

# Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Croton matourensis*

## Isolation and Characterization of Secondary Metabolites from *Croton matourensis*

ALÍRICA I SUÁREZ<sup>A\*</sup>, DIANA RIVAS<sup>B</sup>, REINALDO S COMPAGNONE<sup>B</sup>,  
ANÍBAL CASTILLO<sup>A</sup>, ZULEIMA BLANCO<sup>A</sup>

### Resumen

La investigación química de los extractos orgánicos obtenidos de las hojas de *Croton matourensis*, condujo al aislamiento e identificación de 6 compuestos: dos flavanonas glicosiladas *hesperidina* (1) y *naringina* (2), dos diterpenos de tipo neoclerodano, *trans-dehidrocrotonina* (3) y *5 $\alpha$ -hidroxi-trans-dehidrocrotonina* (4), el monoterpeneo *vainillina* (5) y el triterpeno de tipo oleanano  *$\alpha$ -amirina* (6). Las estructuras de los metabolitos fueron determinadas en base a técnicas espectroscópicas de IR, EM, y RMN en una y dos dimensiones y por comparación con datos de la literatura. Todos los compuestos fueron aislados por primera vez de las hojas de *Croton matourensis*.

**Palabras clave:** *Croton matourensis*, Euphorbiaceae, flavonoides, metabolitos secundarios.

### Abstract

Phytochemical investigation of organic extracts from the leaves of *Croton matourensis* resulted in the isolation and identification of two glycosilated flavanones: *hesperidine* (1) and *naringine* (2), two neoclerodane diterpenes, *trans-dehydrocrotonin* (3) and *5 $\alpha$ -hydroxy-trans-dehydrocrotonin* (4), the monoterpene *vainillin* (5) and the oleanane triterpene  *$\alpha$ -amyrin* (6). The structure elucidation of these metabolites was based primarily on spectroscopic techniques: IR, MS and 1D and 2D NMR analysis, and by comparison with literature data. All the compounds have been isolated for first time of *Croton matourensis*.

**Key words:** *Croton huberi*, Euphorbiaceae, flavonoids, secondary metabolites.

### Introducción

El género *Croton*, perteneciente a la gran familia Euphorbiaceae, está formado por hierbas, arbustos, árboles e inusualmente lianas. Las plantas están recubiertas por pelos estrellados o escamosos, y tienen hojas enteras, dentadas o lobuladas. Sus flores son monoicas o dioicas y están reunidas en espigas terminales o axilares. Dicho género comprende aproximadamente unas 1300 especies difundidas en las regiones cálidas del planeta, sobre todo en América del Sur y en África; es el género más grande de la subfamilia Crotonoideae, en Venezuela se encuentran 80 especies (Berry, 1999). El género *Croton* incluye varias especies las cuales contienen una savia roja viscosa que se obtiene realizando cortes a la corteza de

la planta y tiene reportada un amplio rango de acciones farmacológicas (Sandoval y col., 2002). En muchas especies esta savia es conocida como Sangre de grado (Dragon's blood), y es utilizada ampliamente en la medicina tradicional de Sur América para el tratamiento de heridas, inflamaciones, infecciones, diarreas y cáncer (Cai y col., 1993). La savia de la especie *C. palanostigma* contiene un alcaloide llamado taspina, el cual es el principio activo responsable de las propiedades antiinflamatorias, así como de sanar heridas y de su actividad biológica como antitumoral (Sandoval y col., 2002). Muchas especies de *Croton* son utilizadas con propósitos medicinales, por ejemplo *Croton zehntneri* (Craveiro y col., 1978; Oliveira y col., 2002) y *C. cajucara* (Maciel y col., 2000) son

<sup>a</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

<sup>b</sup> Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

comúnmente utilizadas en Brasil para tratar problemas gastrointestinales, *Croton lechleri* es ampliamente utilizado en toda Sur América para inflamaciones, úlceras gástricas, para cicatrizar heridas y para el cáncer (Cai y col., 1993). *Croton nepetaefolius* es utilizado en la medicina folclórica de Brasil como antiespasmódico (Abdon y col., 2002). Usos, química y farmacología de una gran cantidad de especies han sido reportadas (Salatino y col., 2007).

La corteza de *Croton malambo* se utiliza en Venezuela para el tratamiento de enfermedades tales como: diabetes, diarreas, reumatismo, úlceras gástricas, así como antiinflamatorio y analgésico. Un extracto acuoso mostró actividad antinociceptiva en ratas (Suárez y col., 2003). *Croton cuneatus* es una planta medicinal utilizada por los nativos del Amazonas para tratar problemas gastrointestinales, y en inflamaciones (Webster y col., 1999): un extracto acuoso de las partes aéreas de dicha planta mostró propiedades antiinflamatorias en animales de experimentación (Suárez y col., 2006a). Dentro de las actividades farmacológicas experimentalmente comprobadas para el género *Croton* se encuentran entre muchos otros su potencial como agentes antidiabéticos (Torrico y col., 2007).

La química del género *Croton*, ha sido bastante explorada, se han realizado estudios fitoquímicos que han conducido al aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas y una gran variedad estructural de diterpenos, con esqueleto carbonado tipo labdano, kaurano, cleistantano, crotofalano así como clerodano, siendo éste último el más abundante, muchas especies son ricas en mono y sesquiterpenos (Junior y col., 2006).

*Croton matourensis*, especie objeto de este estudio es un árbol pequeño o mediano, el cual se encuentra abundantemente en Brasil y Guayana. En Venezuela se ha observado principalmente en el estado Bolívar (Schnee, 1984). La composición del aceite esencial ha sido reportado para la especie de Brasil (Gottlieb y col., 1981) y más recientemente por nuestro grupo para la especie venezolana (Compagnone y col., 2009). La literatura contiene reportado la presencia de un diterpeno conocido como ácido maravúico (Schneider y col., 1995) en una muestra brasilera. Continuando nuestra investigación fitoquímica y farmacológica de plantas venezolanas pertenecientes al género *Croton*, informamos aquí los resultados del estudio fitoquímico de la especie *C. matourensis* colectada en Venezuela, como contribución a la búsqueda de metabolitos bioactivos. Nuestros recientes estudios, señalaron una baja toxicidad y la evaluación sobre 4 líneas de leucemia humana,

mostró resultados que señalan una interesante actividad citotóxica de los compuestos presentes en los extractos orgánicos (Rivas, 2007). La investigación fitoquímica de los extractos de diclorometano y acetato de etilo obtenidos de las hojas de dicha planta resultó en el aislamiento de un nuevo compuesto y 5 compuestos ya conocidos, pero por primera vez reportados en esta especie, cuyas estructuras fueron determinadas en base a técnicas espectroscópicas de RMN, EM y comparación con valores reportados en la literatura.

## Materiales y Métodos

### MATERIAL VEGETAL

La planta fue recolectada cerca del aeropuerto de Santa Elena de Uairén e identificada por el botánico Aníbal Castillo, una muestra de la colección se guardó bajo el número 22260 en el Herbario Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

### EXTRACCIÓN Y AISLAMIENTO

Las hojas de *Croton matourensis* se secaron en una estufa a 60 °C por 3 días, se molieron y se pesaron obteniéndose 172,50 g de material vegetal. El material molido se sometió a un proceso de extracción en caliente con etanol vía Soxhlet por 48 horas, luego se concentró al vacío hasta sequedad obteniéndose un extracto crudo de 124,0 g, el cual se disolvió en una mezcla metanol/agua 1:1 a la cual se hizo partición con solventes orgánicos de incrementada polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo. Cada extracto orgánico obtenido se sometió a separación cromatográfica, empleando como técnica de separación la cromatografía en columna de fase normal sobre sílica gel, utilizando como eluentes diferentes solventes o mezclas de solventes. Las fracciones eluidas fueron monitoreadas por medio de cromatografía de capa fina (CCF) y fueron unidas según criterios de  $R_f$  y de coloración con el reactivo p-anisaldehído. Cada compuesto aislado fue caracterizado por medio de métodos espectroscópicos como RMN de  $^1\text{H}$ , y  $^{13}\text{C}$ , HMQC, HMBC, COSY y NOESY.

### PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los espectros de IR fueron tomados en un espectrómetro SHIDMAZU 470. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y son reportados sin corrección. Los espectros de RMN fueron tomados en un espectrómetro Bruker de 500 MHz, espectros de masa de alta resolución fueron

tomados en un JEOL JMS-AX505WA. Las rotaciones ópticas fueron medidas en un Lynos Photonies Typ SR6, Spannung. Análisis de CCF fueron realizados en placas de aluminio preparadas con silica gel G<sub>254</sub> (Merck) y los compuestos fueron visualizados por irradiación con UV (254 nm) y reacción con el reactivo p-anisaldehído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HOAc. Para cromatografía de columna se utilizó silica gel 60 (Merk 100-200 mesh) y RP-18.

#### HESPERIDINA (1)

Pf: 256 – 261 °C; RMN <sup>1</sup>H (DMSO) δ 1.08(d, J = 6.0 Hz; rham-H6); 2.69(1H, dd, J = 18.0, 5.0 Hz, H-3a); 2.99(1H, dd, J = 18.0, 5.0, H-3b); 3.81(s, OCH<sub>3</sub>); 4.59(1H, sa, rham H-1); 4.95(1H, d, J = 7.8 Hz, glu H-1); 5.21(1H, d, J:14.0, 5.0 Hz); 5.45(1H, d, J: 5.0 Hz; H-2 ); 6.13(2H, sa, H-6, H-8) 6.78-6.93(m, H-2', H-5', H-6') 12.01(1H, s, C5-OH). RMN <sup>13</sup>C (DMSO) δ 18.4(C-6); 40.3(C-3); 56.2(OCH<sub>3</sub>). 66.6(C-6); 68.9(C-5); 70.8(C-4); 71.2(C-5); 73.6(C-2); 76.8(C-3); 76.8(C-4, C-2); 96.1(C-8); 96.9(C-6); 102.1(rham, C-1); 103.8(C-10); 114.7(C-2'); 115.7(C-5'); 118.4(C-6'); 131.4(C-1'); 146.9(C-3'); 148.0(C-4'); 163.0(C-5); 165.6(C-7); 163.5(C-9); 163.9(C-10). 197.6(C-4); Glucosa δ 100.0(Glu-C-1); 73.5(Glu-C-2); 80.0(Glu-C-3). EM: *m/z* (%) 610 (M<sup>+</sup>,15).

#### NARINGINA (2)

Pf: 249-252 °C RMN <sup>1</sup>H (DMSO) δ 12.05 (OH que-lado); 7.33(d, J = 8.9 Hz; H-2', H-6' ); 6.79(d, J=7.3 Hz; H-3', H-5'); 6.10(d, J=7.9 Hz; H-6, H-8); 5.50(t, J=13.2 Hz; H-2), 2.71(d J= 16.2 Hz; H-3a); 3.20( sa, H-3b) Rahmnosa δ 4.69(dd, J=4.0 ; 16.5 Hz; H-1) 1.15(d, J= 5.9 Hz; H-6 ) Glucosa δ 4.75(dd J= 4.6; 17.1 Hz; H-1); 3.68(s, H-6). RMN <sup>13</sup>C (DMSO), δ 129.1(C-1'); 129.1(C-2', C-6'); 115.8(C-3', C-5'); 79.4 (C-2); 43.0(C-3); 197.8(C-4); 158.3(C-5); 95.7(C-6); 165.2(C-7); 96.8(C-8); 163.2(C-9); 103.8(C10) Glucosa δ 100.0(C-1); 73.5(C-2); 80.0(C-3); 70.8(C-4); 71.2(C-5); 66.6(C-6) Rahmnosa δ 102.1(C-1); 73.6(C-2); 76.8(C-3); 76.8(C-4); 68.9(C-5); 18.4(C-6); 56.2(OCH<sub>3</sub>). EM: *m/z* (%) 580 (M<sup>+</sup>,12).

#### T-DEHIDROCROTONINA (3).

P.f (139-141) °C. RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.18(m, 1H, H-6b); 1.54(d, J =5.7Hz, 3H, H-17); 1.64(m, 1H, H-8); 1.77(m, 1H, H-10); 1.92(s, 3H, H-18); 2.14( m, 1H, H-1a); 2.38 (m, H, H-6a); 2.08-2.27(m, 2H, H-11); 2.36(dd, J = 8.5 Hz, H, H-12 ); 2.53(dd, J = 2.24, 13.3 Hz, 2H, H-1), 3.13(t, J = 11.3 Hz, 1H, H-5); 5.39(t, J = 8.6 Hz, 1H, H-12); 5.85(s, 1H, H-14); 6.37(m, 1H, H-16), 7.42(m, 1H, H-15). <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ: 17.2(C-17); 21.7(C-18); 27.8(C-6); 28.3(C-6); 29.8(C-

7); 39.3(C-5); 39.5(C-1); 40.4(C-11), 41.4(C-8); 45.8(C-10); 51.2(C-9); 72.3(C-12); 108.1(C-14); 125.3(C-13); 126.9(C-3); 139.6(C-16); 144.1(C-15); 165.5(C-4); 177.6(C-19); 198.4(C-2). EM: *m/z* (%) 314 (M<sup>+</sup>,100).

#### 5α-HIDROXI-TRANS-DEHIDROCROTONINA (4).

RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>) δ 1.09(m, H-6); 1.21(s, H-17); 1.54(m, H-7); 1.95(s, H-18); 2.01(m, H-8); 2.20(m, H-10); 2.30(dd, H-11a); 2,58(dd , H-1a); 2.85(dd, H-11b); 3.34(dd, H-1b); 5.33(t, J = 7.2 Hz; H-12); 5.80(s, H-3); 6.45(s,H-14); 7.43(s, H-16); 7.47(s, H-15). RMN <sup>13</sup>C (MeOD) δ 17.2(C-17); 18.7(C-18); 25.0(C-6); 29.7(C-7); 33.2 (C-8); 37.7(C-1); 45.6(C-11); 49.0(C-10); 50.8(C-9); 71.2(C-12); 72.5(C-5); 108.3(C-14); 124.4(C-13); 127.3(C-3); 139.9(C-16); 144.0(C-15); 154.3(C-4); 176.7(C-19); 198.4(C-2). EM: *m/z* (%) 330 (M<sup>+</sup>,36).

#### VAINILLINA (5)

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 3.92(s, OCH<sub>3</sub>); 6.89(d, J = 8.6 Hz; H-5 ); 7.55(d, J= 2.0 Hz; H-2); 7.73(d, J = 8.5 Hz; H-6); 9.78(s,COH); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ 56.1(OCH<sub>3</sub>); 110.4(C-2); 112.4(C-5); 121.8(C-6); 124.6(C-1); 148.7(C-3); 153.7(C-4); EM: *m/z* (%): 153 (M<sup>+</sup>,100); 135 (84).

#### 3α – AMIRINA (6)

RMN <sup>1</sup>H(CDCl<sub>3</sub>) δ 0.84(H-25); 0.94(s, H-23); 0.97 (H-24); 1.00(s,H-27); 1.28 – 1.90 (H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-15, H-16, H-18). 3.20(H-3); 5.10(s, H-12); RMN <sup>13</sup>C δ 15.6(C-24); 15.7(C-25); 18.3(C-6); 23.3(C-11); 26.6(C-16); 27.2(C-2); 27.7(C-15); 29.3(C-23); 31.2(C-21); 32.9(C-7); 33.7(C-17); 36.8(C-10); 38.7(C-1); 39.6(C-4); 39.8 (C-19); 39.9(C-20); 40.0(C-8); 41.5(C-14); 41.6(C-22); 47.7(C-9); 55.1(C-5); 59.0 (C-18); 77.2(C-3); 124.4(C-12); 139.5(C-13). EM: *m/z* (%) 426 (M<sup>+</sup>,20), 218 (100).

## Resultados y discusión

La caracterización e identificación de los compuestos aislados de los diferentes extractos de las hojas de *C. matourensis* fue realizada por medio de diferentes técnicas espectroscópicas: Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono – 13 (RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C), DEPT 135, HMBC, HMQC, NOESY, EM e IR en.

Hesperidina (1) fue aislado del extracto de acetato de etilo en una columna eluida con polaridad EtOAc/MeOH 95/5 con un peso de 7mg, fue obtenido como un sólido amarillo claro de Pf: 258 – 261 °C y su porcentaje de rendimiento fue de 1,95%. Su

espectro de protones en DMSO, mostró señales que sugerían la presencia de una estructura tipo flavonoide glicosilado, donde se observaban señales correspondientes a sistemas aromáticos y a azúcares presentes en la estructura. Una señal típica de OH formando puente de hidrógeno en la posición del C-5, se evidenció a un desplazamiento de 12,01 ppm. Fueron observadas igualmente las señales correspondientes a un metilo de rahnosa a  $\delta$  1,08 ppm y la de un grupo metoxi a  $\delta$  3,81 ppm. La presencia de un par de dobletes distorsionados con  $J = 13,9$  Hz, fueron observados a  $\delta$  2,74 y 3,63 ppm (H-3), estas señales conjuntamente con el doblete presente a  $\delta$  5,45 (H-2) con  $J = 5,0$  Hz, sugirieron la presencia de una flavanona. Fueron identificados dos protones anoméricos a  $\delta$  4,52 (H-1 rahnosa) y 4,97 (H-1 glucosa) revelando un disacárido glucosa-rahnosa en la estructura. Otras señales observadas muestran protones fenílicos. Los datos obtenidos con el espectro de  $^{13}\text{C}$  los cuales fueron discriminados en metilos, metilenos, metinos y cuaternarios en conjunto con el experimento DEPT 135, nos permitieron confirmar por comparación de los datos espectrales experimentales con los reportados la identidad de la flavanona (Mabry y col., 1970). En 197,6 ppm se observa la señal correspondiente al carbonilo presente en el anillo C de la flavanona, se observa igualmente el desplazamiento correspondiente al grupo metoxi presente en el anillo B en 56,2 ppm, el C-3 fue evidenciado a 42,6 ppm y el C-2 a 78,9 ppm. Comparación con estructuras de flavanonas reportadas en la literatura y específicamente con datos correspondientes a la hesperidina, nos señalaron la presencia de la misma. (Horowitz y Gentili, 1963).

Naringenina (**2**) fue aislado del extracto de acetato de etilo específicamente de la fracción eluida con EtOAc/MeOH 9:1 con un peso de 6,7 mg, y un porcentaje de rendimiento del 4,8%. Se aisló como un sólido amarillo de pf: 249 – 252 °C. Su espectro de RMN de protones tomado en DMSO, mostró igual que para la hesperidina, señales que sugerían la estructura de un flavonoide. Un hidrógeno en puente de hidrógeno a 12,05 ppm, señaló la presencia de un carbonilo en la posición 4 del anillo C y de un hidroxilo en la posición 5 del anillo A del esqueleto flavonoide. Un par de dobletes que integran para dos protones los cuales se observan a 7,33 ppm con  $J = 8,9$  Hz y a 6,79 ppm con  $J = 7,9$  Hz, sugieren la presencia de un anillo B para sustituido. Un tercer doblete integrando para dos protones se muestra a 6.10 ppm con  $J = 7,9$  Hz, señal en la cual deben colapsar los protones 6 y 8 del anillo A. El par de dobletes a 3,20 y a 2,71 (16,2 Hz) ppm señalaron de nuevo la estructura de una flavanona. La señal a 5,50 (t,  $J =$

13,2 Hz) correspondiente al protón H-2 nos confirma la presencia de una flavanona glicosilada. El metilo en 1,15 ppm (d,  $J = 5,9$  Hz) sugiere la presencia del azúcar rahnosa conjuntamente con su protón anomérico H-1 a 4,69 ppm (dd  $J = 4,0; 16,5$  Hz), se observa también claramente la presencia de la glucosa mediante su protón anomérico a un desplazamiento de 4,75 ppm (dd ; 4,6; 17,1Hz). La estructura que estábamos analizando se parecía mucho a la que habíamos analizado previamente con la diferencia de que ésta no tenía el grupo metoxi y su patrón aromático era diferente. La comparación de los datos del espectro de  $^{13}\text{C}$  tomado en DMSO, el cual fue discriminado en metilos, metilenos, metinos y cuaternarios en conjunto con el experimento DEPT 135, y comparando con los datos de  $^{13}\text{C}$  de la hesperidina, indicaron una sustitución similar en el anillo A y un anillo B sustituido en posición para con un grupo hidroxilo. Se observan señales características para la flavanona tales como: a 197 ppm se observa C-4 correspondiente al carbonilo presente en el anillo C, a 163,5 ppm se encuentra la señal del C-5 el cual está enlazado a un grupo hidroxilo así como el C-7 a un desplazamiento de 165,2 ppm. Igualmente se observan señales características para la rahnosa; el C-6 correspondiente al grupo metilo en 18,6 ppm y para la glucosa una señal en 60,9 ppm del C-6 metilénico. La comparación de datos reportados para la naringenina con los obtenidos experimentalmente, señalan inequívocamente su presencia en las hojas de *Croton matourensis* siendo la primera vez que dicho compuesto es aislado de la planta (Mabry y col., 1970).

T-dehidrocronina (**4**), fue aislado de las fracciones mayoritarias de la separación cromatográfica del extracto de acetato de etilo, en una mezcla de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CHCl}_3$ , con una proporción 2:1, se obtuvo como un sólido blanco de punto de fusión 139-141°C. El análisis del espectro de IR, mostró dos bandas intensas a 1700 y 1650  $\text{cm}^{-1}$ , revelando la presencia de una lactona y de un carbonilo  $\alpha, \beta$  insaturado; se obtuvo además en este análisis información de la presencia de un anillo de tipo furano, al observar las absorciones típicas a 1500 y 870  $\text{cm}^{-1}$ . La espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , Dept, HMQC, HMBC y COSY, se acumuló para lograr identificar el compuesto. El espectro desacoplado de  $^{13}\text{C}$ , indicó que 19 átomos de carbono constituían la molécula. Análisis comparativos de  $^{13}\text{C}$  y Dept 135, determinaron la naturaleza de los carbonos presentes: dos grupos metilo, 4 carbonos metilénicos, 8 carbonos de tipo metínico, conjuntamente con tres carbonos cuaternarios y dos grupo carbonilo, pertenecientes a una lactona y a un carbonilo  $\alpha, \beta$  insaturado. El experimento HMQC, nos permitió establecer las conecti-

vidades entre carbonos y sus protones directamente unidos, mientras las correlaciones a dos y tres enlaces fueron determinadas a través de un HMBC. El carbono más desapantallado (198.4 ppm), se correlacionó con la ayuda del HMBC con los protones a 2,47 y 2,12 ppm, el desplazamiento de este carbono sugería una cetona conjugada que pudiera estar localizada en la posición 2 de un esqueleto diterpenico de tipo clerodano. Las señales de los grupos metilos a 1,54 y 1,92 ppm, fueron correlacionadas con los carbonos 4 y 8 de una estructura diterpenoide con esa naturaleza, comúnmente reportadas en el género *Croton*. Las características espectrales previamente discutidas, previa comparación con la literatura, indicaron que la estructura correspondía a T-dehidrocrotonina (TDHC) (**3**), aislada por primera vez de *Croton cajucara* (Maciel y col., 1992).

El compuesto (**4**) fue aislado del extracto de acetato de etilo, específicamente de la fracción siguiente al compuesto (**3**), la cual se eluyó con polaridad  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1, se obtuvo con apariencia de caramelo color marrón con un peso de 29,2 mg, y un porcentaje de rendimiento del 5,14%. El ión molecular obtenido por EM, utilizando la técnica de impacto electrónico fue de 330 m/z, sugiriendo una fórmula molecular de  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_5$ , la cual establece un número de 9 insaturaciones presentes en la estructura. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tomado en  $\text{CDCl}_3$  sugirió una estructura tipo diterpeno muy similar a la trans-dehidrocrotonina (**3**), previamente descrito. Se observaron señales que sugerían la presencia de un grupo metilo secundario a  $\delta$  1,21 ppm como un singlete, otro metilo terciario se observó a un  $\delta$  de 1,95 ppm igualmente como un singlete. Se evidenció también en el espectro de protones las señales correspondiente a un anillo furánico  $\delta$  (6,45 ; 7,43 y 7,47) ppm. Un protón olefínico sin acoplamiento fue igualmente observado a un desplazamiento químico de 5,80 ppm como un singlete. El resto de las señales presentes en el espectro de  $^1\text{H}$ , se establecieron con ayuda de los experimentos en dos dimensiones HMQC, COSY y HMBC. El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  claramente nos indicó que estábamos en presencia de un diterpeno con 19 átomos de carbono; se identificaron los carbonos correspondientes al anillo furánico a  $\delta$  (144,0; 139,9; 124,4; 108,3); la señal de una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada fue evidenciada a un  $\delta$  198,4 (C-2), esta señal conjuntamente con la señal carbonílica de una gamma-lactona a un desplazamiento de 176,7 ppm (C-19), nos corroboraron la presencia de una estructura muy similar a trans-dehidrocrotonina. Dos señales en el espectro de carbono fueron encontradas diferentes a la estructura mencionada, un carbono oxigenado cuaternario a un  $\delta$  72,5 (C-5) y la señal

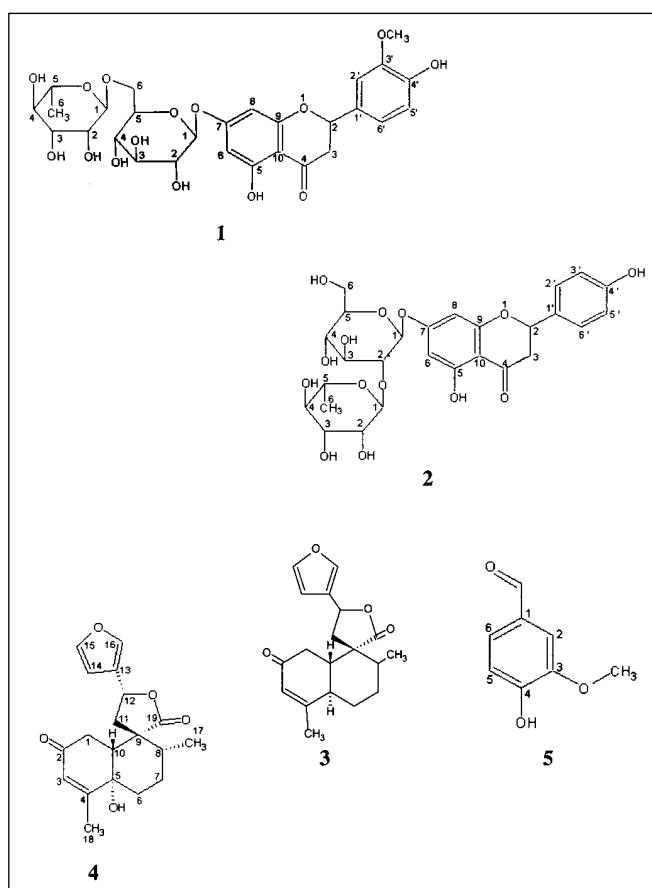


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de *Croton matourensis*.

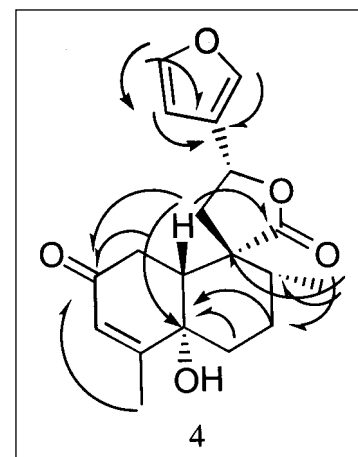


Figura 2. Principales correlaciones en el HMBC para **4**.

olefínica cuaternaria del C-4, se mostró desplazada de 164,0 ppm en TDHC hasta 154,3 ppm en nuestra estructura, algunas pequeñas diferencias en los desplazamientos de los carbonos vecinos (C-6, C-7, C-5), fueron igualmente notables. El espectro de HMQC nos permitió establecer todas las conectividades carbono-hidrógeno, siendo evidente a través de este análisis la desaparición del H-5, presente en TDHC, en cuyo carbono ubicamos al grupo hidroxilo. Las correlaciones de los espectros de COSY y HMBC, nos corroboraron la ubicación de este grupo; especialmente fueron importantes las correlaciones en el

HMBC entre el H-18 (1,95 ppm) con el carbono C-5 (72.5 ppm), y del H-10 (2,20 ppm) con el mismo C-5. El resto de las señales fueron asignadas con toda la data espectroscópica y comparación detallada con estructuras similares reportadas en la literatura. Luego de examinar la data espectroscópica y comparar los datos experimentales con los reportados para la 5 $\alpha$ -hidroxi-cis-dehidrocrotónina, pudimos observar diferencias significativas en los valores correspondientes al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Un experimento NOESY fue necesario para confirmar que el compuesto que habíamos aislado correspondía al isomero trans de la 5-hidroxi-dehidrocrotónina, el cual reportamos por primera vez como parte de la evaluación fitoquímica de *Croton matourensis*.

La vainillina (**5**) fue aislada del extracto de acetato de etilo, específicamente de la fracción eluída con una mezcla diclorometano/hexano/metanol en una proporción 9,2/ 0,4/0,4 con un peso de 18,1 mg, y un porcentaje de rendimiento del 2,6%. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  fue tomado en  $\text{CDCl}_3$ ; se observa un singlete con muy poca intensidad, correspondiente al hidrógeno de un aldehído a un desplazamiento de 9,78 ppm, señal que se corrobora posteriormente con el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , se observa también un desplazamiento a 3,92 ppm correspondiente a un grupo metoxi así como las señales de los hidrógenos presentes en la estructura aromática; 7,55 ppm (H-2), 6,89 ppm (H-5), 7,73 ppm (H-6) con constantes de acoplamiento de 2,0; 8,6; y 7,73 respectivamente. Los datos obtenidos a partir del espectro de  $^{13}\text{C}$  tomado en  $\text{CDCl}_3$ , el cual fue discriminado en metilos, metinos y cuaternarios en conjunto con el experimento DEPT 135, mostró con mayor claridad que el RMN  $^1\text{H}$ , las señales pertenecientes a la vainillina, se observa un  $\delta$  característico de un grupo metoxi a 56.1 ppm así como un desplazamiento característico de un grupo hidroxilo en un anillo aromático. Se observan los metinos pertenecientes a la estructura aromática C-2, C-5 y C-6 a 110,4; 112,4 y 124,6 ppm respectivamente. El ión molecular obtenido por EM utilizando la técnica de impacto electrónico fue de 153 m/z con un pico base de 135 m/z, sugiriendo una fórmula molecular de  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ , la cual establece un número de 5 insaturaciones presentes en la estructura. Como es característicos de los aldehídos aromáticos en el espectro de masas puede observarse un pico de ion molecular (153 m/z) bastante intenso además de la pérdida del grupo hidroxilo como agua (135 m/z) y la pérdida del grupo carbonilo perteneciente al aldehído (108 m/z). Luego de revisar toda la data espectroscópica se llegó a la conclusión de que estábamos en presencia de la vainillina, compuesto aislado por primera vez de las hojas de *Croton matourensis*.

El compuesto (**6**)  $\alpha$ -amirina fue aislado del extracto de hexano, específicamente de la fracción 3,2 con un peso de 4,6 mg, y un porcentaje de rendimiento de 0,8%. En el espectro de RMN de protones tomado en  $\text{CDCl}_3$  pueden observarse señales características de un triterpeno de tipo oleanano. Examinando el espectro de  $^1\text{H}$  se observa una señal olefínica correspondiente a 5.10 ppm (H-12) y a 5,20 ppm (H-13) característica de los esqueletos tipo oleanano, se observa también una señal perteneciente a un metino oxigenado a 3,20 ppm correspondiente al H-3. La comparación de los datos del espectro de  $^{13}\text{C}$  tomado en  $\text{CDCl}_3$  en conjunto con el espectro DEPT 135 permitió clasificar los carbonos en metilos, metilenos, metinos y cuaternarios. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observan señales de un doble enlace en 124,4 y 139,5 ppm desplazamientos característicos de los esqueletos tipo oleanano. Los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT 135 mostraron la presencia de un metino oxigenado en 77.2 ppm característico de un carbinol secundario en posición  $\alpha$ , lo cual se confirmó con el desplazamiento químico del C-5 en 55.1 ppm y el  $\delta$  de C-24 en 15.6 ppm, evidenciándose claramente que la estereoquímica del C-3 era axial (3 $\alpha$ ). Se determinó si dicho compuesto se trataba de la 3 $\alpha$ - $\alpha$ -amirina o de la 3 $\alpha$ - $\beta$ -amirina, al observar que el C-20 (39,9 ppm) no era cuaternario, siendo éste un carbono característico de la 3 $\alpha$ - $\beta$ -amirina. El ión molecular obtenido por EM utilizando la técnica de impacto electrónico fue de 426 m/z con un pico base de 218 m/z característico de los esqueletos de tipo oleanano, sugiriendo una fórmula molecular de  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ , la cual establece un número de 6 insaturaciones presentes en la estructura. Luego de examinar y comparar la data espectroscópica proponemos que la estructura que hemos aislado por primera vez de *Croton matourensis* corresponde al triterpeno de tipo oleanano  $\alpha$ -amirina.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado con fondos de CDCH PG-06-7342-2008, Universidad Central de Venezuela.

## Referencias bibliográficas

- Abdon APV, Leal-Cardoso JH, Coelho-de-Sousa AN, Moraes SM, Santos CF. 2002. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice Braz J Med Biol Res 35:1215-1219.
- Berry EP. 1999. Flora of the Venezuelan Guayana. Editorial Missouri Botanical Garden Press. Vol 5. USA.
- Cai Y, Chen ZP, Phillipson JD. 1993. Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. Phytochemistry 34: 265-268.

- Craveiro AA, Andrade CHS, Abreu Matos FJ, J. De Alencar JW. 1978. Anise-like flavor of *Croton* aff. *zehntneri* Pax et Hoffm. *J Agric Food Chem.* 26: 772-773.
- Compagnone RS, Chavez K, Mateu E, Orsini G, Arvelo F, Suárez AI. 2009. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela, *Records of Natural Products* (en prensa).
- Gottlieb OR, Koketsu M, Magalhães MT, Maia JGS, Mendes PH, Rocha AI, Silva ML, Wilberg VC. 1981. Óleos essenciais da Amazônia. VII. *Acta Amazônica.* 11: 143-148.
- Horowitz RM, Gentili B. 1963. Flavonoids of Citrus VI. The structures of neohesperidose. 19: 773.
- Itokawa H, Ichihara Y, Kojima H, Watanabe K, Takeya K. 1989. Nor-clerodane diterpenes from *Croton cajucara*. *Phytochem.* 28: 1667-1669.
- Junior S, Alves V, Moura F, Vieira M, Conserva L, Lemos R. 2006. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Braz J Pharmacognosia.* 16: 397-402.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer-Verlag: Berlin.
- Maciel MA, Pinto AC, Brabo SN, Silva MN. 1998. Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry.* 49: 823-828.
- Maciel MA, Pinto AC, Arruda AC, Pamplona SG, Vanderlinde FA, Echevarria A, Grynberg NF, Colus IM, Farias RA, Luna Costa AM, Rao VS. 2000. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajuraca*. *J Ethnopharmacol.* 70: 41-55.
- Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-de-Sousa AN. 2002. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz J Med Biol Res.* 34:1471.
- Rivas D. 2007. Estudio fitoquímico de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Croton matourensis*. Tesis de Licenciatura en Química, Escuela de Química, UCV.
- Salatino A, Faria-Salatino ML, Negri G. 2007. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J Brazil Chem Soc.* 18: 11-33.
- Sandoval M, Okuhama NN, Clark M, Angeles FM, Lao J, Bustamante S, Millar M. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 80: 121-129.
- Schnee L. 1984. *Plantas comunes de Venezuela*. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la biblioteca. 3ra edición. Caracas.
- Schneider C, Breitmaier E, Bayma JC, de Franca LF, Kneifel H, Krebs HC. 1995. Maravuiic Acid, a New *seco*-labdane Diterpene from *Croton matourensis*. *Liebigs Ann.* 709-710.
- Suárez AI, Salazar-Bookaman MM, Compagnone RS, Tillett S, Delle Monache F, Digiulio C, Bruges G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 88:11-14.
- Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C. 2006. Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 105: 99-101.
- Steyermark JA, Berry PE, Yatskievych K, Holist BK. 1999. *Flora of the Venezuelan Guayana*. USA. Missouri Botanical Garden Press. 15: 72.
- Torrico F, Cepeda M, Guerrero G, Meléndez F, Blanco Z, Canelon DJ, Díaz B, Compagnone RS, Suárez AI. 2007. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Braz J Pharmacognosy.* 17: 166-169.
- Webster G, Berry P, Armbruster W, Esser H, Gillespie L, Hayden J, Levin G, Secco R, Heald S. 1999. *Flora of the Venezuelan Guayana*. USA. Missouri Botanical Garden Press. 5:117.