

NUEVO ESTEROL Y OTROS CONSTITUYENTES DE *Zanthoxylum setulosum*

Alberto A. Angulo O.*, Luis E. Cuca S.**

Recibido: 22/10/02 Aceptado: 04/12/02

Palabras clave: *Zanthoxylum setulosum*; Rutaceae; 22-oxo-24-metilcholest-5-en-3 β -ol; lignanos; flavonoides.

Key words: *Zanthoxylum setulosum*; Rutaceae; 22-oxo-24-methylcholest-5-en-3 β -ol; lignans; flavonoids.

RESUMEN

Ácido cerótico, pungenina, (2S)-naringenina, (2R)-naringenina y el nuevo estero 22-oxo-24-metilcholest-5-en-3 β -ol fueron aislados de las hojas de *Zanthoxylum setulosum*; de la corteza fueron aislados lupeol, (8R, 8'R)-3',4'-dimetoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olido y metilarctigenina; de la madera se aisló ácido cerótico, kokusaginin y siringaresinol. Sus estructuras fueron elucidadas por RMN, incluyendo técnicas 2D y por comparación con muestras auténticas y datos de la literatura.

ABSTRACT

Cerotic acid, pungenin, (2S)-naringenin, (2R)-naringenin, and the new sterol 22-oxo-24-methylcholest-5-en-3 β -ol were isolated from *Zanthoxylum setulosum* leaves; from the bark were isolated lupeol, (8R,

8'R)-3',4'-dimethoxy-3,4-methylenedioxy lignan-9,9'-olide and methylarctigenin; from cerotic acid, kokusaginin and siringaresinol its stems were isolated. Its structures were elucidated by NMR, including 2D techniques and for comparisons with authentic samples and literature data.

INTRODUCCIÓN

El género *Zanthoxylum*, uno de los más representativos y abundantes de la familia *Rutaceae*, está constituido por un gran número de especies de amplia distribución mundial pero predominantemente pantropical (1). En Colombia se encuentran reportadas hasta el momento 21 especies, repartidas en 23 de los 32 departamentos que conforman el territorio colombiano, siendo el género de mayor distribución en el país. El *Zanthoxylum setulosum* es usado por la población nativa de la región de Córdoba como maderable y sus hojas, maceradas, como coadyuvante en labores de pesca artesanal por sus propiedades ictiotóxicas. Sólo ha sido realizada una investigación química (2), que reporta la presencia del terpeno (-)-loliolide en las hojas, un repelente de la hormiga *Atta cephalotes*. En este trabajo reportamos el aislamiento e identificación

* Universidad de Córdoba, Departamento de Química, A.A. 354, Montería, Colombia.

** Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, A.A. 14490, Bogotá, Colombia.

de cuatro compuestos conocidos y un nuevo esteroide **1** de las hojas; tres compuestos conocidos de la corteza, y tres compuestos conocidos, además de **1**, a partir de la madera.

El género *Zanthoxylum* es conocido por la producción de alcaloides benzofenanthridínicos como N-nornitidina (10) y quinolínicos como skimmianina (11), lignanos del tipo furofuránicos ((+)-sesamina) y dibencilbutirolactona (metilarctigenina) y amidas de importancia quimiotaxonómica (11, 12, 13). De igual forma, sus especies son utilizadas para el tratamiento de una gran variedad de desórdenes causados por enfermedades humanas, pues presenta actividad antibacteriana (12), antitumoral (10), anestésica (11), antihelmíntica y antiagregación plaquetaria (14), entre otras.

PARTE EXPERIMENTAL

General. RMN-¹H: 500 MHz en CDCl₃ con TMS como estándar interno; RMN-¹³C: 125 MHz; EM-IE: 70 eV; CG-EM (70 eV); HPLC-DAD: columna RP-18; UV: en MeOH; CC: sílica gel 60: sílica gel (Kieselgel 60, Merck). TLC: sílica gel 60 HF₂₅₄ (Merck). Las placas de TLC fueron visualizadas con luz UV y expuestas a vapores de I₂.

Material vegetal. Una muestra de hojas, corteza y madera de *Zanthoxylum setulosum* fue colectada en Valencia (Córdoba), Colombia, en abril de 1999 y clasificada por Idulfo Leguizamó. Un espécimen de herbario, No. 003111, reposa en el Herbario de la Universidad de Córdoba (HUC), Montería, Colombia.

Extracción y aislamiento. Las hojas secas y molidas (5.6 kg) fueron exhaustivamente extraídas con EtOH a temperatura ambiente. Del residuo viscoso obtenido (870 g), se tomó una fracción de 6.6 g que se sometió a CC (sílica gel; C₆H₆-EtOAc, en polaridad creciente) y se obtuvieron 36 fracciones. De la fracción 7 (330 mg) por CC (C₆H₅CH₃-MeOH, 95:5) se obtuvo el compuesto **1** (115 mg). La fracción 8 (1.18 g) por CC (sílica gel; C₆H₅CH₃-MeOH, 95:5) dio ácido cerótico (28 mg). Otra porción del extracto etanólico (500 g) fue resuspendido en H₂O y extraído sucesivamente con n-Hexano, CHCl₃, EtOAc y n-BuOH. La porción soluble en CHCl₃ (35 g) fue sometida a varias CC sucesivas (sílica gel; C₆H₅CH₃-MeOH, 7:3; 9:1; 95:5), HPLC (columna RP-18; MeOH-H₂O, 6:4) para obtener (S)-naringenina (16 mg) y (R)-naringenina (22 mg). La porción soluble en EtOAc (28 g) fue fraccionada por CC (sílica gel; CHCl₃-MeOH, 98:2) y una fracción purificada por CC (sílica gel; CHCl₃-MeOH, 8:2) para dar pungenina (48 mg).

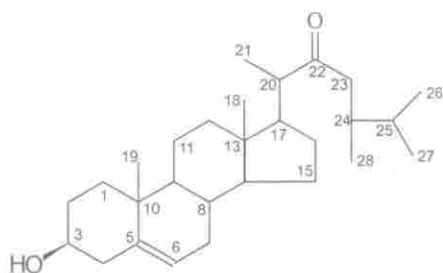
A partir de 3.5 kg de la corteza del tronco, seca y molida, se obtuvieron 295 g de extracto EtOH. Una porción de este extracto (5 g) se fraccionó por CC (sílica gel; C₆H₆-EtOAc, en polaridad creciente), y se obtuvieron 28 fracciones. La fracción 10 fue purificada por CC (sílica gel; CHCl₃) para dar (8R,8'R)-3'-4'-dimetoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olido (123 mg). Otra porción del extracto etanólico (87.5 g) fue resuspendida en H₂O y extraída sucesivamente con n-Hexano, CHCl₃, EtOAc y n-BuOH. La porción soluble en CHCl₃ (15 g) fue sometida a varias CC sucesivas (sílica gel; CH₂Cl₂) para dar lupeol (1.345 g) y metilarctigenina (25 mg).

De un total de 24.7 kg de madera seca y molida se obtuvieron 670 g de extracto etanólico que, en posterior fraccionamiento por CC sucesivas (sílica gel; CH_2Cl_2 ; CH_2Cl_2 -MeOH, 98:2), dieron como resultado la purificación de **1** (18 mg), ácido cerótico (25 mg), kokusaginina (12 mg) y siringaresinol (15 mg).

Actividad biológica. Se realizó un screening preliminar de actividad biológica antimicrobiana a los extractos de EtOH de hojas y corteza al igual que sus respectivos extractos de n-Hexano, CHCl_3 , EtOAc y n-BuOH y las sustancias purificadas de ellos, frente a cuatro bacterias (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 65380, *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028s y *S. tiphymurium* ATCC MS7953). De igual forma se realizó un screening preliminar de actividad biológica antimalárica a los extractos de EtOH de hojas, corteza y madera, frente a las cepas de *Plasmodium falciparum* FVO y FCB-2. El extracto de EtOH de la corteza y el compuesto (8R,8'R)-3',4'-dimetoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olido se probaron actividad en un screening preliminar de actividad antitumoral, empleando líneas celulares de leucemia L-1218 y P-388, tumores sólidos de ratón P-03, C-38 y M-17, tumores sólidos humanos H-15 y H-116 y fibroblastos normales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La separación cromatográfica del extracto etanólico de las hojas de *Z. setulosum*, originó el aislamiento de cuatro compuestos conocidos: ácido cerótico (3), pungenina (4), (2S)-naringenina y (2R)-naringenina (5), y el nuevo esterol



(1)

22-oxo-24-metilcolest-5-en-3 β -ol **1**. Tratamiento similar fue dado a la corteza para obtener tres compuestos conocidos: lupéol (6), (8R, 8'R)-3',4'-dimetoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olido y metilarcigenina (7). De la madera también fue aislado **1** y los compuestos ácido cerótico, kokusaginina (8) y siringaresinol (9). Los compuestos conocidos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos y por comparación con muestras auténticas o datos de la literatura.

El nuevo compuesto **1** es un sólido blanco amorfo que revela en su espectro IR la presencia de un hidroxilo (3388 cm^{-1}) y un grupo carbonilo cetónico (1706 cm^{-1}), entre otras señales. El espectro de RMN- ^1H muestra un perfil de señales características de triterpenos. Se destacan como señales importantes las siguientes: δ 5.34 (d(a), 1H) que corresponde a un CH olefínico; δ 3.53 (dt, J = 6.0, 11.0 Hz, 1H) correspondiente a un protón sobre carbono oxigenado, seis grupos metilos a δ 1.29 (s, 6H), δ 1.0 (s, 3H), δ 0.92 (d, J = 6.0 Hz, 3H), δ 0.83 (d, J = 7.5 Hz, 3H) y δ 0.68 (s, 3H) [90]. Los espectros de RMN- ^{13}C y DEPT permiten establecer la presencia de un carbono carbonílico en δ 178; tres carbonos cuaternarios alifáticos en δ 140, δ 138 y δ 129.2; nueve CH alifáticos a δ 121 (olefínico), δ 71 (oxigenado),

δ 57, δ 56, δ 50, δ 45.8, δ 36.1, δ 31.9 y δ 29.1; nueve CH_2 alifáticos a δ 42, δ 39.8, δ 37.1, δ 34, δ 31.4, δ 29.9, δ 24.2, δ 23 y δ 21; además, los seis grupos metilos descritos anteriormente. Todos los datos de RMN se muestran en la tabla 1. De igual forma se analizó el espectro HMQC y se establecieron las respectivas conectividades C-H, como se muestra en la tabla 1. El espectro de masas de impacto electrónico exhibe un ión $[\text{M}^+]$ a m/z 414.21, consistente con la fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_2$ según el análisis de RMN. Esta información, aunada a los fragmentos a m/z 399 $[\text{M}^+ - \text{Met}]$, 396 $[\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}]$, 381 $[\text{M}^+ - \text{Met} - \text{H}_2\text{O}]$, 329 $[\text{M}^+ - 85]$, 303 $[\text{M}^+ - 111]$, 273 $[\text{M}^+ - \text{CL}]$, 255 (37.9), 213 (37.3), 160 (37.3) y 145 (45.5), típicos de núcleos esteroidales, permite deducir que el compuesto **1** tiene un esqueleto tetracíclico tipo ergostano con el respectivo protón en posición sobre el C-3 y doble enlace en C-5 (15, 16, 17). El análisis del espectro HMBC mostró correlaciones importantes (tabla 1), destacándose la presentada por el carbono carbonílico en δ 178 y los protones a δ 1.59 y δ 2.32, el carbono metínico en δ 45.8 con los protones δ 0.83 y δ 1.26, el carbono metilénico en δ 34 con los protones en δ 0.92 y δ 1.59, por último, el carbono metilénico en δ 24.2 y el metínico en δ 29.1 con los protones en δ 2.32. El espectro COSY-45 puso en evidencia correlaciones espaciales protón-protón, como las presentadas entre los protones en δ 1.82 y δ 1.28, δ 1.82 y δ 1.0, δ 1.95 y δ 1.53, δ 1.59 y δ 0.92; también se destaca la correlación entre los protones en δ 2.32 y δ 1.59. El análisis detallado del EM permitió la ubicación exacta del grupo carbonilo en la cadena lateral, teniendo en cuenta los patrones de fragmentación de cetonas alifáticas (18). De esta forma, la cadena lateral resultante de la

fragmentación del ion molecular sufre inicialmente un rearrreglo de McLafferty y posteriores fragmentaciones para dar lugar a los picos a m/z 69 (58 %), 71 (28 %), 57 (59 %) y 55 (100 %), lo que lleva a proponer la posición del carbonilo en C-22. El análisis anterior condujo a la elucidación estructural completa del compuesto **1** como 22-oxo-24-metilcolest-5-en-3 β -ol.

En los ensayos de actividad antimicrobiana los extractos etanólicos de hojas y corteza presentaron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y a las dos cepas de *Salmonella typhimurium*, mientras que las sustancias puras ensayadas no presentaron ningún tipo de inhibición.

Los extractos crudos de hojas, corteza y madera de *Zanthoxylum setulosum* presentaron capacidad de inhibición frente a las dos cepas de *Plasmodium falciparum*. El extracto de mayor porcentaje fue el de hojas (79 %), seguido del de corteza (39 %) y el de madera (22 %).

El extracto etanólico de la corteza y el compuesto (8R, 8'R)-3',4'-dimetoxi-3,4-metilenodioxilignan-9,9'-olido presentaron lecturas representativas (mayores de 950) en los ensayos *in vitro* anticáncer. En la segunda fase (ensayos en ratones), los resultados fueron negativos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los departamentos de Química de la Universidad de Córdoba y la Universidad Nacional de Colombia. Agradecemos al Dr. José Manuel Lozano (Fundación Instituto de Inmunología de Colombia) por los ensayos antimicrobianos y anti-

maláricos, y al grupo de RMN de la misma Fundación por la toma de espectros a 500 MHz. A los Drs. Eduardo Palomino y Thomas Carbet (Escuela de Medicina-

Instituto de Hematología y Oncología - Universidad Estatal de Wayne, Detroit, USA) por los ensayos de actividad antitumoral.

Tabla 1. Datos espectrales de RMN de ^1H y ^{13}C del Compuesto **1**, (CDCl_3)

C	^1H (ppm)	MULT	J (Hz)	^{13}C (ppm)	DEPT	HMQC	HMBC
1	1.49			21	CH_2	21.0	0.83
2	1.07 1.85			37.1	CH_2	37.1	1.0
3	3.53	dt	6.0, 11.0	71	CH	71.0	---
4	2.26			42	CH_2	42.0	0.68, 0.98
5	--	--		140	C	--	1.0, 1.49, 1.85, 2.26, 5.35
6	5.34	d(a)		121	CH	121.0	1.49, 2.26
7	1.17 2.03			39.8	CH_2	39.8	0.68
8	0.98			57	CH	57.0	0.68, 1.07, 1.53
9	1.35			36.1	CH	36.1	0.92, 0.98, 1.0, 1.85, 2.26
10	--	--		138	C	--	1.0, 1.07
11	1.48 1.82			31.4	CH_2	31.4	0.68, 2.26
12	1.26 1.28			23	CH_2	23.0	0.83, 1.26
13	--	--		129.2	C	--	--
14	0.92			50	CH	50.0	1.0
15	1.26			29.9	CH_2	29.9	1.26
16	1.53 1.59			24.2	CH_2	24.2	2.32
17	1.95			31.9	CH	31.9	1.28, 1.53
18	0.68	s		11.9	CH_3	11.9	0.83, 0.98, 1.12, 1.17, 1.26
19	1.0	s		19.3	CH_3	19.3	1.07
20	0.92			45.8	CH	45.8	0.83, 1.26
21	0.83	d	7.5	18.9	CH_3	18.9	0.68
22	--	--		178	C	--	1.59, 2.32
23	2.32			34	CH_2	34.0	0.92, 1.59
24	1.12			56	CH	56.0	1.95
25	1.26			29.1	CH	29.1	0.83, 2.32
26	1.29			28.1	CH_3	28.1	--
27	1.29			29.5	CH_3	29.5	1.59
28	0.92	d	6.0	18.6	CH_3	18.6	--

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández Da Silva, M. F.; Gottlieb, O. R. and Ehrendorfer, F. (1988). Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a more Natural Taxonomy and Evolutionary Interpretation of the Family. *Plant Systematic Evolution*. **161**, 97.
2. Okunade, A. L., and Wiemer, D. F. (1985). (-)-Loliolide an Antirepellent compound from *Zanthoxylum setulosum*. *Journal of Natural Products*, **48**, 472.
3. Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons Ltd: London.
4. Torssell, K. B. G. (1997). Natural Products Chemistry. Apotekarsocieteten: Sweden.
5. Harborne, J. B.; Mabry, T. J. and Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*. Chapman and Hall: London.
6. Mahato, S. B. and Kundu, A. P. (1994). ¹³C-NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **33**, 1517.
7. López, L. M.; Yoshida, M. and Gottlieb, O. R. (1983). Dibenzylbutyrolactone Lignans from *Virola sebifera*. *Phytochemistry*, **22**, 1516.
8. Baetas, A. C.; Arruda, M. S.; Muller, A. H. and Arruda, A. C. (1999). Coumarins and Alkaloids from the Stems of *Metrodorea flavida*. *Journal Brazil Chemistry Society*. **10**, 181.
9. Agrawal, P. K. and Thakur, R. S. (1985), 13 C NMR Spectroscopy of lignan and Neolignan Derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **23**, 389.
10. Sukari, M. A.; Salim, W. S. W.; Ibrahim, N. H.; Rahmani, M.; Aimi, N.; Kitajima, M. (1999). Phenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. *Fitoterapia*. **70**, 197.
11. Cuca, L. E.; Martínez, J. C. and Delle Monache, F. (1998). 7,9'-Epoxilignan and other Constituents of *Zanthoxylum culantrillo*. *Phytochemistry*. **47**, 1437.
12. Cuca, L. E.; Martínez, J. C. and Delle Monache, F. (1999). Constituyentes químicos de *Zanthoxylum monophyllum*. *Revista Colombiana de Química*. **27**, 1.
13. Adesina, S. K.; Olugbade, T. A.; Akinwusi, D. D. and von Willert, D. J. (1997). New Amides from *Zanthoxylum lemarie* Pericarps. *Planta Medica*. **63**, 286.
14. Xiong, Q. B. and Shi, D. W. (1991). Morphological and Histological Studies of Chinese Traditional Drug Hua Jiao pericarpium-Zanthoxili and its Allied Drugs. *Acta Pharmaceutica Sinica*. **26**, 938.
15. Wyllie, S. G.; Amos, B. A. and Tokes, L. (1977). Electron Impact Induced Fragmentation of Cholesterol and Related C-5 Unsaturated Steroids. *Journal Organic Chemistry*. **42**, 725.
16. Wyllie, S. G. and Djerassi, C. (1968). Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical problems. CXLVI.

Mass Spectrometric Fragmentations Typical of Sterols with Unsaturated Side Chains. *Journal Organic Chemistry*. **33**, 305.

17. Pettit, G. R., Numata, A., Cragg, G. M., Herald, D. L., Takada, T., Iwamoto, C., Riesen, R., Schmidt, J. M., Doubeck, D. L. and Goswami, A. (2000). Isolations and Structures of Schleicherastatins 1-77 and Schleicheols 1 and 2 from the Teak Forest Medical Tree *Schleichera oleosa*. *Journal of Natural Products*. **63**, 72.
18. Silverstein, R. M.; Glayton Bassler, J. and Morrill, T. C. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons: London.