

LIGNANOS DE *Zanthoxylum acuminatum*

R. Murillo^{1*}, V. Castro¹, M. Chavarría¹, L. Poveda²

1. Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, Costa Rica 2060 Costa Rica, 2. Escuela de Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar, Universidad Nacional, 3000 Costa Rica.

Recibido: 15 de mayo, 2006; aceptado: 15 de diciembre, 2006

Abstract

From the aerial parts of *Zanthoxylum acuminatum* (Rutaceae) collected in Upala, Alajuela, Costa Rica were isolated the known lignans hinokinin, (+)-asarinin, (+)-piperitol, (+)-kobusin, and epi-kobusin. In addition to the lignans were isolated the triterpen lupeol and the steroid campesterol. All the separations were performed with chromatographic techniques and the structures were elucidated using 1D and 2D NMR techniques.

Keywords: lignans, Rutaceae, *Zanthoxylum acuminatum*.

I. Introducción

La familia Rutaceae comprende a nivel mundial unos 150 géneros y alrededor de 900 especies distribuidas principalmente por los trópicos y regiones templadas, particularmente en África del Sur y Australia. En Costa Rica se han reportado 19 géneros según datos del Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio)[1]. La familia tiene muchísima importancia debido a los frutos (cítricos) de muchas de sus especies, así como a la producción de aceites esenciales y medicinales [2,3,4].

Uno de los géneros más importantes en esta familia es el *Zanthoxylum* ya que presenta una variada actividad biológica[5]. Por ejemplo, el extracto etanólico de *Zanthoxylum fagara* presenta actividad contra los dermatofitos de animales domésticos, y además presenta actividad antifúngica. Entre los compuestos aislados de las hojas de esta planta se reportan alcaloides, lignanos; y cumarinas de los frutos[6]. La *Zanthoxylum xanthoxyloides*, presentó actividad antifúngica y antimicrobiana[7,8] mientras que la *Zanthoxylum budrunga* se ha utilizado en medicina popular en el tratamiento de asma, bronquitis y hemorroides; las raíces y frutos poseen actividad

*email: renato@calzada.equi.ucr.ac.cr

antiinflamatoria y antifúngica[9]. El aceite esencial de las hojas se ha utilizado contra el cólera, y el jugo de los troncos genera mejorías ante los dolores de cabeza y el vómito[10]. Además de las propiedades mencionadas anteriormente, algunas especies de este género como la *Zanthoxylum piperitum* presentan potente actividad como repelentes de algunos mamíferos (como ratas)[11].

Muchos científicos se han interesado en estudiar los componentes y actividades biológicas de los aceites esenciales en especies de este género ya que han presentado actividades muy diversas tales como antimicrobianas, antibacteriales, y como estimulantes gastrontestinales entre otros[12]. Estudios de composición de aceites esenciales en especies costarricenses del género *Zanthoxylum* (*Z. fagara*, *Z. acuminatum*, *Z. melanostictum*, *Z. Monophyllum*) revelan la presencia de un gran número de terpenos principalmente monoterpenoides tales como linalool, 4-terpineol, α -terpineol, y *trans*-2-hexenol[13].

Adicionalmente, la *Z. acuminatum* reporta en estudios fitoquímicos previos la presencia de lupeol, amidas y de alcaloides tales como la culantramina, culantraminol, ordenina y la N,N-dimethyltriptamina [14,15].

En el presente trabajo reportamos los resultados del estudio fitoquímico de una muestra de *Zanthoxylum acuminatum* recolectada en Upala, Costa Rica.

II. Materiales y método

Equipo y materiales. Las separaciones primarias se realizaron con silica gel (60 a 200 μ m) Merck. Los platos cromatográficos (TLC1) se prepararon con una mezcla 1:1 de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck y yeso. Para la separación de fracciones con masas menores se utilizaron cromatofolios de gel de sílice 20 x 20 cm gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (TLC2).

El control de las separaciones se llevó a cabo mediante radiación ultravioleta y resonancia magnética nuclear. Se utilizó una lámpara UV marca Vpland, UVLS-28.

La elucidación estructural de los compuestos puros se llevó a cabo con espectros de una y dos dimensiones obtenidos con un espectrómetro de resonancia magnética nuclear RMN de 400 MHz Varian Mercury 400.

Material vegetal. Las partes aéreas de la planta se recolectaron en Upala en enero del año 2003. Se conserva una muestra de esta planta en el Herbario Juvenal Valerio de la Universidad Nacional, número 10232.

Extracción y aislamiento. La planta se secó y se molió obteniéndose una masa de 1850 g. Posteriormente, se maceró por 24 horas con una mezcla de éter tert-butilmetílico (MTBE):metanol(MeOH) en una proporción 9:1.

Fraccionamiento del extracto. Se desengrasó el extracto con metanol a una temperatura de -20 °C obteniéndose una masa de 5.0 g. La masa del extracto se disolvió en cloroformo, y se fraccionó en una columna (CC) de gel de sílice grueso (60-200 μ m) utilizando como fase móvil mezclas de disolventes secos con polaridad

creciente. Se obtuvieron seis fracciones: Fr. 1 Hexano:MTBE 8:2, Fr 2. Hexano:MTBE 6:4, Fr 3. Hexano:MTBE 1:1, Fr 4. Hexano:MTBE 2:8, Fr 5. MTBE 100%, Fr 6. MTBE:MeOH 8:2.

Las fracciones Fr1, Fr2 y Fr3 se separaron utilizando platos cromatográficos (TLC 1, 100 mg por plato) de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (5-25 μ m) con una mezcla de hexano:MTBE 75:25. Después de esta separación, de la fracción Fr1 se obtiene el compuesto **6** (Rf = 0,88 Hexano:MTBE 1:1; 10,0 mg) . De la separación de la fracción Fr2 se conservan dos fracciones (Fr21, Fr22). La fracción Fr21 (menos polar) se separó en TLC2 con Hexano:MTBE 1:1 obteniéndose una fracción la cual fue purificada con Benceno:Hexano 8:2 para finalmente obtener el compuesto **2** (Rf = 0,36 Benceno:Hexano 8:2; 15,0 mg). De la fracción Fr22 (más polar) precipita el compuesto **7** (Rf = 0,68 Hexano:MTBE 1:1; 10,0 mg) de forma cristalina a -20°C. De la separación de Fr3 se obtienen las fracciones Fr31, Fr32, Fr33. Se realiza la separación de Fr31 en TLC1 con una mezcla de Benceno: CH₂Cl₂:MTBE 7:2:1 obteniéndose el compuesto **3** (Rf = 0,53 Benceno:éter petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1; 20,0 mg) de forma pura, y el compuesto **1**(Rf = 0,60 Benceno:éter petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1; 16,0 mg) de forma impura el cual fue purificado en TLC2 con Benceno: éter de petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1. De la Fracción Fr32 se obtuvo el compuesto **5** (Rf = 0,47 Benceno:éter petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1; 10,0 mg) después de realizar la separación de la misma en TLC2 con Benceno: CH₂Cl₂:MTBE 7:2:1 y posteriormente en TLC2 con Benceno: éter de petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1. Finalmente, de la fracción Fr33 se obtiene el compuesto **4** (Rf = 0,41 Benceno:éter petróleo:CH₂Cl₂:MTBE 4:3:2:1; 80,0 mg) después de separar la misma en TLC1 con una mezcla de hexano:MTBE 75:25.

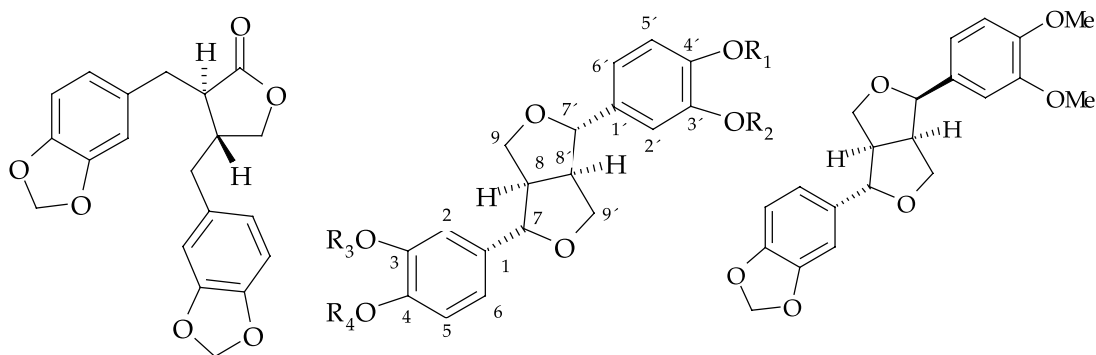
III. Resultados y discusión

El fraccionamiento cromatográfico del extracto no polar (MTBE:MeOH 9:1) de las partes aéreas de *Zanthoxylum acuminatum* revela la presencia del lignano dibencilbutirolactónico conocido como hinokinina[16,17] **1** y los cuatro bisfurano lignanos (+)-asarinina[18] **2**, (+)-piperitol[19] **3**, (+)-kobusina[19] **4**, y epi-kobusina[20] **5**. Conjuntamente a estos lignanos se aisló el triterpeno conocido como lupeol[15] **6** y el esteroide campesterol[21] **7**. Además fue posible detectar en varios extractos la presencia de alcaloides, los cuales no fueron separados puesto que en estudios previos de esta planta ya se han reportado estos metabolitos.

La elucidación de todas las estructuras se realizó con la ayuda de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) de una y dos dimensiones, a saber, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, H,H-COSY, gHSQC, gHMBC y NOE (Efecto Nuclear Overhauser) para la determinación de la estereoquímica de los compuestos. En vista de que todas las estructuras ya han sido previamente reportadas en la literatura, no se discute el proceso de elucidación estructural.

El presente estudio es importante debido a que se reporta la presencia de compuestos que no habían sido reportados en esta especie lo cual contribuye a un mejor conocimiento de los metabolitos presentes en el género *Zanthoxylum* y la familia Rutaceae.

Se recomienda hacer estudios de actividad biológica de esta planta, ya que bisfurano lignanos con estructura similar han reportado actividad como inhibidores de cAMP fosfodiesterasa[22], actividad antiinsecticida[23] y contra el crecimiento de ciertas larvas[21] entre otras.



- | | | | |
|---|---|------------------------------------------------------|---|
| 1 | 2 | $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = -OCH_2O-$ | 5 |
| | 3 | $R_1 = Me \quad R_2 = H \quad R_3 = R_4 = -OCH_2O-$ | |
| | 4 | $R_1 = Me \quad R_2 = Me \quad R_3 = R_4 = -OCH_2O-$ | |

IV. Referencias

1. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio) <http://www.inbio.ac.cr/en/biod/Biod.html>. Descargada en Junio, 2005.
2. Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Castro, V.H.; Salazar, R., *Rev. Biol. Trop.* **2001**, *49*, 501-508.
3. Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.; Salazar, R., *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* **2000**, *55*, 12-23.
4. Gunatilaka, A.A.; Kingston, D.G.; Wijeratne, E.M.; Bandara, B.M.; Hofmann, G.A.; Johnson, R.K., *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 518-20.
5. Ajith P.K.; Nissanka, V.; Karunaratne, B.; Bandara, R.; Kumar, V.; Nakanishi, T.; Nishi, M.; Inada, A.; Tillekeratne, L.; Wijesundara, D.; Gunatilaka, L., *Phytochemistry* **2001**, *56*, 857-861.

6. Diéguez-Hurtado, R.; Garrido-Garrido, G.; Prieto-González, S.; Iznaga, Y.; González, L.; Molina-Torres, J.; Curini, M.; Epifanio, F.; Marcotullio, M.C., *Fitoterapia* **2003**, *74*, 384-386.
7. Ngassoum, M.B.; Essia-Ngang, J.J.; Tatsadjieu, L.N.; Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Adjoudji, O., *Fitoterapia* **2003**, *74*, 284-287.
8. Tatsadjieu, L.N.; Essia Ngang, J.J.; Ngassoum, M.B.; Etoa, F.X., *Fitoterapia* **2003**, *74*, 469-472.
9. Ahmad, M.U.; Rahman, M.A.; Huq, E.; Chowdhury, R., *Fitoterapia* **2003**, *74*, 191-193.
10. Kirtikar, K. R. and Basu, B.D. *Indian Medicinal Plants*. Vol 2, Segunda edición, Debra Dun: Shiva Offset Press, India, 1993, pag 484-517.
11. Epple, G.; Bryant, B.; Mezine, I.; Lewis, S., *Pest. Manag. Sci.* **2004**, *60*, 624-30.
12. Itthipanichpong, C.; Ruangrunsi, N.; Pattanaautsahakit, C., *J. Med. Assoc. Thai.* **2002**, *85*, 344-54.
13. Setzer, W.; Noletto, J.A.; Lawton, R.O.; Haber, W.A., *Molecular Diversity* **2005**, *9*, 3-13.
14. Della Casa de Marcano, D.; Hasegawa, M.; Castaldi, A., *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1531-1532.
15. Schroeder, D.R.; Stermitz, F.R., *Tetrahedron* **1985**, *41*, 4309-4320.
16. Tada, T.; Nakatsuka, T., *Mokuzai Gakkaishi* **1968**, *14*, 344.
17. Kato, M.J.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R., *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1799-810.
18. Covalcante, S. *et al.*, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1051-1055.
19. Massuo J. K.; Chu, A.; Lawrence, B.; Lewis, D.; Lewis, N., *Phytochemistry* **1998**, *47*, 583-591.
20. Kato, M.J.; Yoshida, M.; Gottlieb, O.R., *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1799-1810.
21. Beveridge, T.; Li, T.; Drover, J., *J. Agric. Food. Chem.*, **2002**, *50*, 744-750.
22. MacRae, W.D.; Neil Towers, G.H., *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1207-1220.

23. Bernard, C.B.; Arnason, J.T.; Philogene, B.J.; Lam, J.; Waddell, T., *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1373-1377.
24. Kalia, N.; Singh, B.; Sood, R., *J.Nat. Prod.* **1999**, *62*, 311-312.

Agradecimientos

A la fundación Volkswagen por el apoyo económico en la realización de este proyecto.