

ESTUDIO QUIMICO Y OBTENCION DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA ESPECIE *Rollinia pittieri* (ANNONACEAE) DEL ALTO SINU

RESUMEN

Del extracto etanólico de hojas, corteza y madera de la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae), se aislaron e identificaron cinco alcaloides con núcleo aporfinoide: Anonaina **1**, nornuciferina **2**, O-metilmoschatolina **3**, Isomoschatolina **4** y Liriodenina **5**; dos flavonoides: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **6** y 5,7,4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **7**. Todos los compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas (UV, IR, EM, RMN-¹H y ¹³C), incluyendo técnicas bidimensionales, y por comparación con datos espectroscópicos reportados en la literatura. El compuesto **6** presentó una significativa actividad captadora de radicales libres según los ensayos DPPH, ABTS y Generación Enzimática del Anión Superóxido.

PALABRAS CLAVES: Annonaceae, *Rollinia pittieri*, alcaloides flavonoides, antioxidantes DPPH. Aporfinoide.

ABSTRACT

From the etanolic extract of the leaves, bark and wood of the *Rollinia Pittieri* (Annonaceae) were isolated and identified five alkaloids with aporphine nucleus: Anonaine **1**, Nornuciferine **2**, O-methilmoschatoline **3**, Isomoschatoline **4** and Liriodenine **5**; two flavonoids: 5,7,3',4'-tetrahydroxi-3-O-rhamnosil-2-phenilcromone **6**, 5,7,4'-tetrahydroxi-3-O-rhamnosil-2-phenilcromone **7**. All compounds were identified by spectroscopic methods (IR, UV MS, ¹H NMR and ¹³C NMR), including 2D techniques and by comparison with dates reported spectroscopic in the literature. The compound **7** showed a significant activity catcher of free radicals according to the DPPH, ABTS and Enzymatic Generation of Superoxid Anion essays.

KEYWORDS: Annonaceae, *Rollinia Pittieri*, alkaloids, flavonoids, antioxidants, DPPH, Aporphines.

OMAR TORRES *

Lic. en Química y Biología, MsC
Profesor Asistente
omartorres@hispavista.com

GILMAR SANTAFA *

Lic. en Química. MsC. Ph.D
Profesor Titular
gsantafe@sinu.unicordoba.edu.co.com

ALBERTO ANGULO *

Lic. en Química y Biología, MsC
Profesor Asistente
aanguloo@hotmail.com

HILTONY VILLA *

Químico Farmacéutico
Profesor Titular
hilttny@latinmail.com

BENJAMIN ROJANO

Químico MsC
Profesor Titular
Universidad Nacional
brojano@unalmed.edu.co

JAIRO SAEZ

Químico Ph.D
Profesor Titular
Universidad de Antioquia
jaisav@matematicas.udea.edu.co

MARY MONTAÑO *

Químico
Profesor Asistente
maryc1281@yahoo.com

PAULA GALEANO *

Químico
paulagaleano20@yahoo.com.ar

* Universidad de Córdoba

1. INTRODUCCIÓN

El género *Rollinia* (Annonaceae) comprende 65 especies alrededor del mundo, 11 de ellas se encuentran distribuidas en el territorio colombiano [1]; algunas de estas especies se han investigado por su composición química y actividad farmacológica [2].

El presente estudio realizado en la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) describe la presencia en el extracto etanólico de cinco alcaloides, dos en la madera:

Anonaina **1**, Nornuciferina **2** y tres en la corteza; O-metilmoschatolina **3**, Isomoschatolina **4** y Liriodenina **5**, responsables de varios efectos fisiológicos, farmacológicos y biológicos; por ejemplo es conocido que poseen efectos inhibidores de la tirosina fosfatasa en la proteína CD45 [3], actividad antimalárica *in vitro* [4]. También se aislaron del extracto en acetato de etilo de hojas los flavonoides 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **6** y 5,7,4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **7**. Para alcaloides y

flavonoides aislados se asignaron señales de RMN ^1H y ^{13}C , lo que permitió identificarlos por este análisis y por comparación con datos espectroscópicos reportados en la bibliografía. Además se evaluó la actividad antioxidante del compuesto **6** por distintos métodos con el propósito de medir la capacidad captadora de radicales libres.

2. CONTENIDO.

2.1 Recolección del material vegetal: El material vegetal de hoja, corteza y madera fue colectado en la vereda el Reposo en el municipio de Valencia Departamento de Córdoba, Colombia. La identificación botánica como *Rollinia pittieri* (Annonaceae), fue realizada por el Doctor Álvaro Cogollo del Jardín Botánico "Joaquín Antonio Uribe". Universidad de Antioquia.

2.2 Materiales y métodos: Los espectros infrarrojo se realizaron en un equipo Perkin-Elmer RXI (FT-IR) en un rango de barrido entre 4000 a 500 cm^{-1} . Los espectros de Resonancia magnética se corrieron en el espectrómetro Bruker AM 400 MHz a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Los solventes utilizados fueron CDCl_3 y MeOD. Los espectros de masas se tomaron en un espectrómetro Nermag-Sidar R10 – 10C.

2.3 Extracción y aislamiento: El material de hojas, corteza y madera, seco y molido se sometió a extracciones sucesivas con etanol al 96% mediante el método de maceración en frío. Al extracto etanólico de corteza y madera se le realizó un desengrase con hexano y luego se hizo la extracción clásica de alcaloides totales [5]. El extracto etanólico de hojas se sometió al proceso de fraccionamiento por reparto empleando un sistema de polaridad creciente (Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, Butanol y agua). A partir del subextracto en acetato de etilo se aislaron los flavonoides **6** y **7**. El aislamiento y la purificación de los alcaloides se hizo por cromatografía en columna (CC) y por cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) empleando el sistema de elución Cloroformo-Metanol 9:1; para los flavonoides se emplearon los mismos métodos cromatográficos, pero se utilizó el sistema de elución Acetato de etilo-Diclorometano-Metanol 4:1:1.

2.4 Ensayo de actividad antioxidante: Se realizaron ensayos dirigidos de Actividad Antioxidante a algunas fracciones y a los compuestos aislados. Se encontró que solo el compuesto **6** poseía una gran capacidad captadora de radicales libres, por lo tanto se le evaluó esta actividad por los métodos DPPPH, método del ABTS, Ensayo de Generación Enzimática del Anión Superóxido.

2.5. Resultados y discusión: Del extracto etanólico de madera de la especie *Rollinia pittieri* se aislaron los compuestos Anonaina **1** y nornuciferina **2**, que corresponden a alcaloides con núcleo Noraporfínicos,

que han sido aislados de otras especie del género *Rollinia* [4]. A partir del extracto etanólico de corteza se aislaron los compuestos O-metilmoschatolina **3**, Isomoschatolina **4** y Liriodenina **5**, que corresponden a alcaloides con núcleo Oxoaporfínico (**figura 1**). El compuesto **4** se aisló por primera vez en el género y en la especie. Todas las estructuras fueron elucidadas utilizando técnicas espectroscópicas como UV, IR, EM, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C (mono y bidimensionales) y por comparación con muestras auténticas.

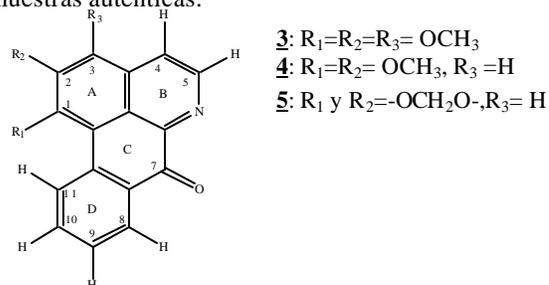


Figura 1. Alcaloides Oxoaporfínicos

Del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Rollinia pittieri*, se aislaron los flavonoides 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **6** y 5,7,4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **7**, (**figura 2 y 3**).

El compuesto **6**, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona (**figura 2**) se aisló como un sólido de color blanco cremoso, al cual se le realizó la prueba de Shinoda, específica para Flavonoides dando positiva. El espectro IR, ν_{max} (cm^{-1}), muestra una banda de alargamiento (C=O) en 1676.8 cm^{-1} . También se observa una banda muy pronunciada a 3272.5 cm^{-1} , correspondiente a alargamientos O-H. El espectro de masas, realizado por técnicas suaves, TOF – MS ES+ muestra un pico a $m/z = 471.1$, correspondiente al Ion molecular mas 23 unidades, este pico esta representado como $[\text{M}^+ + \text{Na}^+]^+$, así el peso molecular para este compuesto es de 448.1 u.m.a. correspondiente a una fórmula molecular condensada $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{O}_{11}$. El espectro de masas también muestra fragmentos a m/z 413.2 y m/z 291.1.

El análisis del espectro de RMN – ^1H (MeOD, 400 MHz) permite observar dos sistemas en la región aromática; uno del tipo AX y el otro de tipo AMX [6]. Para el primer sistema se observan dos desplazamientos a δ : 6.37 ppm (d, 1H, J= 1.3 Hz) y δ : 6.20 ppm (d, 1H, J= 1.7 Hz) correspondiente a protones del anillo A del núcleo básico. Para el sistema del otro anillo (B) aromático aparecen las siguientes señales: δ : 7.32 ppm (dd, 1H, J= 8.2 Hz y 2.0 Hz) δ : 7.35 ppm (d, 1H, J= 1.9 Hz) y δ : 6.92 ppm (d, 1H, J= 8.3 Hz). Característica de un núcleo Flavonol. Las señales de los demás protones aparecen en la **tabla 1**. En el espectro de RMN- ^{13}C (MeOD, 100 MHz) técnica DEPT, se muestran 10 señales correspondientes a carbonos metínicos, de las cuales 4 aparecen en la región alifática entre δ : 71.8 - 73.2 ppm,

que por su desplazamiento están unidos a un heteroátomo; estas señales son características de un azúcar. Sin embargo la señal del carbono 6 del azúcar no aparece alrededor de 60.00 ppm, como es característico, lo que indica que este carbono está deshidroxilado. En el mismo análisis se observó una señal δ : 17.6 ppm que corresponde al carbono de un grupo metilo unido al

carbono 6 del azúcar. Así mismo en el espectro de RMN – ^1H (MeOD, 400 MHz) se observó una señal a δ : 5.36 ppm, la cual corresponde al protón del carbono anomérico del azúcar. Las demás señales de carbono trece del núcleo básico y del azúcar se presentan en la tabla 1.

COMP <u>6</u>	^1H d/ppm (H, Mult, J/Hz)	^{13}C d/ppm	HMBC	COMP <u>7</u>	^1H d/ppm (H, Mult, J/Hz)	^{13}C d/ppm	HMBC
2	--	123.0	--	2	--	151.1	--
3	--	136.2	--	3	--	159.2	--
4	--	179.6	--	4	--	180.4	--
5-OH	--	158.6	--	5	--	135.7	--
6	6.38(1H, d, 1.30)	94.8	C5,C10, C8, C7	6	6.15(1H, d, 1.37)	96.7	C8
7-OH	--	166.2	--	7	--	165.6	--
8	6.21(1H, d, 1.74)	99.9	C6,C10,C9	8	6.08(1H, d, 1.64)	102.6	--
9	--	163.2	--	9	--	148.2	--
10	--	105.8	--	10	--	118.2	--
1'	--	159.3	--	1'	--	158.3	--
2'	7.36(1H, d, 1.92)	116.9	C6',C3',C4',C1'	2',6'	6.88(2H, d, 8.80)	116.8	C2', C6'
3'-OH	--	146.4	--	3',5'	7.70(2H, d, 8.78)	131.8	C3', C5',C1', C4'
4'-OH	--	149.8	--	4'-OH	--	162.8	--
5'	6.93(1H, d, 8.32)	116.3	C6',C3,C4'	1''	5.32(1H, d, 1.64)	103.5	C2''
6'	7.32(1H, dd, 2.00, 8.28)	122.8	C2',C4'	2''	3.33(1H, t, 11.5)	72.2	C3''
1''	5.37(1H, d, 1.38)	103.5	C2'', C3	3''	3.69(1H, m)	72.0	C2'', C4''
2''	3.43(1H, t)	73.2	C3''	4''	4.19(1H, m)	72.2	C3'', C5''
3''	3.78(1H, m)	72.0	C2'', C4''	5''	3.31(1H, m)	73.3	C4'', C6''
4''	4.24(1H, m)	72.1	C3'', C5''	6''	0.89(3H, d, 5.69)	17.7	C5''
5''	3.37(1H, m)	71.9	C4'', C6''				
6''	0.96(3H, d, 6.08)	17.6	C5''				

Tabla 1. Datos espectroscópicos de d RMN – ^1H , RMN – ^{13}C y HMBC del compuesto 6 y 7

La técnica ^1H - ^1H COSY, (figura 2) mostró correlaciones entre el protón a δ : 6.37 ppm con el protón a δ : 6.20 ppm, lo que confirmó la existencia del sistema AX del anillo A. Para el sistema AMX del otro anillo aromático (B) se observaron las correlaciones entre el protón a δ : 7.35 ppm con el protón a δ : 7.32 ppm y, este a su vez, correlacionando con el protón a δ : 6.92 ppm. (figura 2).

Del experimento HMQC, se tiene la conectividad exacta de cada hidrógeno sobre el carbono al cual está unido, siendo correlaciones importantes las siguientes: el protón a δ : 7.35 ppm con el carbono a δ : 116.9 ppm, el protón a δ : 6.92 ppm con el carbono a δ : 116.3 ppm, el protón a δ : 6.37 ppm con el carbono a δ : 94.7 ppm y el protón a δ : 6.20 ppm con el carbono a δ : 99.9 ppm.

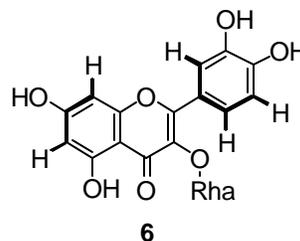


Figura 2. Estructura del compuesto 6

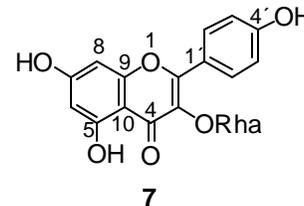


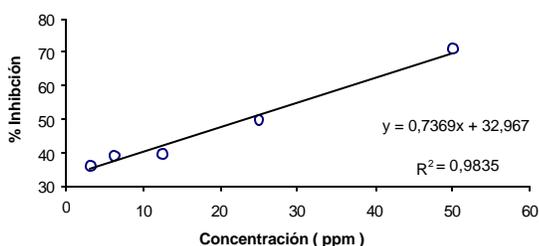
Figura 3. Estructura del compuesto 7

El espectro HMBC, correlaciona protones con carbonos a dos, tres y cuatro enlaces. Las correlaciones para el núcleo flavonol se reportan en la tabla 1; cabe destacar aquí la correlación entre el protón a δ : 5.36 ppm (protón anomérico del azúcar) con el carbono a δ : 136.2 ppm (carbono 3 del núcleo flavonólico), lo cual indica que el

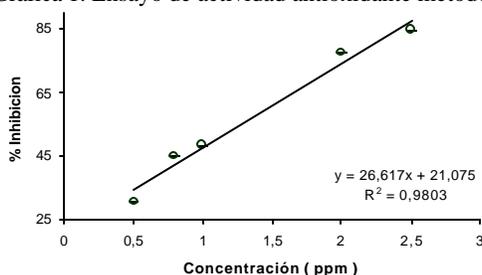
flavonoide se encuentra 3-glicosidado, lo que biogenéticamente es común en este tipo de compuestos.

El compuesto **7** fue identificado como, 5,7,4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona un sólido pulverizado de color naranja; los resultados de **RMN-¹H** (MeOD 400 MHz), **RMN-¹³C** (MeOD, 100 MHz) técnica **DEPT** y las correlaciones a dos, tres y cuatro enlaces se muestran en la tabla 1

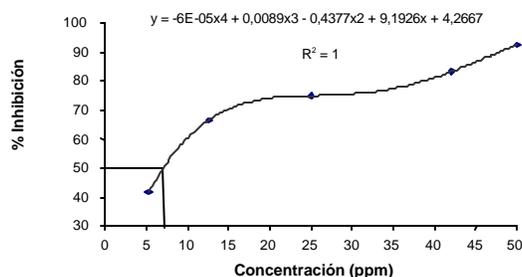
2.6 Evaluación de la actividad antioxidante del compuesto 6: Se realizó la evaluación de la capacidad antioxidante para el compuesto **6** empleando los ensayos de DPPH; ABTS y Generación enzimática del anión superóxido. Para los tres ensayos realizados el compuesto mostró una gran capacidad captadora de radicales libres, si se compara con el de otros antioxidantes naturales como el ácido ascórbico, el BHA y el BHT, la cual se atribuye a estos compuestos fenólicos con la presencia de varios grupos hidroxilos libres en la molécula [7]. El método de DPPH muestra un IC₅₀ de 25.12 ppm, la prueba de ABTS arrojó un valor de 1.02 ppm (gráficas 1 y 2). Por otra parte el ensayo de generación enzimática del anión superóxido mostró un IC₅₀ de 8.25 ppm (gráfica 3)



Gráfica 1. Ensayo de actividad antioxidante método DPPH.



Gráfica 2. Ensayo antioxidante por el método ABTS.



Gráfica 3 Ensayo de actividad antioxidante por el método de Generación Enzimática del Anión superóxido.

3. CONCLUSIONES

Del extracto etanólico de la madera de la especie *Rollinia pittieri* se aislaron los alcaloides Anonaina **1** y nornuciferina **2**. A partir del extracto corteza se aislaron los alcaloides O-metilmoschatolina **3**, Isomoschatolina **4** y Liriodenina **5**. Del extracto en acetato de etilo hojas se aislaron dos flavonoides 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **6** y 5,7,4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona **7**.

El perfil antioxidante realizado al compuesto **6** muestra gran capacidad captadora de radicales libres, aporte significativo que permite continuar ensayando otros métodos para la búsqueda de moléculas naturales con actividad antioxidante, que puedan ser utilizadas en la prevención de enfermedades dependientes de procesos oxidativos, también en la utilización como preservantes de alimentos.

4. BIBLIOGRAFIA

- [1] MURILLO, A, J. Las Annonaceae de Colombia. *Biota Colombiana*. (1) 49-58. 2001
- [2] RAYNAUD-LE., *et al.* "In vitro Antileishmanial Activity of Acetogenins from Annonaceae". *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58(6-7). 388 - 392. 2004
- [3] MISKI, M., *et al.* Aporphine Alkaloids, CD 45 Protein Tyrosine Phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*. 5 (4) 1519-1522. 1995
- [4] SÁENZ A., *et al.* Aporfinoïdes en corteza de *Guatteria lehmannii* y evaluación de su actividad antimalárica *in vitro*. *Revista Colombiana de Química*. 26(1)1-9.1997.
- [5] TORRES, A. *et al.* Estudio Químico y Obtención de Principios Activos de la Especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) del Alto Sinú. *Informe final de Investigación*. Universidad de Córdoba. 13-21.2006.
- [6] NATHAN, p. *et al* Elementos de Resonancia Magnética Nuclear. Segunda Edición. Grupo Editorial Iberoamericana 40-36. 1993.
- [7] D.I., TSIMOGIANNIS, *et al* "Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of 5,7,3',4'- hydroxy - substituted flavonoids". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*". 523- 528. 2004.