

## Compuestos Polifenólicos aislados de *Pluchea sagittalis* (Compuestas)

VIRGINIA S. MARTINO, GRACIELA E. FERRARO,  
SILVIA L. DEBENEDETTI y JORGE D. COUSSIO

IQUIMEFA (Instituto de la Química y Metabolismo del Fármaco) UBA-CONICET,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica,  
Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113), Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (Compuestas) fueron aislados tres flavonoles metilados: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona; 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona y 5,3',4'-trihidroxi-3,6,7-trimetoxi-flavona. Del extracto de éter etílico fue aislado ácido isochlorogénico y del extracto de acetato de etilo los ácidos clorogénico y cafeico. Estos compuestos fueron identificados en base a su análisis espectroscópico y algunos de ellos por comparación cromatográfica con muestras patrones.

SUMMARY Three methoxylated flavonols: 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3,6,8-trimethoxy flavone; 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone and 5,3',4'-trihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone were isolated from the chloroform extract from the aerial parts of *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (Compositae). Isochlorogenic acid was isolated from the ether extract and chlorogenic and caffeic acids from the ethyl acetate extract. These compounds were identified on the basis of spectroscopic analysis and some of them by comparison with authentic samples.

### INTRODUCCION

La familia Compuestas, ampliamente distribuida en todo el territorio de nuestro país, comprende un gran número de especies utilizadas en medicina popular. De algunas especies de esta familia que son empleadas en medicina folklórica como digestivas, colagogas y coleréticas, se han aislado diversos compuestos polifenólicos del tipo de los flavonoides, ácidos cafeoilquínicos y cumarinas.

*Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, perteneciente a la familia Compuestas, es una planta medicinal de amplia difusión en la región noreste de nuestro país. Crece también en lugares húmedos del

sur de Brasil, Paraguay y Uruguay.

Se la conoce con el nombre vulgar de "lucero" o "lusera" o "yerba del lucero" y en el noroeste de nuestro país (en la provincia fitogeográfica de las Yungas) con el nombre de "cuatro cantos".

Es utilizada como digestiva, estomáquica, carminativa, tónico amargo, antiespasmódica, febrífuga y resolutive en forma de té o infusión antes o después de las comidas o agregada al mate amargo<sup>1-3</sup>. En Brasil es utilizada también como emenagoga<sup>4</sup>.

En Entre Ríos su extracto es usado para la fabricación de un licor digestivo y aperitivo cuya explotación está a

PALABRAS CLAVE: *Pluchea sagittalis*, (Compuestas), flavonoides, ácidos cafeoilquínicos.

KEY WORDS: *Pluchea sagittalis* (Compositae), flavonoids, caffeoilquinic acids.

cargo de una firma comercial en Concepción del Uruguay.

Existen algunos trabajos previos de esta planta realizados sobre su contenido de aceites esenciales<sup>5-7</sup>, compuestos sesquiterpénicos<sup>8</sup> y polifenoles<sup>9,10</sup>.

En 1937 Bonorino Udaondo y colaboradores<sup>1</sup> hicieron un estudio clínico del efecto de la ingestión de *P. sagittalis* sobre pacientes con diferentes padecimientos hepáticos y observaron que ésta ejercía una acción colagoga y fluidificante de la secreción biliar.

En el presente trabajo se describe el aislamiento e identificación de los compuestos polifenólicos presentes en dicha planta.

#### MATERIALES Y METODOS

El material vegetal fue recolectado en Concepción del Uruguay, Pcia. de Entre Ríos, en febrero de 1975 en las proximidades de la fábrica del aperitivo "Lusera". La determinación taxonómica de *P. sagittalis* fue realizada por la Dra. Stella Beatriz Sorarú. Un ejemplar de herbario se halla depositado en la Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Los espectros UV fueron realizados en un espectrofotómetro marca Beckman DBG con red de difracción y cubetas de cuarzo de 1 cm y en un Shimadzu UV 240 con microprocesador y registrador PR1.

Los espectros infrarrojos fueron realizados en un equipo Beckman Microspec en fase sólida utilizando pastillas de bromuro de potasio.

Los espectros H<sup>1</sup>-NMR fueron registrados en un equipo Perkin Elmer R-12 (60 MHz) y en un Varian FT 80A.

El material vegetal (1,7 kg, partes aéreas) fue extraído con metanol acuoso al 25% por maceración. El extracto así ob-

tenido fue llevado a sequedad, tomado con agua y particionado con solventes de polaridad creciente: éter de petróleo, cloroformo, éter etílico y acetato de etilo.

El extracto clorofórmico fue fraccionado por cromatografía en columna de Sephadex LH<sub>20</sub> eluída con benceno, benceno-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol. Se separaron tres fracciones que fueron purificadas por cromatografía preparativa aislando así tres flavonoides que fueron identificados como:

*5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona*<sup>9</sup>: I. Color a la luz ultravioleta (366 nm): marrón rojizo. UV/NH<sub>3</sub>: viraje al amarillo. Cromatografía en papel usando como solventes TBA y AcH 15%, Rf: 0,96 y 0,41, respectivamente. Pf (Et OH) 167-169 °C. UV y H<sup>1</sup>-NMR (ver tablas 1 y 2) MS m/e 376 (100%, M), 361 (100%, M-15), 333 (10%, M-43), 213 y 137.

*5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona* (centaureidina)<sup>11</sup>: II. Color a la luz ultravioleta (366 nm): marrón rojizo. UV/NH<sub>3</sub>: no hay cambio. Cromatografía en papel usando como solventes TBA y AcH 15%, Rf: 0,90 y 0,20, respectivamente. UV y H<sup>1</sup>-NMR ver tablas 1 y 2.

*5,3',4'-trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona* (chrysofenol D)<sup>11</sup>: III. Color a la luz ultravioleta (366 nm): marrón rojizo. UV/NH<sub>3</sub>: viraje al amarillo. Cromatografía en papel usando como solventes TBA y AcH 15%, Rf: 0,95 y 0,29, respectivamente. Pf (MeOH) 236-237 °C (lit. 235-236 °C)<sup>12</sup>. UV y H<sup>1</sup>-NMR (ver tablas 1 y 2).

El extracto de éter etílico fue sometido a una cromatografía en columna de Sílica gel PF254. De las fracciones eluídas con cloroformo-metanol precipitó una sustancia amarilla amorfa que fue identificada como:

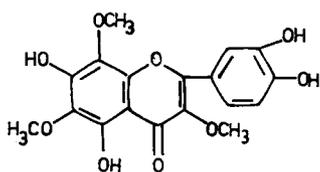
*Acido isoclorogénico*<sup>10</sup>: IV-VI: Color a la luz ultravioleta (366 nm) celeste. UV/NH<sub>3</sub>: viraje al color verde. Cromatografía en papel usando como solvente HCl 0,1 N y AcH 15%, Rf: 0,17 y 0,36, respectivamente. UV λ máx MeOH (nm): 235,245,295 sh, 328. NaOMe: 266, 308 sh, 375. IR (cm<sup>-1</sup>) 3350, 2925, 2875, 2350, 1700, 1610, 1520, 1460, 1380, 1290, 1160, 1100, 980, 930 850, 780.

	MeOH	NaOMe	AlCl <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub> / HCl	NaOAc	NaOAc / H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
5,7,3,4'-tetrahidroxi- 3,6,8-trimetoxiflavona I	345 (275)	385 (320)	435 (365)	365 (320)	380 270	367 265
5,7,3'-trihidroxi- 3,6,4'-trimetoxiflavona II	345 (272)	382 (310)	(410) 375 (305) (285) 270	(410) 367 (285) 265	375 275	355 275
5,3',4'-trihidroxi- 3,6,7-trimetoxiflavona III	352 (275)	405 270	435 (342) (309) 280	(410) 380 (302) (286) 272	402 263	377 263

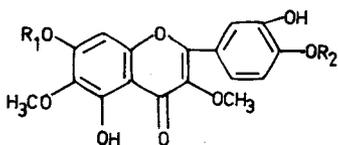
Tabla 1. Datos del espectro ultravioleta ( $\lambda$  max nm) de los flavonoides de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. Los valores entre paréntesis corresponden a inflexiones ("shoulders").

	H2'	H6'	H5'	H8	OMe
5,7,3',4'-tetrahidroxi- 3,6,8-trimetoxiflavona I	7.60 d J = 16	7.60 d J = 16	6.85 d J = 8		3.97 3.85 3.80
5,7,3 -trihidroxi- 3,6,4 -trimetoxiflavona II	7.46 d	7.65 d	6.97 d	6.71 s	4.04 3.98 3.86
5,3',4'-trihidroxi- 3,6,7-trimetoxiflavona III	7.45 d	7.60 d	6.97 d	6.86 s	3.93 3.81 3.75

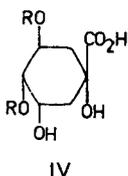
Tabla 2. Datos del espectro de resonancia magnética nuclear de los flavonoides de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera. Los desplazamientos están dados en ppm (escala  $\delta$ ) usando TMS como standard interno. d=doblete, s=singulete. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hz.



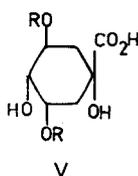
I  
5,7,3,4-tetrahydroxi-3,6,8-trimetoxiflavona



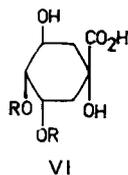
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
II	H	CH <sub>3</sub>
III	CH <sub>3</sub>	H



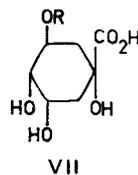
IV



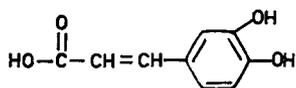
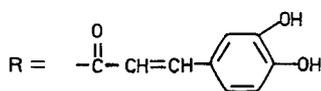
V



VI



VII



ácido cafeico  
VIII

**Hidrólisis.** 52 ml de ácido isoclorogénico fueron disueltos en 2 ml de solución 2 N de hidróxido de sodio y calentados en baño maría durante 1 h 30'. Se neutralizó la solución con ácido clorhídrico 2 N. La fase acuosa fue extraída con éter etílico (3 x 5 ml) y ambas con-

centradas a presión reducida. Por TCL (silicagel 60 F 254) en cloroformo-acetato de etilo-ácido fórmico (5:4:1) contra una muestra patrón de ácido cafeico se comprobó la presencia del mismo en el hidrolizado. La fase acuosa remanente fue sembrada en papel Whatman N° 1 y corrida en butanol-ácido fórmico agua (4:1:5) contra un testigo de ácido quínico, comprobándose la presencia del mismo en el hidrolizado.

**HPLC de ácido isoclorogénico:** Se realizó en un aparato Spectra Physics 3500B provisto de un detector UV770 de longitud de onda variable y una computadora integradora SP 4100. Se utilizó una columna de Lichrosorb RP 18 10 μ 250 x 4 mm. Se usó como solvente una mezcla de metanol-solución 0,1 N de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (33:67). Flujo: 0,8 ml/min. La detección se realizó a 350 nm. Se inyectaron soluciones de ácidos 3,4; 3,5 y 4,5 dicafeoilquínicos al 0,1%.

El ácido isoclorogénico aislado se separó por este método en tres picos correspondientes a los tres ácidos dicafeoilquínicos arriba mencionados (Fig. 1).

El extracto de acetato de etilo fue fraccionado por cromatografía en columna de Sephadex LH20 y eluido con etanol al 50 % llevado a pH 4 con ácido clorhídrico. De distintas fracciones de esta columna fueron eluidos e identificados:

**Acido clorogénico** (ácido 3-O-cafeoil-D-quínico): VII. Color a la luz ultravioleta (366 nm): celeste. UV/NH<sub>3</sub>: viraje al color verde. Cromatografía en papel usando como solventes HCl 0,1 N y AcH 15%, R<sub>f</sub>: 0,52 y 0,49, respectivamente. UV λ máx MeOH (nm): 245, 253, 300 sh, 328. IR (cm<sup>-1</sup>) 3350, 2950, 2625, 1650, 1530, 1390, 1290, 1200, 1080, 1040, 980, 915, 820.  
**Acido cafeico:** VIII. Color a la luz ultravioleta (366 nm): celeste. UV/NH<sub>3</sub>: se intensifica el color. Cromatografía en papel usando como solventes HCl 0,1 N y AcH 15% R<sub>f</sub> 0,24 y 0,40 respectivamente. UV λ máx MeOH (nm): 242, 297

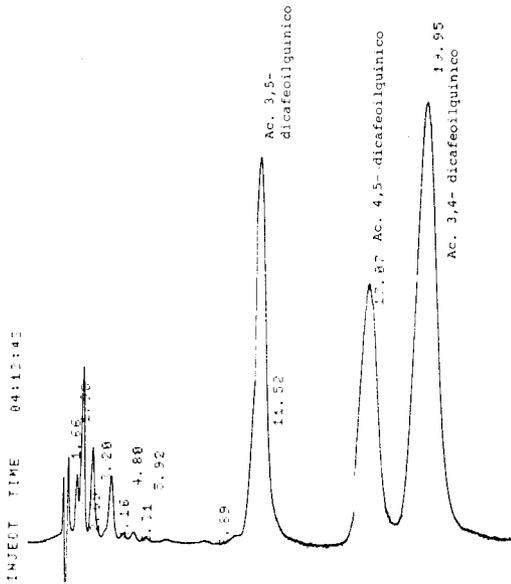


Figura 1. Cromatografía líquida de alta performance de ácido isoclorogénico.

sh, 322 . IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3325, 3130, 1620, 1520, 1460, 1270, 1196, 1090, 960, 980, 846, 800 y 780.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La 5,7,3'-trihidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona y la 5,3',4'-trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona fueron identificadas a través del análisis de sus espectros ultravioleta y de resonancia magnética nuclear<sup>11</sup>. Estos dos flavonoles metilados habían sido aislados ya de otras fuentes naturales<sup>12-19</sup>.

En cuanto a la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6,8-trimetoxiflavona, ésta ha sido aislada por primera vez en la naturaleza. Su estructura fue determinada por el estudio de sus espectros ultravioleta, de resonancia magnética nuclear y de masa<sup>9</sup>.

La identificación de los ácidos clorogénico, isoclorogénico y cafeico se hizo por comparación cromatográfica contra muestras patrones y estudio de los espectros ultravioleta e infrarrojo. Estos compuestos han sido aislados reiteradamente de diversas fuentes naturales, en

tre ellas del café, té y yerba mate<sup>20,21</sup>.

El ácido isoclorogénico es una mezcla de tres isómeros: los ácidos 3,4 (IV); 3,5 (V) y 4,5 (VI) dicafeoilquínicos. La separación de estos tres ácidos en cromatografía en capa fina y papel es dificultosa. Se logró la separación de los mismos por cromatografía líquida de alta performance y fueron identificados estos tres ácidos por comparación con muestras patrones.

En Europa se conocía desde la antigüedad el uso de los extractos o infusión de las hojas de *Cynara scolymus* (Compositae), de nombre vulgar "alcachofa", en el tratamiento de afecciones hepáticas y por sus propiedades diuréticas, coleréticas e hipocolesteremiantes.

Fue recién en 1965 que investigadores italianos<sup>22</sup> determinaron la estructura de su principio activo, la cinarina (ácido 1,5-dicafeoil-D-quínico), responsable de la acción farmacológica de la droga<sup>23</sup>. Por otra parte numerosos investigadores han demostrado que los ácidos isoclorogénico, clorogénico y cafeico poseen una marcada acción colagoga y colerética<sup>24</sup>.

Es importante recordar que *P. sagittalis* es utilizada en medicina popular en forma de infusión. Dada la solubilidad de los ácidos cafeoilquínicos en agua caliente, su uso como digestiva, colagoga y colerética estaría ampliamente justificado por la presencia de los mismos en la infusión.

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos a la Dra. Stella B. Sorarú por la recolección y clasificación del material botánico. Al Profesor Dr. Benjamín Frydman (Cátedra de Fitoquímica, Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA) por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Este trabajo fue financiado en parte por el subsidio N° 6324/h de 1982 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bonorino Udaondo, C., G.P. Goñalons, A.R. Basile, H. Zunino y J.J. Lacour (1937) *Boletín de la Academia Nacional de Medicina* 20: 441-58
2. Parodi, D (1881) "*Ensayo de Botánica Médica Argentina Comparada*", Tesis, P. Coni, Buenos Aires, 48
3. Hieronymus, J. (1882) *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*, Tomo IV: 343
4. Moraes, M (1881) "*Phytographia ou Botanica Brasileira*", Río de Janeiro, 236 y 240
5. Fester, G.A., E.A. Martinuzzi, J.A. Retamar y A.I.A. Ricciardi (1955) *Revista de Ingeniería Química* 24: 37-55
6. Talenti, E.C.J. (1976) *Esss. Deriv. Agrum.* XLVI, 40-57
7. Talenti, E.C.J. (1982) *Ess. Deriv. Agrum.* LII, 21-7
8. Bohlmann, F., S. Ziesche, R.M. King y H. Robinson (1980) *Phytochem.* 19: 969-70
9. Martino, V.S., G.E. Ferraro y J.D. Coussio (1976) *Phytochem.* 15: 1086-7
10. Martino, V.S., S.L. Debenedetti y J.D. Coussio (1979) *Phytochem.* 18: 2052
11. Martino, V.S., G.E. Ferraro, S.L. Debenedetti y J.D. Coussio, *Anales de la Asoc. Quím. Arg.*, enviado a publicar
12. Ghisalberti, E.L., P.R. Jefferies y C.I. Stacey (1967) *Aust. J. Chem.* 20: 1049-53
13. Rodríguez, E., N.J. Carman, G. Vander Velde, J.H. Mc. Reynolds, T.J. Mabry, M.A. Irwin y T.A. Geissman (1972) *Phytochem.* 11: 3509-14
14. Bohlmann, F. y C.H. Zdero (1967) *Tetrahedron Letters* 3239-42
15. Kupchan, S. y E. Bauerschmidt (1971) *Phytochem.* 10: 664-6
16. Herz, W., S.V. Bhat y V. Sudarsanian (1972) *Phytochem.* 11: 1829-31
17. Timmerman, B.N., R. Mues, T.J. Mabry y A. Michael Powell (1979) *Phytochem.* 18: 1855-8
18. Shimizu, M. y N. Morita (1968) *Chem. Pharm. Bull.* 16: 2310-1
19. Roberts, M.I., B.N. Timmerman y T.J. Mabry (1980) *Phytochem.* 19: 127-9
20. Barnes, H.M., J R. Feldman y W.V. White (1950) *J. Am. Chem. Soc.* 72: 4178-82
21. Scarpati, M L. y P. Esposito (1963) *Tetrahedron Letters* 18: 1147
22. Panizzi, L. y M.L. Scarpati (1965) *Gazz. Chim. Ital.* 95: 71-82
23. Preziosi, P. y B. Loscalzo (1956) *Fitoterapia* 27: 666-73
24. Czok, G. y P. Schulze (1973) *Z. Ernahrungswiss* 12: 224