

## Cassipourol: Un diterpenoide monocíclico con actividad larvicida en *Croton funkianus*

[Cassipourol: A monocyclic diterpenoid with larvicidal activity from *Croton funkianus*]

Sonia VEGAS, Bárbara MORENO-MURILLO & Rodolfo QUEVEDO

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia.  
Contactos / Contacts: Rodolfo QUEVEDO E-mail address: [arquevedop@unal.edu.co](mailto:arquevedop@unal.edu.co)

### Abstract

Bioassay-guided fractionation of petroleum ether soluble part of the ethanolic extract of *Croton funkianus* (Euphorbiaceae: Crotonoideae) senescent leaves against *Culex quinquefasciatus* third instar larvae afforded a diterpenoid with Larvicidal activity called cassipourol. The structure of cassipourol was elucidated by 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) and 2D (COSY, HMQC, HMBC) NMR spectroscopy and by comparing their spectroscopic data with that reported in the literature.

**Keywords:** *Croton funkianus*; Euphorbiaceae; larvicidal activity; *Culex quinquefasciatus*; cassipourol, hemicosanol.

### Resumen

El fraccionamiento guiado por bioensayos de la fracción soluble en éter de petróleo del extracto etanólico proveniente de las hojas senescentes de la especie *Croton funkianus* (Euphorbiaceae: Crotonoideae) frente a larvas de tercer estadio del mosquito zancudo *Culex quinquefasciatus* condujo a la identificación de un nuevo diterpenoide con actividad larvicida denominado cassipourol. La estructura del cassipourol se elucidó empleando espectroscopia RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) y 2D (COSY, HMQC, HMBC) y por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.

**Palabras Clave:** *Croton funkianus*; Euphorbiaceae; actividad larvicida; *Culex quinquefasciatus*; cassipourol, hemicosanol.

**Recibido | Received:** 27 de Mayo de 2010.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 4 de Marzo de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Mayo de 2011.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia por el soporte financiero para el desarrollo de esta investigación (Proyecto DIB 11578).

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Sonia VEGAS, Bárbara MORENO-MURILLO & Rodolfo QUEVEDO 2011. Cassipourol: un diterpenoide monocíclico con actividad larvicida en *Croton funkianus*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10 (3): 228 – 232.

## INTRODUCCIÓN

El uso continuo de insecticidas sintéticos genera serios problemas ambientales en acuíferos, aire, suelos, contaminación en alimentos y animales, son ecológicamente inaceptables porque producen efectos adversos sobre los organismos benéficos y desarrollan resistencia en insectos, hongos, bacterias y malezas, lo que trae como consecuencia la aplicación de dosis cada vez más altas, con un mayor riesgo de intoxicación humana. Adicional a los problemas ambientales, la salud pública se ve seriamente afectada por enfermedades como filariasis, malaria, dengue, fiebre amarilla y leishmaniasis, entre otras, que son transmitidas por insectos vectores. Este tipo de enfermedades causa un gran impacto económico y social especialmente en regiones con condiciones de salubridad y suministro de agua potable deficientes y en regiones con sobrepoblación como Latino América y el Caribe. Dentro de los vectores que se encuentran asociados con mayor frecuencia al hábitat humano tanto urbano como rural se encuentra el mosquito zancudo *Culex quinquefasciatus* y a pesar de que en Colombia no existe riesgo de transmisión de agentes patógenos por parte de esta especie, constituye un problema de salud pública debido a la alergia ocasionada por su picadura y a las molestias causadas por la alta densidad de población que alcanza en la sabana de Bogotá (Sukumar et al., 1991; Bisset et al., 1998; Alvarez et al., 2006).

De otro lado, el género *Croton* (Euphorbiaceae) ha sido objeto de estudio por la gran diversidad de compuestos químicos que lo constituyen, se destaca especialmente la presencia diterpenoides de tipo labdano, ciclitoles, neo-inositol, triterpenoides pentacíclicos, esteroides, aceites volátiles mono y sesquiterpenicos, sustancias fenólicas y alcaloides (Ramos et al., 2008; Salatino et al., 2007; Ngadjui et al., 2002). Estudios previos del extracto etanólico proveniente de las hojas senescentes de la especie Colombiana *Croton funckianus* mostraron actividad larvicida prometedora frente a larvas de tercer estadio del mosquito zancudo *Culex quinquefasciatus* SAY ( $CE_{50}=288 \mu\text{L/mL}$ ) (Quevedo et al., 2007). En este artículo se presentan los resultados del estudio químico guiado por bioensayos frente a larvas de tercer estadio del mosquito *C. quinquefasciatus* de la fracción soluble en éter de petróleo del extracto etanólico de las hojas senescentes de *C. funckianus*, estudio que condujo al aislamiento e identificación de un diterpenol monocíclico con actividad larvicida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Las hojas senescentes de *C. funckianus* se recolectaron en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá; el ejemplar fue clasificado por el Dr. C. J. Jiménez del Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia (COL 1238).

### Material entomológico

Para los bioensayos se emplearon larvas de tercer estadio de *C. quinquefasciatus* provenientes de colonias de crianza estandarizadas en el laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Las crías se mantuvieron a una temperatura promedio de 20°C y humedad relativa del 60%.

### Bioensayos de Actividad Larvicida (BAL-Cq)

Los ensayos de actividad larvicida se hicieron siguiendo la metodología propuesta por McLaughlin et al. (1998). Para los extractos totales y fracciones se aplicó el protocolo de placa multipozos de 96 unidades de 250  $\mu\text{L}$ , cinco concentraciones en el rango de 1000 a 25 ppm, una larva por pozo, se utilizó como control absoluto agua y como control positivo cafeína. Los efectos se midieron como mortalidad de larvas a las 48 horas.

### Separación Cromatográfica

La fracción soluble en éter de petróleo se sometió a cromatografía en columna (Columna **A**) en silica gel eluyendo con mezclas de disolventes de polaridad creciente desde tolueno hasta etanol. Se colectaron 16 fracciones (**A-1** hasta **A-16**) de acuerdo a su perfil en CCD (AcOIPr:MeOH 90:10) revelando con  $\text{H}^+$ /vainillina. A cada una de estas fracciones se evaluó la actividad larvicida con el bioensayo BAL-Cq (Tabla 1). La fracción activa **A-6** se sometió a cromatografía en columna (Columna **B**) en silica gel eluyendo con mezclas variables de tol:AcOIPr. Se colectaron 7 fracciones (**B-1** hasta **B-6**) de acuerdo a su perfil en CCD; por cantidad de muestra y actividad frente al bioensayo BAL-Cq (Tabla 2) se seleccionó la fracción **B-6** para continuar con el estudio. De la fracción **B-6** precipitó un sólido de color blanco que se cristalizó en una mezcla n-hexano:tolueno (compuesto **1** (9 mg)). El compuesto **1** no presentó actividad frente al bioensayo BAL-Cq (Tabla 3). La fracción **B-6** se sometió a cromatografía en columna (columna **C**) en fase reversa (RP-18) eluyendo con una mezcla

MeOH:agua (80:20); se colectaron 10 fracciones (**C-1** hasta **C-10**). A cada una de estas fracciones se evaluó la actividad larvicida con el bioensayo BAL-Cq (tabla 3), la fracción activa **C-2** se obtuvo como un líquido viscoso de color amarillo (30 mg) cuyo análisis espectroscópico condujo a una estructura de tipo diterpenol, compuesto **2**.

Los estructura de los compuestos 1 y 2 se elucidó empleando métodos espectroscópicos IR, RMN (1D y 2D) y espectrometría de masas.

### Datos Espectroscópicos

**Henicosanol 1:** MP: 67- 68 °C. IR (KBr): 3431, 2919, 2850, 1119, 1061, 721  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,88 (3H, t, J=6,69 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,25 (36 H, br s,  $(\text{CH}_2)_n$ ), 1,56 (2H, m, J=6,67 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,64 (2H, t, J=6,67 Hz,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):14,1 ( $\text{CH}_3$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 25,7 ( $\text{CH}_2$ ), 29,4 ( $\text{CH}_2$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 32,8 ( $\text{CH}_2$ ), 63,1 ( $\text{CH}_2$ ). APCI-MS: m/z = 313, 17 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ .

**Cassipourol 2:** Líquido viscoso,  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 0,84 (3H, d, J=8,0 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,86 (3H, d, J=8,0 Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,86 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 0,88 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 1,14 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1,25 (8H, br s,  $(\text{CH}_2)_4$ ), 1,28 (4H, m,  $(\text{CH}_2)_2$ ), 1,34 (1H, br s, CH), 1,37 (2H, m, CH), 1,52 (1H, m, CH), 1,67 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 2,01 (2H, t, J=8,0 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4,15 (2H, d, J= 6,9 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5,41 (1H, m, CH).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):16,2 ( $\text{CH}_3$ ), 19,6 ( $\text{CH}_3$ ), 19,7 ( $\text{CH}_3$ ), 22,6 ( $\text{CH}_3$ ), 22,7 ( $\text{CH}_3$ ), 24,5 ( $\text{CH}_2$ ), 24,8 ( $\text{CH}_2$ ), 25,1 ( $\text{CH}_2$ ), 28,0 (CH), 32,8 (CH), 32,8 (CH), 36,7 (C), 37,4 ( $\text{CH}_2$ ), 37,4 ( $\text{CH}_2$ ), 37,5 ( $\text{CH}_2$ ), 39,4 ( $\text{CH}_2$ ), 39,9 ( $\text{CH}_2$ ), 59,4 ( $\text{CH}_2$ ), 123,1 (CH), 140,3 (C).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación mostraron que el extracto etanólico de las hojas senescentes de *Croton funckianus* es bioactivo frente al bioensayo BAL-Cq; el fraccionamiento por partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad mostró a la fracción soluble en éter de petróleo como apropiada para un posterior estudio por sus valores de actividad larvicida y cantidad de muestra (Tabla 1). El fraccionamiento sucesivo por cromatografía en columna guiado por bioensayos teniendo como criterio de selección la cantidad de muestra y el valor de  $\text{CE}_{50}$  (Tablas 1 y 2) condujo a la precipitación de un sólido blanco cuya elucidación estructural empleando métodos espectroscópicos condujo a un compuesto de fórmula molecular  $\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{O}$  conocido como 1-henicosanol **1**, un metabolito previamente identificado en *Croton*

*hieronymi* (Catalan et al, 2003). Este compuesto a pesar de ser proveniente de una fracción activa no presentó bioactividad (Tabla 3).

**Tabla 1.** Actividad larvicida de las fracciones obtenidas de la columna **A** frente a larvas de *C. quinquefasciatus*

Fracción	Masa (mg)	$\text{CE}_{50}$ (ppm)
Extracto en EtOH	100000	105
Fracción apolar (A)	20600	549
A-1	214	619
A-2	266	353
A-3	48	> 1000
A-4	46	> 1000
A-5	100	>1000
<b>A-6</b>	<b>1200</b>	<b>259</b>
A-7	63	>1000
A-8	353	571
A-9	189	>1000
A-10	432	>1000
A-11	163	>1000
A-12	44	>1000
A-13	29	>1000
A-14	28	493
A-15	420	>1000
A-16	420	>1000
Cafeína	----	450

**Tabla 2.** Actividad larvicida de las fracciones obtenidas de la columna **B** frente a larvas de *C. quinquefasciatus*

Fracción	Masa (mg)	$\text{CE}_{50}$ (ppm)
<b>B (A-6)</b>	<b>1200</b>	<b>259</b>
B-1	59	118
B-2	409	> 1000
B-3	80	88
B-4	47	> 1000
B-5	150	354
<b>B-6</b>	<b>286</b>	<b>223</b>
B-7	150	354

**Tabla 3.** Actividad larvicida de las fracciones obtenidas de la columna **C** frente a larvas de *C. quinquefasciatus*

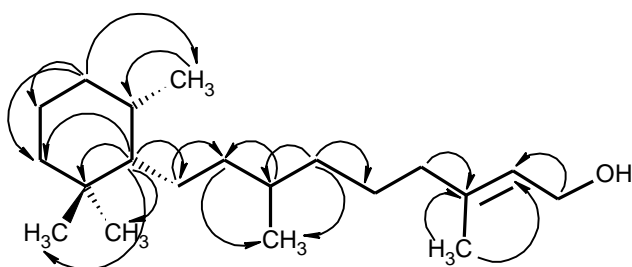
Fracción	Masa (mg)	$\text{CE}_{50}$ (ppm)
<b>C (B-6)</b>	<b>286</b>	<b>259</b>
C-1	11	216
<b>C-2</b>	<b>30</b>	<b>18</b>
<b>(cassipourol)</b>		
C-3	15	> 1000
C-4	16	> 1000
C-5	13	145
C-6	16	>1000
C-7	11	>1000
C-8	33	>1000
C-9	49	223
C-10	80	>1000
<b>Henicosanol</b>	<b>9</b>	<b>&gt;1000</b>

De la misma fracción se aisló un líquido viscoso de color amarillo cuyo análisis estructural empleando métodos espectroscópicos condujo a un compuesto de fórmula molecular  $C_{20}H_{38}O$  (compuesto 2). El espectro IR muestra una fuerte absorción a  $3369\text{ cm}^{-1}$  indicando la presencia de un hidroxilo; también se observa una banda a  $1654\text{ cm}^{-1}$  característica de alquenos.

El espectro de  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) mostró un multiplete a  $\delta$  5,41 ppm originado por un protón olefínico, un doblete a  $\delta$  4,15 ppm ( $J=6,9\text{ Hz}$ ) correspondiente a un oximetileno, tres singletes asignados a grupos metilo a  $\delta$  1,67; 0,88 y 0,86 ppm; dos dobletes asignados a grupos metilo a  $\delta$  0,84 y 0,86 ppm.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN muestra señales correspondientes a 20 carbonos cuyas multiplicidades se dedujeron por medio del experimento DEPT. Los experimentos bidimensionales COSY, HMQC y HMBC permitieron concluir que la señal a  $\delta$  59,4 ppm esta directamente unida a los protones que aparecen a  $\delta$  4,15 (H-15) y corresponden a un metileno alifático unido a un átomo de oxígeno; el protón metínico a  $\delta$  5,41 ppm esta directamente unido un carbono olefínico a 123,1 ppm (H-14) (Figura 1).

**Figura 1.** Estructura y correlaciones importantes en el espectro HMBC (H  $\rightarrow$  C) de Cassipourol 2.



El análisis espectroscópico completo condujo finalmente a una estructura tipo diterpeno monocíclico. El análisis comparativo de los datos espectroscópicos observados con los datos reportados permitió determinar que el diterpeno aislado corresponde al cassipourol; diterpeno aislado previamente de la combinación de raíces y hojas naranja de *Cassipourea madagascariensis* (Prakash et al., 2006).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, solo se han aislado tres diterpenoides monocíclicos con estas características estructurales, los dos primeros: Viridiol

A y viridiol B fueron aislados de las algas rojas de *Laurencia viridis* (Norte et al., 1996), Cassipourol es el tercer diterpeno con estas características aislado en la naturaleza y el único que se ha aislado desde plantas superiores, en este artículo se reporta por primera vez su presencia en especies de la familia Euphorbiaceae. Adicionalmente, el diterpeno aislado presentó actividad larvicida frente a larvas de tercer estadio de *Culex quinquefasciatus* comparable con algunos insecticidas comerciales (Cetih et al., 2004; Cheng et al., 2009).

## CONCLUSIONES

El fraccionamiento bioguiado de la fracción soluble en éter de petróleo de las hojas senescentes de *Croton funckianus* condujo a la identificación de un diterpenoide monocíclico conocido como cassipourol. Este diterpeno presentó actividad larvicida frente a larvas de tercer estadio del mosquito zancudo *Culex quinquefasciatus*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a la Universidad Nacional de Colombia por el soporte financiero para el desarrollo de esta investigación (Proyecto DIB 11578), al Laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia por el mantenimiento de las crías y suministro de las larvas.

## REFERENCIAS

- Álvarez L, Briceño A, Oviedo M. 2006. Resistencia al Temephos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. **Rev Colomb Entomol** 32: 172 - 175.
- Bisset J, Rodríguez M, Díaz C, Soca A. 1998. Estudio de la resistencia en una cepa de *Culex quinquefasciatus* procedente de Medellín, Colombia. **Rev Cub Med Trop** 50: 133 - 137.
- Catalán C, Heluani C, Kotowicz G, Gedris T, Herz W. 2003. A linear sesterpene, two squalene derivatives and two peptide derivatives from *Croton hieronymi*. **Phytochemistry** 64: 625 - 629.
- Cetih H, Erler F, Yanikoglu A. 2004. Larvicidal activity of a botanical natural product, AkseBio2. **Fitoterapia** 75: 724 - 728.
- Cheng S, Liu J, Huang C, Hsui Y, Chen W, Chang S. 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *cinnamomum osmophloeum* against

- three mosquito species. **Biores Technol** 100: 457 - 464.
- McLaughlin J, Lingling R, Rogers M, Anderson J. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Inf J** 32: 513 - 524.
- Ngadjui B, Abegaz BM, Keumedjio F, Folefoc G, Kapche G. 2002. Diterpenoids from the stem bark of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry** 60: 345 - 349.
- Norte M, Souto M, Fernández J. 1996. Viridiols, two new diterpenes from *Laurencia viridis*. **Nat Prod Res** 8: 263 - 269.
- Prakash S, Norris A, Miller S, Ratovoson F, Andriantsiferana R, Rasamison V, Kingston D. 2006. Cytotoxic diterpenes from *Cassipourea madagascariensis* from the Madagascar Rainforest. **J Nat Prod** 69: 287 - 289.
- Quevedo R, Núñez L, Moreno B. 2007. Contribución al estudio químico y de bioactividad de dos especies nativas (*Croton bogotanus* Cuatrec. y *Croton funcianus* Müller) Euphorbiaceae. **Scientia et Technica** XIII: 391 - 393.
- Ramos F, Takaishi Y, kashiwada Y, Osorio C, Duque C, Acuña R, Fujimoto Y. 2008. *ent*-3,4-secolabdane and *ent*-labdane diterpenoids from *Croton stipuliformis* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry** 69: 2406 - 2410.
- Salatino A, Salatino L, Negri G. 2007. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J Braz Chem Soc** 18: 11 - 33.
- Sukumar K, Perich M, Boobar L. 1991. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A review. **J Am Mosq Cont Assoc** 7: 210 - 237.

\*\*\*\*\*

---

## II SIMPOSIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIONES “RESPONSABILIDAD AMBIENTAL”

18 y 19 de Agosto de 2011

Curso pre-simposio

16 y 17 de Agosto de 2011

Universidad del Quindío

Armenia – Colombia

[viceinvestigaciones@uniquindio.edu.co](mailto:viceinvestigaciones@uniquindio.edu.co)

---