



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS PRESENTES EN EXTRACTOS DE HOJAS MADURAS DE MYROSPERMUM FRUTESCENS

¹HÉCTOR E. MONTENEGRO M., ²DIANETH PINEDA

¹Universidad de Panamá; Departamento de Química Orgánica.
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología. Universidad de Panamá
hector.montenegro5@gmail.com

²Universidad de Panamá; Departamento de Química Orgánica.
Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología. Trabajo de graduación.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de un triterpeno y cuatro diterpenos de tipo cassano a partir del fraccionamiento del extracto de AcOEt/CH₃OH de hojas maduras de *Myrospermum frutescens*. El estudio de los valores espectroscópicos de IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT 135 y experimentos de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) permitieron establecer las estructuras de los compuestos: Estigmasterol (1), 6β-hidroxi-18-acetoxycassano-13,15-dieno (2), 6β,-18-dihidroxycassano-13,15-dieno (3), 6β,13-dihidroxi-18-acetoxi-cassano-15,16-dieno (4) y 6β,18,17-trihidroxycassano-13,15-dieno (5).

PALABRAS CLAVES

Triterpeno, diterpeno, *Myrospermum frutescens*, cassano.

INTRODUCCIÓN

Las plantas continúan siendo una fuente importante de nuevas entidades químicas. Por ello, durante las últimas décadas, se ha

practicado la bioprospección, que implica "la búsqueda sistemática de compuestos naturales, diseños genéticos y organismos completos en la vida silvestre con potencial para el desarrollo de productos" (Mateo *et al.*, 2001).

Los grupos que desarrollan actividades de investigación en bioprospección trabajan y publican sobre una gran variedad de temas; uno de ellos son los dirigidos hacia fases primarias del proceso bioprospectivo como la identificación y caracterización de principios que se podrían considerar bioactivos (actividad antiparasitaria, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, producción de fitoalexinas, actividad citotóxica, actividad antifúngica, actividad antibacteriana y actividad antitumoral) (Duarte, 2009).

Entre estas investigaciones se encuentran los trabajos realizados en el laboratorio de Biorgánica Tropical de la Universidad de Panamá, cuyo enfoque fue el aislamiento e identificación de compuestos terpénicos con posible bioactividad contra enfermedades parasitarias tales como la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis a partir de extractos orgánicos de *Myrospermum frutescens* (Torres *et al.*, 2003), (Torres *et al.*, 2004).

Entre los compuestos aislados a partir de esta planta se encuentran 18-hidroxicassao-13,15-dieno y 6 β ,18-dihidroxicassano-13,15-dieno los cuales fueron sometidos a un programa de diseño de fármacos para identificar nuevos anti-tripanosomales. Los estudios de acoplamiento de los 110 metabolitos de plantas seleccionados contra *Trypanosoma cruzi* trypanotion reductasa (TcTR), revelaron que los compuestos antes mencionados se encuentran entre los cuatro inhibidores más potentes y que cumplen con los requisitos farmacofóricos según lo predicho por Pharmagist. Lo que contribuye así a nuevas vías de investigación que podrían mejorar el éxito terapéutico relacionado con la enfermedad de Chagas. (Sahay Sharma, 2015).

Dados los interesantes resultados obtenidos en previas investigaciones de esta planta y siendo los terpenoides los productos naturales más abundantes y estructuralmente diversos, que han mostrado múltiples propiedades bioactivas, se ha realizado en el presente trabajo el aislamiento e identificación de 5 compuestos terpenoides a partir de un extracto de acetato de etilo/metanol de las hojas maduras de *Myrospermum frutescens* (Figura 1).

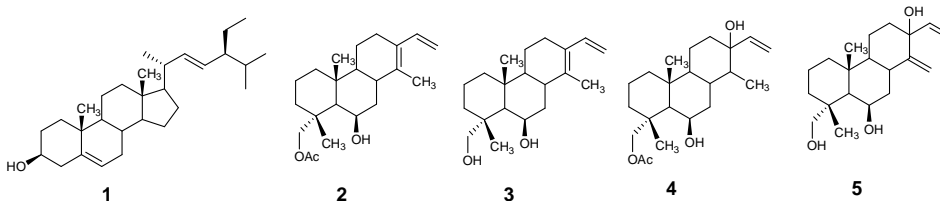


Figura 1. Estructuras de los terpenos aislados de hojas maduras de *Myruperмум frutescens*.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección

Las hojas maduras de *Myrospermum frutescens* se colectaron en el Monumento Natural de Barro Colorado, en el Lago Gatún, Panamá, en mayo de 2014 y se encuentra en el herbario de la Universidad de Panamá, bajo los números PMA 50913 y PMA 48733.

Extracción

Se colectaron 2.0 kg de hojas maduras, se trituraron y se extrajeron con metanol y posteriormente con acetato de etilo en fracciones de 30 g. El extracto se filtro y se evaporó a sequedad a 36 °C.

Aislamiento y purificación del triterpeno.

Se hizo fraccionamiento de 15.0 g de extracto crudo (AcOEt/CH₃OH) por cromatografía de columna corta (CCG), sobre gel de sílice y se eluyó por gravedad con un gradiente de polaridad utilizando mezclas de *n*-hexano, éter de petróleo, acetato de etilo y metanol de diferente polaridad, obteniéndose ocho fracciones. La fracción 7 (284 mg), obtenida de la columna anterior se separó por CCG, sobre gel de sílice y se desarrolló mediante gradiente, utilizando mezclas de *n*-hexano y acetato de etilo, obteniéndose un total de doce fracciones. La fracción 7 (197 mg), de la columna anterior se separó por CCG utilizando las mismas condiciones, obteniéndose un total de once fracciones. De esta separación se obtuvieron 16.5 mg de la fracción 4 que corresponde al compuesto (1) el cual fue caracterizado por RMN.

Aislamiento y purificación de los diterpenos de tipo cassano

Columna 1: Se hizo la separación de 17.5 g de extracto crudo (metanol/acetato de etilo), utilizando cromatografía líquida al vacío (CLV), en un sistema compuesto por un embudo de vidrio fritado (grado de porosidad: medio) provisto con papel filtro y en el cual posteriormente se depositó gel de sílice y se eluyó con gradiente, utilizando mezclas de diclorometano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose un total de siete fracciones.

Columna 2: La fracción 2 (3.5 g), obtenida de la columna 1, se separó mediante CCG y se desarrolló mediante elución con gradiente, utilizando mezclas de diclorometano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose un total de quince fracciones. Las fracciones 6 (531 mg) y 11 (403 mg), presentaron señales características de diterpenos por $^1\text{H-RMN}$ y se trabajaron posteriormente.

Columna 3: Se realizó la separación de la fracción 6 (531 mg), de la columna 2, por CCG y se desarrolló mediante la técnica de elución con gradiente, utilizando mezclas de *n-hexano*, acetato de etilo y metanol, obteniéndose un total de cinco fracciones. Las fracciones 2 y 4 presentaron señales características de diterpenos por $^1\text{H-RMN}$ y se trabajaron posteriormente.

Columna 4: Se realizó la purificación de las fracciones 2 (531 mg) y 4 (73 mg), de la columna 3 utilizando las mismas condiciones, obteniéndose cinco fracciones. La separación de la fracción 2 (117 mg) obtenida de la columna anterior, y utilizando las mismas condiciones, proporcionó 61 mg de la fracción 3 que corresponde al compuesto (**2**), el cual fue caracterizado por RMN.

La fracción 11 de la columna 2 con masa de 403 mg fue separada mediante CCG utilizando las mismas condiciones, obteniéndose cinco fracciones. La purificación de la fracción 2 (160 mg) de la columna anterior, se realizó mediante CCG y bajo las mismas condiciones, proporcionando 103 mg de la fracción 5 que corresponde al compuesto (**3**), la cual fue caracterizada por RMN.

La fracción 4 (73 mg), de la columna 3, fue separada mediante CCG, utilizando las mismas condiciones, obteniéndose cuatro fracciones. La fracción 3 (17 mg), de la columna anterior, se purificó mediante CCG, bajo las mismas condiciones, la cual proporcionó 4.9 mg de la fracción 2 que corresponde al compuesto (**4**) el cual fue caracterizado por RMN.

Aislamiento y purificación del diterpeno 5

Se realizó el fraccionamiento de 17.0 g adicionales de extracto crudo mediante CLV, y se eluyó con gradiente, utilizando mezclas de diclorometano, acetato de etilo y metanol, obteniéndose siete fracciones. La separación de la fracción 2 (2.7 g) de la columna CLV, mediante CCG y utilizando las mismas condiciones de la columna anterior, llevando a la obtención de doce fracciones. La fracción 7 (367 mg) de la columna anterior se separó por CCG, utilizando las mismas condiciones, llevando a la obtención de diez fracciones. La fracción 8 (53 mg) de la columna anterior, se separó mediante CCG, utilizando elución con gradiente, utilizando mezclas de *n*-hexano, acetato de etilo y metanol, llevando a la obtención de tres fracciones. La fracción 2 de la columna anterior se purificó mediante CCG, utilizando las mismas condiciones. Este proceso proporcionó 23 mg de una fracción que corresponde al compuesto (5) el cual fue caracterizado por RMN.

Todas las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas se analizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF), se revelaron con p-anisaldehído y se reunieron por la similitud en su factor (R_f) mostrado en el análisis en CCF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto 1 presentó en el espectro infrarrojo bandas de absorción a 3547,41 cm^{-1} y 2960.78 cm^{-1} , que indican la presencia de grupo -OH y estructura de olefina cíclica -HC=CH-, respectivamente. Mientras la banda de absorción en 1504.47 cm^{-1} es característica de estiramiento C=C. El espectro ^1H -RMN presentó dos singuletes en 0.69 ppm y 1.01 ppm con integración para tres hidrógenos para cada singulete, un doblete en 0.78 ppm con integración para seis hidrógenos ($J = 7.2$ Hz), un doblete en 1.01 ppm con integración para tres hidrógenos ($J = 7.6$ Hz) y un triplete en 0.83 ppm con integración para tres hidrógenos ($J = 6.0$ Hz). De la misma manera, mostró dos dobletes a 5.00 ($J = 15.2$ y 8.8 Hz) y 5.14 ppm ($J = 15.2$ y 8.8 Hz) con integración para un hidrógeno y un triplete en 5.34 ppm ($J = 5.2$ Hz) con integración para un hidrógeno que sugiere la presencia de tres protones olefínicos en la molécula. Se observó también un triplete doblete a 3.52 ppm ($J = 4.8, 4.4$ y 3.6 Hz) con integración para un hidrógeno, característicos de un protón conectado a un carbono que está unido a un grupo hidroxilo.

El espectro ^{13}C -RMN mostró señales para 29 carbonos en los que se confirmó la presencia de carbonos metilos angulares a 12.26 y 19.40 ppm. También se observaron las señales en 140.76, 138.34, 129.27 y 121.73 ppm indicativas de enlaces dobles; y la señal correspondiente a carbono unido a grupo hidroxilo a 71.82 ppm. Estos datos fueron confirmados mediante experimentos DEPT 135 donde se observó señales para 26 carbonos distribuidos de la siguiente forma: seis carbonos metilos, nueve carbonos metilénicos y diez carbonos metínicos. La confirmación de la estructura se realizó a través de los espectros bidimensionales HSQC y HMBC y por comparación con los datos reportados en la literatura (Tabla 1) (Chaturvedula y Prakash, 2012). Se determinó la estructura del compuesto (**1**), como Estigmasterol (Figura 1).

Para el compuesto **2**, se observó en el espectro IR bandas de absorción a 3500.00 cm^{-1} y 1735.00 cm^{-1} , que indican la presencia de grupo -OH y del grupo carbonilo del éster R-C-O-O-R, respectivamente. Además, presentó una banda de absorción en 2900.00 cm^{-1} debido a la frecuencia de estiramiento de C-H saturado; la banda de absorción débil en 1642.00 cm^{-1} sugiere la presencia del estiramiento del enlace doble C=C conjugado y la banda de absorción intensa en 1220.00 cm^{-1} es característica del estiramiento del enlace sencillo C-O lo que evidencia la presencia de un grupo éster en la molécula.

El espectro ^1H -RMN presentó un singulete en 1.19 ppm con integración para tres hidrógenos, un singulete en 1.25 ppm con integración para tres hidrógenos, un singulete en 1.75 ppm con integración para tres hidrógenos, indicativo de un grupo metilo unido a un alqueno y un singulete en 2.04 ppm con integración para tres hidrógenos que sugiere un grupo metilo adyacente a un grupo carbonilo. Los dobletes en 3.70 ($J = 10.8\text{ Hz}$) y 4.02 ppm ($J = 11.2\text{ Hz}$) con integración para un hidrógeno son indicativos de protones díaxiales tereotópicos de metileno enlazado a oxígeno.

El doblete en 4.29 ppm ($J = 2.4\text{ Hz}$) con integración para un hidrógeno sugiere un protón enlazado a un carbono que tiene un grupo -OH y las señales de un doblete en 6.81 ppm ($J = 11.2$ y 17.6 Hz), y dos dobletes con integración para un hidrógeno en 4.96 ppm ($J = 11.2\text{ Hz}$) y 5.12 ppm ($J = 17.2\text{ Hz}$), son características de un grupo vinilo.

El espectro ^{13}C -RMN mostró señales para 22 carbonos en los que se confirmó la presencia de carbonos de metilo a 15.89, 17.10 y 19.62 ppm. De manera similar, el desplazamiento químico del carbono del metilo en 20.89 ppm corres-

ponde a un átomo de carbono enlazado a un grupo carbonilo. También se observaron las señales en 136.41, 135.46, 129.26 y 110.74 ppm indicativas de enlaces dobles en la molécula. Además, de la señal en 171.42 ppm que corresponde a carbono de grupo carbonilo C=O, una señal en 67.61 ppm para un átomo carbono enlazado a hidroxilo -OH y la señal en 72.86 ppm correspondiente a un carbono de metileno adyacente a un átomo de oxígeno (-CH₂-O-). Los valores de ¹H-RMN y ¹³C-RMN para todos los protones y carbonos se asignaron sobre la base de las correlaciones HSQC y HMBC presentados en la Tablas 2 y 3. Los datos espectroscópicos nos permitieron establecer por comparación con los datos reportados en la literatura, la estructura del compuesto (2), asignado como 6β-hidroxi-18-acetoxicassano-13,15-dieno (Figura 1) (Torres et al., 2003).

Tabla 1. Valores de desplazamientos químicos ¹H y ¹³C RMN para el compuesto (1).

Posición	Valor experimental		Valor reportado*	
	¹ H (δ _H ppm, mult. J/Hz)	¹³ C	¹ H (δ _H ppm, mult. J/Hz)	¹³ C
1		37.26		37.6
2		31.66		32.1
3	3.52 (tdd, 1H, 4.8, 4.4 y 3.6)	71.82	3.51 (tdd, 1H, 4.5, 4.2 y 3.8)	72.1
4		42.31		42.4
5		140.76		141.1
6	5.34 (t, 1H, 5.2)	121.73	5.31 (t, 1H, 6.1)	121.8
7		31.66		31.8
8		31.89		31.8
9		50.15		50.2
10		36.52		36.6
11		21.07		21.5
12		39.68		39.9
13		42.22		42.4
14		56.87		56.8
15		24.37		24.4
16		28.93		29.3
17		55.95		56.2
18	1.01 (s, 3H)	12.26	1.03 (s, 3H)	12.2
19	0.69 (s, 3H)	19.40	0.71 (s, 3H, 6.2)	18.9
20		40.51		40.6
21	0.78 (d, 3H, 7.2)	21.10	0.91 (s, 3H, 6.2)	21.7
22	5.00 (dd, 1H, 15.2, 8.8)	138.34	4.98 (m, 1H)	138.7
23	5.14 (dd, 1H, 15.2, 8.8)	129.27	5.14 (m, 1H)	129.6
24		51.24		46.1
24a		25.42		25.4
24b	0.83 (t, 3H, 6.0)	12.05	0.83 (t, 3H, 7.1)	12.1
25		31.89		29.6
26	1.01 (d, 3H, 7.6)	21.22	0.82 (d, 3H, 6.6)	20.2
27	0.78 (d, 3H, 7.2)	18.98	0.80 (d, 3H, 6.6)	19.8

Los espectros se registraron en CDCl₃, 300 MHz a 27 °C, utilizando TMS como referencia interna (δ en ppm). *Chaturvedula, V. S. P., Prakash, I. 2012

Para el compuesto **3**, en el espectro IR se observó una banda de absorción a 3450.00 cm^{-1} que indica la presencia de grupo $-\text{OH}$, una banda de absorción en 2900.00 cm^{-1} debido a la frecuencia de estiramiento de C-H saturado y una banda de absorción débil en 1620.00 cm^{-1} que sugiere la presencia del estiramiento del enlace doble C=C conjugado en la molécula.

Tabla 2. Valores de desplazamientos químicos ^1H -RMN para los compuestos **2** - **5**.

Posición	2	3	4	5
	^1H (δ_{H} ppm, mult. J/Hz)	^1H (δ_{H} ppm, mult. J/Hz)	^1H (δ_{H} ppm, mult. J/Hz)	^1H (δ_{H} ppm, mult. J/Hz)
1				
2				
3				
4				
5				
6	4.29(d, 1H, 2.4)	4.42(d, 1H, 2.4)	4.35(d, 1H, 2.0)	4.46 ppm (d, 1H, 1.2)
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13			4.84(d, 1H, 1.2)	
14				
15	6.81(dd, 1H, 11.2, 17.6)	6.77(dd, 1H, 11.2, 17.6)	6.06(dd, 1H, 10.8, 17.6)	5.78(dd, 1H, 14.0, 23.2)
16	4.96(d, 1H, 11.2) 5.12(d, 1H, 17.2)	4.94(d, 1H, 11.2) 5.09(d, 1H, 17.6)	5.20(dd, 1H, 0.8, 10.4) 5.26(dd, 1H, 2.0, 16.0)	5.35(dd, 1H, 1.2, 23.2) 5.45(dd, 1H, 1.2, 14.0)
17	1.75(s, 3H)	1.75(s, 3H)	1.22(s, 3H)	4.94(d, 1H, 1.6) 5.22(d, 1H, 1.6)
18	3.70(d, 1H, 10.8) 4.02(d, 1H, 11.2)	3.23(d, 1H, 10.8) 3.54(d, 1H, 10.8)	3.69(d, 1H, 11.2) 4.03(d, 1H, 11.2)	3.19(d, 1H, 14.8) 3.56(d, 1H, 14.4)
19	1.25(s, 3H)	1.19(s, 3H)	1.25(s, 3H)	1.18(s, 3H)
20	1.19(s, 3H)	1.18(s, 3H)	1.25(s, 3H)	1.18(s, 3H)
CH ₃ CO-18	2.04(s, 3H)			
CO-18				

Los espectros se registraron en CDCl_3 , 300 MHz a $27\text{ }^\circ\text{C}$, utilizando TMS como referencia interna (δ en ppm.). *Torres, D., Ureña, L., Ortega, E., Capson, T. y Cubilla, L., 2003.

El espectro ^1H -RMN presentó un singulete en 1.18 ppm con integración para tres hidrógenos, un singulete en 1.19 ppm con integración para tres hidrógenos y un singulete en 1.75 ppm con integración para tres hidrógenos, indicativo de un grupo metilo unido a un alqueno.

Los dobletes en 3.23 ($J = 10.8$ Hz) y 3.54 ppm ($J = 10.8$ Hz), con integración para un hidrógeno son indicativos de protones diastereotópicos de metileno enlazado a oxígeno. El doblete en 4.42 ppm ($J = 2.4$ Hz) con integración para un hidrógeno, sugiere un protón enlazado a un carbono que tiene un grupo -OH y las señales de un doblete en 6.77 ppm ($J = 17.6$ y 11.2 Hz) con integración para un hidrógeno y dos dobletes con integración para un hidrógeno en 4.94 ppm ($J = 11.2$ Hz) y 5.09 ppm ($J = 17.6$ Hz) son características de un grupo vinilo.

El espectro ^{13}C -RMN mostró señales para 20 carbonos en los que se confirmó la presencia de carbonos de metilo a 16.15, 17.36 y 20.03 ppm. También se observó las señales en 136.55, 135.67, 129.49 y 110.83 ppm indicativas de enlaces dobles en la molécula. Además, de la señal en 68.55 ppm que corresponden a un átomo carbono enlazado a un hidroxilo -OH y la señal en 72.83 ppm correspondiente a un carbono de metileno adyacente a un átomo de oxígeno (-CH₂-O-).

Los valores de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para todos los protones y carbonos se asignaron sobre la base de las correlaciones HSQC y HMBC y son presentados en la Tablas 2 y 3. El estudio de los datos espectroscópicos nos permitieron establecer por comparación con los datos reportados en la literatura, la estructura del compuesto (3), asignado como 6 β , -18-dihidroxicassano-13,15-dieno. (Figura 1) (Torres *et al.*, 2003).

Para el compuesto 4, en el espectro IR se observaron bandas de absorción a 3300.00 cm⁻¹ y 1735.00 cm⁻¹, que indican la presencia de grupo -OH y del grupo carbonilo del éster R-C-O-O-R, respectivamente. Además, presento una banda de absorción en 2920.00 cm⁻¹ debido a la frecuencia de estiramiento de C-H saturado y la banda de absorción débil en 1050.00 cm⁻¹ característica del estiramiento del enlace sencillo C-O lo que evidencia la presencia de un grupo éster en la molécula.

Tabla 3. Valores de desplazamientos químicos ^{13}C -RMN para los compuestos 2 - 5.

Posición	2	3	4	5
	^{13}C (δ_{C} ppm)	^{13}C (δ_{C} ppm)	^{13}C (δ_{C} ppm)	^{13}C (δ_{C} ppm)
1	40.76	40.81	37.59	38.52
2	18.28	18.65	18.26	20.05
3	37.82	38.69	35.65	37.43
4	37.09	36.26	37.09	37.60
5	51.15	51.55	49.25	50.11
6	67.61	68.55	67.56	67.58
7	40.42	40.69	41.34	39.59
8	36.01	37.85	34.81	34.09
9	54.59	54.70	49.95	41.50
10	37.18	37.27	37.23	29.70
11	21.21	21.41	18.93	18.44
12	26.40	26.57	33.29	33.61
13	129.26	129.49	74.91	86.92
14	136.31	136.55	40.42	151.16
15	135.46	135.67	143.26	138.49
16	110.74	110.83	113.70	120.62
17	15.89	16.15	17.97	106.60
18	72.86	72.83	72.84	72.52
19	19.62	20.03	20.99	21.34
20	17.10	17.36	19.91	17.76
CH ₃ CO-18	20.89		21.14	
CO-18	171.42		171.46	

Los espectros se registraron en CDCl_3 , 300 MHz a 27 °C, utilizando TMS como referencia interna (δ en ppm.). *Torres, D., Ureña, L., Ortega, E., Capson, T. y Cubilla, L., 2003.

El espectro ^1H -RMN presentó un singulete en 1.22 ppm con integración para tres hidrógenos, un singulete en 1.25 ppm con integración para seis hidrógenos y un singulete en 2.07 ppm con integración para tres hidrógenos que sugiere un grupo metilo adyacente a un grupo carbonilo.

Los dobletes en 3.69 ($J = 11.2$ Hz) y 4.03 ppm ($J = 11.2$ Hz) con integración para un hidrógeno son indicativos de protones diastereotópicos de metileno enlazado a oxígeno. Los dobletes en 4.35 ($J = 2$ Hz) y 4.84 ppm ($J = 1.2$ Hz) con integración para un hidrógeno sugiere dos protones de carbonos unidos a grupo $-\text{OH}$ en la molécula. Los tres grupos de señales de doblete con integración para un hidrógeno en 5.20 ($J = 0.8$ y 10.4 Hz), 5.26 ($J = 2.0$ y 16.0 Hz) y 6.06 ppm ($J = 10.8$ y 17.6 Hz) son características de un doble enlace terminal que presenta sistema de tres espines de segundo orden, ABX.

El espectro ^{13}C -RMN mostró señales para 22 carbonos en los que se confirmó la presencia de carbonos de metilo a 18.11, 18.39 y 20.06 ppm. De manera similar, el desplazamiento químico del carbono del metilo en 21.14 ppm corresponde a un átomo de carbono enlazado a un grupo carbonilo. También se observaron las señales en 143.45 y 113.90 ppm indicativas de enlaces dobles en la molécula. Además, de la señal en 171.46 ppm que corresponde a carbono de grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$, dos señales en 67.71 y 75.05 ppm para dos átomos de carbono enlazados a hidroxilo $-\text{OH}$ y la señal en 72.97 ppm correspondiente a un carbono de metileno adyacente a un átomo de oxígeno ($-\text{CH}_2-\text{O}-$).

Estos datos fueron confirmados mediante experimentos DEPT-135 donde se observó señales para 17 carbonos distribuidos de la siguiente forma: cuatro carbonos metilos, ocho carbonos metilénicos y cinco carbonos metínicos.

El espectro HSQC mostró la correlación del protón en 6.06 ppm (H-15) con el carbono en 143.26 ppm (C-15), la correlación de los protones del metileno en 5.02 y 5.26 ppm (H-16) con el carbono en 113.70 ppm (C-16) que permite la asignación del doble enlace. También presentó la correlación del protón en 4.35 ppm (H-6) con el carbono en 67.56 ppm (C-6). De igual forma presentó la correlación de los protones metilénicos en 3.69 y 4.03 ppm (H-18) con el carbono en 72.84 ppm (C-18) y la correlación de los protones en 2.07 ppm (H-22) con el carbono en 21.66 ppm (C-22). Además, de la correlación de los protones de metilo en 1.22 ppm (H-17) con el carbono en 17.97 ppm (C-17) (Figura 2a).

El espectro HMBC presentó la correlación de los protones en 6.06 (H-15), 5.20 (H-16) y 5.26 ppm (H-16) con el carbono en 74.91 ppm (C-13). Se observaron también la correlaciones de los protones en 5.20 (H-16) y 5.26 ppm (H-16) con el carbono en 143.26 ppm (C-15). De manera similar se observó la correlación del protón en 4.35 ppm (H-6) con los carbonos en 37.09 (C-4) y 37.23 ppm (C-10). Por otro lado, mostró la correlación de los protones

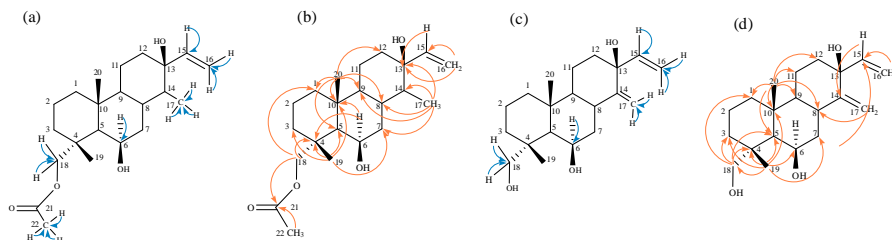


Figura 2. Correlaciones presentadas en los experimentos HSQC (a), HMBC (b) para el compuesto 4, HSQC (c), HMBC (d) para el compuesto 5.

metilénicos en 3.69 (H-18) y 4.03 ppm (H-18) con los carbonos en 37.09 (C-4), 37.59 (C-1), y 171.30 ppm (C-21) (Figura 2b).

Los valores de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para todos los protones y carbonos se asignaron sobre la base de las correlaciones HSQC y HMBC y son presentados en la Tabla 2 y 3.

El estudio de los valores espectroscópicos de IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT 135 y experimentos de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) permitieron establecer la estructura del compuesto (4), asignado como 6 β ,13-dihidroxi-18-acetoxi-cassano-15 en (Figura 1). Para este caso, no se ha encontrado concordancia con los valores reportados por estudios previos realizados a esta planta es por ello que adjudicamos el aislamiento de este nuevo compuesto a *Myrospermum frutescens*.

Para el compuesto 5 en el espectro IR se observó una banda de absorción a 3400.00 cm^{-1} que indica la presencia de grupo -OH, una banda de absorción en 2900.00 cm^{-1} debido a la frecuencia de estiramiento de C-H saturado y una banda de absorción en 1700.00 cm^{-1} que sugiere la presencia del estiramiento del enlace doble C=C.

El espectro ^1H -RMN presentó un singulete en 1.18 ppm con integración para seis hidrógenos. Los dobletes en 3.19 ppm ($J = 14.8\text{ Hz}$) y 3.56 ppm ($J = 14.4\text{ Hz}$) con integración para un hidrógeno son indicativos de protones diastereotópicos de metileno enlazado a un carbono que tiene oxígeno. Por otra parte, el doblete en 4.46 ppm ($J = 1.2\text{ Hz}$) con integración para un hidrógeno es característico de un protón unido a un carbono que se encuentra enlazado a un oxígeno.

Los dobletes en 4.94 ($J = 1.6\text{ Hz}$) y 5.22 ppm ($J = 1.6\text{ Hz}$) con integración para un hidrógeno son característicos de un doble enlace terminal que presenta sistema AB.

Los tres grupos de señales de doblete con integración para un hidrógeno en 5.35 ppm ($J = 1.2\text{ y }23.2\text{ Hz}$), 5.45 ppm ($J = 1.2\text{ y }14.0\text{ Hz}$) y 5.78 ppm ($J = 14.0\text{ y }23.2\text{ Hz}$) son características de un doble enlace terminal que presenta sistema de tres espines de segundo orden, ABX.

El espectro ^{13}C -RMN mostró señales para 20 carbonos en los que se confirmó la presencia de carbonos de metilo a 17.76 y 21.34 ppm. También se observaron

las señales en 106.60, 120.62, 138.49 y 151.16 ppm indicativas de enlaces dobles en la molécula. Además, de la señales en 67.58 y 72.52 ppm que corresponden a un carbono de metino y metilo enlazado a un grupo hidroxilo –OH, respectivamente. Análogamente, se observó la señal en 86.92 ppm correspondiente a un carbono cuaternario unido a un grupo hidroxilo.

El espectro HSQC mostró la correlación del protón en 4.46 ppm (H-6) con el carbono en 67.58 ppm (C-6), la correlación de los protones del metileno en 5.35 y 5.45 ppm (H-16) con el carbono en 120.62 ppm (C-16) y la correlación del protón en 5.78 ppm (H-15) con el carbono en 138.49 ppm (C-15) que permite la asignación de un doble enlace. De igual forma presentó la correlación de los protones en 4.94 y 5.22 ppm (H-17) con el carbono en 106.60 ppm (C-17) que permite la asignación de un segundo doble enlace. También se observó la correlación de los protones de metileno en 3.19 y 3.56 ppm (H-18) con el carbono en 72.52 ppm (C-18) y la correlación de los protones en 1.18 ppm (H-19 y H-20) con los carbonos en 17.76 y 21.34 ppm (C-20 y C-19) que indican la presencia de dos grupos metilo (Figura 2c).

El espectro HMBC presentó la correlación de los protones en 4.94 y 5.22 ppm (H-17) con los carbonos en 34.09 (C-8) y 138.49 ppm (C-15). De manera similar se observó la correlación del protón en 5.78 ppm (H-15) con el carbono en 151.16 ppm (C-14).

Por otro lado, mostró la correlación de los protones metilénicos en 3.19 (H-18) y 3.56 ppm (H-18) con los carbonos en 38.52 (C-1), 37.43 (C-3), 37.60 (C-4) y 50.10 ppm (C-5). También se pudo determinar la correlación de los protones en 5.35 (H-16) y 5.45 (H-16) con el carbono en 138.49 ppm (C-15) (Figura 2d).

Los valores de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ para todos los protones y carbonos se asignaron sobre la base de las correlaciones HSQC y HMBC y son presentados en la Tabla 2 y 3.

El estudio de los valores espectroscópicos de IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ y experimentos de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) permitieron establecer la estructura del compuesto (5), asignado como 6 β ,13,17-trihidroxicassano-14,(17)15-dieno (Figura 1). Para este caso, no se ha encontrado concordancia con los valores reportados por estudios previos realizados a ésta planta es por ello que adjudicamos el aislamiento de este nuevo compuesto a *Myrospermum frutescens* (Torres *et al.*, 2003), (Torres *et al.*, 2004).

CONCLUSIÓN

El estudio del extracto crudo de acetato de etilo/metanol de hojas maduras de *Myrospermum frutescens* condujo al aislamiento de cinco compuestos, de los cuales, el compuesto (**1**) es un triterpeno identificado como estigmasterol, y los cuatro restantes, corresponden al grupo de diterpenos tipo cassano; dos de ellos, (**2** y **3**), han sido reportados previamente en la literatura y los otros dos, (**4** y **5**) no registran valores que indiquen concordancia con los reportados en estudios previos realizados a *Myrospermum frutescens*.

SUMMARY

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF TERPENES PRESENT IN EXTRACTS OF MATURE LEAVES OF MYROSPERMUM FRUTESCENS

The isolation of a triterpene and four diterpenes of the cassano type was performed from the fractionation of the AcOEt / CH₃OH extract of mature leaves of *Myrospermum frutescens*. The study of the spectroscopic values of IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT 135 and heteronuclear correlation experiments (HSQC and HMBC) allowed us to establish the structures of the compounds: Stigmasterol (1), 6β-hidroxi-18-acetoxicassano-13,15-dieno (2), 6β, -18-dihidroxicassano-13,15-dieno (3), 6β,13-dihidroxi-18-acetoxi-cassano-15, en (4) and 6β, 13, 18-trihidroxicassano-13,15-dieno (5).

KEYWORDS

Triterpene, diterpen, *Myrospermum frutescens*, cassano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CHATURVEDULA, V. S. P., PRAKASH, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β-Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubussuavissimus*, **International Current Pharmaceutical Journal**, 1, (9): 9-242.
- DUARTE, O. T. (2009). La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. **Ciência da Informação**, 38, (3): 96-110.
- MATEO, N., NADER, W., TAMAYO, G.2001. **Bioprospecting in Encyclopedia of biodiversity**, Vol. 1. Academic Press, New York. 471 pp.

- SAHA, D. SHARMA, A. 2015. Docking-based screening of natural product database in quest for dual site inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase (TcTR) **Medicinal Chemistry Research**, 24 (1): 316-333.
- TORRES, D., UREÑA, L., ORTEGA, E., CAPSON, T. & CUBILLA, L. 2003. Five New Cassane Diterpenes from *Myrospermumfrutescens* with Activity against Trypanosoma cruzi. **Journal of Natural Products**, 66: 928-932.
- TORRES, D., UREÑA, L., ORTEGA, E., CAPSON, T., COLEY, P., KURSAR, T., MACPHAIL, K., & CUBILLA, L. 2004. Novel Cassane and Cleistanthane Diterpenes from *Myrospermumfrutescens*: Absolute Stereochemistry of the Cassane Diterpene Series. **Journal of Natural Products**, 67: 1711-1715.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Laboratorio de Bioorgánica Tropical de la Universidad de Panamá y a SENACYT por el financiamiento de esta investigación.

Recibido: 9 de mayo 2018.

Aceptado: diciembre 2018.