

FLAVONOIDES GLICOSIDICOS DE *Ageratina arbutifolia*

Cecilia Espitia de Pérez* y Ever Villegas Molina.

*Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Keywords: *Ageratina arbutifolia*, flavonoid glycosides, quercetagine-6-methoxy-3-O- β -galactoside, quercetine-3-O- β -galactoside.

RESUMEN

De la fracción soluble en agua, proveniente del extracto etanólico de la hojas de *Ageratina arbutifolia*, se aislaron los glicósidos: quercetagina-6-methoxy-3-O- β -galactósido **1** y quercetina-3-O- β -galactósido **2**. Sus estructuras fueron determinadas con base en sus datos espectroscópicos y los de sus agliconas. El compuesto **1** es de rara ocurrencia en la naturaleza. El presente trabajo complementa sus datos espectroscópicos.

ABSTRACT

From the aqueous fraction of the extract of *Ageratina arbutifolia* leaves, two glycosides were isolated. They were identified as quercetagine-6-methoxy-3-O- β -galactoside **1** and quercetine-3-O- β -galactoside **2**. Their structures and the structures of the aglicones, were elucidated by spectroscopic data. The occurrence of **1** is rare in nature; in addition we extended its spectroscopic data.

INTRODUCCION

El extenso género *Ageratina*, tribu *Eupatoriae* (*Asteraceae*) está distribuido principalmente en América Tropical. Se han estudiado aproximadamente 33 especies y entre los compuestos aislados se encuentran los flavonoides con alto grado de oxigenación.

En un trabajo previo con esta especie (1), se han aislado tres compuestos del extracto clorofórmico, los cuales fueron caracterizados como los ácidos

(-)-Kaur-16-en-19-oico, 2-Hidroxi-6-metoxibenzoico y la 7-hidroxi-6-metoxi-cumarina.

Como continuación del estudio químico con esta especie, el presente trabajo comprende el análisis de la fracción polar, de la cual se aislaron dos flavonoides glicosídicos. Estos compuestos no han sido aislados previamente del género *Ageratina*, constituyéndose éste el primer reporte de flavonoides de *A. arbutifolia*.

PARTE EXPERIMENTAL

La especie *Ageratina arbutifolia* (Benth) King & Robinson, se recolectó a 2.040 m de altura sobre el nivel del mar. Un ejemplar reposa en el Herbario Nacional. COL 204124.

Obtención de los compuestos 1 y 2

Las hojas secas (100 g), se molieron y se extrajeron según la metodología previamente descrita (1). El residuo insoluble en cloroformo se llevó a sequedad, se suspendió en agua y se extrajo exhaustivamente con cloroformo y acetato de etilo. La fracción acuosa se liofilizó (17 g) y se separó por CC de vacío continuo. Silica Gel; AcOEt-MeOH-H₂O (75:15:10), efectuando gradiente de elución hasta finalizar con MeOH 100%. Las fracciones de interés (por su contenido en flavonoides) se recromatografiaron sucesivamente en CC de Sephadex LH-20, MeOH; RP-18, H₂O-MeOH, obteniéndose por liofilización un sólido amarillo, que se presentaba como un compuesto homogéneo en diversos sistemas cromatográficos; pero que en CCDB: Celulosa. TBA (60:20:20) y AcOH 15%, se detectó la presencia de dos componentes. Estos se separaron por CCDP: Celulosa. Fenol saturado con agua. Se obtuvieron 20 mg de **1** y 15 mg de **2**. Estos compuestos se analizaron espectroscópicamente.

Hidrólisis de los compuestos 1 y 2

Los compuestos **1** (10 mg) y **2** (5 mg) se sometieron a hidrólisis por reflujo con HCl 2N, durante 30 minutos, controlando la reacción por CCD. Por enfriamiento, precipitaron sendos sólidos (compuestos **1a** y **2a**), los cuales se separaron, lavaron y cristalizaron. Se confirmó su pureza por CCD y analizaron por UV. La identidad del compuesto **2a** se corroboró por cromatografía con un patrón auténtico de quercetina.

La fracción acuosa procedente de la reacción de hidrólisis, se neutralizó y desalinizó con resinas de intercambio iónico. El residuo liofilizado, se analizó cromatográficamente en celulosa, n-BuOH-Bz-Pyr-H₂O/42:8:25:25.

Características de los compuestos obtenidos**Quercetagina-6-metoxi-3-O-β-galactosido (1)**

Sólido amarillo; pf 192-193 °C

UV λ_{max} nm: MeOH 260, 358; +NaOMe 274, 340h, 410; +AlCl₃ 276, 434; +AlCl₃/HCl 270, 372; +AcONa 268, 372; +AcONa/H₃BO₃ 265, 380.IR (KBr) γ cm⁻¹: 3436, 2954, 2925, 2856, 1655, 1607, 1518.RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆/CDCl₃, TMS int.): ver tabla 1.RMN¹³C (75.42 MHz, DMSO-d₆/CDCl₃, TMS int.): ver tabla 1.

EM (IE 70eV) m/z (% int. rel.): M+ 332 (100), 333 (17.93), 317 (9.42), 314 (37.17), 289 (82.72), 286 (8.64), 137 (24.48), 109 (9.29).

Quercetina-3-O-β-galactósido (2)

Sólido amarillo, pf 233-234 °C

UV λ_{max} nm: MeOH 258, 268h, 356; +NaOMe 272, 340h, 406; +AlCl₃ 274, 426; +AlCl₃/HCl 272, 300h, 364, 400; +AcONa 264, 378; +AcONa/H₃BO₃ 264, 376.IR (KBr) γ cm⁻¹: 3435, 2954, 2927, 2856, 1622, 1560, 1528.RMN¹H (300 MHz, DMSO-d₆/CDCl₃, TMS int.) δ ppm(int. multiplicidad) asignacion: 6.26 (1H, d, J=2.0 Hz) H-6, 6.40 (1H, d, J=2.0 Hz) H-8, 7.94 (1H, d, J=2.2 Hz) H-2', 6.91 (1H, d, J=8.7 Hz) H-5', 7.50 (1H, dd, J₁=8.7, J₂=2.2 Hz) H-6', 4.97 (1H, d, J=8.6 Hz) H-1'', 3.45-3.87 (6H, m), 12.26 (1H, s).

EM (IE 70eV) m/z (% int. rel.): M+ 302 (43.55), 303 (11.65).

6-Metoxi-3,5,7,3',4' -pentahidroxiflavona (1a)

Sólido amarillo; pf 264-265 °C.

UV λ_{max} nm: MeOH 258, 370; +NaOMe 274, 334h, 416 (desc.); +AlCl₃ 273, 458; +AlCl₃/HCl 268, 310h, 360h, 428; +AcONa 262, 386; +AcONa/H₃BO₃ 262, 390.IR (KBr) γ cm⁻¹: 3436, 1657, 1608, 1560, 1525.**Quercetina (2a)**

Sólido amarillo; Analizado por UV y co-cromatografía con patrón auténtico de Quercetina.

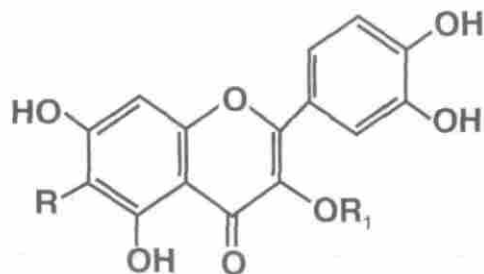
RESULTADOS Y DISCUSION

Los compuestos **1** y **2**, aislados del extracto acuoso presentan espectros UV característicos de flavonoles O-sustituídos en la posición C-3 (2). La hidrólisis de estos compuestos producen agliconas cuya banda I se encuentra desplazada a mayor longitud de onda, con relación a la banda I de los compuestos no hidrolizados, deduciéndose así que la porción glicosídica se encuentra en la posición C-3.

El UV de **1** con adición de AlCl_3/HCl indica orto-dihidroxi-sustitución, además la magnitud del desplazamiento batocrómico remanente de la banda I, muestra una posible O-sustitución en la posición C-6 (3). El comportamiento con los demás reactivos de desplazamiento, permite deducir la presencia de hidroxilos en las posiciones C-5, C-7 y probablemente en C-3' y C-4'.

El EM muestra para la aglicona un ión molecular $M+ 332$, $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8$ y fragmentos correspondientes a m/z $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$; $[\text{M}-\bullet\text{CH}_3]^+$; $[\text{M} - (\bullet\text{CH}_3+\text{CO})]^+$, cuyas intensidades relativas permiten deducir metoxilación en la posición C-6 (4). Se observan las señales de los iones B_2+ y $[\text{B}_2-\text{CO}]^+$ obtenidos por una fragmentación via II (2), propia de flavonoles, indicando también que en el anillo B hay dihidroxi-sustitución.

El RMN¹H muestra la presencia de OH quelatado (δ 12.39 ppm), asignable al hidroxilo en posición C-5. Se observan las señales típicas de una sustitución 3', 4'; lo mismo que las señales correspondientes a los protones en C-8 y al grupo metoxilo. En la tabla 1 se presentan las asignaciones, las cuales se confirman por las correlaciones COSY ¹H-¹H. El doblete en δ 4.97 ppm (1H, J=8.6 Hz) corresponde al proton anomérico del azúcar; la magnitud de la constante de acoplamiento indica una interacción axial-axial entre los protones H-1'' y H-2'' , la cual corresponde al anómero β . Entre δ 3.45 - 3.87 ppm se localizan las señales para los otros protones del azúcar, las cuales aparecen muy concentradas y no es posible hacer la asignación directa, sinembargo el espectro COSY permite asignar la señal δ 3.82 ppm a H-2'' por su correlación con la señal del protón anomérico. Igualmente las señales δ 3.45 y 3.61 ppm se asignan a los protones H-5'' y H-6'' por la correlación observada entre ellos. El desplazamiento de la señal del protón anomérico da como azúcar probable la galactosa, descartándose la glucosa, cuya señal debe aparecer a campo más bajo. La identidad fue confirmada como galactosa por CCD con patrones auténticos. Con base en el anterior análisis se deduce la estructura 6-metoxi-3,5,7,3',4' -pentahidroxi-3-O- β -galactósido (figura 1).



- 1:** R=OMe; R₁=Gal
1a: R=OMe; R₁=H
2: R=H; R₁=Gal
2a: R=R₁=H

Figura 1.

El espectro RMN¹³C y DEPT confirman la estructura propuesta. Se deduce que las señales para carbonos alifáticos oxigenados corresponden a 5 metinos asignables a los carbonos C1''-C5'', la señal en δ 60.6 ppm que se invierte corresponde al C-6'' y la señal en δ 59.7 ppm al metilo del grupo metoxilo. En la región aromática se localizan cuatro señales, que corresponden a cuatro carbonos metínicos, asignables a C-8, C-2', C-5' y C-6'. En la tabla 1 se muestra las asignaciones hechas para todas las señales. Estas se hicieron por comparación con las publicadas para compuestos glicosídicos similares (4).

La hidrólisis de **1** produjo la aglicona **1a** cuyo UV exhibe máximos a 370 y 258 nm, indicando una estructura de flavonol, con hidroxilo libre en la posición C-3; corroborándose así que el enlace O-glicosídico, efectivamente se encontraba en esta posición. Por el análisis UV con reactivos de desplazamiento, se deduce que el compuesto **1a** corresponde a la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavonol, también llamado Patuletina (figura 1).

El compuesto **1** es de rara ocurrencia en la naturaleza. Se ha aislado previamente de *Ipomopsis aggregata* (5) y *Pallenis spinosa* (6). Este constituye el primer reporte en el género *Ageratina*. Resulta también interesante esta estructura desde el punto de vista quimiotaxonómico ya que la sustitución 6-metoxi se ha postulado como característica del género y el hallazgo de esta estructura complementa los datos que en este sentido hemos encontrado en otras especies colombianas de *Ageratina* (7-9).

El compuesto **2** presentó en el UV con reactivos de desplazamiento, un comportamiento análogo al del compuesto **1**, exceptuando la magnitud del desplazamiento remanente en la banda I (44 nm) del espectro con AlCl₃/HCl, relativo al espectro en MeOH, lo cual indica que la posición C-6 no está O-sustituída (3).

El análisis de RMN¹H y COSY ¹H-¹H, muestra el mismo tipo de sustitución del compuesto **1** exceptuando la posición C-6, que en este caso se encuentra libre. Se observa la señal para un protón a δ 6.26 ppm interactuando con la señal del protón a δ 6.40 ppm, con acoplamiento meta, asignables a los protones en C-6 y C-8. Las señales correspondientes al azúcar son análogas a las observadas para el compuesto **1**, lo cual indica que el azúcar corresponde a la galactosa; cuya identidad se corroboró por CCD.

La hidrólisis del compuesto **2** produjo la aglicona **2a**, que se identificó como Quercetina por UV y co-cromatografía con una muestra auténtica. Se confirma así la unión O-glicosídica en C-3.

Con base en el anterior análisis se deduce que el compuesto **2** corresponde a la quercetina 3-O-β-galactósido (figura 1). Este compuesto se ha aislado de varias especies, entre las cuales están *Hypericum perforatum* (2), *Verbesina encelioides* (10), pero del género *Ageratina* está es la primera vez que se aísla.

Tabla 1. RMN¹H Y RMN¹³C (300MHz). Asignaciones para el compuesto 1.

	RMN ¹ H	RMN ¹³ C		
	δ (multiplicidad)	C	δ	DEPT
8	6.51 (1H,s)	2	157.3	C
2'	7.94 (1H,d,J=2.2 Hz)	3	133.7	C
5'	6.91 (1H,d,J=8.8 Hz)	4	177.5	C
6'	7.50 (1H,dd,J ₁ =8.8 Hz, J ₂ =2.2 Hz)	5	151.5	C
6-OMe	3.89 (3H,s)	6	130.8	C
1''	4.97 (1H,d,J=8.6Hz)	7	156.8	C
2''-6''	3.45-3.87 (6H,m)	8	93.5	CH
2''	3.82	9	151.7	C
5''	3.45	10	104.2	C
6''	3.61	1'	120.7	C
5-OH	12.39 (1H)	2'	114.5	CH
OH	5.30 (1H)	3'	143.5	C
		4'	147.7	C
		5'	116.5	CH
		6'	120.9	CH
		1''	104.7	CH
		2''	71.1	CH
		3''	73.2	CH
		4''	67.9	CH
		5''	74.8	CH
		6''	60.6	CH ₂
		-OCH ₃	59.7	CH ₃

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó gracias a la financiación otorgada por BID-Colciencias-Universidad Nacional al Programa de Productos Naturales del Departamento de Química.

BIBLIOGRAFIA

1. Espitia de Pérez, C. y Cocunubo, J., *Rev. Col. Quim.* **1989**, 1-2, 47.
2. Markhan, K. R. and Mabry, T. J. in "*The Flavonoids*", J. B. Harborne, ed., Chapman and Hall, London, **1982**.
3. Voirin, B., *Phytochemistry*. **1983**, 22, 2107.
4. Wollenweber, E. in "*The Flavonoids. Advances in Research*", J. B. Harborne and T. J. Mabry, ed. Chapman and Hall, NY., **1982**.
5. Smith, D. M., Glennis, C. W. and Harborne, J. B., *Phytochemistry*. **1971**, 10, 3115.
6. Ahmed, A. A., Spaller, M. and Mabry, T. J., *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, 20, 785.
7. Higuera, B. L. y Espitia de Pérez, C., *Rev. Col. Quim* **1989**, 18, 55.
8. Espitia de Pérez, C. y Salgado de Pinilla, G., *Rev. Col Quim.* **1990**, 19, 101.
9. Villarraga, A. y Espitia de Pérez, C., *Rev. Col. Quim.* **1994**, 23, 45.
10. Glennie, C. W. and Jain S. C., *Phytochemistry*. **1980**, 19, 157.