

FLAVONOIDES DE *BACCHARIS BOLIVIENSIS*

Alberto Calle, Jimena Yupanqui, Yonny Flores y Giovanna R. Almanza*

Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Campus Universitario
Calle 27 Cota Cota, La Paz-Bolivia

Accepted: 22/10/12

Published: 09/12/12

Keywords: *filifolin*, *xanthomicrol*, *6-hidroxiluteolin*, *flavonoides polimetoxilados*, *Baccharis boliviensis*.

ABSTRACT

Two diterpenes and four flavonoids: **1** (5,7,3',4'-tetrahydroxy-6-methoxyflavanone; *Filifolin*), **2** (5,3'-dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone), **3** (5,4'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone; *Xanthomicrol*) and **4** (5,6,7,3',4'-pentahydroxyflavone; 6-Hydroxyluteolin), were isolated from the aerial parts of *Baccharis boliviensis* and identified by spectroscopic techniques of NMR 1D and 2D as well as by comparison with bibliographic data. The two diterpenes were previously reported in *B. boliviensis* while the four flavonoids are first reported in this species and being major secondary metabolites give a potential pharmacological interest because these compounds or similar compounds showed apoptotic or cytotoxic activity.

*Corresponding author: giovvalmanza@yahoo.com.ar

RESUMEN

Dos diterpenos y cuatro flavonoides: **1** (5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavanona; **Filifolin**), **2** (5,3'-dihidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona), **3** (5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona; **Xanthomicrol**) y **4** (5,6,7,3',4'-pentahidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona; **6-Hidroxiluteolin**), fueron aislados de las partes aéreas de *Baccharis boliviensis* e identificados mediante técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D así como por comparación con datos bibliográficos. Los dos diterpenos fueron anteriormente reportados en *B. boliviensis* mientras que los cuatro flavonoides son reportados por primera vez en esta especie y al ser metabolitos secundarios mayoritarios le dan un potencial interés farmacológico porque los mismos compuestos o compuestos muy similares presentaron actividad apoptótica o citotóxica.

INTRODUCCION

El género *Baccharis* es exclusivo de América y predomina principalmente en zonas tropicales. Las especies que presenta el género pueden ser arbustos o hierbas perennes, a veces presentan xilopodio, raíces gomíferas o rizomas. Varias especies de éste género han sido ampliamente estudiadas debido a su reconocida utilización en la medicina tradicional de América Latina, presentando una concentración significativa de flavonoides y diterpenos, compuestos que presentaron una acción farmacológica [1]. En Bolivia existen aproximadamente 60 especies del género *Baccharis* [2] varias de las cuales tienen una amplia distribución en el valle de La Paz, entre las cuales está la especie *Baccharis boliviensis* seleccionada para el presente estudio. *Baccharis boliviensis* es un arbusto que crece hasta 1,5 m de altura, tiene flores blancas de 14 pétalos o más y se la encuentra predominantemente en regiones subandinas, como en la ciudad de La Paz, donde se encuentra distribuida en las laderas este y oeste. Debido a su amplia distribución y al interés en el género *Baccharis*, esta especie fue sometida a estudios químicos y biológicos previos. Así Zdero y colaboradores [3] reportaron el aislamiento de varios diterpenos tipo ent-clerodano en la especie, mientras que Cazón y colaboradores [4] reportaron el efecto fitotóxico alelopático de un compuesto de la planta. En el presente estudio reportamos el aislamiento y elucidación estructural de cuatro flavonoides no reportados anteriormente en *B. boliviensis*, identificados como: **1** (5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavanona), **2** (5,3'-dihidroxi-3,6,7,8,4'-pentametoxiflavona), **3** (5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona) y **4** (5,6,7,3',4'-pentahidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona), que fueron aislados junto a los diterpenos **5** y **6** anteriormente identificados en la misma especie (Figura 1).

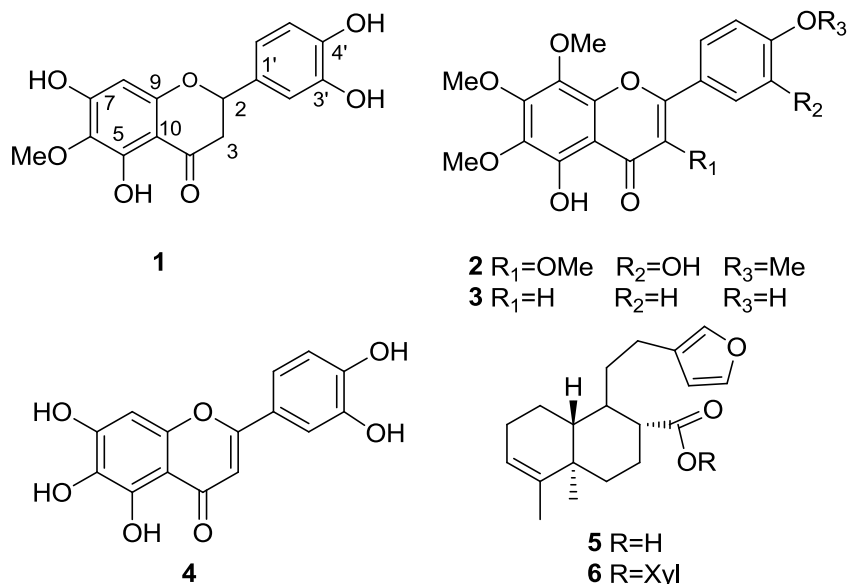


Figura 1. Compuestos aislados de *Baccharis boliviensis*.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las partes aéreas de *Baccharis boliviensis* fue recolectadas en los alrededores de la ciudad de La Paz (Bolivia), secadas y maceradas con etanol de 95°, obteniéndose un extracto etanólico rico en compuestos fenólicos, particularmente flavonoides, de acuerdo a un análisis por cromatografía en capa fina revelada con FeCl₃ y H₂SO₄. Debido al interés de nuestro grupo en éste tipo de compuestos de comprobada acción farmacológica [5], se realizaron separaciones por exclusión molecular utilizando una columna de Sephadex LH-20 para obtener una fracción rica en compuestos fenólicos, que por su tamaño son eluidos en las últimas fracciones. La fracción enriquecida en compuestos fenólicos fue sometida a diversas técnicas cromatográficas posteriores, lográndose aislar cuatro flavonoides (1-4), cuyas estructuras fueron determinadas principalmente mediante técnicas de RMN 1D y 2D (Tabla 1) y confirmadas mediante comparación con datos bibliográficos. Así, analizando los datos de RMN¹³C (Tabla 1) se puede observar que los cuatro compuestos (1-4) presentan señales características de metabolitos tipo flavonoide, observándose un esqueleto de 15 carbonos, la mayor parte de ellos en la zona de carbonos sp², uno de ellos correspondiente a un grupo carbonilo alrededor de 180 ppm en los compuestos 2, 3 y 4, típico de flavonas y a 196,8 ppm en el compuesto 1, característico de flavanonas. En la zona alifática se observan pocas señales, en la mayoría de los casos correspondientes a grupos metoxilo (aproximadamente a 60 ppm) y en el compuesto 1 se observa adicionalmente un carbono ligado a oxígeno a δ 79 y un carbono α a carbonilo a δ 42,8 asignados a los carbonos 2 y 3 de una flavanona. Por tanto, tenemos 3 flavonas (2, 3 y 4) y una flavanona (1). Los espectros de RMN¹H (Figura 2, Tabla 1) muestran también señales características de flavonoides. Así en el compuesto 1, se observa un sistema *orto*, *orto-meta*, *meta* correspondiente a los protones H-5' a δ 6,68 *d* (8,1), H-6' a δ 6,82 *d* (8,1;1,7) y H-2' a δ 6,74 *d* (1,7) correspondiente al anillo B, un singulete correspondiente al H-8 a 5,9 ppm, sugiriendo que el resto de posiciones del anillo A están sustituidas, un grupo metoxilo a 3,7 ppm y finalmente un sistema ABX alifático correspondiente a los protones H-2 a δ 5,14 *dd* (12,9; 2,8) y H-3 a δ 2,62 *dd* (17,2; 3,0) y 2,95 *dd* (17,2; 12,9). La posición de los sustituyentes fue determinada mediante las correlaciones heteronucleares a larga distancia. Así por ejemplo se observa que los protones del grupo metoxilo correlacionan con el C-6, el cual correlaciona a su vez con el H-8 y este con el C-10 que tiene una conectividad a J₃ con los protones H-3 (Figura 3). Esto confirma la posición del grupo metoxilo en C-6 y la posición del único protón del anillo A en C-8, por tanto las posiciones C-5 y C-7 se encuentran sustituidas y de acuerdo a sus desplazamientos químicos en RMN¹³C las sustituciones son grupos hidroxilo. Finalmente las estructura propuesta fue confirmada mediante comparación con datos bibliográficos, determinándose que este compuesto recibe el nombre de **Filifolin** y fue anteriormente aislado en las especies *Eupatorium subhastatum*. [6] y *Bracteantha viscosa* [7]

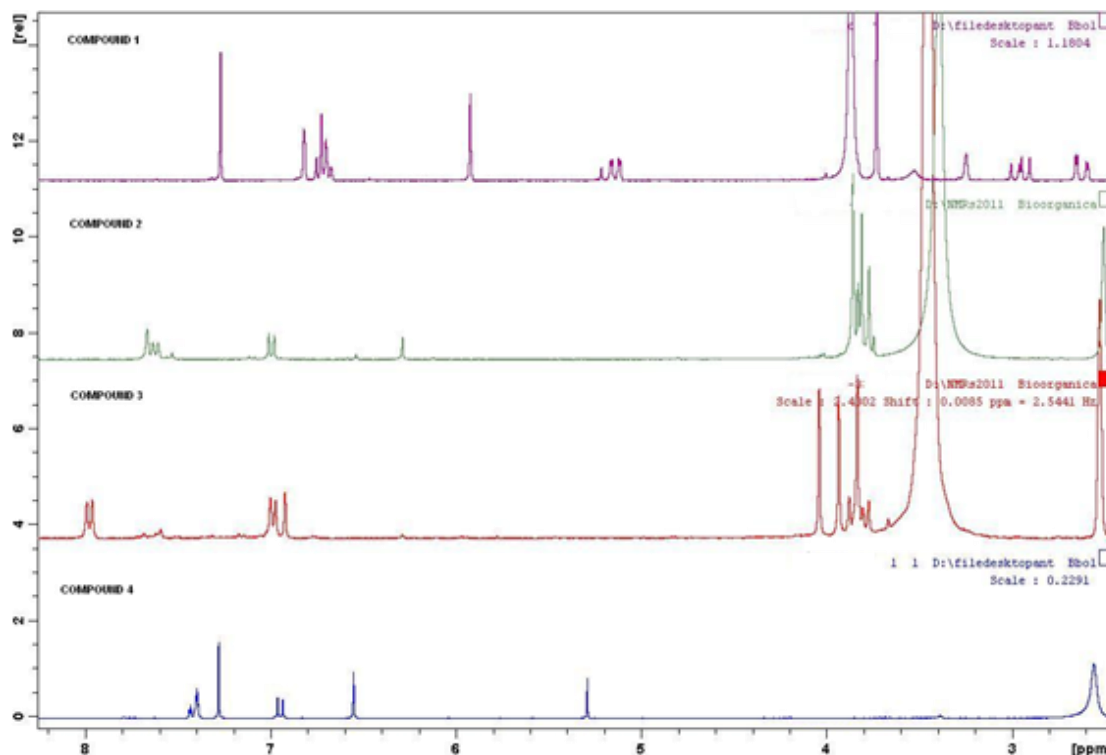


Figura 2. Espectros de RMN^1H de los flavonoides 1-4 aislados de *Baccharis boliviensis*

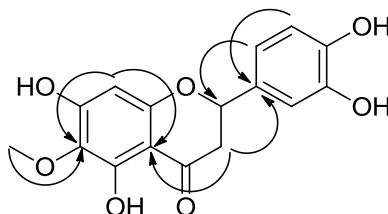


Figura 3. Correlaciones HMBC importantes del compuesto 1

Los compuestos **2** y **3** tienen espectros y estructuras muy similares entre sí, son flavonas polimetoxiladas poseyendo el compuesto **2** cinco grupos metoxilo mientras que el compuesto **3** posee solo 3 grupos metoxilo. En ambos compuestos el anillo **A** está completamente sustituido, el carbono C-5 está hidroxilado ya que los espectros de RMN^1H muestran la presencia de un protón a desplazamiento mayor a 12 ppm característico del OH-5 con el protón quelado por el grupo carbonilo. Las posiciones 6, 7 y 8 están metoxiladas ya que muestran los grupos metoxilo que correlacionan a J_2 con los carbonos C-6, C-7 y C-8, respectivamente, lo cual se puede observar al analizar los espectros de heterocorrelación HMBC. En el compuesto **2** no se observa la señal del H-3 por lo que también esta posición está sustituida y adicionalmente se observa las señales correspondientes al anillo **B** con un sistema *orto*, *orto-meta*, *meta* correspondiente a los protones H-5', H-6' y H-2' donde no se puede distinguir claramente la constante de acoplamiento *meta* que solo causa un ensanchamiento de las señales correspondientes. Por tanto el anillo **B** se encuentra sustituido en C-3' y C-4'. De acuerdo a los desplazamientos químicos de carbono, todas las sustituciones son oxigenadas, sin embargo el grupo metoxilo fue localizado en C-4' y un grupo hidroxilo en C-3' debido a la correlación de los protones del metoxilo con el C-4' y de este carbono con los protones H-2'/H-6' que a su vez correlacionan con el C-2. El compuesto **3** (**Xanthomicrol**) muestra un singulete para el H-3 y un sistema paradisustituido para el anillo **A**. Fue aislado en nuestro laboratorio de otra especie del mismo género, *B. pentlandii* [8], por lo que fue identificado por comparación con la muestra de laboratorio y por comparación con datos bibliográficos [8 y 9]. Es importante mencionar que este compuesto fue reportado como el principal componente citotóxico y potencial agente anti-cáncer de *Dracocephalum kotschyii* una especie medicinal tradicionalmente usada en Irán contra cáncer [9]. Además que existen varios antecedentes de compuestos polimetoxilados, similares a los

compuestos **2** y **3**, que muestran una importante actividad biológica [10] por lo que resultan interesantes para posteriores estudios farmacológicos.

Tabla 1. Datos de RMN¹H y RMN¹³C de los flavonoides **1**, **2**, **3** y **4** aislados de *B. boliviensis*

Nº	1*		2 ^y		3 ^y		4*	
	¹ H δ	¹³ C δ	¹ H δ	¹³ C δ	¹ H δ	¹³ C δ	¹ H δ	¹³ C δ
2	5,14dd(12,9; 2,8)	79,0		155,6		164,7		164,3
3	2,62dd(17,2;3,0) 2,95 dd(17,2;12,9)	42,8		131,9	6,7 s	103,1	7,4 s	103,8
4		196,8		178,7		183,0		183,6
5		154,9		156,4		149,0		153,8
6		128,9		127,9		136,3		129,6
7		145,1		128,3		152,4		154,5
8	5,92 s	95,1		137,9		133,1	5,3 s	96,7
9		144,7		147,9		145,7		148,2
10		102,4		104,5		106,7		105,5
1'		129,9		121,4		121,5		122,4
2'	6,74 d(1,7)	113,2	6,9 bs	112,0	8,0 d(8,4)	129,0	6,9 d(2,1)	112,6
3'		158,9		148,4	6,9 d(8,4)	116,6		146,9
4'		158,5		150,3		161,9		145,5
5'	6,68 d(8,1)	118,1	7,0 d(8,4)	116,3	6,9 d(8,4)	116,6	6,6 d(8,3)	116,0
6'	6,82 d(8,1;1,7)	115,0	7,6 bd(8,4)	122,6	8,0 d(8,4)	129,0	7,3 dd(8,3;2,1)	120,7
2-OMe			3,76 s	60,2				
6-OMe	3,73 s	60,4	3,82 s	61,6	3,7 s(4,2)	61,0		
7-OMe			3,85 s	61,4	4,2 s(3,0)	61,9		
8-OMe			3,80 s	60,6	3,8 s(2,9)	62,4		
4'-OMe			3,8 s	55,9				

Solvente: *CDCl₃, ^yDMSO; Equipo: Bruker de 300 MHz; J en Hz entre paréntesis

Finalmente, el compuesto **4** es una flavona pentahidroxilada identificada como **6-hidroxiluteonin**, aislada previamente en especies como *Pinguicula vulgaris* y *Utricularia vulgaris* [11]. En el espectro de RMN¹H se observan dos singuletes a 7,4 y 5,3 ppm correspondientes a los protones H-3 y H-8 respectivamente, además de un sistema *orto*, H-5' a δ 6,6 d(8,3), *orto-meta* a δ 7,3 dd(8,3; 2,1), *meta* a δ 6,9 d(2,1), correspondiente a los protones del anillo B. No tiene grupos metoxilo por lo que el resto de las posiciones están sustituidas por grupos hidroxilo, lo que concuerda con su espectro de RMN¹³C (Tabla 1). Todos los datos fueron confirmados por comparación con datos bibliográficos [11] y [12]

PARTE EXPERIMENTAL

General

Los solventes utilizados fueron purificados por destilación antes de su uso. Los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad en un rotaevaporador Heidolph acoplado a una bomba de membrana. Para la separación en cromatografía líquida al vacío (VLC) se utilizó Silica Gel 60 (63-200 mesh) como adsorbente y como eluyente solventes en orden creciente de polaridad Éter de Petróleo al 100 %; Éter de Petróleo: AcOEt al 50 % y AcOEt al 100 %. Para la cromatografía por exclusión molecular se utilizó Sephadex LH-20. Para la purificación se utilizó una cromatografía en capa fina preparativa (TLCp) utilizando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH 2% y finalmente se utilizaron varias

técnicas de re-cristalización, con diferentes solventes para el aislamiento de los compuestos. El seguimiento de todo el proceso de aislamiento se realizó con cromatografía en capa fina utilizando placas de Silica Gel 60 F₂₅₄ para análisis (TLC 0.25 mm Merck). Como revelador se utilizó H₂SO₄ al 5 % y FeCl₃ al 10 %. Los espectros de RMN fueron obtenidos en un espectrofotómetro Bruker de 300 MHz utilizando como solventes CDCl₃ y DMSO *d*₆, los desplazamientos químicos δ están listados en ppm con referencia a la señal de solventes.

Material vegetal

La especie vegetal *Baccharis boliviensis* fue recolectada en Octubre del año 2011 por el Lic. Alberto Calle, en el campus universitario de Cota Cota (3 800 m.s.n.m.), un área correspondiente al valle de La Paz. Bolivia. La identificación botánica se realizó por la Lic. Esther Valenzuela experta del Herbario Nacional de Bolivia, donde se puede encontrar un ejemplar de la misma.

Extracción y aislamiento

Las partes aéreas de la especie en estudio fueron secadas y molidas dando un total de 500 g. Este material vegetal fue sometido a una extracción por maceración, a temperatura ambiente, con EtOH de 96° durante 15 minutos, obteniendo un extracto que fue concentrado por rotaevaporación hasta sequedad, dando 48 g de extracto crudo, con un rendimiento del 9,6 % respecto a la planta seca.

El extracto etanólico seco fue sometido inicialmente a una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20, utilizando MeOH como solvente. Las últimas fracciones de la cromatografía de exclusión molecular se unieron y se sometieron a una separación por cromatografía VLC en silica gel, con gradiente de solvente, utilizando diferentes mezclas de Éter de Petróleo y Acetato de Etilo, las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa fina TLC, reagrupadas y luego sometidas a otras sucesivas separaciones en Sephadex y cromatografía en capa fina preparativa (TLCp), lográndose aislar seis compuestos que finalmente se purificaron mediante técnicas de recristalización dando: 30 mg del compuesto **1**, 20 mg del compuesto **2**, 30 mg del compuesto **3**, 25 mg del compuesto **4**, 52 mg del compuesto **5** y 43 mg del compuesto **6**.

El compuesto **1** (5,7,3',4'-tetrahidroxi-6-metoxiflavonona) **Filifolin**, fue aislado anteriormente de la especie *Eupatorium subhastatum* [6] y es reportado por primera vez en la especie *Baccharis boliviensis*. Cristales amarillos de fórmula molecular C₁₆H₁₄O₇. Datos de RMN¹H y RMN¹³C (Tabla 1).

El compuesto **2** (5,3'-dihidroxi-3.6.7.8.4'-pentametoxiflavona) fue aislado de las especies *Gutierrezia* spp., *Zieridium pseudoobtusifolium*, *Acronychia porteri*, *Polanisiado decandra* y *Calycadenia* sp. Es reportado por primera vez en esta especie y fue cristalizado dando cristales amarillos tipo aguja de fórmula molecular C₂₀H₂₀O₉. Datos de RMN¹H y RMN¹³C (Tabla 1).

El compuesto **3** (5,4'-dihidroxi-6.7.8-trimetoxiflavona). **Xanthomicrol** fue aislado de las especies de *Ambrosia deltoidea*, *Baccharis* spp., *Citrus sudachi*, *Mentha piperita*, *Micromeria chamissonis*, *Sideritis* spp. y *Thymus* spp [8,9,10]. Es reportado por primera vez en la especie *Baccharis boliviensis* en la cual fue aislada como cristales de color amarillo, de fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇. Datos de RMN¹H y RMN¹³C (Tabla 1).

El compuesto **4** (5,6,7,3',4'-pentahidroxiflavona) **6-Hidroxiluteolin** fue aislado anteriormente de *Pinguicula vulgaris* y *Utricularia vulgaris* [11] y es reportado por primera vez en esta especie donde fue aislado en forma de cristales tipo aguja de color amarillo de fórmula molecular C₁₅H₁₀O₇. Datos de RMN¹H y RMN¹³C (Tabla 1).

El compuesto **5** denominado **Acido Bacchabolivico** fue aislado anteriormente de la misma especie *Baccharis boliviensis* [3] y durante este trabajo fue aislado en forma de cristales incoloros de P.f. 147-149°C. La fórmula molecular calculada en base a sus datos de RMN¹³C es C₂₀H₂₈O₃. Su determinación estructural se realizó mediante un análisis de datos de RMN 1D y comparación con los datos reportados. Así muestra las siguientes señales de RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 17,9 (C-1), 26,6 (C-2), 120,7 (C-3), 143,6 (C-4), 38,7 (C-5), 35,5 (C-6), 21,5 (C-7), 49,1 (C-8), 37,8 (C-9), 46,3 (C-10), 40,5 (C-11), 18,3 (C-12), 125,2 (C-13), 111,1 (C-14), 138,6 (C-15), 142,6 (C-16), 181,6 (C-17), 19,9 (C-18), 20,0 (C-19), 17,9 (C-20), que coinciden con las reportadas [3].

El compuesto **6** denominado **1'-O - Bacchabolivil Xilopiranosido** fue purificado en mezclas de AcOEt y Éter de Petróleo 20-40, obteniéndose cristales incoloros en forma de aguja de P.f. 120-121°C. La fórmula molecular fue calculada en base a datos de RMN¹³C dando la fórmula C₃₁H₄₂O₁₀. Su determinación estructural se realizó mediante un análisis de datos de RMN 1D y comparación con los datos reportados. Así muestra las siguientes señales RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 17,9 (C-9), 26,6 (C-2), 120,7 (C-3), 143,4 (C-4), 38,9 (C-5), 35,6 (C-6), 21,5 (C-7), 49,0 (C-8),

37,8 (C-9), 46,3 (C-10), 39,9 (C-11), 18,2 (C-12), 125,6 (C-13), 110,8 (C-14), 138,3 (C-15), 143,6 (C-16), 173,3 (C-17), 19,9 (C-18), 20,0 (C-19), 18,0 (C-20), 94,2 (C-1'), 72,5 (C-2'), 76,3 (C-3'), 69,4 (C-4'), 77,2 (C-5'), 66,1 (C-6') que coinciden con las reportadas [3].

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al FEMCIDI/OEA por el financiamiento al proyecto "Desarrollo de productos naturales Fitoterapéuticos", a fondos IDH/UMSA por el financiamiento al proyecto "Productos terapéuticos y cosméticos Parte III" y a la Agencia Sueca ASDI por el financiamiento al proyecto "Estudio de la Biodiversidad Vegetal".

REFERENCIAS

- [1] BOHLMANN, F.; BANERJEE, J.; JAKUPOVIC, M.; GRENZ, L.; MISRA ET AL. 1985. Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 24:511-515.
- [2] GIRAULT L. 1987. *Kallawayas, curanderos itinerantes de los Andes. Investigación sobre plantas medicinales y mágicas. Bolivia*. Unicef, Quipus, La Paz - Bolivia
- [3] ZDERO, C.; BOHLMANN, J.C.; SOLOMON, R.M.; KING, H. & ROBINSON. 1989. Ent-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 28:531-542.
- [4] CAZÓN, AV.; DE VIANA, M.L. & GIANELLO, J.C. 2000. Identificación de un compuesto alelopático de *Baccharis boliviensis* (Asteraceae) y su efecto en la germinación de *Trichocereus pasacana* (Cactaceae). *Rev. Biol. Trop.* 48: 47-51
- [5] MABRY, T. J. AND MARKHAM, K. 1975 in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. and Mabry, H., eds.), Vol. 1, p. 94. Academic Press, New York.
- [6] FERRAGO G., MARTINO V., BORRAJO G., COUSSIO J.D. 1987. 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavanone from *Eupatorium subhastatum*.
- [7] WOLLENWEBER, K.; MANN, F. J.; ARRIAGA-GINER, J. N.; ROITMAN, J. G.; WESTI. 1993. Exudate flavonoids from two Australian Asteraceae, *Bracteantha viscosa* and *Cassinia quinquefaria*, *Phytochemistry*, Vol. 33, No. 4, pp. 871-873.
- [8] TARQUI S., FLORES Y., ALMANZA G.R. Polioxygenated flavonoids from *Baccharis pentlandii*, *Revista Boliviana de Química* Vol. 29, No.1, pp. 10-14
- [9] FERESHTEH J., SOLTAN A. E., NAHID R-R., MASSOUD M. 2005. *Xanthomicrol is the main cytotoxic component of Dracocephalum kotschyii and a potential anti-cancer agent*, *Phytochemistry* Vol. 66, pp.1581-1592
- [10] ROITMAN, J. & JAMES L.F. 1985. Chemistry of toxic range plants highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry* Vol. 24, pp 835-845.
- [11] JAY M. & GONNET J. F. 1974. Les flavonoides de deux Lentibulariaceae: *Pinguicula vulgaris* et *Utricularia vulgaris*, *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 2, pp. 47-51.
- [12] KAWABATA J., MIZUHATA K., SATO E., NISHIOKA T., OAYAMA Y., KASAI T. 2003. 6-Hydroxyflavonoids as α -glucosidase inhibitors from *Marjoram* (*Origanum majorana*) leaves, *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, Vol. 67 N°2, pp. 445-447