

ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Esenbeckia runyonii* (Rutaceae)

RESUMEN

Del extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* (Rutaceae) se aisló un alcaloide acridónico 1-Hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona **1** y la estructura fue establecida por análisis espectroscópicos de RMN, incluyendo técnicas 2D y por comparación de datos de la literatura. Este es el primer estudio fitoquímico y de actividad biológica reportado de la corteza de *E. runyonii*. Se determinó la actividad citotóxica *in vitro*, del extracto etanólico en las células tumorales humanas, U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKUL, la actividad antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica y antioxidante.

PALABRAS CLAVES: *Esenbeckia runyonii*, Rutaceae, Acridona, Antibacterial, Antifúngica, Antioxidante, Antiinflamatoria, Citotóxica.

ABSTRACT

From the ethanolic extract of bark of Esenbeckia runyonii (Rutaceae) was isolated one acridone named 1-Hydroxy-3-methoxy-N-methylacridone 1 and structure was established by spectroscopic analyses of NMR, including 2D techniques and comparison with literature data. This is the first phytochemical and biological activity reported study of the bark of E. runyonii. The in vitro cytotoxic activity was determined against U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 and SKUL human cells, antiinflammatory, antibacterial, antifungal and antioxidant of the ethanolic extract.

KEYWORDS: *Esenbeckia runyonii*, Rutaceae, Acridone, Antibacterial activity, Antifungal, Antioxidant, Antiinflammatory, Cytotoxic.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies de la familia Rutaceae no solo presentan propiedades medicinales sino que también presentan aplicaciones industriales como es el caso del género *Citrus* cuyas especies son ampliamente usadas en la industria de alimentos, el género *Murraya* usado en la industria de perfumes y saborizantes y los géneros *Amyris*, *Zanthoxylum* y *Hortia* que presentan potencial como especies maderables. Muchos compuestos volátiles obtenidos de frutos y hojas de especies de esta familia son usados en la industria farmacéutica como aromatizante y antioxidante [1].

Los usos en la medicina tradicional que han sido reportados por los individuos de la familia Rutaceae y los diversos metabolitos que se han aislado exhibiendo actividad biológica y quimiotaxonómica, justifican el estudio de esta familia. El género *Esenbeckia* ha sido estudiado muy poco en nuestro país y en particular la especie *Esenbeckia runyonii*, que crece en la región caribe, no ha sido estudiada aún, todo ello señala que se hace necesario adelantar investigaciones que permitan enriquecer el conocimiento quimiotaxonómico y fitoquímico del género *Esenbeckia*.

Los estudios de las especies de este género reportan como metabolitos principales: alcaloides [2] de tipo quinolínico,

acridónico e indólico, furanocumarinas [3] de tipo lineales y angulares, flavonoides [4] y terpenoides [5].

El objetivo principal de esta investigación es la elucidación estructural de los compuestos aislados del extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* (Rutaceae) así como los resultados de las pruebas antibacterial [6], antifúngica [7], antitumoral [8], [9] antiinflamatoria [10], [11] y antioxidante [12], [13], [14] realizados en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

2. CONTENIDO

2.1. Material Vegetal

El material vegetal empleado en esta investigación corresponde a la corteza *Esenbeckia runyonii* (Rutaceae), recolectada en los Montes de María, en el departamento de Bolívar, en Octubre de 2004, por el Biólogo Giovanni Montes Arrieta de la Universidad de Sucre.

La especie fue determinada por el Biólogo Eduino Carbonó De La Hoz del Herbario UTM-12000 de la ciudad de Santa Marta.

2.2. Extracción y Purificación

1100 g de corteza seca y molida se sometieron a una extracción por percolación con etanol al 96%, obteniéndose 30 g de extracto etanólico. Luego se

JORGE A. LASPRILLA COLL

Ingeniero Químico
Estudiante de Maestría
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá
lcollj@unal.edu.co

LUIS ENRIQUE CUCA SUÁREZ

Químico, Dr. Sci.
Profesor Asociado
Universidad Nacional de Colombia
Sede Bogotá
lecucas@unal.edu.co

fraccionó por soxhlet con tres solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, cloroformo y acetato de etilo. El compuesto **1** se aisló del extracto clorofórmico.

2.3. Actividad Biológica

2.3.1. Actividad Antitumoral

La actividad antitumoral *in vitro* fue llevada a cabo de acuerdo con el protocolo de la NCI. El ensayo se hizo usando un panel de líneas celulares tumorales humanas. Las líneas celulares son U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 and SKUL. En general, el método utilizado es el mismo descrito por Monks *et al* [8], [9].

2.3.2. Actividad Antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se llevó a cabo *in vivo* en ratones usando el modelo de edema inducido con TPA. La metodología usada se encuentra en las referencias [10], [11].

2.3.3. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se llevó a cabo *in vitro* midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). La metodología usada se encuentra en las referencias [12], [13], [14].

2.3.4. Actividad Antibacterial

La actividad antibacterial se llevó a cabo usando el método de difusión en agar Mueller-Hinton contra los microorganismos a ensayar *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* *torr*, *Staphylococcus epidermis*, *Vibrio cholerae* caso clínico. La metodología usada se encuentra en la referencia [6].

2.3.5. Actividad Antifúngica

La actividad antifúngica se llevó a cabo usando el método de difusión en agar papa dextrosa contra los hongos *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus Níger*. La metodología usada se encuentra en la referencia [7].

2.4. Resultados y Análisis de Resultados

2.4.1. Elucidación Estructural del Compuesto 1

El compuesto **1** se aisló como un sólido de color anaranjado, el cual fue recrystalizado en metanol, su punto de fusión fue de 169-170 °C.

En el espectro IR se observan bandas de tensión en 3340 cm^{-1} característica del grupo hidroxilo, en 1637 cm^{-1} aparece una banda aguda e intensa debida a estiramientos del enlace C=O, aparecen bandas entre 1500 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} características del estiramiento C=C en compuestos aromáticos [15].

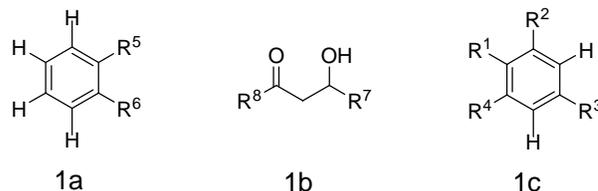
Teniendo en cuenta el espectro de RMN- ^1H a 400 MHz y sus respectivas ampliaciones se hicieron las siguientes observaciones: aparecen dos singletes, uno a δ : 3.79 (3H, s), y otro a δ : 3.91 (3H, s), que según las referencias bibliográficas, por su desplazamiento y multiplicidad son características de grupos *N*-metilo y metoxilo

respectivamente [16]; también se observa, la señal en δ : 6.32 (2H, s), que por su desplazamiento y multiplicidad corresponde a dos protones situados en anillo aromático. Aparecen en el espectro de RMN- ^1H , cuatro señales, δ : 7.30 (1H, ddd, $J=0.7\text{Hz}$, 7.1Hz, 8.0Hz), δ : 7.49 (1H, d, $J=0.7\text{Hz}$, 8.7Hz), δ : 7.72 (1H, ddd, $J=1.7\text{Hz}$, 7.1Hz, 8.7Hz), δ : 8.47 (1H, dd, $J=1.7\text{Hz}$, 8.0Hz), que por los desplazamientos, multiplicidades y constantes de acoplamiento se trata de cuatro protones aromáticos en posiciones consecutivas, formando un sistema ABCD [17]. También en el espectro de RMN- ^1H , aparece una señal a campo muy bajo δ : 14.8 (1H, s) que por su desplazamiento, integración y multiplicidad corresponde a un protón fenólico influenciado por un grupo carbonilo, señales que se encuentran evidenciadas en el espectro IR. Se tiene pues un total de 13 hidrógenos, 1 Hidroxílico, 6 Aromáticos (4 en un anillo y 2 en el otro) y 6 Alifáticos unidos a heteroátomos.

El espectro de RMN- ^{13}C muestra una señal en δ : 180.83, correspondiente a un carbono cuaternario de un grupo carbonilo, además se confirma la presencia de los grupos *N*-metilo y metoxilo con las señales de los carbonos en δ : 34.07 y δ : 55.58 respectivamente.

Al comparar los espectros de RMN- ^{13}C y los experimentos DEPT 90 y DEPT 135, se observan las señales de los carbonos en δ : 34.07 y δ : 55.58 de los carbonos metílicos unidos a los heteroátomos N y O, la señal en δ : 180.83 del carbono cuaternario carbonílico y doce carbonos de los dos anillos aromáticos distribuidos así: 7 son metínicos y 5 son cuaternarios, dos de estos últimos son oxigenados cuyas señales están en δ : 166.08 y δ : 166.06, y otros dos unidos al nitrógeno lógicamente, para un total de 15 carbonos.

La presencia de los sustituyentes OH, C=O, *N*-CH₃, OCH₃, el número de hidrógenos y de carbonos previamente obtenidos sugiere la fórmula molecular C₁₅H₁₃O₃N, lo cual daría un IDH de 10. Como hay un IDH en el grupo carbonilo y ocho entre los dos anillos aromáticos, faltaría solo uno, y que obligatoriamente deberá ser un ciclo. Este análisis permite proponer las estructuras parciales **1a**, **1b**, **1c**.



Se propuso la estructura **1c** debido a que los dos hidrógenos situados en δ : 6.32 (2H, s) no presentaban constante de acoplamiento. Acoplando las estructuras parciales **1a**, **1b**, **1c** y teniendo en cuenta el número de carbonos, el IDH, las valencias que faltan por sustituir y la química del género *Esenbeckia* se propone la estructura **1**;

de manera tal que el sustituyente OCH_3 se encuentre en la posición de la valencia libre.

Las técnicas HMQC y HMBC ayudaron a la confirmación de la estructura propuesta, la cual corresponde a un alcaloide de tipo acridona denominado: 1-Hidroxi-3-metoxi-*N*-metilacridona **1**.

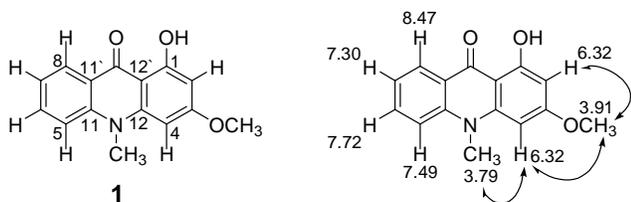


Figura 1. Estructura del compuesto **1** y correlaciones espaciales de los grupos *N*-metil y *O*-Metil.

El análisis del HMQC muestra las conectividades C-H, de los dos protones en posición relativa meta δ : 6.32 (2H, s), uno está sobre el carbono δ : 94.03 y el otro sobre el carbono δ : 90.08. Por otro lado los protones del anillo aromático pertenecientes al sistema ABCD δ : 7.30, δ : 7.49, δ : 7.72 y δ : 8.47 se encuentran conectados con los carbonos δ : 121.43, δ : 114.47, δ : 134.07 y δ : 126.81 respectivamente. El orden reportado en la literatura en estos tipos de sistemas se muestra en la figura 1. [18]

El análisis del HMBC muestra correlaciones a 2J y 3J como las del protón δ : 6.32 que correlaciona a 2J con los carbonos δ : 166.08 y δ : 166.06 y a 3J con los carbonos δ : 90.08 y δ : 144.77; el otro protón en δ : 6.32 correlaciona a 2J con los carbonos δ : 105.32 y δ : 166.06 y a 3J con el carbono δ : 94.03. El protón en δ : 14.8 se correlaciona a 3J con los carbonos δ : 94.03 y δ : 105.32 y a 2J con el carbono δ : 166.06 o con el carbono δ : 166.08, esto se debe a los valores tan cercanos de los carbonos.

El espectro NOESY muestra las correlaciones espaciales entre el hidrógeno *N* metílico y los hidrógenos situados en δ : 6.32 y δ : 7.49, también muestra la correlación espacial entre el hidrógeno metoxílico y los hidrógenos en δ : 6.32. En la figura 2 se aprecian las correlaciones espaciales descritas anteriormente.

Por consiguiente se concluye que el compuesto aislado es el 1-Hidroxi-3-metoxi-*N*-metilacridona **1**, Figura 1. Cabe anotar que todo lo reportado en esta investigación es nuevo, ya que la especie *Esenbeckia runyonii* no había sido estudiada aún.

El resumen de las conectividades y correlaciones se encuentran consignados en la tabla 1.

N ^o C	1H (ppm)	Multipl	J (Hz)	13C (ppm)	DEPT	HMQC	HMBC
1	-----	-----	-----	166.083	C	-----	-----
1-OH	14.8	s	-----	-----	-----	-----	94.035, 167.747, 105.320,
2	6.32	s	-----	94.035	CH	94.035	90.089, 167.74, 166.06, 105.320
3	-----	-----	-----	166.060	C	-----	-----
3-OCH ₃	3.91	s	-----	55.589	CH ₃	55.589	166.060
4	6.32	s	-----	90.089	CH	90.089	166.060, 94.035, 105.320
5	7.49	d	0,7-8.7	114.476	CH	114.476	121.439, 121.106
6	7.72	ddd	1.7-7.1-8.7	134.073	CH	134.073	126.813, 142.448
7	7.30	t	0.7-7.1-8.0	121.439	CH	121.439	114.476, 121.106
8	8.47	dd	1.7-8.0	126.813	CH	126.813	134.073, 180.830, 142.448
9	-----	-----	-----	180.830	C	-----	-----
11	-----	-----	-----	142.448	C	-----	-----
11'	-----	-----	-----	121.106	C	-----	-----
12	-----	-----	-----	144.770	C	-----	-----
12'	-----	-----	-----	105.320	C	-----	-----
N-CH ₃	3.79	s	-----	34.077	CH ₃	34.077	142.448, 144.770

Tabla 1. Datos de RMN ¹H, RMN ¹³C, HMQC y HMBC del compuesto **1**, utilizando como solvente CDCl₃

2.4.2. Resultados de la Actividad Antitumoral

El extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* mostró una alta capacidad de inhibición de crecimiento celular tumoral. Las líneas celulares usadas y su

respectivo porcentaje de inhibición fueron: U251 (Sistema Nervioso Central) (100%), PC-3 (Próstata) (100%), K562 (Leucemia) (97.69%), HCT-15 (Colon) (100%), MCF-7 (Mama) (100%) y SKUL (Pulmón) (98.53%)

2.4.3. Resultados de la Actividad Antiinflamatoria

El extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* no mostró actividad antiinflamatoria *in vivo* en ratones usando el modelo de edema inducido con TPA.

2.4.4. Resultados de la Actividad Antioxidante

El extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* no mostró actividad antioxidante *in vitro* midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

2.4.5. Resultados de la Actividad Antibacterial

El extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* no mostró actividad antibacterial contra los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* torr, *Staphylococcus epidermis*, *Vibrio cholerae* caso clínico.

2.4.6. Resultados de la Actividad Antifúngica

El extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* no mostró actividad antifúngica contra los hongos *Fusarium sporotrichum*, *Fusarium monoliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus Níger*

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del extracto etanólico de la corteza de *Esenbeckia runyonii* se aisló el alcaloide tipo acridona denominado 1-Hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona **1**, el cual mostró una alta capacidad de inhibición de crecimiento celular tumoral. No mostró actividad antiinflamatoria usando el modelo de edema inducido con TPA, no mostró actividad antioxidante utilizando DPPH, no mostró actividad antibacterial ni fúngica. Se recomienda seguir fraccionando el extracto etanólico.

4. BIBLIOGRAFÍA

[1] Cuca Suarez, L. E., (1998), Tesis de Doctorado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 3-8.

[2] Guilhon, G., Baetas, A., Maia, J and Conserva, (1994), *Phytochemistry*, 37, 1193-1195.

[3] Dreyer, D., (1980), *Phytochemistry*, 19, 941-944.

[4] Trani, M., Carbonetti, A., Monache, D., Monache, F., (2004), *Fitoterapia*, 75, 99-102.

[5] Ríos, M. Y., Delgado G., (1992), *Journal Natural of Products*, 55, 1307 – 1309.

[6] Vanden-Berghe, D.A., Vlienticick, A. J., (1991), *Methods in plant biochemistry*, Vol 6 “Assay for bioactivity”, Ed. DeyP.M. Academic press, New York, USA. , 47-71.

[7] Hexianng, W., Tzi, B., NG., (2002), *Phytochemistry*, 61, 1-16.

[8] Monks, A., Scudiero, D., Skehan P., Shoemaker, R., Paul K., Vistica, D., Hose C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M., (1991), *Journal of the National Cancer Institute*, 38(11), 757-766.

[9] Oviedo, I. and Ramirez, T., (2005), *Journal of Pharmacy an Pharmacology*, 57, 1087-1091.

[10] Rao, T. S., Currie, J. I., Shaffer, A. F. and Isakson, P. (1993), *Inflammation*, 10, 723-741.

[11] Payá, M., Ferrandiz, M. I., Erradi, F, Terencio, M. C., Kijjoa, A., Pinto, M., and Alcaraz, M., J. (1996), *European Journal of Pharmacology*, 312, 97-105.

[12] Cotelle, N., et al, (1996), *Free Radical & Medicine*, 20, (1), 35-43.

[13] Gámez, E., et al, (1998), *Journal Natural of Products*, 61, 706-708.

[14] Cavin, A., et al, (1998), *Planta Médica*, 64, 393-396.

[15] Silverstein, R.M., Bassier, G., Morril, J., (1991), “Spectrometric identification of organic compounds”, Fifth edition, Jhon Willey & Sons, INC, New York.

[16] Tetsuon, A., Jhons, T., Isoaltion, (1990), *Journal Natural of Products*, 53, N. 6, 1508-1515.

[17] Nathan, P. J., Diaz, T.E., (1992), *Elementos de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno*. Segunda edición. Grupo Editorial Iberoamericano. México.

[18] Kuzovkina, I., Al'terman, I., Schneider, B., (2004), *Phytochemistry*, 65, 1095-1100.