

CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMICO DE LAS LAURACEAS EN COLOMBIA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA PERSEA CAERULIA

*LUIS ENRIQUE CUCA SUAREZ

SUMARIO

De los extractos metanólicos de la corteza y tronco de la *Persea caerulia* (Laurácea), se aislaron y caracterizaron : (+) catequina, (-) epicatequina y la proantocianidinas B₁ y B₂. Igualmente se aisló B-sitosterol de las hojas.

INTRODUCCION

La familia de las Lauráceas ha sido estudiada principalmente Brasil, Chile y últimamente en Italia (especialmente los géneros *Nectandra* y *Ocotea*).

En este artículo se describe el estudio de una Laurácea del género *Persea*, solamente se conoce en el país el estudio de la *Persea gratissima*. La *Persea caerulia* es un árbol de 8 a 10 metros de altura, comúnmente llamado aguacatillo o cutapo, característico de clima templado. Generalmente se usa como poste para las cercas, ya que su madera es muy resistente a la humedad y al ataque de tipo biológico.

* Profesor Asistente, Sección Química Orgánica, Universidad Nacional de Colombia.

En la familia de las Lauráceas, se han encontrado diferentes clases de compuestos tales como: aceites esenciales, neolignanos, pironas, derivados de alilbenceno, cumarinas, chalconas, terpenos, ceras, grasas; esteroides en los géneros Aniba, Litsea, Potameia, Cassytha, Phoebe, Endlicheria. Flavonoides y triterpenos únicamente en el género Litsea, mientras que alcaloides (generalmente de tipo aporfínico y bisbencilisoquinoleínico) en los géneros Persea, Cryptocarya, Nectandra, Ocotea, Laurus y Cinnamomum. (1)

Como se puede observar, la familia de las Lauráceas es muy rica en productos químicos, muchos de los cuales son utilizados en la fabricación de productos farmacológicos.

P A R T E E X P E R I M E N T A L

La planta fué recolectada en el municipio de la Vega (Cundinamarca) y determinada por el botánico R. Jaramillo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

Extracción: Se hicieron extracciones con metanol de muestras secas y molidas de corteza (2 Kg), tronco (1.5 Kg) y hojas (3.5 Kg) y hojas (3.5 Kg) por maceración, obteniéndose los extractos correspondientes, los cuales fueron evaporados a presión reducida.

Fraccionamiento del extracto proveniente de la corteza en catequinas y proantocianidinas.

El extracto metanólico proveniente de la corteza (10.5%) fue extraído con acetato de etilo. A la fracción soluble se le llamó A y al residuo B. A se fraccionó por cromatografía en columna sobre celulosa, eluyendo con agua, controlando la separación por cromatografía de capa delgada, y utilizando vainillina-ácido clorhídrico, como revelador. Se obtuvieron 2.1 g de catequinas (fracción menos soluble) y 0.6 gr de proantocianidinas, los cuales se diferenciaron por sus Rf (2).

Separación de (+) catequina (I) y (-) epicatequina (III) :

La fracción constituida por catequinas (2.10 gramos) se sometió a cromatografía de columna en celulosa, usando como eluyente agua. De esta manera se obtuvieron 0.18 gramos de un compuesto I y 0.08 gramos de un compuesto II. Los compuestos fueron recristalizados en agua y presentaron las siguientes características :

Compuesto I: punto de fusión 249°C ; $[\alpha]_D^{20} = -67.8$ (acetona); Rf = 0.37 (agua). Análisis elemental : Encontrado : 62.88 % C, 4.8%, H, 32,25%O; calculado 61.96% C, 5.00% H, 33.94% O.

Compuesto II: punto de fusión : 178°C ; $[\alpha]_D^{20} = +15.3$ (acetona) Rf = 0.28 (agua). Análisis elemental : Encontrado : parecido al del compuesto I.

Los dos compuestos presentaron reacción positiva con el reactivo de Pauli. Tanto I como II se co-cromatografiaron con muestras patrones, correspondiendo I a (-) epicatequina y epicatequina y II a (+) catequina.

Metilación de catequinas :

Las catequinas (10 gr) fueron tratadas con 5 ml de diazometano (preparado a partir de p-toluensulfonitroso metilamida en éter) con agitación durante 3 horas y observando la finalización de la reacción por Cromatografía de Capa Delgada (C.C.D.).

Los derivados obtenidos se purificaron por cromatografía de columna en sílica gel, utilizando como eluyente benceno : acetona (9.1) y recogiendo fracciones de 30 ml, las cuales fueron examinadas por C.C.D., usando como revelador ácido sulfúrico-formaldehído-agua y calentado a 100°C. De esta manera, se obtuvieron 90.67 gramos de (+) catequina tetrametilada (III) y 0.43 gramos de (-) epicatequina tetrametilada (IV). Estas sustancias fueron recristalizadas en metanol obteniéndose los siguientes datos que concuerdan con los publicados por F. Delle Monache (3) :

Compuesto III : p.f. = 187°C.; $[\alpha]_D^{20} = +10$ (acetona); IR (KBr cm^{-1}) 3610, 1681; UV (EtOH) $\lambda_{\text{max}} = 272$ nm ($\log \epsilon = 3.4$) con adición de NaOH 0.5 N, 290; RMN (60 MHz δ) 1.75 (s, OH-3); 1.95 (d, J = 3.2 Hz; 2H-4); 3.85 (s, 4-OCH₃); 4.5 (s, H-2); 6.2 (c, J = 2.4 Hz, H-6, H-8); 7.10 - 7.30 (m, H-3, H-5', H-6').

Compuesto IV : p.f = 157°C.; $[\alpha]_D^{20} = 63^{\circ}$ (acetona); IR(KBr) 3640, 1683 (OH); UV (EtOH) = 226 (log $\epsilon = 4,2$), con adición de NaOH 0.5N, 292; RMN (60 Mz, δ) : 1.80 (s, OH, 3); 2.85 (d, CH₂, 2H-4); 3.75 (s, 4-OCH₃); 4.9 (s, H-2); 4.68 (s, H-3); 6.15 (d, J = 2.4 Hz, H-5, H-6); 6.9-7.0 (m, H-3, H-5', H-6')

En ambos casos el pico debido al-OH desaparece al correr el espectro con agua deuterada.

Acetilación de catequinas :

Tomando otra parte de la mezcla de catequinas, se trató (10 g) con anhídrido acético y piridina durante 8 horas con agitación, con el objeto de acetilar todos los grupos -OH de la molécula y luego se dejó reposar por 6 horas. Los derivados acetilados se separaron por cromatografía de columna en sílica gel, utilizando como eluyente cloroformo : metanol (95:5). Estos compuestos se recrystalizaron en mezcla de metanol- agua y presentaron las siguientes características :

Compuesto V : (pentaacetil (-) epicatequina: p.f. = 153°C.; $[\alpha]_D^{20}$ (metanol) = 14.9 RMN (60 MHz, CDCl₃, δ) : 1.95 (s, OAc alifático C-3) ; 2.30 (s, 4-O Ac aromáticos) 3.10 (d, CH₂-4); 5.10 Ks, H-2); 5.40 (s, H-3); 6.75 (s, H-6, H-8); 7.3-7.6 (m, H-2', H-5', H-6')

Compuesto VI : (pentaacetil (+) catequina) : p.f. = 181°C.; $[\alpha]_D^{20}$ (metanol) = + 10.3; RMN (60 MHz, CDCl₃, δ) : 2.19 (s, -OAc alifático); 2.30 (s, 4-OAc aromáticos); 2.75 (m, CH₂, 2H-4), 5.30 (s, H-2); 5.43 (s, H-3); 6.70 (d, H-6, H-8); 7.35-7.70 (m, H del anillo B).

Degradación de catequinas :

Se trataron respectivamente 0.8 gramos de catequina y 9.10 gramos de epicatequina con KOH 6N en metanol bajo reflujo durante 12 horas, seguido de hidrólisis ácida (4).

Los productos de esta reacción se purificaron usando cromatografía de columna. El compuesto fenólico y el ácido puros así obtenidos, presentaron las características del fluoroglucinol (VII) y del ácido 3,4 dihidroxibenzoico.

Compuesto VII: p.f. = 221°C., coloración roja con FeCl₃ en piridina, decoloración del agua de bromo; IR (KBr en cm⁻¹): 31.70, 2850 ,

1750, 1390, 1285, 1190, 960, 835, 780; RMN (60 MHz, CDC13, δ): 5.90 (s); 3.55 (s); 8.70 (s).

Compuesto VIII: p.f. = 201°C., reacción positiva con NaHCO₃ e hidroxamato férrico; IR (KBr, cm⁻¹): 2900, 1850, 1700, 1590, 1470, 1250, 1090, 950, 770.

Tosilación de las catequinas:

Se trataron 0.5 gramos de catequinas, previamente metilados, con cloruro de p-toluensulfónico TsCl en piridina (3) la mezcla se refluxó durante 5 horas con lo cual se obtuvo 5, 6, 3', 4'-tetrametoxi-2-(p-tolilsulfonato)-catequina. Este compuesto se recristalizó en diclorometano, dando cristales blancos de p.f. = 181-8°C.

Identificación de proantocianidinas:

La purificación de la fracción constituida por proantocianidinas (0.6 gramos), por cromatografía de columna en celulosa, usando agua como eluyente produjo 0.4 gramos de proantocianidina B1, 0.09 gramos de proantocianidina B2. Las otras dos proantocianidinas que componían la mezcla inicial no se pudieron separar debido a que sus R_f eran muy parecidos, lo que está de acuerdo con lo reportado por F. Delle Monache et al (5).

La proantocianidinas B1 y B2 fueron comparadas cromatográficamente con patrones auténticos obtenidos anteriormente por Marine Bettolo et al (6).

Obtención de catequinas y proantocianidinas del extracto proveniente del tronco:

El extracto proveniente del tronco fue purificado por cromatografía de columna en sílica gel, usando como eluyente acetato de etilo. Se recogieron fracciones de 100 ml, las cuales se estudiaron por C.C.D., usando como reveladores vainillina-ácido clorhídrico y ácido sulfúrico-formaldehído-agua. Al agrupar las fracciones que presentaban similitud, se obtuvieron 2.5 gramos de catequinas, 1.2 gramos de proantocianidinas y 0.9 gramos de mezcla de ácidos grasos; estos últimos no se identificaron.

Aislamiento de β -sitosterol del extracto proveniente de las hojas:

El extracto proveniente de las hojas, fue lavado con éter de

petróleo, obteniéndose un extracto etéreo (p.93%), el cual purificó por cromatografía de columna, obteniéndose abundante cantidad de clorofilas y dos sólidos blancos correspondientes a un ácido graso y al B-sitosterol p.f. = 137°C.

Estudio tentativo del extracto B proveniente de la corteza :

La fracción insoluble en acetato de etilo ó fracción B (206 gramos) fue extraída con cloroformo y luego con acetona, quedando un residuo soluble en metanol. El extracto clorofórmico se purificó por cromatografía de columna, obteniéndose clorofilas y un sólido blanco (1,3%) de punto de fusión 145-148°C, al cual se le realizaron los siguientes ensayos químicos cualitativos :

- a) Tratamiento del sólido blanco con (cloroformo + anhídrido acético + ácido sulfúrico) dió una coloración verde.
- b) Una solución clorofórmica de esta sustancia con ácido tricloro-acético, dió un color morado.
- c) A una solución del sólido blanco se le agregó cloruro de Zinc y al calentar se observó un color naranja.

Todos los reactivos anteriores están reportados por J.R. Hanson (7) para esteroides. Mediante una comparación de los datos de IR y RMN con los reportados por Hanson, se concluyó que el sólido blanco corresponde a una mezcla de esteroides.

IR (KBr, cm^{-1}) : 3680, 3030, 2815, 1635, 1450, 1380, 1350, 800, RMN (60MHz, CDCl_3 ,) 0.70, 0.8, 1.4, 3.5, 4.3 4.8 (-OH).

El extracto acetónico (2.3 gr) se purificó por cromatografía de columna en silica gel, obteniéndose dos productos que no se identificaron, pero dieron las siguientes pruebas generales para polifenoles (8) :

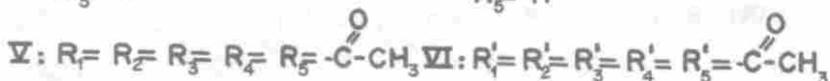
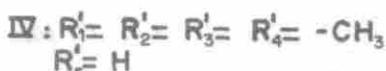
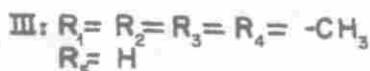
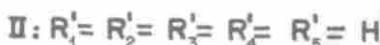
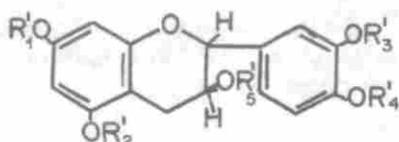
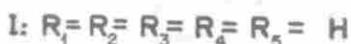
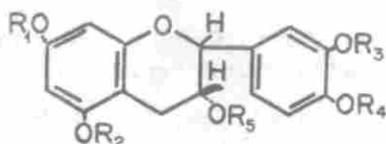
- a) color morado con el reactivo de Pauli
- b) color rojo con cloruro férrico en metanol
- c) color rojo con ácido sulfúrico-formol (aromaticidad)

El extracto metanólico es insoluble en casi todos los solventes orgánicos y posiblemente está constituido por lignanos poliméricos y taninos. Esta fracción no fué estudiada.

Discusión.

Estructura de las catequinas I y II:

Por las características obtenidas y mediante comparación cromatográfica con patrones auténticos (1) se pudo deducir que los compuestos I y II corresponden a (-) epicatequina (I) y a (+) catequina (II). Los datos obtenidos para estos compuestos están de acuerdo a los reportados por F. Ferrari et al (9).



Las características de los derivados obtenidos por metilación (III y IV) concuerdan con los reportados por F. Delle Monache (2). A los derivados acetilados se les asignó las estructuras V y VI con base en las constantes físicas y los dos espectros de RMN los cuales presentaron señales en 3.10 y 2.75 δ respectivamente. Según F. Ferrari (10) para las (+) catequina pentaacetilada (VI) la señal apareció como un octeto y para las (-) epicatequina pentaacetilada (V) como un doblete.

Las características de los derivados anteriores y el hecho de haber obtenido como productos de descomposición el floroglucinol y el ácido 3,4-dihidroxibenzoico corroboran las estructuras I y II asignadas a las catequinas aisladas.

Estructuras de las proantocianidinas:

Las proantocianidinas por comparación directa con patrones (co-cromatografía) corresponden a la siguiente fórmula (5,11).



AGRADECIMIENTO

Este trabajo forma parte del proyecto : "Estudio Químico de las lauráceas en Colombia, patrocinado por Colciencias". (Co-010-1-54-74).

BIBLIOGRAFIA

1. O.R. GOTTLIEB, *Phytochemistry* 11, 1537 (1972).
2. E.C. BATE-SMITH, *Biochem. J.*, 58, 122 (1954).
3. F. DELLE MONACHE, L.L. D' Albuquerque, *Annali Di Chimica*, 57, (1967).
4. F. DELLE MONACHE y G.B. METTOLO, *Annali di Chimica*, 57,964-71 (1967).
5. F. FERRARI y F. DELLE MONACHE, L.L. D' Albuquerque, *Il Farmaco Ed. Sci.* 25, 96 (1970).
6. F. DELLE MONACHE, y F. FERRARI y G. B. MARINI BETTOLO, *Gazzetta Chimica Italian*, 101, 387-395 (1971).
7. J.R. HANSON, "Introduction to steroid Chemistry" Ed. Pergamon Press, 1968 Cap. 2.
8. X. DOMINGUEZ, "Métodos de investigación fitoquímica" Ed. Limusa, México, 1973, Pág. 127.
9. F. FERRARI y G. B. MARINI BETTOLO, *Il Farmaco Ed. Sci.* 29, 551 (1974).
10. F. FERRARI, *Gazz. Chimm. Ital.*, 103, 97 (1974).
11. G. B. MARINI BETTOLO, *Pontifica Academia Scientiarum-Commentarii* II, N° 42, 1-16 (1972).