

Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Wigandia urens* (*Hydrophyllaceae*)

Isolation and identification of secondary metabolites in leaves from *Wigandia urens* (*Hydrophyllaceae*)

Juan Camilo Vargas Gallego, Leovigildo Quijano

*Departamento de productos naturales, Instituto de química-UNAM, México D.F, México*¹

*Escuela de química, Universidad tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia*²

kmilovg18@hotmail.com

quijano@unam.mx

Resumen— Se aisló dos compuestos no conocidos en la planta el flavidulol A y la geranilhidroquinona. El primero es un benzociclododecadieno aislado anteriormente de un hongo [2], compuesto muy similar al wigandol, reportado antes en la misma planta [1] y aislado nuevamente en este estudio. El segundo es una hidroquinona prenilada reportada en otros géneros de la misma familia [4]. Adicionalmente se encontraron 5 compuestos ya aislados en esta especie, dos de ellos derivados de la geranilhidroquinona.

Palabras claves— flavidulol A, wigandol, geranilhidroquinona, *Wigandia urens*, RMN.

Abstract—Two compounds don't know in the plant were isolated, flavidulol A and geranylhydroquinone. The first is a previously isolated benzocyclodecadiene from a fungus [2], very similar to wigandol, reported previously from the same plant [1] and isolated in this study again. The second compound is a prenylated hydroquinone reported in other genera of the same family. Additional 5 compounds were isolated in this species and two of them derivate from geranylhydroquinone.

Keywords— flavidulol A, wigandol, geranylhydroquinone, *Wigandia urens*, NMR

I. INTRODUCCIÓN

Wigandia urens es un arbusto que pertenece a la familia Hydrophyllaceae. Crece en el Pedregal de San Ángel, reserva ecológica ubicada al interior de la UNAM.

De esta familia se han aislado varios tipos de compuestos entre ellos terpenos, flavonoides [1], [6], [7] y algunos compuestos fenólicos prenilados [1], [3], [4], [5].

Estos compuestos prenilados con cadenas de geranilo se ciclan al anillo aromático formando benzociclododecadienos, que tienen grupos OH o derivados

dependiendo de su precursor fenólico. A este tipo de compuestos pertenece el wigandol y el flavidulol A.

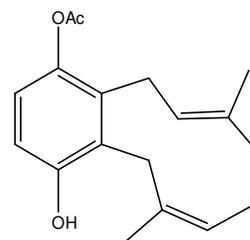


Figura 1. Estructura del wigandol

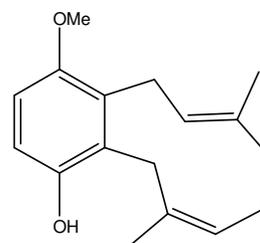


Figura 2. Estructura del flavidulol A

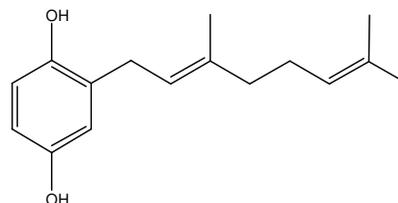


Figura 3. Estructura de la geranilhidroquinona

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales y equipos

Se utilizó Sílica-gel de malla 230-400 para cromatografía en columna. Placas de Sílica-gel de 0.20 mm fueron usadas para TLC analítica y 0.25, 0.5, 1 y 2 mm para TLC preparativa, con indicador de fluorescencia suministradas por MACHEREY NAGEL. Se usó un espectrómetro FT-IR Bruker Tensor 27 para la toma de espectros de infrarrojo. Un espectrómetro de masas Jeol, JMS AX-505 HA por impacto electrónico a 70 eV y un cromatógrafo Agilent 6890N y espectrómetro de masas Jeol JMS-GCMate II para GC-MS. Un equipo Bruker Avance III para espectros de RMN de 400 MHz.

Todos los datos de RMN son reportados con referencia al TMS y el disolvente usado CDCl_3 . Los desplazamientos químicos δ son dados en ppm y las constantes de acoplamiento J en Hz.

- [1] La condicionen cromatográficas utilizadas para el espectro de CG-MS fueron:
- [2] Se utilizó una columna HP5 (30m x 0.25 mm (D.I) x 0.25 μm espesor de película).
- [3] EL flujo utilizado fue de 1 ml/min.
- [4] Gas de arrastre utilizado: helio
- [5] Rampa de temperatura: La temperatura comenzó en 30°C se mantuvo por un minuto, de ahí se aumentó a 7°C/min hasta 305°C y se mantuvo por 5 min.

B. Material vegetal

Se recolectaron 300g de Hojas secas de *Wigandia kunthii* en el campus de la UNAM el 14 de abril de 2008 y su identificación se hizo de acuerdo al Voucher GOMEZ-10 que se encuentra en el Herbario Nacional de la UNAM (MEXU).

C. Extracción y Aislamiento de los compuestos

Se realizó cromatografía en columna de Sílica-gel del extracto de hexano (25.58 g). Se obtuvo 15 fracciones nombradas JCV-Wk A-P. A la fracción JCV-Wk-E (2.4930 g) se le aplicó nuevamente cromatografía en columna de Sílica-gel utilizando CH_2Cl_2 como eluyente obteniendo 7 fracciones que se nombraron JCV-Wk EA-EG. A la fracción JCV-Wk-EB (0.6823g) se le aplicó nuevamente cromatografía en columna de Sílica-gel eluyendo con Hexano-Acetato de Etilo, en orden creciente de polaridad obteniendo 17 fracciones. (EBA-EBQ) A la fracciones JCV-Wk-EBG y JCV-Wk-EBH se les aplicó TLC preparativa obteniendo el Flavitudol A (44.8 mg) de las fracciones JCV-Wk-EBGc y JCV-Wk-EBHd (Fig. 2). En la fracción JCV-Wk-EBKc se obtuvo una mezcla en la cual el producto mayoritario analizado tanto por RMN y CG-EM era el 3-geranil-4-metoxifenol (16.6 mg). [10]

A la fracción G se le aplicó cromatografía en columna de Sílica-gel eluyendo con CH_2Cl_2 -Acetona en orden creciente de polaridad. En la fracción JCV-Wk-GE y JCV-Wk-GF se les aplicó TLC preparativa obteniendo en

las fracción JCV-Wk-GEe-g y JCV-Wk-GFd-e el ácido 3-geranil-4-metoxibenzoico (17.0 mg) [11], y en la fracción JCV-Wk-GFa se obtuvo cantidades adicionales del 3-geranil-4-metoxifenol. (7.5 mg). La fracción JCV-Wk-GI se lavó con MeOH y se filtró obteniendo un sólido que se identificó como β -sitosterol (154 mg).

De la fracción JCV-Wk-H se separaron unos cristales en los lavados con CH_2Cl_2 y MeOH obteniendo 196.4 mg de Wigandol (Fig. 1). Se le hizo cromatografía en columna a las aguas de lavado. Se eluyó con CH_2Cl_2 -Acetona en orden creciente de polaridad, obteniendo 12 fracciones.

A las fracciones JCV-Wk-HA, JCV-Wk-HB y JCV-Wk-HD se les aplicó TLC preparativa y se obtuvo cantidades adicionales del ácido asilado en fracciones anteriores (63.9 mg). De las fracciones JCV-Wk-HF y JCV-Wk-HG se obtuvo mayor cantidad de cristales de wigandol (216.5 mg). También de las fracción JCV-Wk-HH se obtuvo nuevamente el β -sitosterol (50.7 mg).

A la fracción JCV-Wk-I se le aplicó cromatografía en columna de Sílica-gel eluyendo con CH_2Cl_2 -Acetona en orden creciente de polaridad obteniendo 11 fracciones. A la fracción JCV-Wk-ID se le aplicó CCF preparativa. En la fracción JCV-Wk-IDc (22.6 mg) se obtuvo una mezcla en la cual la geranilhidroquinona (Fig. 3) era el componente mayoritario y uno de los componentes minoritarios era la farnesilhidroquinona asilado previamente de la misma planta [1].

A la fracción JCV-Wk-IB se recromatografió nuevamente en columna de sílica-gel obteniendo 17 fracciones. A las fracciones JCV-Wk-IBH, JCV-Wk-IBI, y JCV-Wk-IBK, se les aplicó CCF preparativa y se obtuvo cantidades adicionales de farnesilhidroquinona (23 mg).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El wigandol presenta en su espectro de RMN ^1H , dos señales dobles con $J = 8.5$ Hz en δ 6.62 y 6.59 característico del anillo tetra, en donde los protones están en posición orto uno del otro.

Se observan además, dos señales de protones vinílicos en δ 5.1 (triple $J=8.5$ Hz) y 5.3 (doble ancho, $J=13.9$ Hz), una señal simple en δ 5.12, asignable al protón de un fenol. La señal simple en δ 2.30 corresponde a un grupo acetato como sustituyente del anillo aromático.

Además de dos señales simples agudas en δ 1.59 y 1.77 correspondiente a dos metilos vinílicos

En el espectro de RMN ^{13}C se observan 18 señales de las cuales se observan 4 metinos en δ 119.98, 113.53, 121.97, 122.52, dos aromáticos y dos olefínicos, 4 metilenos en δ 28.39, 24.73, 38.34, 27.80, correspondientes a los dos metilenos bencílicos y los dos metilenos del ciclodecadieno, y tres metilos en δ 22.43, 16.93, 20.86 este último del acetato, con el carbonilo en δ 170.45. Las señales restantes corresponden a carbonos cuaternarios.

En el espectro de IR las absorciones en 1741 y 3473 cm^{-1} característica de un grupo carbonilo y de un grupo hidroxilo

respectivamente, que confirma la presencia de estos grupos en la estructura.

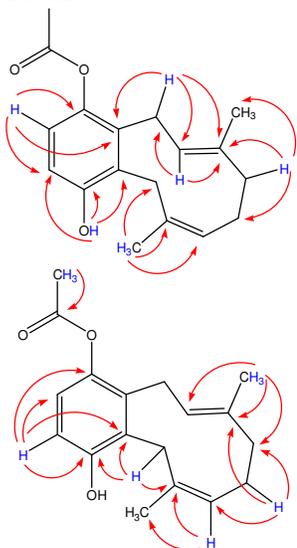


Figura 4. Correlaciones ^1H - ^{13}C (HMBC) a dos y tres enlaces en el wigandol

El flavidulol A presenta en su espectro de RMN ^1H al igual que el wigandol dos dobles en este caso con $J = 8.7$ Hz, en δ 6.65 y 6.60 correspondientes a los protones aromáticos, se asignan señales a protones olefínico en δ 5.26 con geometría *trans* y 5.11 con geometría *cis*. Además la señal en δ 3.77 asignada para grupo metoxilo muestra la diferencia con la señal en δ 2.30 para el metilo del grupo acetilo en el wigandol. En el espectro de carbono se observan 17 señales, una menos que en el wigandol debido al carbonilo del acetato y además un grupo metilo δ 56.43 del grupo metoxilo en vez del metilo del acetilo. Las señales restantes son iguales que en el wigandol 4 metinos, 4 metilenos y tres metilos.

La posición de los grupos sobre el anillo se asignó mediante el experimento HSQC, HMBC, COSY y NOESY en el cual se observan las relaciones entre el protón H-2 con el grupo metoxilo y del protón H-3 con el grupo OH.

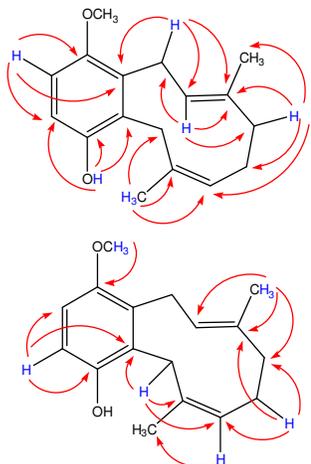


Fig. 5. Correlaciones ^1H - ^{13}C (HMBC) a dos y tres enlaces en el flavidulol A

De igual forma la geometría de los dobles enlaces *cis* C-7, *trans* C-11 y de las demás señales. (Ver tabla 1).

La geranilhidroquinona se obtuvo de la fracción JCV-Wk-IDc como mezcla aceitosa en la cual esta era el componente mayoritario, esto se analizó tanto por RMN como por GC-EM. El cromatograma de gases se puede ver en la Figura 6, en el cual la geranilhidroquinona corresponde con el pico con tiempo de retención 27.26 min.

En el espectro de RMN ^1H se observan señales para tres tipos de protones aromáticos: dos dobletes en δ 6.67 y 6.61 ($J=8.4$ y $J=2.9$ Hz) y un doble de dobles en δ 6.51 con $J=8.5$ y $J=3.1$ Hz, las cuales son señales características de un anillo trisustituido 1, 2, 4.

Además de señales asignables a dos protones vinílicos, δ 5.29 y 5.07 así como señales para tres metilos vinílicos, δ 1.60, 1.68 y 1.74 y la señal doble en δ 3.30 ($J=7.2$ Hz) es asignada al metileno bencílico.

En el espectro de RMN ^{13}C se observan 16 señales de las cuales 5 de ellas corresponden con los metinos de las dos insaturaciones y tres del anillo aromático en δ 123.87, 121.39, 116.57, 116.47, 113.65, tres metilenos en δ 39.65, 29.58, 26.43 y tres metilos en δ 25.65, 17.67, 16.14. Las señales restantes son para los carbonos cuaternarios.

En el espectro de IR se observan claramente absorciones características en 3351 y 3602 cm^{-1} correspondientes a grupos OH en la estructura.

La posición de todos los grupos en la estructura se determinó mediante el experimento HMBC como se observa en la figura 7 y todos los datos de RMN se observan con más detalle en la tabla 2.

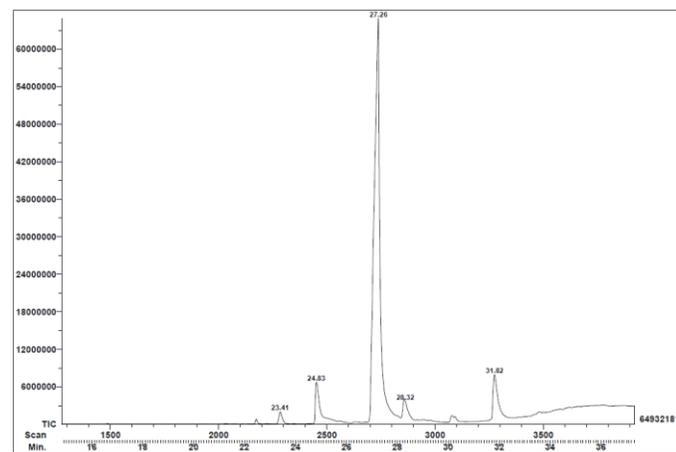


Figura. 6. Cromatograma de gases para la fracción JCV-Wk-IDc

JCV-Wk-IDc

C/H	δ_c	δ_H (HSQC)	COSY (1H - 1H)	HMBC (1H - ^{13}C)
1	152.13 (C)	-	-	-
2	109.46 (CH)	6.65 d (8.7)	-	C-3, C-4, C-13
3	112.52 (CH)	6.60 d (8.7)	-	C-1, C-2, C-14
4	148.90 (C)	-	-	-
5	28.35 (CH ₂)	3.30 s	5.11, 1.61	C-4, C-6, C-7, C-13, C-14,
6	139.32 (C)	-	-	-
7	123.92 (CH)	5.11 t (8.3)	2.0, 1.61, 3.30	C-5, C-8, C-15
8	24.78 (CH ₂)	2.0 m	1.73, 5.11	C-6, C-7, C-9, C-10
9	38.44 (CH ₂)	2.15 t, 1.73 m	1.73	C-7, C-8, C-10, C-16
10	131.36 (C)	-	-	-
11	124.13 (CH)	5.26 da (13.9)	3.23, 3.91, 1.78	C-9, C-12, C-16
12	27.21 (CH ₂)	3.23 dd (17, 11.7),	3.91, 5.26	C-10, C-11, C-13
		3.91 da (17)	1.78, 3.23, 5.26	
13	128.93 (C)	-	-	-
14	127.51 (C)	-	-	-
15	22.43 (CH ₃)	1.61 s	3.30, 5.11	C-5, C-6, C-7
16	16.93 (CH ₃)	1.78 s	3.91, 5.26	C-9, C-10, C-11
OMe	56.43	3.77 s	-	C-1

OH	-	4.41 s	-	C-3, C-4, C-14
----	---	--------	---	----------------

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN para el flavidulol A

C/H	δ_c	δ_H (HSQC)	COSY (H-H)	HMBC (H-C)
1	148.06 (C)	-	-	-
2	128.32 (C)	-	-	-
3	116.57 (CH)	6.61 d (2.9)	-	C-1, C-4, C-5
4	149.44 (C)	-	-	-
5	113.65 (CH)	6.57 dd (8.5, 3.1)	6.67	C-1, C-3, C-4, C-6
6	116.47 (CH)	6.67 d (8.4)	6.57	C-1, C-2, C-4
1'	29.58 (CH ₂)	3.30 d (7.2)	5.29, 1.74	C-1, C-2, C-3, C-2', C-3'
2'	121.39 (CH)	5.29 t (7.0)	3.30, 1.74	C-2, C-1', C-4', C-10'
3'	138.36 (C)	-	-	-
4'	39.65 (CH ₂)	2.06 m	5.07	C-2', C-3', C-5', C-10'
5'	26.43 (CH ₂)	2.11 m	5.07, 1.68	C-3', C-4', C-6', C-7'
6'	123.87 (CH)	5.07 t (6.2)	2.11, 2.06, 1.68, 1.60	C-4', C-5', C-8', C-9'
7'	131.89 (C)	-	-	-
8'	17.67 (CH ₃)	1.60 s	5.07	C-6', C-7', C-9'
9'	25.65 (CH ₃)	1.68 s	5.07, 2.11	C-6', C-7', C-8'
10'	16.14 (CH ₃)	1.74 s	5.29, 3.30	C-2', C-3', C-4'

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN para la geranilhidroquinona

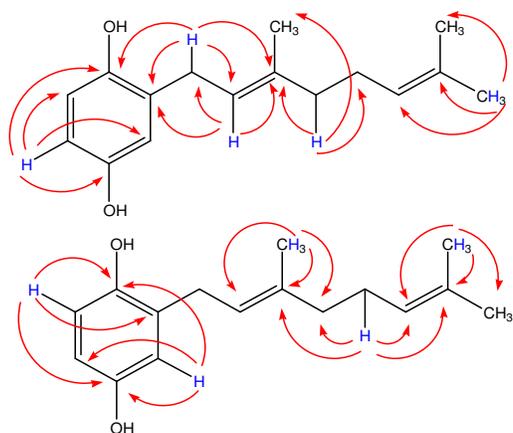


Figura 7. Correlaciones ^1H - ^{13}C (HMBC) a dos y tres enlaces en la geranihidroquinona

WIGANDOL (1): Cristales incoloros. p.f. 163-166°C. IR (KBr) 3473, 2934, 1741, 1435, 1374, 1244, 1204. EM-IE, 70 e-v (int. rel.) 286 (M^+ 10), 245 (52), 244 (100), 188 (50), 173 (44), 136 (43), 91(33), 43(38). RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ 6.69 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-2), 6.52 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-3), 5.20 (1H, da, $J=13.7$ Hz, H-11), 5.11 (1H, t, $J=8.4$ Hz, H-7), 3.2-3.5 (4H, m, H-5, H-12), 5.12 (1H, s, OH), 2.30 (3H, s, CH_3 acetato), 2.17 (1H, m, H-9), 1.73 (1H, m, H-9), 1.99 (2H, m, H-8), 1.77 (3-H, s, H-16), 1.57 (3-H, s, H-15). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ 142.85 (C, C-1), 153.01 (C, C-4), 139.26 (C, C-6), 131.93 (C, C-10), 131.67 (C, C-13), 127.42 (C, C-14), 119.98 (CH, C-2), 113.53 (CH, C-3), 121.97 (CH, C-7), 122.52 (CH, C-11), 28.39 (CH_2 , C-5), 24.73 (CH_2 , C-8), 38.34 (CH_2 , C-9), 27.80 (CH_2 , C-12), 22.43 (CH_3 , C-15), 16.93 (CH_3 , C-16). 20.86 (CH_3 , CH_3CO), 170.45 (C=O).

FLAVIDULOL A (2): Aceite amarillo-rojizo. IR (Sol. CHCl_3) 3423, 2930, 2860, 1599, 1474, 1452, 1258, 1239, 1076. EM-IE, 70 e-v (int. rel.) 258 (M^+ 100), 243 (22), 201 (13), 189 (22), 187 (18), 150 (27). RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ 6.65 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-2), 6.60 (1H, $J=8.7$ Hz, H-3), 5.26 (1H, da, $J=13.9$ Hz, H-11), 5.11 (1H, t, $J=8.3$ Hz, H-7), 3.91 (1H, da, $J=17$ Hz, H-12), 3.23 (1H, dd, $J=17$, $J=11.7$ Hz, H-12), 3.30 (2H, s, H-5), 3.77 (3H, s, OMe), 4.41 (1H, s, OH), 2.15 (1-H, m, H-9), 2.0 (2H, m, H-8), 1.73 (1H, m, H-9), 1.78 (3H, s, H-16), 1.61 (3H, s, H-15). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ 152.13 (C, C-1), 148.9 (C, C-4), 139.32 (C, C-6), 131.36 (C, C-10), 128.93 (C, C-13), 127.51 (C, C-14), 109.46 (CH, C-2), 112.52 (CH, C-3), 123.92 (CH, C-7), 124.13 (CH, C-11), 28.35 (CH_2 , C-5), 24.78 (CH_2 , C-8), 38.44 (CH_2 , C-9), 27.21 (CH_2 , C-12), 56.43 (CH_3 , OMe), 22.43 (CH_3 , C-15), 16.93 (CH_3 , C-16).

GERANILHIDROQUINONA (3): IR (Sol. CHCl_3) 3602, 3351, 2929, 2856, 1653.95, 1498, 1451, 1231, 1201. EM-IE: 70 e-v (int. rel.) 246 (M^+ 100), 177 (80), 161(80), 123 (100), 69 (78). RMN ^1H (CDCl_3 , 400MHz) δ 6.67 (1H, d,

$J=8.4$ Hz, H-6), 6.61 (1H, d, $J=2.9$ Hz, H-3), 6.57 (1H, dd, $J=8.5$, $J=3.1$ Hz, H-5), 5.29 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-2'), 5.12 (1H, t, $J=6.2$ Hz, H-6'), 3.30 (2H, d, $J=7.2$ Hz, H-1'), 2.09 (4H, m, H-4', H-5'), 1.68 (3H, s, H-8'), 1.60 (3H, s H-9'), 1.74 (3H, s, H-10'). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) δ 149.44 (C, C-4), δ 148.06 (C, C-1), δ 138.36 (C, C-3'), δ 131.89 (C, C-7'), δ 128.32 (C, C-2), 123.87 (CH, C-6'), 121.39 (CH, C-2'), 116.57 (CH, C-3), 116.47 (CH, C-6), 113.65 (CH, C-5), 39.65 (CH_2 , C-4'), 29.58 (CH_2 , C-1'), 26.43 (CH_2 , C-5'), 25.65 (CH_3 , C-9'), 17.67 (CH_3 , C-8'), 16.14 (CH_3 , C-10').

IV. CONCLUSIONES

- Se aislaron 7 compuestos de los cuales dos son nuevos para la especie el Flavidulol A, aislado anteriormente de un hongo *Lactarius flavidulus* y geranihidroquinona aislado de *Phacelia ixodes* y *Phacelia crenulata*. De los 5 compuestos ya aislados en la planta dos son derivados de la geranihidroquinona el ácido 3-gerani-4-metoxibenzoico y el 3-gerani-4-metoxifenol, este último sería el posible precursor biosintético del flavidulol A.
- Se pudo establecer la geometría de los dobles enlaces como cis (C-7)- trans (C-11) en los anillos de los ciclodecadienos a través del experimento NOESY

V. AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de espectroscopía del instituto de química, ya que siempre amablemente facilitaron los resultados de RMN, IR y EM.

REFERENCIAS

- [1] Gómez F., Quijano L., Calderón J. S., and Rios T. Terpenoids isolated from *Wigandia kunthii*. *Phytochemistry*. 19, 2202-2203. 1980.
- [2] Takahashi A., Kusano G., Ohta T., Nozoe S. The constituents of *Lactarius flavidulus*. *Chem. Pharm. Bull.* Vol 36(7) 2366-2370. 1988
- [3] Reynolds G. W and Rodriguez E. Prenylated phenols that cause Contact Dermatitis Trichomes of *Phacelia ixodes*. *Planta medica*. Vol. 43. pp. 187-193. 1981.
- [4] Reynolds G. W., Rodriguez E. Geranylhydroquinone: a contact allergen from trichomes of *Phacelia crenulata*. *Phytochemistry*. Vol. 18, pp. 1567-1568. 1979.
- [5] Reynolds G. W., Epstein W. Rodriguez E. Unusual contact allergens from plants in the family Hydrophyllaceae. *Contact dermatitis*. Vol.14. pp.39-44. 1986
- [6] Ley J. Krammer G y otros. Evaluation of Bitter Masking Flavanones from Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H.

- & A.) Torr., Hydrophyllaceae) J. Agric. Food Chem. 53 pp. 6061-6066. 2005
- [7] Bacon J., Hannan G. y otros. Chemosystematics of Species of *Eriodictyon*. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 14, No. 6, pp. 591-595, 1986
- [8] Cao S., Rossant C., y otros. Phenolic derivatives from *Wigandia urens* with weak activity against the chemokine receptor CCR5. *Phytochemistry*. 64, 987-990. 2003
- [9] Zavala-Sánchez M., Pérez C., y otros. Anti-inflammatory activity of *Wigandia urens* and *Acalypha alopecuroides*, *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (21), pp. 5901-5905, 2009.
- [10] Yamaguchi L., Lago, J., Tanizaki T., Di Mascio P., Kato M. 2006. Antioxidant activity of prenylated hydroquinone and benzoic acid derivatives from *Piper crassinervium*. *Phytochemistry* 67: 1838-1843.
- [11] Baldoqui D. C., Kato M., Cavalheiro J., Bolzani V., Young M. C., Furlan M. 1999. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry* 51: 899-902.