



Zanthoxyfolina, un nuevo meroterpenoide y derivados del labdano aislados de las hojas de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae).

Laura Santiago-Brugnoli^{1,2}, Carmelo Rosquete-Porcar^{1*}, Laurent Pouységu², Stéphane Quideau²

1) Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela.

2) Université de Bordeaux 1, Institut des Sciences Moléculaires (CNRS-UMR 5255) and Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France.

(*) carmelor@ula.ve

Recibido: 18/06/2013

Revisado: 23/08/2013

Aceptado: 28/08/2013

Resumen

Un nuevo meroterpeno derivado de la 2-quinolona el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) y tres derivados del labdano fueron aislados de las hojas secas de *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae), dos de ellos epímeros, el (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) y el (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) y un tercero, el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**). Este tipo de compuestos, hasta ahora, no habían sido reportados para el género *Zanthoxylum*. Las estructuras fueron identificadas mediante estudios espectroscópicos (IR, RMN uni y bidimensionales y EM).

Palabras clave: *Zanthoxylum rhoifolium*; 2-quinolona; derivados del labdano

Abstract

A new meroterpene derivated of the 2-quinolone, 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) and three derivates of labdane, have been isolated from the fresh leaves of *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae), two epimers (13*S*)-labdane-8 α ,15-diol (**2**) and (13*R*)-labdane-8 α ,15-diol (**3**) and a third one 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-ene (**4**). These compounds had not been reported before for genus *Zanthoxylum*. Their structures were established by 2D-NMR spectroscopic techniques (IR, NMR one-two dimensional and ME).

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*; 2-quinolone; labdane derivates.

Introducción

Desde el punto de vista fitoquímico, el género *Zanthoxylum* ha sido estudiado ampliamente desde principios del siglo XX, muchas especies se han explorado químicamente por la gran variedad de esqueletos estructurales presentes en la familia Rutaceae¹. A la infusión preparada de las hojas de *Z. rhoifolium* se le atribuyen actividades desinflamatorias, antitumorales, antileucémicas y antimicrobiales²; también es usada en la Medicina Tradicional en la Guayana Francesa como tratamiento preventivo contra la malaria³. Estudios recientes confieren a los aceites esenciales obtenidos de las hojas y los frutos, actividades bactericidas frente a microorganismos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativos (*Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella setubal*)⁴.

Teniendo como objetivo el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de las hojas de *Z. rhoifolium* colectada en el jardín botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela, del extracto acetónico, se obtuvo un nuevo

monoterpeno derivado de la 2-quinolona el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) y tres derivados del labdano, dos de ellos epímeros, (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) y (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) y un tercer compuesto, el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**). El aislamiento de dichas sustancias se realizó por técnicas cromatográficas convencionales y la caracterización estructural de la misma se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas IR, RMN (uni y bi-dimensional) y EM.

Parte experimental

Procedimiento experimental general

Los espectros IR fueron realizados en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo FT-1725X en pastillas de KBr y disco de NaCl. Los espectros RMN fueron tomados en un equipo Bruker Avance DRX 400 (400 y 100 MHz) usando CDCl₃ y TMS como patrón interno. Para los espectros de masa se empleó un espectrofotómetro Hewlett-Pakcard Mass modelo 5930^o (70 eV). Para la cromatografía en capa fina (CCF) y capa gruesa (CCGP) se utilizó papilla de sílica gel Merk HF 254 de 0.25 y 0.5 mm soportadas sobre placas de vidrio y para

las cromatografías en columna se utilizó gel de sílice 60 (Merck, 63 a 200 μ , 70-230 mesh) como adsorbente y montaje húmedo⁵ y la cromatografía de exclusión se utilizó Sephadex[®] LH20⁶. Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Johns dotado de plancha de calentamiento para el rango de 20 a 300 °C. Los puntos de ebullición fueron realizados en un tubo de Thiele y corregidos.

Material vegetal

Las hojas *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) fueron recolectadas en el jardín botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela. La muestra botánica de la especie se encuentra depositada en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA). La clasificación botánica de la especie la realizó el Ing. Juan Carmona Arzola, Curador del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA), bajo el voucher N° VS-001.).

Extracción y separación

1 Kg de hojas frescas de *Z. rhoifolium*, fueron extraídas en un soxhlet con *n*-hexano, diclorometano, acetona y metanol, sucesivamente hasta agotamiento. Del extracto de hexano (43g), en las fracciones 21-26 (2,582g), luego de pasarlas por Sephadex LH-20 utilizando la mezcla 2:1:1 de hexano/benceno/metanol, se aislaron dos compuestos, el (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (**2**) (46mg) y el (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (**3**) (44 mg). De la misma forma, del extracto de acetona (35g) de las fracciones 2-10 (9,574g) (Hex/CH₂Cl₂; 50%), tras varios procesos de cromatografía se logró aislar el 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (**1**) (82mg), así mismo de las fracciones 24-26 (1,138g) (Hex/CH₂Cl₂; 90%) se aisló el 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (**4**) (53mg).

Zanthoxyfolina ó 7-*O*-neril éter de 2-quinolona (1**):** 82mg. C₁₉H₂₃NO₂, cristales en forma de finas agujas de color blanco, P_f 68-69°C. IR (KBr): ν_{\max} 3422, 2925, 1728, 1226, 1614, 833 cm⁻¹. RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) y RMN¹³C (CDCl₃, 100MHz): ver Tabla 1. EM *m/z*: [M]⁺ 297.

(13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (2**):** 46mg. C₂₀H₃₈O₂, pasta de color amarillo tenue, P_e 74-75°C, [α]_D²⁰: -4,1° (46mg/5ml de acetona), IR (película líquida en NaCl): ν_{\max} 3388, 2926, 2868, 1716, 1460, 1386, 1082, 936 cm⁻¹. RMN δ _H (CDCl₃, 400MHz): 1.59; 1.34 (H_{3_{a,b}}), 1.06 (H₅), 1.35; 1.00 (H_{6_{a,b}}), 2.03; 1.63 (H_{7_{a,b}}), 1.26 (H₉), 1.37; 1.00 (H_{11_{a,b}}), 1.99 (H₁₃), 3.68; 3.63 (H_{15_{a,b}}), 1.03; 0,98 (H_{16_{a,b}}), 1.13 (H₁₇), 0.72 (H₁₈), 0.85 (H₁₉), 0.76 (H₂₀). RMN δ _C (CDCl₃, 100MHz): 39.4(C₁, (CH₂)), 18.9 (C₂(CH₂)), 42.3 (C₃(CH₂)), 33.3 (C₄(C)), 56.2 (C₅(CH)), 20.8 (C₆(CH₂)), 44.8 (C₇(CH₂)), 74.2 (C₈(COH)), 61.5 (C₉(CH)), 39.4 (C₁₀(C)), 22.0 (C₁₁(CH₂)), 40,1 (C₁₂((CH₂)), 30.1

(C₁₃(CH)), 40.3 (C₁₄((CH₂)), 61.2 (C₁₅((CH₂)), 20.5 (C₁₆(Me)), 24.3 (C₁₇(Me)), 15.6 (C₁₈(Me)), 33.6 (C₁₉(Me)), 21.7 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 310.

(13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (3**):** 44 mg. C₂₀H₃₈O₂, pasta de color amarillo tenue, P_e 83-84°C (corregido), [α]_D²⁰: -9,7° (46mg/5ml de acetona). IR (película líquida en NaCl) ν_{\max} 3388, 2924, 2867, 1726, 1461, 1385, 1061, 700 cm⁻¹. RMN δ _H (CDCl₃, 400MHz): 1.60; 1.35 (H_{3_{a,b}}), 1.08 (H₅), 1.38; 1.01 (H_{6_{a,b}}), 2.08; 1.67 (H_{7_{a,b}}), 0.51 (H₉), 1.40; 1.02 (H_{11_{a,b}}), 1.93 (H₁₃), 3.77; 3.73 (H_{15_{a,b}}), 0.99; 0,98 (H_{16_{a,b}}), 1.16 (H₁₇), 0.73 (H₁₈), 0.86 (H₁₉), 0.77 (H₂₀). RMN δ _C (CDCl₃, 100MHz): 39.2(C₁, (CH₂)), 18.2 (C₂(CH₂)), 41.6 (C₃(CH₂)), 32.6 (C₄(C)), 55.4 (C₅(CH)), 20.1 (C₆(CH₂)), 43.8 (C₇(CH₂)), 73.6 (C₈(COH)), 61.8 (C₉(CH)), 38.5 (C₁₀(C)), 22.9 (C₁₁(CH₂)), 40.5 (C₁₂(CH₂)), 30.3 (C₁₃(CH)), 39.2 (C₁₄((CH₂)), 59.8 (C₁₅((CH₂)), 20.9 (C₁₆(Me)), 23.4 (C₁₇(Me)), 14.9 (C₁₈(Me)), 32.8 (C₁₉(Me)), 38.5 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 310.

13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (4**):** 53mg. C₂₀H₃₄O, sólido de color blanco, P_f 79-80°C (corregido). IR (KBr): ν_{\max} 2926, 1735, 1642, 1387,1120 cm⁻¹. RMN δ _H (CDCl₃, 400MHz): 1.47; 0.78 (H_{1_{a,b}}), 1.63;nd* (H₂), 0.79; 0.82 (H_{3_{a,b}}), 2.08; 0.92 (H₅), 0.94, nd* (H₆), 1.83;nd* (H₇), 1.33 (H₉), nd* (H₁₁), nd*(H₁₂), 5.89; 5.90 (H_{14_{a,b}}), 4.90; 5.20 (H_{15_{a,b}}), 1.30 (H₁₆), 1.24 (H₁₇), 0.78 (H₁₈), 0.84 (H₁₉), 0.77 (H₂₀). RMN δ _C (CDCl₃, 100MHz): 37.7(C₁, (CH₂)), 19.3 (C₂(CH₂)), 34.0 (C₃(CH₂)), 44.0 (C₄(C)), 57.2 (C₅(CH)), 20.5 (C₆(CH₂)), 42.8 (C₇(CH₂)), 76.0 (C₈(C)), 56.4 (C₉(CH)), 39.0 (C₁₀(C)), 15.9 (C₁₁(CH₂)), 36.3 (C₁₂(CH₂)), 74.1 (C₁₃(C)), 149.3 (C₁₄(=CH)), 111.4 (C₁₅(=CH₂)), 26.1 (C₁₆(Me)), 29.8 (C₁₇(Me)), 21.9 (C₁₈(Me)), 33.9 (C₁₉(Me)), 15.8 (C₂₀(Me)). EM *m/z*: [M]⁺ 290. (* no determinada, solapada con otras señales

Resultados y discusiones.

El compuesto (**1**) mostró en su espectro de masas un ion molecular a *m/z* 297, lo que permitió establecer su fórmula molecular C₁₉H₂₃NO₂, la cual resultó coherente con el número de carbonos e hidrógenos observados en sus espectros de RMN-¹³C y RMN-¹H (Tabla 1). En su espectro IR, se apreciaron bandas de absorción, entre las más características, de amidas mono-sustituidas [ν_{\max} 3422 cm⁻¹ (N-H)], de carbonilos [ν_{\max} 1728 cm⁻¹ (C=O)] y de aromáticos [ν_{\max} 1614 cm⁻¹ (C=C) y ν_{\max} 833 cm⁻¹ (=C-H)]⁷.

Según su fórmula molecular, C₁₉H₂₃NO₂, posee nueve grados de insaturación, con base a esto, en su espectro de RMN-¹H, a campo bajo, se observan dos dobletes en δ 6,21 (H-4); δ 7.59 (H-3), con una constante de acoplamiento, *J*= 9 Hz, lo que conforma un sistema típico

AB, propio de un par de hidrógenos “*orto*” acoplados, similar a esto, ocurre con una señal doblete (*d*) en δ 7.32 (H-5) ($J=9$ Hz), y otra doblete de dobletes (*dd*) en δ 6,80 (H-6) ($J_1=2,0$; $J_2=9,0$ Hz) respectivamente, y un singulete en δ 6.77 (H-8), cuyas constantes de acoplamiento, permiten establecer un sistema ABX. Ambos sistemas se detectan claramente en el espectro $^1\text{H}, ^1\text{H-COSY}$. Las señales en el espectro de RMN- ^{13}C (banda ancha (BB) y DEPT-135) de los carbonos que llevan estos hidrógenos, fueron identificadas a δ 112.1 (C-4); δ 143.3 (C-3); δ 128.6 (C-5); δ 113.1 (C-6); δ 101.5 (C-8), a través de su espectro HSQC. Estos datos accedieron a caracterizar las subunidad estructural [A] (figura 1), el espectro HMBC confirmó la presencia de un núcleo bencénico 1,2,4-trisustituido, que concierne al sistema ABX anteriormente identificado (correlaciones: C-8 \leftrightarrow H5, C-8 \leftrightarrow H6), donde uno de los sustituyentes, es un grupo que está unido a un oxígeno [δ 162.0 (C-7)], el cual se sitúa “*orto*” con respecto a (C-6) y a (C-8), al mismo tiempo, establece que dicho sistema esta fusionado con el sistema AB (correlaciones: C-9 \leftrightarrow H-5, C-9 \leftrightarrow H-8, C-9 \leftrightarrow H-4 y C-10 \leftrightarrow H-5, C-10 \leftrightarrow H-3, C-10 \leftrightarrow H-8), en este caso, uno de los sustituyentes “*orto*” a (C-3) es un grupo carbonilo [δ 161.1 (C-2) (Correlaciones: C-2 \leftrightarrow H-3 y C-2 \leftrightarrow H-4) y finalmente el otro sustituyente es el grupo -NH referido en el espectro IR, por lo tanto, se corrobora que se trata del núcleo derivado de la 2-quinolona⁸.

Por otro lado, en su espectro de RMN- ^1H , a campo alto, resaltan tres señales que aparecen como singuletes [δ 1.57 (H-9'), δ 1.63 (H-8') y δ 1.73 (H-10')], propias de metilos. Asimismo, una serie de señales que emergen como multipletes entre δ 2.10 y δ 2.03 que se atribuyen a metilenos [δ 2.10; 2.09 (H-5') y δ 2.04; 2.03 (H-4')]. Además, entre δ 4.50 y δ 5.50, resaltan tres señales: un triplete en δ 5.43 (H-2'), un triplete de dobletes en δ 5.04 (H-6'), que por sus desplazamientos, son protones olefínicos y un doblete en δ 4.57 (H-1') que podría ser un protón unido a una función oxigenada. Dichas señales, se ajustan a lo observado en el experimento DEPT-135 de RMN- ^{13}C y con el espectro HSQC se logró asignar cada señal de protón con su carbono respectivo. Ahora bien, mediante las correlaciones que muestra el espectro de HMBC, se consiguió establecer la subunidad estructural [B] (figura 1), la cual confirmó ser una cadena alifática de diez carbonos con dos dobles enlaces, es decir, un monoterpreno, esto se estipuló siguiendo las correlaciones a través de los metilos [(C-2') \leftrightarrow (H-10'), (C-3') \leftrightarrow (H-10'), (C-4') \leftrightarrow (H-10')] y [(C-6') \leftrightarrow (H-8'), (C-6') \leftrightarrow (H-9'), (C-7') \leftrightarrow (H-8')], y así sucesivamente.

Al balancear, en referencia la fórmula molecular del compuesto [$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$], con los átomos comprometidos con la subunidad [A] [$\text{C}_9\text{H}_4\text{NO}_2$] y con la subunidad [B]

[$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{O}$], se completan los nueve grados de insaturación que rige la fórmula del compuesto, sin embargo, al haber un oxígeno extra, hace pensar que ambas subestructuras comparten al menos un átomo de oxígeno, esto se ratificó con el espectro HMBC, con la correlación [(C-7) \leftrightarrow (H-1')]. De esta manera quedó establecida la estructura de como 7-*O*-neril éter-2-quinolona, un nuevo meroterpenoide, y se le dio el nombre de *Zanthoxyfolina* (1).

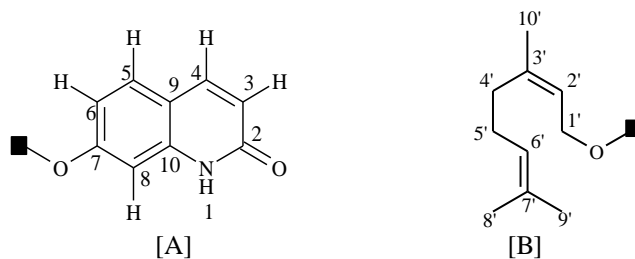
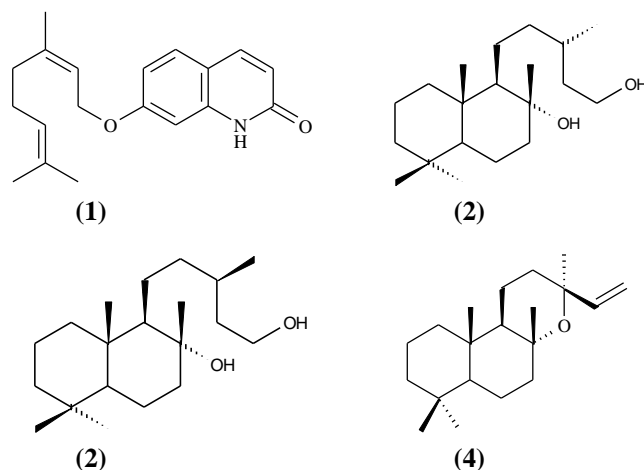


Fig. 1: Sub unidades estructurales [A] y [B] de (1).

Se sabe que los monoterprenos se derivan del (*trans*) geranilpírofosfato o del (*cis*) nerilpírofosfato y que sus funciones oxigenadas se pueden generar de varias maneras, como por ejemplo, oxidación alílica, oxidación vinílica o cicloadiciones del tipo Diels-Alder, por otro lado, los alcaloides quinolínicos pueden tener dos precursores aromáticos como el triptófano y el ácido antranílico⁸. Ahora bien, para proponer una posible ruta biosintética de esta nueva molécula, se puede pensar que su formación viene a partir del geraniol y del 7-hidroxi-2-quinolona, se produzca una deshidratación, se genere el respectivo éter (figura 2)

Los compuestos (2), (3) y (4), presentaron características espectroscópicas similares, conjuntamente, otros datos como rotación óptica ($[\alpha]_D^{20}$), puntos de fusión (P_f °C) y punto de ebullición (P_e °C) y estereoquímica fueron comparados con los reportados en la bibliografía^{9-11,12,14}, quedando sus estructuras establecidas como (13*S*)-labdano-8 α ,15-diol (2), (13*R*)-labdano-8 α ,15-diol (3) y 13(*S*)-8 α -13-epoxilabd-14-eno (4).



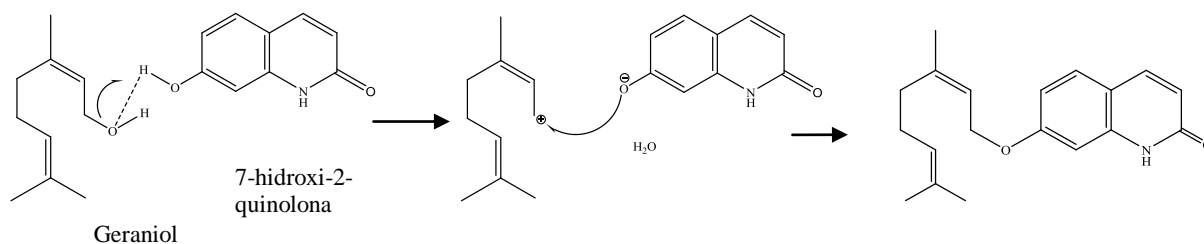


Figura 2. Posible ruta biosintética de (1).

Tabla 1: Datos RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz), ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) de (1)

(1)		
	δ_{C}	δ_{H} , m (J Hz)
2 (C=O)	161,1	-
3 (=CH-)	143,3	7,59, d (9)
4 (=CH-)	112,8	6,21, d (9)
5 (=CH-)	128,6	7,32, d (9)
6 (=CH-)	113,1	6,80, dd (9;2)
7 (=C<)	162,0	-
8 (=CH)	101,5	6,77, s
9 (=C<)	112,3	-
10 (=C<)	155,7	-
1' (-CH ₂ -)	65,4	4,57; 4,56, d (6)
2' (=CH-)	118,4	5,43, t (6)
3' (=C<)	142,1	-
4' (-CH ₂)	26,1	2,04; 2,03, m
5' (-CH ₂ -)	39,4	2,10; 2,09, m
6' (=CH)	123,5	5,04 td
7' (=C<)	131,8	-
8' (Me)	25,5	1,63, s
9' (Me)	17,6	1,57, s
10' (Me)	16,8	1,73, s

Conclusiones

Del género *Zanthoxylum*, se han descrito numerosos meroterpenoides mediante un átomo de carbono, éste es el primer reporte de un monoterpeno unido a un derivado de la 2-quinolona a través de un átomo de oxígeno y se le dio el nombre de *Zanthoxyfolina* (1), como nuevo producto natural. Además, se aislaron e identificaron tres derivados del labdano (2), (3) y (4), nunca antes descritos para el género *Zanthoxylum*

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento al FONACIT-PCP, Francia-Venezuela, y al Ministerio Francés de Asuntos Extranjeros por el financiamiento de estadía de L. Santiago. Al CDCHTA por el financiamiento de los proyectos C-1732-11-08-Ed y C-1750-11-08-A.

Referencias.

1. S Talapatra, S Dutta, B Talapatra. Alkaloids and terpenoids of *Zanthoxylum ovalifolium*. **Phytochemistry**, **12**(3), 729-730 (1973).

- D Della Casa, M Hasegawa, A Castaldi. Neutral compounds and alkaloids of *Zanthoxylum ocumarensis*. **Phytochemistry**, **11**(4), 1531-1532 (1972).
- N De Moura, H Ribeiro, E Machado, E Ethur, N Zanatta, A OREL. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, **46**(8), 1443-1446 (1997).
- V Jullian, G Bourdy, S Georges, S Maurel, M Sauvain. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal Ethnopharmacology**, **106**, 348-352 (2006).
- W De Abreu, A Weber, S Giacomelli, E Simionatto, I Dalcol, E Machado, A Farias. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, **63**(7), 773-775 (2003).
- H Cassidy. *Fundamentals of Chromatography*. New York. Interscience, p. 447 (1966).
- H Henke. *Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20*. Hüthig Verlag. Heidelberg. (1995).
- L Bellamy. *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Vol. 1 and 2. Chapman and Hall. London (1975).
- S Dev, R Misra. *CRC Handbook of Terpenoids-Diterpenoids*. Volume III. CRC Press, Inc. Florida, pp 14-15 (1986).
- F Piozzi, M Bruno. Diterpenoids in the Essential Oils from the Genus *Stachys*. **Records of Natural Products**, **3**(3), 120-125 (2009).
- C Henrick, P Jefferies. The chemistry of the euphorbiace-XI¹. The diterpenes of *Ricinocarpus muricatus* and the stereochemistry of eperuic acid. **Tetrahedron**, **21**, 1175-1190 (1995).
- A Baker, G Eglinton, A Gonzalez, R Hamilton, R Raphael.. A new leaf-gum constituents: Labdane-8 α ,15-diol. **Journal of the Chemical Society**, 4705-4708 (1962).
- C Demetzos, A Kolocouris, T Anastasaki. A Simple and Rapid Method for the Differentiation of C-13 Manoyl Oxide Epimers in Biologically Important Samples Using GC-MS Analysis Supported with NMR Spectroscopy and Computational Chemistry Results. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **12**, 3605-3609 (2002).