

TRITERPENOS PENTACÍCLICOS EN PROPÓLEO

Julio César Bracho Pérez^{1*}, Carmen Rodríguez Best¹, Francisco Llanes²

RESUMEN

Los triterpenos pentacíclicos, acetato de lupeol (acetato de lup-20 (29) en-3 β) y acetato de β -amirina (acetato de olean-12-en-3 β), fueron identificados a partir de una fracción de baja polaridad de un propóleo pardo de origen tropical, mediante la aplicación de técnicas cromatográficas (CC, CCF) y espectroscópicas (IR, EM, RMN- H^1 , RMN- ^{13}C).

Palabras clave: propóleo, triterpenos pentacíclicos, acetato de β -amirina, acetato de lupeol.

PENTACYCLIC TRITERPENES IN PROPOLIS

ABSTRACT

Pentacyclic triterpenes, acetate of lupeol [acetate of lup-20(29)-en-3 β] and acetate of β -amyrine [acetate of olean-12-en-3 β], were identified in a low polarity fraction from a brown propolis of tropical origin by means of chromatographic (CC, TLC) and spectroscopic techniques (IR, MS, H^1 -NMR, ^{13}C -NMR).

Key words: propolis, pentacyclic triterpens, β -amyrine acetate, lupeol acetate.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es un producto apícola de aspecto resinoso y sabor amargo, con una coloración que varía del amarillo-verdoso al pardo-rojizo. Consiste básicamente en una mezcla de cera y exudados resinosos de diferentes plantas que la abeja obtiene para utilizarlo como material auxiliar en la protección de la colmena¹.

Los estudios de propóleos de diversas latitudes, han demostrado que tanto su composición como su actividad biológica, se encuentran directamente relacionadas con las especies vegetales, fuentes de resinas y bálsamos, que colectan las abejas propolizadoras². En este sentido, se han identificado diversos metabolitos secundarios como los flavonoides, ésteres del ácido cafeico, diterpenos, benzofenonas y constituyentes volátiles entre los que se encuentran los sesquiterpenos.³⁻⁸ Asimismo, han quedado establecidas sus propiedades antibiótica, fungicida, antiviral⁹ y antitumoral, entre otras.¹⁰

Las investigaciones realizadas en las últimas décadas, orientadas a determinar la composición química del propóleo a nivel mundial, han permitido establecer que los flavonoides no son los marcadores químicos principales, pues existen otros componentes novedosos como los triterpenos. Al respecto, el primer reporte sobre la presencia de este tipo de metabolito secundario fue la identificación del triterpeno acíclico escualeno (figura 1), precursor de los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos; considerado como el más importante de los triterpenos.^{11,12}

^{1*} Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina.
jcbracho@yahoo.edu.pe

² Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, Cuba.

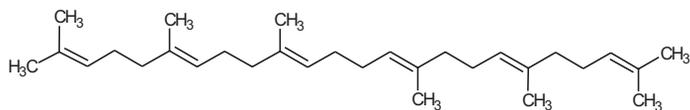


Figura 1. Estructura del escualeno, primer triterpeno identificado en el propóleo.

Posteriormente, dos equipos de investigación reportaron en 1998, la presencia de alcoholes triterpénicos y el triterpeno pentacíclico β -amirina (figura 2) en muestras de propóleos provenientes de Egipto¹³ y Brasil¹⁴, respectivamente.

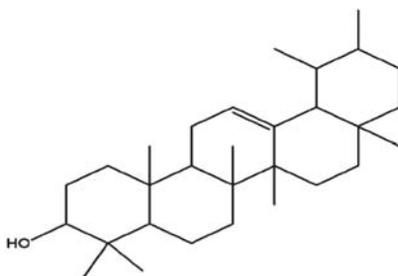


Figura 2. Estructura de la β -amirina

Investigadores como Abd El Hady y Hegazi, han identificado nuevos triterpenos: β -amirina y lupeol (figura 3); cuatro ésteres metilados del ácido triterpénico, que pertenecen a los tipos ursano y oleanano; un triterpeno tipo β -amirina y un triterpeno tipo lupano. También han confirmado la presencia de la β -amirina, en muestras de propóleos de origen egipcio.^{15,16}

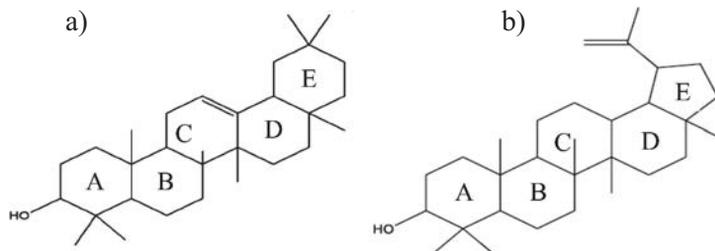


Figura 3. Estructuras de la α -amirina (a) y el lupeol (b)

La aplicación de la cromatografía gaseosa de alta resolución y alta temperatura acoplada a Espectrometría de Masas (HT-HRGC-MS) ha contribuido al reconocimiento de la importancia del contenido de los triterpenos en propóleos brasileños. En el estudio desarrollado por Pereira *et al.*, se identificaron cuatro triterpenos pentacíclicos: α -amirina, β -amirina, lupeol y lupenona. Además, se encontraron dos series de alcanosatos de triterpenilo, y por primera vez en propóleo, el 9,19-ciclolanosta-24-en-3-ol y su acetato¹⁷ (figura 4).

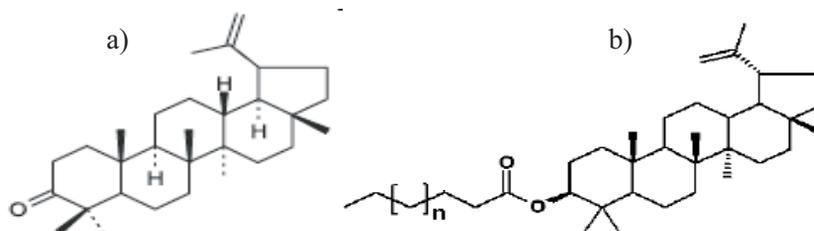


Figura 4. Nuevas estructuras de triterpenos pentacíclicos identificadas en propóleos de Minas Gerais, Brasil: lupenona (a), alcanosato de lupeol (b)

De acuerdo al avance de los trabajos sobre caracterización de propóleos brasileños de color verde, los triterpenos pentacíclicos constituyen en algunos casos, metabolitos secundarios muy importantes en su composición química. Tal como se ha observado, en el extracto de diclorometano para una muestra de propóleo proveniente de Sao Paulo, Brasil (tabla 1), que poseía una composición química mayoritariamente constituida por triterpenos pentacíclicos.¹⁸

Tabla 1. Triterpenos pentacíclicos presentes en un extracto de diclorometano de una muestra de Sao Paulo, Brasil

Nº	Triterpenos	%
1	α -amirina	0,4
2	β -amirina	1,0
3	Lupenona	3,4
4	Lupeol	16,9
5	Fridour-7-en-3-ona	1,9
6	Fridour-7-en-3-ol	3,1
7	Acetato de β -amirina	3,1
8	Acetato de lupeol	26,3

Sin embargo, los triterpenos no están presentes en todas las muestras de propóleos verdes y su cantidad relativa modifica la apariencia física de la muestra, que pierde dureza e intensidad del color verde, tornándose más cremosa y pulverulenta conforme se incrementan los niveles de triterpenoides. Ese aspecto es de gran utilidad para la búsqueda de propóleos, ya que existen propóleos verdes que no poseen este tipo de metabolitos o los poseen en muy bajas concentraciones.¹⁹

Los estudios de elucidación estructural permitieron identificar un nuevo triterpeno pentacíclico en un propóleo recolectado en el sudeste de Brasil, el acetato de Bauer-7-en-3 β -il (figura 5), que fue aislado a partir de un extracto clorofórmico perteneciente a una muestra de color crema pálido diferente al color verde típico en esa región.²⁰

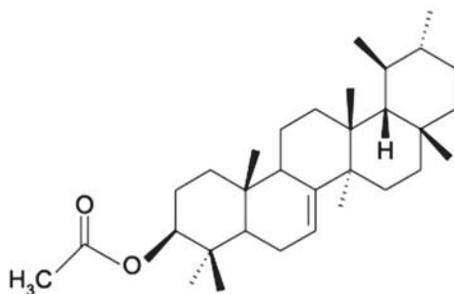


Figura 5. Nuevo triterpeno pentacíclico: acetato de Bauer-7-en-3 β -il.

En el primer estudio sobre la composición de una muestra de propóleo rojo, proveniente de la región norteña de Brasil, también se encontraron triterpenos pentacíclicos como: lupeol, α -amirina y β -amirina (figuras 2 y 3); este último el más abundante²¹, los que antes fueron identificados en propóleos brasileños de color verde.

Por otra parte, en la investigación fitoquímica de una muestra de Alto Santo-Ceará, Brasil, se identificaron diversos triterpenos pentacíclicos como: ácido canárico (3,4-seco derivado de lupano), lupeol, lupenona y germanicon²² (figuras 6a, 3b, 4a, y 6b).

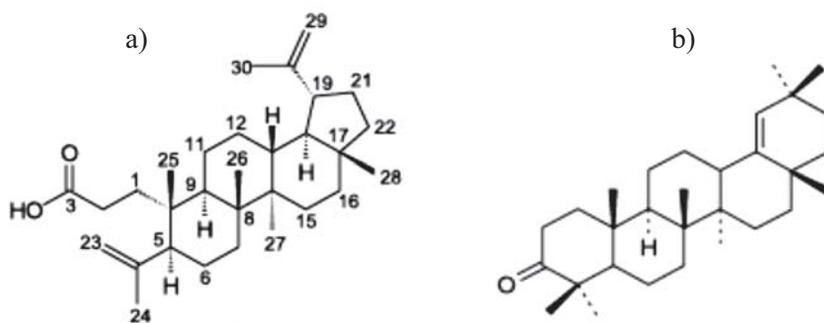


Figura 6. Ácido canárico (a) y germanicon (b)

La presencia de triterpenos pentacíclicos en propóleos brasileños en particular y en propóleos de países tropicales en general, constituye una característica importante de su composición química vinculada a su actividad antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral. Por tal razón, en los momentos actuales, las investigaciones respecto a los propóleos se han dirigido hacia la actividad biológica de estos metabolitos secundarios, principalmente a estudiar la capacidad antiviral de ciertas estructuras de triterpenos pentacíclicos: ácidos betulínico, ácido morónico, ácido betulónico y las meliferonas que presentan una importante acción anti-HIV²³⁻²⁵ (figura 7).

Teniendo en cuenta las evidencias científicas presentadas acerca de la composición química del propóleo, caracterizada por la presencia de triterpenos pentacíclicos tanto en propóleos verdes como rojos y su demostrada actividad biológica, antes mencionada, se realiza este trabajo con el objetivo de aislar e identificar posibles estructuras triterpénicas en una muestra de propóleo tropical.

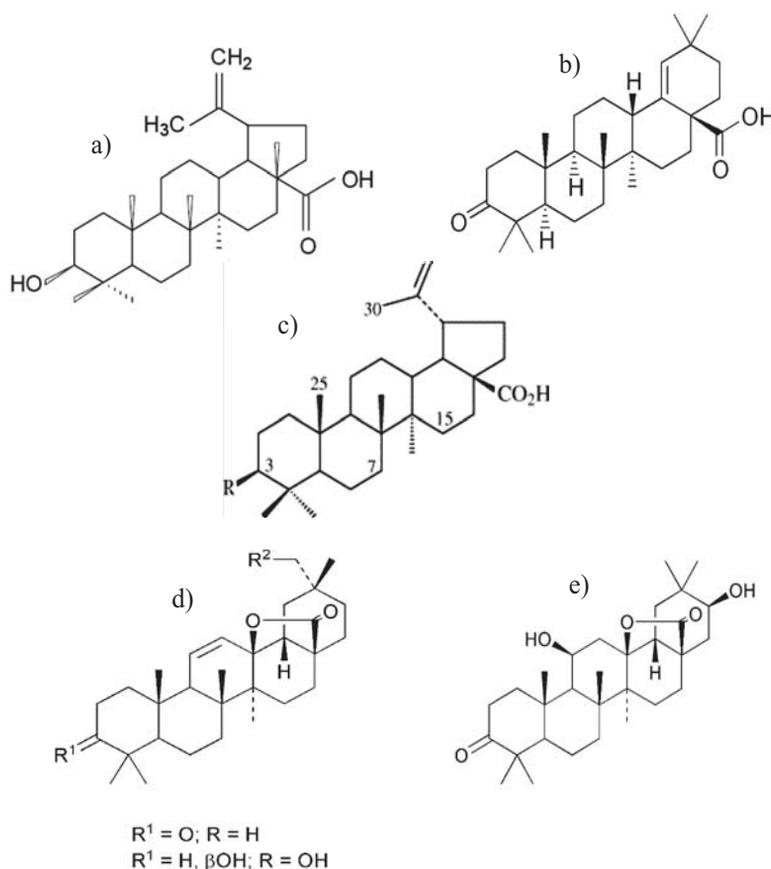


Figura 7. Ácido betulínico (a), ácido morónico (b), ácido betulónico (c), meliferonas (d, e)

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Muestra de propóleo

La muestra de propóleo, de color pardo, fue recolectada a través de la técnica de raspado a partir de las partes superiores de la colmena. La muestra procede de la región central de Cuba.

Insumos

Los disolventes orgánicos utilizados en este estudio fueron de calidad analítica: hexano, acetato de etilo, así como bromuro de potasio (KBr) y cloroformo deuterado (CDCl₃) de calidad espectroscópica.

Materiales y equipos

- Sílicagel 60 (35 - 70 mesh) Merck.
- Columna cromatográfica de vidrio pyrex con llave de teflón (3,7 cm x 70 cm).
- Embudo separador 500 mL.
- Cromatoplasmas de silicagel (20 cm x 20 cm) 60 F₂₅₄0,1 mm Merck.
- Cromatoplasmas de silicagel (5 cm x 20 cm) ASTM 60 F₂₅₄0,1 mm Merck.
- Evaporador rotatorio Büchi B-461.
- Equipo FTIR Philips Analytical, modelo PU 9800.
- Equipo CG-EM JEOL JMS-DX 300.
- Equipo CG-EM Perkin Elmer, modelo Turbo Mass, Autosystem XL GC
- Equipo RMN Brücker Espectrómetro de Pulsos y FT AC 250 F.

Metodología

Preparación de la muestra

La muestra de propóleo (100 g) fue desmenuzada y macerada durante 10 días con una disolución hidroalcohólica al 90%. Posteriormente, el macerado fue filtrado, y el residuo sólido fue sometido a maceración dos veces más.

Los extractos obtenidos de cada una de las tres maceraciones fueron mezclados y concentrados en un rotoevaporador, obteniéndose una masa viscosa de color pardo oscuro. La misma, fue redisuelta en disolución hidroalcohólica al 70% y extraída con n-hexano hasta la desaparición de la coloración rojiza del extracto. Luego, los extractos se mezclaron y concentraron en el rotoevaporador, obteniéndose 15,13 g de un sólido de aspecto ceroso de color pardo-rojizo.

A partir del sólido obtenido fueron pesados 6,92 g y redisueltos en n-hexano, mezclados con 10 g de silicagel y llevados a sequedad con el empleo del rotoevaporador hasta obtener una muestra sólida, seca y homogénea. Finalmente, el sólido fue sometido a separación mediante cromatografía de columna abierta.

Separación por cromatografía en columna

- Columna cromatográfica

La columna cromatográfica (3,7 cm x 70 cm) fue preparada adicionando una suspensión de silicagel en hexano y haciendo pasar n-hexano a través de la fase estacionaria hasta lograr la compactación adecuada, con una proporción silicagel-muestra de 30:1. Posteriormente, la muestra sólida fue compactada hasta obtener un lecho uniforme, quedando listo el sistema cromatográfico para el proceso de separación.

- Fase móvil

Hexano (500 mL), acetato de etilo 10 % (20 mL) en n-hexano (180 mL), acetato de etilo 20 % (40 mL) en n-hexano (160 mL), acetato de etilo 30 % (60 mL) en n-hexano (140

mL), acetato de etilo 40 % (80 mL) en n-hexano (120 mL), acetato de etilo 50 % (100 mL) en n-hexano (100 mL), acetato de etilo 60 % (120 mL) en n-hexano (80 mL), acetato de etilo 70 % (140 mL) en n-hexano (60 mL), acetato de etilo 80 % (160 mL) en n-hexano (40 mL), acetato de etilo 90 % (180 mL) en n-hexano (20 mL) y acetato de etilo (500 mL).

- **Separación cromatográfica**

La elución fue realizada aplicando las fases móviles en orden creciente de polaridad, luego se recolectaron 54 fracciones, que se mezclaron de acuerdo a semejanzas en composición considerando los resultados observados en la cromatografía en capa fina (cromatoplasas de silicagel). Las fracciones de interés (9-17), fueron concentradas en el rotoevaporador, obteniéndose 767 mg de un sólido blanco-amarillento que fue purificado por cristalización en acetona y metanol, obteniéndose 207 mg de cristales blancos en forma de agujas (compuesto desconocido I) y 450 mg de cristales en forma de agujas alargadas (compuesto desconocido II).

Caracterización estructural

- **Espectroscopía Infrarrojo (IR)**

Los espectros IR de los compuestos desconocidos fueron realizados utilizando la técnica de pastilla de KBr en el equipo FTIR Philips Analytical modelo PU 9800.

- **Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas (CG-EM)**

Los espectros de masas de los compuestos desconocidos fueron realizados en un CG-EM JMS-DX 303 de la firma JEOL. Las muestras fueron redisueltas en n-hexano e inyectadas en el equipo. La inyección de la muestra se realizó por el modo "split" con una relación de 1:10, siendo la temperatura del inyector, la interfase y el detector 280, 280, 150 °C, respectivamente. El volumen de inyección empleado fue de 2 µL del extracto previamente obtenido. La separación cromatográfica se realizó en una columna SPB-5 (15 m x 0,25 mm x 0,10 µm, Supelco) y como gas portador se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno se programó a 60 °C (2 min), aumentando 4 °C por cada min hasta 100 °C. Posteriormente, se aumentó la temperatura a razón de 10 °C por cada min hasta 290 °C, donde se mantuvo 5 min. El detector operó en el modo ionización por impacto electrónico (IE) (70 eV) a 230 °C. La detección se realizó en el modo de barrido desde 20-500 dalton.

- **Espectroscopía ¹H-RMN y ¹³C-RMN**

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrómetro de pulsos y transformada de Fourier modelo AC 250 F de la firma Brüker a las frecuencias de 250 MHz (¹H) y 62,8 MHz (¹³C), utilizando CDCl₃ como disolvente y tetrametilsilano (TMS), como referencia interna respecto a la cual se dan los valores de los corrimientos químicos en ppm. Las asignaciones de las señales del espectro de ¹³C se realizaron con la aplicación de la técnica de registro DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer).²⁶

Identificación de compuestos

La identificación de los compuestos desconocidos se realizó con el estudio e interpretación de sus bandas características en IR, los iones moleculares y fragmentos típicos, así como las señales específicas en RMN-¹H y RMN-¹³C. Además, los espectros obtenidos fueron comparados y correlacionados con espectros de los triterpenoides disponibles en la literatura²⁷⁻³⁰ y de las bases de datos del equipo CG-EM Perkin Elmer modelo Turbo Mass, Autosystem XL GC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del compuesto desconocido I

- Espectroscopía Infrarrojo (IR)

El espectro IR del compuesto desconocido I ha mostrado bandas de absorbancia a 3075, 2943, 2872, 2855, 1725, 1645, 1385, 1245, 898 y 872 cm^{-1} . Estas bandas son representativas de los grupos químicos presentes en el compuesto, como la banda a 1725 cm^{-1} , que fue originada por las vibraciones de tensión $\nu_{\text{as,s}} \text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$, que se relacionan con la presencia de cadenas hidrocarbonadas saturadas. Estas bandas, así como las vibraciones de deformación de los grupos metilenos (CH_2) y metilos (CH_3) a 1456 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} , respectivamente, han confirmado la naturaleza hidrocarbonada del compuesto.

Finalmente, las vibraciones de tensión $\nu \text{C}=\text{C}$ a 1645 cm^{-1} , indican la presencia de un resto olefinico en la estructura, que relacionada a otras bandas a 3075 cm^{-1} y 880 cm^{-1} , sugiere la existencia de un grupo exometilénico.

- Espectrometría de Masas

EM (m/z): 468, 427, 407, 408, 358, 297, 275, 249, 218, 204, 189, 175, 147, 135, 109, 95, 81, 69, 55, 43, 29.

El análisis del espectro de masas ha permitido establecer la fórmula molecular, $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$, a partir del ion molecular M^+ m/z 468.

Los fragmentos más interesantes para el diagnóstico estructural son: m/z 427 (M-41), debido a la pérdida de un grupo isoprenilo, la m/z 408 (M-AcOH), que corresponde a la pérdida del grupo acetato, así como m/z 249 (M- $\text{C}_{16}\text{H}_{27}$), que coincide con la eliminación de parte de la estructura hidrocarbonada correspondiente a los anillos C (parcialmente), D, E (figura 3b) y el grupo isoprenilo. El fragmento m/z 189 (249-AcOH), coincide con la eliminación del grupo acetato. Por lo tanto, el patrón de fragmentación que ha presentado el compuesto es la vía más importante de ruptura para la estructura de un triterpeno pentacíclico, en este caso el acetato de lupeol²⁷ (figura 8).

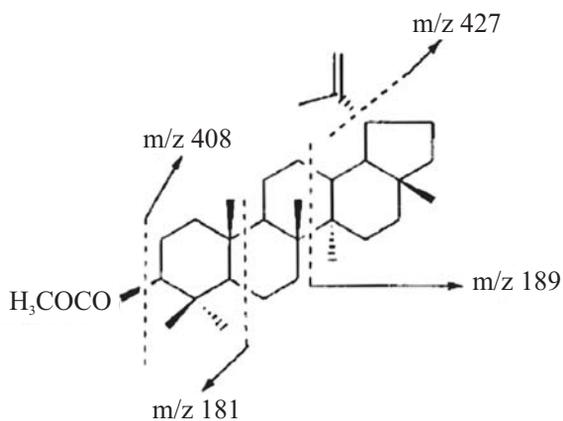


Figura 8. Fragmentaciones diagnósticas propuestas para el acetato de lupeol.

- **Espectroscopía RMN**

RMN-¹H (350 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 0.77 (3H, s, H-27), 0.79 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, s, H-24), 0.87 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-25), 1.65 (3H, s, H-30), 2.07 (3H, s, H-2'), 4.25 (1H, dd, $J_{ax,ax}=9.8$, $J_{ax,eq}=4.2$ Hz, H-3), 4.62 (1H, s, H-29a), 4.72 (1H, s, H-29b).

El espectro de RMN-¹H ha mostrado la existencia de ocho grupos metilos terciarios singletes a valores de δ 0.77, 0.79, 0.85, 0.87, 0.94, 1.05, 1.65 y un metilo de acetato a 2.07 ppm. Los singletes a δ 4.62 y δ 4.72 indican la presencia de un grupo exometilénico, cuyos protones son el H-29a y H-29b, respectivamente. Por otra parte, el doblete a δ 4.25 ppm fue causado por el protón que estaba unido al carbono conectado con el grupo funcional acetato. Los valores de los corrimientos químicos y los valores de las constantes de acoplamiento ($J_{ax,ax}=9.8$, $J_{ax,eq}=4.2$), han sugerido que la configuración del grupo acetato es β y que está en posición ecuatorial al conectarse con el carbono C-3, característica estructural importante para el acetato de lupeol.

- **RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ, ppm):** 38.5 (C-1), 171.2 (C-1'), 23.6 (C-2), 27.9 (C-2'), 81.0 (C-3), 38.0 (C-4), 55.4 (C-5), 18.2 (C-6), 34.3 (C-7), 41.0 (C-8), 50.4 (C-9), 37.2 (C-10), 21.0 (C-11), 24.5 (C-12), 36.7 (C-13), 43.1 (C-14), 26.5 (C-15), 35.7 (C-16), 43.2 (C-17), 48.4 (C-18), 48.3 (C-19), 151.2 (C-20), 30.0 (C-21), 41.2 (C-22), 27.9 (C-23), 16.7 (C-24), 16.3 (C-25), 16.1 (C-26), 14.7 (C-27), 18.2 (C-28), 109.5 (C-29), 19.4 (C-30).

El espectro de RMN-¹³C ha presentado un grupo carbonilo a 171.2 ppm y su conexión con C-3 a δ 81.0. También se han ubicado dos carbonos olefinicos C-20 y C-29, conectados mediante el doble enlace correspondiente al único grupo exometilénico presente en la estructura. Las señales del espectro han coincidido con las reportadas por Sholichin *et. al.* para el acetato de lupeol.²⁸

Los análisis espectroscópicos realizados, han permitido establecer que el compuesto desconocido I es un triterpeno pentacíclico y que la estructura corresponde específicamente al acetato de lupeol (figura 9).

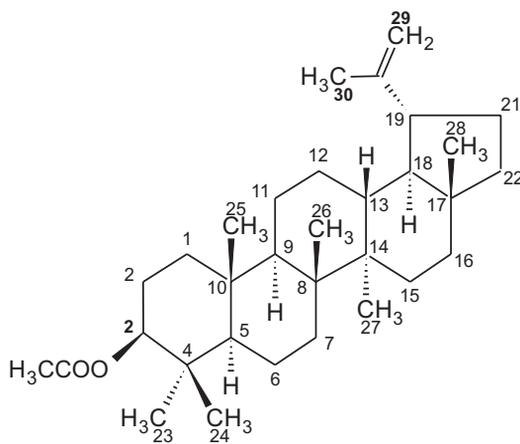


Figura 9. Estructura del acetato de lupeol (acetato de lup-20(29)en-3β) correspondiente al compuesto desconocido I

Análisis del compuesto desconocido II

- Espectroscopía Infrarrojo (IR)

Las bandas de absorción observadas en el espectro IR del compuesto desconocido II fueron 2944, 2873, 2856, 1736, 1640, 1456, 1390, 1245 y 881 cm^{-1} . La banda a 1736 cm^{-1} , originada por las vibraciones de tensión ν C=O, vinculada a la banda a 1245 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión ν C-O, han sugerido la presencia de un grupo funcional tipo éster. Por otro lado, las bandas a 2944 cm^{-1} y 2873 cm^{-1} se corresponden con las vibraciones de tensión simétricas y asimétricas $\nu_{\text{as,s}} \text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$. Estas bandas tanto como las de 1456 cm^{-1} y 1390 cm^{-1} asignadas a las vibraciones de deformación de los grupos metilenos (CH_2) y metilos (CH_3), han demostrado la naturaleza hidrocarbonada del compuesto. Adicionalmente, la estructura posee vibraciones de tensión ν C=C a 1640 cm^{-1} debido a una insaturación aislada, que vinculada a la banda típica de carbono trisustituido, ν (CH)RR' C=CH₂ a 881 cm^{-1} , han confirmado la existencia de un doble enlace en la estructura del compuesto desconocido II.

- Espectrometría de Masas

EM (m/z): 468, 452, 425, 411, 408, 392, 356, 257, 248, 218, 207, 203, 189, 177, 147, 135, 109, 95, 81, 69, 51, 43, 29.

La interpretación del espectro de masas, ha permitido establecer la presencia del ion molecular M^+ a m/z 468, con la fórmula molecular, $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$. La asignación de los fragmentos han sido: la pérdida de un grupo acetato a m/z 425 (M-Ac), la pérdida del grupo acetato seguido de la pérdida de un metilo a m/z 411 (M-Ac-Me), la pérdida del grupo acetato seguido de la pérdida de agua a m/z 408 (M-Ac-H₂O), así como los fragmentos m/z 257, 218, 207, 203, y 189, que constituyen los denominados picos diagnósticos para esqueletos tipo amirina con una insaturación en el C-12 (figura 10).

El fragmento m/z 218 es el más importante porque corresponde a un reordenamiento Retro-Diels-Alder (RDA), en el anillo que posee el doble enlace, suficiente evidencia de la existencia de esa insaturación.²⁹

El espectro de masas del compuesto desconocido II fue comparado con otros reportados en la literatura y contrastado en la base de espectros de masas del equipo CG-EM Perkin Elmer modelo Turbo Mass, Autosystem XL GC, permitiendo identificar la presencia del acetato de β -amirina. Este triterpeno pentacíclico tipo oleanano es un isómero del acetato de lupeol, aunque posee una diferencia estructural importante consistente en la presencia de un doble enlace en el C-12, que favorece la ruptura RDA en el espectro de masas, lo que origina el pico base a m/z 218 (figura 10).

- Espectroscopía RMN

RMN-¹H (350 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 0.78 (3H, s, H-28), 0.84 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-25), 0.86 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-27), 1.04 (3H, s, H-26), 1.64 (3H, s, H-30), 2.05 (s, CH₃CO), 4.05 (1H, dd, $J_{\text{ax,ax}}=10$, $J_{\text{ax,eq}}=4.3$ Hz, H-3), 5.0 (m, H-12)

El espectro de RMN-¹H ha evidenciado la existencia de siete grupos metilos terciarios singletes a valores de δ 0.78, 0.84, 0.85, 0.86, 0.95, 1.04, 1.64 y un metilo de acetato a 2.05 ppm. Por otra parte, el doble doblete a 4.05 ppm corresponde al protón que está unido al carbono C-3, donde se enlaza el grupo funcional acetato.

Los valores obtenidos para los corrimientos químicos y las constantes de acoplamiento ($J_{\text{ax,ax}}=10$, $J_{\text{ax,eq}}=4.3$), corresponden a la resonancia de los protones carbonílicos y permiten establecer la orientación α y la posición axial para el grupo acetato. Finalmente, el multiplete a δ 5.0 ppm, constituye una evidencia de la presencia de un protón olefínico en la estructura.

- **RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, (, ppm):** 38.7 (C-1), 170.3 (C-1'), 27.4 (C-2), 20.8 (C-2'), 78.8 (C-3), 38.8 (C-4), 37.2 (C-5), 18.3 (C-6), 34.2 (C-7), 40.8 (C-8), 50.3 (C-9), 37.1 (C-10), 20.9 (C-11), 25.2 (C-12), 38.1 (C-13), 42.8 (C-14), 27.4 (C-15), 35.6 (C-16), 42.9 (C-17), 48.3 (C-18), 47.9 (C-19), 150.2 (C-20), 30.0 (C-21), 39.9 (C-22), 28.0 (C-23), 15.0 (C-24), 16.2 (C-25), 15.9 (C-26), 14.6 (C-27), 18.0 (C-28), 109.2 (C-29), 19.3 (C-30).

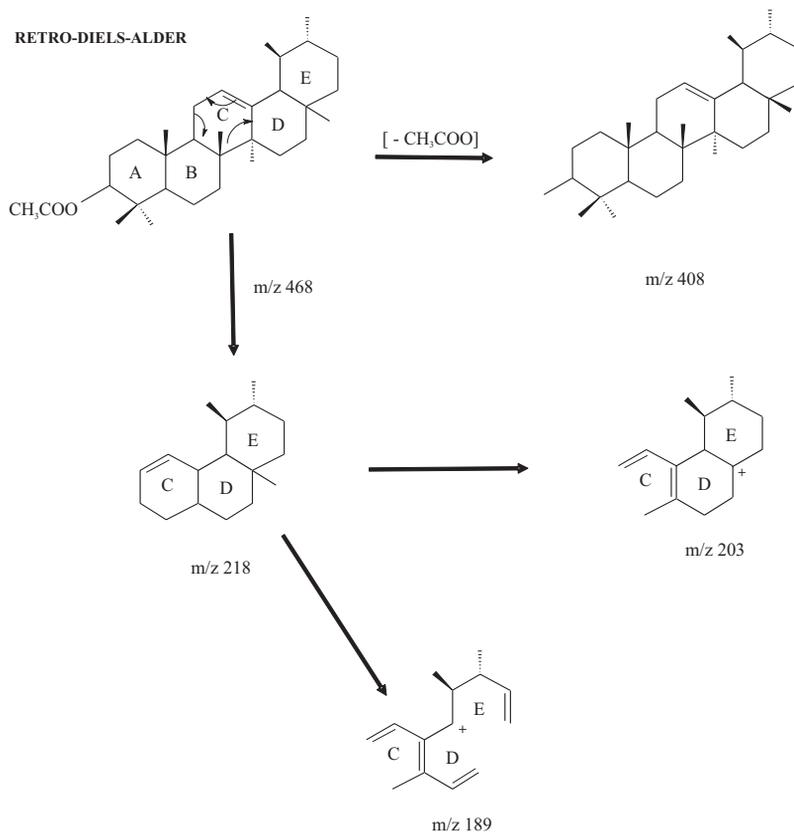


Figura 10. Fragmentaciones más importantes del acetato de β -amirina.

El espectro de RMN-¹³C ha revelado la presencia de 32 átomos de carbono. La técnica DEPT aplicada al compuesto desconocido II ha indicado la existencia de ocho metilos (8 -CH₃), cinco metilenos (5 -CH₂) y 7 carbonos cuaternarios en la estructura.

Además de la presencia de un grupo carbonilo a δ 170.3 y su conexión con C-3 a δ 78.8, se han identificado dos carbonos olefinicos en los carbonos C-12 y C-13, conectados al único doble enlace de la estructura.

Las señales registradas han coincidido con los valores reportados por Shamma et al., para el acetato de β -amirina.³⁰

La interpretación de las señales espectroscópicas (IR, MS, RMN-¹H, RMN-¹³C) ha permitido establecer la estructura de un acetato de triterpeno pentacíclico con una insaturación en el C-12, que corresponde específicamente al acetato de β -amirina (figura 11).

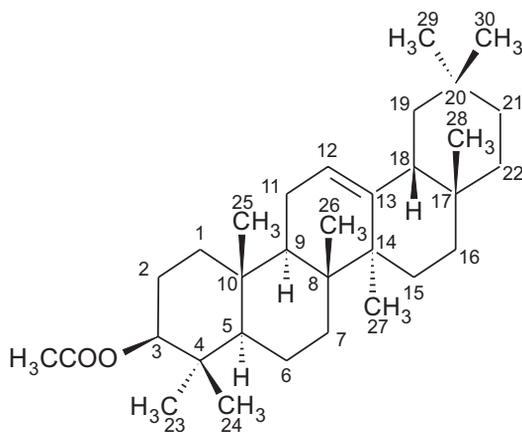


Figura 11. Estructura del acetato de β -amirina (acetato de olean-12-en-3 β) correspondiente al componente desconocido II.

CONCLUSIONES

- Se aislaron dos triterpenos pentacíclicos a partir de la fracción hexánica de un propóleo pardo de origen tropical.
- Los triterpenos pentacíclicos identificados fueron: el acetato de lupeol (acetato de lup-20(29)en-3 β) y el acetato de β -amirina (acetato de olean-12-en-3 β).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro Nacional de Investigaciones Científicas de La Habana, Cuba, por la colaboración brindada en la realización de las mediciones espectroscópicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bracho J. C. Constituyentes volátiles de propóleo: realidad acerca de su rica composición química. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 2000; LXVI (4): 198-209.
2. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100: 114-117.
3. Greenaway W., Scaysbrook T.; Whatley F. R. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. *Proceedings of the Royal Society of London* 1987; B232: 249–272.
4. Nagy E., Papay V., Litkei G., Dinya Z. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. *Stud. Org. Chem.* (Amsterdam) 1986; 23: 223–232.
5. Demestre M., Messerli S. M., Celli N. et. al. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother. Res.* 2009; 23(2): 226-230.
6. Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K. et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232.

7. Bankova, V., L. De Castro, and M.C. Marcucci. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
8. Tomás-Barberán F., García-Viguera C., Vit-Olivier P., Ferreres F., Tomás-Lorente F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 1993; 34(1): 191-196.
9. Harish, Z., Rubinstein, A., Golodner, M., Elmaliyah, M., Mizrahi, Y., Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1997; 23: 89-96.
10. Burdock G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 1997; 36: 347-363.
11. Kholodova Y. D. et al. Squalene, lanosterol and cholesterol of propolis and its probable sources. *Khím. Biol. Nauki.* 1981; 5: 88-90.
12. Silva M., Bittner M., Hoeneisen M. et al. Química de los Triterpenos. Secretaría general de los Estados Americanos. p. 73. 1992.
13. Christov R., Bankova V., Hegazi A. et. al. Chemical composition of egyptian propolis. *Z. Naturforsch.* 1998; 53c: 197-200.
14. Marcucci M.C., Rodríguez J., Ferreres F. et. al. Chemical composition of brazilian propolis from Sao Paulo State. *Z. Naturforsch.* 1998; 53c: 117-119.
15. Abd El Hady F. K., Hegazi A. G. Egyptian propolis 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. *Z. Naturforsch.* 2002; 57c: 386-394.
16. Hegazi A. G., Abd El Hady F. K. Egyptian propolis 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch.* 2002; 57c: 395-402.
17. Pereira A. S., Nascimento E. A., Aquino Neto F.R. Lupeol Alkanoates in brazilian propolis. *Z. Naturforsch.* 2002; 57c: 721-726.
18. Pereira A.S.W., Bicalho B., Aquino Neto F.R. Comparison of propolis from *Apis Mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 2003; 34: 291-298.
19. Salatino A., Teixeira E.W., Message D., Negri et. al. Origin and Chemical variation of brazilian propolis. *eCAM.* 2005; 2: 1933-38.
20. Teixeira E. W., Message D., Negri G. et. al. Bauer-7- en 3 β -YL acetate: A major constituent of unusual samples of brazilian propolis. *Quim. Nova.* 2006; 29(2): 245-246.
21. Trusheva B., Popova M., Bankova V. et. al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *eCAM.* 2006; 3(2): 249-254.
22. Albuquerque J.L., Alves L.A., Lemos T.L.G. et. al. Acido canárico (3,4- seco derivado do lupano) em propolis do Ceara. *Quim. Nova.* 2007; 30 (4): 828-831.
23. Geetha T., P. Varalaxmi. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia* 1998; 69: 13-19.
24. Patočka J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* 2003; 1: 7-12.
25. Ito J, Chang FR, Wang HK et al. (Anti-AIDS agents. 48. (1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J. Nat. Prod.* 2001; 64 (10): 1278-1281.
26. San Feliciano A., Pérez A., Del Olmo E. et al. Manual de determinación estructural de compuestos naturales. Editorial SECAB (Bogotá) pp. 88-90. 2008.
27. Sturm V. G., Zilliken F. Ingredients of *Diospyros mollis* fruits. *Planta Medica* 1972; 21(3): 61-66.

28. Sholichin M., Yamasaki K., Kasai R., Tanaka O. ¹³C Nuclear magnetic resonance of lupine-type triterpenes: Lupeol, betulinic acid. *Chem. Pharm. Bull.* 1980; 28: 1006-1008.
29. Budzikiewicz H., Wilson J. M., Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 85: 3688-3699.
30. Shamma M., Glick R. E., Mumma R. O. The nuclear magnetic resonance spectra of pentacyclic triterpenes. *J. Org. Chem.* 1962; 27: 4512-4517.