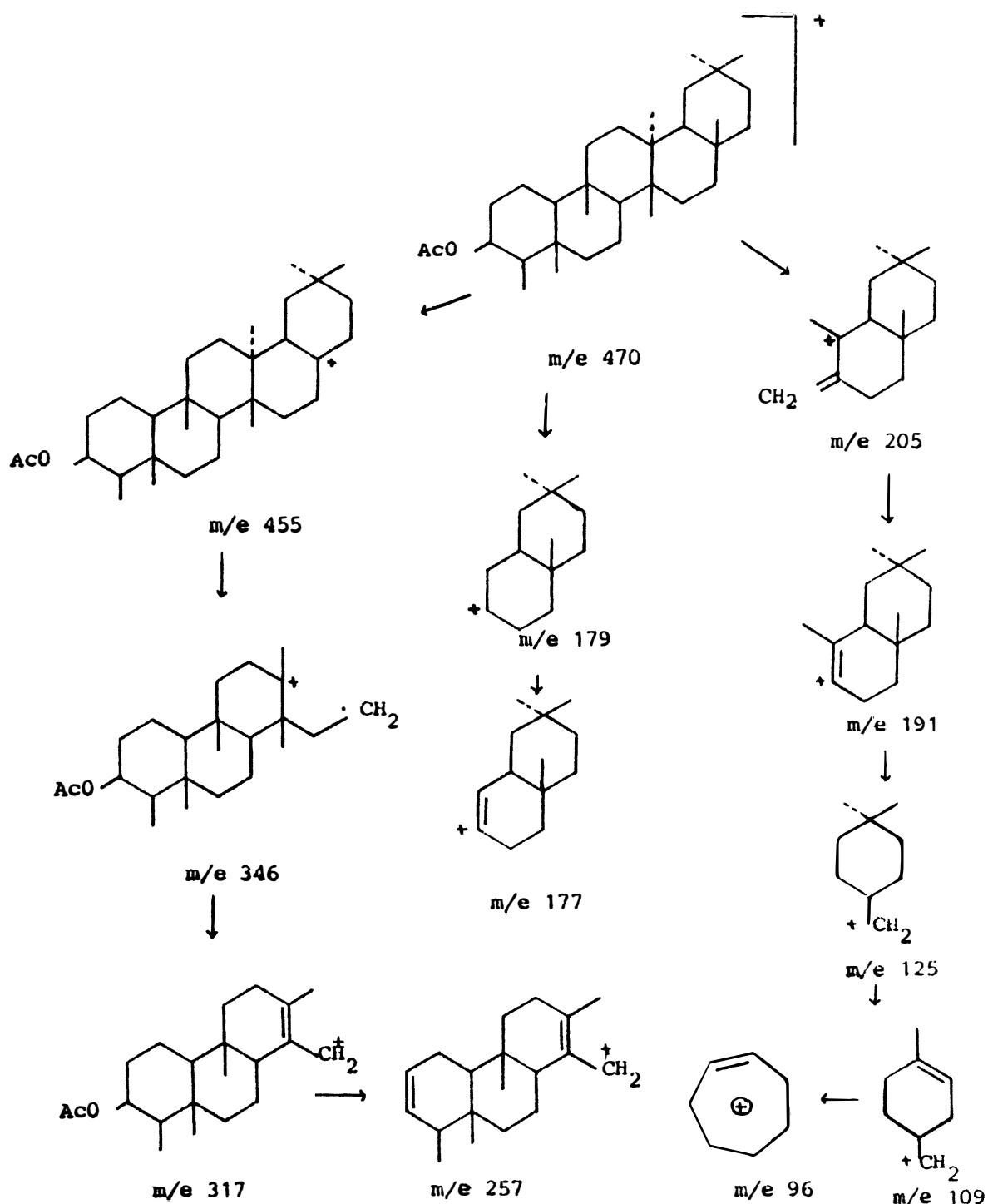
FIGURA 1: FRAGMENTACION DE MASA DE Ia.



una constante de acoplamiento de 7.0 Hz y un multiplete centrado a $\delta = 1.93$ que integra para un protón. Lo anterior junto con señales singuletes para 7 metilos indica que el compuesto Ib es un derivado del friedelano. El espectro IR de Ib-acetato, mostró una banda a $\nu = 1735$ (C=O) y $1245\ (\text{C-O})\text{cm}^{-1}$ que indica la presencia del grupo $-\text{OCOCH}_3$ y no muestra ninguna señal debido al grupo hidroxilo, poniendo en evidencia que el compuesto Ib se acetiló totalmente. Este grupo hidroxilo debe encontrarse en el carbono 3 como lo sugiere la biogénesis de estos triterpenos (18) y como se puede comprobar con el espectro

RMN- ^1H , en el cual se observa muy claramente en $\delta = 4.88$ la señal del protón geminal al grupo hidroxilo (ahora acetilado) cuyo desplazamiento químico, forma y anchura media, son los que usualmente se presentan para este tipo de protones (21,22). También el espectro de masa del compuesto Ib-acetato, mostró picos característicos a $m/e\ 410$ (24.8), 346 (4.0), 317 (29.9) y 257 (22.2%) (figura 2), indicando la presencia del grupo acetato en el anillo A, lo cual se confirmó por la obtención de la friedelina (compuesto Ia) por medio del reactivo de Jones ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$) (17), a partir del compuesto Ib.

FIGURA 2: FRAGMENTACION DE MASA DE Ib-ACETATO



Por otra parte, queda todavía por establecer si el compuesto Ib tiene configuración α o β en el carbono 3. Para aclarar esto, se recurrió a la gran diferencia que existe en el punto de fusión de los dos epímeros, ya que Ib tiene un punto de fusión 286-289°C que corresponde al punto de fusión del friedelan -3 β -ol (288-289°C). Pero no está de acuerdo con el punto de fusión del friedelan -3 α -ol (301-303°C) aislados de los tallos de *Castanopsis cuspidata* de la familia Fagaceae (23), lo cual indica que el compuesto Ib es friedelan-3 β -ol (epifriedelinol).

CONCLUSIONES

Por medio de la extracción y cromatografía en columna y en la capa fina sobre sílica gel fueron aislados dos compuestos de la corteza de *Clusia*

ellipticifolia Cuatr., los cuales se identificaron, con base en métodos químicos y espectroscópicos como friedelina (friedooleanan-3-ona) y epifriedelinol (friedooleanan-3 β -ol).

El haber encontrado por primera vez en la corteza de *Clusia ellipticifolia* Cuatr., la sustancia epifriedelinol, sugiere que puede ser un indicador biotaxonómico, ya que en ninguna otra especie se ha reportado hasta el momento, excepto en *Clusia rosea* de la flora Venezolana (16).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación y Desarrollo Científico (CINDEC) de la Universidad Nacional de Colombia, por la financiación del trabajo. Al Dr. Hernando García Barriga, del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, por la clasificación de la planta. Al Dr. P.J. Hylands, Pharmacy Department, Chelsea College, London University, por la colaboración prestada para obtener los espectros de RMN y masas de los compuestos.

BIBLIOGRAFIA

1. GARCIA BARRIGA, H., Flora Medicinal Colombina, Ed. 1, Tomo III, Imprenta Nacional, Bogotá, 208-217, 1975.
2. SUZUKI, O., KATSUMATA, Y., Oya, M., Chari, V.M., Klapfenberger, R., Wagner, H. and Hostettmann, K., Planta Médica, 39 (1), 19-23, 1980.
3. NAGESWARA RAO, K.V., NARASIMBA RAO, P.L., Indian J. Exp. Biol., 5 (2), 102-5, 1967.
4. GOTTLIEB, O.R., Tetrahedron, 22, (6), 1785-1788, 1966.
5. LOCKSLEY, H.D., MOORE, I., and Scheinmann, F., J. Chem. Soc. c, (23), 2186-90, 1966.
6. LOCKSLEY, H.D., MOORE, I., and Scheinmann, F., J. Chem. Soc. Org. 4, 430-2, 1966.
7. LOCKSLEY, H.D., MOOORE, I. and SCHEINMANN, F., J. Chem. Soc. C, 24 2265-9, 1966.
8. JACKSON, B., LOCKSLEY, H.D. and SCHEINMANN, F., J. Chem. Soc. Org., 2, 178-181, 1966.
9. HERBIN, G.A. JACKSON, B., LOCKSLEY, H.D., SCHEINMANN, F. and WOLSTENHOLME, W.A., Phytochemistry, 9 (1), 221-226, 1970.
10. JACKSON, B., LOCKSLEY, H.D., SCHEINMANN, F. and WOLSTENHOLME, W.A., J. Chem. Soc. C, 22, 3791-3804, 1971.
11. HARBORNE, J.B., Phytochemistry, 14 (5/6), 1331-1338, 1975.
12. DE ARAUJO, H.C., MAHAJAN, J.R., GOTTLIEB, O.R., MAGALHAES, M.T., An. Acad. Brasil Cienc., 38, (3, 4), 429-30, 1966.
13. SOMANATHAN, R. and SULTANBAWA, M.U.S., J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 15, 1935, 1972.
14. GUNASEKERA, S.P. and SULTANBAWA, M.U.S., J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 22, 2215-2220, 1975.
15. GONZALEZ G., CUELLAR, V., BETANCOURT, A. and PINZON, M.I., Phytochemistry, 22 (9), 2088-2090, 1983.
16. MATHUR, S.B., CHAVES, S., FERMIN, C.M., Int. Congr. essent. Oils, 6 th, 1974.
17. CURTIS, R.G., HEILBRON, S.I., JONES, E.R.H. and WOODS, G.F., J. Chem. Soc., 457, 1953.
18. ROBINSON, TREVOR, The Organic Constituents of Higher Plants, Third Edition, Cordus Press, North Amherst, Mass. 01059, 1975, p. 153.
19. BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J.M. and DJERASSI, C., J. Amer. Chem. Soc., 85, 3688, 1963.
20. FORTUNE KOHEN, A.S., SAMSAN, S.J. and STEVENSON, R., J. Org. Chem., 34, No. 5, 1355-58, 1969.
21. WOO, W.S. and KANG, S.S., J. Natural Products, 47, No. 3, 547-549 1984.
22. SHAMMA, M., GLICK, R.E. and MUMMA, R.O., J. Org. Chem., 27, 4512-17, 1962.
23. HUI, WAI-HAAN and LI, Man-Moon, Phytochemistry, 15, 427-29, 1976.