

NUEVAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS DE *Perymenium grande*

R. Murillo^{1*}, V. Castro¹, J. Araya¹, L. Poveda²

1. Escuela de Química y Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de 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: 20 de septiembre, 2006; aceptado: 1 de diciembre, 2006

Abstract:

Three new sesquiterpene lactones were isolated from the aerial parts of *Perymenium grande* Hemsl. (Asteraceae), collected around Rincón de la Vieja Volcano, Costa Rica. In addition to the three new lactones 1, 3 and 5; were isolated the additional five known sesquiterpene lactones. The separations were performed with chromatographic techniques and the structures were elucidated by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques.

Keywords: sesquiterpene lactones, Asteraceae, *Perymenium grande*.

I. Introducción

Perymenium grande pertenece a la familia Asteraceae. Es conocida comúnmente como tatascán, taxicobo ó tatascamite en diferentes regiones de Centroamérica. Crece de manera natural desde el norte de México hasta Perú y es un árbol que puede alcanzar los 20 m de altura [1]. El género *Perymenium* ha sido objeto de diversos estudios fitoquímicos y se han aislado diversos compuestos, dentro de los cuales predominan las lactonas sesquiterpénicas [2-7]. Por ejemplo, en el año 1992 se publicó un estudio fitoquímico de *P. grande*, que reveló la presencia de germacranólidos α,β -insaturados como metabolitos secundarios principales [8].

Las lactonas sesquiterpénicas se han aislado de numerosas plantas pertenecientes al género Asteraceae y han sido descritas como los componentes activos de diversas plantas medicinales de uso tradicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias [9]. Continuando nuestra investigación fitoquímica del género, reportamos aquí los resultados obtenidos de un nuevo estudio fitoquímico de *Perymenium grande* recolectada en Costa Rica.

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

II. Resultados y Discusión

De la parte aérea de *Perymenium grande* se encontraron ocho lactonas sesquiterpénicas, tres de ellas con estructuras novedosas: **1**, **3** y **5**; y cinco de estructuras ya publicadas: **2**, **4**, **6-8** [10-12]. Del estudio realizado en el año 1992, únicamente las lactonas **2** y **5** fueron aisladas nuevamente, aún cuando la planta provenía de la misma zona geográfica [8].

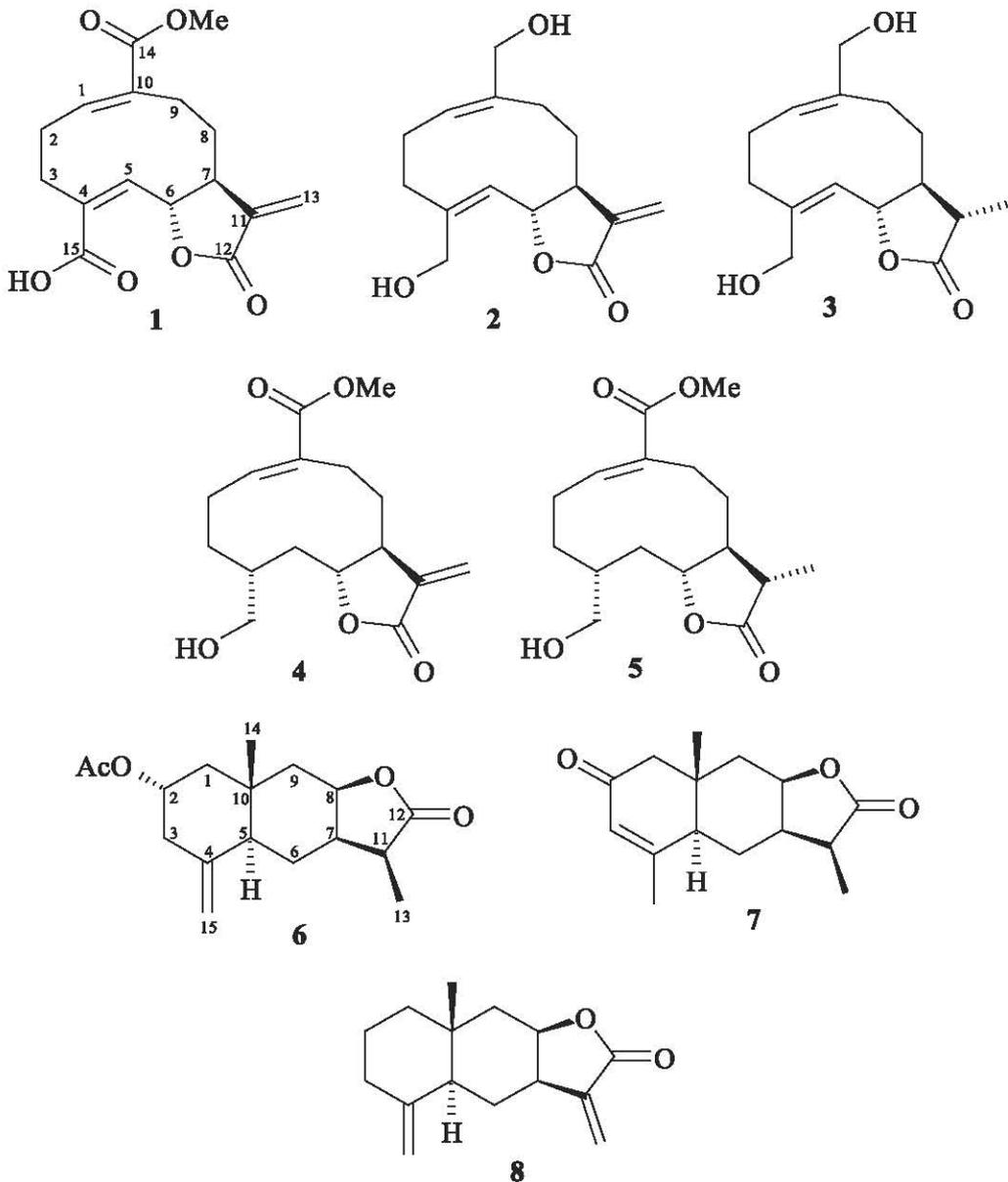


Figura 1. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Perymenium grande*.

El espectro ^{13}C -RMN del compuesto **1** presenta un total de dieciséis carbonos (Tabla 2). Las señales en ^1H -RMN a δ 3.68 s y ^{13}C -RMN a δ 51.9 q sugieren la presencia de un éster de metilo (demostrado con la correlación observada en el espectro gHMBC). Las restantes quince señales en el espectro de ^{13}C -RMN indican la estructura de un sesquiterpeno. Dos dobletes a δ 6.12 d y a δ 5.42 d ($J = 3.2$ Hz) son típicos de una estructura de lactona sesquiterpénica *trans* α,β -insaturada [10], esto está además apoyado con los acoplamientos J^3 de estos hidrógenos con las señales en ^{13}C -RMN a δ 46.0 d y δ 170.0 s. Del espectro H,H-gCOSY se puede derivar la secuencia H-13, H-13', H-7, H-6 y H-5 (ver Tabla 1 y numeración de la estructura). La señal H-5 a δ 5.78 d (10 Hz) correlaciona en J^1 (gHSQC) y J^2, J^3 (gHMBC) con las señales de un doble enlace δ 141.6 d y δ 132.0 s, y la señal de un carboxilo a δ 171.1 s, respectivamente. La señal a δ 6.63 ddd (10, 7.6, 2 Hz) presenta acoplamientos en J^1 con la señal en ^{13}C -RMN a δ 139.4 d y J^2, J^3 con las señales a δ 134.4 s y a δ 168.0 s. Esto indica que los dos metilos presentes en el sistema del sesquiterpeno (aparte del isopropilo) se encuentran oxidados a carboxilos y además α,β insaturados. El espectro gHMBC aclara, en una correlación J^3 -como se indicó anteriormente- que el carboxilo a δ 168.0 s se encuentra metilado. Del espectro gHSQC se pueden identificar aún las señales de cuatro metilenos; por razones biogénicas y con las observaciones realizadas anteriormente, se propone para este compuesto la raíz carbonada de un germacranólido. Las correlaciones observadas en el gHMBC entre H-6 (δ 5.49 dd (10, 10 Hz)) y C-8 (δ 24.4 t), entre H-1 (δ 6.63 ddd) y C-9 (δ 22.9 t), entre H-1 y C-2 (δ 26.9 t) y entre H-5 (δ 5.78 d (10 Hz)) y C-3 (δ 32.4 t) corroboran la estructura (ver Figura 2). Como se mencionó anteriormente las constantes de acoplamiento de H-13 y H-13' (3.2 Hz) [9] indican la presencia de una lactona *trans*, lo cual además es concordante con las constantes de acoplamiento medidas para H-6. Cabe recordar, que en la biogénesis de los sesquiterpenos cíclicos, el grupo isopropilo (unido a C-7) generalmente se observa -en la familia Asteraceae- en posición beta, de ahí la estereoquímica planteada [11]. La designación 10(1)*E*, 4*Z* de los dobles enlaces se plantea en analogía con los compuestos aislados y publicados de esta especie, además de la concordancia con los cambios químicos en el espectro ^{13}C -RMN [9, 13] y con la estereoquímica propuesta para el compuesto **2** biogénicamente relacionado con **1**.

El compuesto **2** ya había sido aislado de esta planta anteriormente y los datos espectrales así lo corroboraron [8]. El espectro ^1H -RMN de **3** presenta una diferencia importante con respecto a **1**, las señales del exometileno (H-13 y H-13') a campo bajo no se observan en **3**, a cambio de esto se aprecia un metilo doblete a δ 1.16 d (7.2 Hz). Esta señal de metilo presenta una correlación J^3 con otra señal de carboxilo a δ 178.5 s (C-12) cuyo cambio químico indica que no está conjugado. La estereoquímica de H-11 se propone α en vista de la interacciones dipolares (NOEs) observadas para el compuesto **5** (ver Figura 3) -se supone la misma estereoquímica relativa en ambos compuestos por razones biogénicas-. De la misma forma se establece la estereoquímica de los dos dobles enlaces. La configuración *trans* de la lactona puede deducirse, de las constantes de acoplamiento de H-6. Los espectros H,H-gCOSY, gHSQC y gHMBC concuerdan con la estructura planteada.

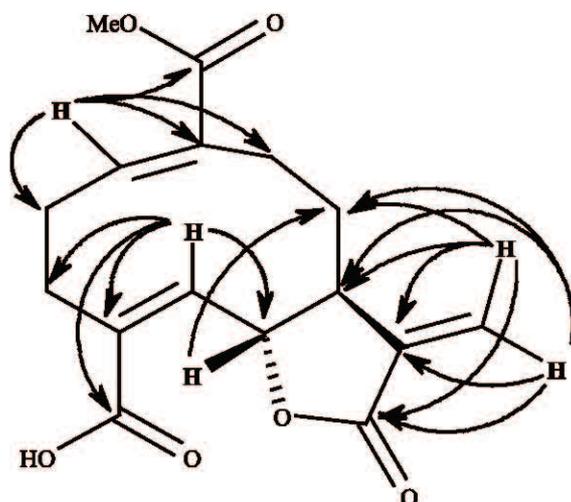


Figura 2. Algunas de las correlaciones observadas en el espectro gHMBC para el compuesto 1 aislado de *Perymenium grande*.

El compuesto 4 también fue aislado de esta planta en el estudio anterior y los datos espectrales confirman su estructura [8]. Comparando los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de 5 con 4 y 3 se puede deducir la presencia en 5 de un solo doble enlace (conjugado), a saber, entre C-1 y C-10, un carboxilato de metilo (C-14) y la lactona sesquiterpénica *trans* (11,13-dihidro). La esteoquímica relativa de los diferentes centros quirales fue deducida de las interacciones dipolares observadas del NOE. En la figura 3 se presenta la estructura de 5 de energía minimizada con el algoritmo de *Molecular Mechanics* (HyperchemTM 6.0), en la cual se indican las interacciones dipolares observadas del NOE, donde concuerdan todos los NOEs observados, de esta manera se puede asignar la esteoquímica relativa de todos los centros quirales partiendo de la configuración del sistema *trans* de la lactona. La asignación de las señales de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN fue realizada con la ayuda de los experimentos H,H-gCOSY, gHSQC y gHMBC, los cuales concuerdan con la estructura planteada.

Los eudesmanólidos 6, 7 y 8 son compuestos de estructura conocida y los datos espectrales son coincidentes con los ya publicados [10-12]. Sin embargo, la presencia de estas lactonas sesquiterpénicas, hasta ahora no habían sido aisladas para esta especie.

La reevaluación fotoquímica de *Perymenium grande* condujo al aislamiento de tres nuevos compuestos con posible actividad biológica, lo cual evidencia la importancia de los estudios fitoquímicos aún en especies ya estudiadas.

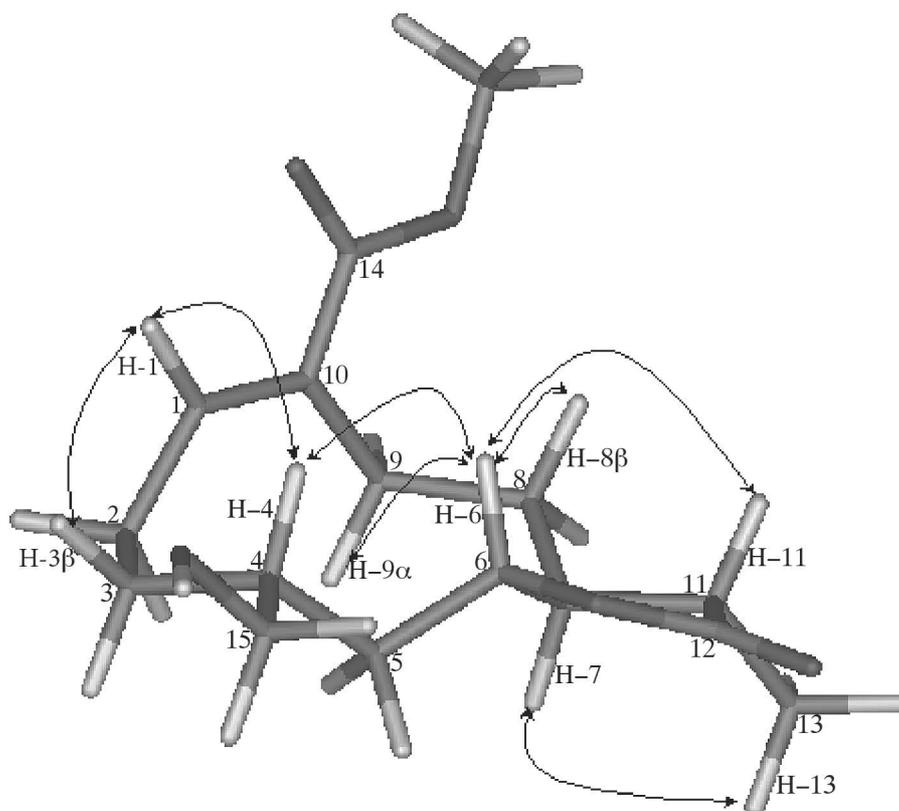


Figura 3. Estructura de energía minimizada utilizando el algoritmo *molecular mechanics* del programa *HyperchemTM 6.0* que muestra las interacciones dipolares observadas en el espectro NOE para el compuesto **5** aislado de *Perymenium grande*.

III. Materiales y métodos

General. ^1H -RMN (400 MHz), ^{13}C -NMR (100 MHz) y experimentos bidimensionales fueron medidos en CDCl_3 con TMS como estándar interno. Cromatografía de Columna (CC): gel de sílice 60 Merck 60-200 mesh. CC de presión media: gel de sílice 45 Mesh. CC fase reversa: octilo C-8 40 μm , J.T. Baker. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): cromatógrafo Knauer 6400, detector de refractómetro diferencial Knauer No. 37407 y columnas de fase reversa, Alltech, Econosil C-18, 10 μm , 250 mm x 22 mm y 250 mm x 10 mm. Cromatografía de Capa Fina (TLC-p) preparativa: gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck 25-50 mesh (20x20x0.1 cm, hasta 100 mg por cromatoplató). Cromatografía de capa fina (TLC): gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck 10-12 mesh (20x10x0.5 mm de ancho, hasta 20 mg por alufolio). Todas las separaciones fueron seguidas mediante TLC utilizando radiación UV (254 y 365 nm) y/o una disolución de permanganato de potasio como agente revelador.

Material vegetal. La planta se recolectó en febrero del 2002 las faldas del Volcán Rincón de la Vieja, Costa Rica. Un espécimen testigo fue depositado en el herbario Juvenal Valerio Rodríguez de la Universidad Nacional (código J.V.R. 10235).

Extracción y fraccionamiento. La parte aérea se secó a temperatura ambiente y se pulverizó. El material vegetal (1880 g) se maceró a temperatura ambiente con una mezcla de *t*-butilmetil éter y metanol en proporciones 9:1; obteniéndose un extracto que fue concentrado en un rotavapor a presión reducida para dar 24.0 g residuo. Este residuo fue sometido a una CC en gel de sílice eluyendo con porciones sucesivas (300 mL) de *n*-hexano – éter etílico (EE) (9:1, 8:2, 7:3, 1:1), EE, EE - MeOH (9:1, 8:2) y se obtuvo un total de siete fracciones.

La fracción 3, correspondiente a hexano – EE 8:2 (953 mg), se separó utilizando TLC-p (gel de sílice, 7:3 hexano:EE × 2) para dar 5 fracciones. La subfracción 3-3 ($R_f = 0.35$) fue purificada mediante TLC (gel de sílice, 85:25 hexano:EE × 2) para dar 8 (8 mg, $R_f = 0.51$).

La fracción 5 (4.66 g), obtenida de la elusión con EE, se sometió a CC de presión media (gel de sílice) eluyendo con un gradiente de hexano:EE (9:1) hasta EE:MeOH (8:2) para dar 9 fracciones. Se trabajó posteriormente con las subfracciones 5-4 y 5-5. La subfracción 5-4 (1.13 g) se trataba de una mezcla de dos compuestos. Se le practicó una separación inicial utilizando HPLC (C-18, 250 mm × 22 mm) con una fase móvil MeOH:H₂O 6:4 y un flujo de 4.0 mL/min para dar el compuesto principal puro 5 (312 mg, t_r : 22 min) y un compuesto impuro (t_r : 24 min) que fue purificado realizando una acetilación exhaustiva y una TLC (gel de sílice, 6:4 hexano:EE × 4) para dar 6 (13 mg, R_f : 0.34). La subfracción 5-5 (984 mg) también fue sometida a una separación con HPLC (C-18, 250 mm × 22 mm) con una fase móvil MeOH:H₂O 6:4 y un flujo de 4.0 mL/min, y se obtuvo una subfracción (t_r : 14 min) que fue sometida a una purificación utilizando TLC-p (gel de sílice, 45:4.5:1 CH₂Cl₂:C₆H₆:EE × 1) resultando el compuesto puro 4 (56 mg, R_f : 0.69).

Finalmente, la fracción 6, proveniente de la CC inicial correspondiente a EE: MeOH (9:1) (5.6 g), se separó con CC presión media con un gradiente de elusión de hexano:EE (9:1) hasta EE:MeOH (8:2), para dar ocho subfracciones de las cuales se trabajó con tres de ellas: 6-2, 6-6 y 6-7. La subfracción 6-2 (40 mg) se trató mediante TLC (gel de sílice, 4:4:2 CH₂Cl₂:EE:C₆H₆ × 2) para dar el compuesto 1 (13 mg, R_f : 0.53). La subfracción 6-6 (1230 mg) se sometió nuevamente a una CC de presión media, pero esta vez se utilizó un gradiente de elusión partiendo de 1:1 hexano:EE hasta 9:1 EE: MeOH, para obtener la subfracción 6-6-4 (94 mg) que fue purificada mediante TLC (gel de sílice, 4.5:4.5:1 CH₂Cl₂:EE:C₆H₆ × 6) para dar 2 (11 mg, R_f : 0.44) y 3 (18 mg, R_f : 0.35). La última subfracción 6-7 se purificó mediante TLC (gel de sílice, 1:1 CH₂Cl₂: EE × 2) para dar 7 (11 mg, R_f : 0.56).

Acetilación exhaustiva. A 100 mg del extracto se le adicionó 25 mL de anhídrido acético y 50 mg 4-dimetilaminopirridina (DMAP) y esta mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se adicionó la mezcla sobre 100 mL de agua con hielo, y se neutralizó con bicarbonato de sodio. A

esta mezcla acuosa se le realizaron tres extracciones con 3 x 15 mL de cloroformo. Se evaporó el cloroformo y se determinó la masa del extracto acetilado.

Compuestos aislados:

Ácido metil-1(10)Z-costunólido-14-éster de metilo-15-oico (1)

(10)Z-14,15-dihidroxicostunólido (2)

1(10)Z,11βH-11,13-dihidro-14,15-dihidroxicostunólido (3)

15-hidroxi-4βH-germacra-1(10)E,11(13)-dien-6α,12-ólido-14-éster de metilo (4)

15-hidroxi-4βH,11βH-germacra-1(10)E-en-6α,12-ólido-14-éster de metilo (5)

2-O-acetil-11,13-dihidroivalina (derivado acetilado) (6)

11,13-Dihidropinatifidina (7)

Isoalantolactona (8)

IV. Referencias

- [1] Melgar O de J P, *Efecto de tres frecuencias de corte y dos densidades de siembra sobre la producción de follaje de Taxiscobo (Perymenium grande)*. Memoria, II Seminario Centroamericano y del Caribe sobre Agroforestería y Rumiantes Menores. Editorial INA, San José, Costa Rica, 1993. pp 143-146.
- [2] Maldonado, E.; Bello, M.; Villaseñor, J.L.; Ortega, A., *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1115-1118
- [3] Maldonado, E.; Mancera, C.; Fiallega, G.; Ortega, G., *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1265-1267
- [4] Maldonado, E.; Mayorga, L.; Ortega, A., *Phytochemistry* **1985**, *24*, 495-499
- [5] Bohlmann, F.; Jakupovic, J. Schuster, A., *Phytochemistry* **1985**, *24*, 813-815
- [6] Maldonado, E.; Vaughan, J.; Ortega, A., *Phytochemistry* **1984**, *23*, 813-815
- [7] Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R.M.; Robinson, H., *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1185-1187
- [8] Stokes, S.; Castro, V.; Poveda, L.; Papasterigiou, F.; Jakupovic, J., *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2894-2896
- [9] Siedle, B.; García-Piñeres, A.; Murillo, R.; Schulte-Mönting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P.; Klaas, C.; Da Costa, F.; Kisiel, W.; Merfort, I., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6042-6054

- [10] Rustaiyan, A.; Saberi, M.; Habibi, Z.; Jakupovic, J., *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1929-1932
- [11] Fraga, B., *Nat. Prod. Report.* **2000**, *17*, 483-504
- [12] Zdero, C.; Bohlmann, F., *Phytochemistry* **1990**, *29*(1), 183-187
- [13] Otmar, S.; Norbert, H.; Vogler, B., *Phytochemistry* **1997**, *46*(8), 1369-1373

V. Agradecimiento

Agradecemos a la fundación *Volkswagen* por su apoyo económico.

VI. Apéndice

TABLA 1
DATOS DE $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) EN CDCl_3 DE LOS COMPUESTOS **1**, **3** Y **5** AISLADOS DE *Perymenium grande*.

	1	<i>J</i> (Hz)	3	<i>J</i> (Hz)	5	<i>J</i> (Hz)
1	6.63 <i>ddd</i>	10, 7.6, 2	5.42 <i>brdd</i>	8.8, 8.8	6.77 <i>dd</i>	10.8, 6.8
2-α	2.18-2.41 <i>m</i>		1.92-2.02 <i>m</i>		2.48 <i>dddd</i>	14, 11.2, 10.8, 2.4
2-β			2.05-2.15 <i>m</i>		2.24-2.33 <i>m</i>	
3-α	2.90 <i>ddd</i>	13, 6, 2.4	2.50 <i>ddd</i>	12, 6, 2	1.32-1.42 <i>m</i>	
3-β	1.87 <i>ddd</i>	13, 11, 2.4	1.71 <i>ddd</i>	12.8, 12, 2	1.78 <i>dddd</i>	10.8, 4.8, 2.8, 2.4
4					1.54-1.62 <i>m</i>	
5	5.78 <i>d</i>	10	5.01 <i>d</i>	10.4	1.70-1.81 <i>m</i>	
6	5.49 <i>dd</i>	10, 10	4.77 <i>dd</i>	10.4, 10	3.93 <i>ddd</i>	8.4, 4.8, 3.6
7	2.12-2.37 <i>m</i>		1.53-1.61 <i>m</i>		1.66-1.72 <i>m</i>	
8-α	2.54-2.63 <i>m</i>		2.12-2.16 <i>m</i>		2.21-2.28 <i>m</i>	
8-β	1.49-1.61 <i>m</i>		1.93-1.99 <i>m</i>		1.37-1.46 <i>m</i>	

TABLA 1 (CONT...)
DATOS DE $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) EN CDCl_3 DE LOS COMPUESTOS 1, 3 Y 5 AISLADOS DE *Perymenium grande*.

	1	<i>J</i> (Hz)	3	<i>J</i> (Hz)	5	<i>J</i> (Hz)
9- α	2.16-2.30	<i>m</i>			2.71	<i>ddd</i>
9- β	2.40-2.46	<i>m</i>	1.99-2.11	<i>m</i>	2.38	<i>ddd</i>
11			2.12-2.18	<i>m</i>	2.15	<i>dq</i>
13	5.42	<i>d</i>				
		3.2				
13'	6.12	<i>d</i>	1.16	<i>d</i>	1.21	<i>d</i>
		3.2		7.2		7.2
14			4.43	<i>d</i>		13.2
14'			4.13	<i>d</i>		13.2
13					1.21	<i>d</i>
						7.2
15			4.05	<i>d</i>	3.49	<i>dd</i>
						11, 6.4
15'			3.97	<i>d</i>	3.56	<i>dd</i>
						11, 6.4
OMe	3.68	<i>s</i>			3.75	<i>s</i>

J: constante de acoplamiento. *s*: singulete, *d*: doblete, *m*: multiplete, *dq*: doblete de cuartetos

TABLA 2
DATOS DE $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz) EN CDCl_3 DE LOS COMPUESTOS 1, 3 Y 5 AISLADOS DE *Perymenium grande*.

	1	3	5
1	139.4	<i>d</i>	125.8
2	26.9	<i>t</i>	26.2
3	32.4	<i>t</i>	33.7
4	132.0	<i>s</i>	139.6
5	141.6	<i>d</i>	127.8
6	79.7	<i>d</i>	79.0
7	46.0	<i>d</i>	49.2
8	24.4	<i>t</i>	25.5
9	22.9	<i>t</i>	23.6
10	134.4	<i>s</i>	140.8
11	138.6	<i>s</i>	41.5
12	170.0	<i>s</i>	178.5

TABLA 2 (CONT...)
 DATOS DE ^{13}C -NMR (100 MHz) EN CDCl_3 DE LOS COMPUESTOS **1**, **3** Y **5**
 AISLADOS DE *Perymenium grande*.

13	119.5 t	12.5 q	13.7 q
	1	2	3
14	168.0 s	66.8 t	167.9 s
15	171.1 s	61.0 t	67.4 t
OMe	51.9 q		51.8 q

s: singulete, *d*: doblete, *t*: triplete, *q*: cuarteto