

CONSTITUYENTES DE AGERATINA ARBUTIFOLIA (BENTH) KING AND ROBINSON (COMPOSITAE)

Cecilia Espitia de Pérez y Juan B. Cocunubo

Departamento de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de
Colombia, Bogotá, Colombia.

Keywords: *Ageratina arbutifolia*, Compositae, (–)Kaur-16-en-19-oic acid, 2-Hydroxy-6-methoxy benzoic acid, 5-Hydroxy-6-methoxy coumarin.

RESUMEN

Del extracto etanólico de las hojas de *Ageratina arbutifolia* se aislaron tres compuestos correspondientes a los ácidos (–) Kaur-16-en-19-oico y 2-Hidroxi-6-metoxi benzoico y a la 5-Hidroxi-6-metoxi cumarina. Las estructuras fueron determinadas con base en los estudios espectroscópicos y químicos. Por metilación exhaustiva de los ácidos se obtuvieron el Kaur-16-en-19-oato de metilo y el 2,6-Dimetoxi benzoato de metilo.

ABSTRACT

Three compounds were isolated from the ethanolic extract of *Ageratina arbutifolia*. These were characterized by spectroscopic and chemical data as: (–) Kaur-16-en-19-oic acid, 2-Hydroxy-6-methoxy benzoic acid and 5-Hydroxy-6-methoxy coumarin. Methylation of isolated acids compounds yielded Methyl kaur-16-en-19-oate and Methyl 2,6-dimethoxy benzoate.

INTRODUCCION

La química del género *Ageratina* (Compositae) ha sido ampliamente estudiada en los últimos años. De muchas especies pertenecientes a este género se han aislado diversos tipos de compuestos, principalmente sesquiterpenos (entre ellos lactonas), díperpenos, cromenos, flavonoides y derivados de timol (1-18). El estudio químico de este género presenta especial interés tanto desde el punto de vista taxonómico, como desde el punto de vista biológico, por la posible actividad que pueden presentar algunos de los metabolitos propios de este género.

La especie *Ageratina arbutifolia*, objeto de este estudio, crece como maleza en nuestro territorio y de ella no se conocen estudios químicos previos. De la fracción soluble en cloroformo se aislaron tres compuestos cuyas estructuras corresponden a un ácido kaurénico, a un derivado del ácido benzoico y a una cumarina.

RESULTADOS Y DISCUSION

La fracción soluble en cloroformo, proveniente del extracto etanólico de las hojas de *A. arbutifolia*, se sometió a purificación por cromatografía, obteniéndose tres compuestos, cuyas estructuras se discuten a continuación:

Acido (-) Kaur-16-en-19-oico (I)

El compuesto I presenta características de diterpeno con base en su espectro RMN¹H y su fórmula empírica C₂₀H₃₀O₂ (M^t 302 y análisis elemental). Su espectro IR presenta señales típicas de ácido carboxílico, 1.690 cm⁻¹ (C=O) y 3.400-3.600 cm⁻¹ (OH). El RMN¹H presenta una señal a 12 ppm que integra para un protón, intercambiable con deuterio, correspondiente al hidroxilo del grupo carboxílico. Se detecta la presencia de metileno terminal por las señales a 3.070 y 1.650 cm⁻¹ en el IR y 4.75 ppm en el RMN¹H que integra para dos protones. Las otras señales de RMN¹H muestran dos grupos metilos a 0.98 y 1.26 ppm; protones metínicos y metilénicos no terminales por las señales entre 1.6 - 2.6 ppm que integran para 21 protones.

El EM presenta señales m/z a: 302 (67%) asignable al ión molecular y las correspondientes a M⁺ - 15; M⁺ - 43; M⁺ - 45; M⁺ - 46; explicables por pérdidas de ¹⁵CH₃, ⁴³C₃H₇, ⁴⁵COOH y [H₂O + CO] del ión molecular respectivamente.

La metilación exhaustiva del compuesto I con diazometano produce el compuesto II. Comparando los espectros de I y II se observa para el compuesto II en el RMN¹H ausencia de la señal correspondiente al hidroxilo (señal a 12 ppm) y la presencia de un grupo metoxilo, por la aparición de una nueva señal a 3.59 ppm que integra para tres protones. En el IR de II se observa desplazada la señal del carbonilo a 1.715 cm⁻¹, debida al C=O del éster.

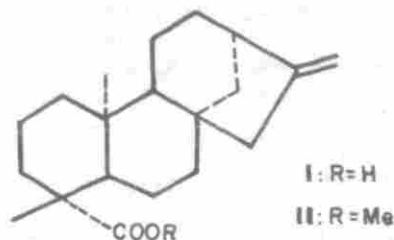


Fig. 1

El anterior análisis permite concluir que el compuesto I corresponde a un ácido monocarboxílico, diterpénico con un metileno terminal y dos grupos metílicos. Los datos espectroscópicos, las constantes físicas (punto de fusión y rotación específica) y pruebas cualitativas (prueba de Bayer) coinciden con las reportadas (19) para la estructura I (Fig. 1). Así mismo, las características de II (Fig 1) corresponden a las de su éster metílico.

Estudios relacionados con su actividad biológica mostraron que este ácido inhibe el crecimiento de bacterias tales como *Staphilococcus aureus* y *Candida albicans* (19). Pocas especies del género *Ageratina* se han caracterizado por contener diterpenos (11) y el compuesto I no se presenta comúnmente en este género.

Acido 2-Hidroxi-6-metoxibenzoico (III)

El compuesto III corresponde a una molécula aromática, con base en sus características espectroscópicas (UV 209, 250 nm; RMN¹H 6.6 - 7.5 ppm). Se deduce la presencia de un ácido carboxílico por su alta solubilidad en solución de bicarbonato de sodio y su IR característico con señales a 3.400-3.500 y 3.150 cm⁻¹, correspondientes a hidroxilos y a 1.685 asignable a carbonilo de un grupo carboxílico. El RMN¹H indica la presencia de un metoxilo por la señal simple observada a 4.10 ppm que integra para tres protones y la presencia de un hidroxilo por la señal a 5.75 ppm que integra para un protón y que se intercambia con deuterio.

El EM muestra un ión molecular m/z 168, compatible con una fórmula empírica C₈H₈O₄, confirmada por el análisis elemental y concordante con la estructura del ácido benzoico disustituido por un metoxilo y un hidroxilo. El RMN¹H indica un patrón de sustitución 1,2,3 para el anillo aromático: se observa una señal triple a 7.45 ppm que integra para un protón con acoplamiento orto a otros dos protones no equivalentes, que se presentan como un par de dobletes, con desplazamientos de 6.70 y 6.58 ppm. El EM muestra señales correspondientes a las pérdidas de H₂O, [H₂O + CO], [H₂O + CO + Me] del ión molecular, entre otras. El hecho de presentar una señal muy intensa (98%) para el ión correspondiente a [M⁺ - H₂O] indica que el hidroxilo debe encontrarse en posición orto al carboxilo.

Con base en el análisis anterior se tiene como posibles dos ordenamientos que corresponden a las estructuras III y IV (Fig. 2); sin embargo se descarta la estructura IV por los resultados de la metilación exhaustiva. El espectro RMN¹H del compuesto metilado V (Fig. 2) muestra la presencia de tres metoxilos y la equivalencia de los protones H₃ y H₅; equivalencia que no se presentaría con la metilación de la estructura IV, ya que en este caso se produciría el producto VI.

La anterior conclusión queda confirmada por la coincidencia de sus constantes físicas con las publicadas en la literatura (20). El compuesto III se conoce como producto de síntesis y su presencia en la naturaleza es rara. Sin embargo este metabolito estaría relacionado con el compuesto VII y análogos (Fig. 3), aislados

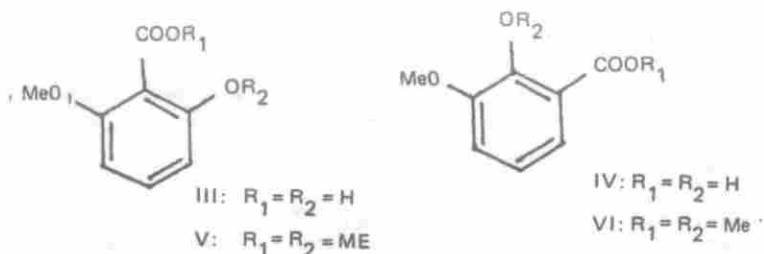


Fig. 2

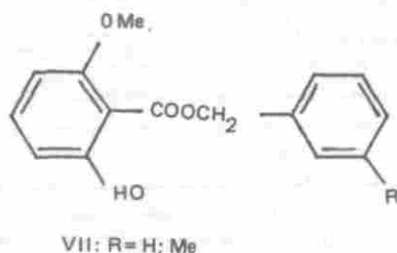


Fig. 3

de las especies *Ageratina petiolaris* (3), *A. anisochroma* (12) y (*A. dendroides* (2).

7-Hidroxi-6-metoxicumarina (VIII)

El tercer compuesto obtenido presenta las características propias de las cumarinas. Produce fluorescencia azul cuando se le expone a la luz UV. El espectro UV presenta máximos a 344 y 296 nm, asignables a los anillos piránico y bencénico. Otros máximos a 260, 252 y 228 nm, concuerdan con los espectros típicos de las cumarinas. El hecho de presentar a 344 y 228 nm las bandas más intensas ($\epsilon = 12.019$ y 13.824 respectivamente); lo mismo que a 260 y 252 nm, bandas de intensidad similar ($\epsilon = 4800$ y 5.136 respectivamente) indican la posible estructura de una cumarina 6,7-dioxigenada (23).

El espectro de masas muestra un ión molecular a m/z 192, lo que permite deducir una fórmula empírica $C_{10}H_8O_4$, concordante con una cumarina sustituida por un hidroxilo y un metoxilo. La señal obtenida a m/z 177 (70%), explicable por una pérdida de CH_3 del ión molecular, permite concluir que el metoxilo se encuentra en la posición 6, ya que esta fragmentación está favorecida (por la formación del sistema p-quinóide, de estabilidad alta) frente a la fragmentación obtenida por la pérdida de CO, del ión molecular m/z 164 (35%) (Fig. 4) (24).

Del análisis anterior se deduce que la estructura de la cumarina debe corresponder a la 5-Hidroxi-6-metoxicumarina (VIII) (Fig. 4), hecho corroborado por la

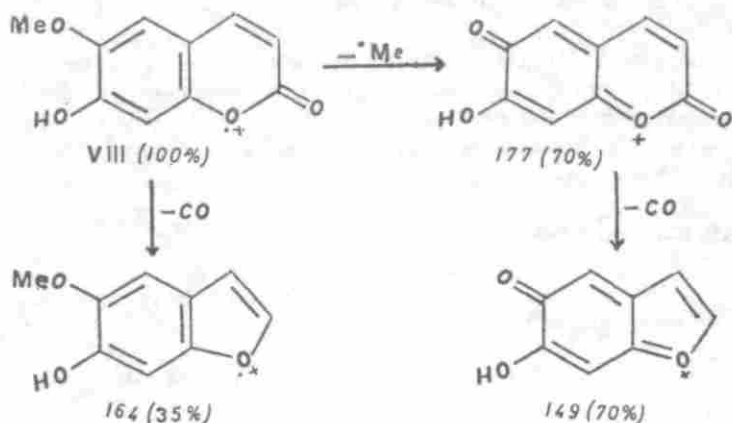


Fig. 4

coincidencia con los datos espectroscópicos y constantes físicas publicadas para este compuesto (24, 25). Las cumarinas y en particular ésta, no aparecen entre los metabolitos aislados del género *Ageratina*; aunque sí se encuentran en otros géneros de *Asteraceae* y entre ellos *Eupatorium*, dentro del cual había sido ubicada, anteriormente, la especie aquí estudiada.

PARTE EXPERIMENTAL

La planta fue recolectada en los alrededores de la laguna El Sisga, Cundinamarca, a 2.040 m de altura sobre el nivel del mar y determinada por R. Jaramillo (Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia). Un ejemplar reposa en el Herbario Nacional bajo el número COL 204124.

Extracción y purificación de los compuestos I, III y VIII

La planta recolectada se secó al aire. Las hojas (2 Kg) se molieron y se extrajeron con etanol en soxhlet durante 48 horas. El etanol se evaporó a presión reducida y el extracto obtenido se redisolvió en el mínimo volumen de etanol caliente y se agregó un volumen igual de agua. Se dejó en reposo 24 horas, al término de las cuales se separó el flóculo formado, obteniéndose un filtrado de color café. El filtrado se concentró a presión reducida y se extrajo con cloroformo. La fracción clorofórmica seca se evaporó a presión reducida. Esta fracción (30g) se separó por CC de sílica gel (700 g) utilizando como eluyente cloroformo. Se separaron tres compuestos:

compuesto I (200 mg), se cristalizó en etanol; el compuesto III (50 mg), en n-hexano; el compuesto VIII, purificado por una nueva cromatografía (15 mg).

La pureza de los compuestos se controló por C.C.D.

Obtención de los ésteres metílicos de I y III

Los compuestos I y III (20 mg) disueltos en éter se trataron con exceso de diazometano, obteniéndose los compuestos II y V. El derivado II fue purificado por cromatografía en columna de sílica (benceno - metanol) y el V por cristalización de n-hexano. A continuación se presentan las propiedades de los compuestos aislados y de los derivados obtenidos:

I. Acido (-) Kaur-16-en-19-oico:

pf 175°C; $[\alpha]_D^{20} = -99.3$ (c= 1.06 CHCl₃). Prueba de Bayer positiva. Con ácido sulfúrico toma coloración rojo intensa.

IR (KBr) cm⁻¹: 3.400 - 3.600, 3.070, 2.990, 2.850, 1.690, 1.650, 1.430 - 1.480, 1.260, 875.

RMN¹H (60Mz, CC l₄) δ: 12 (1H); 4.75 (2H); 2.63, 2.3, 2.05, 1.82, 1.57 (21H); 1.26 (s, 3H); 0.98 (s, 3H).

EM (70eV) m/z (int. relativa): 302 (67), 287 (58), 259 (100), 257 (23), 256 (24), 243 (76), 187 (38), 148 (43), 131 (100), 123 (35), 121 (42), 119 (42), 109 (42), 105 (48).

Análisis elemental: encontrado: 79.53% C, 10.08% H, 10.39% O; calculado para C₂₀H₃₀O₂: 79.47% C, 9.93% H, 10.60% O.

II. (-) Kaur-16-en-19-oato de metilo:

IR (KBr) cm⁻¹: 1.715, 1.655, 1.230, 1.150, entre otras.

RMN¹H (60Mz, CDCl₃) δ: 4.85 (2H); 3.59 (s,3H); 2.70 - 1.55 (varias señales anchas; 21H); 1.15 (s,3H); 0.85 (s,3H).

III. Acido 2-Hidroxi-6-metoxibenzoico:

pf 134-135°C; soluble en bicarbonato de sodio al 5%.

UV (MeOH) λ nm (ε): 209 (11.216); 250 (10.412); 310 (4.495).

IR (KBr) cm⁻¹: 3.400 - 3.600, 3.150, 2.950, 2.820 (bandas anchas); 1.685, 1.615, 1.575, 1.455, 1.395, 1.320, 1.235.

RMN¹H (60Mz, CD₃COCD₃+DMSO) δ: 7.45 (t, J= 9Hz, 1H); 6.70 (dd, J= 9Hz, 1H); 6.58 (dd, J= 9Hz, 1H) J_m: no calculadas por baja resolución; 5.75 (m, 1H); 4.10 (s,3H).

EM (70eV) m/z (int. relativa): 168 (29); 150 (98); 122 (55.8); 107 (100); 79 (14.3); 51 (9); 39 (10).

Análisis elemental: encontrado: 57.14% C, 4.76% H, 38.10% O; calculado para $C_8H_6O_4$: 57.05% C, 4.81% H; 38.14% O.

IV. 2,6-Dimetoxi-benzoato de metilo:

RMN¹H (60Mz, CCl_4) δ : 3.78 (s, 9H); 6.43 (d, J = 9 Hz, 2H); 7.14 (t, J = 9 Hz, 1H), entre otras.

VIII. 5-Hidroxi-6-metoxi cumarina:

pf 204°C.

IR (KBr) cm^{-1} : 3.310, 2.915, 1.690, 1.600, 1.560, entre otras UV (MeOH) λ nm (ϵ): 344 (12.019), 296 (5.568), 260 (4.800), 252 (5.136), 228 (13.824).

EM (70eV) m/z (int. relativa): 192 (100%), 177 (70%), 164 (35%) 149 (70%), 121 (35%), 105 (8%), 81 (15%), entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias a la financiación del Comité de Investigación y Desarrollo de la Universidad Nacional y al Programa II Expedición Botánica.

BIBLIOGRAFIA

1. S. Banerjee, J. Jakupovic, F. Bohlmann, R.M. King and H. Robinson, *Phytochemistry*, **24**, 2681 (1985).
2. F.R. Melek, D.A. Gage and T.J. Mabry, *J. Nat. Prod.*, **48**, 331 (1985).
3. F. Bohlmann, S. Banerjee, C. Wolfrum, J. Jakupovic, R.M. King and H. Robinson, *Phytochemistry*, **24**, 1319 (1985).
4. N. Fang and T.J. Mabry, *J. Nat. Prod.*, **49**, 738 (1986).
5. N. Fang, S. Yu and T.J. Mabry, *Phytochemistry*, **25**, 2684 (1986).
6. J. Romo, T. Rios and L. Quijano, *Tetrahedron*, **24**, 6087 (1987).
7. S. Yu, N. Fang and T.J. Mabry, *J. Nat. Prod.*, **49**, 1178 (1986).
8. V.M. Hernández, R. Miranda, M. Martínez and J. Nathan, *J. Nat. Prod.*, **49**, 1173 (1986).
9. S. Yu, N. Fang and T.J. Mabry, *Rev. Latinoamer. Quim.*, **18**, 20 (1987).
10. N. Fang and T.J. Mabry, *Phytochemistry*, **27**, 283 (1988).
11. N. Fang, S. Yu, T.J. Mabry, K.A. Abboud and S.H. Simonsen, *Phytochemistry*, **27**, 3187 (1988).

12. G. Tamayo-Castillo, J. Jakupovic, F. Bohlmann, A. Rojas, V. Castro and R.M. King, *Phytochemistry*, **27**, 2893 (1988).
13. N. Fang, S. Yu, and T.J. Mabry, *Phytochemistry*, **27**, 1902 (1988).
14. A. Morales Méndez and C. Rosquete, *Rev. Latinoamer. Quim.*, **19**, 47 (1988).
15. P. Proksch, L. Witte and V. Wray, *Phytochemistry*, **27**, 3690 (1988).
16. G. Tamayo-Castillo, J. Jakupovic, F. Bohlmann, V. Castro and R.M. King, *Phytochemistry*, **28**, 139 (1989).
17. C.E. de Pérez, A.M. Roa y Y. Castelblanco, *Rev. Colombiana de Quim.*, **10**, 17 (1980).
18. C.E. de Pérez y A.M. Céspedes, *Rev. Colombiana de Quim.*, **13**, 49 (1984).
19. S.B. Mathur, P. García Tello, C. Marciano-Fermin and V. Mora-Arellano, *Rev. Latinoamer. Quim.*, **6**, 201 (1975).
20. J.R.A. Pollock and R. Stevens (editores), "Dictionary of Organic Compounds", 4 ed., Eyre and Spottiswoode Publ., London, 1965, V.2.
21. F. Bohlmann, J. Jakupovic und M. Lonitz, *Chem. Ber.*, **110**, 301 (1977).
22. F. Bohlmann und M. Grenz, *Chem. Ber.* **110**, 1321 (1977).
23. R.D.H. Murray, J. Méndez and S.A. Brown, John Wiley, N.Y., 1982, p. 29.
24. *Ibid.* p. 47.
25. *Ver Ref.* 20, V.5.