

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS DEL TALLO DE Casearia corymbosa Y RAÍZ DE Stachytarpheta frantzii

Tesis que presenta

MARÍA LEONOR VILA LUNA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de la QFB. María Leonor Vila Luna, titulado "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos del tallo de Casearia corymbosa y raíz de Stachytarpheta frantzii", fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dra. Cleliá De la Peña Seaman Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de agosto de 2019.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

18

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

QFB. María Leonor Vila Luna

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de plantas pertenecientes a la península de Yucatán", en el que participé bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las instalaciones e infraestructura proporcionadas para la realización de este trabajo.

A mi asesor, el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez del CICY, por su asesoramiento en la realización del presente trabajo.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, por su apoyo técnico y orientación en la realización del estudio fitoquímico en el laboratorio.

Al Sr. Paulino Simá Polanco, por la colecta e identificación taxonómica del material vegetal estudiado en este trabajo de tesis.

Al comité revisor de tesis integrado por la Dra. Marcela Gamboa Angulo, la Dra. Gloria Molina Salinas, la Dra. Marina Vera Ku, el Dr. Gonzalo Mena Rejón, la Dra. Cecilia Rodríguez García y la Dra. Virginia Herrera Valencia, por sus revisiones, observaciones y aportaciones al manuscrito de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada (297645).

Al proyecto, Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de plantas pertenecientes a la península de Yucatán.

A mis profesores, por todo el conocimiento trasmitido durante mi doctorado, en especial a la Dra. Blondy Canto Canché.

Al personal administrativo y académico, por su amabilidad y orientación brindada, con especial agradecimiento a la Lic. Gilma Michell, a la QFB. Mirbella Cáceres Farfán y la QFB. Leticia Medina Baizabal.

A mi hermana la M. en C. Sara Elena Vila Luna, por apoyarme a nivel tanto profesional como personal.

DEDICATORIAS

Para las personas que han sido ejemplo de fortaleza, responsabilidad, honestidad, ética y perseverancia, me refiero a mis padres, hermanos y amigos.

Para todas las personas que les sirva de apoyo el presente trabajo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
INDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii

INTRODUCCIÓN	. 1
--------------	-----

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Tipos de metabolitos en plantas	3
2. Análisis fitoquímico	3
3. Procedimientos de extracción	4
4. Técnicas cromatográficas	5
5. Técnicas espectróscopicas	6
6. Técnicas espectrométricas	7
7. Propiedades de los metabolitos secundarios	8
8. Casearia corymbosa y metabolitos aislados del género Casearia	9
8.1. Familia Flacourtiaceae	9
8.2. Género Casearia	9
8.3. Especie Casearia corymbosa	16

9. Stachytarpheta frantzii y metabolitos aislados del género Stachytarpheta	. 18
9.1. Familia Verbenaceae	. 18
9.2. Género Stachytarpheta	. 18
9.3. Especie Stachytarpheta frantzii	. 21
JUSTIFICACIÓN	. 22
HIPÓTESIS	. 23
OBJETIVO GENERAL	. 23
OBJETIVOS PARTICULARES	. 23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	. 24

CAPÍTULO II

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE CASEARIA CORYMBOSA

2.1. Introducción	25
2.2. Materiales y métodos	26
2.2.1. Reactivos y equipos	26
2.2.2. Material vegetal	27
2.2.3. Obtención de extractos	28
2.2.4. Purificación y aislamiento de los metabolitos	28
2.2.4.1. Procesamiento de la fracción hexánica (CCT-2a)	28
2.2.4.1.1. Aislamiento del compuesto I, ácido ent-(-)-kaur-16-en-19-oico o	

ácido kaurenoico	29
2.2.4.1.2. Aislamiento del compuesto II, γ-sitosterol	
2.2.4.1.3. Aislamiento del compuesto III, óxido de <i>ent</i> -3 β -hidroxi-(\neg)-	
13- <i>epi</i> -manoilo	31
2.2.4.1.3.1 Acetilación del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(−)-13- <i>epi</i> -manoilo o	
ribenol	31
2.2.4.1.3.2 Oxidación del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(−)-13- <i>epi</i> -manoilo o	
ribenol	
2.2.4.1.4. Aislamiento del compuesto IV, óxido de <i>ent</i> -(-)-13- <i>epi</i> -manoilo	
2.2.4.2. Procesamiento de la fracción diclorometánica (CCT-2b)	34
2.2.4.2.1. Aislamiento del compuesto V, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-	
3,5-dimetoxibenzoico	
2.2.4.2.2. Aislamiento del compuesto VI, casearborina c	35
2.3. Resultados	
2.3.1. Identificación de los compuestos	
2.3.1.1. Fracción hexánica (CCT-2a)	37
2.3.1.1.1. Identificación del compuesto I, ácido ent-(-)-kaur-16-en-19-oico	
o ácido kaurenoico	
2.3.1.1.2. Identificación del compuesto II, γ-sitosterol	42
2.3.1.1.3. Identificación del compuesto III, óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(-)-13-	

<i>epi</i> -manoilo45
2.3.1.1.3.1. Identificación del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-($-$)-13- <i>epi</i> -manoilo o
ribenol acetilado
2.3.1.1.3.2. Identificación del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-($-$)-13- <i>epi</i> -manoilo o
ribenol oxidado53
2.3.1.1.4. Identificación del compuesto IV, óxido de <i>ent</i> -(-)-13- <i>epi</i> -manoilo57
2.3.1.2 Fracción diclorometánica (CCT-2b)61
2.3.1.2.1. Identificación del compuesto V, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-
3,5-dimetoxibenzoico61
2.3.1.2.2. Identificación del compuesto VI, casearborina c65
2.4. Discusión
2.5. Conclusiones71

CAPÍTULO III

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA RAÍZ DE STACHYTARPHETA FRANTZII

3.1. Introducción	73
3.2. Materiales y métodos	73
3.2.1. Reactivos y equipos	73
3.2.2. Material vegetal	74

3.2.3. Obtención de extractos	74
3.2.4. Purificación y aislamiento de los metabolitos7	74
3.2.4.1. Procesamiento de la fracción hexánica (SFR-2a)7	74
3.2.4.1.1 Aislamiento del compuesto I, ácido betulínico7	' 6
3.2.4.1.2 Aislamiento del compuesto II, acetato de nor-28-urs-12-eno-3,17,19-triol7	' 6
3.2.4.1.3 Aislamiento del compuesto III, ácido oleanólico7	77
3.2.4.1.4 Aislamiento del compuesto IV, α-espinasterol7	78
3.2.4.2. Procesamiento de la fracción diclorometánica (SFR-2b)7	' 9
3.3. Resultados7	' 9
3.3.1. Fracción hexánica (SFR-2a)8	30
3.3.1.1. Identificación del compuesto I, ácido betulínico8	30
3.3.1.2. Identificación del compuesto II, acetato de nor-28-urs-12-eno-3,17,19-triol 8	34
3.3.1.3. Identificación del compuesto III, ácido oleanólico9) 1
3.3.1.4. Identificación del compuesto IV, α-espinasterol9) 5
3.3.2. Fracción diclorometánica (SFR-2b)9	99
3.4. Discusión	99
3.5. Conclusiones)1

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

4.1. Discusión general	. 103
4.2. Conclusiones generales	103

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Esqueleto base del diterpeno de tipo clerodano	16
Figura 1.2 Hojas, tallos y frutos de <i>C. corymbosa</i>	17
Figura 1.3 Distribución de C. corymbosa en la Península de Yucatán	17
Figura 1.4 Esqueleto base del monotereno de tipo iridoide	20
Figura 1.5 Esqueleto base del glicósido feniletanoide	21
Figura 1.6 Tallos y flores de S. frantzii	22
Figura 1.7 Distribución de S. frantzii en la Península de Yucatán	22
Figura 1.8 Diagrama de flujo de la extrategia experimental	24
Figura 2.1 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción	
CCT-2a de <i>C. corymbosa.</i>	29
Figura 2.2 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción	
CCT-2b de <i>C. corymbosa.</i>	34
Figura 2.3 Espectro de IR y CCD del compuesto I de C. corymbosa	39
Figura 2.4 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto I de C.	
corymbosa	39
Figura 2.5 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto I de C.	
corymbosa	40
Figura 2.6 Estructura química del ácido ent-(-)-kaur-16-en-19-oico	41
Figura 2.7 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto II de C. corymbosa	43

Figura 2.8 Fragmentaciones posibles del compuesto II según el CG-EM 44
Figura 2.9 Estructura química del γ-sitosterol
Figura 2.10 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto III de C. corymbosa
Figura 2.11 Espectro de IR del compuesto III de C. corymbosa
Figura 2.12 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto III de C.
corymbosa
Figura 2.13 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto III de C.
corymbosa
Figura 2.14 Estructura química del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(-)-13- <i>epi</i> -manoil
o ribenol
Figura 2.15 Espectro de IR y CCD del compuesto III acetilado de
C. corymbosa
Figura 2.16 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto III
acetilado de <i>C. corymbosa</i>
Figura 2.17 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto III
acetilado de <i>C. corymbosa</i>
Figura 2.18 Estructura química del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(-)-13- <i>epi</i> -manoil
acetilado
Figura 2.19 Espectro de IR y CCD del compuesto III oxidado de
C. corymbosa

Figura 2.20 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto III oxidado
de <i>C. corymbosa</i>
Figura 2.21 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto III
oxidado de C. corymbosa55
Figura 2.22 Estructura química del óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(-)-13- <i>epi</i> -manoil
oxidado56
Figura 2.23 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto IV de
C. corymbosa
Figura 2.24 Espectro de IR del compuesto IV de C. corymbosa
Figura 2.25 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto IV de
C. corymbosa
Figura 2.26 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto IV
de C. corymbosa
Figura 2.27 Estructura química del óxido de <i>ent</i> -(-)-13- <i>epi</i> -manoil oxidado61
Figura 2.28 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto V de
C. corymbosa
Figura 2.29 Espectro de IR del compuesto V de C. corymbosa
Figura 2.30 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto V de
C. corymbosa
Figura 2.31 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto V de

C. corymbosa
Figura 2.32 Estructura química del ácido siríngico65
Figura 2.33 Espectro de IR y CCD del compuesto VI de C. corymbosa
Figura 2.34 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto VI
de C. corymbosa
Figura 2.35 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto VI
de C. corymbosa67
Figura 2.36 Estructura química de la casearborina c69
Figura 3.1 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción
SFR-2a de <i>S. frantzii</i> 75
Figura 3.2 Diagrama para la obtención del compuesto de la fracción SFR-2b de
S. frantzii
Figura 3.3 Espectro de IR y CCD del compuesto I de S. frantzii
Figura 3.4 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto I de
S. frantzii
Figura 3.5 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto I de
S. frantzii
Figura 3.6 Estructura química del ácido betulínico84
Figura 3.7 Espectro de RMN ¹ H, estructura química y CCD del compuesto II de

Figura 3.8 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto II de	
S. frantzii	86
Figura 3.9 Espectro de DEPT 135 y estructura química del compuesto II de	
S. frantzii	87
Figura 3.10 Espectro de HSQC y estructura química del compuesto II de	
S. frantzii	88
Figura 3.11 Espectro de HMBC y estructura química del compuesto II de	
S. frantzii	89
Figura 3.12 Estructura química del acetato de urs-12-eno-3,19-diol	91
Figura 3.13 Espectro de RMN ¹ H, estructura química y CCD del compuesto III	
de S. frantzii	92
Figura 3.14 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto III de	
S. frantzii	93
Figura 3.15 Estructura química del ácido oleanólico	95
Figura 3.16 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto IV de S. frantzii	96
Figura 3.17 Espectro de IR del compuesto IV de S. frantzii	96
Figura 3.18 Espectro de RMN ¹ H y estructura química del compuesto IV de	
S. frantzii	97
Figura 3.19 Espectro de RMN ¹³ C y estructura química del compuesto IV de	
S. frantzii	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Referencias generales del material vegetal utilizado
Tabla 1.2 Tipo de moléculas aisladas del género Casearia 10
Tabla 1.3 Tipo de moléculas aisladas del género Stachytarpheta
Tabla 2.1 Rendimientos del extracto y fracciones de C. corymbosa
Tabla 2.2 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del ácido <i>ent</i> -(−)-kaur-16
-en-19-oico del con el compuesto I
Tabla 2.3 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del óxido de <i>ent</i> -3 β -hidroxi
-(-)-13- <i>epi</i> -manoil con el compuesto III
Tabla 2.4 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del óxido de <i>ent</i> -3 β -hidroxi
-(-)-13- <i>epi</i> -manoil sin acetilar y acetilado52
Tabla 2.5 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del óxido de <i>ent</i> -3 β -hidroxi
-(-)-13- <i>epi</i> -manoil sin oxidar y oxidado56
Tabla 2.6 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del óxido de <i>ent</i> -(-)
-13- <i>epi</i> -manoil con el compuesto IV60
Tabla 2.7 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del ácido siríngico
con el compuesto V64
Tabla 2.8 Comparación de las señales de RMN ¹³ C de la casearborina
con el compuesto VI 68
Tabla 3.1 Rendimientos del extracto y fracciones de S. frantzii 80

Tabla 3.2 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del ácido betulínico	
con el compuesto I	83
Tabla 3.3 Desplazamientos de las señales de RMN del compuesto II	90
Tabla 3.4 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del ácido oleanolico	
con el compuesto III	94
Tabla 3.5 Comparación de las señales de RMN ¹³ C del α-espinasterol	
con el compuesto IV	98

RESUMEN

Las plantas constituyen una fuente importante de metabolitos. El conocimiento fitoquímico es relevante, por su significancia quimiotaxonómica y además porque se ha reportado que muchos de los metabolitos secundarios aislados de especies vegetales tienen importantes actividades biológicas.

Los géneros *Casearia* y *Stachytarpheta* han presentado metabolitos con actividad farmacológica. Las especies *Casearia corymbosa* Kunth y *Stachytarpheta frantzii* Pol. tienen muy pocos y nulos estudios fitoquímicos, respectivamente.

En el presente trabajo se reporta el aislamiento y la elucidación de las estructuras moleculares de 10 metabolitos provenientes de las diferentes fracciones orgánicas del tallo de *C. corymbosa* y de la raíz de *S. frantzii*, mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas y la preparación de dos derivados semi-sintéticos.

Se aislaron cuatro metabolitos provenientes de la fracción hexánica y dos metabolitos provenientes de la fracción diclorometánica de *C. corymbosa*. Entre los metabolitos aislados se encuentran diterpenos de tipo kaureno y labdano, así como un esterol y un ácido benzoico.

Se aislaron cuatro metabolitos provenientes de la fracción hexánica y un metabolito proveniente de la fracción diclorometánica de *S. frantzii*. Entre los metabolitos aislados se encuentran triterpenos de tipo lupano, ursano y oleanano, así como un esterol.

ABSTRACT

Plants are an important source of metabolites. The phytochemical knowledge is relevant due to the chemotaxonomic significance and, particularly, because many of the secondary metabolites isolated from plant species show biological activity.

Casearia and *Stachytarpheta* genera have presented pharmacologically active metabolites. The species of *Casearia corymbosa* Kunth and *Stachytarpheta frantzii* Pol. have very few and no phytochemical studies, respectively.

In this paper, we report the isolation and elucidation of the molecular structures of 10 metabolites from the different organic fractions of *C. corymbosa* stem and *S. frantzii* root, by chromatographic, spectroscopic, and spectrometric techniques, and the preparation of two semi-synthetic derivatives.

Four metabolites were isolated from the hexane fraction and two metabolites from the dichloromethane fraction of *C. corymbosa*. Among the metabolites isolated, there are diterpenes of kaurene and labdane types, as well as a sterol and a benzoic acid.

Four metabolites were isolated from the hexane fraction and one metabolite from the dichloromethane fraction of *S. frantzii*. Among the metabolites isolated, there are triterpenes of lupane, ursane, and oleanane types, as well as a sterol.

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen una fuente importante de compuestos, los cuales han sido utilizados para tratar diversos tipos de padecimientos (Unnati *et al.,* 2013; Barnes *et al.,* 2007; Balunas y Kinghorn, 2005; Cragg & Newman, 2005). Desde la antigüedad distintas civilizaciones han usado las plantas con fines medicinales (Jaramillo-Juárez *et al.,* 2008).

México tiene un amplio registro de plantas usadas en la medicina tradicional para tratar síntomas de distintas enfermedades (Alonso-Castro *et al.*, 2011; Arellano-Rodríguez, 2003), y la Península de Yucatán no es la excepción (Hopkins y Stepp, 2012; Arellano-Rodríguez, 2003). Ésta posee una flora de 2,300 especies distribuidas en 956 géneros y 161 familias clasificadas como nativas o asilvestradas, es decir, que crecen naturalmente en una región determinada (Fernández-Carnevali *et al.*, 2012).

El aislamiento de metabolitos es útil para el conocimiento fitoquímico de las especies vegetales y para la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica (Ringuelet y Viña, 2013). En este contexto algunos estudios han sugerido a los géneros *Casearia* y *Stachytarpheta* como posibles fuentes de metabolitos con estructuras moleculares interesantes, es decir, que no se hayan reportado antes en la literatura o que tengan actividad biológica (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011; Okoye *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Penido *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2004; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Beutler *et al.*, 2000; Schapoval *et al.*, 1998; Hunter *et al.*, 1997). Entre este tipo de estudios se encuentra el realizado en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en colaboración con la Unidad de Investigación Médica Yucatán del IMSS (UIMY-IMSS) en el que se evaluaron diferentes plantas usadas en la medicina tradicional Maya, distinguiéndose la raíz de *Stachytarpheta frantzii* Pol. y el tallo de *Casearia corymbosa* Kunth con potencial farmacológico (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011).

El propósito de este trabajo fue aislar los compuestos que se encuentren en las diferentes fracciones orgánicas del tallo de *Casearia corymbosa* Kunth y de la raíz de *Stachytarpheta frantzii* Pol. e identificar las estructuras moleculares de estos metabolitos.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. TIPOS DE METABOLITOS EN PLANTAS

Los compuestos presentes en las plantas pueden ser clasificados como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son los que desempeñan funciones esenciales en la especie vegetal, necesarias para su mantenimiento, desarrollo y reproducción, a esta clase pertenecen los metabolitos que conforman a los carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Mientras que los metabolitos secundarios, por definición no son requeridos en procesos fisiológicos esenciales para la planta. Sin embargo, se sugiere que participan en funciones más específicas como en la defensa contra insectos o atrayente de ellos (Ringuelet y Viña, 2013; Dewick, 2002; Riveros *et al.,* 2002). Ejemplos de ellos son los flavonoides, terpenoides, cumarinas, lignanos y taninos (Kuklinski, 2003; Riveros *et al.,* 2002), los cuales se pueden encontrar en un género particular o estar distribuidos en muchas familias de plantas (conocimiento quimiotaxonómico) (Barnes *et al.,* 2007) y se pueden extraer de las diferentes partes de la planta como son raíces, tallo u hojas (Jaramillo-Juárez *et al.,* 2008). En el presente trabajo nos enfocaremos en los metabolitos secundarios.

2. ANÁLISIS FITOQUÍMICO

Para la búsqueda de nuevos metabolitos a partir de especies vegetales se pueden utilizar distintos enfoques, entre los que se encuentran:

1. Enfoque etnobotánico. Se refiere al conocimiento del uso particular de una planta por una comunidad indígena.

2. Enfoque quimiotaxonómico. Se refiere al conocimiento de cierta clase de compuestos que son producidos por un género o familia de plantas, lo cual sugiere que las plantas taxonómicamente relacionadas pueden contener compuestos estructuralmente similares.

3. Enfoque aleatorio. Es independiente de cualquier conocimiento previo (biológico o químico) (Atanasov *et al.*, 2016; Heinrich *et al.*, 2012).

El análisis fitoquímico del material vegetal comprende: la colecta del material vegetal, extracción de los metabolitos, separación y aislamiento de los mismos, identificación de los metabolitos, evaluación de la actividad biológica, investigación de las rutas biosintéticas y determinación cuantitativa (Ringuelet y Viña, 2013). Sin embargo, todo depende de los objetivos que estén contemplados en cada trabajo de investigación.

3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

La extracción es la obtención de los componentes del material vegetal por acción de soluciones extractivas (disolventes o fluidos) (Ferraro *et al.*, 2015; Pandey y Tripathi, 2014). Para la extracción de los metabolitos se utilizan diversos procedimientos entre los cuales están la maceración, digestión, deccoción, infusión, extracción Soxhlet, extracción asistida por microondas y extracción por fluidos supercríticos.

Maceración. En este procedimiento el material vegetal se mantiene en contacto con el disolvente en un recipiente durante un período de tiempo, la agitación facilita el proceso de extracción (Ferraro *et al.*, 2015; Pandey y Tripathi, 2014). La maceración puede ser simple o estática cuando la agitación es ocasional y dinámica cuando es constante (Sharapin, 2000).

Digestión. Es un tipo de maceración con una gentil aplicación de calor (sin llegar a ebullición) durante el proceso.

Deccoción. El material vegetal es hervido con el disolvente por un periodo de 15 minutos.

Infusión. En este proceso al material vegetal se le agrega agua hirviendo por un corto período (Ferraro *et al.*, 2015; Pandey y Tripathi, 2014).

Extracción Soxhlet. Es un proceso de extracción continua mediante el uso de disolventes en el que también puede incrementarse la polaridad (Ringuelet y Viña, 2013; Heinrich *et al.*, 2012).

Extracción asistida por microondas. Es un proceso de extracción con disolventes que emplea el uso de una irradiación por microndas, facilitando el proceso de extracción (Altemimi *et al.*, 2017; Ferraro *et al.*, 2015).

Extracción por fluidos supercríticos. Proceso que utiliza fluidos en estado supercrítico (estado de comportamiento híbrido gas-líquido), el CO₂ es el que se utiliza con mayor frecuencia (Wrona *et al.*, 2017; Heinrich *et al.*, 2012).

4. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

En el aislamiento de los metabolitos secundarios se utilizan diversas técnicas cromatográficas (Ringuelet y Viña, 2013). La cromatografía es un método de separación de mezclas que consiste en una fase estacionaria y una fase móvil, la primera fase se refiere a un sólido o un líquido adherido sobre un sólido y la segunda fase puede ser un liquído o un gas el cual se hará pasar a través de la fase estacionaria (Coskun, 2016) de esta forma se estarán separando los compuestos presentes en un material vegetal. Entre los tipos de cromatografía se encuentra la cromatografía líquida al vacio, en columna por gravedad, por exclusión molecular, en capa delgada y de gases (SECyTA, 2019; Coskun, 2016; Pelletier *et al.*, 1986).

Cromatografía líquida al vacio (CLV). En este tipo de cromatografía se utiliza una presión de vacío de 20-70 mm de Hg (utilizar una presión mayor podría causar posible ebullición de los disolventes o colapso de la cristalería) para hacer pasar la fase móvil a través de la fase estacionaria (Maurya *et al.*, 2018; Pelletier *et al.*, 1986). En el laboratorio ha sido útil en el procesamiento de una gran cantidad de muestra, hasta 30 g o poco más.

Cromatografía en columna por gravedad (CCG). La fase estacionaria se encuentra dentro de un tubo de vidrio y la fase móvil fluirá a través de la columna cromatográfica por acción de la gravedad, de esta forma los metabolitos eluyen de la columna por afinidad con el disolvente (SECyTA, 2019; Coskun, 2016).

Cromatografía por exclusión molecular (CEM). El principio es la separación por tamaño molecular, de tal forma que los metabolitos de mayor tamaño eluyen primero de la

columna y los de menor tamaño después (SECyTA, 2019), es común utilizar Sephadex LH-20, el cual es un polímero de dextrano, diseñado especificamente para la separación de productos naturales (GE Healthcare, 2014).

Cromatografía en capa delgada (CCD). En este tipo de cromatrografía la fase estacionaria se encuentra adherida a un soporte que puede ser aluminio o vidrio (llamado cromatofolio o cromatoplaca), la cual se coloca en una cámara saturada de la fase móvil, eluyendo los metabolitos por capilaridad (SECyTA, 2019; Coskun, 2016). La CCD se puede clasificar en analítica y preparativa, dependiendo del espesor de la capa (fase estacionaria) y forma de aplicación de la muestra. La CCD analítica tiene una capa de 0.25 mm de espesor y la muestra se aplica en forma de punto. La CCD preparativa tiene una capa de 2 mm de espesor o superior y la muestra se aplica en forma de banda (Albella *et al.*, 1993).

Cromatografía de gases (CG). La fase estacionaria se encuentra en una columna y la fase móvil es un gas inerte (He o N_2). La elución de los metabolitos se produce por el flujo del gas a través de la columna a una presión alta. En este tipo de cromatografía la muestra debe volatilizarse (SECyTA, 2019; Coskun, 2016).

5. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Las técnicas de espectroscopía se utilizan en la elucidación o identificación de los metabolitos (Ringuelet y Viña, 2013), las cuales se basan en la interacción energíamateria, basándose en la absorción de la radiación electromagnética por parte de la molécula, provocando en la misma ciertos fenómenos que nos proporcionará información sobre la molécula (Silverstein *et al.*, 2005). Las técnicas espectroscópicas utilizadas son la espectroscopía de ultravioleta (UV), la espectroscopía de infrarojo (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Ringuelet y Viña, 2013; Silverstein *et al.*, 2005).

En la espectroscopía de UV se utiliza la región ultravioleta del espectro electromagnético, proporcionando a la molécula la energía necesaria para provocar transiciones electrónicas, obteniendo información sobre si existen grupos insaturados y/o heteroatómicos presentes en la molécula (Durst y Gokel, 2007).
En la espectroscopía de IR se utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético, utilizando una radiación de 10,000-100 cm⁻¹ (Silverstein *et al.*, 2005), proporcionando a la molécula la energía necesaria para provocar vibraciones moleculares, obteniendo información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula (Barth, 2007; Silverstein *et al.*, 2005; Pasquini, 2003).

Por último, en la espectroscopía de RMN se utiliza la región de radiofrecuencias del espectro electromagnético proporcionando a la molécula la energía necesaria para provocar transiciones de spin nuclear y electrónico, obteniendo información sobre el tipo, número y entorno químico del núcleo átomico, los espectros de RMN más comunes son de protón y carbono (Bothwell y Griffin, 2011; Silverstein *et al.*, 2005), pues las moléculas orgánicas están conformadas principalmente de este tipo de núcleos átomicos.

6. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

Las técnicas espectrométricas también se utilizan como herramienta en la elucidación o identificación de los metabolitos (De Hoffmann y Stroobant, 2017; Ringuelet y Viña, 2013), para estudiar las masas de los átomos o moléculas de una muestra (Fuentes-Arderiu *et al.*, 1998). Está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa o especies desorbidas de fases sólidas, estos iones se separan en función de su relación masa/carga (*m/z*) y posteriormente son detectados y registrados, lo que nos proporcionará información sobre la masa molecular y estructura química de la mólecula a identificar (De Hoffmann and Stroobant, 2017; Silverstein *et al.*, 2005; Fuentes-Arderiu *et al.*, 1998), convirtiéndola en una técnica destructiva a diferencia de las técnicas espectroscópicas.

La espectrometría de masas se puede acoplar con la cromatografía de gases (CG-EM) o con la cromatografía de líquidos (CL-EM), teniendo como ventaja la unión de la capacidad de separación de la cromatografía con la capacidad de identificación de la espectrometría de masas, tomando en consideración que la CL-EM se utiliza cuando la muestra no se volatiliza (Fuentes-Arderiu *et al.*, 1998).

Para conocer el peso molecular exacto de la muestra analizada se utiliza la espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) (De Hoffmann y Stroobant, 2017).

7. PROPIEDADES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Como ya se mencionó, las plantas constituyen una fuente de compuestos y son utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades; de hecho, la mayoría de los fármacos disponibles provienen de fuentes vegetales o sus derivados (Unnati *et al.,* 2013; Balunas y Kinghorn, 2005; Cragg y Newman, 2005).

Muchos de los metabolitos secundarios aislados de especies vegetales tienen diversas clases de actividad farmacológica (Shankar *et al.*, 2017; Aljofan *et al.*, 2014; Dewick, 2002; Beutler *et al.*, 2000). Por ejemplo, en metabolitos de tipo terpeno se ha reportado actividad citótoxica en diferentes líneas celulares de cáncer (Sai-Pakrash *et al.*, 2009; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Beutler *et al.*, 2000), actividad antiinflamatoria, antimicrobiana (Lobitz *et al.*, 1997) y actividad leishmanicida (Fokialakis *et al.*, 2006). Otro ejemplo son alcaloides, que han sido reportados por tener actividad antiviral (Aljofan *et al.*, 2014), antitripanosomal (Nibret *et al.*, 2009), antibacterial y antihelmíntica (Rocha *et al.*, 2017).

Con el objetivo de buscar metabolitos con potencial farmacológico en los que se evalúan diversas plantas con propiedades medicinales (Suffredini *et al.*, 2007; Steenkamp y Gouws, 2006; Ankli *et al.*, 2002; Lentz *et al.*, 1998), se encuentra el realizado por nuestro grupo de investigación (en el CICY en colaboración con la UIMY-IMSS), con resultados favorables en las especies de *Casearia corymbosa* Kunth y de *Stachytarpheta frantzii* Pol. (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011). Partiendo de ese trabajo se eligieron el tallo de *C. corymbosa* y la raíz de *S. frantzii*, ya que fueron las partes de las plantas que tuvieron actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011), con el fin de aislar y purificar mediante técnicas cromatográficas los compuestos presentes en las fracciones de hexano y diclorometano (Tabla 1.1), así como elucidar las estructuras moleculares mediante técnicas espectroscópicas.

Especie	Parte de la	Familia [⊳]	Sinonimia	Sinonimia
	planta utilizada		maya ^a	popular ^b
Casearia corymbosa	Tallo	Flacourtiaceae	lxi' imche'	Zapote amarillo
Kunth				
Stachytarpheta	Raíz	Verbenaceae	X-polk' uy	Cola de mico
<i>frantzii</i> Pol.				

Tabla 1.1 Referencias generales del material vegetal utilizado.

^aCICY 2010; ^bAtlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009.

8. CASEARIA CORYMBOSA Y METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO CASEARIA

8.1. FAMILIA FLACOURTIACEAE

La familia Flacourtiaceae Rich ex DC. consta de 85 géneros y alrededor de 800 especies (Nee, 1999; Calderón de Rzedowski, 1996). En la actualidad se han transferido muchos géneros de esta familia a la familia Salicaceae Mirb. que consta de 55 géneros y 1,010 especies, entre ellos *Casearia* (Stevens, 2012). Los miembros de este grupo se caracterizan por ser árboles o arbustos, de distribución cosmopolita, que crecen en regiones tropicales (Stevens, 2012; Calderón de Rzedowski, 1996).

8.2. GÉNERO CASEARIA

El género *Casearia* Jacq. incluye aproximadamente 180 especies (Nee, 1999). Las plantas de este género se consideran como una fuente de diterpenos tipo clerodano (Tabla 1.2). Estos diterpenos son los responsables de los efectos inmunomoduladores (Hunter *et al.*, 1997) y citotóxicos (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2004; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Beutler *et al.*, 2000). De las hojas de la especie *C. corymbosa* se han aislado metabolitos de tipo diterpeno (Chen y Wiemer, 1991).



 Tabla 1.2 Tipo de moléculas aisladas del género Casearia.







Tipo de molécula(s) aislada(s)	Características
Diterpenos de tipo clerodano:	Especie: Casearia grewiifolia Material vegetal utilizado: frutos Actividad: Citotóxica (Kanokmedhaku I <i>et al.</i> , 2007).
R	
8 H 9 OH	
Diterpenos de tipo clerodano: $R_{1'}$, $R_{1'}$, R_{2} , R_{2	Especie: Casearia obliqua Material vegetal utilizado: hojas y ramitas Actividad: Citotóxica (Vieira-Junior <i>et</i> <i>al.</i> , 2009).
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	



Los diterpenos son metabolitos secundarios que se encuentran dentro del grupo de los terpenos, los cuales pueden provenir de dos rutas metabólicas: la ruta del ácido mevalónico o de la ruta de la desoxixilulosa 5-fosfato. Su esqueleto fundamental es de 20 carbonos, formados por la unión de cuatro unidades de isopreno (Dewick, 2002).

Los diterpenos de tipo clerodano son diterpenos bicíclicos (Marcano y Hasegawa 2002), en ocasiones los metilos del primer anillo se encuentran formando un anillo de furano (Figura 1.1) (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2004; Beutler *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 1997; Chen y Wiemer, 1991). También llamados de tipo kolovano o kovaleno (Atta-ur-Rahman, 2003). Los diterpenos de tipo norkolovano, han perdido un carbono en su estructura (Chen y Wiemer, 1991).



Figura 1.1 Esqueleto base de diterpeno de tipo clerodano.

8.3. ESPECIE CASEARIA CORYMBOSA

Casearia corymbosa Kunth también llamada C. nitida auct. non. Jacq., C. laevis Standl., C. banquetana Krause, C. salicifolia Turcz., C. lindeniana Briq., C. pringlei Briq., C. orizabana Briq., C. dubia D.C., C. dolichophylla Standl. cuyo nombre en maya es ixi' imche', comúnmente conocida en México como zapote amarillo, cafetillo, chilillo, botoncillo entre otros. Es un arbusto o árbol de 2-6 m de altura, llegando a medir 11 m (Figura 1.2) (CICY, 2010; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Nee, 1999). Se encuentra distribuida en muchos estados de la República Mexicana entre ellos Yucatán, Campeche y Quintana Roo (Figura 1.3) así como en el centro y sur de América Latina (CICY, 2010; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Nee 1999). Se utiliza como antiinflamatoria, antisifilítica, carminativa, antitusígeno, para el asma, la erisipela y heridas de la piel (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003).



Figura 1.2 Hojas, tallo y frutos de *C. corymbosa.*



Figura 1.3 Distribución de *C. corymbosa* en la Península de Yucatán. CICY, 2010.

9. STACHYTARPHETA FRANTZII Y METABOLITOS AISLADOS DEL GÉNERO STACHYTARPHETA

9.1. FAMILIA VERBENACEAE

La familia Verbenaceae J. ST.-Hil. comprende 35 géneros, entre los que se encuentra el género *Stachytarpheta*, y más de 1,000 especies. Esta familia está constituida por hierbas, arbustos o árboles, que con frecuencia son aromáticos, que crecen en zonas de clima templado y cálido, ampliamente distribuida en el mundo (Stevens, 2012; Calderón, 1996).

9.2. GÉNERO STACHYTARPHETA

El número de especies del género *Stachytarpheta* Vahl es incierto, de 30 a 40 especies según algunos autores (Rzedowski y Calderón, 2002; Nash y Nee, 1984). El Jardín Botánico de Missouri registra 305 especies, sin embargo, algunos nombres son sinónimos de otras (Missouri Botanical Garden, 2014).

En estudios químicos del género *Stachytarpheta* se han aislado compuestos de tipo glicósidos feniletanoides e iridoides (Tabla 1.3) (Viccini *et al.*, 2008; Penido *et al.*, 2006; Schapoval *et al.*, 1998). Las especies de este género tienen propiedad antiinflamatoria, antiulcerogénica y antimicrobiana (Okoye, *et al.*, 2010; Penido *et al.*, 2006; Schapoval *et al.*, 1998).

Molécula(s) aislada(s)	Características
Monoterpeno de tipo iridoide: HO HO HO HO HO HO HO HO HO HO	Especie: Stachytarpheta cayennensis Material vegetal utilizado: hojas Actividad: Antiinflamatoria y antinociceptiva (Schapoval <i>et</i> <i>al.,</i> 1998)
Monoterpeno de tipo iridoide: O O H O O H O O H O O H O O H O O Glic Glicósido feniletanoide: HO O H HO O H O H	Especie: Stachytarpheta cayennensis Material vegetal utilizado: hojas Actividad: Antiinflamatoria y antiulcerogénica (Penido <i>et</i> <i>al.,</i> 2006)
Monoterpenos de tipo iridoide: COOCH ₃ HO HO HO HO HO GOOCH ₃	Especie: Stachytarpheta glabra Material vegetal utilizado: hojas Actividad: No se reporta actividad biológica (Viccini <i>et al.,</i> 2008)

 Tabla 1.3 Tipo de moléculas aisladas del género Stachytarpheta.

Molécula(s) aislada(s)	Características
Glicósido feniletanoide:	Especie: Stachytarpheta glabra Material vegetal utilizado: hojas Actividad: No se evaluó su efecto (Viccini <i>et al.,</i> 2008)
Ninguna molécula se aisló. Sólo se evaluaron extractos y fracciones.	Especie: Stachytarpheta cayennensis Material vegetal utilizado: hojas Actividad: Antimicrobiana y antiespasmódica (Okoye <i>et</i> <i>al.</i> , 2010)

Los monoterpenos constan de 10 carbonos como esqueleto base y están constituidos de dos unidades de isopreno y al igual que los diterpenos pertenecen al grupo de los terpenos (Dewick, 2002). Los monoterpenos de tipo iridoide son monoterpenos de tipo bicíclico, uno de los cuales es el ciclopentano el cual se encuentra fusionado a un heterociclo con oxígeno de seis miembros como el anillo de pirano (Marcano y Hasegawa, 2002). En ocasiones unidos a una molécula de azúcar (Figura 1.4) (Penido *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 1998).

Glc

Figura 1.4 Esqueleto base del monoterpeno de tipo iridoide.

Los glicósidos fenólicos son metabolitos secundarios que constan de dos componentes: el azúcar y la parte aglicona que es una molécula diferente al azúcar (Marcano y Hasegawa,

2002). A este tipo de metabolitos encontrados en la planta de *S. frantzii* en ocasiones se les refiere también como glicósidos fenilpropanoides (arilpropanoides) o glicósidos feniletanoides (Penido *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 1998) porque hay dos grupos aglicona unidos a la glucosa, siendo uno el feniletanoide y el otro el fenilpropanoide (Figura 1.5) (Okoye *et al.,* 2010; Penido *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 1998). Estos metabolitos provienen de la ruta del ácido shikímico (Dewick, 2002).



Figura 1.5 Esqueleto base del glicósido feniletanoide.

9.3. ESPECIE STACHYTARPHETA FRANTZII

Stachytarpheta frantzii Pol. también es llamada S. frantzii var. patentiflora Moldenke, S. guatemalenseis var. lundelliana Moldenke, S. robinsoniana Moldenke, S. mutabilis var. maxonii Moldenke (CICY, 2010; Nash y Nee 1984) cuyo nombre en maya es *x-polk' uy*, comúnmente llamada cola de mico o verbena (CICY, 2010; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Esta especie es una hierba o arbusto de 1-2 m de alto (Figura 1.6) (Rzedowski y Calderón, 2002) y se encuentra distribuida en la Península de Yucatán (Figura 1.7) así como en otros estados de México, al igual que en Centroamérica y las Antillas (CICY, 2010; Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003; Rzedowski y Calderón, 2002). Se utiliza para contrarrestar el dolor de oído en Quintana Roo y para heridas en Yucatán (Atlas de las Plantas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).



Figura 1.6 Tallo y flores de S. frantzii.



Figura 1.7 Distribución de *S. frantzii* en la Península de Yucatán. CICY, 2010.

JUSTIFICACIÓN

Hasta el día de hoy las plantas constituyen una fuente importante de metabolitos y el conocimiento fitoquímico es importante por su significancia quimiotaxonómica, además de que muchos metabolitos secundarios han reportado actividad biológica; de hecho, la mayoría de los fármacos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de muchas enfermedades son obtenidos a partir de ellos. En este contexto el estudio de las especies del género *Casearia* y *Stachytarpheta* es requerido puesto que se ha reportado que tienen diversas propiedades farmacológicas. Dentro de éstas, las especies *C. corymbosa* y *S. frantzii* tienen pocos y nulos estudios fitoquímicos respectivamente y se ha reportado su

potencial farmacológico en un estudio previo. Por lo que se aislaron y purificaron, mediante técnicas cromatográficas, metabolitos secundarios mayoritarios provenientes de las fracciones del extracto metanólico del tallo de *C. corymbosa* y de la raíz de *S. frantzii*. Asimismo, se elucidaron con ayuda de técnicas espectroscópicas y espectrométricas sus estructuras moleculares, así contribuir el conocimiento fitoquímico de ambas especies, para el propósito del presente trabajo.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de las especies vegetales *Casearia corymbosa* y *Stachytarpheta frantzii* contienen metabolitos de tipo terpenoide, no reportados en la literatura.

OBJETIVO GENERAL

Aislar y elucidar las estructuras moleculares de los metabolitos mayoritarios de las fracciones orgánicas del tallo de *Casearia corymbosa* y de la raíz de *Stachytarpheta frantzii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Aislar y purificar los metabolitos del tallo de *C. corymbosa* y de la raíz de *S. frantzii* mediante técnicas cromatográficas.
- Elucidar las estructuras químicas de los compuestos aislados de *C. corymbosa* y de *S. frantzii* mediantes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente esquema (Figura 1.8) muestra el procedimiento que se llevó a cabo para el aislamiento, la purificación y la elucidación de los metabolitos a partir de las especies estudiadas.



Figura 1.8 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE CASEARIA CORYMBOSA

2.1. INTRODUCCIÓN

El género *Casearia* ha sido considerado como parte de la familia Flacourtiaceae, pero en la actualidad se ha transferido este género a la familia Salicaceae (Stevens, 2012; Calderón de Rzedowski, 1996; Nee, 1999). El género es considerado una fuente de metabolitos secundarios de tipo terpenoide, específicamente diterpenos de tipo clerodano, de los cuales se ha reportado efecto citotóxico (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2004; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Beutler *et al.*, 2000).

En Yucatán se reporta la distribución de algunos miembros de este género, entre ellos la especie *Casearia corymbosa* Kunth (CICY, 2010). Plantas de la especie *C. corymbosa*, cuyo nombre en maya es *ixi' imche*', se utilizan en medicina tradicional para tratar los síntomas de diversas afecciones (Arellano-Rodríguez *et al.*, 2003). Sin embargo, de la especie vegetal hay pocos estudios fitoquímicos o biológicos.

Partiendo de un estudio previo (realizado en el CICY en colaboración con el IMSS) en el que se reportó que el extracto metanólico del tallo de *C. corymbosa* mostró actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011), en el presente trabajo se aisló, elucidó e identificó los metabolitos a partir del extracto metanólico de esta especie vegetal. De los seis metabolitos que se aislaron, tres metabolitos son nuevos en la especie *C. corymbosa*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Los disolventes orgánicos utilizados en los diferentes procesos de extracción fueron de grado técnico destilados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY.

Para la concentración del extracto metanólico se utilizó un evaporador rotatorio equipado con una bomba de alto vacío a una presión de 70 mm de Hg y un baño de agua a 40 °C (marca Büchi R-151). Para la eliminación de los disolventes de las particiones y fracciones también se utilizó un evaporador rotatorio de menor potencia (presión de vacío menor a 70 mm de Hg, 40 °C, marca Büchi 461).

La CCD se realizó con cromatofolios (aluminio) o cromatroplacas (vidrio) impregnados con gel de sílice (60 Å, F₂₅₄, Merck). Las placas fueron visualizadas por espectroscopía de UV a 254 nm y 365 nm en un gabinete de marca Chromato-Vue[®] C-75. Para revelar las placas se utilizó una disolución de ácido fosfomolíbdico o una disolución de óleum, en los casos en los que se deseaba determinar la naturaleza del compuesto.

Para la CLV la columna se empacó con gel de sílice (60 Å, 0.75 cm³/g, 2-25 μ m, Sigma-Aldrich y gel de sílice 60 Å, 0.75 cm³/g, 70-230 mallas, Sigma-Aldrich para la cabeza de la columna) con una presión de vacío de 70 mm de Hg.

Para empacar la CCG se utilizó gel de sílice (60 Å, 0.75 cm³/g, 70-230 mallas, Sigma-Aldrich).

En la CEM se utilizó Sephadex LH-20 para el empaque de la misma.

La determinación del punto de fusión (p.f.) se realizó mediante un bloque de calentamiento conectado a un registro de temperatura (Melt-Temp II, Fluke 51^{K/J} Thermomether).

Para la CG se utilizó el equipo 7890A (G3440A) GC System marca Agilent Technologies y como gas acarreador N₂.

En la CG-EM el equipo usado fue el 6890N (G1530N) Network GC System marca Agilent Technologies acoplado al detector másico 5975B Inert MSD (G3171A) y como gas acarreador He.

El equipo que se utilizó en la espectroscopía de IR fue el modelo Nicolet 8700 (FTIR), marca Thermo Scientific, usando como pastilla KBr.

En la reacción de oxidación se usó disolvente orgánico grado técnico y clorocromato de piridinio, preparado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY. Para la recuperación del producto se utilizó disolvente orgánico grado técnico.

Para la reacción de acetilación se utilizó anhídrido acético (Técnica Química, S.A. de C.V.) y piridina (Aldrich Chemical Company, Inc.). En la recuperación del producto se usó disolvente orgánico grado técnico, así como HCI (J.T. Baker) e NaOH (Sigma-Aldrich) y Na₂SO₄ anhídro (J.T. Baker) para eliminar las trazas de agua.

2.2.2. MATERIAL VEGETAL

La colecta se realizó el día 20 de noviembre de 2013 en Othón P. Blanco, Quintana Roo y la identificación de la especie la realizó Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Un ejemplar se depositó en el herbario de la institución con el número de Voucher P.Simá 3562.

El material se procesó, descortezando los tallos (parte de la planta que presentó actividad en estudio previo) (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011) y secándolos a una temperatura no mayor a 50 °C durante 48 h (para asegurar la completa deshidratación de la especie vegetal). Después se trituraron a 5 mm utilizando un molino de cuchillas (Pagani ®).

2.2.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal (1,327 g) seco y triturado se maceró (método estático) con metanol (MeOH, 3 × 4 L) por 48 h (i.e. primera extracción) y posteriormente por 24 h, con agitación ocasional (3 a 4 veces durante el día). La concentración del extracto se realizó con ayuda de un evaporador rotatorio.

2.2.4. PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS

El extracto metanólico (CCT-1), fue sometido a una partición líquido-líquido (3×) con tres diferentes disolventes orgánicos de polaridad ascendente: hexano (Hx), diclorometano (CH₂Cl₂) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose en total cuatro fracciones con la fase acuosa (CCT-2a: fracción Hx; CCT-2b: fracción CH₂Cl₂; CCT-2c: fracción AcOEt y CCT-2d: fracción acuosa).

2.2.4.1. Procesamiento de la fracción hexánica (CCT-2a)

La fracción CCT-2a fue subfraccionada mediante una CLV con mezclas de disolventes orgánicos a los cuales se les incrementó la polaridad en un 10% y haciendo modificaciones en el aumento de la polaridad dependiendo de los resultados en la CCD. Las fracciones resultantes de la CLV fueron reunidas de acuerdo a su similitud en CCD dando en total nueve subfracciones (CCT-3a – CCT-3i). De estas últimas se tomaron las subfracciones CCT-3b, CCT-3d, CCT-3e y CCT-3f para seguir con el subfraccionamiento y posterior purificación de los metabolitos, debido a que presentaron menor complejidad (i.e. menor número de manchas en CCD) y mayor rendimiento (Figura 2.1).



Figura 2.1 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción CCT-2a de C. corymbosa.

2.2.4.1.1. Aislamiento del compuesto I, ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico o ácido kaurenoico

Las subfracciones CCT-3d y CCT-3e compartían algunos metabolitos en común, por lo cual se decidió mezclarlas con el fin de enriquecer los componentes y fraccionarlas mediante una CLV dando un total de siete fracciones (CCT-4a – CCT-4g). Las fracciones CCT-4a y CCT-4b se purificaron con una CEM con sephadex LH-20 usando el sistema $CH_2Cl_2/MeOH$ (1:1); de este procedimiento se obtuvieron seis fracciones (CCT-12a – CCT-12f). La fracción CCT-12d se lavó dos veces con el sistema en el que se procesó la columna, obteniéndose cristales incoloros y separando el sobrenadante que contenía

metabolitos minoritarios de la muestra, aislándose el ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico (CCT-12d1). Se determinó su p.f. para conocer su grado de pureza.

Compuesto I, ácido *ent-(-)-kaur-16-en-19-oico.* Cristales cúbicos (189.1 mg; rendimiento 0.17%), p.f. 170.3 – 172.5 °C, R_f = 0.5 en Hx/AcOEt (9:1). Soluble en CH₂Cl₂. **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 3061, 1695, 2977, 2925, 2851 y 1655. RMN-¹H (600 MHz, CDCI₃): δ 4.80 (1H, s, H-17a), 4.74 (1H, s, H-17b), 2.64 (1H, pt, H-13), 2.16 (1H, m, H-3a), 2.06 (1H, s, H-15a), 2.04 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, H-15b), 1.99 (1H, m, H-14a), 1.88 (2H, m, H-1), 1.84 (2H, m, H-6), 1.53 (1H, t, *J* = 3.3 Hz, H-7a), 1.51 (1H, t, *J* = 3.3 Hz, H-7b), 1.45 (2H, m, H-12), 1.24 (3H, s, H-18), 1.13 (1H, m, H-14b), 1.06 (2H, t, *J* = 6.4 Hz, H-5 y H-9), 1.01 (1H, td, *J* = 4.5, 13.5, 13.5 Hz, H-3b), 0.95 (3H, s, H-20). RMN-¹³C (150 MHz, CDCI₃): δ 184.1 (C-19, COOH), 155.9 (C-16), 103.0 (C-17), 57.0 (C-5), 55.1 (C-9), 49.0 (C-15), 44.2 (C-8), 43.8 (C-13), 43.7 (C-4), 41.3 (C-7), 40.7 (C-1), 39.7 (C-10), 39.7 (C-14), 37.8 (C-3), 33.1 (C-12), 29.0 (C-18), 21.8 (C-6), 19.1 (C-2), 18.4 (C-11), 15.6 (C-20). EMAR: *m/z* 302.2237 (calculado para C₂₀H₃₀O₂, *m/z* 302.2243).

2.2.4.1.2. Aislamiento del compuesto II, y-sitosterol

Este compuesto se obtuvo al subfraccionar la subfracción CCT-24b mediante una CCG donde se obtuvieron diez subfracciones (CCT-25a – CCT-25j). La subfracción CCT-25e se subfraccionó mediante una nueva CCG de la cual se obtuvieron cinco subfracciones (CCT-26a – CCT-26e). La subfracción CCT-26c también se subfraccionó mediante una CCG con el sistema Hx/AcOEt (9:1) y de ésta se obtuvieron cinco subfracciones (CCT-28a – CCT-28e), aislándose el compuesto γ-sitosterol (CCT-28d1).

Compuesto II, γ -sitosterol. Cristales aciculares (12.5 mg; rendimiento 0.01%). R_f = 0.33 en Hx/An (8:2). Soluble en CH₂Cl₂. **CG-EM (% int. rel.)**: $t_{\rm R}$ = 15.12 min, *m/z* 414 ([M]⁺, 100), 396 (54), 381 (43), 255 (43), 213 (54), 145 (58), 81 (42).

2.2.4.1.3. Aislamiento del compuesto III, óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo

La subfracción CCT-24d fue subfraccionada mediante una CCG con el sistema Hx/An (9:1) y se obtuvieron seis subfracciones (CCT-29a – CCT-29f), aislándose el óxido de ent-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol (CCT-29c1).

Compuesto III, **óxido de** *ent*-**3**β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo. Cristales aciculares (467.1 mg; rendimiento 0.41%), $R_f = 0.53$ en Hx/AcOEt (8:2). Soluble en CH₂Cl₂. **IR** v_{max} cm⁻¹: 3400, 3076, 2965, 2943, 2868, 1699 y 1658. **RMN-**¹**H** (**600 MHz, CDCl**₃): δ 6.01 (1H, dd, *J* = 11.1, 18.0 Hz, H-14), 4.97 (1H, d, *J* = 17.9 Hz, H-15a), 4.92 (1H, d, *J* = 11.4 Hz, H-15b), 3.22 (1H, dd, *J* = 4.5, 11.6 Hz, H-3, C<u>H</u>OH), 2.21 (1H, dd, *J* = 3.7, 6.8 Hz, H-12b), 1.78 (1H, dd, *J* = 3.2, 8.9 Hz, H-7a), 1.69 (1H, m, H-1a), 1.66 (2H, m, H-6), 1.59 (2H, m, H-2), 1.49 (1H, d, *J* = 4.7 Hz, H-12a), 1.46 (2H, m, H-11), 1.33 (1H, dd, *J* = 2.9, 11.3 Hz, H-7b), 1.22 (3H, s, H-17), 1.16 (1H, dd, *J* = 4.2, 9.1 Hz, H-9), 1.13 (3H, s, H-16), 0.98 (3H, s, H-18), 0.93 (1H, dd, *J* = 2.4, 11.9 Hz, H-5), 0.75 (3H, s, H-19), 0.73 (3H, s, H-20). **RMN-**¹³**C** (150 MHz, CDCl₃): δ 147.5 (C-14), 109.6 (C-15), 75.8 (C-8), 78.9 (C-3, <u>C</u>HOH), 73.4 (C-13), 58.3 (C-9), 55.2 (C-5), 43.0 (C-7), 38.8 (C-4), 37.6 (C-1), 36.6 (C-10), 34.8 (C-12), 32.7 (C-16), 28.0 (C-18), 27.3 (C-2), 23.8 (C-17), 19.5 (C-6), 16.0 (C-11), 15.9 (C-20), 15.2 (C-19).CG-EM (% int. rel.): $t_{\rm R}$ = 7.61 min, *m*/z 291 ([M]⁺, 100), 273 (12), 255 (91), 190 (30), 175 (29), 135 (42), 81 (38).

Este compuesto, debido a su alto rendimiento (467.1 mg) y tener un grupo OH en su estructura, fue expuesto a reacciones de derivatización. Las dos reacciones se describen a continuación.

2.2.4.1.3.1 Acetilación del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol

En un matraz balón de 5 mL se disolvieron 10.9 mg de ribenol, 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 72 h, comprobándose el consumo de la materia prima por CCD. El producto acetilado se recuperó mediante una partición líquido-líquido vertiendo la suspensión en agua destilada y utilizando como disolvente AcOEt (2x, 2:1 y 1:1 v/v), la fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl al 5% (2x, 1:1 v/v), con agua destilada (2x, 1:1 v/v), con NaOH al

3% (2x, 1:1 v/v) y una disolución saturada con NaCl. Al final, se le añadió Na₂SO₄ para eliminar las trazas de agua. Después se filtró y evaporó el disolvente. Al producto de la reacción se le realizó un análisis por espectroscopía de IR y RMN de ¹³C y ¹H.

Compuesto III acetilado. Cristales aciculares (6 mg; rendimiento 55%), $R_f = 0.53$ en Hx/AcOEt (9:1). Soluble en CH₂Cl₂. **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 2969, 2942, 2870 y 1729. **RMN-**¹**H** (600 **MHz, CDCI₃**): δ 5.98 (1H, dd, J = 11.0, 17.9 Hz, H-14), 4.94 (1H, d, J = 17.9 Hz, H-15a), 4.89 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-15b), 4.45 (1H, dd, J = 4.6, 11.7 Hz, H-3), 2.18 (1H, dd, J = 3.0, 9.0 Hz, H-12b), 2.02 (3H, s, H-2', CH₃COO), 1.75 (1H, dd, J = 3.0, 8.9 Hz, H-7a), 1.67 (2H, d, m, H-6), 1.62 (2H, m, H-2), 1.46 (1H, t, J = 2.6 Hz, H-12a), 1.44 (2H, m, H-11), 1.31 (1H, dd, J = 2.6, 13.0 Hz, H-7b), 1.20 (3H, s, H-17), 1.15 (1H, dd, J = 3.8, 9.8 Hz, H-9), 1.11 (3H, s, H-16), 0.83 (3H, s, H-18), 0.80 (3H, s, H-19), 0.73 (3H, s, H-20). **RMN-**¹³**C** (150 MHz, CDCI₃): δ 171.1 (C-1', CH₃COO), 147.7 (C-14), 109.8 (C-15), 80.9 (C-3), 75.9 (C-8), 73.6 (C-13), 58.3 (C-9), 55.5 (C-5), 43.1 (C-7), 37.9 (C-4), 37.5 (C-1), 36.7 (C-10), 34.9 (C-12), 32.8 (C-16), 28.1 (C-18), 24.0 (C-2), 23.8 (C-17), 21.5 (C-2', CH₃COO), 19.6 (C-6), 16.5 (C-11), 16.2 (C-20), 16.1 (C-19).

2.2.4.1.3.2. Oxidación del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol

En un matraz balón de 10 mL se disolvierón 10.4 mg de ribenol, 2 mL de CH_2CI_2 y 46.7 mg de clorocromato de piridinio o también llamado reactivo de Corey (CCP). La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 24 h, comprobándose el consumo de la materia prima por CCD. El producto oxidado se recuperó por medio de una filtración, haciendo pasar la suspensión a través de una columna de gravedad usando gel de sílice (d = 2 cm, h = 3cm, 70-230 mallas) con filtro de vidrio poroso, mediante un sistema isocrático usando CH_2CI_2 y después se evaporó el disolvente. Al producto de la reacción se le realizó un análisis por espectroscopía de IR y RMN de ¹³C y ¹H.

 12.8 Hz, H-12b), 1.87 (1H, m, H-1a), 1.78 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-7a), 1.58 (1H, d, J = 12.4 Hz, H-12a), 1.48 (2H, m, H-11), 1.24 (3H, s, H-17), 1.12 (3H, s, H-16), 1.07 (3H, s, H-18), 0.99 (3H, s, H-19), 0.81 (3H, s, H-20). **RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃)**: δ 217.0 (C-3, CO), 147.6 (C-14), 109.9 (C-15), 75.7 (C-8), 73.8 (C-13), 57.9 (C-9), 54.9 (C-5), 42.4 (C-7), 38.4 (C-4), 36.6 (C-1), 35.0 (C-10), 34.1 (C-12), 32.9 (C-16), 26.9 (C-18), 29.9 (C-2), 23.6 (C-17), 21.1 (C-6), 21.0 (C-11), 16.6 (C-20), 15.7 (C-19).

2.2.4.1.4. Aislamiento del compuesto IV, óxido de ent-(-)-13-epi-manoilo

La subfracción CCT-3b se subfraccionó mediante una CLV, incrementando gradualmente la polaridad del sistema en un 5% y 10% según las placas en CCD; se obtuvieron siete subfracciones (CCT-40a – CCT-40g). La CCT-40b fue subfraccionada mediante una CCG, dando como resultado cinco subfracciones (CCT-41a – CCT-41e). La CCT-41a se subfraccionó mediante una CCG usando el sistema Hx/CH_2Cl_2 (7.8:2.2), de la cual se obtuvieron cinco subfracciones (CCT-45a – CCT-45e), aislándose el óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo (CCT-45a1).

Compuesto IV, 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent-(-)-13-epi-manoilo.* Sólido amorfo color blanco (81.5 mg; rendimiento 0.07%), $R_f = 0.41$ en Hx/CH₂Cl₂ (8:2). Soluble en CH₂Cl₂. **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 3071, 3012, 2992, 2970, 2888, 2868 y 2834. **RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃)**: δ 6.02 (1H, t, J = 14.5 Hz, H-14), 4.97 (1H, d, J = 17.9 Hz, H-15a), 4.91 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-15b), 2.21 (1H, m, H-12b), 1.77 (1H, m, H-7a), 1.61 (4H, m, H-1, H-6), 1.51 (1H, m, H-12a), 1.46 (2H, m, H-11), 1.37 (1H, d, J = 13.4 Hz, H-7b), 1.27 (1H, m, H-3), 1.22 (3H, s, H-17), 1.14 (3H, s, H-16), 0.95 (1H, d, J = 12.4 Hz, H-5), 0.86 (3H, s, H-18), 0.79 (3H, s, H-19), 0.73 (3H, s, H-20). **RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃)**: δ 147.7 (C-14), 109.5 (C-15), 76.1 (C-8), 73.3 (C-13), 58.5 (C-9), 56.5 (C-5), 43.1 (C-7), 42.1 (C-3), 39.3 (C-1), 36.8 (C-1), 34.8 (C-12), 33.3 (C-4), 33.3 (C-18), 32.7 (C-16), 23.9 (C-17), 21.2 (C-19), 19.9 (C-2), 18.6 (C-6), 15.9 (C-11), 15.9 (C-20). **CG-EM (% int. rel.)**: $t_{R} = 8.15$ min, *m/z* 275 (100), 245 (18), 220 (7), 192 (83), 163 (59), 137 (69), 109 (59), 81 (89), 55 (70).

Las estructuras moleculares de los cuatro compuestos aislados provenientes de la fracción hexánica y los derivados acetilado y oxidado se elucidaron utilizando la espectroscopía ultravioleta (UV), espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C y espectrometría de masas (EM).

2.2.4.2. Procesamiento de la fracción diclorometánica (CCT-2b)

La fracción CCT-2b se subfraccionó mediante una CLV usando el sistema Hx/AcOEt e incrementando la polaridad, dando en total nueve subfracciones (CCT-3ab – CCT-3ib). De estas últimas se tomaron las subfracciones CCT-3eb y CCT-3db para seguir con el subfraccionamiento y posterior purificación de los metabolitos, debido a que presentaron menor complejidad y mayor rendimiento (Figura 2.2).



Figura 2.2 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción CCT-2b de C. corymbosa.

2.2.4.2.1. Aislamiento del compuesto V, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5dimetoxibenzoico

La subfracción CCT-3eb se subfraccionó mediante una CEM dando un total de siete subfracciones (CCT-44a – CCT-44g). La CCT-44c se subfraccionó con una CCG usando el sistema $CH_2Cl_2/AcOEt$ (8:2), de la cual se obtuvieron siete subfracciones (CCT-48a – CCT-48g), aislándose el ácido siríngico (CCT-48a1).

Compuesto VI, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico. Polvo color crema (6.7 mg; rendimiento 0.006%), $R_f = 0.69$ en $CH_2CI_2/AcOEt$ (8:2). Soluble en An. **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 3471, 2994, 2950, 2839, 1685. RMN-¹H (600 MHz, CDCI₃): δ 7.30 (2H, s, H-2, H-6), 3.85 (6H, s, H-8, H-9, -OCH₃ × 2). RMN-¹³C (150 MHz, CDCI₃): δ 167.6 (C-7, COOH), 148.4 (C-3), 148.4 (C-5), 141.6 (C-4), 121.5 (C-1), 108.2 (C-2), 108.2 (C-6), 56.7 (C-8, -OCH₃), 56.7 (C-9, -OCH₃). CG-EM (% int. rel.): $t_R = 5.69$ min, m/z 198 ([M]⁺,100), 155 (8), 127 (29), 79 (9), 53 (12).

2.2.4.2.2. Aislamiento del compuesto VI, casearborina c

La subfracción CCT-3db se subfraccionó mediante una CEM dando un total de cuatro subfracciones (CCT-43a – CCT-43d). De estas últimas, las subfracciones CCT-43b y CCT-43c compartían algunos metabolitos en común, por lo cual se mezclaron con el fin de enriquecer los componentes y subfraccionarlas mediante una CCG dando un total de ocho subfracciones (CCT-49a – CCT-49h); CCT-49e se subfraccionó con una CCG; de este procedimiento se obtuvieron seis subfracciones (CCT-50a – CCT-50f). La subfracción CCT-50c se purificó con una nueva CCG usando el sistema $CH_2CI_2/AcOEt$ (7:3), de la cual se obtuvieron cuatro subfracciones (CCT-53a – CCT-53d), aislándose la casearborina c (CCT-53a1).

Compuesto VI, casearborina c. Cristales aciculares claros (8 mg; rendimiento 0.007%), $R_f = 0.61$ en CH₂Cl₂/AcOEt (6:4). Soluble en CH₂Cl₂. **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 3400, 2967, 2938, 1752, 1732. **RMN-¹H (600 MHz, CDCl₃)**: δ 8.02 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-4', H-6'), 6.86 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3', H-7'), 6.77 (1H, s, H-19), 6.51 (1H, t, J = 1.4 Hz, H-18), 6.32 (1H, dd, J = 10.7, 17.3 Hz, H-14), 6.02 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-3), 5.46 (1H, s, H-12), 5.14 (1H, dd, J = 4.2, 12.2 Hz, H-6), 5.10 (1H, d, J = 17.4 Hz, H-15a), 4.94 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-15b), 4.45 (1H, pt, H-2), 2.45 (1H, dd, J = 3.6, 13.5 Hz, H-10), 2.29 (1H, dd, J = 8.2, 17.1 Hz, H-11b), 2.06 (3H, s, H-18", CH₃COO), 2.03 (1H, m, H-1a), 2.00 (1H, m, H-1b), 1.98 (3H, s, H-19", CH₃COO), 1.89 (1H, t, J = 3.7 Hz, H-7a), 1.92 (1H, m, H-8), 1.78 (1H, d, J = 19.5 Hz, H-11a), 1.71 (1H, s, H-7b), 1.68 (3H, s, H-16), 0.94 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-17), 0.90 (3H, s, H-20). **RMN-**¹³**C (150 MHz, CDCI₃)**: δ 170.7 (C-18', CH₃COO), 170.1 (C-19', CH₃COO), 165.8 (C-1'), 160.9 (C-5'), 142.4 (C-4), 141.4 (C-14), 135.9 (C-13), 132.4 (C-4'), 132.4 (C-6'), 129.2 (C-12), 126.6 (C-3), 121.9 (C-2'), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-7'), 111.3 (C-15), 97.9 (C-19), 95.7 (C-18), 74.5 (C-6), 64.1 (C-2), 52.1 (C-5), 37.9 (C-9), 36.6 (C-10), 36.3 (C-8), 33.3 (C-7), 30.6 (C-11), 29.6 (C-1), 25.3 (C-20), 22.0 (C-19", CH₃COO), 21.4 (C-18", CH₃COO), 15.7 (C-17), 12.1 (C-16).

Las estructuras moleculares de los dos compuestos aislados provenientes de la fracción diclorometánica se elucidaron de la misma forma descrita al final de la sección 2.2.4.1. (Procesamiento de la fracción hexánica).

2.3. RESULTADOS

En la tabla 2.1 se observa el rendimiento del extracto MeOH (CCT-1) del tallo de *C. corymbosa* junto con las fracciones resultantes de la partición líquido-líquido. La fracción Hx fue la que tuvo el mayor rendimiento. Se analizó la complejidad de las fracciones por medio de CCD, mostrando diferencias entre ellas, por lo cual se decidió trabajar cada fracción por separado.

Extracto/fracción	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
CCT-1	112.5	8.47
CCT-2 ^a	30.7	27.28
CCT-2b	6.6	5.86
CCT-2c	16.3	14.48
CCT-2d	47.66	42.36

 Tabla 2.1 Rendimientos del extracto y fracciones de C. corymbosa.

CCT-1: extracto MeOH; CCT-2a: fracción Hx; CCT-2b: fracción CH₂Cl₂; CCT-2c: fracción AcOEt; CCT-2d: fracción acuosa.

2.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS

2.3.1.1. Fracción hexánica (CCT-2a)

La fracción hexánica fue subfraccionada por medio de una CLV (la cual nos permitió procesar una gran cantidad de muestra), dando un total de nueve subfracciones (CCT-3a – CCT-3i), de las cuales se tomaron las que tuvieron mayor rendimiento y menor complejidad en las manchas según CCD, para seguir con la purificación de los metabolitos. Las subfracciones CCT-3d y CCT-3e se subfraccionaron estando mezcladas mediante una nueva CLV, porque presentaron similitud en la complejidad de las manchas según CCD. De este procesamiento se obtuvieron siete subfracciones nuevas (CCT-4a – CCT-4g).

El compuesto I se obtuvo a partir de las subfracciones CCT-4a + CCT-4b. La CCT-3f fue otra subfracción primaria que se purificó, de la cuál se obtuvieron seis subfracciones (CCT-5a – CCT-5f) y de la CCT-5a se obtuvieron los compuesto II y III. La CCT-3b también se purificó, de la cual se obtuvo el compuesto IV; ya descrito en la sección de métodos (Figura 2.1). A continuación, se describe la elucidación estructural de cada compuesto y su identificación.

2.3.1.1.1. Identificación del compuesto I, ácido ent-(-)-kaur-16-en-19-oico

El compuesto I, ácido *ent*-(–)-kaur-16-en-19-oico o ácido kaurenoico, tiene un aspecto de cristales cúbicos, obteniéndose 189.1 mg (rendimiento 0.17%), es soluble en CH_2CI_2 . Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un $R_f = 0.5$ en Hx/AcOEt (9:1) (Figura 2.3). Debido a que la muestra no se volatiliza y por lo tanto no se observa alguna señal en el CG, para determinar su grado de pureza se determinó su p.f. el cual fue de 170.3 – 172.5 °C, indicando que el compuesto está puro, ya que el intervalo de incio-final de la fusión fue de ~2 °C.

En el espectro de IR (Figura 2.3) se observan bandas a 3061 cm⁻¹ características de enlaces carbono sp²-hidrógeno (C_{sp2} -H), una banda intensa a 1694 cm⁻¹ de un grupo carbonilo, bandas a 2977, 2925, 2851 cm⁻¹ de enlaces carbono sp³-hidrógeno (C_{sp3} -H) y una banda a 1655 cm⁻¹ del doble enlace carbono-carbono (C=C).

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.4) se observa la presencia de dos singuletes a δ 1.24 y 0.95 (s, 3H, H-18 y H-20), correspondientes a protones metílicos, dos singuletes a δ 4.80 y 4.74 (s, 1H, H-17a y H-17b), pertenecientes a protones vinílicos, tres tripletes a δ 2.04 (t, 1H, *J* = 2.6 Hz, H-15b), 1.53 (t, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-7a) y 1.51 (t, 1H, *J* = 3.3 Hz, H-7b) de protones metilénicos y un seudotriplete a δ 2.64 (pt, 1H, H-13), correspondiente a un protón metínico.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.5) se observan 20 carbonos, dos de los cuales son carbonos sp² correspondiente al doble enlace exocíclico a δ 155.9 (C-16) y 103.0 (C-17) y un carbono corresponde al grupo carbonilo de un ácido orgánico (COOH) a δ 184.1 (C-19); los otros carbonos tienen hibridación sp³.



Figura 2.3 Espectro de IR y CCD del compuesto I de C. corymbosa.



Figura 2.4 Espectro de RMN ¹H y estructura química del compuesto I de *C. corymbosa*.



Figura 2.5 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto I de *C. corymbosa*.

El compuesto I al elucidar la estructura resultó ser un diterpeno de tipo kaureno (Tabla 2.2 y Figura 2.6) (Kakuta *et al.*, 1992).

P	osición	Ácido <i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-oico	Compuesto I	
(fórmul	a C ₂₀ H ₃₀ O ₂)	(100.6 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	(150 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	
1	CH ₂	40.7	40.7	
2	CH_2	19.1	19.1	
3	CH_2	37.8	37.8	
4	С	43.7	43.7	
5	СН	57.0	57.0	
6	CH_2	21.8	21.8	
7	CH_2	41.2	41.3	
8	С	44.2	44.2	
9	СН	55.1	55.1	
10	С	39.7	39.7	
11	CH_2	18.4	18.4	
12	CH_2	33.1	33.1	
13	СН	43.8	43.8	
14	CH_2	39.6	39.7	
15	CH_2	48.9	49.0	
16	С	155.9	155.9	
17	CH_2	103.0	103.0	
18	CH_3	29.0	29.0	
19	COOH	184.8	184.1	
20	CH_3	15.6	15.6	

Tabla 2.2 Comparación de las señales de RMN ¹³C del ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico con el compuesto I.

Kakuta et al., 1992.



Figura 2.6 Estructura química del ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico.

2.3.1.1.2. Identificación del compuesto II, γ-sitosterol

El compuesto II, γ -sitosterol, tiene un aspecto de cristales aciculares, obteniéndose 12.5 mg (rendimiento 0.01%), es soluble en CH₂Cl₂. Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un R_f = 0.33 en Hx/An (8:2) (Figura 2.7) y de acuerdo con la comparación de una muestra patrón nos sugiere que se trata del sitosterol. Se encuentra en un 84% de pureza según el CG.

El análisis del espectro de CG-EM por comparación de una base de datos NIST del equipo sugiere con un elevado porcentaje de similitud (99%) que se trata del y-sitosterol. Además, los patrones de fragmentación que se observan en él son característicos de los esteroles (Martínez-Martínez, 2002; Friedland y Lane, 1959). En el CG-EM se observa un pico a m/z 414 [M]⁺ que corresponde al ion molecular y se ajusta a la fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ del y-sitosterol, con una fragmentación característica de los esteroles con un pico a m/z 396, lo que indica que perdió 18 u [M – H₂O], posiblemente después se perdió 15 u $[M - CH_3]$ lo cual da como resultado un pico a m/z 381. Posteriormente, sufre una serie perdiendo anillo de nuevas fragmentaciones. la cadena lateral del del ciclopentanoperhidrofenantreno lo que da como resultado un ion a m/z 213 (Figura 2.7).

También se muestran las probables fragmentaciones del compuesto (Figura 2.8). La molécula se muestra en la Figura 2.9






Figura 2.8 Fragmentaciones posibles del compuesto II según el CG-EM (Martínez-Martínez, 2002; Friedland y Lane, 1959).



Figura 2.9 Estructura química del γ-sitosterol.

2.3.1.1.3. Identificación del compuesto III, óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo

El compuesto III, óxido de *ent*-3 β -hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo, tiene un aspecto de cristales aciculares, obteniéndose 467.1 mg (rendimiento 0.41%), es soluble en CH₂Cl₂. Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un R_f = 0.53 en Hx/AcOEt (8:2) (Figura 2.10). Según el cromatograma de CG se encuentra en un 92% de pureza.

En el análisis de CG-EM (Figura 2.10) se observan pérdidas de 18 u $[M - H_2O]$ lo que concuerda con el grupo OH observado en el IR, además hay pérdidas de 14 u $[M - CH_2]$. Tambien se observa la pérdida de 15 u $[M - CH_3]$.

En el espectro de IR (Figura 2.11) se observan bandas a 3400 cm⁻¹ características de un grupo hidroxilo (OH), bandas a 3076 cm⁻¹ de enlaces C_{sp2} -H, bandas a 2965, 2943, 2868 cm⁻¹ de C_{sp3} -H y bandas a 1699 y 1658 cm⁻¹ de un doble enlace C=C.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.12) se observa la presencia de cinco singuletes a δ 1.22, 1.13, 0.98, 0.75 y 0.73 (s, 3H, H-17, H-16, H-18, H-19 y H-20), correspondientes a protones metílicos, una señal doble de dobles a δ 6.01 (dd, 1H, *J* = 11.1, 18.0 Hz, H-14) y dos dobletes a δ 4.97 (d, 1H, *J* = 17.9 Hz, H-15a) y 4.92 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz, H-15b), correspondientes a protones vinílicos.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.13) se observan 20 carbonos, dos de los cuales son carbonos sp² correspondientes al doble enlace exocíclico a δ 147.5 (C-14) y 109.6 (C-15), dos corresponden a un puente de carbonos unidos mediante un oxígeno a δ 75.8 (C-8) y 73.4 (C-13), uno corresponde al carbono base de alcohol a δ 78.9 (C-3); los otros carbonos tienen hibridación sp³.







Figura 2.11 Espectro de IR del compuesto III de C. corymbosa.



Figura 2.12 Espectro de RMN ¹H y estructura química del compuesto III de *C. corymbosa*.



Figura 2.13 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto III de *C. corymbosa*.

El compuesto III al elucidar la estructura resultó ser un diterpeno de tipo labdano (Tabla 2.3 y Figura 2.14) (Demirezer *et al.,* 2012).

Posición		Óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-13-	Compuesto III
(fórmula C ₂₀ H ₃₄ O ₂)		(−)- <i>epi</i> -manoil o ribenol	(150 MHz, CDCl₃), δ _C
		(100 MHz, $CDCI_3$), δ_C	
1	CH ₂	37.8	37.6
2	CH_2	27.5	27.3
3	СН	79.1	78.9
4	С	39.1	38.8
5	СН	55.5	55.2
6	CH_2	19.8	19.5
7	CH_2	43.2	43.0
8	С	76.0	75.8
9	СН	58.5	58.3
10	С	36.7	36.6
11	CH_2	16.2	16.0
12	CH_2	35.0	34.8
13	С	73.6	73.4
14	СН	147.8	147.5
15	CH_2	109.8	109.6
16	CH_3	32.9	32.7
17	CH_3	24.0	23.8
18	CH_3	28.2	28.0
19	CH_3	15.4	15.2
20	CH_3	16.1	15.9

Tabla 2.3 Comparación de las señales de RMN ¹³C del óxido de *ent*-3 β -hidroxi -(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol con el compuesto III.

Demirezer et al., 2012.



Figura 2.14 Estructura química del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(−)-13-*epi*-manoilo o ribenol.

Como se mencionó anteriormente este compuesto fue expuesto a reacciones de derivatización, las cuales se describen a continuación.

2.3.1.1.3.1. Identificación del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(−)-13-*epi*-manoilo o ribenol acetilado

De los 10.9 mg de ribenol expuesto a la reacción de acetilación se obtuvó 6 mg (rendimiento 55%) de producto acetilado. El ribenol acetilado tiene un aspecto de cristales aciculares, es soluble en CH_2Cl_2 . Este producto acetilado no se ve bajo luz UV. En el mismo sistema que la muestra original (ribenol sin acetilar) se observa claramente una disminución de la polaridad con un $R_f = 0.85$ en Hx/AcOEt (8:2) (Figura 2.15).

En el espectro de IR del ribenol acetilado (Figura 2.15) se puede observar una banda a 1729 cm⁻¹ característico del grupo carbonilo de un éster y no se observa la banda a 3400 cm⁻¹ del grupo OH que se observa en el espectro de la muestra original sin acetilar. Las bandas de 2989, 2942 y 2870 cm⁻¹ corresponden a enlaces C_{sp3} -H.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.16) se observa la presencia de seis singuletes a δ 2.02, 1.20, 1.11, 0.83, 0.80 y 0.73 (s, 3H, H-2', H-17, H-16, H-18, H-19 y H-20), correspondientes a protones metílicos, una señal dobles de dobles a δ 5.98 (dd, 1H, *J* = 11.0, 17.9 Hz, H-14) y dos dobletes a δ 4.94 (d, 1H, *J* = 17.9 Hz, H-15a) y 4.89 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H-15b), correspondientes a protones vinílicos y otra señal doble de dobles a δ 4.45 (1H, dd, *J* = 4.6, 11.7 Hz, H-3), perteneciente a un protón metínico.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.17) se observan 22 carbonos, uno de los cuales corresponde a un grupo carbonilo de un éster a δ 171.1 (C-1'), dos de ellos son carbonos sp² correspondientes al doble enlace exocíclico a δ 147.8 (C-14) y 109.8 (C-15), uno corresponde al carbono base de un éster a δ 80.9 (C-3), dos corresponden a un puente de carbonos unidos mediante un oxígeno a δ 75.9 (C-8) y 73.9 (C-13); las otras señales pertenecen a carbonos con una hibridación sp³.



Figura 2.15 Espectro de IR y CCD del compuesto III acetilado de C. corymbosa.



Figura 2.16 Espectro de RMN ¹H y estructura química del compuesto III acetilado de *C. corymbosa*.



Figura 2.17 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto III acetilado de *C. corymbosa*.

El compuesto III es un diterpeno de tipo labdano. A continuación, se presenta la estructura acetilada y una tabla de comparación con la muestra original (Tabla 2.4 y Figura 2.18).

Posición		Óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-13-	Óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-(−)-
(fórmula C ₂₂ H ₃₆ O ₃)		(−)- <i>epi</i> -manoilo	13- <i>epi</i> -manoilo acetilado
		(150 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	(150 MHz, CDCl ₃), δ _C
1	CH ₂	37.6	37.5
2	CH_2	27.3	24.0
3	СН	78.9	80.9
4	С	38.8	37.9
5	СН	55.2	55.4
6	CH_2	19.5	19.6
7	CH_2	43.0	43.1
8	С	75.8	75.9
9	СН	58.3	58.3
10	С	36.6	36.7
11	CH_2	16.0	16.5
12	CH_2	34.8	34.9
13	С	73.4	73.6
14	СН	147.5	147.7
15	CH_2	109.6	109.8
16	CH ₃	32.7	32.8
17	CH ₃	23.8	23.8
18	CH ₃	28.0	28.1
19	CH ₃	15.2	16.1
20	CH ₃	15.9	16.2
1'	COO		171.1
2'	CH_3		21.5

Tabla 2.4 Comparación de las señales de RMN ¹³C del óxido de *ent*-3 β -hidroxi-(-)-13*epi*-manoilo sin acetilar y acetilado.



Figura 2.18 Estructura química del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(−)-13-*epi*-manoilo acetilado.

2.3.1.1.3.2. Identificación del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol oxidado

De los 10.4 mg de ribenol expuesto a la reacción de oxidación se obtuvó 6.3 mg (rendimiento 60%) de producto oxidado. El ribenol oxidado tiene un aspecto de cristales aciculares, soluble en CH_2CI_2 . El producto oxidado no se ve bajo luz UV. En el mismo sistema que la muestra original (ribenol sin oxidar) se observa claramente una disminución de la polaridad con un $R_f = 0.77$ en Hx/AcOEt (8:2) (Figura 2.19).

En el espectro de IR del ribenol oxidado (Figura 2.19) se puede observar una banda a 1702 cm⁻¹ característica de un grupo carbonilo de una cetona y no se observa la banda a 3400 cm⁻¹ del grupo OH que se observa en el espectro de la muestra original sin oxidar; las bandas de 2969, 2940 y 2885 cm⁻¹ corresponden a enlaces C_{sp3} -H, mientras que las bandas de 3085 y 3058 cm⁻¹ corresponden a enlaces C_{sp2} -H.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.20) se observa la presencia de cinco singuletes a δ 1.24, 1.12, 1.07, 0.99 y 0.81 (s, 3H, H-17, H-16, H-18, H-19 y H-20), correspondientes a protones metílicos, una señal doble de dobles a δ 5.99 (dd, 1H, *J* = 11.0, 17.9 Hz, H-14) y dos dobletes a δ 4.96 (d, 1H, *J* = 17.9 Hz, H-15a) y 4.91 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H-15b), pertenecientes a protones vinílicos.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.21) se observan 20 carbonos, uno de los cuales corresponde a un grupo carbonilo de una cetona a δ 217.0 (C-3), dos de ellos son carbonos sp² correspondientes al doble enlace exocíclico a δ 147.8 (C-14) y 109.8 (C-15)

y dos corresponden a un puente de carbonos unidos mediante un oxígeno a δ 75.7 (C-8) y 73.8 (C-13); las otras señales pertenecen a carbonos con una hibridación sp³.



Figura 2.19 Espectro de IR y CCD del compuesto III oxidado de C. corymbosa.



Figura 2.20 Espectro de RMN ¹H y estructura química del compuesto III oxidado de *C. corymbosa*.



Figura 2.21 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto III oxidado de C. corymbosa.

El compuesto III oxidado es un diterpeno de tipo labdano. A continuación, se presenta la estructura oxidada y una tabla de comparación con la muestra original (Tabla 2.5 y Figura 2.22).

Posición		Óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-13-	Óxido de <i>ent</i> -3β-hidroxi-
(fórmula $C_{20}H_{32}O_2$)		(−)- <i>epi</i> -manoilo	(−)-13- <i>epi</i> -manoilo
		(150 MHz, CDCl ₃), δ _C	oxidado
			(150 MHz, CDCl ₃), δ _C
1	CH ₂	37.6	36.6
2	CH ₂	27.3	29.9
3	СН	78.9	217.0
4	С	38.8	38.4
5	СН	55.2	54.9
6	CH_2	19.5	21.1
7	CH_2	43.0	42.4
8	С	75.8	75.7
9	СН	58.3	57.9
10	С	36.6	35.0
11	CH_2	16.0	21.0
12	CH_2	34.8	34.1
13	С	73.4	73.8
14	СН	147.5	147.6
15	CH_2	109.6	109.9
16	CH_3	32.7	32.9
17	CH_3	23.8	23.6
18	CH ₃	28.0	26.9
19	CH ₃	15.2	15.7
20	CH_3	15.9	16.6

Tabla 2.5 Comparación de las señales de RMN ¹³C del óxido de *ent*-3 β -hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo sin oxidar y oxidado.



Figura 2.22 Estructura química del óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo oxidado.

2.3.1.1.4. Identificación del compuesto IV, 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(−)-13-*epi*-manoilo

El compuesto IV, 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo, tiene el aspecto de un sólido amorfo color blanco, obteniéndose 81.5 mg (rendimiento 0.07%), es soluble en CH₂Cl₂. No se ve bajo luz UV, tiene un R_f = 0.41 en Hx/CH₂Cl₂ (8:2) (Figura 2.23). Según la CG se encuentra en un 99.5% de pureza.

El análisis de CG-EM (Figura 2.23) por comparación de una base de datos NIST del equipo sugiere con un elevado porcentaje de similitud (98%) que se trata del 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoil que se ajusta a una fórmula molecular de $C_{20}H_{34}O$, cuyo peso molecular es 290 u. En el espectro se observa un pico a *m/z* 275 que es característica de este compuesto, lo cual sugiere que al principio pierde 15 u [M – CH₃] lo que da como resultado este pico, también se muestra pérdidas de 28 u [M – CH₂=CH₂].

En el IR (Figura 2.24) se observan bandas a 3071 y 3012 cm⁻¹ de enlaces C_{sp2} -H, bandas a 2992, 2967, 2888, 2868 y 2834 cm⁻¹ de enlaces C_{sp3} -H.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.25) se observa la presencia de cinco singuletes a δ 1.22, 1.14, 0.86, 0.79 y 0.73 (s, 3H, H-17, H-16, H-18, H-19 y H-20), correspondientes a protones metílicos, un triplete a δ 6.02 (t, 1H, *J* = 14.5 Hz, H-14) y dos dobletes a δ 4.97 (d, 1H, *J* = 17.9 Hz, H-15a) y 4.91 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz, H-15b) de protones vinílicos.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.26) se observan 20 carbonos, dos de los cuales corresponden a un puente de carbonos unidos mediante un oxígeno (*epi*) a δ 76.1 (C-8) y 73.3 (C-13), dos son carbonos sp² correspondientes al doble enlace exocíclico a δ 147.7 (C-14) y 109.5 (C-15); los otros carbonos tienen configuración sp³.



Figura 2.23 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto IV de C. corymbosa.



Figura 2.24 Espectro de IR del compuesto IV de C. corymbosa.



Figura 2.25 Espectro de RMN ¹H y estructura química del compuesto IV de *C. corymbosa*.



Figura 2.26 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto IV de *C. corymbosa*.

La estructura del compuesto IV resultó ser un diterpeno de tipo labdano (Tabla 2.6 y Figura 2.27) (Kenmoku *et al.,* 2004).

Posición		8,13-epoxilabd-14-eno u óxido	Compuesto IV
(fórmula C ₂₀ H ₃₄ O)		de <i>ent</i> -(−)-13- <i>epi</i> -manoilo	(150 MHz, CDCl ₃), δ _C
		(100 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	
1	CH ₂	39.4	39.3
2	CH_2	19.9	19.9
3	CH_2	42.2	42.1
4	С	33.3	33.3
5	СН	56.5	56.5
6	CH_2	18.7	18.6
7	CH_2	43.1	43.1
8	С	76.1	76.1
9	СН	58.5	58.5
10	С	36.9	36.8
11	CH_2	15.9	15.9
12	CH_2	34.9	34.8
13	С	73.3	73.3
14	СН	147.7	147.7
15	CH_2	109.5	109.5
16	CH_3	327	32.7
17	CH_3	24.0	23.9
18	CH ₃	33.3	33.3
19	CH ₃	21.3	21.2
20	CH ₃	15.9	15.9

Tabla 2.6 Comparación de las señales de RMN ¹³C del 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo con el compuesto IV.

Kenmoku et al., 2004.



Figura 2.27 Estructura química del óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo.

2.3.1.2. Fracción diclorometánica (CCT-2b)

Como resultado de la CLV a la que fue expuesta la fracción CCT-2b se obtuvo un total de nueve subfracciones (CCT-3ab – CCT-3ib), de las cuales se tomaron las que tuvieron mayor rendimiento y menor complejidad en las manchas según CCD, para seguir con la purificación de los metabolitos.

La subfracción CCT-3eb se subfraccionó mediante CEM y de una de las subfracciones resultantes se obtuvo el compuesto V. La CCT-3db fue otra subfracción primaria que se purificó de la cual se obtuvó el compuesto VI; descrito en la sección de métodos (Figura 2.2), ambos compuestos se describen abajo.

2.3.1.2.1. Identificación del compuesto V, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5dimetoxibenzoico

El compuesto V, ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, tiene un aspecto de polvo color crema, obteniendose 6.7 mg (rendimiento 0.006%), es soluble en An. Este compuesto se ve en UV a 254 nm, tiene un $R_f = 0.69$ en CH₂Cl₂/AcOEt (8:2) (Figura 2.28).

El análisis del espectro de CG-EM (Figura 2.28) se ajusta a una fórmula molecular de $C_9H_{10}O_5$, cuyo peso molecular es 198 u. El espectro muestra una pérdida inicial de 15 u $[M - CH_3]$ y también una pérdida de 28 u [M - C=O], lo que concuerda con los datos del IR.

En el IR (Figura 2.29) se observan bandas a 3471 cm⁻¹ características de un grupo OH, bandas a 2994, 2950, 2839 cm⁻¹ de enlaces C_{sp3} -H y una banda intensa 1685 cm⁻¹ del grupo carbonilo del ácido orgánico.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.30) se observa la presencia de dos singuletes a δ 7.30 (s, 2H, H-2 y H-6) y 3.85 (s, 6H, H-8 y H-9), correspondientes a protones del anillo aromático y protones de grupos metoxilo, respectivamente.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.31) se observan nueve carbonos, dos de los cuales corresponden a carbonos del anillo aromático a δ 108.2 (C-2 y C-6), dos a grupos metoxilo a δ 56.7 (C-8 y C-9) y uno al grupo carbonilo de un ácido orgánico a δ 167.6 (C-7).







Figura 2.29 Espectro de IR del compuesto V de C. corymbosa.



Figura 2.30 Espectro de RMN¹H y estructura química del compuesto V de *C. corymbosa*.



Figura 2.31 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto V de *C. corymbosa*.

El compuesto V al elucidar la estructura resultó ser un ácido benzoico (Tabla 2.7 y Figura 2.32) (Cho *et al.*, 2013).

Posición		(100 MHz, CD ₃ OD)	Compuesto VI
(fórmula C ₉ H ₁₀ O ₅)		Ácido siríngico o ácido	(150 MHz, CDCl ₃), δ_{C}
		4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico, δ_{C}	
1	С	124.3	121.5
2	CH_2	108.5	108.2
3	С	149.5	148.4
4	С	141.3	141.6
5	С	149.5	148.4
6	CH_2	108.5	108.2
7	COOH	170.8	167.6
8	-OCH ₃	57.1	56.7
9	$-OCH_3$	57.1	56.7

Tabla 2.7 Comparación de las señales de RMN ¹³C del ácido siríngico o ácido 4hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico con el compuesto V.

Cho et al., 2013.



Figura 2.32 Estructura química del ácido siríngico.

2.3.1.2.2. Identificación del compuesto VI, casearborina c

El compuesto VI, casearborina c, tiene un aspecto de cristales aciculares claros, obteniéndose 8 mg (rendimiento 0.007%), es soluble en CH_2CI_2 . Este compuesto se ve en UV a 254 nm, tiene un $R_f = 0.61$ en $CH_2CI_2/AcOEt$ (6:4) (Figura 2.33) y no se volatiliza.

En el espectro de IR (Figura 2.33) se observan bandas a 3400 cm⁻¹ características del grupo OH, bandas a 2967, 2938 cm⁻¹ de enlaces C_{sp3} -H y una bandas intensas a 1752 y 1732 cm⁻¹ del grupo carbonilo de un éster.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 2.34) se observa la presencia de cuatro singuletes a δ 2.06, 1.98, 1.68, 0.90 (s, 3H, H-18", H-19", H-16 y H-20) y un doblete a δ 0.94 (d, 3H, J = 6.7 Hz, H-17), correspondientes a protones metílicos, dos dobletes a δ 8.02 (d, 2H, J = 8.6 Hz, H-4', H-6') y 6.86 (d, 2H, J = 8.6 Hz, H-3', H-7'), correspondiente a los protones del anillo aromático, tres dobletes a δ 6.02 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H-3), 5.10 (d, 1H, J = 17.4 Hz, H-15a), 4.94 (d, 1H, J = 10.7 Hz, H-15b) y una señal doble de dobles a δ 6.32 (dd, 1H, J = 10.7, 17.3 Hz, H-14), correspondientes a protones vinílicos; las otras señales en su mayoría pertenecen a protones metínicos.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 2.35) se observan 31 carbonos, tres de los cuales corresponden a grupos carbonilo de un éster a δ 170.7 (C-18'), 170.1 (C-19') y 165.8 (C-1'), dos carbonos base de alcohol a δ 160.9 (C-5') y 64.1 (C-2), dos corresponden a un puente de carbonos unidos mediante un oxígeno a δ 97.9 (C-19) y 95.7 (C-18) y cuatro son carbonos sp² de dobles enlaces exocíclicos a δ 141.4 (C-14), 135.9 (C-13), 129.2 (C-12) y 111.3 (C-15).



Figura 2.33 Espectro de IR y CCD del compuesto VI de C. corymbosa.



Figura 2.34 Espectro de RMN¹H y estructura química del compuesto VI de *C. corymbosa*.



Figura 2.35 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto VI de *C. corymbosa*.

Al elucidar la estructura del compuesto VI resultó ser un diterpeno de tipo clerodano, Tabla 2.8 y Figura 2.36 (Beutler *et al.,* 2000).

Posición		Casearborina c	Compuesto VI
(fórmula C ₃₁ H ₃₈ O ₉)		(125 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	(150 MHz, CDCl ₃), δ_{C}
1	CH ₂	29.6	29.6
2	СН	64.0	64.1
3	СН	126.8	126.6
4	С	142.2	142.4
5	С	52.1	52.1
6	СН	74.6	74.5
7	CH ₂	33.4	33.3
8	СН	36.3	36.3
9	С	37.9	37.9
10	СН	36.7	36.6
11	CH_2	30.6	30.6
12	СН	129.3	129.2
13	С	125.9	135.9
14	СН	141.4	141.4
15	CH_2	111.3	111.3
16	CH_3	12.2	12.1
17	CH_3	15.7	15.7
18	СН	95.8	95.7
19	СН	98.0	97.9
20	CH_3	25.2	25.3
1'	С	166.1	165.8
2'	С	121.5	121.9
3'	СН	115.8	115.7
4'	СН	132.5	132.4
5'	С	161.6	160.9
6'	СН	132.5	132.4
7'	СН	115.8	115.7
18"	C=O	171.0	170.7
19"	C=O	170.4	170.1
18"	CH_3	21.5	21.4
19"	CH ₃	22.0	22.0

 Tabla 2.8 Comparación de las señales de RMN ¹³C del casearborina c con el compuesto VI.

Beutler et al., 2000.



Figura 2.36 Estructura química de casearborina c.

2.4. DISCUSIÓN

Se considera que el género *Casearia* es una fuente rica de diterpenos de tipo clerodano, los cuales han mostrado principalmente tener actividad citotóxica en diferentes líneas de células cancerígenas (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2004; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Beutler *et al.*, 2000). También han presentado actividad antialimentaria en insectos e inmunorreguladora (Hunter et al., 1997; Chen y Wiemer, 1991). Existen pocos reportes de la especie de *C. corymbosa*, en este trabajo se reportan diversos tipos de metabolitos de esta especie.

El ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico o ácido kaurenoico pertenece a la clase de los diterpenos de tipo kaureno y fue aislado de la especie *Ricinocarpus estylosus* (Fujita, 1965). Se han aislado compuestos de tipo kaureno de la especie de *C. corymbosa* (Khan *et al.,* 1990). Este compuesto ha mostrado actividades antifúngica (Boeck *et al.,* 2005) y citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer (Neto *et al.,* 2013; Henry *et al.,* 2006; Fatope y Audu 1996). Su isómero el ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-18-oico ha mostrado actividades larvicida (Fatope *et al.,* 2010), antimicrobiana y antiinflamatoria (Lobitz *et al.,* 1997).

El γ-sitosterol pertenece al grupo de los esteroles, los cuales están caracterizados por tener como base al ciclopentanoperhidrofenantreno (núcleo formado por cuatro anillos) con una cadena alifática lateral de 8-10 carbonos y un grupo hidroxilo (OH) en C-3. En las plantas es común encontrar este tipo de metabolitos secundarios (Myant, 1981). Se ha reportado la actividad citotóxica del γ-sitosterol en diferentes líneas celulares de cáncer (Sundarraj *et al.,* 2012). También se ha reportado su efecto antidiabético (Balamurugan *et al.,* 2011) y citotóxico contra crustáceos (Khan and Mlungwana, 1999).

El óxido de *ent*-3β-hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol pertenece a la clase de los diterpenos de tipo labdano. Se han aislado compuestos de tipo labdano derivados del óxido de manoil en la especie de *C. corymbosa* (Khan *et al.*, 1990). Particularmente este compuesto ha mostrado actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (Su *et al.*, 2014; Dimas *et al.*, 2001) y para su derivado semisintético el oxido de 2-cloroetilcarbamato-*ent*-13-*epi*-manoil se ha reportado actividad antimicrobiana de amplio espectro (Kalpoutzakis *et al.*, 2001). Los labdanos en general también han mostrado actividad leishmanicida (Fokialakis *et al.*, 2006).

El 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo pertenece a la clase de los diterpenos de tipo labdano. Como ya se mencionó los metabolitos de tipo labdano derivados del óxido de manoilo han sido aislados en la especie de *C. corymbosa* (Khan *et al.,* 1990). Se ha reportado que los compuestos de tipo labdano derivados del óxido de manoilo presentan actividad citotóxica en la línea celular de leucemia (Dimas *et al.,* 2001). Este tipo de compuestos también presentan actividad antibacteriana y antifúngica (Kalpoutzakis *et al.,* 2001).

El ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico es un ácido benzoico. Para el que se ha reportado actividad antioxidante (Cho *et al.*, 2013). En la especie de *C. corymbosa* no se ha reportado el aislamiento de compuestos de este tipo. Por otro lado, el ácido 4-[3,5-bis(trimetilsilil) benzamida]benzoico, un derivado sintético del acido benzoico, inhibió la metástasis del hígado en ratones (Murakami *et al.*, 1998). Además, los ácidos metoxi-benzoicos han mostrado actividades antiinflamatoria (Alam y Gomez, 1998) y hepatoprotectora (Gadgoli y Mishra, 1999).

La casearborina c fue aislada por primera vez por Beutler *et al.* (2000) de la raíz de *C. arbórea*, pertenece al grupo de los diterpenos de tipo clerodano, los cuales están caracterizados por tener como base un esqueleto bicíclico que comúnmente se encuentra fusionado con un anillo de furano. De la especie de *C. corymbosa* no se ha aislado este diterpeno. Sin embargo, sí se han aislado compuestos de tipo similar, considerándose al género y la especie como una fuente rica de diterpenos de tipo clerodano (Gonzaga dos Santos *et al.*, 2010; Vieira-Junior *et al.*, 2009; Kanokmedhakul *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2004; Sai-Prakash *et al.*, 2002; Chen y Wiemer, 1991; Khan *et al.*, 1990). La casearborina c ha mostrado efecto citotóxico en diferentes líneas celulares de cáncer (Beutler *et al.*, 2000).

Es importante recalcar que este es el primer reporte del óxido de *ent*-3 β -hidroxi-(-)-13*epi*-manoilo, ácido siríngico y casearborina c en la especie de *C. corymbosa,* pues los otros compuestos ya han sido aislados de la especie.

2.5. CONCLUSIONES

- El compuesto I obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico.
- El compuesto II obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectrométrico, corresponde al γ-sitosterol.
- El compuesto III obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al óxido de *ent*-3β–hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo o ribenol.
- El compuesto IV obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al 8,13-epoxilabd-14-eno u óxido de *ent*-(-)-13-*epi*manoilo.

- El compuesto V obtenido de la fracción diclorometánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al ácido siríngico o ácido 4-hidroxi-3,5dimetoxibenzoico.
- El compuesto VI obtenido de la fracción diclorometánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al compuesto casearborina c.
- Los metabolitos secundarios presentes en la especie de *C. corymbosa* son principalmete de tipo diterpénico.

CAPITULO III

ESTUDIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA RAÍZ DE STACHYTARPHETA FRANTZII

3.1. INTRODUCCIÓN

El género *Stachytarpheta* ha sido considerado como parte de la familia Verbenaceae (Stevens, 2012; Calderón, 1996). De este género se han aislado metabolitos secundarios de tipo terpenoide, específicamente monoterpenos de tipo iridoide y glicósidos feniletanoides, de los cuales se ha reportado actividad antiinflamatoria, antiulcerogénica y antibacteriana (Okoye *et al.,* 2010; Penido *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 1998).

En Yucatán se reporta la distribución de algunos miembros de este género, entre ellos la especie *Stachytarpheta frantzii* Pol. (CICY, 2010). Plantas de la especie *S. frantzii*, cuyo nombre en maya es *x-polk' uy*, se utilizan en medicina tradicional para tratar los síntomas de diversas afecciones (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Sin embargo, de la especie vegetal no hay reportes fitoquímicos o biológicos.

Partiendo de un estudio previo (realizado en el CICY en colaboración con el IMSS) en el que se reportó que el extracto metanólico de la raíz de *S. frantzii* mostró actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer (Caamal-Fuentes *et al.*, 2011), en el presente trabajo se aisló, elucidó e identificó los metabolitos a partir del extracto metanólico de esta especie vegetal. De los cuatro metabolitos que se aislaron, dos metabolitos son nuevos en la especie *S. frantzii*, uno de los cuales no sido reportado en ningún otro género.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Los disolventes orgánicos y equipos de laboratorio se describen en el capítulo II (sección 2.2.1).

3.2.2. MATERIAL VEGETAL

Se colectó el material vegetal el día 21 de noviembre de 2013 en Othón P. Blanco Quintana Roo y la identificación de la especie la realizó Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Un ejemplar se depositó en el herbario de la institución con el número de Voucher P.Simá 3563.

El material se procesó, lavando las raíces (parte de la planta que presentó actividad en estudio previo) (Caamal-Fuentes *et al.,* 2011) y secándolos a una temperatura no mayor a 50 °C durante 48 h (para asegurar la completa deshidratación de la especie vegetal). Después se trituraron a 5 mm utilizando un molino de cuchillas (Pagani ®).

3.2.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

El material vegetal (1.5 Kg) seco y triturado se maceró (método estático) con metanol (MeOH, 3×4 L) por 48 h (i.e. primera extracción) y posteriormente por 24 h, con agitación ocasional (3 a 4 veces durante el día). La concentración del extracto se realizó con ayuda de un evaporador rotatorio.

3.2.4. PURIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS

El extracto metanólico (SRF-1), fue sometido a una partición líquido-líquido (3x) con tres diferentes disolventes orgánicos de polaridad ascendente: hexano (Hx), diclorometano (CH₂Cl₂) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose en total cuatro fracciones con la fase acuosa: (SFR-2a: fracción Hx; SFR-2b: fracción CH₂Cl₂; SFR-2c: fracción AcOEt y SFR-2d: fracción acuosa).

3.2.4.1. Procesamiento de la fracción hexánica (SFR-2a)

La fracción SFR-2a fue subfraccionada mediante una CLV, los sistemas utilizados fueron Hx/CH_2CI_2 y Hx/AcOEt con aumento de la polaridad en un 20% para la mezcla de Hx/CH_2CI_2 y en un 5% para la mezcla de Hx/AcOEt, obteniéndose 13 subfracciones (SFR-3a — SRF-3m). De éstas las que presentaron menor complejidad según CCD

fueron sometidas a diferentes columnas cromatográficas para su subfraccionamiento y posterior purificación de los metabolitos (Figura 3.1).



Figura 3.1 Diagrama para la obtención de los compuestos de la fracción SFR-2a de S. frantzii.

De la subfracción SFR-3h se obtuvieron los compuestos I, II y V, mientras que de la subfracción SFR-3g se obtuvieron los compuestos III, IV, VI y VII. De los compuestos V, VI, y VII se obtuvo muy poco rendimiento, lo que dificultó los estudios espectroscópicos necesarios para su elucidación estructural.

A continuación se discute la elucidación estructural de cada compuesto y su identificación.

3.2.4.1.1. Aislamiento del compuesto I, ácido betulínico

La subfracción SFR-3h se purificó mediante una CCG; las subfracciones resultantes fueron cinco (SFR-6a — SFR-6e); SFR-6d fue subfraccionada mediante una CCG obteniéndose seis subfracciones (SFR-10a — SFR-10f). La subfracción SFR-10b fue purificada mediante una CEM con sephadex LH-20 usando MeOH, de ésta se aisló el ácido betulínico (SFR-16a1).

Compuesto I, ácido betulínico. Sólido blanco (20 mg; rendimiento 0.01%), $R_f = 0.43$ en Hx/An (7:3). Soluble en An y CH₂Cl₂/MeOH (1:1). **IR** $v_{máx}$ cm⁻¹: 3446, 3071, 2942, 2866, 1687 y 1642. **RMN-**¹**H (600 MHz, CDCl₃/CD₃OD)**: δ 4.68 (1H, s, H-29b), 4.55 (1H, s, H-29a), 3.11 (1H, dd, J = 5.2, 10.9 Hz, H-3, C<u>H</u>OH), 2.98 (1H, m, H-19), 2.21 (1H, t, J = 11.8 Hz, H-13), 1.89 (2H, m, H-21b, H-22b), 1.65 (3H, s, H-30), 1.56 (2H, m, H-1b, H-12b), 1.49 (1H, s, H-18), 1.37 (7H, m, H-2 y H-16, H-6a, H-11a y H-22a), 1.22 (4H, m, H-6b, H-7b, H-9, H-21a), 1.13 (1H, d, J = 13.5 Hz, H-11b), 1.00 (1H, dd, J = 4.1, 12.9 Hz, H-12a), 0.95 (3H, s, H-27), 0.91 (6H, s, H-23 y H-25), 0.87 (1H, dd, J = 4.0, 12.9 Hz, H-1a), 0.80 (3H, s, H-26), 0.71 (3H, s, H-24). **RMN-**¹³**C (150 MHz, CDCl₃/CD₃OD)**: δ 178.9 (C-28, COOH), 150.5 (C-20), 109.1 (C-29), 78.4 (C-3, <u>C</u>HOH), 56.1 (C-17), 55.4 (C-5), 50.5 (C-9), 49.1 (C-18), 46.9 (C-19), 42.2 (C-14), 40.6 (C-8), 38.8 (C-4), 38.7 (C-1), 38.2 (C-13), 37.0 (C-10), 36.9 (C-22), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.4 (C-21), 29.5 (C-15), 26.7 (C-2), 27.6 (C-23), 25.5 (C-12), 20.8 (C-11), 18.8 (C-30), 18.1 (C-6), 15.6 (C-24), 15.7 (C-26), 15.0 (C-25), 14.3 (C-27).

3.2.4.1.2. Aislamiento del compuesto II, acetato de nor-28-urs-12-eno-3,17,19-triol

La subfracción SFR-3h se purificó mediante una CCG; las subfracciones resultantes fueron cinco (SFR-6a – SFR-6e); SFR-6d fue subfraccionada mediante una CCG y se obtuvieron seis subfracciones (SFR-10a – SFR-10f). La subfracción SFR-10d fue subfraccionada mediante una CCD preparativa usando el sistema tolueno/AcOEt (8:2) y de ésta se obtuvieron tres subfracciones (SFR-27a – SFR-27c), aislándose el acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol (SFR-27a1).

Compuesto II, el acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol. Sólido blanco (4 mg; rendimiento 0.002%), R_f = 0.20 en Hx/AcOEt (8:2). Soluble en MeOH. **RMN**-¹H (600 **MHz, CD**₃**OD**): δ 5.27 (1H, pt, H-12), 3.32 (1H, pt, H-3, C<u>H</u>OH), 2.59 (1H, s, H-18), 2.39 (2H, ddd, J = 4.2, 13.5, 13.5 Hz, H-11), 1.88 (3H, s, H-31, C<u>H</u>₃COO), 1.81 (1H, t, J = 8.8 Hz, H-9), 1.67 (2H, t, J = 12.3 Hz, H-22), 1.56 (2H, dd, J = 4.1, 12.1 Hz, H-1), 1.37 (4H, m, H-6, H-7), 1.32 (3H, s, H-27), 1.19 (3H, s, H-29), 0.94 (3H, s, H-26), 0.92 (3H, s, H-23), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-30), 0.85 (3H, s, H-25), 0.83 (3H, s, H-24). **RMN**-¹³C (150 MHz, CD₃OD): δ 179.1 (C-28, CH₃COO), 139.4 (C-13), 127.4 (C-12), 75.5 (C-3, <u>C</u>HOH), 72.7 (C-19, <u>C</u>HOH), 54.2 (C-18), 48.6 (C-5), 48.5 (C-17), 46.9 (C-9), 41.6 (C-20), 41.3 (C-14), 39.8 (C-8), 38.1 (C-22), 36.9 (C-4), 36.7 (C-10), 32.8 (C-7), 32.7 (C-1), 28.5 (C-15), 27.6 (C-23), 25.6 (C-16), 22.7 (C-31), 26.3 (C-21), 23.5 (C-30), 14.3 (C-26). **EMAR**: *m/z* 487.3569 (calculado para C₃₁H₅₀O₄, *m/z* 486.371).

3.2.4.1.3. Aislamiento del compuesto III, ácido olenólico

La subfracción SFR-3g se purificó mediante una CCG; las subfracciones resultantes fueron cinco (SFR-7a – SFR-7e); la SFR-7c fue subfraccionada mediante una CCG resultando seis subfracciones (SFR-9a – SFR-9f); la subfracción SFR-9d fue subfraccionada mediante CC resultando cinco subfracciones (SFR-22a – SFR-22e); la SFR-22c fue subfraccionada con una CEM obteniéndose SFR-25a. La subfracción SFR-25a fue subfraccionada mediante una CCD preparativa usando el sistema tolueno/AcOEt (8:2) y de ésta se obtuvieron seis subfracciones (SFR-28a – SFR-28f), aislándose el ácido oleanólico (SFR-28b1).

Compuesto III, ácido oleanólico. Sólido blanco (7.3 mg; rendimiento 0.004%), $R_f = 0.35$ en Hx/AcOEt (8:2). Soluble en MeOH y CH₂Cl₂/MeOH. **RMN-¹H (600 MHz, CDCI₃/CD₃OD)**: δ 5.18 (1H, pt, H-12), 3.31 (1H, m, H-3, C<u>H</u>OH), 2.20 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-18), 1.30 (3H, s, H-23), 1.24 (3H, s, H-27), 1.13 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-30), 0.91 (3H, s, H-24), 0.84 (3H, s, H-29), 0.80 (3H, s, H-25). **RMN-¹³C (150 MHz, CDCI₃/CD₃OD)**: δ 183.9 (C-28, COOH), 145.1 (C-13), 121.2 (C-12), 75.6 (C-3, <u>C</u>HOH), 53.5 (C-5), 48.6 (C-9), 47.3 (C-17), 46.6 (C-19), 42.1 (C-14), 41.9 (C-18), 39.5 (C-4), 39.3 (C-8), 39.1 (C-1), 36.9 (C-10), 34.1 (C-21), 33.0 (C-7), 32.8 (C-22), 32.7 (C-29),

30.9 (C-20), 28.1 (C-2), 27.8 (C-15), 27.7 (C-23), 25.4 (C-27), 23.1 (C-30), 23.0 (C-11), 22.9 (C-16), 18.1 (C-6), 16.8 (C-26), 16.6 (C-24), 14.7 (C-25).

3.2.4.1.4. Aislamiento del compuesto IV, α-espinasterol

La subfracción SFR-3g se purificó mediante una CCG; las subfracciones resultantes fueron cinco (SFR-7a – SFR-7e); la SFR-7c fue subfraccionada mediante una CCG obteniéndose seis subfracciones (SFR-9a – SFR-9f); la subfracción SFR-9d fue subfraccionada mediante una CC obteniéndose cinco subfracciones (SFR-22a – SFR-22e); la SFR-22c fue subfraccionada con una CEM obteniéndose SFR-25a. La subfracción SFR-25a fue subfraccionada mediante una CCD preparativa usando el sistema tolueno/AcOEt (8:2) y de ésta se obtuvieron seis subfracciones (SFR-28a – SFR-28f), aislándose el α-espinasterol (SFR-28d1).

Compuesto IV, α -espinasterol. Sólido blanco (4.9 mg; rendimiento 0.003%), R_f = 0.48 en Hx/An (7:3). Soluble en CH₂Cl₂/MeOH. IR v_{máx} cm⁻¹: 3400, 1660, 1633, 2955 y 2933. **RMN-¹H (600 MHz, CDCI₃/CD₃OD)**: δ 5.30 (2H, t, J = 7.4 Hz, H-7, H-22), 5.17 (1H, dd, J = 8.8, 15.1 Hz, H-23), 3.67 (1H, m, H-3, CHOH), 2.17 (1H, m, H-20), 1.96 (3H, m, H-6a, H-14, H-16a), 1.90 (2H, m, H-6b, H-16b), 1.83 (1H, m, H-24), 1.75 (2H, m, H-2a, H-9), 1.65 (3H, m, H-2b, H-4a, H-27), 1.55 (3H, m, H-1a, H-15a, H-25a), 1.51 (3H, m, H-1b, H-4b, H-25b), 1.40 (5H, m, H-5, H-11a, H-12a, H-15b, H-17), 1.30 (1H, m, H-11b), 1.23 (1H, m, H-12b), 1.16 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-28), 0.99 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-26), 0.95 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-29), 0.94 (6H, s, H-18, H-19), 0.70 (3H, s, H-21). **RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃/CD₃OD)**: δ 139.9 (C-8), 138.7 (C-22), 129.9 (C-23), 117.8 (C-7), 70.8 (C-3, CHOH), 56.4 (C-17), 55.5 (C-14), 51.8 (C-24), 49.9 (C-9), 43.6 (C-13), 41.3 (C-20), 40.7 (C-5), 39.9 (C-12), 37.8 (C-4), 37.6 (C-1), 34.6 (C-10), 32.3 (C-25), 31.3 (C-2), 30.0 (C-6), 28.9 (C-16), 25.7 (C-28), 23.3 (C-15), 21.9 (C-11), 21.5 (C-26), 21.1 (C-21), 19.1 (C-27), 13.1 (C-19), 12.3 (C-29), 12.2 (C-18). CG-EM (% int. rel.): t_R = 17.67 min, m/z 271 ([M]⁺, 100), 412 (18), 396 (19), 351 (4), 300 (13), 255 (32), 292 (14), 213 (15), 173 (10), 147 (25), 131 (16), 107 (36), 81 (55), 55 (54).
3.2.4.2. Procesamiento de la fracción diclorometánica (SFR-2b)

Para realizar la CLV de la fracción SFR-2b se usaron mezclas de Hx/AcOEt de polaridad ascendente con un aumento de la polaridad en un 10% en la mayoría de los casos. Las subfracciones resultantes de la CLV fueron 15 (SFR-3ab – SFR-3nb). De éstas las que presentaron menor complejidad según CCD fueron sometidas a diferentes columnas para su subfraccionamiento y posterior purificación de los metabolitos (Figura 3.2).



Figura 3.2 Diagrama para la obtención del compuesto de la fracción SFR-2b de S. frantzii.

Del compuesto VIII se obtuvo muy poco rendimiento (1.2 mg), lo que dificultó los estudios espectroscópicos necesarios para su elucidación estructural.

3.3. RESULTADOS

En la Tabla 3.1 se observa el rendimiento del extracto MeOH (SFR-1) de la raíz de *S. frantzii* junto con las fracciones resultantes de la partición líquido-líquido. La fracción Hx fue la que tuvo el mayor rendimiento. Las fracciones fueron diferentes en los patrones de complejidad de las manchas según la CCD, por lo que se decidió trabajar cada fracción por separado.

Extracto/fracción	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
SFR-1	187.00	12.5
SFR-2 ^a	9.01	4.8
SFR-2b	6.90	3.7
SFR-2c	8.21	4.4
SFR-2d	153.8	82.24

Tabla 3.1 Rendimientos del extracto y fracciones de S. frantzii.

SFR-1: extracto MeOH; SFR-2a: fracción Hx; SFR-2b: fracción CH₂Cl₂; SFR-2c: fracción AcOEt; SFR-2d: fracción acuosa.

3.3.1. Fracción hexánica (SFR-2a)

La fracción hexánica fue subfraccionada por medio de una CLV, dando un total de trece subfracciones (SFR-3a – SFR-3m), de las cuales se tomaron las que tuvieron mayor rendimiento y menor complejidad en las manchas, según CCD, para seguir con la purificación de los metabolitos. Una mezcla de Hx/AcOEt en polaridad ascendente se utilizó durante la purificación, teniendo como referencia el trabajo de Viccini *et al.* (2008), en el cuál se aislaron metabolitos de tipo monoterpeno y glicósido. Las subfracciones SFR-3h, SFR-3g, se subfraccionaron por separado mediante una CCG. De este procesamiento se obtuvieron cinco subfracciones de cada una, (SFR-6a – SFR-6e) y (SFR-7a – SFR-7e), respectivamente.

Los compuestos I y II se obtuvieron a partir de la subfracción SFR-3h, mientras que los compuestos III y IV fueron obtenidos a partir de la subfracción SFR-3g, ya descrito en la sección de métodos (Figura 3.1).

A continuación, se describen los compuestos I, II, III y IV, los cuales fueron elucidados con ayuda de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

3.3.1.1. Identificación del compuesto I, ácido betulínico

El compuesto I, ácido betulínico, tiene un aspecto de sólido blanco, obteniéndose 20 mg (rendimiento 0.01%), es soluble en An y $CH_2Cl_2/MeOH$ (1:1). Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un $R_f = 0.43$ en Hx/An (7:3) (Figura 3.3).

En el espectro de IR (Figura 3.3) se observa una banda a 3446 cm⁻¹ característica de un grupo OH, una banda intensa a 1687 cm⁻¹ del grupo carbonilo, una banda a 3071 cm⁻¹ del enlace C_{sp2} -H, una banda a 1642 cm⁻¹ del enlace C=C y bandas a 2942 y 2866 cm⁻¹ de enlaces C_{sp3} -H.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.4) se observa la presencia de cinco singuletes a δ 1.65, 0.95, 0.80 y 0.71 (s, 3H, H-30, H-27, H-26 y H-24) y uno a δ 0.91 (s, 6H, H-23 y H-25), correspondientes a protones metílicos, dos singuletes a δ 4.68 (s, 1H, H-29b) y 4.55 (s, 1H, H-29a), correspondientes a protones vinílicos y una señal doble de dobles a δ 3.11 (dd, *J* = 5.2, 10.9 Hz, 1H, H-3), que pertenece al protón de un carbono base de alcohol.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 3.5) se observan 30 carbonos, uno de los cuales corresponden al grupo carbonilo de un ácido orgánico a δ 178.9 (C-28), dos pertenecen a carbonos sp² del doble enlace exocíclico a δ 150.5 (C-20) y 109.1 (C-29), uno a un carbono base de alcohol a δ 78.4 (C-3) y uno a un carbono base del grupo carbonilo del ácido orgánico a δ 56.1 (C-17).



Figura 3.3 Espectro de IR y CCD del compuesto I de S. frantzii.



Figura 3.4 Espectro de RMN¹ H y estructura química del compuesto I de S. frantzii.



Figura 3.5 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto I de S. frantzii.

Al elucidar la estructura del compuesto I resultó ser un triterpeno pentacíclico (Jalil *et al.,* 2015), (Tabla 3.2 y Figura 3.6).

Posición Ácido bet		Ácido betulínico	Compuesto I
(fórmula C ₃₀ H ₄₈ O ₃)		(125 MHz, CDCl ₃), δ _C	(150 MHz, CDCI ₃ /CD ₃ OD),
			δ _c
1	CH ₂	38.7	38.7
2	CH ₂	27.6	26.7
3	СН	77.2	78.4
4	С	38.9	38.8
5	СН	55.3	55.4
6	CH_2	18.4	18.1
7	CH_2	34.4	34.3
8	С	40.7	40.6
9	СН	50.4	50.5
10	С	37.2	37.0
11	CH_2	20.9	20.8
12	CH ₂	25.5	25.5
13	CH	38.0	38.2
14	С	42.5	42.2
15	CH_2	29.7	29.5
16	CH_2	32.2	32.1
17	С	55.9	56.1
18	СН	48.9	49.1
19	СН	47.1	46.9
20	С	150.8	150.5
21	CH_2	30.5	30.4
22	CH_2	36.8	36.9
23	CH_3	28.6	27.6
24	CH ₃	16.3	15.6
25	CH ₃	16.2	15.0
26	CH ₃	16.4	15.7
27	CH ₃	14.8	14.3
28	COOH	177.0	178.9
29	CH_2	110.1	109.1
30	CH_3	19.4	18.8

 Tabla 3.2 Comparación de las señales de RMN ¹³C del ácido betulínico con el compuesto I.

Jalil *et al.,* 2015.



ácido betulínico.

3.3.1.2. Identificación del compuesto II, acetato de nor-28-urs-12-eno-3,17,19-triol

El compuesto II, acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol, es un compuesto novedoso, no existen reportes en la literatura, tiene un aspecto de sólido blanco, obteniéndose 4 mg (rendimiento 0.002%), es soluble en MeOH. Este compuesto se ve bajo luz UV a 254 nm, tiene un $R_f = 0.20$ en Hx/AcOEt (8:2) (Figura 3.7).

En el EMAR se observa un ión molecular de m/z 487.3569 [M]⁺ que se ajusta a la formula molecular C₃₁H₅₀O₄.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.7) se observa la presencia de siete singuletes a δ 1.88, 1.32, 1.19, 0.94, 0.92, 0.85, 0.83 (s, 3H, H-31, H-27, H-29, H-26, H-23, H-25 y H-24) y un doblete a δ 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-30) correspondientes a protones metílicos y dos pseudotripletes a δ 5.27 y 3.32 (pt, 1H, H-12 y H-3), que pertenecen a un protón vinílico y a un protón de un carbono base de alcohol, respectivamente.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 3.8) se observan 31 carbonos, uno de los cuales corresponden al grupo carbonilo de un éster a δ 179.1 (C-28), dos pertenecen a carbonos sp² a δ 139.4 (C-13) y 127.4 (C-12) y dos a carbonos base de alcohol a δ 75.5 (C-3) y 72.7 (C-19).

En el espectro de DEPT 135 se observan nueve señales que salen en fase negativa, correspondientes a carbonos metilénicos a δ 38.1 (C-22), 32.8 (C-7), 32.7(C-1), 28.5 (C-15), 25.6 (C-16), 26.3 (C-21), 23.2 (C-2), 24.8 (C-11) y 18.1 (C-6) y catorce señales en fase positiva correspondientes a carbonos metílicos o metínicos. En total son 31 carbonos según el EMAR y el espectro de RMN ¹³C por lo tanto hay ocho carbonos cuaternarios (Figura 3.9).

En el espectro de HSQC se observa que la señal a δ 5.27 (1H, pt, H-12), corresponde a un carbono sp² a δ 127.4 (C-12) y la señal a δ 3.32 (1H, pt, H-3), corresponde al carbono base del alcohol a δ 75.5 (C-3). El singulete a δ 1.88 (3H, s, H-31) corresponde al carbono metílico a δ 22.7 (C-31), este protón sale un poco desplazado por la influencia del grupo carbonilo, ya que forma parte de un grupo acetato (CH₃COO). Con este análisis fue posible asignar los protones con sus respectivos carbonos (Figura 3.10).

En el espectro de HMBC se observa que la señal a δ 1.88 (3H, s, H-31) correlaciona a dos enlaces con el grupo carbonilo a δ 179.1 (C-28), los singuletes a δ 1.19 (3H, s, H-29) y 0.91 (3H, d, *J* = 6.84 Hz, H-30) correlacionan a dos y tres enlaces de la señal a δ 72.7 (C-19) respectivamente. Mientras que las señales a δ 0.92 y 0.83 (3H, s, H-23 y H-24) correlacionan con el carbono a δ 75.5 (C-3) a tres enlaces. Con este análisis fue posible determinar el orden y lugar de los sustituyentes (Figura 3.11).

La información de los desplazamientos obtenidos en cada experimento de RMN y la correlación nuclear entre sus átomos se detallan en una tabla para fines practicos (Tabla 3.3).

Con base en los análisis espectroscópicos y espectrométricos se determinó que la molécula es un triterpeno tipo ursano hidroxilado en C-19, con un grupo acetato en C-28 (Figura 3.12).



Figura 3.7 Espectro de RMN¹ H, estructura química y CCD del compuesto II de S. frantzii.







Figura 3.9 Espectro de DEPT 135 y estructura química del compuesto II de S. frantzii.



Figura 3.10 Espectro de HSQC y estructura química del compuesto II de S. frantzii.



Figura 3.11 Espectro de HMBC y estructura química del compuesto II de S. frantzii.

Carbono y	¹ H	¹³ C	DEPT 135	HS	QC		HMBC	
multiplicidad				¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	J
1 CH ₂	1.56, dd, <i>J</i> = 4.1, 12.1 Hz	32.7	CH2	1.56	32.7			
2 CH ₂		23.2	CH ₂					
3 CH-OH	3.32, pt, 1H	75.5	$CH_3^{-} \circ CH$	3.32	75.5			
4 C		36.9						
5 CH		48.6	CH₃ o CH					
6 CH ₂	1.37, m, 2H	18.1	CH₂	1.37	18.1			
7 CH ₂	1.37, m, 2H	32.8	CH₂	1.37	32.8			
8 C		39.8						
9 CH	1.81, t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H	46.9	CH₃ o CH	1.81	46.9			
10 C		36.7						
11 CH ₂	2.39, ddd, J = 4.2,	24.8	CH2	2.39	24.8			
	13.5, 13.5 H 7 2H							
12 CH	5.27, pt, 1H	127.4	$CH_3 \circ CH$	5.27	127.4			
13 C 14 C		139.4 41 3						
15 CH ₂		28.5	CH₂					
16 CH ₂		25.6	CH₂					
17 C		48.5						
18 CH	2.59, s,	54.2	CH₃ o CH	2.59	54.2	2.59	25.6	³ J
	1H						48.5	2 J
							12.5 127 /	3 J
							139.4	2 2
19 C		72.7					10011	·
20 C		41.6	CH₃ o CH					
								
21 CH ₂	167 + 1	26.3		1 67	20.1			
22 CH ₂	1.07, I, J - 12 3	30.1	CH ₂	1.07	30.1			
	Hz. 2H							
23 CH ₃	0.92, s,	27.6	CH₃ o CH	0.92	27.6	0.92	21.5	³ J
	ЗH						36.9	² J
							48.6 75 5	°J 3,
24 CH	0.83 5	21.5		0.83	21.5	0.83	75.5 27.6	3 J
	3H	21.0	0130011	0.00	21.5	0.00	36.9	2 2
							48.6	³ J
							75.5	³ J

Tabla 3.3 Desplazamientos de las señales de RMN del compuesto II.

Carbono y	¹ H	¹³ C	DEPT 135	HS	QC		HMBC	
multiplicidad				¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	J
25 CH ₃	0.85, s,	16.6	$CH_3 \circ CH$	0.85	16.6	0.85	27.6	្វី
	3H						32.7	္နဲ
							36.7	² J
							39.8	⁴J
							41.3	۶J
							46.9	³ J
							75.5	⁵ J
26 CH ₃	0.94, s,	14.3	CH₃ o CH	0.94	14.3	0.94	32.7	ិJ
	ЗH						36.7	⁴ J
							46.9	³ J
							48.6	្វ័
27 CH ₃	1.32, s,	23.5	$CH_3 \circ CH$	1.32	23.5	1.32	28.5	³ J
	3H						39.8	³ J
							41.3	² J
							139.4	³ J
28 COO		179.1						2
29 CH₃	1.19, s,	25.9	CH₃ o CH	1.19	25.9	1.19	41.6	្វ័
	3H						54.2	្វ័្យ
							72.7	źJ
30 CH₃	0.91, d, <i>J</i>	15.3	$CH_3 \circ CH$	0.91	15.3	0.91	26.3	្វ័
	= 6.8 Hz,						41.6	źJ
	3H						72.7	°J
31 CH₃	1.88, s,	22.7	$CH_3 \circ CH$	1.88	22.7	1.88	179.1	²J
	ЗH							

Tabla 3.3 (Continuación).



Figura 3.12 Estructura química del acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol.

3.3.1.3. Identificación del compuesto III, ácido oleanólico

El compuesto III, ácido oleanólico, tiene un aspecto de sólido blanco, obteniéndose 7.3 mg (rendimiento 0.004%), es soluble en MeOH y $CH_2Cl_2/MeOH$ (1:1). Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un $R_f = 0.35$ en Hx/AcOEt (8:2) (Figura 3.13)

En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.13) se observa la presencia de siete singuletes a δ 1.30, 1.24, 1.13, 1.08, 0.91, 0.84, 0.80 (s, 3H, H-23, H-27, H-26, H-30, H-24, H-29 y

H-25), correspondientes a protones metílicos. También se observa un pseudotriplete a δ 5.18 (1H, pt, H-12), que pertenece a un protón vinílico y un multiplete a δ 3.31 (1H, m, H-3), que pertenece a un protón de un carbono base de alcohol.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 3.14) se observa 30 carbonos, uno de los cuales corresponde al carbono del grupo carbonilo del ácido orgánico a δ 183.9 (C-28), dos pertenecen a carbonos sp² a δ 145.1 (C-13) y 121.2 (C-12) y una señal corresponde a un carbono base de alcohol a δ 75.6 (C-3).



Figura 3.13 Espectro de RMN¹H, estructura química y CCD del compuesto III de S. frantzii.



Figura 3.14 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto III de S. frantzii.

La presencia de impurezas en la muestra dificultó la elucidación del compuesto III. Sin embargo, resultó ser un triterpeno de tipo oleanano (Wang *et al.*, 2016) (Tabla 3.4 y Figura 3.15).

Posición Ácido ole		Ácido oleanólico	Compuesto III	
(fórmula $C_{30}H_{48}O_3$)		(100 MHz, Piridina-d ₅), δ_{C}	(150 MHz, CDCI ₃ /CD ₃ OD),	
			δ _c	
1	CH ₂	38.8	39.1	
2	CH_2	28.0	28.1	
3	СН	78.0	75.6	
4	С	39.3	39.5	
5	СН	55.7	53.5	
6	CH_2	18.7	18.1	
7	CH_2	33.2	33.0	
8	С	39.6	39.3	
9	СН	48.0	48.6	
10	С	37.3	36.9	
11	CH_2	23.6	23.0	
12	СН	122.4	121.2	
13	С	144.8	145.1	
14	С	42.1	42.1	
15	CH_2	28.1	27.8	
16	CH_2	23.7	22.9	
17	С	46.6	47.3	
18	СН	41.9	41.9	
19	CH ₂	46.4	46.6	
20	С	30.9	30.9	
21	CH ₂	34.2	34.1	
22	CH ₂	33.2	32.8	
23	CH_3	28.7	27.7	
24	CH_3	16.5	16.6	
25	CH_3	15.6	14.7	
26	CH_3	17.5	16.8	
27	CH_3	26.1	25.4	
28	COOH	180.4	183.9	
29	CH_3	33.2	32.7	
30	CH_3	23.7	23.1	

 Tabla 3.4 Comparación de las señales de RMN ¹³C del ácido oleanólico con el compuesto III.

Wang et al., 2016.



Figura 3.15 Estructura química del ácido oleanólico.

3.3.1.4. Identificación del compuesto IV, α-espinasterol

El compuesto IV, α -espinasterol, tiene un aspecto de polvo blanco, obteniéndose 4.9 mg (rendimiento 0.003%), es soluble en CH₂Cl₂/MeOH (1:1). Este compuesto no se ve bajo luz UV, tiene un R_f= 0.48 en Hx/An (7:3) (Figura 3.16). Según la CG se encuentra en un 100% de pureza.

El análisis de CG-EM (Figura 3.16) se ajusta a una fórmula molecular de $C_{29}H_{48}O$, cuyo peso molecular es 412 u. El espectro muestra pérdidas de 28 u [M – CH₂=CH₂], lo que sugiere pérdida de un doble enlace y pérdidas de 18 u [M – H₂O], características de los grupos OH, lo que concuerda con los datos del IR.

En el espectro de IR (Figura 3.17) se observan una banda ancha a 3400 cm⁻¹ característica del grupo OH, dos bandas débiles a 1660 y 1633 cm⁻¹ de los enlace C=C y dos bandas intensas a 2955 y 2933 cm⁻¹ de los enlaces C_{sp3} -H.

En el espectro de RMN ¹H (Figura 3.18) se observa una señal doble de dobles a δ 5.17 (dd, 1H, *J* = 8.8, 15.1 Hz, H-23) y un triplete a δ 5.30 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz H-7, H-22), correspondientes a protones vinílicos; dos singuletes a δ 0.94 (s, 6H, H-18, H-19) y 0.70 (s, 3H, H-21), dos dobletes a δ 1.16 (d, 3H, *J* = 6.7 Hz, H-28) y 0.99 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz, H-26) y un triplete a δ 0.95 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, H-29), correspondientes a protones metílicos y un multiplete a δ 3.67 (m, 1H, H-3), que pertenece al protón de un carbono base de alcohol.

En el espectro de RMN ¹³C (Figura 3.19) se observan 29 carbonos, de los cuales cuatro pertenecen a carbonos sp² a δ 139.9 (C-8), 138.7 (C-22), 129.9 (C-23) y 117.8 (C-7) y uno a un carbono base de alcohol a δ 70.8 (C-3).



Figura 3.16 Espectro de CG-EM y CCD del compuesto IV de S. frantzii.



Figura 3.17 Espectro de IR del compuesto IV de S. frantzii.



Figura 3.18 Espectro de RMN¹H y estructura química del compuesto IV de S. frantzii.



Figura 3.19 Espectro de RMN ¹³C y estructura química del compuesto IV de S. frantzii.

Al elucidar la estructura del compuesto IV resultó ser un esterol (Rodriguez *et al.,* 1996), (Tabla 3.5 y Figura 3.20).

I	Posición α-Spinasterol		Compuesto IV		
(fórm	ula C ₂₉ H ₄₈ O)	(125 MHz, CDCl ₃), δ_{C}	(150 MHz, CDCl ₃ /CD ₃ OD), δ_{C}		
1	CH ₂	37.2	37.6		
2	CH_2	31.5	31.3		
3	CH	71.1	70.8		
4	CH ₂	38.1	37.8		
5	CH	40.3	40.7		
6	CH_2	29.7	30.0		
7	CH	117.5	117.8		
8	С	139.6	139.9		
9	CH	49.5	49.9		
10	С	34.3	34.6		
11	CH ₂	21.6	21.9		
12	CH_2	39.5	39.9		
13	С	43.3	43.6		
14	СН	55.2	55.5		
15	CH_2	23.0	23.3		
16	CH_2	28.5	28.9		
17	СН	56.0	56.4		
18	CH_3	12.1	12.2		
19	CH_3	13.0	13.1		
20	СН	40.1	41.3		
21	CH_3	21.1	21.1		
22	СН	138.1	138.7		
23	СН	129.5	129.8		
24	СН	51.3	51.8		
25	CH ₂	31.9	32.3		
26	CH ₃	21.4	21.5		
27	СН	19.0	19.1		
28	CH ₃	25.4	25.7		
29	CH ₃	12.2	12.3		

Tabla 3.5 Comparación de las señales de RMN 13 C del α -spinasterol con el compuesto IV.

Rodríguez et al., 1996.



Figura 3.20 Estructura química del α-spinasterol.

3.3.2. Fracción diclorometánica (SFR-2b)

La fracción diclorométanica fue subfraccionada mediante una CLV, dando un total de quince subfracciones (SFR-3ab – SFR-3ob), de las cuales se tomaron las que tuvieron mayor rendimiento y menor complejidad en las manchas según CCD, para seguir con la purificación de los metabolitos. Las subfracciones SFR-3gb y SFR-3hb, compartían algunos metabolitos en común, por lo cual se mezclaron con el fin de enriquecer los componentes y se subfraccionaron mediante una CCG, dando un total de cuatro subfracciones (SFR-5ab – SFR-5db).

El compuesto VIII se obtuvo de la subfracción SFR-5ab, ya descrito en la sección de métodos (Figura 3.2). Como ya se mencionó anteriormente, se dificultaron los estudios espectroscópicos necesarios para su elucidación estructural debido a su bajo rendimiento, por lo que no se abordará en esta sección.

3.4. DISCUSIÓN

Del género *Stachytarpheta* se han aislado principalmente monoterpenos de tipo iridoide y un glicósido feniletanoide (Viccini *et al.,* 2008; Penido *et al.,* 2006; Schapoval *et al.,* 1998). En este trabajo se aislaron otros tipos de compuestos, algunos de cuales han sido reportados previamente en el género.

El ácido betulínico es un triterpeno de tipo lupano, que se caracteriza por tener un esqueleto pentacíclico y es común encontrarlo en diversas especies de plantas (Zhang

et al., 2015; Cano-Flores, 2013); se aisló por primera vez de *Gratiola officinalis* en 1902 por Retzlaff y es producto de la oxidación de la betulina (Zhang *et al.,* 2015). También ha sido aislado de la raíz de la especie de *Stachytarpheta cayennensis* (André de Souza *et al.,* 2011). Sin embargo, este es el primer reporte en la especie de *S. frantzii*. De este compuesto se ha reportado actividad biológica, exhibiendo efecto antioxidante (André de Souza *et al.,* 2011), antiflamatorio en ratones (Oliveira-Costa *et al.,* 2014) y citotóxico en diferentes líneas de células tumorales (Shankar *et al.,* 2017; Chintharlapalli *et al.,* 2011).

El compuesto II, acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol, es un triterpeno tipo ursano, los cuales se caracterizan por tener como base un esqueleto pentacíclico y es común encontrarlos en diversas especies de plantas (Cano-Flores, 2013; Mahato y Kundu, 1994). Se han reportado triterpenos en el género *Stachytarpheta* (Okokon *et al.*, 2008), pero no hay reportes en la especie *S. frantzii.* Los triterpenos de tipo ursano han presentado actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer (Eyong *et al.*, 2018), actividad antifúngica (Ghosh *et al.*, 2013), así como efectos hepatoprotector (Liu, 2005) y antioxidante (Ď Abrosca *et al.*, 2006). Una búsqueda en SciFinder permitió confirmar que este compuesto no ha sido descrito con anterioridad en la literatura.

El ácido oleanólico es un triterpeno de tipo oleanano, que se caracteriza por tener un esqueleto pentacíclico y es común encontrarlo en diversas especies de plantas (Cano-Flores, 2013; Mahato y Kundu, 1994). Se han reportado triterpenos en el género *Stachytarpheta* (Okokon *et al.*, 2008). Sin embargo, no hay reportes del ácido oleanólico en la especie *S. frantzii.* El ácido oleanólico ha presentado actividad antiinflamatoria y citotóxica en líneas celulares de cáncer, así como actividad hepatoprotectora (Liu, 2005). También se ha reportado actividad hepatoprotectora en otros triterpenos de tipo oleanano (Zhan *et al.*, 2012), antibacteriana y antifúngica (Iqbal *et al.*, 2014).

El α-espinasterol pertenece al grupo de los esteroles, caracterizados por tener como base un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno con una cadena alifática lateral de 8-10 carbonos y un grupo hidroxilo (OH) en C-3 (Myant, 1981); ha sido aislado en la especie vegetal *Spinacia oleracea* o comúnmente llamada espinaca, de ahí su nombre (Hart y Heyl, 1932). También ha sido aislado de la raíz de la especie de *Stachytarpheta urticaefolia* (Chowdhury *et al.*, 2003). Sin embargo, éste es el primer reporte en la especie de *S. frantzii*. Este compuesto ha sido sintetizado a través de

otro esterol, el estigmasterol, y se ha reportado que tienen efectos biológicos benéficos, presentando un efecto sinérgico frente a diversas bacterias (Yang *et al.*, 2017). También se ha reportado su actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares de cáncer (Meneses-Sagrero *et al.*, 2017) y actividad antigenotóxica en ratones (Villaseñor *et al.*, 1996).

Es importante recalcar que el acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol, no ha sido reportado en la literatura de acuerdo a la búsqueda en SciFinder. Este es el primer reporte de este y del α -espinasterol, el ácido betulínico y ácido oleanólico en la especie de *S. frantzii*, pues no hay estudios fitoquímicos de la especie.

3.5. CONCLUSIONES

- El compuesto I obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al ácido betulínico.
- El compuesto II obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde a un triterpeno tipo ursano, el acetato de *nor*-28urs-12-eno-3,17,19-triol, el cual es un metabolito que no ha sido reportado con anterioridad en la literatura, de acuerdo con una búsqueda realizada en SciFinder.
- El compuesto III obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al ácido oleanólico.
- El compuesto IV obtenido de la fracción hexánica, de acuerdo al análisis espectroscópico, corresponde al α-espinasterol, siendo ésta la primera vez que se reporta su aislamiento de *S. frantzii*.
- Los metabolitos secundarios presentes en la especie de *S. frantzii* son principalmente de tipo triterpénico y esteroidal.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Casearia corymbosa es una especie poco estudiada. Sin embargo, del género se han encontrado moléculas interesantes principalmente diterpenos de tipo clerodano, los cuales son responsables de la actividad citotóxica que se ha reportado. En el presente estudio se aislaron cuatro metabolitos de la fracción hexánica y dos de la fracción diclorometánica. Entre los metabolitos aislados se encuentran diterpenos de tipo kaureno, labdano y clerodano, así como un esterol y un ácido benzoico los cuales según lo reportado en la literatura tienen diferentes actividades biológicas.

Stachytarpheta frantzii es una especie que no ha sido estudiada previamente. Del género *Stachytarpheta* se han aislado monoterpenos de tipo iridoide y glicósidos feniletanoides, sugiriendo que este tipo de moléculas son las que le confieren la actividad biológica a la especie *S. frantzii*. En el presente estudio se aislaron cuatro metabolitos de la fracción hexánica cuyas estructuras se lograron elucidar y uno de la fracción diclorometánica que debido al bajo rendimiento que se obtuvo no se pudo identificar su estructura molecular. Entre los metabolitos aislados se encuentran triterpenos de tipo lupano, ursano y oleanano así como un esterol, de los cuales se han reportado actividad biológica, según la literatura.

4.2. CONCLUSIONES GENERALES

Del extracto metanólico del tallo de *C. corymbosa* se aislaron e identificaron terpenoides específicamente diterpenos de tipo kaureno, labdano y clerodano, además de un esterol y un ácido benzoico.

El óxido de *ent*-3 β -hidroxi-(-)-13-*epi*-manoilo (diterpeno de tipo labdano), ácido siríngico (ácido benzoico) y casearborina c (diterpeno de tipo clerodano), no han sido reportados previamente en la especie *C. corymbosa*, mientras que el ácido *ent*-(-)-kaur-16-en-19-oico (diterpeno de tipo kaureno), γ -sitosterol (esterol) y óxido de *ent*-(-)-13-*epi*-manoilo (diterpeno de tipo labdano), ya han sido previamente reportados.

Para la especie *S. frantzii*, los metabolitos secundarios aislados de su raíz fueron terpenoides específicamente triterpenos de tipo ursano, lupano y oleanano, además de un esterol.

El acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol (triterpeno de tipo ursano), el α espinasterol (esterol), ácido betulínico (triterpeno de tipo lupano) y ácido oleanólico (triterpeno de tipo oleanano) se reportan por primera vez en la especie *S. frantzii*. Además, se distingue que este trabajo condujo a la identificación de un nuevo producto natural el acetato de *nor*-28-urs-12-eno-3,17,19-triol acorde con la búsqueda realizada en SciFinder.

BIBLIOGRAFÍA

- Alam, M.I. y A. Gomez (1998). Viper venom-induced inflammation and inhibition of free radical formation by pure compound (2-hydroxy-4-methoxy benzoic acid) isolated and purified from anantamul (*Hemidesmus indicus* R. Br) root extract. Toxicon, 36, 1, 207-215.
- Albella, J.M., A.M. Cintas, T. Miranda y J.M. Serratosa (1993). Introducción a la ciencia de materiales. Técnicas de preparación y caracterización. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. pp 627-628.
- Aljofan, M., H.J. Netter, A.N. Aljarbou, T.B. Hadda, I.E. Orhan, B. Sener y B.A. Mungall (2014). Anti-hepatitis B activity of isoquinoline alkaloids of plant origin. Archives of Virology, 1119-1128.
- Alonso-Castro, A.J., M.L. Villarreal, A. Salazar-Olivo, M. Gomez-Sanchez, F. Dominguez y A. Garcia-Carranca (2011). Mexican medicinal plants used for cáncer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. Journal of Ethnopharmacology, 133, 945-972.
- Altemimi, A., N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D.G. Watson y D.A. Lightfoot, (2017). Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants, 6, 42, 1-23.
- André de Souza, P.A., C. Rodrigues, A.P.S.A. Santiago, N. Camara de Lucas, G. Guimaraes Leitao y A. Galina Filho (2011). Antioxidant activity of natural compounds of *Stachytarpheta cayennensis* by scavenger of mitochondrial reactive oxygen species. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 21, 420-426.
- Ankli, A., M. Heinrich, P. Bork, L. Wolfram, P. Bauerfeind, R. Brun, C. Schmid, C. Weiss, R. Bruggisser, J. Gertsch, M. Wasescha y O. Sticher (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. Journal of Ethnopharmacology, 79, 43-52.
- Arellano-Rodríguez, J., J. Flores-Guido, J. Tun-Garrido y M. Cruz-Bojorquez (2003). Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies

vegetales de la Península de Yucatán. Flacourtiaceae. Verbenaceae. Universidad Autónoma de Yucatán Press, México. pp. 238, 601.

- Atanasov, A.G., B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linderd, C. Wawroscha,
 P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E.H. Heiss, J.M. Rollinger, D. Schuster, J.M. Breuss, V. Bochkov, M.D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V.M. Dirsch y H. Stuppner (2016). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnology, 33, 8, 1582-1614.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [Online] (Actualizado 2009). Disponible <u>http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php?mo=moe&nombre=</u> <u>botanico&action=bot</u> [Acceso abril 2014].
- Atta-ur-Rahman (2003). Studies in natural products chemistry. Bioactive natural products (part I). Volume 28. Elsevier, Pakistan. pp 58.
- Balamurugan, R., V. Duraipandiyan y S. Ignacimuthu (2011). Antidiabetic activity of γsitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. European Journal of Pharmacology, 667, 410-418.
- Balunas, M.J. y A.D. Kinghorn (2005). Drug discovery from medicinal plants. Life Sciences, 78, 431-441.
- Barnes, J., L.A. Anderson y J.D. Phillipson (2007). Herbal Medicines. 3rd edition. Pharmaceutical Press, London Chicago.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1767, 1073-1101.
- Beutler, J.A., K.L. McCall, K. Herbert, D.L. Herald, G.R. Pettit, T. Johnson, R. Shoemaker y M.R. Boyd (2000). Novel cytotoxic diterpenes from *Casearia arborea*. Journal of Natural Products, 63, 657-661.
- Bothwell, J.H.F. y J.L. Griffin (2011). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biological Reviews, 86, 2011, 493-510.

- Boeck, P., M.M. Sáa, B.S. De Souza, R. Cercená, A.M. Escalante, S.A. Zachino, V.C. Valdir Cechinel Filho y R.A. Yunes (2005). A simple synthesis of kaurenoic esters and other derivatives and evaluation of their antifungal activity. Jornal of Brazilian Chemical Society, 16, 6B, 1360-1366.
- Caamal-Fuentes, E., L.W. Torres-Tapia, P. Simá-Polanco, S.P. Peraza-Sánchez y R. Moo-Puc (2011). Screening of plants used in Mayan traditional medicine to treat cancer-like symptoms. Journal of Ethnopharmacology, 135, 719-724.
- Calderón de Rzedowski, G. (1996). Flora de Bajío y de regiones adyacentes. Flacourtiaceae, fascículo 41.
- Cano-Flores, A. (2013). Biotransformation of triterpene with diferent microorganisms. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 44, 7-16.
- Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), 2010. Flora de la Península de Yucatán. Herbario. Unidad de Recursos Naturales. [Online] (Actualizado 2010). Disponible en:<u>http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital</u> [Acceso mayo 2014].
- Chintharlapalli, S., S. Papineni, P. Lei, S. Pathi y S. Safe (2011). Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors. BMC Cancer, 11, 1-12.
- Chen, T.B. y D.F. Wiemer (1991). Corymbotins A-I: highly oxydized kolovane derivatives from *Casearia corymbosa*. Journal of Natural Products, 54, 1612-1618.
- Cho, J.-Y., X. Yang, K.-H. Park, H.J. Park, S.-Y. Park, J.-H. Moon y K.-S. Ham (2013). Isolation and identification of antioxidative compounds and their activities from *Suaeda japonica*. Food Science and Biotechnology, 22, 6, 1547-1557.
- Chowdhury, R., M.U. Rashid, O.F. Khan y C.M. Hasan (2003). Ipolamiide and αspinasterol from *Stachytarpheta urticaefolia*. Biochemical Systematics and Ecology, 31, 1209-1211.
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. Northern Clinics of Istanbul, 3, 2, 156-60.

- Cragg, G.M. y D.J. Newman (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology, 100, 72-79.
- D Abrosca, B., A. Fiorentino, P. Monaco, P. Oriano y S. Pacifico (2006). Annurcoic acid: a new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple. Food Chemistry, 98, 285-290.
- De Hoffmann, E. y V. Stroobant (2017). Mass spectrometry, principles and applications. 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Demirezer, L.O., Z. Guvenalp, A. Kuruuzum-Uz y C. Kazaz (2012). Labdane type diterpenes from *Cistus creticus*. Chemistry of Natural Compounds, 48, 2, 337-338.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach 2nd edition. John Wiley & Sons, LTD. England.
- Dimas K., C. Demetzos, V. Vaos, P. Ioannidis y T. Trangas (2001). Labdane type diterpenes down-regulate the expression of *c-Myc* protein, but not of *Bcl-*2, in human leukemia T-cells undergoing apoptosis. Leukemia Research, 25, 449-454.
- Durst, H.D. y G.W. Gokel (2007). Química orgánica experimental. Reverté, S.A. Barcelona, España. pp 129-133.
- Eyong, K.O., G. Bairy, A.A. Eno, J. Taube, K.G. Hull, G.N. Folefoc, H.S. Foyet y D. Romo (2018). Triterpenoids from the stem bark of *Vitellaria paradoxa* (Sapotaceae) and derived esters exhibit cytotoxicity against a breast cancer cell line. Medicinal Chemistry Research, 27, 268-277.
- Fatope, M.O., G.B. Varma, N.M. Alzri, R.G. Marwah y R.S. Nair (2010). Bioactive *ent*-Kaurene diterpenoids from *Annona senegalencis*. Journal Natural Products, 59, 301-303.
- Fatope, M.O. y O.T. Audu (1996). *Ent*-Kaurene diterpenoids from *Blepharispermum hirtum*. Chemistry & Biodiversity, 7, 1862-1870.
- Fernández-Carnevali, G.C., J.L. Tapia-Muños, R. Duno de Stefano, I.M. Ramírez-Morillo, L. Can-Itzá, S. Hernández-Aguilar y A. Castillo (2012). La Flora de

Península Yucatán Mexicana: 250 años de conocimiento florístico. CONABIO. Biodiversitas, 101, 6-10.

- Ferraro, G.A., V.S. Martino, A.L. Bandoni y J.L. Nadinic (2015). Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales. Eudeba, Buenos Aires.
- Fokialakis, N., E. Kalpotzakis, B.L. Tekwani, A.L. Skaltsounis y S.O. Duke (2006). Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus sp.* and semisynthetic derivatives thereof. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 29, 8, 1775-1778.
- Fuentes-Arderiu, X., M.J. Castiñeras-Lacambra y J.M. Queralto-Campaño (1998). Bioquímica clínica y patología molecular. 2ª edición, vol 1. Reverté, S.A. Barcelona, España. pp 259-262.
- Friedland, S.S. y G.H. Lane (1959). Mass spectra of steroids. Analytical Chemistry, 31, 169-174.
- Fujita E. (1965). The chemistry on the diterpenoids in 1964. Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University. 43, 3, 278-302.
- Gadgoli, C. y S.H. Mishra (1999). Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from *Capparis spinosa*. Journal of Ethnopharmacology, 66, 1999, 187-192.
- GE Healthcare, Life Sciences (2014). Size exclusion chromatography principles and methods. Appendix 1. pp 83-87.
- Gonzaga dos Santos, A., P.M. Pinheiro-Ferreira, G.M. Vieira-Júnior, C.C. Perez, A.
 Gomes-Tininis, G.H. Silva, V. Da Silva-Bolzani, L.V. Costa-Lotufo, C. Do O´
 Pessoa y A.J. Cavalheiro (2010). Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. Chemistry & Biodiversity, 7, 205-215.
- Ghosh, P., A. Mandal y M. Golam Rasul (2013). A new bioactive ursane-type triterpenoid from *Croton bonplandianum* Bail. Journal of Chemical Sciences, 125, 359-364.
- Hart M.C. y F.W. Heyl (1932). Spinasterol and some of its esters. Journal of Biological Chemistry, 95, 311-315.

- Hopkins, A. y J.R. Stepp (2012). Distribution of herbal remedy knowledge in Tabi, Yucatan, Mexico. Economic Botany, 66, 249-254.
- Hunter, M.S., D.G. Corley, C.P. Carron, E. Rowold, B.F. Kilpatrick y R.C. Durley (1997). Four new clerodane diterpenes from the leaves of *Casearia guianensis* which inhibit the interaction of leukocyte function antigen 1 with intercellular adhesion molecule 1. Journal of Natural Products, 60, 894-899.
- Henry, G.E., L.S. Adams, J.C. Rosales, H. Jacobs, D. Heber y N.P. Seeram (2006). Kaurene diterpenes from *Laethia thamnia* inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Letters, 244, 190-194.
- Heinrich, M., J. Barnes, S. Gibbons y E.M. Willianson (2012). Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. 2nd edition. Elsevier, Churchill Livigstone, Edinghburg. pp 63, 106, 107.
- Iqbal, M., M. Bilal, R. Iqbal, M. Akram, I.B. Baloch y M.K. Baloch (2014). New bioactive oleanane type compounds from *Coriandrum sativum* Linn. Journal of Chemistry, 1-8.
- Jalil, J., C.W. Sabandar, N. Ahmat, J.A. Jamal, I. Jantan, N. Aladdin, K. Muhammad, F. Buang, H.F. Mohamad y I. Sahidin (2015). Inhibitory effect of triterpenoids from *Dillenia serrata* (Dilleniaceae) on prostaglandin E2 production and quantitative HPLC analysis of its koetjapic acid and betulinic acid contents. Molecules, 20, 3206-3220.
- Jaramillo-Juárez, F., E.G. Cardona-Muñoz y A.R. Rincón-Sánchez (2008). Farmacología General. Farmacognosia. 2ª edición. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes. pp. 17-21.
- Kakuta, H., T. Seki, Y. Hashidoko y J. Mizutani (1992). *Ent*-kaurenic acid and its related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 56, 1562-1564.
- Kalpoutzakis, E., N. Aligiannis, S. Mitaku, I. Chinou, C. Charvala y A.L. Skaltsounis (2001). New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49, 814-817.

- Kanokmedhakul, S., K. Kanokmedhakul y M. Buayairaksa (2007). Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*. Journal of Natural Products, 70, 1122-1126.
- Kenmoku, H., T. Sugai, H. Yajima y T. Sassa (2004). Phaeoside, a novel galactoside of hydroxymanoyl oxide from the gibberellin A1-producing phaeosphaeria sp. L487 Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68, 2418-2420.
- Khan, M.R. y S.M. Mlungwana (1999). γ-Sitosterol, a cytotoxic sterol from *Markhamia zanzibarica* and *Kigelia africana*. Fitoterapia, 70, 96-97.
- Khan, M.R., A.I. Gray y P.G. Waterman (1990). Clerodane diterpenes from *Casearia corymbosa* stem bark. Phytochemistry, 29, 3591-3595.
- Kuklinski, C. (2003). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 51-54.
- Lentz, D.L., A.M. Clark, C.D. Hufford, B. Meurer-Grimes, C.M. Passreiter, J. Cordero,O. Ibrahimi y A.L. Okunade (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 63, 253-263.
- Liu, J (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. Journal of Ethnopharmacology, 100, 92-94.
- Lobitz, G.O., G. Tamayo-Castillo y I. Merfort (1997). Diterpenes and sesquiterpenes from *Mikania banisteriae*. Phytochemistry, 46, 161-164.
- Mahato, S.B. y A.P. Kundu (1994). ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids -a compilation and some salient features. Phytochemistry, 37, 1517-1575.
- Marcano, D. y M. Hasegawa (2002). Fitoquímica Orgánica. Terpenos. 2ª edición. Editorial Torino, Venezuela. pp. 298.
- Martínez-Martínez, A. (2002). Esteroles. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín. pp 15.

- Maurya, A., K. Kalani, S.C. Verma, R. Singh y A. Srivastava (2018). Vacuum liquid chromatography: simple, efficient and versatile separation technique for natural products. Organic & Medicinal Chemistry, 7, 2, 1-3.
- Meneses-Sagrero, S.E., M. Navarro-Navarro, E. Ruiz-Bustos, C.L. Del-Toro Sánchez, M. Jiménez-Estrada y R.E. Robles-Zepeda (2017). Antiproliferative activity of spinasterol isolated of *Stegnosperma halimifolium* (Benth, 1844). Saudi Pharmaceutical Journal, 25, 1137-1143.
- Missouri Botanical Garden (Tropicos.org.Missouri Botanical Garden), 2014. [Online] (Actualizado abril 2014). Disponible en: <u>http://www.tropicos.org</u> [Acceso abril 2014].
- Murakami, K., K. Wierzba, M. Sano, J. Shibata, K. Yonekura, A. Hashimoto, K. Sato y Y. Yamada (1998). TAC-101, a benzoic acid derivative, inhibits liver metastasis of human gastrointestinal cancer and prolongs the life-span. Clinical and Experimental Metastasis, 16, 323-331.
- Myant, N.B. (1981). The biology of cholesterol and related esteroids. William Heinenmann Medical Books Ltd, London. pp. 4.
- Nash, D. y M. Nee (1984). Flora de Veracruz. Verbenaceae, fascículo 41.
- Nee, M. (1999). Flora de Veracruz. Flacourtiaceae, fascículo 111.
- Neto, F.S.L., D.P.C. Tirapelli, S.R. Ambrosio, C.R. Tirapelli, F.M. Oliveira, P.C. Novais, F.M. Peria, H.F. Oliveira, C.G. Carlotti-Junior y L.F. Tirapelli (2013). Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 46, 71-78.
- Nibret, E., F. Sporera, K. Asresb y M. Winka (2009). Antitrypanosomal and cytotoxic activities of pyrrolizidine alkaloid-producing plants of Ethiopia. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61, 801-808.
- Okokon, J.E., E. Ettebong, B.S. Antia (2008). In vivo antimalarial activity of ethanolic leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis*. Indian Journal of Pharmacology, 40, 111-113.

- Okoye, T.C., P.A. Akah, C.O. Okoli, A.C. Ezike y F.N. Mbaoji (2010). Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3,189-192.
- Oliveira-Costa, J.F., J.M. Barbosa-Filho, M. Lemos de Azevedo, G. Teixeira Guimarães, E.C. Santana-Meira, R. Ribeiro-dos-Santos, L.C. Pontes de Carvalho y M.B. Pereira-Soares (2014). Potent anti-inflammatory activity of betulinic acid treatment in a model of lethal endotoxemia. International Immunopharmacology, 23, 469-474.
- Pandey, A. y S. Tripathi (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2, 5, 115-119.
- Pasquini, C. (2003). Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. Journal of the Brazilian Chemical Society, 14, 198-219.
- Pelletier, S.W., H. Chokshi y H.K. Desai (1986). Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. Journal of Natural Products, 49, 5, 892-900.
- Penido, C., K.A. Costa, D.O. Futuro, S.R. Paiva, M.A. Kaplan, M.R. Figueiredo y M.G. Henriques (2006). Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. Journal of Ethnopharmacology, 104, 225-233.
- Rocha, J.A., I.M. Andrade, L.M.C. Véras, P.V. Quelemes, D.F. Lima, M.J.S. Soares,
 P.L.S. Pinto, J.M. Mayo, G. Ivanova, M. Rangel, M. Correia, A.C. Mafud, Y.P.
 Mascarenhas, C. Delerue-Matos, J. De Moraes, P. Eaton y J.R.S.A. Leite
 (2017). Anthelmintic, antibacterial and cytotoxicity activity of imidazole alkaloids
 from *Pilocarpus microphyllus* leaves. Phytotherapy Research, 31, 624-630.
- Ringuelet, J. y S. Viña (2013). Productos naturales vegetales. Editorial de la Universidad de la Plata. Buenos Aires, Argentina. pp 4-10.
- Riveros, A. S., L.E. Pocasangre y F.E. Rosales (2002). Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. El papel de los

metabolitos secundarios en la defensa inducida de plantas. Memorias del taller internacional realizado en el CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp. 65-67.

- Rodriguez, J.B., E.G. Gros, M.H. Bertoni y P. Cattaneo (1996). The sterol *Cucurbita moschata* ("calabacita") seed oil. Lipids, 31, 11, 1205-1208.
- Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski (2002). Flora de Bajío y de regiones adyacentes. Verbenaceae, fascículo 100.
- Sai-Prakash, C.V., J.M. Hoch y D.J. Kingston (2002). Structure and stereochemistry of new cytotoxic clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia lucida* from the Madagascar rainforest. Journal of Natural Products, 65, 100-107.
- Schapoval, E.E., M.R. Winter de Vargas, C.G. Chaves, R. Bridi, J.A. Zuanazzi y A.T. Henriques (1998). Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. Journal of Ethnopharmacology, 60, 53-59.
- Silverstein, R.M., F.X. Webster y D.J. Kiemle (2005). Spectrometric identificacion of organic compounds. 7th edition. Jonh Wiley & Sons, INC. Unites States of America.
- Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA), 2019. [Online] (Actualizado 2014). Disponible en: <u>https://www.secyta.es/es/node/10</u> [Acceso febrero 2019].
- Shankar, E., A. Zhang, D. Franco y S. Gupta (2017). Betulinic acid-mediated apoptosis in human prostate cancer cells involves p53 and nuclear Factor-Kappa B (NFkB) pathways. Molecules, 22, 264, 1-14.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia. pp 41-45.
- Shen, Y.-C., C.-H. Wang, Y.-B. Cheng, L.-T. Wang, J.-H., Guh, C.-T. Chien y A.-T. Khalil (2004). New cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia membranácea*. Journal of Natural Products, 67, 316-321.
- Steenkamp, V. y M.C. Gouws (2006). Cytotoxicity of six South African medicinal plant extracts used in the treatment of cancer. South African Journal of Botany, 72, 630-633.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website, 2012. [Online] (Actualizado julio 2012). Disponible en: <u>http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/</u> [Acceso abril 2014].
- Su, D., X.-Y. Yang, X. Feng, M.-Y. Shang y S.-Q. Cai (2014). The diterpenes ovoideal A–G from *Tirpitzia ovoidea*. Molecules, 19, 18966-18979.
- Suffredini, I. V., M.L.B. Paciencia, A.D. Varella y R.N. Younes (2007). In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. Fitoterapia, 78, 223-226.
- Sundarraj, S., R. Thangama, V. Sreevania, K. Kaverib, P. Gunasekaranb, S. Achiramanc y S. Kannana (2012). γ-Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells. Journal of Ethnopharmacology, 141, 803-809.
- Unnati, S., S. Ripal, A. Sanjeev y A. Niyati (2013). Novel anticáncer agents from plant sources. Chinese Journal of Natural Medicines, 11, 16-23.
- Viccini, L.F., P.S. Silva, M.V. De Almeida, M.F. Saraiva, P.H. Peixoto, F.R. Salimena, R. Diniz, B.L. Rodriguez, I. Scowen, H.G.M. Edwards y L.F.C. De Oliveira (2008).
 Ipolamiide and fulvoipolamiide from *Stachytarpheta glabra* (Verbenaceae): A structural and spectroscopic characterization. Journal of Molecular Structure, 875, 27-31.
- Vieira-Junior, G.M., T. De Oliveira Goncalves, L.O. Regasini, P.M. Pinheiro-Ferreira, C.
 Do O´ Pessoa, L.V. Costa-Lotufo, R. Buzanelli-Torres, R. Nivaldo-Boralle, V. Da
 Silva Bolzani y A.J. Cavalheiro (2009). Cytotoxic clerodane diterpenoids from
 Casearia oblique. Journal of Natural Products, 72, 1847-1850.
- Villaseñor, I.M., P. Lemon, A. Palileo y J.B. Bremner (1996). Antigenotoxic spinasterol from *Cucurbita maxima* flowers. Mutation Research, 360, 89-93.

- Wang, C.-M., H.-T. Chen, Z.-Y. Wu, Y.-L. Jhan, C.-L. Shyu y C.-H. Chou (2016). Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. Molecules, 21, 1-11.
- Wrona, O., K. Rafińska, K. Mozeński y B. Buszewski (2017). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plant materials. Journal of AOAC International, 100, 6, 1624-1635.
- Williams, R.B., A. Norris, J.S. Miller, C. Birkinshaw, F. Ratovoson, R. Andriantsiferana, V.E. Rasamison y D.G. Kingston (2007). Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. Journal of Natural Products, 70, 206-209.
- Yang, X., J. Zhou, T. Wang, L. Zhao, G. Ye, F. Shi, Y. Li, H. Tang, Q. Dong, X. Zhou,
 M. Xu, Q. Rong, H. Chen, X. Yang y Y. Cai (2017). A novel method for synthesis of α-spinasterol and its antibacterial activities in combination with ceftiofur. Fitoterapia, 119, 12-19.
- Zhan, Q., F. Zhang, L. Sun, Z. Wu y W. Chen (2012). Two new oleanane-type triterpenoids from platycodi radix and anti-proliferative activity in HSC-T6 Cells. Molecules, 17, 14899-14907.
- Zhang, D.-M., H.-G. Xu, L. Wang, Y.-J. Li, P.-H. Sun, X.-M. Wu, G.-J. Wang, W.-M. Chen y W.-C. Ye (2015). Betulinic acid and its derivatives as potential antitumor agents. Medicinal Research Reviews, 35, 1127-1155.