

ESTUDIO QUÍMICO ANALÍTICO DE LA FRACCIÓN ALCALÓIDICA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Croton baillonianus* (AUBL)

César M. Fuertes R.^{a*}, Angelyne Benavides^b, Cosimo Pizza^b, Asunta Napolitano^b,
Carla Basarello^b, Sonia Piacente^b, Virginia Carbone^c

RESUMEN

El objetivo del presente estudio ha sido extraer y aislar los alcaloides de las hojas de *Croton baillonianus*, desde el extracto metanólico, mediante cromatografía de exclusión, con Sephadex LH-20 seguida de una purificación en cromatografía líquida de alta performance (HPLC); se aislaron no menos de seis alcaloides. Dos alcaloides de baja polaridad y dos alcaloides en la forma de glicósidos fueron analizados por espectrometría de masa de impacto electrónico (ESI-MS); estos alcaloides pertenecen al tipo bencilisoquinolínico. El estudio tiene conexión con la determinación de sus propiedades como antioxidante, antiulcerosa y citotóxica.

Palabras clave: Sephadex, alcaloides, cromatografía de exclusión, espectrometría de masa, impacto electrónico.

ANALYTICAL CHEMICAL STUDY OF ALKALOYD FRACTION OF METHANOLIC EXTRACT OF *Croton baillonianus* (AUBL) LEAVES

SUMMARY

The objective of the present study has been to extract and isolate the alkaloids from leaves of *Croton baillonianus*, corresponding to the methanolic extract by exclusion chromatography with Sephadex LH-20 followed by a purification by high performance liquid chromatography, obtaining six alkaloids. Two low polarity alkaloid and two glycoside alkaloids were analyzed by Electronic System impact mass spectrometry; these alkaloids belong to bencylisoquinolinic type; the study has connection to the determination of its antioxidant, antiulcerose and citotoxic properties.

Key words: Sephadex, alkaloids, exclusion chromatography, mass spectrometry, electron system impact.

INTRODUCCIÓN

Croton baillonianus (Aubl) es una especie endémica de la selva amazónica peruana; junto con otras especies del género *Croton* son utilizadas en la medicina tradicional; y las más importantes, son: *C. lechleri*, *C. draconoides*, *C. palanostigma*, *C. collinus*, *C. cuneatus* *C. erythrochilus*¹.

^{a*} Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jirón Puno - Lima 1. cfuertesr@unmsm.edu.pe

^b Departamenti di Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno (Italy).

^c Centro di Spettrometria di Massa Proteomica e Bio molecolare, Istituto di Scienze dell'Alimentazione Consiglio Nazionale delle Ricerche.

En particular esta especie es comúnmente utilizada por su capacidad cicatrizante y antiulcerosa, junto a *C. lechleri*; es conocida con el nombre de sangre de drago².

Quimiotaxinómicamente las plantas de la familia Euphorbiaceae, especialmente del género *Croton*, biosintetizan alcaloides provenientes de la L-tirosina, destacando los alcaloides del tipo bencilisoquinolínico^{3,4}.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Las plantas de *Croton baillonianus* fueron colectadas en Santa Cruz (Cajamarca) por el biólogo José Campos de la Cruz; la clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las hojas fueron estabilizadas por desecación a 35°C.

Todos los reactivos y solventes utilizados en el laboratorio fueron de grado analítico.

Extracción y aislamiento de alcaloides

Las hojas, en polvo, se sometieron a maceración en metanol; el solvente fue eliminado por evaporación en el evaporador rotatorio.

El aislamiento de las fracciones fue monitoreado por cromatografía en capa fina analítica en fase directa, realizada con cromatofolios de aluminio de sílica gel 60 F254. El revelado se efectuó con detector de luz UV de 224 y 366 nm de longitud de onda y con sulfato de cerio en ácido sulfúrico al 65% seguido por un calentamiento a 120° C. por 15 minutos. Asimismo, se usó el reactivo de Dragendorff para alcaloides.

Para aislar los alcaloides se usó la cromatografía de exclusión molecular, para lo cual la columna de vidrio (70 x 25 cm) fue cargada con Sephadex LH-20 (25 - 100 mm Pharmacia, Fine Chemicals) suspendida en metanol con un flujo constante de 1,2 mL por minuto.

El proceso de extracción, aislamiento y estudio químico analítico de alcaloides de *Croton baillonianus* se llevó a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno de Italia.

Perfil cromatográfico

La fracción alcaloídica del extracto metanólico fue analizada por HPLC-ESI/TMS; previamente esta fracción fue tratada con cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con un equipo Waters, constituido por una bomba Waters 590, con un inyector UGK y revelador de índice de refracción Waters R 401 provisto de una columna C-18 μ - Bondapack (30 cm x 7,8 mm).

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Para los espectros RMN se utilizó un espectrómetro Bruker DRX 600 (Software UXMNR) operado a 599.19 MHz para ¹H.

ESI-MS (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry)

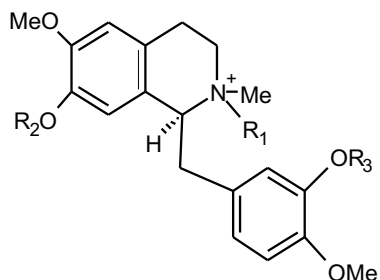
(Espectrometría de masa de impacto electrónico)

El análisis ESI-MS en modalidad iones positivos y iones negativos han sido realizados en un instrumento Finnigan LCQ Deca ion trap, marca thermo Finnigan (San José, CA, USA).

Los compuestos fueron disueltos en metanol e introducidos directamente en la corriente electrospray, utilizando una bomba de inyección, con flujo constante a 5 μ l/min. El capilar se sometió a una temperatura de 220° C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los alcaloides del núcleo bencilisoquinolínico del extracto metanólico de *Croton baillonianus* se presenta en la figura 1.



	R1	R2	R3
Reticulina	H	H	H
Tembetarina	Me	H	H
Reticulina glicósido	H	Hexósido	H
	H	H	Hexósido
Tembetarina glicósido	Me	Hexósido	H
	Me	H	Hexósido

Figura 1. Alcaloides encontrados en el extracto metanólico de las hojas de *C. baillonianus*

Estos alcaloides, provenientes del extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus*, están acompañados por otros alcaloides derivados del núcleo bencilisoquinolínico como aporfina, morfinanodienona y protoberberina.

Bittner y col.⁵ han aislado alcaloides derivados del tipo morfinanodienona y un alcaloide aporfínico.

Payo y col.⁶ realizaron el tamizaje fitoquímico en 14 especies del género *Croton*, con excepción de *C. myricifolius* y *C. rosmarinoides*; la mayoría de las especies mostró la presencia de alcaloides, especialmente en las hojas; estos resultados apoyan la distribución quimiotaxonómica de los alcaloides bencilisoquinolínico en las especies del género *Croton*.

Además de reticulina y tembetarina, de acuerdo a los resultados, también se encuentran en la forma de glicósido en R₂ y R₃ (figura 1)

La figura 2 muestra el perfil cromatográfico después del análisis HPLC-ESI/MS de la fracción alcaloídica del extracto metanólico.

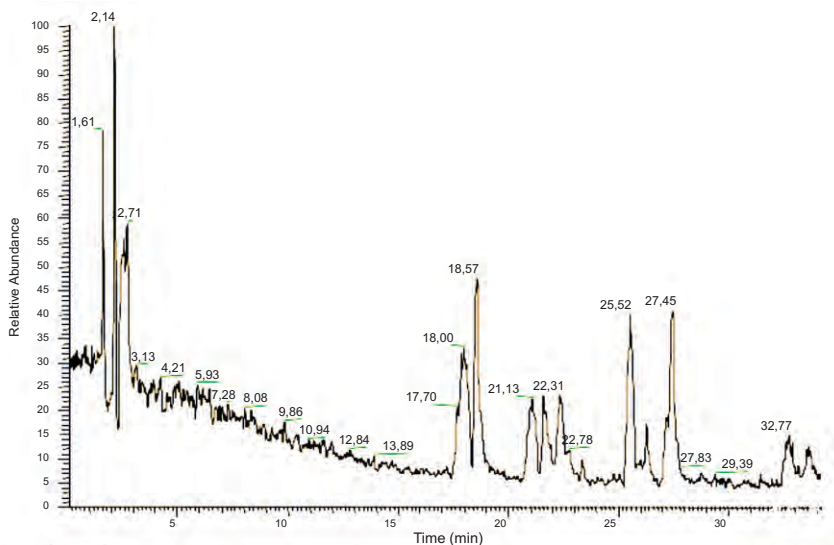


Figura 2. Perfil cromatográfico después del análisis HPLC-ESI/MS de la fracción alcaloídica proveniente del extracto metanólico de las hojas de *C. baillonianus*

En la figura 3 se presenta el espectro MS de tembetarina, y en la figura 4 el espectro MS del glucósido correspondiente.

Alcaloide benzilisoquinolínico tembetarina

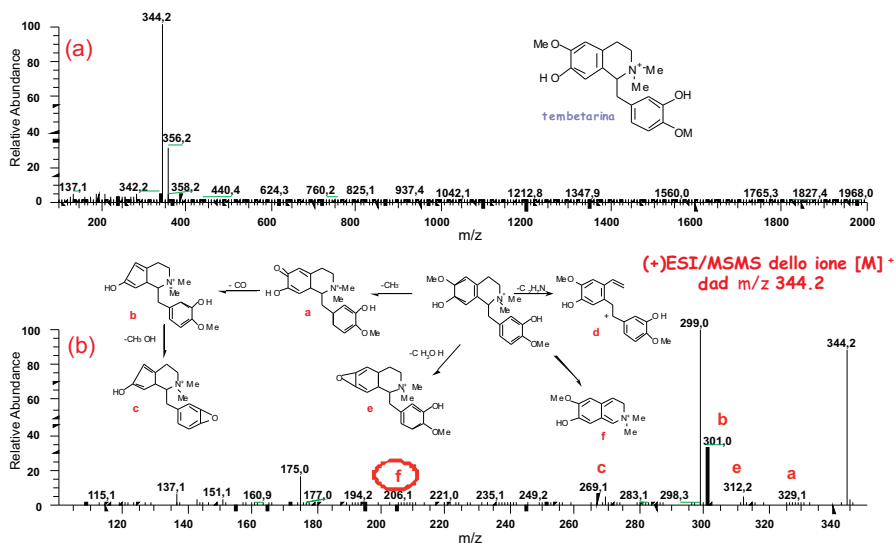


Figura 3. Espectro MS de tembetarina; éste exhibe los iones producto del impacto electrónico

Alcaloide benzisochinolinico tembetarina-glicoside

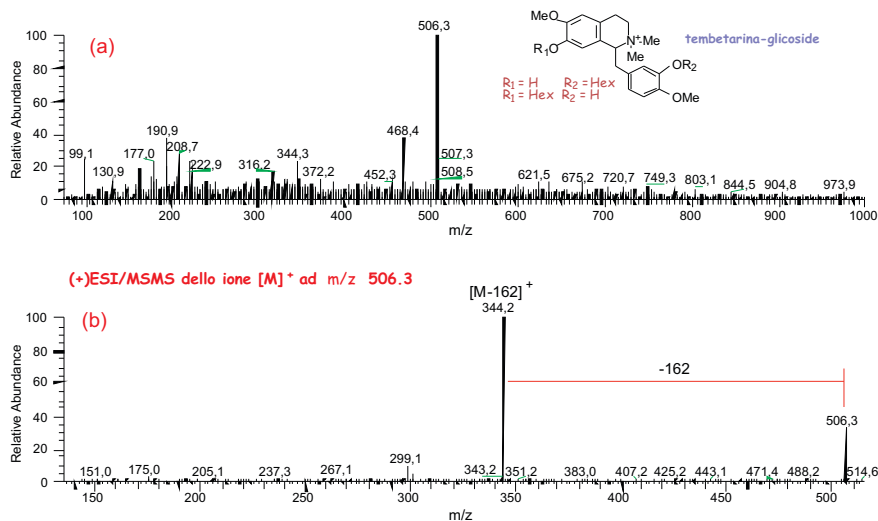


Figura 4. Espectro MS del glicosido de tembetarina; las hexosas se unen en R₁ y R₂

Los datos espectroscópicos RMN ¹H concuerdan con el típico sistema del núcleo alcaloidal benzisochinolinico (figura. 5)

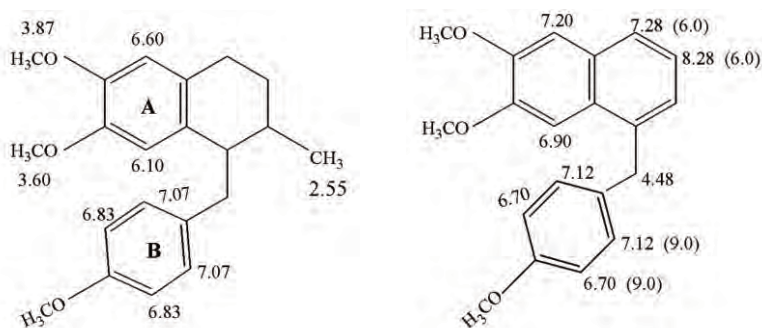


Figura 5. Valores espectrales RMN ¹H, característico del sistema benzisochinolinico. La estructura corresponde al alcaloide arneparina completamente metilada en su forma original y en su estructura aromatizada.

La información espectral coincide al determinar el espectro RMN (H) del alcaloideannonalíptina aislada de *Annona elliptica*⁷; en el caso de los alcaloides y tembetarina también presenta las señales 9.06 y 8.90 correspondiente a los oxhidrilos fenólicos de los núcleos aromáticos A y B.

El análisis ESI-MS exhibe la señal correspondiente al peso molecular del alcaloide tembetarina; dos señales importantes están constituidas por la pérdida del anillo aromático B ($m/z/206.1$) y la epoxidación en el anillo aromático A ($m/z/312.2$)

El glicósido de tembetarina presenta un espectro ESI-MS donde es nítida la señal m/z 506.3, que resulta de la sustitución de una hexosa en la molécula de tembetarina.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus* (Aubl) contiene alcaloides del tipo bencilisoquinolina distribuidos en los subgrupos tetrahydro bencilisoquinolinas, aporfinas y protoberberinas.
- El estudio químico - analítico de los alcaloides mediante espectrometría de masa de impacto electrónico, ha determinado dos alcaloides de baja polaridad; reticulina y tembetarina, así como sus correspondientes estructuras glicosídicas.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de espectroscopía y espectrometría del Dipartimento di Science Farmaceutiche de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salerno (Italia), por su apoyo en el desarrollo del presente estudio.

A la Universidad de Salerno, que a través de una pasantía en sus laboratorios, se hizo posible el desarrollo del proyecto

BIBLIOGRAFÍA

1. Brack A. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú. PNUD, Cuzco, 1999
2. Desmarchelier C., Witting J., Schaus F., Coussio J., Cicca G. Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell. Arg on the production of active oxygen radicals *J. Ethnopharmacole.* 1997; 58: 103 – 108.
3. Bittner M., Alarcón J., Aqueveque P., Becerra J., Hernández V. Hoeneisen M. y Silva M. Estudio químico de las especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. *Bol Soc. Chil. Quim.* 2001; 46(4) Versión electrónica.
4. Sánchez V., Sandoval D., Herrera P., Oquendo M. Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* I. Estudio químico preliminar *Rev. Cubana Farm.* 1982; 16: 39-44.
5. Bittner M., Silva M. Aqueveque P., Kufer J., Jakpovic J. y Murillo R. Alkaloids and other constituents from *Croton chilensis*. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 1997; 42: 223-228.
6. Payo A., Dominici M.E., Mayor J., Oquendo M., y Sarduy R., Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Rev. Cubana Farm.* 2001; 35(3): 203-206.
7. Sandoval D., Preiss A., Schreiber K., Ripperger H. *Phytochem.* 1985; 24: 375-376.