

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE *Croton gossypiifolius* COLECTADA EN VENEZUELA

ALÍRICA I. SUÁREZ^a, KATIUSKA CHAVEZ^a, ZULEYMA BLANCO^a, REINALDO S. COMPAGNONE^b,
STEPHEN TILLET^a, FÁTIMA TORRICO^a

(Recibido Julio 2013; Aceptado Octubre 2013)

ABSTRACT

Croton gossypiifolius Vahl is a species of the *Croton* genus (Euphorbiaceae), which is among those known as dragon's blood due to the viscous red sap derived from its bark, widely used in traditional medicine in Latin America. As a result of a phytochemical study of the organic extracts obtained from the bark, three diterpenes with *ent*-kaurene structure were isolated: *ent*-kaurenoic acid (**1**), grandiflorenic acid (**2**), *ent*-15 β -*E*-cinnamoiloxy-kaurenoic acid (**3**), one 3,4-*seco-ent*-kaurene diterpene known as 7-deoxo-geayine (**4**), the flavonoid quercitrine (**5**) and a series of fatty acids where palmitic proved to be the major one. These compounds were identified based on spectroscopic analysis of 1D and 2D NMR and mass spectrometry. All of them are reported for the first time in this species. www.relaquim.com

Keywords: Euphorbiaceae, *Croton gossypiifolius*, *ent*-kauranes, quercitrine, NMR, MS.

RESUMEN

Croton gossypiifolius Vahl es una especie del género *Croton* (Euphorbiaceae), que se encuentra entre las conocidas como sangre de drago, debido a la savia roja y viscosa que exuda su corteza, ampliamente utilizada en la medicina tradicional de Latinoamérica. Del estudio fitoquímico de los extractos orgánicos obtenidos de la corteza, fueron aislados tres diterpenos de tipo *ent*-kaurano: ácido *ent*-kaurenoico (1), ácido grandiflorénico (2), ácido *ent*-15 β -*E*-cinamoil-kaurenoico (3), un 3,4-*seco-ent*-kaureno conocido como 7-desoxo-geayina (4), el flavonoide quercitrina (5) y ácidos grasos donde el palmítico resultó ser el mayoritario. Estos compuestos se identificaron por RMN en 1D y 2D y por espectrometría de masas, y son reportados por primera vez en esta especie. www.relaquim.com

Palabras clave: Euphorbiaceae, *Croton gossypiifolius*, *ent*-kauranos, quercitrina, RMN, EM.

^a Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

^b Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Dra. Alirica I. Suárez, Tlf: 58-212-6052755, Fax: 58-212-6052706, E-mail: alirica.suarez@ciens.ucv.ve

INTRODUCCIÓN

Croton es el género más grande de la subfamilia Crotonoideae (Euphorbiaceae) (Webster *et al.*, 1999). Se reportan unas 1,300 especies dentro del género (Berry *et al.*, 2005). En Venezuela, existen unas 80 especies endémicas (Berry, 1999). Muchas plantas de *Croton* son utilizadas en América, África y Asia con diferentes propiedades terapéuticas: antiinflamatoria (Perazzo *et al.*, 2007), antinociceptiva (Campos *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2006), antineoplásica (Motta *et al.*, 2011), hipoglicemiante (Okokon *et al.*, 2006) y para el tratamiento de problemas gastrointestinales (Hiruma-Lima *et al.*, 2000). Sus aceites esenciales son también de uso común para tratar trastornos de salud (Salatino *et al.*, 2007).

La química y la farmacología de especies venezolanas pertenecientes al género han sido reportadas (Suárez *et al.*, 2003, 2006, 2009), demostrando que muchas de ellas tienen las propiedades que la población les atribuye: la corteza de *C. malambo* se utiliza para tratar enfermedades tales como: diabetes, diarrea, reumatismo, úlceras gástricas, así como antiinflamatoria y analgésica. Un extracto acuoso de su corteza mostró actividad antinociceptiva en ratas (Suárez *et al.*, 2003). De *C. cuneatus*, utilizada para problemas gastrointestinales e inflamación, se comprobaron sus propiedades antiinflamatorias (Suárez *et al.*, 2006) y antidiabéticas (Torricono *et al.*, 2007) en animales de experimentación. Igualmente, la respuesta antiinflamatoria de alcaloides glutarimídicos extraídos de ella ha sido confirmada en estudios *in vitro* (Mijares *et al.*, 2012). De la especie *C. micans* se aislaron 3,4-*secokauranos*, los cuales mostraron una muy buena citotoxicidad sobre nueve tipos diferentes de células tumorales humanas (Suárez *et al.*, 2009, 2010; Mateu *et al.*, 2012) y un extracto acuoso de sus hojas mostró actividad antihistamínica (Suárez *et al.*, 2012).

La savia de color rojo y consistencia viscosa que exudan muchas especies de *Croton* es conocida como sangre de drago (Dragon's blood), y es utilizada ampliamente en la medicina tradicional de Sudamérica para el tratamiento de heridas, inflamación, infecciones, diarreas y cáncer (Gupta *et al.*, 2008). La savia de la especie *C. palanostigma* contiene un alcaloide llamado taspina, responsable de las propiedades antiinflamatorias, así como de sanar heridas y de su actividad biológica como agente antitumoral (Sandoval *et al.*, 2002).

La química del género *Croton* ha sido bastante explorada; se ha informado del aislamiento de esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas y una gran variedad de diterpenos con esqueleto de labdano, kaurano, cleistanano, crototalano y clerodano.

Croton gossypifolius Vahl se encuentra dentro de esas especies conocidas como sangre de drago, debido al color rojo de su látex. Es utilizada en la medicina tradicional de Venezuela para curar heridas y como antiinflamatoria. De especies de esta planta, colectadas en otras latitudes, se han aislado péptidos cíclicos (Quintyne-Walcott *et al.*, 2007), alcaloides, lignanos y flavonoides (Rodríguez, 1946). Como parte de nuestra investigación en la búsqueda de metabolitos bioactivos de plantas pertenecientes al género *Croton*, recientemente hemos reportado la composición de los aceites esenciales de *C. gossypifolius* colectada en nuestro país (Suárez *et al.*, 2011), y en este artículo presentamos el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la corteza de esta planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedimiento General

Los puntos de fusión fueron determinados utilizando un instrumento Kofler hot-stage y se reportan sin corregir. Los espectros de IR fueron tomados en un espectróme-

tro Perkin-Elmer 1320. Los espectros de ^1H y ^{13}C NMR se tomaron en CDCl_3 en un equipo JEOL 270 MHz y las resonancias están referenciadas con respecto a la señal residual del disolvente utilizado (δ_{H} 7.24 y δ_{C} 77.0). Los espectros de masa se tomaron en un equipo Varian modelo Saturno 2000. Los procedimientos de aislamiento por cromatografía de columna se evaluaron empleando cromatografía de capa fina sobre placas de aluminio cubiertas con gel de sílice (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄). En el proceso de revelado se utilizó una lámpara de UV y como reactivo revelador una disolución de *p*-anisaldehído en MeOH.

Material Botánico

La corteza de *C. gossypifolius* fue colectada en La Cortada del Guayabo, estado Miranda, Venezuela, e identificada por el Dr. Stephen Tillett. Un ejemplar de la muestra, representativo de la colección e identificado con el código MYF 26723, ha sido depositado en el Herbario "Dr. Víctor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

Extracción y aislamiento de los compuestos presentes en los extractos orgánicos

El material vegetal, secado a temperatura ambiente, fue sometido a maceración utilizando metanol por 72 h, el disolvente fue evaporado a presión reducida y el material resultante re-disuelto en una mezcla MeOH/H₂O (50:50) y sometido a partición sucesivamente con hexano, diclorometano y acetato de etilo; la mezcla hidro-metanólica fue liofilizada previa evaporación del metanol. El extracto y las diferentes fracciones se evaluaron por cromatografía en capa fina y sus componentes fueron separados por cromatografía preparativa y de columna en fase normal o reversa, utilizando las mejores condiciones de separación obtenidas por CCF. Utilizando estos procedimientos se realizó una cromatografía de columna en fase normal a la fracción de CH_2Cl_2 (500 mg). Se utilizó gel

de sílice como soporte y se eluyó con una mezcla AcOEt/Hx de polaridad creciente (2:8 - 7:3). De esta columna se colectaron 50 eluatos, los cuales al ser unidos de acuerdo a criterios de Rf que señalaban similar composición, permitieron obtener diez fracciones. De los compuestos **1**, **2** y **3** se obtuvo lo siguiente: **1** (35 mg), **2** (23 mg), y **3** (52 mg). Del extracto de AcOEt se obtuvo los metabolitos **4** (125 mg), y **5** (42 mg). Todos los compuestos luego de su aislamiento fueron posteriormente purificados por cristalización en disolventes apropiados o por cromatografía de columna.

La evaporación de la subfracción 25 de la cromatografía realizada a la fracción de diclorometano, ofreció un residuo aceitoso que fue recromatografiado en columna de gel de sílice, usando como disolvente acetato de etilo, las fracciones que se visualizaron por CCF con un solo compuesto fueron unidas y evaporadas para ofrecer un sólido blanco de punto de fusión 176-178 °C, que resultó ser el compuesto **1**.

La subfracción 32 (53 mg) de la columna previamente mencionada, se sometió a una nueva cromatografía en columna de gel de sílice, usando una mezcla eluyente cloroformo-hexano (9:1); los eluatos se analizaron por cromatografía en capa fina y se reunieron de acuerdo a criterios de similitud en Rf. De la reunión de las fracciones mayoritarias se obtuvo un sólido blanco que posteriormente se recrystalizó en etanol, para ofrecer 23 mg del compuesto **2**.

El compuesto **3** se obtuvo de la subfracción 45 (70 mg) como un residuo de color marrón, el cual mostraba pocas impurezas al ser visualizado por CCF, se lavó varias veces con mezclas de diclorometano:hexano (2:8), obteniéndose un sólido amorfo de color marrón claro, que al ser caracterizado resultó ser el compuesto **3**.

El extracto de acetato de etilo fue sometido a cromatografía utilizando gel de sílice y elución con polaridad creciente de acetato de etilo hasta acetato:metanol (9:1); de las primeras 6 subfracciones eluidas con

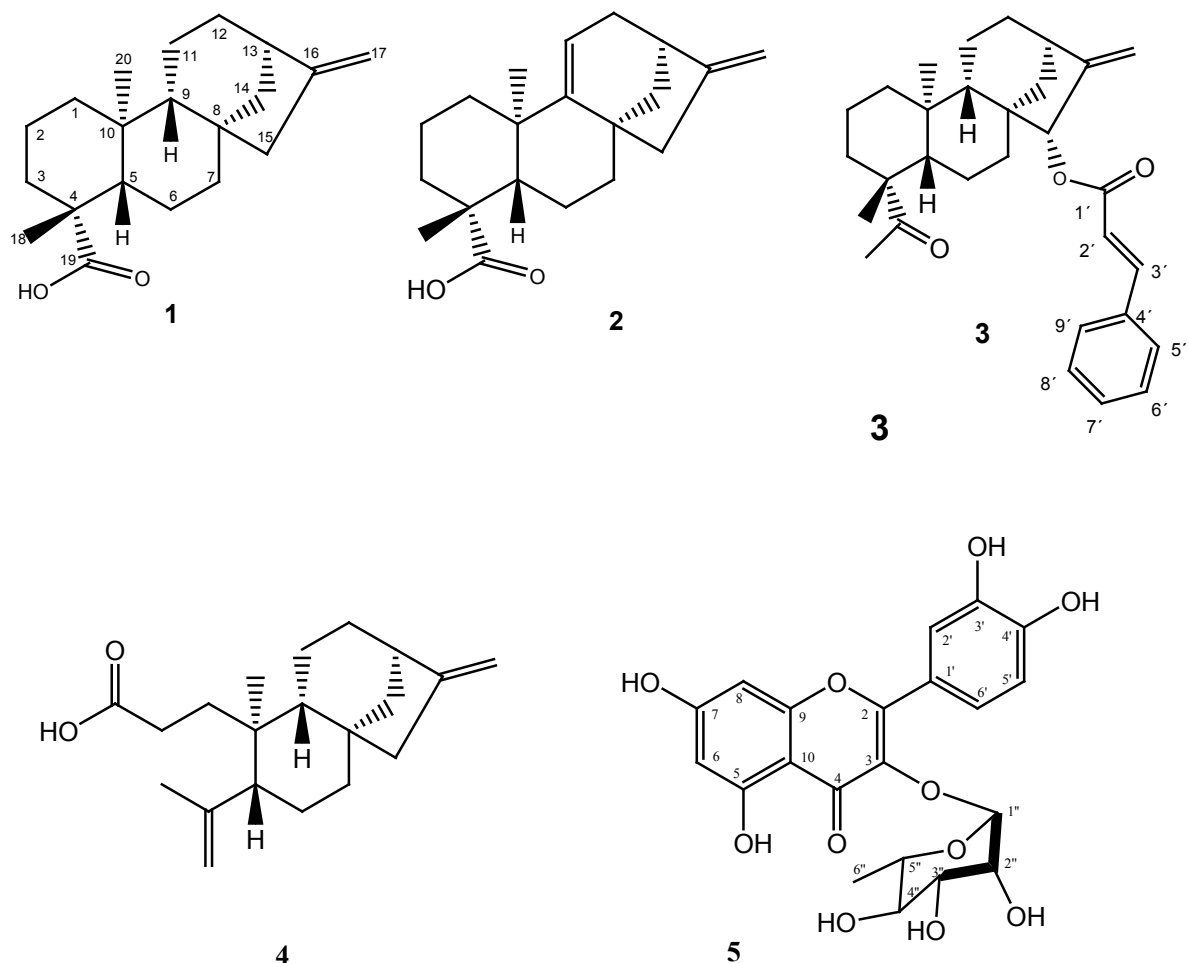


Figura 1. Estructuras de compuestos aislados de la corteza de *C. gossypifolius*.

acetato se obtuvo, luego de su evaporación, el compuesto **4**, como un aceite viscoso de color amarillo.

En las últimas fracciones eluidas con acetato:metanol, de la cromatografía previamente mencionada, cristalizó espontáneamente un sólido amarillo que fue recrystalizado en metanol:agua, ofreciendo 25 mg del compuesto **5**.

La caracterización estructural de los compuestos puros fue obtenida utilizando técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear, infrarrojo y espectrometría de masas. Los datos obtenidos se compararon con los informados previamente en

la literatura. El extracto de hexano fue analizado por cromatografía de gases-masas y mostró principalmente la presencia de ácidos grasos, donde el palmítico mostró ser el mayoritario.

Características físicas y espectroscópicas de los compuestos caracterizados.

Ácido ent-kaurenoico (1): Sólido cristalino; p.f. 176-178 °C; EM m/z : 302 (M^+), 287, 257, 214; IR (KBr) ν_{\max} cm^{-1} : 3400, 1700, 1685, 1665; RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz), δ : 0.98 (1H, dt, $J = 13.2, 4.4$ Hz, H-3a), 0.99 (3H, s, H-20), 1.02-1.05 (2H, m, H-5, H-9), 1.07 (1H, dd, $J = 11.2, 4.8$ Hz, H-14a), 1.23

(3H, s, H-18), 1.48-1.57 (7H, m, H-2, H-7, H-11a, H-12), 1.80-1.84 (4H, m, H-1b, H-6, H-11b), 1.89 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-14b), 1.99-2.03 (2H, m, H-15), 2.67 (1H, sa, H-13), 4.72 (1H, s, H-17a), 4.78 (1H, s, H-17b); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 67 MHz), δ : 184.4 (C-19), 156.0 (C-16), 103.1 (C-17), 57.1 (C-5), 55.1 (C-9), 49.0 (C-15), 44.3 (C-8), 43.9 (C-13), 43.8 (C-4), 41.3 (C-7), 40.8 (C-1), 39.7 (C-14), 39.3 (C-10), 37.9 (C-3), 33.2 (C-12), 29.0 (C-18), 21.9 (C-6), 19.2 (C-2), 18.5 (C-11), 15.7 (C-20).

Ácido grandiflorénico (2): Sólido blanco; p.f. 156-158 °C; EM m/z : 300 (M^+), 285, 240; IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 1695 (COOH), 1655 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz), δ : 0.98 (3H, s, H-20), 1.05 (1H, m, H-3a), 1.22 (3H, s, H-18), 1.31 (1H, m, H-1a), 1.49 (1H, m, H-7a), 1.55 (1H, m, H-14a), 1.67 (1H, m, H-7b), 1.90 (2H, m, H-2), 2.02 (1H, m, H-5), 2.04 (1H, m, H-1b), 2.15 (1H, m, H-7b), 2.91 (1H, m, H-15a), 2.36 (1H, m, H-3, H-3b), 2.38 (2H, m, H-12), 2.43 (2H, m, H-6), 2.58 (1H, m, H-15b), 2.75 (1H, sa, H-13), 4.83 (1H, s, H-17a), 4.89 (1H, s, H-17b), 5.22 (1H, t, $J=3.2$, H-11); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 67 MHz), δ : 183.9 (C-19), 158.7 (C-16), 156.0 (C-9), 114.9 (C-11), 105.6 (C-17), 50.4 (C-15), 46.6 (C-5), 45.0 (C-14), 44.8 (C-4), 42.3 (C-8), 41.3 (C-13), 40.8 (C-1), 38.9 (C-10), 38.3 (C-3), 38.0 (C-12), 29.7 (C-7), 28.3 (C-18), 23.7 (C-20), 20.2 (C-2), 18.5 (C-6).

Ácido ent-15 β -E-cinamoil-16-kauren-19-oico (3): Sólido amorfo; p.f. 103-104 °C; EM m/z : 420 (M^+); IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 1730 (COOR), 1635 (C=C); RMN ^1H (CDCl_3 , 270 MHz), δ : 0.82 (1H, m, H-1a), 0.95 (3H, s, H-20), 1.06 (1H, sa, H-5), 1.20 (3H, s, H-18), 1.24 (1H, s, H-9), 1.28 (1H, sa, H-7a), 1.52 (1H, d, $J=5.8$ Hz, H-11a), 1.53 (1H, m, H-12a), 1.61 (1H, m, H-2a), 1.70 (1H, m, H-12b), 1.77 (1H, m, H-7b), 1.82 (1H, m, H-2b), 1.86 (1H, m, H-1b), 1.88 (2H, sa, H-6), 1.89 (1H, m, H-11b), 2.02 (1H, d, $J=12.6$ Hz, H-3a), 2.12 (2H, m,

H-14), 2.15 (1H, d, $J=12.6$ Hz, H-3b), 2.86 (1H, sa, H-13), 5.09 (1H, s, H-17a), 5.11 (1H, s, 17b), 5.39 (1H, s, H-15), 6.48 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-2'), 7.37 (3H, m, H-6', H-7', H-8'), 7.52 (2H, m, H-5', H-9'), 7.64 (1H, d, $J=15.8$ Hz, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 67 MHz), δ : 184.4 (C-19), 167.1 (C-1'), 155.5 (C-16), 144.9 (C-3'), 134.5 (C-4'), 130.4 (C-7'), 128.9 (C-5', C-9'), 128.2 (C-6', C-8'), 118.5 (C-2'), 110.3 (C-17), 83.1 (C-15), 56.7 (C-5), 52.9 (C-9), 47.8 (C-8), 43.7 (C-4), 42.6 (C-13), 40.6 (C-1), 39.9 (C-10), 37.7 (C-3), 37.4 (C-14), 34.9 (C-7), 32.7 (C-12), 28.9 (C-18), 20.8 (C-6), 19.1 (C-11), 18.5 (C-2), 15.1 (C-20).

7-Desoxo-geayina (4): Aceite amarillo; $[\alpha]_D -32.5$ (CHCl_3 , $c=2.0$); EM m/z : 302, 287, 229, 159; IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3500 cm^{-1} (OH), 1695 (COOR); ^1H (CDCl_3 , 270 MHz), δ : 0.97 (3H, s, H-20), 1.22 (1H, m, H-2a), 1.27 (1H, m, H-9), 1.46 (1H, m, H-6a), 1.48 (2H, m, H-15), 1.52 (2H, m, H-11), 1.56 (2H, m, H-12), 1.62 (1H, m, H-14a), 1.67 (1H, m, H-1a), 1.62 (1H, m, H-6b), 1.72 (3H, s, H-18), 1.93 (1H, d, $J=7.4$ Hz, H-14b), 1.95 (1H, m, H-5), 2.03 (2H, m, H-7), 2.22 (1H, m, H-1b), 2.26 (1H, m, H-2b), 2.63 (1H, m, H-13), 4.56 (1H, s, H-17a), 4.72 (1H, s, H-17b), 4.77 (1H, s, H-19a), 4.84 (1H, s, H-19b). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67 MHz) δ : 179.9 (C-3), 155.5 (C-16), 147.5 (C-4), 113.7 (C-19), 103.3 (C-17), 50.5 (C-5), 49.1 (C-7), 46.2 (C-9), 43.9 (C-8), 43.8 (C-13), 40.9 (C-10), 39.6 (C-15), 39.5 (C-14), 33.7 (C-1), 32.9 (C-12), 28.5 (C-2), 26.3 (C-6), 23.4 (C-18), 21.8 (C-20), 18.3 (C-11).

Quercitrina (5). Sólido amarillo; p.f. 178-181 °C; EM m/z : 448; IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3500 (OH), 1710 (C=O), 1615 (C-H aromático); ^1H NMR (CDCl_3 , 270 MHz) δ : 0.94 (3H, d, $J=6.1$ Hz, CH_3 -Ram), 3.30-3.34 (2H, m, H-4'', H-5''), 3.74 (1H, dd, $J=9.0$, 3.35 Hz, H-3''), 4.21 (1H, m, H-2''), 5.33 (1H, m, H-1'') 6.19 (1H, d, $J=22.1$ Hz, H-6), 6.35 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.91 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 7.29 (1H, dd, $J=2.2$, 8.3

Hz, H-6'), 7.30 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 67 MHz) δ : 179.6 (C-4), 165.8 (C-7), 163.2 (C-5), 159.3 (C-9), 158.5 (C-2), 149.8 (C-4'), 146.4 (C-3'), 136.2 (C-3), 122.9 (C-6', C-1'), 116.9 (C-2'), 116.3 (C-5'), 105.8 (C-10), 103.5 (C-1''), 99.7 (C-6), 94.7 (C-8), 73.2 (C-2''), 72.1 (C-3''), 72.0 (C-4''), 71.9 (C-5''), 17.7 (C-6'').

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de sucesivas cromatografías realizadas a las fracciones obtenidas del extracto de CH_2Cl_2 , se obtuvo el ácido kaurenoico (**1**), ácido grandiflorénico (**2**), ácido *ent*-15 β -E-cinamoil-16-kauren-19-oico (**3**), 7-desoxogeayina (**4**) y el flavonoide quercitrina (**5**).

El compuesto **1** fue obtenido como agujas blancas, de p.f. 176-178 °C, las cuales se cristalizaron en una mezcla EtOH/ H_2O . Su espectro de IR mostró una intensa banda de absorción a 1700 cm^{-1} identificando a un grupo carbonilo, y una banda ancha a 3400 cm^{-1} de -OH, ambas asociadas a grupo -COOH. Una banda a 1665 cm^{-1} perteneciente a la absorción de una olefina terminal se consideró entre las más importantes. El espectro de masas obtenido por impacto electrónico (EI) dio una relación m/z 302 (ión molecular), con este dato se consideró una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, la cual sugiere seis insaturaciones en la estructura. Otros picos importantes observados en el espectro de masas fueron los siguientes: m/z : 287 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 257 [$\text{M}^+ - \text{COOH}$], 214 [$\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$]. El análisis de RMN de ^1H en CDCl_3 claramente mostró señales para dos metilos a δ 0.99 (3H, s, H-20) y 1.23 (3H, s, H-18), dos protones olefinicos a δ 4.72 (1H, s, H-17a), y δ 4.78 (1H, s, H-17b), además de una serie de multipletes entre δ 0.93 y 2.03; se observó igualmente un singlete ancho que integraba para un protón a δ 2.67 (H-13); todas estas señales sugirieron una estructura terpenoide. El espectro de RMN de ^{13}C y un experimento DEPT 135 conjuntamente con un HMQC,

revelaron que la estructura contenía 20 átomos de carbono discriminados como: dos metilos a δ 29.0 (C-18) y 15.7 (C-20), 10 metilenos, incluyendo uno de naturaleza olefinica a δ 103.1 (C-17), tres metinos y cinco carbonos cuaternarios, de los cuales uno corresponde a una olefina de tipo terminal a δ 156.0 (C-16) y otro a un grupo carboxilo δ 184.4 (C-19), corroborando con ello la presencia de un diterpeno. La similitud con compuestos previamente aislados en nuestro grupo de trabajo nos sugirió una estructura de tipo *ent*-kaurano. Con la ayuda de los espectros de HMQC y HMBC todas las señales fueron asignadas y con la comparación con datos de la literatura (Guillopé *et al.*, 2011) se corroboró que el compuesto **1** era el *ent*-kaur-16-en-19-oico (**1**), conocido como ácido kaurenoico.

El compuesto **2** fue aislado de la fracción de diclorometano que tenía una apariencia de "miel", la cual se purificó a través de cromatografía en columna utilizando gel de sílice y una mezcla de CHCl_3/n -hexano, 9:1, obteniéndose como un sólido blanco de p.f. 156-158 °C; el revelado con *p*-anisaldehído mostró una mancha de color azul. La muestra fue sometida a un análisis de CG/EM, el cual presentó un M^+ de 300 m/z ; otros picos importantes en el espectro de masas se observaron a m/z : 285 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$), 240 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{COOH}$). El espectro de RMN de ^{13}C exhibió un total de 20 señales, las cuales fueron discriminadas con ayuda de un experimento DEPT 135 en: dos carbonos metílicos a δ 28.3 (C-18) y 23.7 (C-20), nueve metilenos entre los cuales uno correspondía a una olefina a δ 105.6 (C-17), dos metinos a δ 41.3 (C-13), 46.6 (C-5) y seis carbonos cuaternarios, entre los cuales destacaban los dos pertenecientes a las dos olefinas presentes en el compuesto a δ 156.0 (C-9) y 158.7 (C-16) y el que señalaba al ácido carboxílico a δ 183.9 (C-19). Estos datos junto con los de espectrometría de masas permitieron establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, que corresponde a un número total de siete

insaturaciones en la molécula. El espectro de RMN ^1H corroboró la presencia de dos grupos metilos singuletes a δ 0.98 (3H, s, H-20) y 1.22 (3H, s, H-18). A través de un experimento HMQC se establecieron las correlaciones entre los carbonos y los protones directamente unidos a ellos; el experimento en dos dimensiones HMBC permitió establecer las correlaciones a tres enlaces (Fig. 2). La comparación de los datos obtenidos para nuestra estructura con datos reportados en la literatura (Batista *et al.*, 2005), indicaron que el compuesto **2** era el *ent*-kaureno conocido como ácido grandiflorénico (**2**), producto natural que se reporta por primera vez de la especie *C. gossypifolius*.

El compuesto **3** se obtuvo como un sólido blanco amorfo, de p.f. 103-104 °C. La fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_4$ se estableció tomando en consideración su espectro de masas, el cual presentó un ion molecular de m/z 420 (M^+). El espectro de RMN ^1H se presentaba muy similar al observado en los dos compuestos anteriores, por lo que se consideró nuevamente la presencia de un diterpeno de estructura kaurenoide. Fue importante reconocer en la estructura la presencia de un éster *E*-cinámico, el cual se distingue por un sistema de tipo

AB presentando dos dobletes con una $J = 15.8$ Hz a desplazamientos de δ 6.48 (H-2') y 7.64 (H-3'). De igual forma, se evidenció la presencia del metileno exocíclico con dos singuletes a δ 5.09 (H-17a) y 5.11 (H-17b) y el ácido carboxílico que se había identificado igualmente en **1** y **2**. El análisis detallado de los espectros de ^{13}C y DEPT 135 conjuntamente con los experimentos HMQC y HMBC, permitieron ubicar el grupo cinamato en la posición C-15 de la estructura del ácido kaurenoico. La comparación con datos de la literatura corroboró la presencia del ácido *ent*-15 β -*E*-cinamoil-16-kauren-19-oico (**3**), de especial importancia fue la comparación del desplazamiento químico de H-15 a δ 5.39 para determinar la estereoquímica de C-9 y de C-15 (dos Nascimento *et al.*, 2001). Este *ent*-kaurano (**3**) se reporta por primera vez como metabolito secundario presente en *C. gossypifolius*.

El compuesto identificado como **4** se observó con las características físicas de un semi-sólido de color miel, presentando una rotación óptica de $[\alpha]_D -32.5$ (CHCl_3 , $c = 2.0$). Su espectro de masas mostró un ion molecular de M^+ 302 m/z ; otros picos importantes observados en el espectro de masas se observaron a m/z : 287, 229 y 159. El dato referente al ion molecular en conjunto con el análisis del espectro de RMN de ^{13}C , permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, sugiriendo nuevamente la existencia de una estructura diterpénica en la cual están presentes seis insaturaciones. El espectro de RMN de ^{13}C , analizado conjuntamente con un experimento DEPT 135, señaló la presencia de dos grupos metilos singuletes δ 23.4 (C-18) y 21.8 (C-20), 10 metilenos, dos de los cuales correspondían a metilenos olefinicos a δ 113.7 (C-19) y 155.5 (C-16), tres grupos metinos a δ 50.5 (C-5), 46.2 (C-9) y 43.8 (C-13). Cinco carbonos cuaternarios de los cuales uno es de naturaleza acíclica a δ 179.9 (C-3) fueron también identificados en la estructura. El espectro de RMN

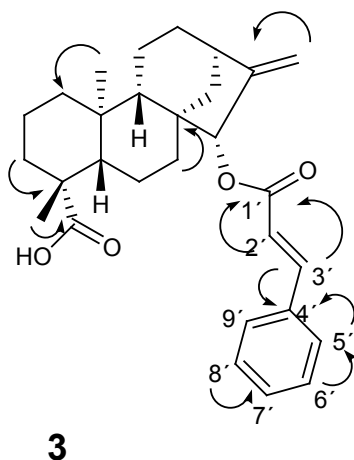


Figura 2. Principales correlaciones de HMBC del compuesto **3**.

de ^1H confirmó los dos grupos metilos ya descritos y la presencia de dos olefinas terminales. Todas las señales fueron asignadas con la ayuda de los experimentos HMQC, HMBC y COSY y, todo ello, condujo a establecer que la estructura correspondía a un diterpeno tricíclico. La similitud de su espectro con el ácido de caracasina, un 3,4-*seco-ent*-kaurano aislado por nuestro grupo de la especie *C. micans* (Suárez *et al.*, 2009), mostró, como la diferencia más importante entre ellos, la ausencia en este compuesto **4** de la cetona α,β -insaturada presente en el ácido de caracasina. Un compuesto de nombre 7-desoxo-geayina, con la estructura propuesta en el análisis espectroscópico, fue reportada por primera vez aislada de *C. geayi* (Palazzino *et al.*, 1997), y en esta oportunidad se reporta de la especie *C. gossypifolius*.

El compuesto **5** resultó ser un sólido amarillo amorfo, de p.f 178-181 °C. El espectro de masas ofreció un ión molecular M^+ 448 m/z . Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C mostraron señales típicas de estructuras flavonoides con glucósidos, un protón anomérico a δ 5.33 (H-1''), señaló la posible presencia de una ramnosa, confirmada por el grupo metilo que fue observado a δ 0.94 (C-6''). El grupo de señales a campo bajo permitió identificar la presencia de dos sistemas de acoplamiento; un anillo **B** trisustituido señalado por el sistema ABX a δ 6.91 (d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 7.29 (dd, $J = 2.2, 8.3$ Hz, H-6'), 7.30 (d, $J = 2.2$ Hz, H-2'); dos señales que integraban cada una para un protón acopladas entre sí con $J = 2.1$ Hz resonaron a δ 6.19 (H-6) y 6.35 (H-8), el resto de las resonancias en el espectro de RMN ^1H muestran la parte glicosídica de la molécula, identificándose claramente a δ 3.42 (H-1'') y 3.76 (H-5''). La completa asignación de las señales de RMN se realizó a través de la interpretación de los espectros de HMQC y HMBC y luego de la comparación con datos de la literatura se concluyó que el compuesto **5** corresponde a 3-*O*-ramnopiranosil-5,7,3',4'-tetrahidroxi-

flavona, conocida con el nombre común de quercitrina, aislada de muchas especies vegetales y particularmente dentro del género de algunas especies como *C. campestris* (dos Santos *et al.*, 2005).

Aun cuando todos los compuestos descritos han sido reportados previamente de otras fuentes botánicas, estos se describen por primera vez como aislados de *C. gossypifolius* y representan el primer estudio fitoquímico de la especie colectada en Venezuela.

La Figura 1 muestra las estructuras de los compuestos caracterizados.

CONCLUSIONES

La evaluación fitoquímica de la corteza de *C. gossypifolius* colectada en Venezuela mostró que la especie contiene compuestos comunes a otras especies del género, especialmente diterpenos de tipo *ent*-kaurano, algunos de los cuales han demostrado importante actividad biológica. Se hace necesario evaluar por separado cada uno de los compuestos en las acciones biológicas señaladas para esta especie con el objeto de identificar aquellos responsables de esas actividades farmacológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela PG-06-7342-2008.

REFERENCIAS

- Batista, R., Braga, F.C., Oliveira, A.B. (2005) Quantitative determination by HPLC of *ent*-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **15**: 119-125.
- Berry, P., Hipp, A.L., Kenneth, J., Wurdack, K.J., van Ee, B., Riina, R. (2005) Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS AND TRNL-TRNF DNA sequence data. *American Journal of Botany* **92**: 1520-1534.
- Berry, E.P. (1999) *Croton*. In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. **5**: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. (eds): Berry, P., Yatskievich, K. and Holst, B. Missouri Botanical Garden Press. USA. pp. 111-133.
- Campos, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C. (2002) Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia* **73**:116-120.
- Do Nascimento, A.M., De Oliveira, D.C.R. (2001) Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **12**: 552-555.
- Dos Santos, P.M.L., Schripsema, J., Kuster, R. (2005) Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **15**: 321-325.
- Guillopé, R., Escobar-Khondiker, M., Guérinau V., Laprévote, O., Höglinger, G.U., Champ, P. (2011) Kaurenoic acid from pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism. *Phytotherapy Research* **25**: 1861-1864.
- Gupta, D., Bleakey, B., Gupta, R.K. (2008) Dragon's blood: Botany, Chemistry and therapeutic uses. *Journal of Ethnopharmacology* **115**: 361-380.
- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodriguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza Brito, A.R.M. (2000) Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **69**: 229-234.
- Mateu, E., Chavez, K., Riina R., Compagnone, R.S., Delle Monache, F., Suárez A.I. (2012) New 3,4-seco-ent-kaurene dimmers from *Croton micans*. *Natural Product Communications* **7**: 5-8.
- Mijares, M.R., Martínez, G.P., Chirinos, P., Suárez A.I., Compagnone, R.S., Blanco, Z., De Sanctis, J.B. (2012) Efecto del julocrotol, isojulocrotol y julocrotona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en leucocitos humanos estimulados con acetato de forbol miristato. *Revista de la Facultad de Farmacia* **75**: 28-34.
- Motta, L.B., Furlan, C.M., Santos, D.Y.A.C., Salatino, M.L.F., Duarte-Almeida, J.M., Negri, G., De Carvalho, J.E., Ruiz, A.L.T.G., Cordeiro, I., Salatino, A. (2011) Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **21**: 972-977.
- Nardi, G.M., Dalbó, S., Delle Monache, F., Pizzolatti, M.G, Ribeiro-do-Valle, R.M. (2006) Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **107**: 73-78.
- Palazzino, G., Federici, E., Rasoanaivo, P., Galeffi, C., Delle Monache, F. (1997) 3,4-Seco diterpenes of *Croton geayi*. *Gazzeta Chimica Italiana* **127**: 311-314.
- Okokon, J.E., Bassey, A.L., Obot, J. (2006) Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* Muell. (Thunder plant) in alloxan diabetic rats. *African Journal Traditional CAM* **3**: 21-26.

- Quintyne-Walcott, S., Maxwell, A.R., Reynolds, W.F. (2007) Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. *Journal of Natural Products* **70**: 1374-1376.
- Rodriguez Caballero, R.L. (1946) Contribución al estudio de targuá (*Croton gossypifolius*) Vahl. Tesis. Universidad de Costa Rica, Fac. De Ciencias, San José, Costa Rica.
- Salatino, A., Faria-Salatino, M.L., Negri, G. (2007) Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**: 11-33.
- Sandoval, M., Okuhama, N.N., Clark, M., Angeles, F.M., Lao, J., Bustamante, S., Millar, M. (2002) Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology* **80**: 121-129.
- Suárez, A.I., Salazar-Bookaman, M.M., Compagnone, R.S., Tillett, S., Delle Monache, F., Digilio, C., Bruges, G. (2003) Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* **88**: 11-14.
- Suárez, A.I., Blanco, Z., Compagnone, R.S., Salazar-Bookaman, M.M., Zapata, V., Alvarado C. (2006). Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology* **105**: 99-101.
- Suárez, A.I., Chavez, K., Delle Monache, F., Vasquez, L., Orsini, G., Compagnone, R.S. (2008) New 3,4-seco-ent-kaurenes from *Croton caracasana* flowers. *Natural Product Communications* **3**: 319-322.
- Suárez, A.I., Chavez, K., Mateu, E., Compagnone, R.S., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F., Mijares, M., De Sanctis, J.B. (2009) Cytotoxic activity of seco-ent-kaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Natural Product Communications* **4**: 1547-1550.
- Suárez, A.I.; Mateu, E.; Chávez, K.; Compagnone, R.S.; Orsini, G.; Tillett, S.; Riina, R.; Alcázar, W.; Salazar Bookaman, M.; Arvelo, F.; Israel, A. (2012) Perfil fitoquímico y farmacológico de *Croton micans* Sw. Una visión general. *Revista de la Facultad de Farmacia* **75**: 1-13.
- Torricon, F., Cepeda, M., Guerrero, G., Melendez, F., Blanco, Z., Canelon, D.J., Diaz, B., Compagnone, R.S., Suárez, A.I. (2007) Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **17**: 166-169.
- Webster, G., Berry, P., Armbruster, W., Esser, H., Gillespie, L., Hayden, J., Levin, G., Secco, R., Heald, S. Euphorbiaceae In: *Flora of the Venezuelan Guayana*. Vol. 5: Eriocaulaceae-Lentibulariaceae. (eds): Berry, P., Yatskievich, K. and Holst, B. Missouri Botanical Garden Press. USA, 1999. pp. 72-228.