

Aislamiento y caracterización de palmitato de β -sitosterol y dos glicósidos de kaempferol de las ramas y hojas de la especie *Cassia fruticosa* Mill.

Isolation and characterization of β -sitosterol palmitate and two kaempferol glycosides from branches and leaves of *Cassia fruticosa* Mill.

REINE MENDOZA^A, JAIRO BERMÚDEZ^{A,*}, MARÍA RODRÍGUEZ^A

Resumen

De las ramas de *Cassia fruticosa* Mill., se aisló el palmitato de β -sitosterol $\cdot\frac{1}{2}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), mientras que de las hojas se aislaron dos flavonoides glicosilados identificados como kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopiranosido (**2**) y kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 2))- β -D-(glucopiranosil)- α -L-ramnopiranosido (**3**), por Cromatografía Flash (Isolera One®, Biotage) en un solo paso cromatográfico. Las estructuras de cada compuesto fueron elucidadas por RMN-¹H, RMN-¹³C, COSY, HMBC, HMQC, MS y comparadas con la data reportada en la literatura.

Palabras claves: *Cassia fruticosa* Mill., cromatografía flash, β -sitosterol, flavonoides glicosilados

Abstract

The ester β -sitosterol palmitate $\cdot\frac{1}{2}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**) was isolated from the branches of *Cassia fruticosa* Mill., meanwhile the glycosylated flavonoids kaempferol 3-O-(α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopyranoside (**2**) and kaempferol 3-O-(α -L-rhamnosyl(1 \rightarrow 2))- β -D-glucopyranosyl)- α -L-rhamnopyranoside (**3**) were obtained from the leaves. Compounds 1-3 were isolated and purified in a single chromatographic step by flash chromatography (Isolera One®, Biotage). The structures of each compound was elucidated by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMBC, HMQC, MS and compared with the data reported in the literature.

Key words: *Cassia fruticosa* Mill., flash chromatography, β -sitosterol, flavonoids glycosides

Introducción

El género *Cassia* pertenece a la familia Leguminosae y posee alrededor de 500 especies distribuidas en Asia (India, China), este y sur de África, México, Brasil y Venezuela (Eisenberg y col., 1993). Las especies más importantes debido a su riqueza fitoquímica y/o actividad

biológica son: *Cassia fistula*, *C. grandis*, *C. hirsutica*, *C. sieberiana*, *C. alata*, *C. tora*, *C. occidentalis*, *C. auriculata* y *C. nigricans*. En Venezuela, estas especies se encuentran ampliamente distribuidas por todo el territorio, en particular en los estados: Barinas, Lara, Portuguesa, Carabobo, Monagas, Sucre y Amazonas; la especie *Cassia fruticosa* Mill. se

^A Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

* Correspondencia: jjbleon@gmail.com.

encuentra en los estados Mérida y Guárico (Casale, 1997).

A pesar de las numerosas especies que conforman este género, pocas han sido estudiadas a nivel fitoquímico. En el caso de la especie *Cassia fruticosa* Mill. son pocos los trabajos publicados, solo se ha reportado el aislamiento, por cromatografía en columna, de un flavonoide glicosilado, del cual solo se identificó la aglicona (kaempferol), una mezcla de antraquinonas glicosiladas no identificadas, provenientes de las hojas (Watson-Samudio, 1991), los ésteres estereato y tetratriacontanoato de etilo, 1-docosanol y dideciltalato de las flores (Meena y Kalidhar, 1998).

La mayoría de los trabajos fitoquímicos reportados para el género *Cassia* basan el aislamiento en el uso de la cromatografía de adsorción en fase normal y/o reversa. En el desarrollo de éste trabajo se utilizó el cromatografo Isolera One® de la casa comercial Biotage, el cual permitió la separación de los metabolitos presentes en las muestras en menor tiempo que los equipos convencionales. Isolera One® permite trabajar a presiones mayores de 100 psi, utiliza columnas cromatográficas con mayor número de platos teóricos (3000 N/m), obteniendo bandas de elución angostas y definidas (Biotage, 2012). El software del equipo es alimentado con las condiciones cromatográficas obtenidas en cromatografía de capa fina (CCF), ya que el factor de retención (Rf), es inversamente proporcional al volumen de columna (VC) del equipo.

$$VC = \frac{1}{R_f}$$

A menor Rf mayor volumen de columna, aumentando la eficiencia durante la separación, debido a que el tiempo de contacto entre el soporte sólido y el compuesto de interés es mayor, mejorando la separación y evitando el solapamiento de las bandas cromatográficas. Para separar dos o más compuestos, se calcula el ΔVC , el cual no es más que la diferencia entre el inverso del Rf de cada uno de los compuestos (Biotage, 2012).

El presente trabajo es un avance en el estudio fitoquímico de plantas venezolanas, utilizadas tradicionalmente para controlar la diabetes mellitus, y se describe el aislamiento y la caracterización total del palmitato de β -sitosterol $\cdot\frac{1}{2}\cdot H_2O$ (**1**), kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopiranosido (Nicotiflorin, **2**) y kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 2))- β -D-(glucopiranosil)- α -L-ramnopiranosido (Clitorin, **3**), (**Figura 1**), siendo éste el primer reporte de dichos compuestos en la especie estudiada.

Materiales y métodos

MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron muestras de la especie *Cassia fruticosa* Mill., en dos épocas del año, las ramas fueron colectadas en junio del 2008 y las hojas en noviembre del 2009, en la zona de San Antonio de los Altos, estado Miranda, Venezuela por el Dr. Stephen Tillett de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Una muestra de este espécimen se encuentra depositada en el Herbario Victor Manuel Ovalles de dicha facultad, bajo el código MYF 26216.

EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente y posteriormente

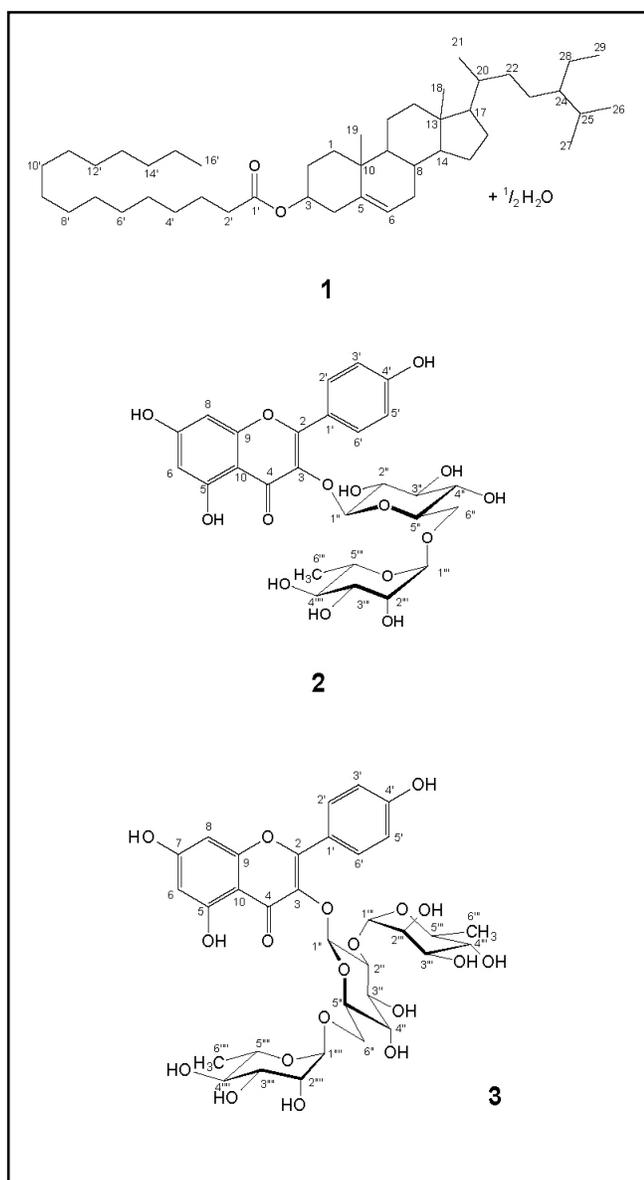


Figura 1: Estructura de los compuestos aislados de las ramas y hojas de *Cassia fruticosa* Mill.

molido. Así, las ramas (2120,70 g) y hojas (351,28 g) de *Cassia fruticosa* Mill., fueron sometidas a percolación con metanol (10 L) semanalmente durante 3 semanas. Seguidamente, los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida, obteniendo 87,94 g (4,2%) correspondiente a las ramas y 66,93 g (19,1%) de las hojas, identificados como CfR y Cf, respectivamente.

El extracto metanólico de las ramas fue sometida a hidrólisis ácida, suspendiendo

la muestra CfR (50,00 g) en 250 mL de la mezcla de solventes MeOH-CHCl₃-H₂SO₄(ac, 20%) (1:1:2; v/v/v) y sometiéndola a temperatura de reflujo durante 3 h con agitación continua. Se obtuvo un sólido (11,97 g), insoluble en el medio de reacción y una fracción orgánica. Una porción del sólido (9,54 g) se disolvió en MeOH (50 mL) y extrajo con n-hexano (5x25 mL), obteniéndose 2 fracciones denominadas **CfR-Me** (9,11 g) y **CfR-Hex** (0,43 g).

Una porción del extracto metanólico de las hojas (Cf, 25,00 g) se suspendió en la mezcla MeOH-H₂O (1:1; v/v), luego de filtrado la fracción soluble fue concentrada al vacío y tratada con acetona, lo cual produjo dos fracciones (soluble e insoluble), la fracción insoluble en acetona, denominada CfC, fue concentrada al vacío (13,50 g). Una porción de CfC (9,35 g) fue particionada con el sistema de solventes *t*-BuOMe-*n*-BuOH-THF-TFA(ac, 0,2%) (1:3:1:5; v/v/v/v) obteniéndose dos fases: una acuosa (**CfG**; 4,78 g) y otra orgánica (**CfH**; 2,86 g).

Los compuestos presentes en las fracciones **CfR-Hex** (428,3mg) y **CfH** (550,8mg) se separaron por cromatografía flash con cartuchos de sílica gel. Las fracciones eluidas fueron monitoreadas por CCF y agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico y coloración con el reactivo anisaldehído-ácido sulfúrico (AS), cada compuesto aislado fue caracterizado por métodos espectroscópicos: RMN-¹H y ¹³C, HMBC, HMQC, COSY; espectrometría de masas e IR.

PROCEDIMIENTO GENERAL

Los espectros de RMN se realizaron en un espectrómetro Brüker de 500 y 270 MHz para ¹H, 75 y 125 MHz para ¹³C, los espectros de masas se tomaron en un equipo TSQ QUANTUM (con Triple

Cuádruplo), marca Thermo. El análisis de CCF fue realizado con placas analíticas de sílica gel 60 de 0,25 mm de espesor e indicador de fluorescencia UV₂₅₄ (Merck) y los compuestos fueron visualizados por irradiación con UV (254 y 365 nm) y reacción con el reactivo anisaldehído en ácido sulfúrico (AS). La cromatografía flash se realizó en el equipo Isolera One de la empresa Biotage, equipado con cartuchos de sílica gel SNAP 25 g de 50 µm de diámetro de partícula, dimensiones 30 x 72 mm y 33 mL de volumen de columna (Biotage, 2012).

DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS COMPUESTOS

PALMITATO DE β-SITOSTEROL•1/2•H₂O (1): Pf 75-77°C, **RMN-¹H 270MHz** (CDCl₃) δ_H 0,66 (s; H-18); 0,79 (d, J= 6,4Hz; H-26); 0,81 (d, J= 6,2Hz; H-27); 0,88 (m; H-16'); 0,91 (t, J= 7,7Hz; H-29); 1,00 (s; H-19); 2,21 (d, J= 9,1Hz; H-2_b'); 2,27 (d, J= 8,4Hz; H-2_a'); 4,57 (m; H-3); 5,33 (s_a; H-6). **RMN-¹³C 75MHz** (CDCl₃) δ_C 11,9 (C-18); 14,1 (C-16'); 12,1 (C-29); 18,8 (C-21); 19,1 (C-27); 19,4 (C-19); 19,8 (C-26); 21,1 (C-11); 22,7 (C-15'); 23,2 (C-28); 24,5 (C-3'); 25,14 (C-15); 26,2 (C-23); 27,9 (C-2); 28,3 (C-16); 29,2-29,7 (C-4'-C-13'); 31,4 (C-25); 31,9 (C-7; C-8; C-14'); 34,0 (C-22); 34,8 (C-2'); 36,2 (C-20); 36,7 (C-10); 37,1 (C-1); 38,5 (C-4); 39,7 (C-12); 42,3 (C-13); 45,9 (C-24); 50,2 (C-9); 56,2 (C-17); 56,8 (C-14); 73,7 (C-3); 122,6 (C-6); 139,9 (C-5); 173,24 (C-1'). **EM:** m/z (%) 663,56 (100); 685,55 (17); 413,31 (67); 397,48 (62); 383,17 (10); 1325,90 (2); 1343,01 (5); 495,08 (100); 551,25 (67); 439,23 (48); 327,06 (27).

KAEMPFEROL 3-O-RUTINÓSIDO, (NICOTIFLORIN) (2): Pf 165-167°C, **RMN-¹H 500MHz** (CD₃OD) δ_H 8,05 (d, J= 9,0Hz; H-2', H-6'); 6,89 (d, J= 9,0Hz; H-3', H-5'); 6,40 (s_a; H-8); 6,21 (d, J= 2,0Hz; H-6). Glucosa δ_H 5,11 (d, J= 7,5Hz; H-1); 3,80 (dd, J= 11,0; 1,5Hz; H-6_a); 3,38 (dd, J= 4,5/11,0Hz; H-6_b). Ramnosa δ_H 4,51

(s; H-1); 3,63-3,25 (H-2 - H-5); 1,11 (d, J= 6,0; H-6). **RMN-¹³C 125MHz** (CD₃OD) δ_C 179,4 (C-4); 166,0 (C-7); 162,9 (C-5); 161,5 (C-4'); 159,4 (C-2); 158,6 (C-9); 135,5 (C-3); 133,4 (C-2'; C-6'); 122,8 (C-1'); 116,2 (C-3'; C-5'); 105,7 (C-10); 99,9 (C-6); 94,9 (C-8). Glucosa δ_C 104,6 (C-1); 78,1 (C-2); 77,2 (C-3); 75,8 (C-2); 71,4 (C-4); 68,6 (C-6). Ramnosa δ_C 102,4 (C-1); 73,9 (C-4); 72,3 (C-3); 72,1 (C-2); 69,7 (C-5); 17,9 (C-6). **EM:** m/z (%) 593,17 (100); 285,05 (26); 284,88 (100), 162,96 (8).

KAEMPFEROL 3-O-(2"-RAMNOSIL)RUTINÓSIDO, (CLITORIN) (3): Pf 195-197°C, **RMN-¹H 500MHz** (CD₃OD) δ_H 8,01 (d, J= 9,0Hz; H-2', H-6'); 6,90 (d, J= 9,0Hz; H-3', H-5'); 6,38 (s_a; H-8); 6,18 (d, J= 2,0Hz; H-6). Glucosa δ_H 5,59 (d, J= 7,5Hz; H-1); 3,81 (dd, J= 5,0/9,5Hz; H-6_a); 3,38 (m; H-6_b). Ram-Gluc (1→2) δ_H 5,22 (d, J= 3,0Hz; H-1); 4,06 (dq, J= 6,5/9,5Hz; H-5); 4,01 (s_a; H-2); 3,79 (dd, J= 4,5/8,5Hz; H-3); 3,33 (m; H-4); 0,98 (d, J= 6,5 Hz; H-6). Ram-Gluc (1→6) δ_H 4,50 (s; H-1); 3,61 (m; H-2); 3,48 (dd, J= 3,5/9,5Hz; H-3); 3,40 (dq, J= 6,5/9,5Hz; H-5); 3,27 (t, J= 9,5; H-4); 1,07 (d, J= 6,5 Hz; H-6). **RMN-¹³C 125MHz** (CD₃OD) δ_C 179,2 (C-4); 165,7 (C-7); 162,9 (C-5); 161,2 (C-4'); 159,0 (C-2); 158,4 (C-9); 134,3 (C-3); 132,1 (C-2'; C-6'); 123,1 (C-1'); 116,2 (C-3'; C-5'); 105,9 (C-10); 99,9 (C-6); 94,8 (C-8). Glucosa δ_C 100,4 (C-1); 79,9 (C-2); 78,8 (C-3); 76,9 (C-5); 71,9 (C-4); 68,3 (C-6). Ram-Gluc (1→2): δ_C 102,5 (C-1); 73,8 (C-4); 72,3 (C-2; C-3); 69,7 (C-5); 17,5 (C-6). Ram-Gluc (1→6): δ_C 102,2 (C-1); 73,9 (C-4); 72,3 (C-3); 72,0 (C-2); 69,9 (C-5); 17,8 (C-6). **EM:** m/z (%) 741,02 (62); 577,05 (6); 285,82 (100); 256,12 (6).

Resultados y discusión

Los tres compuestos se aislaron de *Cassia fruticosa* Mill. por la técnica de cromatografía flash, utilizando el equipo Isolera One®, con una elución por gradiente múltiple a un flujo de

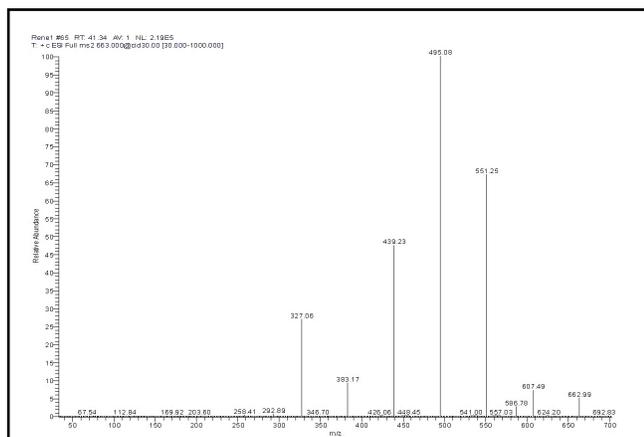


Figura 2: EM-EM del ión m/z 663 del compuesto **1** (palmitato de β -sitosterol $\cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$)

fase móvil de 25 mL/min. El compuesto palmitato de β -sitosterol $\cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**1**) fue aislado de la fracción **CfR-Hex** obtenida de las ramas, con el sistema de solventes tolueno-acetato de etilo, en gradiente: 1% de tolueno durante 1 volumen de columna (VC), de 1 \rightarrow 14% durante 10VC, manteniéndose esta condición isocrática por 2VC. Los flavonoides kaempferol 3-*O*-rutinosido (**2**) y kaempferol 3-*O*-(2''-ramnosil)rutinosido (**3**) se aislaron de la fracción **CfH** proveniente de las hojas, con el sistema de solventes CH_2Cl_2 -MeOH de acuerdo a la siguiente relación: 5% de CH_2Cl_2 por 1 VC, de 5 \rightarrow 30% durante 10 VC, manteniéndose de manera isocrática por 5,2 VC.

El compuesto **1** fue aislado como un sólido amorfo (10,6 mg) de Pf 75-77°C. El análisis del espectro de IR mostró bandas de absorción características de estiramientos C-H sp^3 en (2850 y 2918 cm^{-1}), un éster no-conjugado (1736, 1260 y 1083 cm^{-1}), grupos metílicos y metilénicos (1463 cm^{-1}) y un grupo isopropilo (1377 cm^{-1}). La fórmula molecular de **1** fue establecida como $\text{C}_{45}\text{H}_{80}\text{O}_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$ a través de las señales en el espectro de masas observadas en 663,56 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 685,55 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1325,90 $[2\text{M}+\text{H}]^{2+}$ y 1343,01 $[2(\text{M}-2)+\text{Na}]^{2+}$. El núcleo esteroidal β -sitosterol fue caracterizado por

los desplazamientos observados en RMN- ^1H (CDCl_3), entre ellos destaca un protón olefínico en 5,33 ppm (s_a ; H-6) y cinco metilos (0,66; 0,79; 0,81; 0,91 y 1,00 ppm) asignados a H-18 H-26, H-27, H-29 y H-19, respetivamente. Estas asignaciones fueron confirmadas por medio de los espectros HETCOR. La sustitución sobre el núcleo esteroidal fue determinada a través de la señal en 4,57 ppm (m ; H-3) ya que la misma está asociada a la presencia de un éster alifático de ácido graso unido a C-3 (Parmar y col., 1998). Este sustituyente fue confirmado debido a las señales de RMN- ^1H en: 2,26 ppm (t , $J= 8,4$ Hz; H-2'), 0,88 ppm (m ; H-16') y RMN- ^{13}C en: 173,24 (C-1'), 34,80 (C-2'), 24,50 (C-3') y 14,14 ppm (C-16') las cuales son características de derivados de ácidos grasos (Parmar y col., 1998). Adicionalmente, en RMN- ^{13}C destacan las señales en 139,86 (C-5), 122,63 (C-6) y 73,73 (C-3) las cuales coinciden con el palmitato de β -sitosterol. Las múltiples señales entre 11 y 56 ppm fueron asignadas a través del espectro DEPT-135 por comparación con la data reportada para el palmitato de β -sitosterol (Su y col., 2009).

Adicionalmente, las señales en el espectro de masas en 413,31 $[\text{M}-250]^+$ y 397,48 $[\text{M}-266]^{2+}$ muestran fragmentaciones características de ésteres alifáticos de β -sitosterol (Nes y col., 1992). Así, el fragmento m/z 266 corresponde al ácido graso que contiene el compuesto **1**. Sin embargo, dicha relación m/z 266 no se corresponde con algún ácido graso lineal saturado o insaturado producido en la naturaleza. En RMN- ^1H y en RMN- ^{13}C no se observa señal alguna para insaturaciones (olefinas o alquinos) distintas a la formada en el anillo B de **1**, por lo que se concluye que el resto de ácido graso es saturado lineal y corresponde al ácido palmítico parcialmente hidratado ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$).

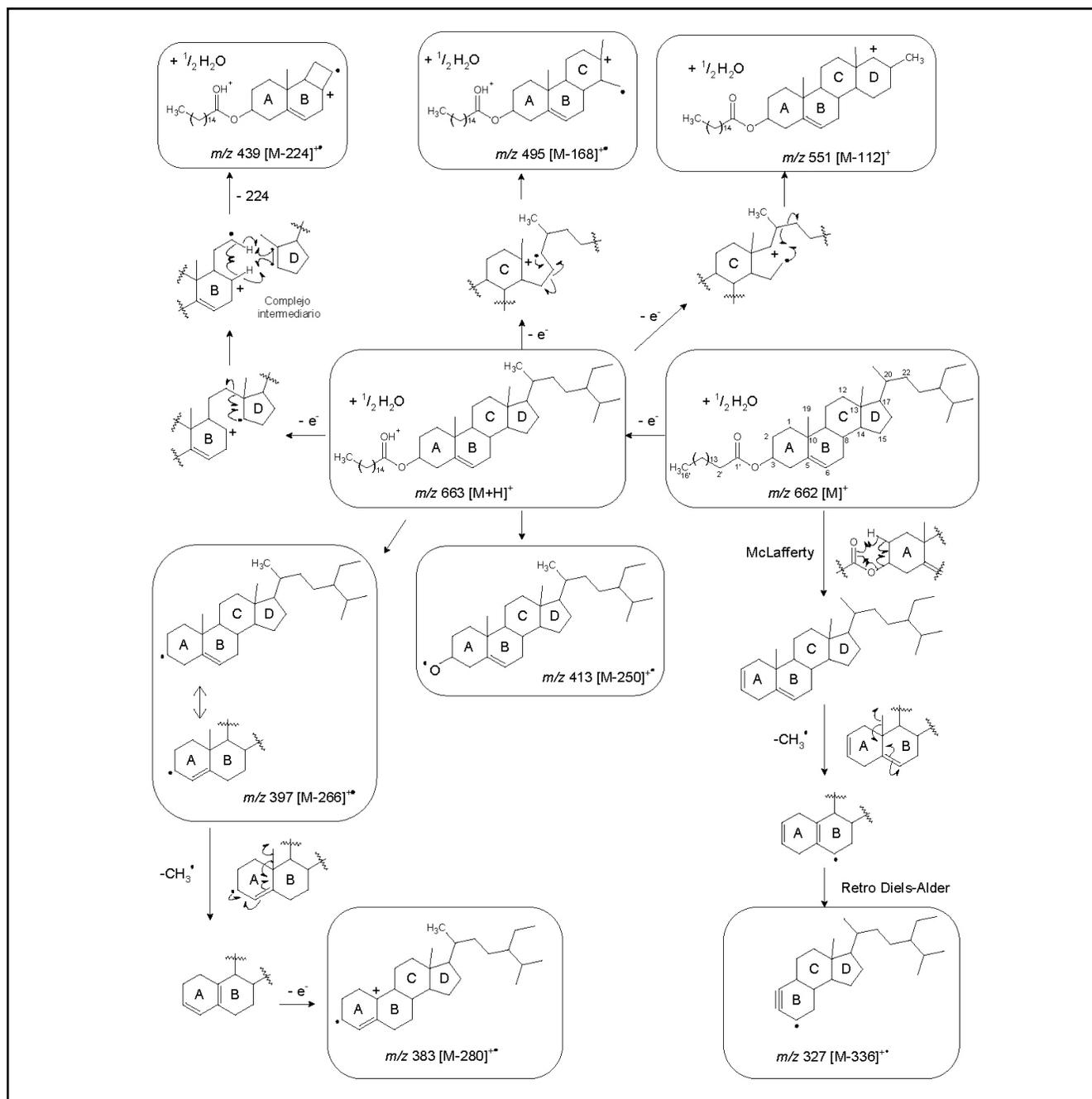


Figura 3. Fragmentación propuesta para el compuesto 1 (palmitato de β -sitosterol $\cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$).

La naturaleza del compuesto **1** se confirmó con el espectro de masas a través de las señales en 1325,90 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ y 1343,01 $[2(\text{M}-2)+\text{Na}]^+$. Por lo tanto, la señal observada en 663,56 $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponde al β -sitosterol palmitato parcialmente hidratado cuya fórmula molecular es $\text{C}_{45}\text{H}_{80}\text{O}_2 \cdot \frac{1}{2} \cdot \text{H}_2\text{O}$, el cual ha sido aislado previamente de la planta *Lobelia davidii* Franch.

(Zhang y col., 1992). El resto de las fragmentaciones, coinciden con las reportadas para el núcleo de β -sitosterol (Bagri y col., 2009). Por otra parte, la fragmentación del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$ (**Figura 2**) produjo fragmentos moleculares múltiples de 56 uma, para los cuales se propone el proceso de fragmentación descrito en la **Figura 3**. Los picos en 495,08 $[\text{M}-168]^+$ y 551,25 $[\text{M}-112]^+$

proviene de la fragmentación clásica para estructuras cíclicas (McLafferty y Turecek, 1993). La reducción del anillo C genera dos fragmentos que se mantienen unidos a través de la interacción ión-dipolo inducido y forman un complejo intermediario (McLafferty y Turecek, 1993) que promueve la formación del catión radical tricíclico de m/z 439,23 $[M-224]^+$. El rearrreglo McLafferty de **1** promueve la pérdida del metilo C₁₉ seguida de una reacción de retro-Diels-Alder y produce el fragmento molecular con m/z 327,06 $[M-224]^+$. Es importante resaltar que el compuesto **1** fue identificado por CCF en el extracto metanólico **CfR**, de modo que es un componente que pertenece a la planta *Cassia fruticosa* Mill. y no un artefacto producto de la esterificación del ácido palmítico y β -sitosterol en medio ácido.

El compuesto **2** fue aislado como un sólido marrón (20,76 mg) de Pf 165-167°C. La fórmula molecular de **2** fue establecida como C₂₇H₃₀O₁₅ a través de los datos de RMN y ESI-MS. En el espectro de ESI-MS se observaron picos en m/z 593,17 $[M]^+$ y 284,88 $[M-glicósido]^+$ los cuales coinciden con los reportados para el kaempferol 3-O-rutinósido (Stobiecki, 2000). En el espectro de RMN-¹H (CD₃OD), se observó el patrón de sustitución AA'BB' proveniente del anillo B del kaempferol en 8,05 y 6,89 ppm ($J=9,0$ Hz). Igualmente, se observaron las señales características los protones anoméricos de β -glucosa en 5,11 ppm ($J=7,4$ Hz) y α -L-ramnosa en 4,51 ppm (s_a), ésta última confirmada por la presencia de un metilo en 1,11 ppm ($J=6,0$ Hz). El espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) mostró 27 señales: 9 carbonos cuaternarios, incluido un carbonilo en 179,42 ppm; 16 metinos, seis de ellos sp^2 ; 1 metileno y 1 metilo sp^3 . Las correlaciones observadas en HMBC permitió establecer la unión de la ramnosa al metileno de la glucosa y de la glucosa al C-3 del kaempferol,

de modo que la identificación de **2** fue kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopiranosido conocido como kaempferol 3-O-rutinósido o nicotiflorin. La asignación total de las señales de RMN-¹H y ¹³C fueron realizadas a través de los espectros de DEPT-135, HMQC, HMBC, COSY y comparadas con los datos reportados en la literatura (Kazuma y col., 2003).

El compuesto **3** fue aislado como un sólido marrón (37,20 mg) de Pf 195-197°C. La fórmula molecular de **3** fue establecida como C₃₃H₄₀O₁₉ a través de los datos de RMN y ESI-MS. En el espectro de ESI-MS se observaron picos en m/z 741,02 $[M+H]^+$ y 285,82 $[M-glicósido]^+$ los cuales coinciden con los reportados para el kaempferol 3-O-(2''-ramnosilrutinosido) (Luo y col., 2013). El patrón de sustitución AA'BB' determinado en el compuesto **2**, fue observado en el espectro de RMN-¹H (CD₃OD) del compuesto **3**. Adicionalmente, se observaron las señales características de protones anoméricos de β -glucosa en 5,59 ppm ($J=7,5$ Hz) y dos unidades de α -L-ramnosa en 5,22 ppm ($J=3,0$ Hz) y 4,51 ppm (s_a), éstas últimas fueron confirmadas por la presencia de dos metilos en 1,07 y 0,98 ppm ($J=6,0$ Hz c/u). El espectro de RMN-¹³C (CD₃OD) mostró 33 señales: 9 carbonos cuaternarios, incluido un carbonilo en 179,23 ppm; 21 metinos, seis de ellos sp^2 ; 1 metileno y 2 metilos sp^3 . Las correlaciones observadas en HMBC permitió establecer la unión de las unidades de ramnosa a la glucosa en C-2'' y C-6'' y de la glucosa al C-3 del kaempferol, de modo que la identificación de **3** fue kaempferol 3-O-(α -L-ramnosil(1 \rightarrow 2))- β -D-(glucopiranosil)- α -L-ramnopiranosido, conocido como kaempferol 3-O-(2''-ramnosil)rutinosido o clitorin. La asignación total de las señales de RMN-¹H y ¹³C fue realizadas a través de los espectros de DEPT-135, HMQC, HMBC, COSY y comparadas con los datos reportados en la literatura (Kazuma y col., 2003).

Conclusiones

Los compuestos: palmitato de β -sitosterol $\cdot\frac{1}{2}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (**1**), nicotiflorin (**2**) y clitorin (**3**) se aislaron de *Cassia fruticosa* Mill. por la técnica de cromatografía flash, utilizando el equipo Isolera One® en un sólo paso cromatográfico y representa el primer reporte de dichos compuestos en la especie. La investigación sobre el estudio fitoquímico y antidiabético de las fracciones (Cf, CfG, CfR, CfR-Me) y compuestos aislados (**1-3**) son actualmente objeto de estudio.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado con fondos del proyecto PG-03-7345-2008/2, otorgado por el CDCH de la Universidad Central de Venezuela. El equipo de Cromatografía Flash Isolera One® utilizado para la separación de los compuestos reportados, pertenece a la empresa Equilab Científica C.A.

Referencias bibliográficas

- Bagri P, Ali M, Sultana S, Acri V. 2009. New sterol esters from the flowers of *Punica granatum* Linn. *J Asian Nat Prod Res* 11(8): 710–715.
- Biotage. Manual del equipo Isolera One®: Flash Purification. 2012.
- Casale I. La Fitotoponimia de los Pueblos de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca, Universidad Central de Venezuela: Caracas. 1997. pp. 200–201, 264, 344.
- Eisenberg DM, Kessler RC, Foster C, Norlock FE, Calkins DR, Delbanco TL. 1993. Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs and patterns of use. *N Engl J Med* 328(4): 246–252.
- Kazuma K, Noda N, Suzuki M. 2003. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochem* 62(2): 229–237.
- Luo JL, Lu FL, Liu YC, Shih YC, Lo CF. 2013. Fingerprint analysis of Ginkgo biloba extract and ginkgo semen in preparations by LC-Q-TOF/MS. *J Food Drug Anal* 21(1): 27–39.
- McLafferty FW, Turecek F. Detailed mechanisms of ion fragmentation. Mass spectra of common compounds classes. In: Interpretation of mass spectra, 4ta edición. University Science Books: California. 1993. pp. 150, 235.
- Meena R, Kalidhar S. 1998. Phytochemical study of *Cassia fruticosa* flowers. *J Med Arom Plant Sci* 20(1): 3–4.
- Nes WD, Norton R, Benson M. 1992. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [^{13}C] mevalonates. *Phytochemistry* 31(3): 805–811.
- Parmar VS, Jain SC, Gupta S, Talwar S, Rajwanshi VE, Kumar R, Azim A, Malhotra S, Kumar N, Jain R, Sharma NK, Tyagi OD, Lawrie SJ, Errington W, Howarth OW, Olsen CE, Singh SK y Wengel J. 1998. Polyphenols and alkaloids from piper species. *Phytochemistry* 49(4): 1069–1078.
- Stobiecki M. 2000. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54(3): 237–256.
- Su K, Gong M, Zhou J, Deng S. 2009. Study on chemical composition of *Nauclea officinalis* leaves. *Intern J Chem* 1(2): 77–81.
- Watson-Samudio H. Evaluación fitoquímica de las hojas de *Senna alata* y *Cassia fruticosa*. Tesis de Maestría en Química. Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias, San José, Costa Rica. 1991.
- Zhang MZ, Wang JC, Zhou SH. 1992. The chemical components of *Lobelia davidii* Franch. *J Integr Plant Biol* 34(1): 58–61.

Recibido: 08-03-2017

Aceptado: 10-10-2017