

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Exostema coulteri*



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ELIAS CASTRO VALDOVINOS

MEXICO, D. F.

1967



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
LISTA DE TABLAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vi
LISTA DE ESQUEMAS -----	vii
LISTA DE ABREVIACIONES -----	viii
LISTA DE ESPECTROS -----	ix
INTRODUCCION -----	1
Generalidades de la <i>Exostema coulteri</i> Hook -----	1
Fitoquímica general de la familia Rubiaceae -----	2
Generalidades sobre triterpenos pentacíclicos de los tipos ursano, oleanano y lupano -----	3
OBJETIVOS -----	13
Objetivo general -----	13
Objetivos específicos -----	13
MATERIALES Y METODOS -----	15
Material vegetal -----	15

	Página
Determinación de alcaloides y triterpenos -----	15
Análisis cromatográfico -----	17
Preparación del extracto metanólico -----	18
Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico ---	18
Aislamiento y purificación de los compuestos -----	21
-Aislamiento del éster metílico del ácido betulí- nico <u>14</u> -----	21
-Aislamiento de los ácidos ursólico <u>15</u> y oleanóli- co <u>16</u> -----	21
-Aislamiento del ácido rotúndico <u>17</u> y del 3 β -glu- cositosterol <u>18</u> -----	22
Caracterización de los compuestos aislados -----	24
-Preparación de derivados -----	24
-Acetilación -----	24
-Metilación -----	27
Reacción del compuesto <u>18</u> frente al reactivo de Molisch -----	28
Hidrólisis del β -D-glucositosterol -----	28
Determinación de constantes físicas y espectroscópicas -	28
RESULTADOS Y DISCUSION -----	30
-Identificación del ácido oleanólico <u>16</u> y del ácido ursólico <u>15</u> -----	31

	Página
-Identificación del ácido rotúndico <u>17</u> -----	44
-Identificación del betulinato de metilo <u>14</u> -----	57
-Identificación del β -gluco- β -sitosterol <u>18</u> -----	63
RESUMEN Y CONCLUSIONES -----	68
BIBLIOGRAFIA -----	70

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Sistemas de eluyentes utilizados para cromatografía en capa fina de triterpenos del tipo oleanano, ursano y lupano -----	6
Tabla 2. Reacciones colóridas para la detección de triterpenos -----	8
Tabla 3. Sistemas de disolventes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	17
Tabla 4. Resumen del fraccionamiento vfa cromatografía en columna del extracto metanólico de <i>Exostema coulteri</i> Hook -----	20
Tabla 5. Resumen de la separación de los constituyentes de las fracciones 340-455 de la Tabla 4 -----	23
Tabla 6. Rendimiento de los compuestos aislados -----	30
Tabla 7. Constantes físicas y espectroscópicas para la mezcla de ácidos ursólico <u>15</u> y oleanólico <u>16</u> ---	31
Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido ursólico <u>15</u> y su derivado acetilado metilado <u>15a</u> -----	35

Página

Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas de la bromolactona oleanólica y del éster metílico del ácido oleanólico -----	36
Tabla 10. Constantes físicas y espectroscópicas del Diacetil rontundato -----	47
Tabla 11. Comparación de los desplazamientos químicos en RMN ¹ H de los metilos del compuesto <u>17a</u> de aquellos del ácido 3 -23-dihidroxi-urs-17-en-28-oico <u>19</u> -----	56
Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas para el betulinato de metilo -----	58
Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas del β -D-glucó- β -sitosterol <u>18</u> -----	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura base de los oleananos, ursanos y lupanos -----	4
Figura 2. Biogénesis de triterpenos del tipo escualeno, oleanano, ursano y lupano -----	9
Figura 3. Ejemplos de saikosaponinas y platicodinas ----	10
Figura 4. Glicósido principal de la Aesina -----	11
Figura 5. Estructura de la glicirricina -----	12
Figura 6. Separación del ácido ursólico y oleanólico mediante la formación de la bromolactona oleanólica -----	34
Figura 7. Estructura del ácido rotúndico <u>17</u> y de su derivado diacetilado <u>17a</u> -----	46
Figura 8. Patrón de fragmentación del diacetil rotundato--	55
Figura 9. Estructura del betulinato de metilo -----	62
Figura 10. Estructura del β -D-glucó- β -sitosterol <u>18</u> -----	62

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Proceso seguido para determinar la presencia de alcaloides en <i>Exostema coulteri</i> Hook -----	16
Esquema 2. Extracción del <i>Exostema coulteri</i> Hook -----	19
Esquema 3. Separación de los derivados acetilados a partir del crudo de la reacción -----	25 .

LISTA DE ABREVIACIONES

CDCl_3:	cloroformo deuterado
d:	doblete
dd:	doble de dobles
D_2O:	agua deuterada
EMIE:	Espectro de masas obtenido por impacto electrónico
Fig:	Figura
Hz:	Hertz
IR:	Infrarrojo
J:	constante de acoplamiento
MHz:	Mega Hertz
pf:	punto de fusión
ppm:	partes por millón
RMN^1H:	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s:	singulete
t:	triplete
TMS:	tetrametilsilano
UV:	Ultravioleta
δ:	delta
Ac:	acetato
Ra:	reactivo analítico
TNM:	Trinitrometano
$\text{DMSO}-d_6$:	Dimetil sulfóxido deuterado

LISTA DE ESPECTROS

	Página
E-1. Espectro IR de la mezcla <u>16</u> y <u>15</u> -----	37
E-2. Espectro de RMN ¹ H de <u>16</u> y <u>15</u> -----	38
E-3. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>16a</u> -----	39
E-4. Espectro IR del compuesto <u>16b</u> -----	40
E-5. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>16c</u> -----	41
E-6. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>15</u> -----	42
E-7. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>15b</u> -----	43
E-8. Espectro IR del compuesto <u>17</u> -----	45
E-9. Espectro UV del compuesto <u>17a</u> -----	48
E-10. Espectro IR del compuesto <u>17a</u> -----	49
E-11. Espectro de masas del compuesto <u>17a</u> -----	50
E-12. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>17a</u> -----	52
E-13. Espectro IR del compuesto <u>14</u> -----	59
E-14. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>14</u> -----	61

	Página
E-15. Espectro IR del compuesto <u>18</u> -----	65
E-16. Espectro IR del compuesto <u>18b</u> -----	66
E-17. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>18a</u> -----	67

INTRODUCCION

1. Generalidades de la *Exostema coulteri* Hook.

La familia Rubiaceae fundamentalmente distribuida en las zonas tropicales, esta constituida aproximadamente por unas 700 especies agrupadas en unas 34 tribus, 500 géneros y 5 subfamilias (Verdcourt, 1965, 1976). En el caso particular de México se consiguen numerosas especies en gran parte del territorio, y algunas son endémicas. Es de hacer notar que de estas especies muchas presentan problemas de índole taxonómico (Standley, 1975; Aiello, 1979; Lorence, 1986).

En general estas plantas, plantean interesantes investigaciones desde el punto de vista químico; por una parte, debido a que muchas son apreciadas como remedios populares (Lozoya, 1982; Martínez, 1969; Aiello, 1979; Bye, 1986; Paris, 1960 *inter alia*) y por la otra, debido a que la información en cuanto al tipo y diversidad de los metabolitos secundarios presentes en las mismas podrían usarse como caracteres taxonómicos aunque, claro esta no determinantes en ningún caso. Sin embargo, muy pocas especies mexicanas han sido estudiadas fitoquímicamente.

La *Exostema coulteri* representa no solo una de las especies de la familia endémica de México, sino también una especie cuya clasificación se encuentra actualmente en proceso de revisión (Lorence, 1986). Se le consigue principalmente en el estado de Hidalgo y, Standley en su tratado de la flora de Norteamérica hace una descrip

ción detallada de la planta (Standley, 1975). Por mucho tiempo y hasta la fecha, la planta ha estado clasificada dentro del género *Exostema* que según algunos autores modernos constituye un género artificial y necesita una profunda revisión taxonómica (Aiello, 1979).

Desde el punto de vista de la medicina popular no existe información alguna del uso de la *Exostema coulteri*; sin embargo, otras especies del mismo género son muy apreciadas como remedios empíricos. Así tenemos que la *E. mexicanum* Gray y la *E. caribaeum* (Jacq) R. et Sh son ampliamente utilizados en medicina tradicional como sucedáneos de la quina en muchas regiones americanas (Roig, 1974; Martínez, del Campo 1906; Aiello, 1979; Monache, 1984 *inter alia*).

Fitoquímicamente no se ha descrito ningún trabajo sobre esta Rubiaceae; sin embargo, la especie relacionada *E. caribaeum* es rica en fenilcoumarinas (Sánchez Viesca, 1969; Calzada, 1987; Mata *et al*, 1987).

2. Fitoquímica general de la Familia Rubiaceae.

Además de las fenilcoumarinas (Monache *et al*, 1984, Reher *et al*, 1983, Reher *et al*, 1984, Mata *et al*, 1987) en la familia Rubiaceae se han descrito otros tipos de metabolitos secundarios tales como: antraquinonas (Adesogau, 1973, Hagnauer, 1973), Flavonoides (Wilson *et al*, 1984; Harborne, 1975, 1982), coumarinas sim-

ples (Hegnauer, 1973), compuestos aromáticos simples (Hegnauer, 1973), xantinas, taninos, esteroides (Hegnauer, 1973), alcaloides (Hemingway *et al*, 1980; Parry *et al*, 1978; Cordell, 1980; Zalacain *et al*, 1982; *inter alia*) y terpenoides (Hegnauer, 1973; Koike *et al*, 1980; Sticher, 1976; Bock, 1976, Ducroix, 1975; Reguero *et al*, 1987; Vitagliana, 1970; Das *et al*, 1983; Pant, 1978 *inter alia*).

Entre los terpenoides más abundantes se encuentran los mono-terpenoides de tipo iridoide y secoiridoide y, los triterpenoides pentacíclicos de las clases del ursano, oleanano, lupano y friedelano (Pant *et al*, 1979; Das *et al*, 1983). También se ha reportado; aunque con menor frecuencia triterpenos tetracíclicos del tipo cucurbitano (Rios y Camacho, 1987, Reguero *et al*, 1987).

3. Generalidades sobre triterpenos pentacíclicos de los tipos ursano, oleanano y lupano.

Los triterpenoides en general son metabolitos secundarios cuyo esqueleto básico está constituido por 30 átomos de carbono. Como se puede observar en la Figura 1, las estructuras de los oleananos, ursanos y lupanos son relativamente complejas. La mayoría de estos compuestos son alcoholes, cetonas, aldehídos ó ácidos. En algunos casos otros grupos funcionales pueden estar presentes.

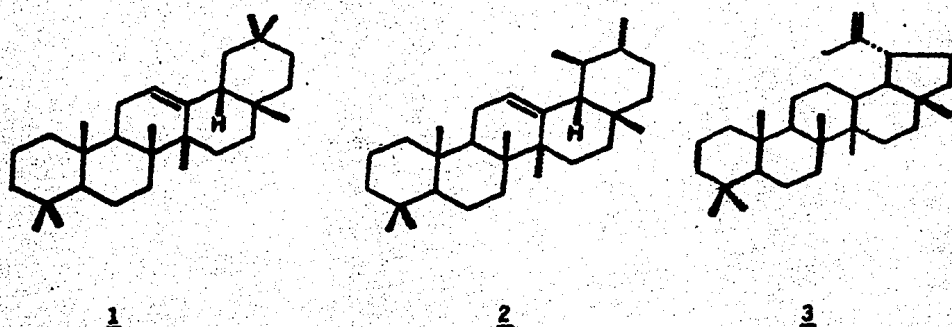


Figura 1. Estructuras base de los oleananos, ursanos y lupanos.

En relación a su distribución en la naturaleza, se puede decir que los oleananos, ursanos o lupanos no son característicos de familia alguna; y que casi todas las familias del reino vegetal contienen algún triterpeno de estos tipos. Recientemente se han publicado dos revisiones acerca de nuevos triterpenos de estos tipos y de otros de origen vegetal (Pant, *et al*, 1979; Das *et al*, 1983).

En general están presentes en las hojas, frutos y/o resinas de las cortezas de los árboles. En cualquier caso pueden encontrarse en forma libre o formando combinaciones glicosídicas (saponinas) (Adesina, 1985; Barua *et al*, 1986 *inter alia*).

Generalmente son sólidos cristalinos, incoloros de elevados

puntos de fusión y ópticamente activos.

Para obtenerlos a partir de sus fuentes naturales generalmente el tejido vegetal es desengrasado y luego extraído con metanol, acetona o acetato de etilo (Pereda Miranda, 1986; Adesina, 1985; Harborne, 1984; Robinson, 1983 *inter alia*). Posteriormente son separados de otros constituyentes presentes en los extractos fundamentalmente por cromatografía en columna sobre sílica gel ó alumina o, por métodos químicos. Para la separación de los constituyentes individuales, casi todos los tipos de triterpenoides se separan mediante procedimientos similares, basados principalmente en cromatografía en columna abierta, CCF ó GLC. La cromatografía en capa fina (TLC) se hace usualmente en capas de sílica gel impregnadas o no con AgNO_3 y utilizando diversos sistemas de eluyentes. Ejemplos de los mismos se indican en la Tabla 1. Las placas impregnadas con AgNO_3 resultan particularmente útiles cuando se desean separar triterpenos con variable número de insaturaciones.

Para las separaciones en cromatografía de gases se usan frecuentemente como fases líquidas metilsiloxano, succinato de dietilenglicol o SE-30 y como soporte sólido se emplea chromosorb W. (Harborne, 1984, Das *et al*, 1983). Se requieren relativamente altas temperaturas y cuando la mezcla a separar contiene trihidroxitriterpenos se requiere formar derivados del tipo trimetilsilil éter, a fin de obtener buena resolución. Igualmente en ca-

Tabla 1. Sistemas de eluyentes utilizados para cromatografía en capa fina de triterpenos del tipo oleanano, ursano y lupano.

SOLVENTES

Eter de petróleo (100-200°C)-dicloroetileno-ácido acético
(50 + 50 + 0.7)

Tolueno-acetona-ácido acético (100 + 3 + 0.07)

Carbón tetrachloride-éter de petróleo (70-80°C)-ácido acético
(66 + 33 + 0.07)

Eter de petróleo (100-120°C)-etil formato-ácido fórmico
(93 + 7 + 0.7)

Diisopropil éter-acetona (75 + 30)

Eter de petróleo-acetato de etilo (95 + 5)

Eter de petróleo-éter (90 + 10)

Eter de petróleo-éter (50 + 50)

Eter dietílico

Benceno

Benceno-éter (60 + 40)

Eter-benceno (80 + 20)

Benceno-cloroformo 90 + 10)

Benceno-cloroformo-metanol (43 + 43 + 13)

Benceno acetato de etilo (70 + 30)

Diisopropil-éter-metanol (95:5)

Diisopropil-éter-metanol (90:10)

Diisopropil éter

Diisopropil éter-acetona (95 + 5)

Diisopropil éter-acetona (75 + 25)

Cloroformo

Cloroformo-acetato de etilo (80 + 20)

Cloroformo-acetato de etilo (80 + 20)

Cloroformo-metanol (90 + 9)

Cloroformo-metanol (60 + 40

y otras mezclas

Cloroformo-acetona (84 + 14)

Cloroformo-acetona (84 + 14)

Cloroformo-etanol (95 + 5)

Varios solventes

n-hexano-acetona (78 + 13) o

CH₂Cl₂-acetona (75 + 25)

ses de mezclas de ácido ursólico y oleanólico o congéneres, estos pueden ser separados satisfactoriamente bajo la forma de sus ésteres metílicos (Das *et al*, 1983).

La cromatografía líquida de alta presión se emplea también para la separación de triterpenos y su mayor ventaja es que no requiere de derivatización (Smith *et al*, 1980; Sakiya *et al*, 1979; Das *et al*, 1983 *inter alia*).

Además de los métodos cromatográficos también se han descrito métodos químicos para la separación de este tipo de constituyentes, por ejemplo, recientemente se han separado ursanos y oleananos mediante la formación de derivados bromados y clorados (Lewis *et al*, 1983; T.K. Radzan *et al*, 1982; Bannon *et al*, 1975). Una vez separados los triterpenos son identificados por métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN, EM), difracción de rayos X y por métodos químicos.

Para la detección de triterpenos se han descrito muchas reacciones coloridas, algunas de ellas se resumen en la Tabla 2.

Biogénicamente estos triterpenos se originan por la ruta del acetato mevalonato a partir del epoxiesqualeno (4) como se indica en la Figura 2.

Tabla 2. Reacciones colóridas para la detección de triterpenos.

Reactivo	Composición	Color observado	Referencia
Lieberman-Burchard	Anhidrido acético CHCl_3 , H_2SO_4	Verde ó naranja	Dominguez, 1974
Rosenthaler	Vainillina al 1% en etanol HCl ó H_2SO_4	Violeta	Robinson, 1983
Noller	Cloruro de tionilo conteniendo 0.1% de tetracloruro de estannico ó FeCl_3 ó SbCl_3 anhidro	Cambia de color solución original	Harborne, 1984
Salkowski	1 ml CHCl_3 1 ml H_2SO_4	Amarillo ó rojo	Robinson, 1983
TNM	Solución cloro- fórmica al 10% de trinitrometano	Amarillo ó rojo	Dominguez, 1974 Harborne, 1984

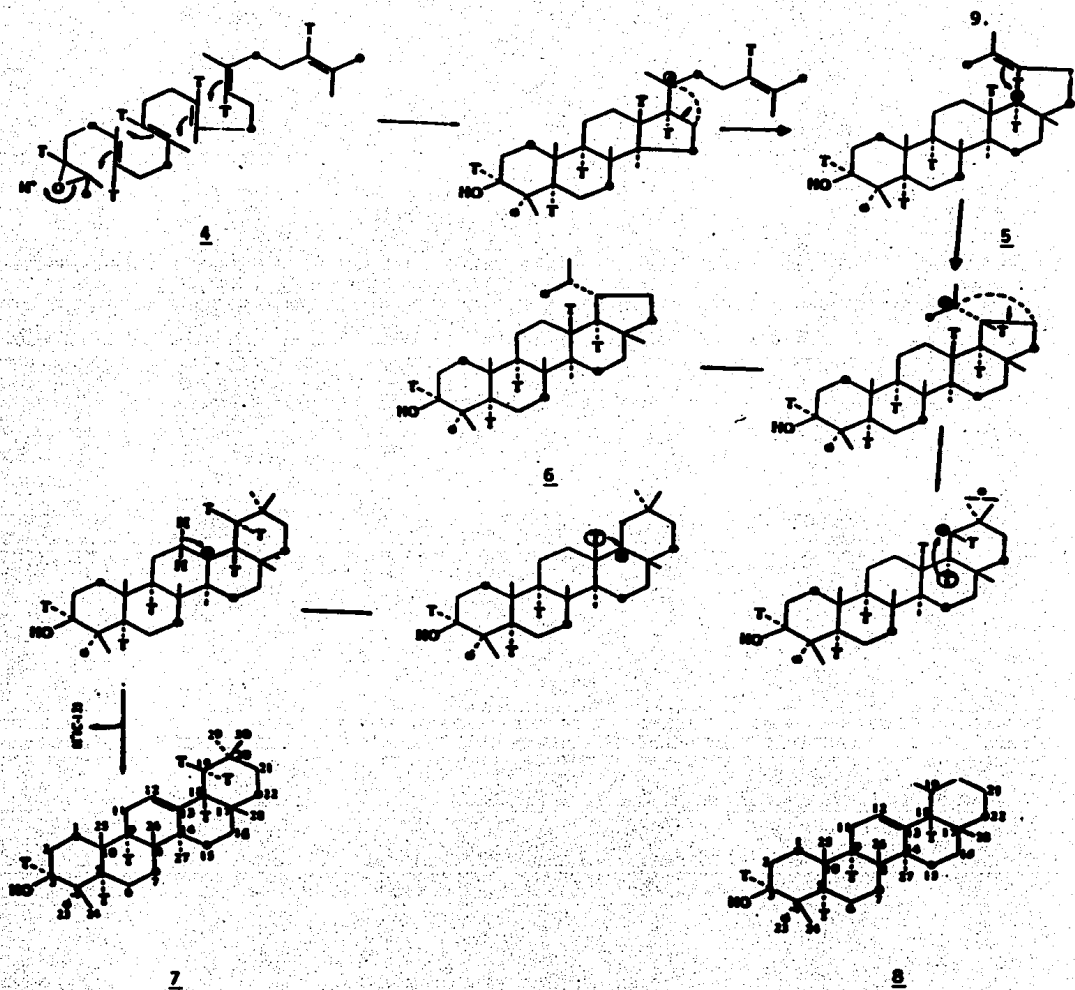


Figura 2. Biogénesis de los triterpenos pentacíclicos de los tipos oleanano, ursano y lupano.

Desde el punto de vista medicinal muchos oleananos son de importancia farmacológica. Quizas de estos compuestos los más investigados son las saponinas de la Umbeliferae, *Bupleurum falcatum* L y de la Campanulaceae *Platycodon grandiflorum* DC. Ambas plantas son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional china, la primera contiene las saikosaponinas y la segunda las platycodinas.

Tanto las saikosaponinas como las platycodinas poseen actividad antiinflamatoria y algunos ejemplos de estos compuestos se ilustran en la Figura 3 (Sticher, 1976).

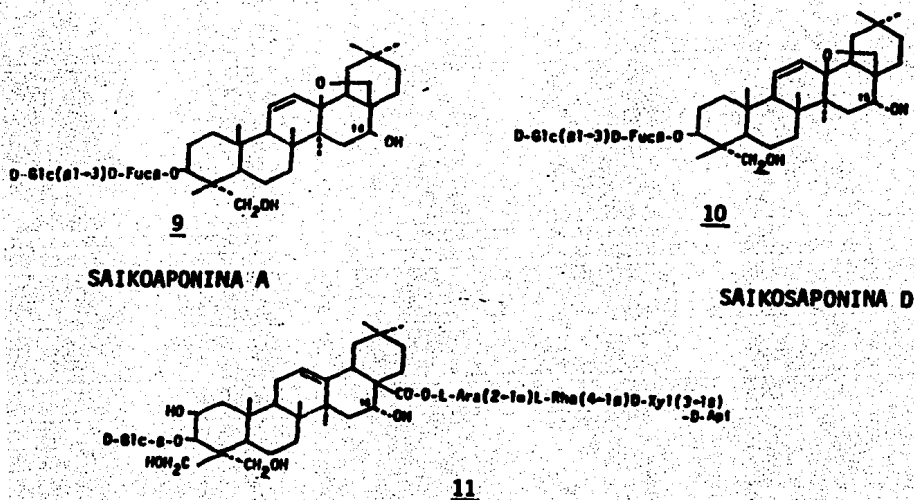


Figura 3. Ejemplos de saikosaponinas y platycodinas.

Otros compuestos de importancia están presentes en la "Aesina" que es una mezcla de saponinas triterpénicas del tipo oleaneno. Se aísla de las semillas de *Aesculus hippocastanum* L. (Hippocastanaceae) y se usa clínicamente como antiinflamatorio. La estructura del principal glicósido de la mezcla se ilustra en la Figura 4 (Sticher, 1976).

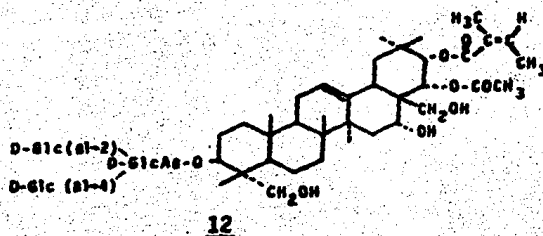


Figura 4. Glicósido principal de la Aesina.

También la glicirricina, presente en varias especies del género *Glycyrrhiza* (Leguminosae), cura úlceras gástricas inducidas experimentalmente y posee actividades hipocolesterolemiantes y antiinflamatorias. La estructura de esta saponina se ilustra en la Figura 5.

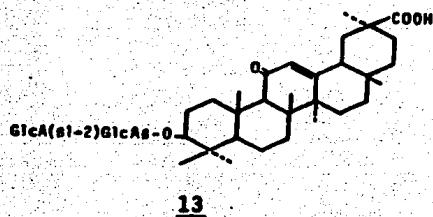


Figura 5. Estructura de la glicirricina.

2. Objetivos.

2.1 Objetivo general.

Con la finalidad de proseguir un estudio sistemático de especies mexicanas de los géneros Coutarea y Exostema (Rubiaceae) se considero conveniente analizar desde el punto de vista químico la *Exostema coulteri* Hook. Como se indico previamente muchas especies del género son ampliamente usadas en medicina tradicional y otras como la *E. coulteri* presentan problemas de índole taxonómico, en consecuencia los resultados que derivasen de la investigación propuesta podrían, por una parte, representar una evidencia taxonómica adicional, aunque no determinante, para ayudar a la resolución de algunos de los problemas existentes en este género artificial. Por la otra, sería factible, sobre consideraciones quimiotaxonómicas, aunque dudosas por lo antes expuesto, encontrar al igual que en la *E. caribaeum* metabolitos secundarios con actividad biológica (Mata *et al.*, 1987).

2.2 Objetivos específicos.

- 2.2.1 Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de la *Exostema coulteri* Hook.
- 2.2.2 Determinar la presencia ó ausencia de alcaloides en partes aéreas de la planta, considerando que algunas especies de

géneros relacionados son ricos en alcaloides y que, previamente se ha reportado como dudosa presencia de los mismos en la *Exostema coulteri* Hook

- 2.2.3 Fraccionar el producto vegetal mediante los métodos adecuados.
- 2.2.4 Separar y purificar algunos de los constituyentes de las diferentes fracciones.
- 2.2.5 Identificar mediante métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos las sustancias aisladas.
- 2.2.6 Correlacionar los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a la composición química de especies relacionadas.

MATERIALES Y METODOS

3.1 Material vegetal.

La planta fue colectada en la barranca de Tolantongo, Hidalgo, el 23 de abril de 1986 y fue identificada por el Dr. David Lorence del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra se depositó en el Herbario Nacional (Voucher DL 5044). El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se molió, posteriormente en un molino de cuchillos modelo Wiley 4.

3.2 Determinación de alcaloides y triterpenos.

La determinación de alcaloides se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Harborne (Harborne, 1984) y se resume en el Esquema 1.

Como reactivos se emplearon el de Dragendorff y el de Mayer y para realizar ambas determinaciones, se disolvió una pequeña cantidad de la fase orgánica "A" en metanol; la solución resultante se acidificó mediante HCl 1N y finalmente se agregó cada uno de los reactivos. En ambos casos se utilizó un blanco y un patrón adecuado para confirmar la veracidad de las reacciones. Para la determinación de triterpenos se usó la reacción de Liebermann Burchard y para ello se trató una porción del extracto metanólico del Esquema 1 con 1 ml de anhídrido acético y gotas de H_2SO_4 concentrado.

56.6 g de corteza

42.7 g de parte aerea

Extracción con 700 ml de EtOH
vía maceración por separado

↓

Extracto etanólico concentrado

↓

Extraer con varias porciones
de 20 ml de HCl 1N

↙

Fase ácida

↘

Residuo del extracto
ó fase neutra

1. Basificar con NH_4OH
hasta pH = 9
2. Extraer con CHCl_3
varias veces

↙

Fase acuosa
básica

↘

Fase orgánica
A

1. Secar sobre SO_4Na_2 anhidro
2. Concentrar al vacío

↓

Fase orgánica "A"
concentrada

ESQUEMA 1. Proceso seguido para determinar la presencia de alcaloides en *Exostema coulteri* Hook.

3.3 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF₂₅₄, Merck). Como agente cromogénico se utilizó una solución reactivo de sulfato cárico en ácido sulfúrico concentrado (Stahl, 1969) y para lograr el desarrollo de color era necesario calentar por 2 min. a 110°C; como fase móvil se utilizaron varios sistemas de disolventes, los cuales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Sistema de disolventes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistemas de eluentes	Composición	Proporción %
I	Hexano	100%
II	Hexano:CHCl ₃	Diversas proporciones
III	CHCl ₃	100
IV	CHCl ₃ :AcOEt	Diversas proporciones
V	Acetato de etilo	100
VI	Acetato de etilo:MeOH	Diversas proporciones
VII	CHCl ₃ :MeOH	Diversas proporciones
VIII	Acetona-H ₂ O	91:10
IX	n-butanol-ACOH-H ₂ O	4:1:5
X	n-propanol-H ₂ O	8.5:15

3.4 Preparación del extracto metanólico.

2 Kg de corteza seca pulverizada de la planta se extrajeron según el procedimiento señalado en el Esquema 2.

3.5 Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico.

El total del extracto metanólico (176 g) se fracciona preliminarmente mediante una cromatografía preparativa en columna utilizando como adsorbente sílica gel (1,8715 g de sílica gel G/60 Merck 70-230 Mallas); el proceso de elución se efectuó con hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol, etanol, en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 527 fracciones de 500 ml cada una. Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas similares. En la Tabla 4 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos así como las fracciones combinadas.

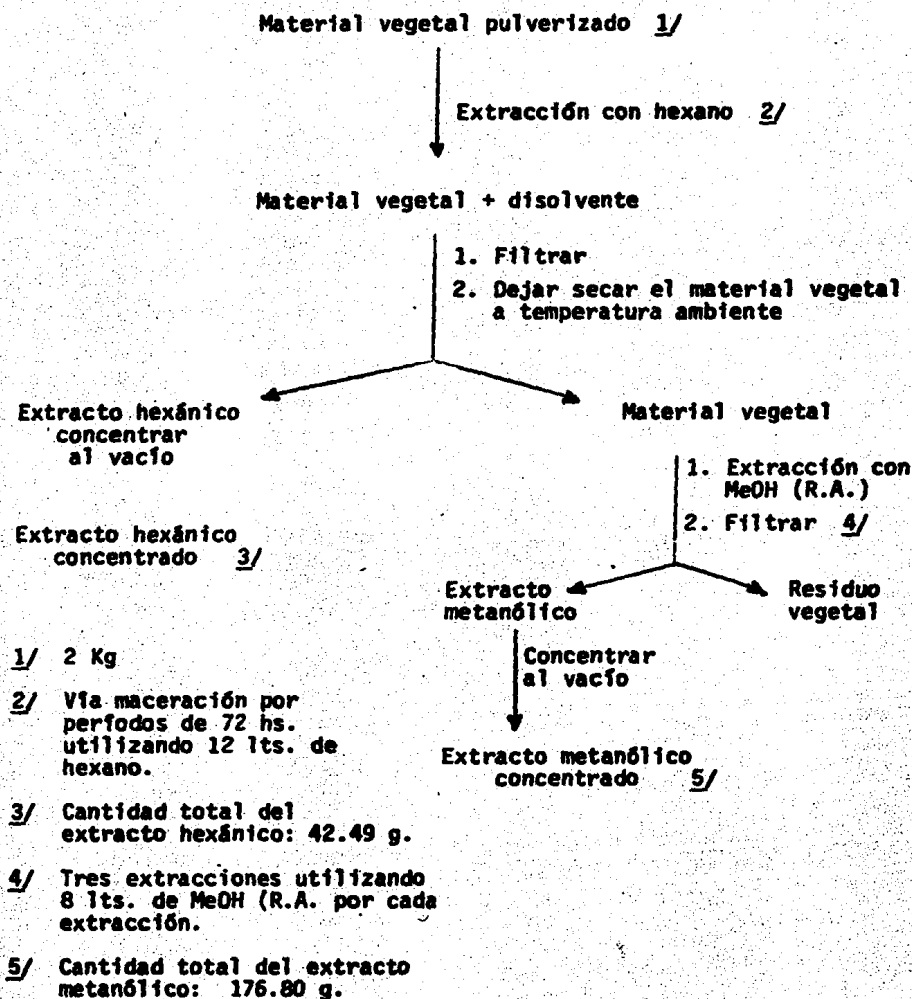
ESQUEMA 2. Extracción del *Exostema coulteri* Hook.

Tabla 4. Resumen del fraccionamiento via cromatografia en columna del extracto metanólico de *Exostema coulteri* Hook.

ELUYENTE	PROPORCION	No. DE FRAC.	FRACC. COMBIN.
Hexano-cloroformo	9:1	1- 39	1-22, 23-39
Hexano-cloroformo	8:2	40- 48	40-48
Hexano-cloroformo	100	49-108	49-102
Cloroformo	100	109-125	
Cloroformo-acetato de etilo	95:5	126-220	
Cloroformo-acetato de etilo	90:10	221-227	103-227
Cloroformo-acetato de etilo	85:15	228-307	230-255
Cloroformo-acetato de etilo	75:25	308-327	
Cloroformo-acetato de etilo	65:35	328-358	256-329
Cloroformo-acetato de etilo	50:50	359-388	
Acetato de etilo-cloroformo	60:40	389-402	330-402
Acetato de etilo-cloroformo	70:30	403-417	403-455
Acetato de etilo-cloroformo	90:10	418-472	
Acetato de etilo-cloroformo	99:1	487-492	456-492
Acetato de etilo-metanol	99:1	487-492	
Acetato de etilo-metanol	90:10	493-524	496-513
Metanol	100%	525-528	517-528

3.6 Aislamiento y purificación de los compuestos.

3.6.1 Aislamiento del éster metílico del ácido betulínico 14:

Al disolver las fracciones 103-227 de la columna original (Tabla 4) en una mezcla de hexano-metanol 8:2 cristalizaron 25 mg (0.0125%) del betulinato de metilo, pf. 205-207°C, el cual fué identificado por comparación con una muestra auténtica.

3.6.2 Aislamiento de los ácidos ursólicos 15 y oleanólico 16:

De las fracciones 230-255 de la columna original Tabla 4 se obtuvo 100 g de un polvo amorfo, pf 230-235°C. A la totalidad de este sólido disuelto en 160 ml de metanol, se le adicionaron gota a gota 10 ml de una solución de bromo (85 mg) en etanol.

La reacción se dejó a temperatura ambiente con agitación durante 2 hs. Al cabo del tiempo anterior el crudo de la reacción se concentró *in vacuo* para obtener 754 mg de un residuo sólido. El análisis cromatográfico de este producto indicó la presencia de dos compuestos mayoritarios, los cuales fueron separados mediante una cromatografía preparativa en capa fina sobre gel de sílice. Se usaron placas de 20X20 cm. y como eluyente una mezcla de CHCl_3 :Acetato de etilo 8:2. La cromatografía se realizó siguiendo las técnicas adecuadas, y al cabo de la operación fue posible la separación de 187.04 mg de la bromolactona del ácido oleanólico, 16a, pf 240-243° (metanol) y de 662 mg del ácido ursólico, pf 285-288° (MeOH).

50 mg de la bromolactona 16a posteriormente se debromaron utilizando 12.5 ml de ácido acético y 0.3 g de Zn, para ello se siguió la técnica que se indica a continuación:

Se agrego en una bola de 50 ml Pyrex las cantidades de reactivos indicados anteriormente y se reflujo durante 3 hs., usando baño maría que favoreció la reacción. Al término de la reacción el residuo se filtro; posteriormente el filtrado se trasbasó a un recipiente con agua fría dando lugar a la formación de un precipitado, el cual se lavó con varias porciones de agua destilada.

El rendimiento obtenido de ácido oleanólico fue de 15 mg. El ácido fue caracterizado bajo la forma del éster metílico correspondiente.

3.6.3 Aislamiento del ácido rotundico 17 y del 3 β -glucosítoesterol 18.

De las fracciones 330-455 de la columna original (Tabla 4) se obtuvo un residuo (4.75 g) que fue recromatografiado en 150 g de sílica gel. La elución se llevo a cabo con los siguientes disolventes hexano:acetato de etilo 9:1 y cantidades crecientes de acetato de etilo. Se recogieron un total de 505 fracciones de 50 ml cada una. Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina combinándose aquellas cromatográficamente similares. En la Tabla 5 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Tabla 5. Resumen de la separación de los constituyentes de las fracciones 340-455 de la Tabla 4.

ELUYENTE	PROPORCION	NO. DE FRAC.	FRACC. COMBIN.
Hexano-Acetato de etilo	9:1	1- 26	1-6, 7-8, 9, 10-13, 14-23
Hexano-acetato de etilo	8:2	27- 59	24-28, 29-33, 34-43, 44-55
Hexano-acetato de etilo	7:3	60-154	80-84
Hexano-acetato de etilo			56-68, 114-154
Hexano-acetato de etilo	6:4	155-186	155-261
Hexano-acetato de etilo	1:1	187-206	-
Hexano-acetato de etilo	4:6	207-229	-
Hexano-acetato de etilo	3:7	230-242	-
Hexano-acetato de etilo	2:8	243-261	-
Hexano-acetato de etilo	1:9	262-320	-
Acetato de etilo	100%	321-338	272-398
Acetato de etilo-etanol	95:5	339-357	-
Acetato de etilo-etanol	99:1	358-380	352-387
Acetato de etilo-etanol	95:50	381-440	381-472
Acetato de etilo-etanol	90:10	441-472	-
Acetato de etilo-etanol	80:20	473-499	473-505
Acetato de etilo-etanol	50:50	450-505	-

De las fracciones 80-84 eluidas con hexano-acetato de etilo 7:3 se obtuvo un polvo amorfo amarillo que luego de una recristalización en metanol origino un sólido blanquecino de pf 270-270 insoluble en CHCl_3 , $\text{CH}_3\text{-OH}$ acetato de etilo y acetona. Para facilitar el proceso de identificación el producto 17 fue acetilado por tratamiento con anhídrido-acético piridina como se indica en el punto 4.7.1.

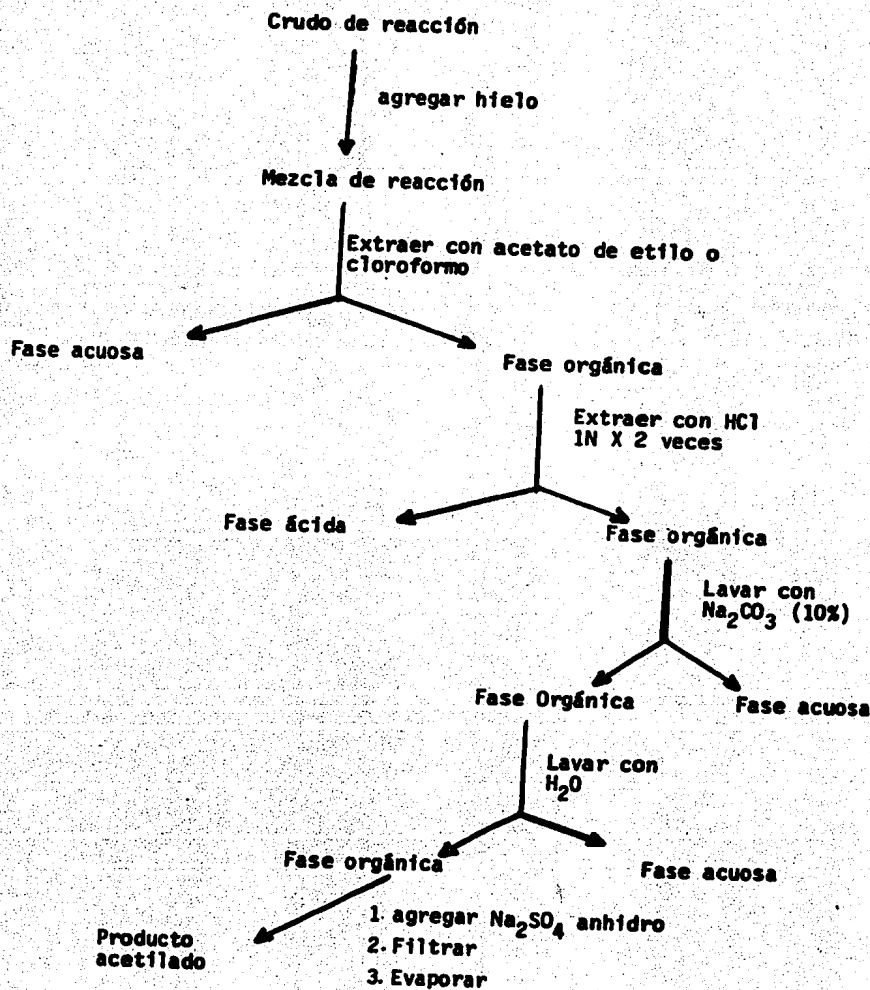
De las fracciones 276-295 eluidas con hexano-acetato de etilo 1:9 se obtuvieron 66 mg de unos cristales blancos pf. 268-270°C igualmente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos habituales. Este producto fue caracterizado como β -D-glucositolsterol por comparación con una muestra auténtica.

3.7 Caracterización de los compuestos aislados.

3.7.1 Preparación de derivados.

a) Acetilación: para formar los derivados acetilados de los productos aislados se empleo 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. Por lo general el tiempo requerido para llevar a cabo la reacción fue de 12 hs. a temperatura ambiente.

Al cabo de la reacción el producto acetilado fue obtenido siguiendo el procedimiento que se especifica en el Esquema siguiente:



Esquema 3. Separación de los derivados acetilados a partir del crudo de la reacción

Los compuestos que fueron acetilados se indican a continuación:

Compuesto	Cantidad del compuesto	Producto obtenido	Cantidad de producto obtenido	p. f.
Acido ursólico <u>15</u>	260 mg	Ac.-3-acetil-ursólico <u>15a</u>	189.6 mg	160-167
β -glucositolsterol <u>16</u>	30 mg	Tetra-acetil β -D-glucositolsterol <u>16b</u>	10 mg	107-110
Acido rotúndico <u>17</u>	31 mg	Diacetil Rotundato <u>17a</u>	27 mg	118-120
Bromolactona oleanónica <u>16a</u>	41.0 mg	Bromolactona oleanónica acetilada <u>16b</u>	29 mg	180-182

b) Metilación: Para obtener los derivados metilados de los productos aislados se utilizó una solución etérea de diazometano. Por cada 100 mg de producto a metilar se utilizó 20 ml de una solución de diazometano preparada con 4 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%, 20 ml de éter etílico y 2 g de N-nitroso-N-metil-urea. En todos los casos el producto a metilar se disolvió en 10 ml de etanol y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se indican los compuestos sometidos a metilación.

Compuesto	Cantidad de compuesto	Producto	Rendimiento	p. f.
Acido 3-acetil-ursólico <u>15a</u>	88.2 mg	éster metílico del ácido 3-acetil ursólico <u>15b</u>	50 mg	200-225°
Acido oleanólico <u>16</u>	100 mg	éster metílico del ácido oleanólico <u>16c</u>	100 mg	198-200°

3.7.2 Reacción del Compuesto 18 frente al reactivo de Molisch.

A una pequeña cantidad del compuesto, 18, disuelto en 3 ml de agua destilada, se le adicionó 1 ml de solución reactivo de α -naftol (10% en etanol), seguidamente se agregaron por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos. La coloración observada era indicativa de una prueba positiva para carbohidratos.

3.7.3 Hidrólisis del β -D-glucositolsterol.

Para efectuar la hidrólisis ácida del compuesto 18 se utilizó 30 mg del producto y 3 ml de ácido clorhídrico 1N. La mezcla de reacción se reflujo durante 1 hora. El producto de reacción 18a, se separó por filtración y posteriormente se lavó repetidamente con agua destilada. El término de la hidrólisis se verificó cromatográficamente.

3.7.4 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Jones y no están corregidos. Los espectros I.R. fueron registrados en un instrumento Nicolet FT-IR5X de un solo haz, en pastilla de KBr, o en solución de cloroformo. Los espectros de RMN¹H se determinaron en un espectrómetro FT-80 Varian utilizando como disolvente CDCl₃ y/o DMSO-d₆ y como referencia interna TMS. Los

espectros U.V. se obtuvieron en un espectrómetro de doble haz Hitachi 2205. Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D en el Instituto de Química de la UNAM.

RESULTADOS Y DISCUSION

D. El extracto metanólico de las partes aéreas de la *Exostema coulteri* Hook, luego de un fraccionamiento preliminar vía una cromatografía preparativa en columna sobre gel de sílice y posterior recromatografía en columna de alguna de las fracciones originales, se aislaron tres ácidos triterpénicos pentacíclicos, un éster metílico de un ácido triterpénico pentacíclico y un esteroi.

Los ácidos triterpénicos obtenidos fueron: el ácido ursólico 15, el ácido oleanólico 16 y el ácido rotúndico 17. El éster metílico fue caracterizado como betulinato de metilo 14 y el esteroi como el 3 β -D-glucositosterol, 18. Los rendimientos de cada uno de estos compuestos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos de los compuestos aislados.

Compuestos	Cantidad referida del extracto total en mg	% en relación a planta seca
Betulinato de metilo <u>14</u>	25.0	0.00125
Acido ursólico <u>15</u>	662.4	0.033
Acido oleanólico <u>16</u>	337.7	0.0169
β -D-glucositosterol <u>18</u>	66.0	0.0033
Acido rotúndico <u>17</u>	30.0	0.0015

3.1 Identificación del ácido oleanólico 16 y del ácido ursólico 15.

De las fracciones 230-255 de la columna de la Tabla 4 se obtuvieron 1.188 g de un sólido amorfo blanco verdoso, pf 230-235° . Las constantes físicas y espectroscópicas de este polvo se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Constantes físicas y espectroscópicas para la mezcla de ácidos ursólico 15 y oleanólico 16.

p.f.	230-233°
I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3691, 3607, 3515, 3050-2500, 2931, 2859, 1698, 1633, 1387, 1180, 1111, 1027
EMIE m/z (%)	456 (3.4), 249 (21.5), 248 (100), 234 (3.1), 207 (24), 203 (59.9), 189 (13), 133 (19)
^1H NMR 80MHz CDCl_3 -DMSO, δ	0.75 (s, 3H), 0.9 (s, 6H), 1.0 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.25 (s, 6H), 2.25 (d, J=10Hz, H-18), 2.85 (dd, J=10,6Hz, H-18), 3.2 (dd, 1H, H-3), 5.25 (t, 1H, H-12)

El análisis cromatográfico de esta sustancia sugirió que posiblemente, la misma era una mezcla de dos o más constituyentes ya que al revelar las cromatoplasas se observaban en los diferentes sistemas una mancha alargada. El análisis espectroscópico global confirmó que efectivamente el sólido amorfo estaba constituido por una mezcla de ácido triterpénicos de los tipos Δ^{12} oleaneno y Δ^{12} urseno, de acuerdo con las siguientes observaciones:

a) El espectro IR (Espectro 1) presentó bandas de absorción a 3443 y 3423 cm^{-1} (OH-libres), $3050\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$ (OH- de ácido carboxílico), 1693 cm^{-1} (carbonilo de ácido) y 1633 cm^{-1} (olefina trisustituida).

b) El espectro de masas (Tabla 1) presentó un ión molecular a m/z 456 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$) y un pico base a m/z 248. Este último fragmento es característico de triterpenos pentacíclicos del tipo Δ^{12} oleanenos o Δ^{12} ursenos y resulta de una ruptura del tipo Retro-Diels Alder (Okungaya, 1981).

c) El espectro de RMN¹H (Espectro 2) presentó señales para:

c.1 Un protón vinílico trisustituido a δ 5.25.

c.2 Un protón base de alcohol secundario a δ 3.17 (m).

c.3 Dos protones alílicos, uno aparecía como doblete de doblete ($J=10,6\text{Hz}$) a δ 2.85 y el otro como doblete ($J=10\text{Hz}$) a δ 2.25. El primero es característico del H-18 de un oleaneno y el segundo del H-18 de un urseno (Cheung *et al.*, 1969). Esta información fue quizás la más importante para determinar la presencia de una mez-

cia en el producto.

c.4 Varios metilos en la zona comprendida entre δ 0.75-1.25

Para resolver la mezcla de los ácidos en sus componentes individuales se decidió transformar el Δ^{12} oleaneno presente en la bromolactona correspondiente (Radzan *et al*, 1982; Lewis *et al*, 1983), tal como se indicó en la sección experimental. Posteriormente, la bromolactona resultante se separo del urseno cromatográficamente. Finalmente la bromolactona separada se transformó en el ácido correspondiente, 16 por tratamiento con Zn en medio ácido. La bromolactona 16a y su derivado acetilado 16b se caracterizaron como la bromolactona oleanólica y la acetilbromolactona oleanólica respectivamente. por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los previamente descritos en la literatura (Radzan *et al*, 1982).

El ácido fue caracterizado como ácido oleanólico bajo la forma de su éster metílico 16c por comparación con una muestra auténtica. Igualmente el ácido ursólico 15 se identificó como tal siguiendo los métodos clásicos (IR, RMN¹H, CCF, pf.) por comparación con una muestra original del ácido libre y del derivado acetilado y metilado, 15b. Las reacciones que permitieron la obtención del ácido oleanólico y del ácido ursólico en forma pura se señalan en la Figura 6 y las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos y sus derivados se indican en las Tablas 8 y 9.

Los espectros correspondientes se encuentran ilustrados también en las páginas siguientes.

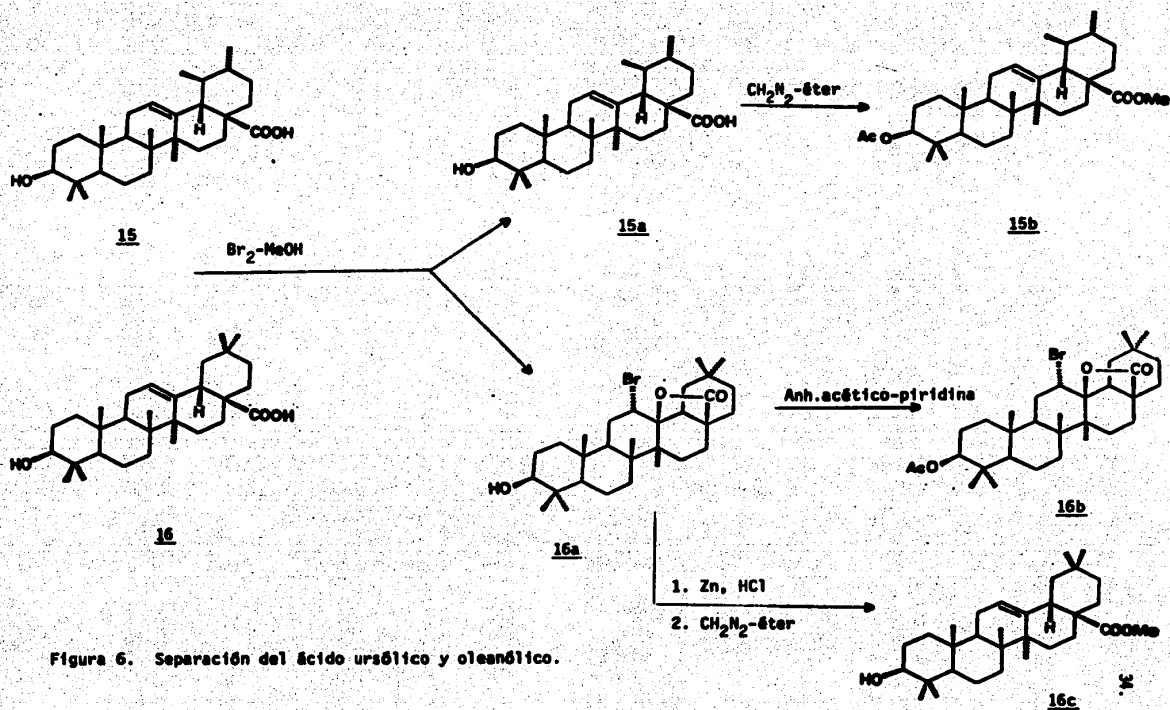


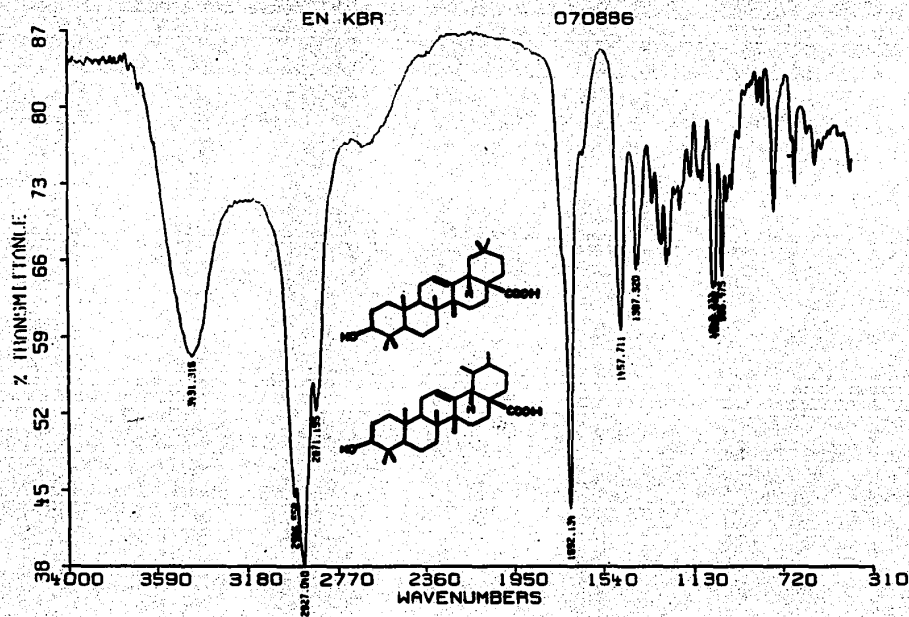
Figura 6. Separación del ácido ursólico y oleanólico.

Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido ursólico 15 y su derivado acetilado metilado 15b.

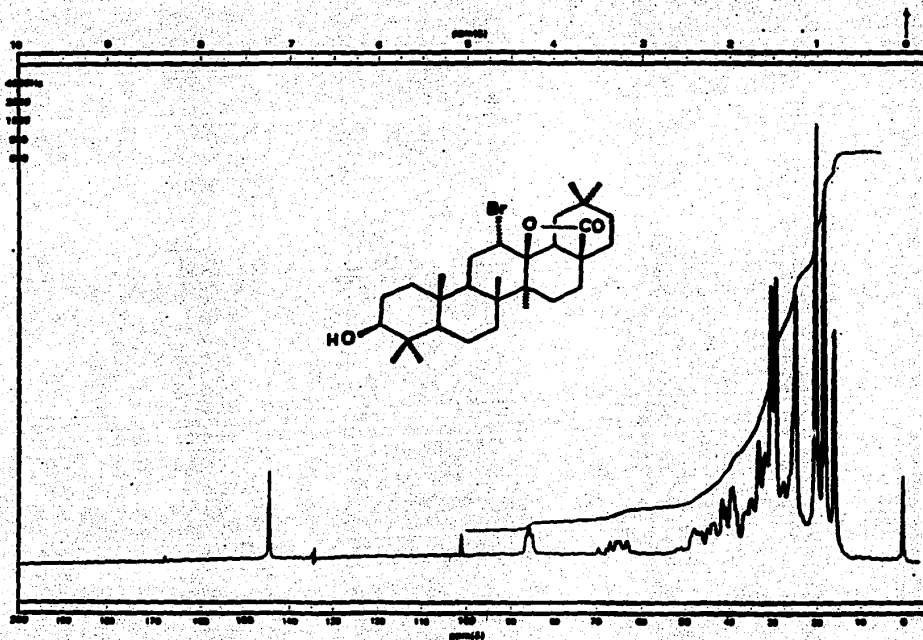
	<u>15</u>	<u>15b</u>
p. f.		
I.R. ν_{max} KBr cm^{-1}	3417, 3156, 2966, 2927, 2871, 1692, 1457, 1387, 1286, 1239, 1030, 996	2990, 2950, 2880, 1742, 1738, 1465, 1380, 1250
EMIE m/z (%)	456 (M^+ , 1.9), 447 (0.2), 248 (100, 207 (21.1), 203, (28.8), 133 (32.8)	512 (M^+ , 1.2), 498 (0.7), 452 (3), 262 (92.7), 203 (68), 133 (33.5) 43 (100)
RMN^1H 80MHz, CDCl_3 -DMSO	0.7 (s, 3H, H-26), 0.8 (s, 6H, H-29), H-24), 0.91 (s, 3H, H-25), 0.98 (s, 6H, H-23), 1.1 (s, 3H, H-27), 2.25 (d, J=10Hz, 1H, H-18), 3.2 (dd, J=10,7Hz, 1H, H-3), 4.3 (sa, 1H, OH), 5.20 (t, 1H, H-12).	0.75 (s, 3H, H-26), 0.85 (s, 6H, H-29, H-24), 0.90 (s, 3H, H-25), 0.95 (s, 3H, H-23), 1.07 (s, 3H, H- 27), 2.04 (s, 3H, CH_3 -C-), 2.20 (d, J=11Hz, 1H, H-18), 3.58 (s, 3H, OCH_3), 4.45 (dd, J=10,7Hz, 1H, H-3), 5.23 (t, 1H, H-12)

Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas de bromolactona oleanó-
lica y del éster metílico del ácido oleanólico.

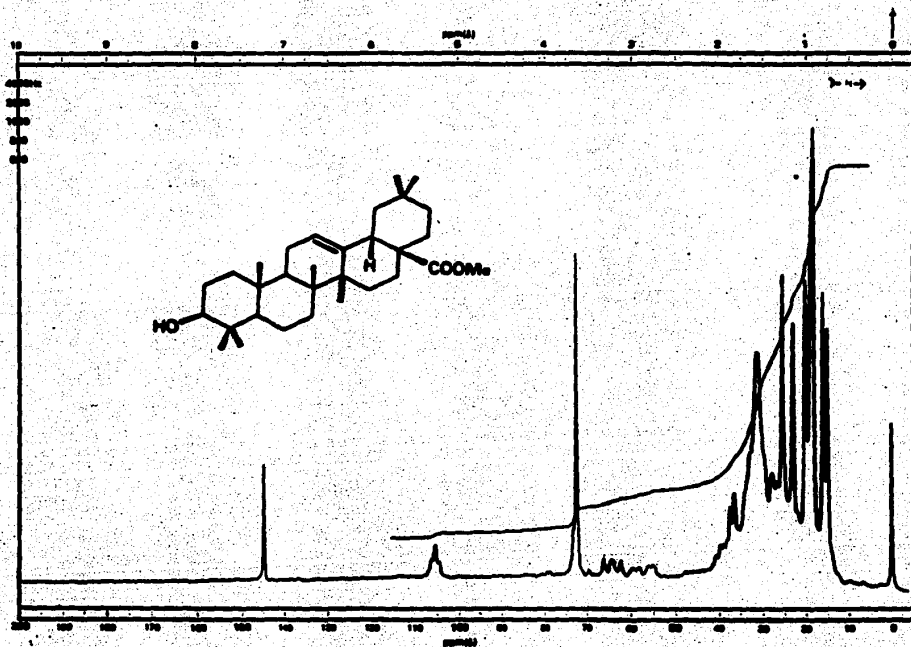
p. f.	225°C	198-200°C
I.R. KBr max cm^{-1}	3380, 2930, 2860, 1770, 1460, 1380, 1310, 1255, 1240, 1215, 1165, 1135, 1105, 1075, 1025, 925, 905, 875	3461, 3436, 3984, 3361, 2928, 2859, 1727, 1640, 1462, 1385, 1200, 1190, 1163, 1032, 996
EMIE m/z (%)	536 (1.4 M^+), 535, (0.7), 534 (1.5), 207 (100), 203 (48.9), 81.2 (50.5), 43 (67.7)	470 ($\text{M}^+ \text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$), 117 455 (M-15, 1.35), 411 (M-59, 5.0), 410 (M-60, 4.3), 262 (M-208), 207 (16.2), 203 (100), 189 (26), 133 (25)
RMN^1H 80MHz, CDCl_3 -DMSO (ppm)	0.74 (s, 3H, H-26), 0.90 (s, 6H, H-24, H-25), 1.0 (s, 3H, H-23), 1.23 (s, 3H, H-27), 1.45 (s, 3H, H-29), 3.3 (m, 1H), 1.50 (s, 3H, H-30), 4.30 (m, 1H, H-12a)	0.75 (s, 3H, H-26), 0.8 (s, 3H, H-24), 0.9 (s, 6H, H-25, H-29), 1.0 (s, 3H, H-30), 1.15 (s, 3H, H-23), 1.25 (s, 3H, H-27), 2.85 (dd, 1H, H-8), 3.2 (dd, 1H, H-3), 5.25 (t, 1H, H-12).



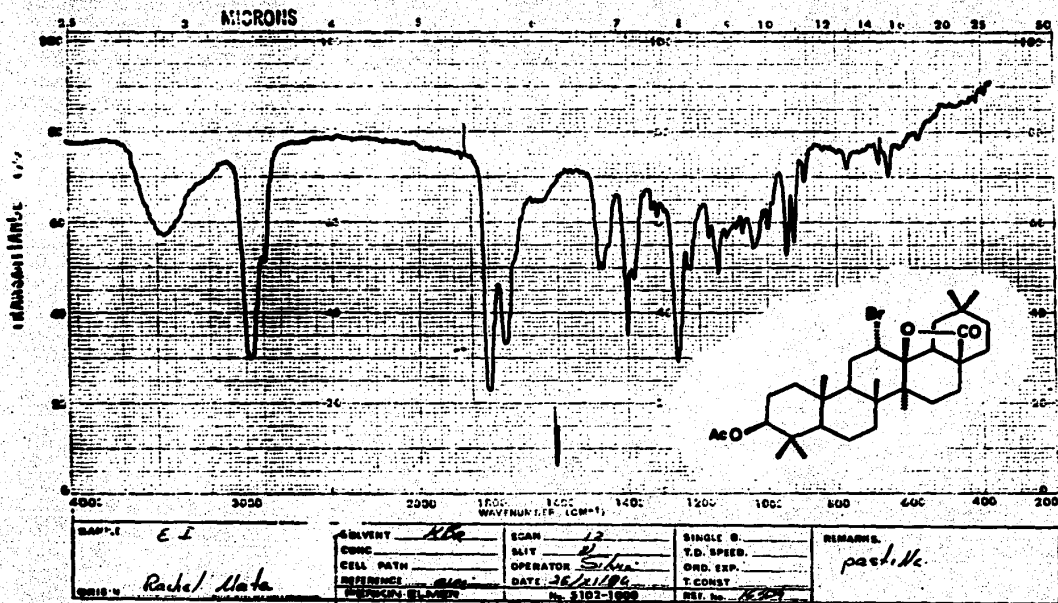
E-1. Espectro IR de la mezcla 16 y 15.



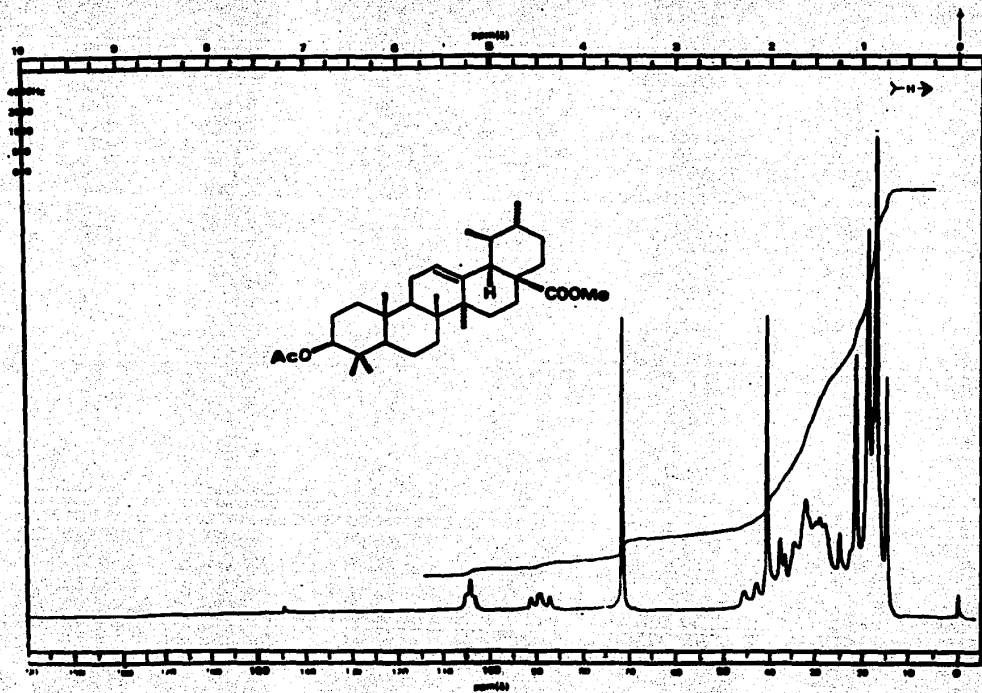
E-3. Espectro de RMN¹H del compuesto **16a**.



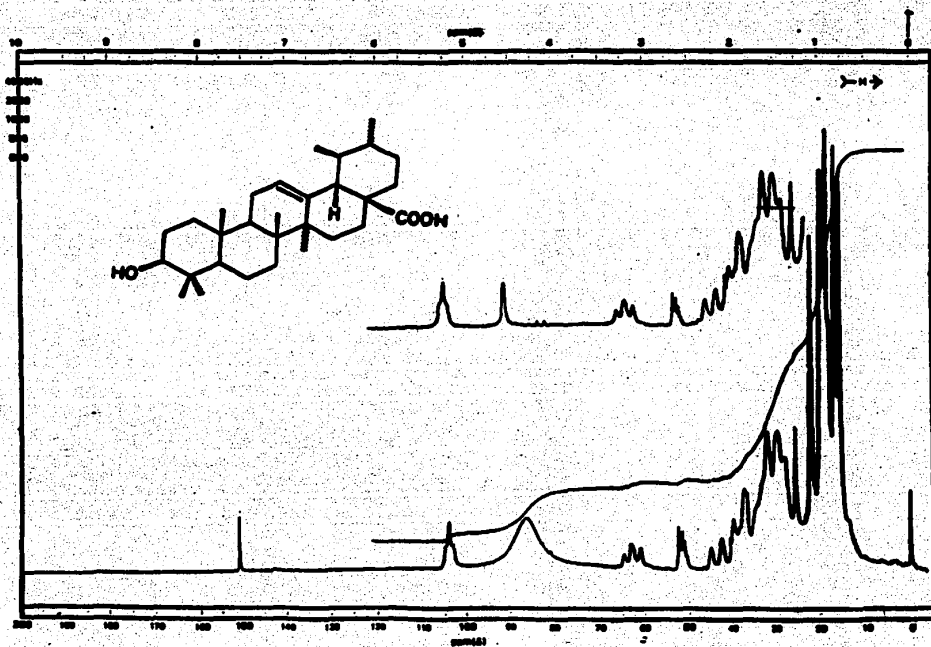
E-5. Espectro de RMN^1H del compuesto 16c.



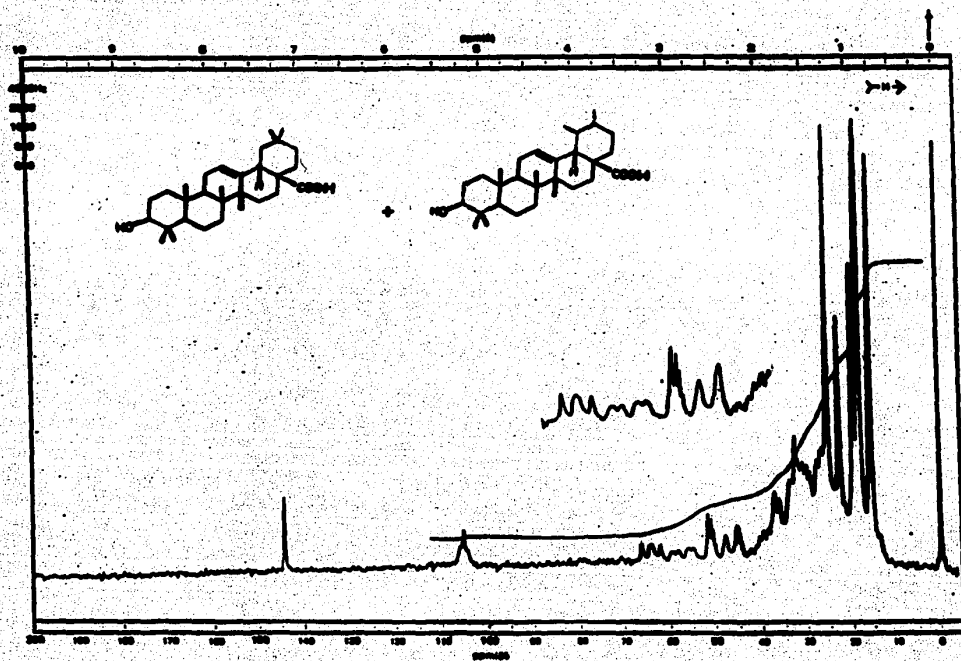
E-4. Espectro IR del compuesto 16b.



E-7. Espectro de ^1H del compuesto 15b.



E-6. Espectro DE RMN^1H del compuesto 15.



E-2. Espectro de ^1H RMN de 14 y 15.

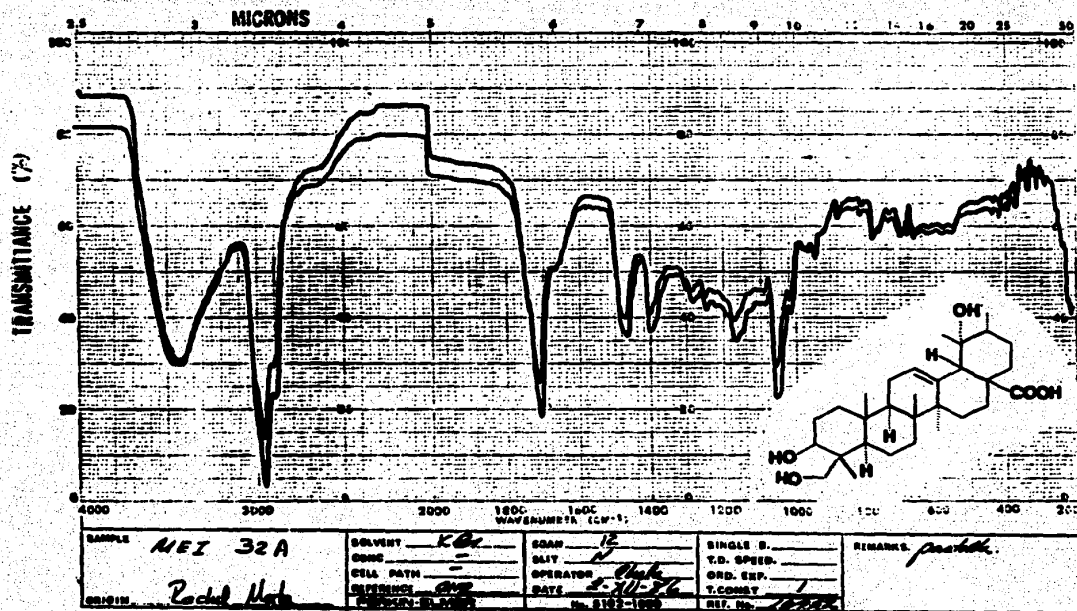
Es de hacer notar, que de usarse un exceso de solución de bromo (Br_2) en metanol para preparar la bromolactona se corre el riesgo de obtener el éster metílico del ácido ursólico como sub-producto. Por este motivo, es recomendable realizar ensayos preliminares para determinar, de acuerdo a la cantidad de oleaneno presente, la cantidad necesaria de la solución de Br_2 que debe agregarse.

3.2 Identificación del ácido rotúndico 17,

De las fracciones 80-84 de la columna de la Tabla 5, se obtuvieron 30 mg de un sólido blanco grisáceo $\text{pf} = 270-271^\circ$ insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos habituales.

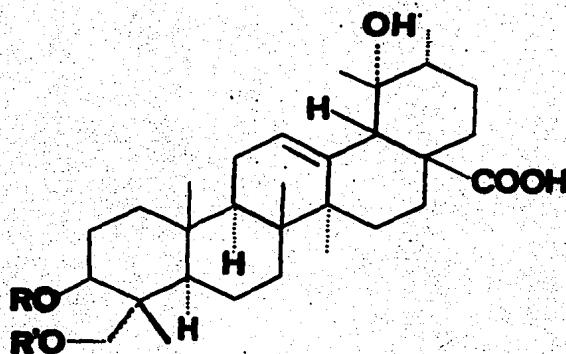
Su espectro IR (Espectro 8) así como una reacción positiva frente al reactivo de Lieberman-Burchard sugirieron *a priori* que el compuesto era un ácido triterpénico. Debido a la alta insolubilidad de esta sustancia y considerando que el compuesto era también de naturaleza alcohólica, a juzgar por las bandas de absorción en el IR a 3450 y 3389 cm^{-1} , se decidió caracterizarlo bajo la forma de su derivado acetilado. Es de hacer notar además que en el compuesto original el único tipo de carbonilo observado en el IR era para ácido (1695 cm^{-1}).

El análisis espectroscópico global del derivado acetilado 17a permitió caracterizar a la sustancia obtenida de las fracciones 80-84 como el ácido rotúndico 17. Las constantes físicas y



E-8. Espectro IR del compuesto 17.

espectroscópicas del derivado 17a se resumen en la Tabla 10 y las estructuras de los compuestos se indican en la Figura 7.



R = R' = H ácido rotúndico 17
 R = R' = Ac ácido diacetil rotúndico

Figura 7. Estructura del ácido rotúndico 17 y de su derivado diacetilado 17a.

Los resultados parciales que permitieron la conclusión anterior fueron los siguientes:

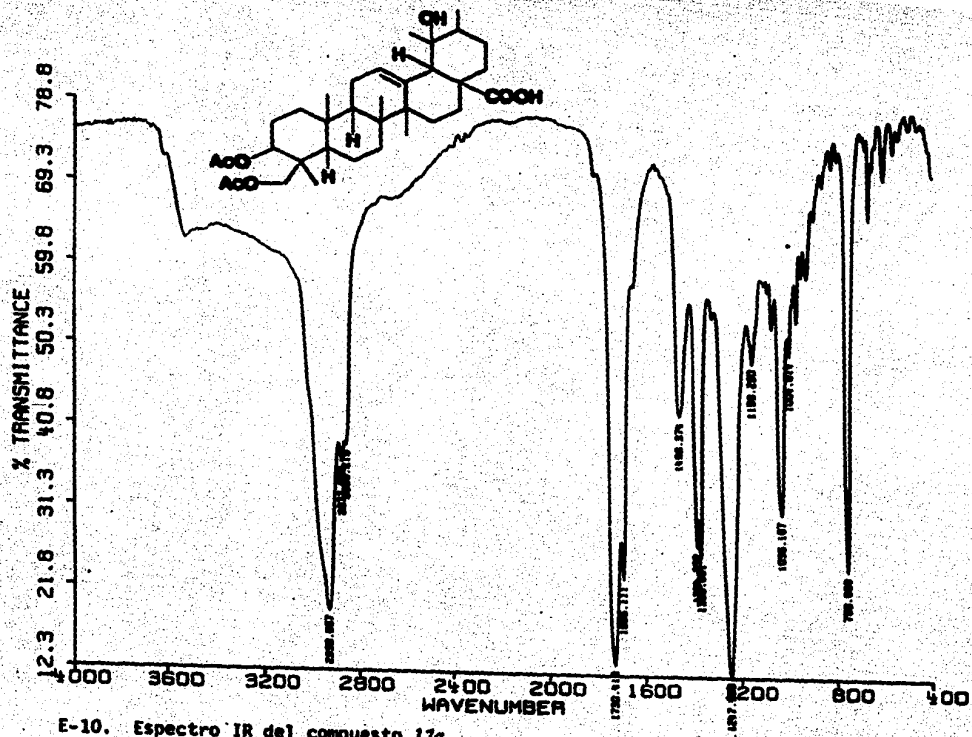
a) El espectro U.V. (Espectro 9) del derivado acetilado presenta solo absorción terminal.

b) El espectro I.R. (Espectro 10) mostró bandas características a 3450 cm^{-1} (OH), 1735 cm^{-1} ($\text{CH}_3\text{-C}(=\text{O})\text{-}$), 1695 cm^{-1} ($\text{-C}(=\text{O})\text{-OH}$), 1640 cm^{-1} (doble ligadura trisustituída), y 1036 cm^{-1} (OH terciario).

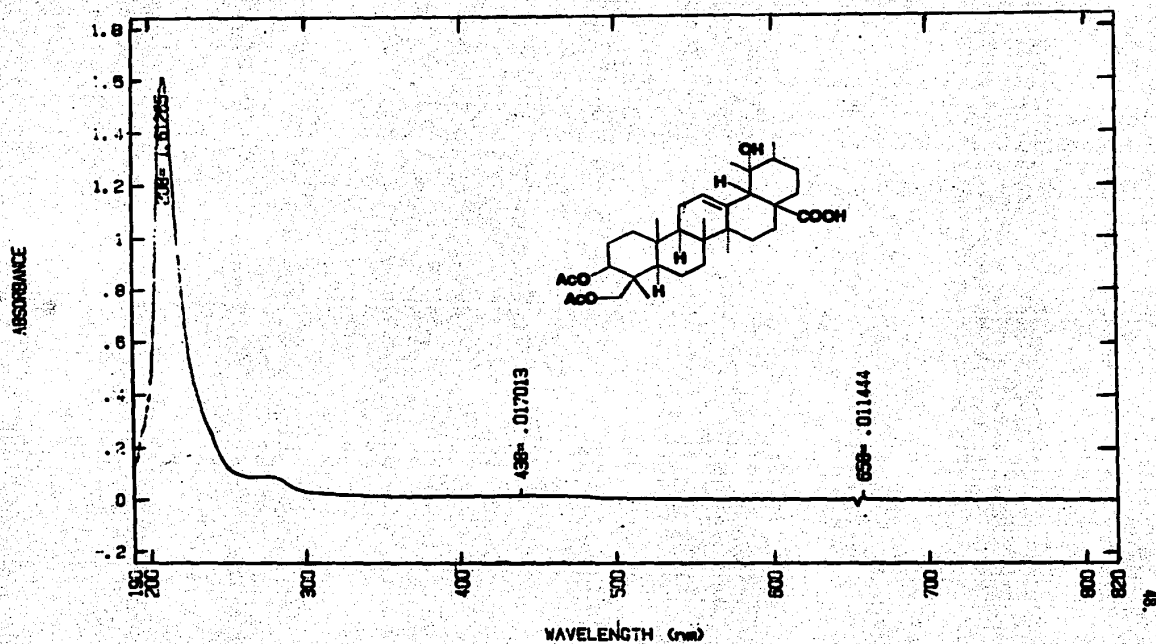
c) El espectro de masas (Espectro 11) presentó un ión molecu-

Tabla 10. Constantes físicas y espectroscópicas del Diacetil Rotundato.

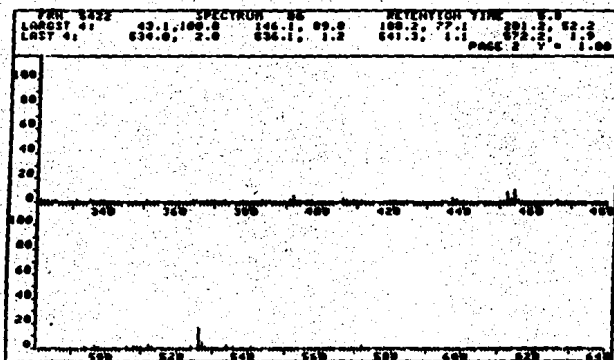
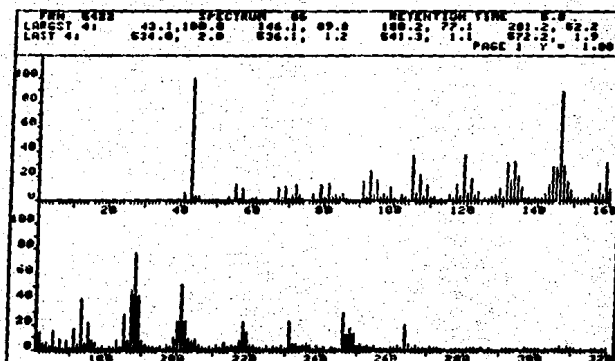
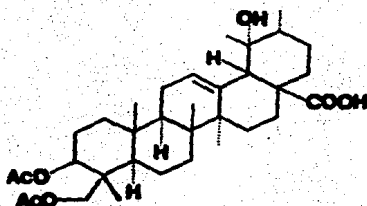
pf.	270-271°C
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3450, 1735, 1695, 1640, 1036
$^1\text{H NMR}$	δ 5.25 (m, 1H, H-12), 4.75 (dd, $J=8\text{Hz}$), 3.77 (δ 3.87, d, $J=12\text{Hz}$, 3.55, d, $J=12\text{Hz}$), 2.55 (s, 1H, H-19), 2.05 (s, $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$), 2.0 (s, $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$) 1.24 (s, 3H, H-29), 1.20 (s, 3H, H-27), 0.97 (s, 3H, H-25), 0.90 (s, 3H, H-30), 0.83 (s, 3H, H-24), 0.73 (s, 3H, H-26).
EMIE m/z (%)	572 (1.9 M^+ , 541 $\text{M}-31$ (1.1) , 526 (19), 536 (1.2), 534 (2), 307 (1), 264 (21), 247 (15), 246 (32), 219 (15), 219 (25), 201 (52), 188 (77), 165 (19), 146 (89), 43 (100)



E-10. Espectro IR del compuesto **17e**.



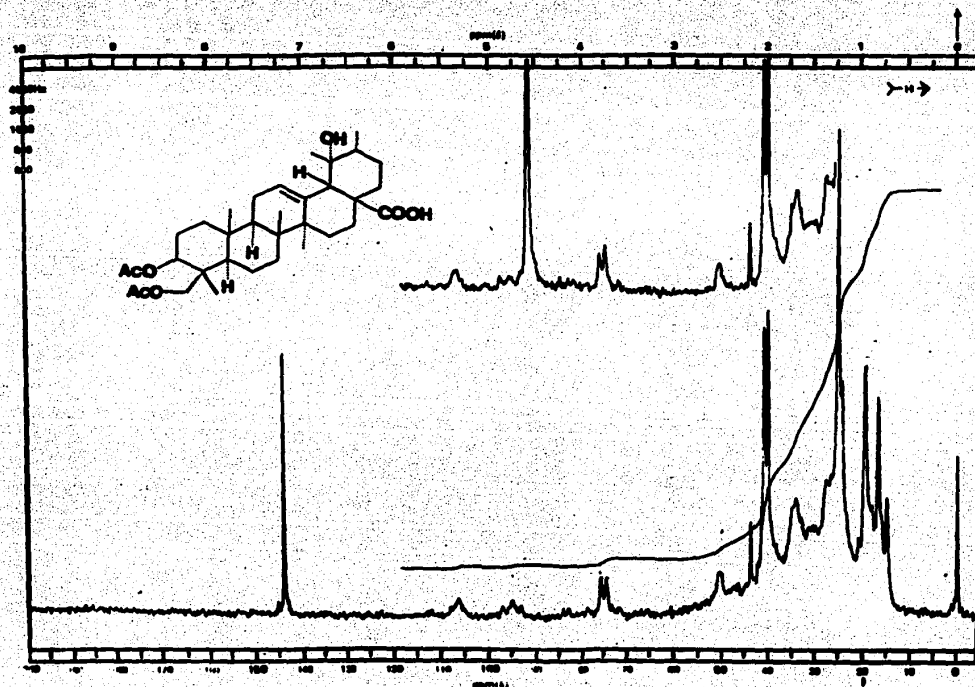
E-9. Espectro UV del compuesto 17a.

E-11. Espectro de Masas del compuesto 17a.

lar a m/z 572 ($C_{34}H_{52}O_7$). Otros picos importantes se observaron a m/z 541, 536, 534, 526, 307, 264, 247, 246, 219, 218, 201, 188, 185, 165, 146 y 43 (pico base). Los picos a m/z 307 y 264, resultaron de la ruptura de tipo Retro-Diels Alder característica de un Δ^{12} urseno ó un Δ^{12} oleaneno con dos funciones carbinólicas en los anillos A y/o B [fragmento a m/z 307] y con una función carboxílica y otra carbinólica en los anillos D y/o E [fragmento a m/z 264] (Ogunkoya, 1981). Los iones secundarios a m/z 246 ($264-H_2O$), 201 ($264-H_2O-COOH$), 219 ($264-COOH$), 218 ($264-COOH-H^+$) sustentaban aún más la proposición de las funcionalidades carbonólicas y carboxílicas en los anillos D y E. Asimismo, permitieron inferir *a priori* la existencia de un hidroxilo terciario, en C-19 (Potier *et al.*, 1966). Por otra parte, el ión intenso a 189 ($307-CH_2COOH-59$) evidenciaba aún más la existencia de dos grupos hidroxilos en los anillos A y/o B del compuesto 17 (Takani *et al.*, 1977). Un resumen del patrón de fragmentación de este compuesto se ilustra en la Figura 8.

d) El espectro de RMN¹H (Espectro 12) permitió comprobar inequívocamente, no solo que el compuesto 17 era el ácido de un tri-terpentriol con un esqueleto básico del tipo Δ^{12} urseno, sino también la naturaleza, ubicación y estereoquímica de las funciones carbinólicas. Las evidencias que permitieron las conclusiones antes mencionadas fueron las siguientes:

d.1) A δ 5.25 se observó un multiplete para un protón vinílico trisustituido característico del H-12 de la estructura tipo.



E-12. Espectro de RMN¹H del compuesto 17a.

d.2) A δ 4.75 se observó la resonancia para un protón metílico base de un acetato secundario. El desplazamiento químico, la multiplicidad observada (dd, $J=8\text{Hz}$) y, finalmente consideraciones biogenéticas eran consistentes con la disposición del acetoxi en la posición C-3 con una disposición β -ecuatorial (Oyama *et al.*, 1968, Pereda-Miranda *et al.*, 1986, Wenjuan *et al.*, 1986, Chung *et al.*, 1968, Takani *et al.*, 1977, y Brieskorn *et al.*, 1967, *inter alia*).

d.3) Centrado en δ 3.77 se observó un sistema AB característico de los protones de un grupo CH_2OAC , [δ 3.87, d, $J=12\text{Hz}$, δ 3.55, d, $J=12\text{Hz}$]. El desplazamiento químico observado para esta señal era consistente con una disposición α ecuatorial lo cual solo era posible con la ubicación del grupo CH_2OAC en la posición 23 del esqueleto básico.

d.4) A δ 2.55 se observó un singulete que integraba para un protón y que se atribuyó al H-18 del urseno. La multiplicidad de la señal y el desplazamiento químico eran congruentes con la presencia de un hidroxilo terciario α orientado en C-19 (Brieskorn *et al.*, 1967; Wenjuan *et al.*, 1986; Oyama *et al.*, 1968; Takani *et al.*, 1977, *inter alia*).

Asimismo la presencia de la función carbinólica terciaria en C-19 era consistente por una parte, con la fragmentación observada en el espectro de masas (Figura 8) y por la otra, con observación de una señal para hidroxilo, terciario en el Espectro I.R. del derivado acetilado.

d.5) A δ 2.05 y a δ 2.00 se observan dos singuletes característicos para las resonancias de los acetatos de los alcoholes primarios en C-23 y secundarios en C-3.

d.6) Finalmente en la zona de los metilos se observaron señales para seis metilos a δ 1.24 (H-29), 1.20 (H-27), 0.97 (H-25), 0.90 (H-30), 0.83 (H-24), 0.73 (H-26) (Takani *et al*, 1977, Cheung *et al*, 1968).

La Comparación y la similitud de los desplazamientos químicos entre los metilos del derivado diacetilado del ácido 3 β -23-dihidroxiurs-12-en-28-oico (Mata *et al*, 1987, Rios y Camacho, 1987), y las del compuesto 17a sustentaron aun más la estructura propuesta. (Ver Tabla 11). Cabe destacar que la posibilidad de obtener un acetónido, en cantidad adecuada para análisis espectroscópico impidió comprobar químicamente la disposición relativa de los grupos carbinólicos primario y secundario.

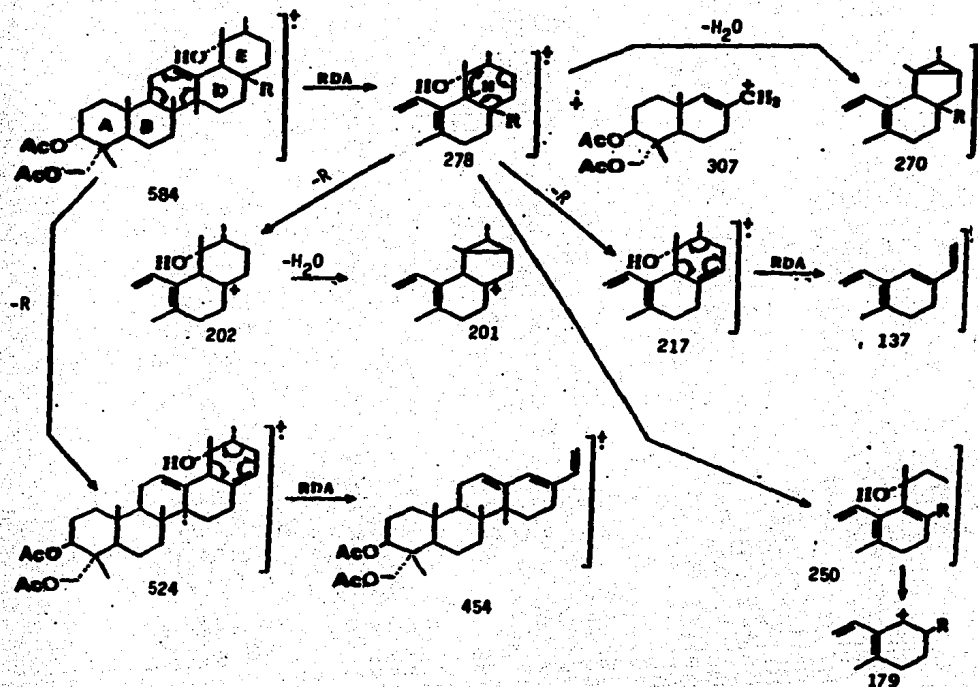


Figura 8. Patrón de fragmentación tipo Retro-Diels-Alder del diacetil rotundato.

Tabla 11. Comparación de los desplazamientos químicos en RMN^1H de los metilos del compuesto 17a con aquellos del ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-17-en-28-oico 19.

	H-26	H-24	H-29	H-30	H-25	H-27	H-23	
19	0.75	0.81	0.89	1.05	0.96	1.22	3.90 (12)	3.65 (12)
17a	0.73	0.83	1.24	0.90	0.97	1.20	3.87d (12)	3.65d (12)
Δ	0.02	-0.02	-0.35	0.15	-0.01	0.02	0.03	0.00

Identificación de Betulinato de metilo 14.

De las fracciones 103-227 de la columna original se obtuvieron 40 mg de un sólido café blanquecino p.f. 175-180.

Su espectro I.R. (Espectro 13) así como una reacción positiva frente al reactivo de Lieberman-Burchard sugirieron que el compuesto era de naturaleza triterpénica.

Las constantes físicas y espectroscópicas de este compuesto 14 se resumen en la Tabla 12.

El análisis espectroscópico compuesto 14 permitió caracterizar a la sustancia obtenida de las fracciones 103-227 como el Betulinato de metilo 14, cuya estructura se incide en la Figura 9.

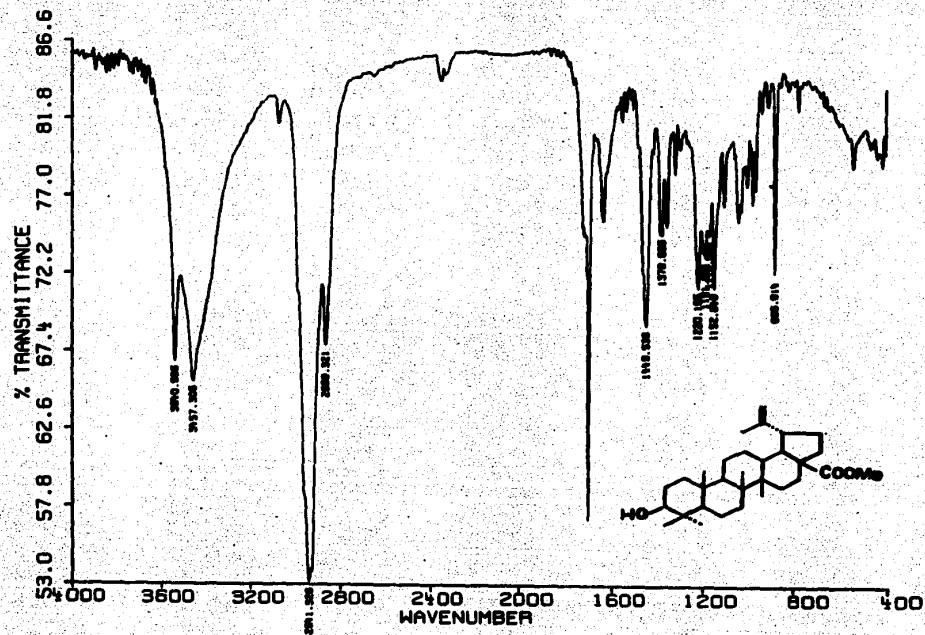
La información que permitió la conclusión anterior fueron las siguientes:

a) El espectro de masas (Tabla 12, presentó un ión molecular a $\frac{m}{z}$ 470 ($C_{32}H_{50}O_3$). Otros picos importantes se observaron a m/z 452, 437, 411, 262, 248, 262, 233, 219, 207, 189, 175, 21, 55, 43, 41. Es de hacer notar que los picos a m/z 207 y 262 resultan de una ruptura de tipo Retro-Diels-Alder, característica para triterpenos pentacíclicos del tipo lupano, oleanano o ursano. (Budzikiewicz, *et al*, (1963).

El fragmento a m/z 207 sugirió la presencia de una función alcohólica en los anillos A y/o B. En tanto que el fragmento a m/z

Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas para el betulinato de metilo.

pf.	204-208° cm ⁻¹
RMN ¹ H	δ 4.58 (m, 1H, H-30a), δ 4.68 (m, 1H, H-30b) δ 3.65 (s, 3H, OH), δ 3.08 (m, 1H, H-3), δ 1.67 (s, 3H, H-29), δ 0.95 (s, 6H, H-14), δ 0.91 (s, 3H, H-10), δ 0.80 (s, 3H, C-4), δ 0.75 (s, 3H, H-4).
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	3611, 3011, 2949, 1719, 1455, 1376, 1161, 1135, 1029, 982 y 889 cm ⁻¹
EME1 m/z (%)	4170 [M⁺ (38)], 452 (M-H₂O, 8), 437 (4), 411 (1), 262 (37), 248 (15), 262 (37), 233 (1), 219 (1), 207 (30), 189 (55), 175 (11), 81 (67.5), 55 (60), 43 (100), 41 (64.9)



E-13. Espectro IR del compuesto 14.

262 indicó un grupo COOCH_3 - en los anillos D y/o E.

b) La presencia en el espectro IR de una banda fina a 1719 cm^{-1} y bandas a 3450 y 3457 cm^{-1} indicó que la molécula era el éster metilo de un ácido triterpen-ol.

c) El espectro de RMN^1H (Espectro 14) confirmó la conclusión anterior y permitió además establecer inequívocamente que el esqueleto básico del compuesto era el de un lupano, ya que se observó lo siguiente:

c.1) La existencia de 2 señales como singulete a $\delta=4.58$ (m, 1H, C-30), ya $\delta=4.68$ (m, 1H, C-30), características de dos protones vinílicos localizados en C-30.

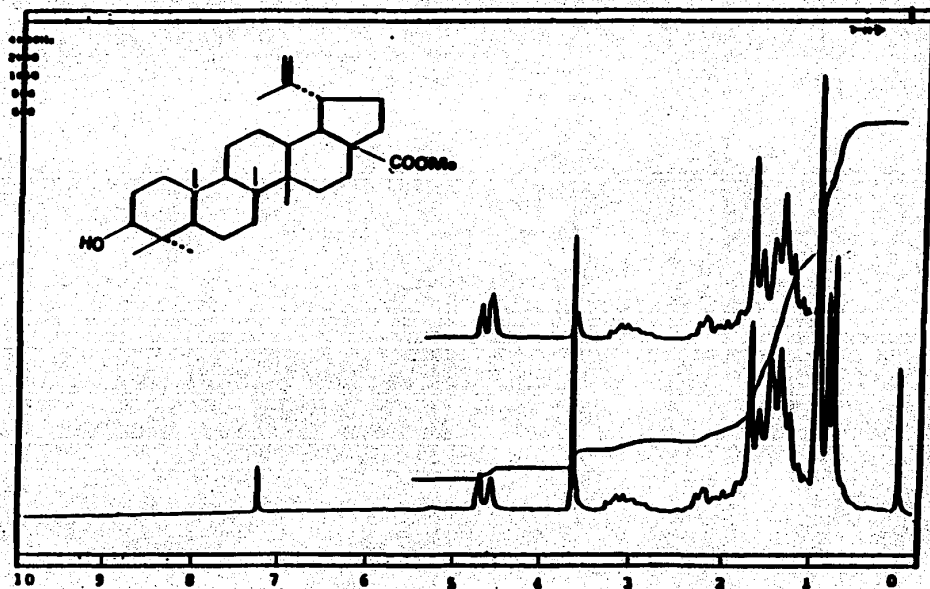
c.2) Un singulete con integración para tres protones a $\delta=1.67$ atribuible al metilo vinílico C-29.

c.3) Cuatro señales singuletes entre δ 0.75 y 0.95 que integran para un total de 15 protones y los cuales indicaban que la molécula poseía cinco metilo terciarios.

c.4) Un multiplete a δ 3.08 correspondiente al protón base de un alcohol secundario.

c.5) Finalmente a δ 3.65 se observó un singulete para 3 protones característicos del O-CH_3 de un éster metílico. Esta última señal fue consistente con la señal a 1719 cm^{-1} del espectro IR, y con el fragmento m/z 262 presente en el espectro de masas.

La comparación de esta sustancia con el éster metílico de una muestra auténtica de ácido betulínico gentilmente proporcionada por el maestro Guillermo Delgado permitió inequívocamente la identificación del compuesto.



E-14. Espectro de RMN^1H del compuesto **14**.

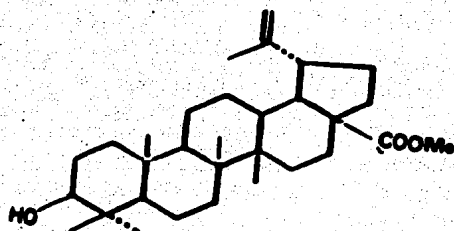


Figura 9. Estructura del Betulinato de metilo 14.

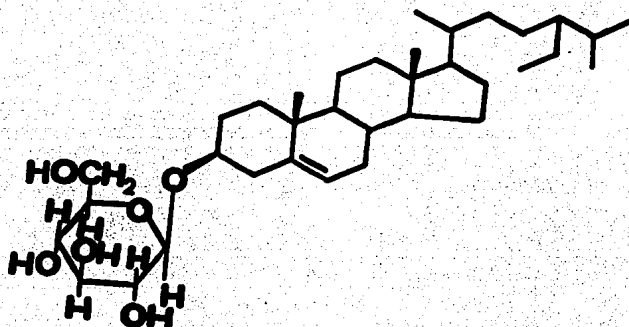


Figura 10. Estructura del β -D-glucosido- β -sitosterol 18.

Identificación del β -gluco- β -sitosterol 18.

De las fracciones 276-295 de la columna de la Tabla 5 se obtuvieron 66 mg de un polvo cristalino de p.f. 280° (dec.). La alta solubilidad en solventes muy polares como MeOH, EtOH, y una reacción positiva con el reactivo de Molish sugirieron que el compuesto era de naturaleza glicosídica. Efectivamente la hidrólisis ácida con HCl 1N permitió obtener la aglicona 18b y detectar cromatográficamente a la β -D-glucosa como único carbohidrato presente en el producto de hidrólisis.

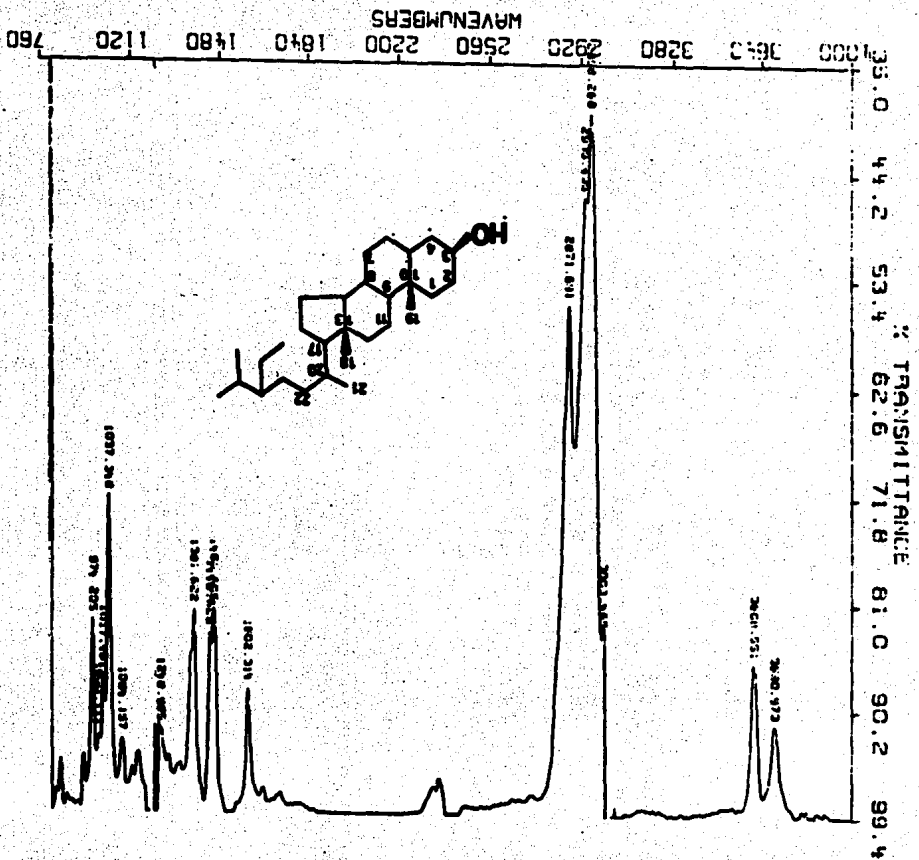
Como los espectros IR (Espectro 16) de la aglicona y del producto original (Espectro 15) presentaron el perfil típico de un esteroide se decidió comparar las constantes físicas y espectroscópicas del producto de hidrólisis con el de una serie de patrones de esteroides, encontrándose que el producto, era idéntico al β -sitosterol. Asimismo, la comparación directa del derivado acetilado del glucósido con muestras auténticas permitió corroborar la identidad del compuesto aislado como β -D-glucosido- β -sitosterol 18. En la Tabla 13 se indican el punto de fusión, los datos IR y EM para el derivado acetilado 18a y en el Espectro 17 se ilustra la RMN¹H del mismo.

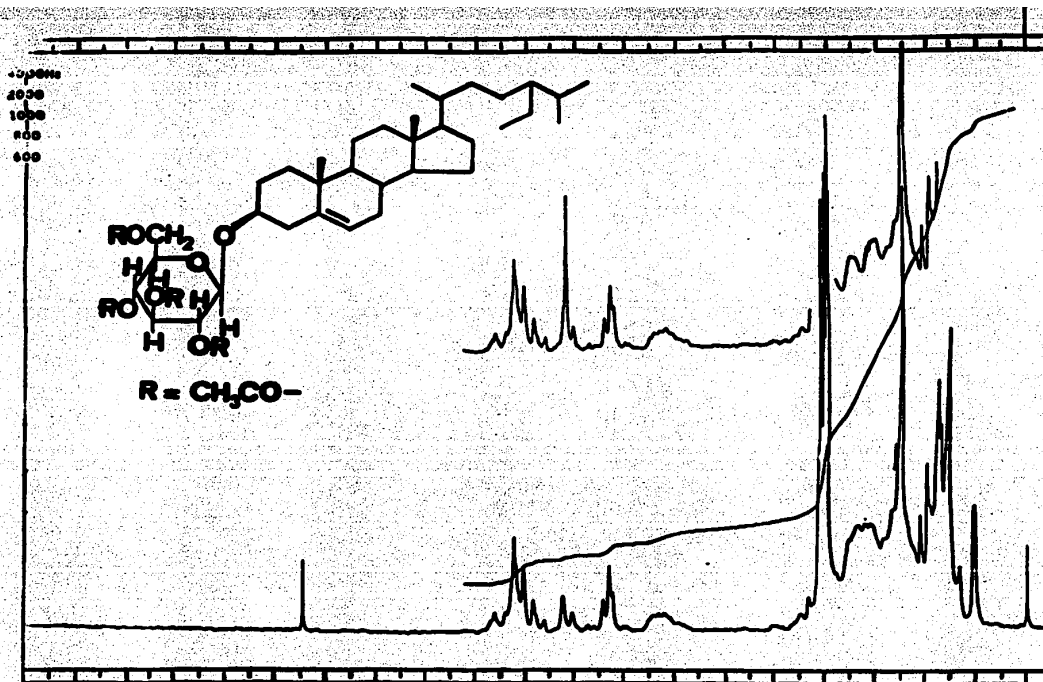
Se indica en la Figura 10 la estructura del β -gluco- β -sitosterol.

Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas del β -D-glucó- β -sitosterol 18.

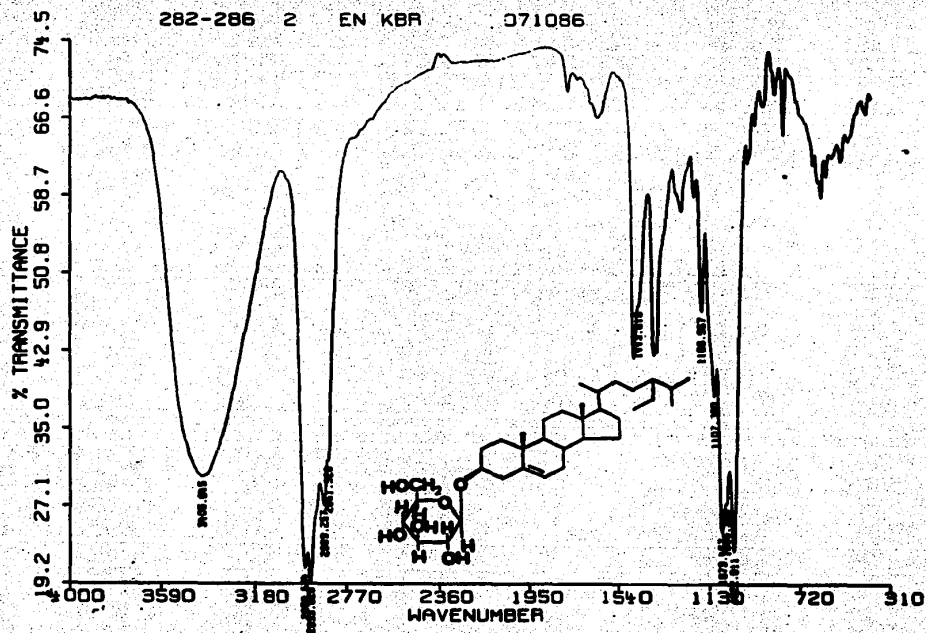
pf.	138-141°
EMEI m/z (%)	397 M^+ -O-tetraacetylglucosa (10 ; 331 (32); 169 (43); 43 (100)
IR ν_{max} KBr cm^{-1}	2960, 2860, 1750, 1450, 1365, 1220, 1035

E-16. Espectro IR del compuesto 18b.





E-17. Espectro de RMN¹H del compuesto **18a**.



E-15. Espectro IR del compuesto 18.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Del extracto metanólico de la *Exostema coulteri* Hook se aislaron y caracterizaron cuatro triterpenos pentacíclicos y una sustancia esteroideal. Los triterpenos fueron caracterizados como ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rotúndico y betulinato de metilo. El esteroide fue identificado como β -D-glucositolsterol.
2. La presencia de triterpenos de los tipos del oleaneno, urseno y lupeno en otras especies de la familia de las Rubiaceae se ha descrito previamente. Sin embargo, es de hacer notar que es la segunda ocasión que se describe el aislamiento e identificación del ácido rotúndico 17.
3. El tipo de metabolitos secundarios obtenidos de la *Exostema coulteri* Hook es diferente al de la especie -relacionada- *Exostema caribaeum*. Esta diferencia, no obstante, no sería, por los momentos, determinante en la resolución de los problemas taxonómicos existentes en torno a la *E. coulteri*, ya que es necesario realizar el estudio de otras especies a fin de establecer el perfil químico del género; sin embargo, el análisis químico de la *Exostema coulteri* y el recientemente realizado de la *E. caribaeum* constituyen el inicio de

este laborioso trabajo.

4. El análisis fitoquímico de la *Exostema coulteri* constituye una contribución adicional al conocimiento de los elementos constitutivos de la Flora mexicana.

BIBLIOGRAFIA

- S.K. Adesina, J. Reisch, Phytochemistry, **24**, 3003 (1985).
- A. Aiello, Journal of The Arnold Arboretum, **60**, 94 (1979).
- E.K. Adesogau, Tetrahedron, **29**, 4099 (1973).
- C.D. Bannan and J.J.H. Simes, Aust. J. Chem. (1976), **29**, 1135.
- R.A. Bannan, Eade, Joseph Samaan and H. Simos Aus. J. Chem., 1975, **28**, 2649-54.
- A.K. Baru, S. Ray, P.K. Datta y R.V. Venkateswasan, Phytochemistry **25**, 1762 (1986).
- K. Bock, S.R. Jersen y B.J. Nieben, Acta Chem. Scand. B., **30**, 743 (1976).
- H. Budzkievicz, J.M. Wilson and D'jerassi, J. Am. Chem. Soc., **85**, 3688 (1963).
- R. Bye, Economic Botany, **40**, 103 (1986).
- F. Calzada, Estudio Fitoquímico de la planta de la Quina, Tesis de Licenciatura, UNAM, 1987.
- H.T. Cheung and D.G. Williamson, Tetrahedron, Vol 25, pp. 119 to 128. Pergamon Press, 1969. Printed in Great Britain.

- M.C. Das y S.B. Mahato, Phytochemistry, **22**, 1071 (1983).
- X.A. Domínguez (1974), "Métodos de Investigación Fitoquímica" Edit. Limusa, 139-159, México, D.F.
- A. Ducroix, Café, Cacao, Thea, **19**, 57 (1975).
- A. Gaudemer, J. Polonsky and E. Wenkert, Bull. Soc. Chim., France 407 (1964).
- J.B. Harborne and T.J. Mabry. The Flavonoids Advances in Research Chapman and Hall London, N.Y., 1982.
- J.B. Harborne and J.T. Mabry. The Flavonoids Chapman and Hall 1975.
- J.B. Harborne, Phytochemical Methods, Chapman and Hall, London 2a. Ed. (1984).
- R. Hegnauer, Chematoxonomic der Pflanzen, Vol. 6, Birkhouser, Basel, P. 130 (1973).
- Hensl, Diag, Pl. Nov. Parts Alt. 31 1979.
- S.R. Henington y J.D. Phillipson. Indole and Biogenetically related alkaloids, (Ed. I.D. Phillipson and M.H. Zenk), Academic Press, London, 63 (1980).
- G. Keith Lewis and J. David Tucker, Aust. J. Chem. (1983), **36**, 2297-305.
- K. Koike, G.A. Cordell, A.A. Freer, C.J. Gilmore y G. Sim., Tetrahedron, **36** (1980).

- S.M. Kupchan, A.H. Gray, M.D. Grove, J. Med. Chem. **10**, 337 (1967).
- D. Lorence, Instituto de Biología, UNAM, comunicación personal (1986).
- X. Lozoya y M. Lozoya. Flora medicinal de México primera parte: Plantas Indígenas, Instituto Mexicano del Seguro Social. México p. 31.
- M. Martínez. Plantas Medicinales de México, Editorial Botas, México, D.F. 1969.
- R. Mata, F. Calzada, Ma. del Rosario García, Ma. T. Reguero. Journal of Natural Products; en prensa (1987).
- G.D. Monache, Botta y Alves de Lima, Phytochemistry, **23**, 1813 (1984).
- L. Okungaya, Phytochemistry, **20**, 121 (1981).
- Pant Y R.P. Rastogi, Phytochemistry, **18**, 1095 (1979).
- R.A. Pario y M. Bastreu, Am. Pharm. Arch., **18**, 205 (1960).
- K.P. Parry y G.P. Smith, S. Chem. Soc. Perkin I, 1671 (1978).
- R. Pereda-Miranda, G. Delgado y A. Romo de Vivar, J. Nat. Prod., **49** (1986).
- Pietro Monaco and Lucio Previtera, Journal of Natural Products, Vol. 47, No. 4 pp. 673-676, Jul-Aug. (1984).
- P. Potier, B.C. Das, A.M. Buh, M.M. Janot, A. Pourrat and H. Pourrat, Bull. Soc. Chim. Fr. 3458 (1966).

- T.K. Radzan et al., Biochemistry, Vol. 21 No. 2 pp. 409-412, 1982.
- G. Reher y V. Kraus, Journal of Natural Products, 47, 172 (1984).
- G. Reher y V. Kraus, Phytochemistry, 22, 1524 (1983).
- M.T. Reguero, R. Mata, G. Delgado, Journal of Natural Products, en prensa (1987).
- L. Rios y Ma. del Rayo Camacho, Estudio Fitoquímico de la planta de Cigarrilla mexicana, Tesis de licenciatura, UNAM, 1987.
- T. Robinson, "The Organic Constituents of higher plants", University Press, 1983.
- J.T. Roig, Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba, Ciencia y Técnica. Instituto del Libro, La Habana, 1974, pp. 273.
- F.I. Sánchez-Viesca, Phytochemistry, 8, 1821 (1969).
- S.L. Smith, J.W. Jorgenson and M. Nototny (1980), J. Chromatogr. 187-111.
- W. Standley. Flora of Guatemala, Field Museum of Natural History, 24, 69 (1975).
- O. Stichler, New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutical Activity (Ed. H. Wagner y P. Wolff), Springer Verlag, Berlin, P. 153 (1976).
- M. Takani, K. Kubota, M. Nozowa, T. Oshiki y K. Takahashi, Chem. Pharm. Bull., 25, 981 (1977).
- M. Tori, T. Ysuyuki and T. Takahashi, (1977), Bull. Chem. Soc. Jpn. 50, 3381.

- Y. Tsuda, T. Sano, K. Isobe and M. Miyauchi, (1974), Chem. Pharm. Bull. 22: 2396.
- E. Tursch, R. Savoir, R. Ottinger and G. Chiurdoglu, Tetrahedron Letters, 539 (1967).
- Verdcourt, Bulletin du Jardin Botanic de L' et at, 28, 209 (1965).
- B. Verdcourt, Flora Tropical East Africa (Ed. R.M. Polhill), Part 1, pp. 1, Crown Agents for over seas Governments and Administration, London (1976).
- J. Vitagliana, An. Asoc. Química Argent. 58, 273 (1970), a través de C.A., 74, 121356 (1971).
- R. Wilson, N.Z., J. Bot. 22, 195 (1984).
- M. Zalacain, E. Zaera, D. Vázquez y A. Jiménez, Febs. Letters, 148, 95 (1982).

ADENDUM

- Bries Korn, Carl Heinz and Horst Wunderer, Chem. Ber 100, 1252-1265 (1967).
- G.A. Cordel, M. Ogura and N.R. Farnsworth, Phytochemistry, 1977 Vol. 16 pp. 285-288, Pergamon Press, Printed in England.
- Egon Stahl Tin-Layer Chromatography a Laboratory Handbook Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Academic Press Inc. Publishers New York, London, 1965.

- T. Oyama, H. Aoyama, K. Yamada, T. Mitsuhashi and O. Sugiyama, Tetrahedron Letters, 1968, 4629-4641.
- Sakiya Y, Akada Y., Kawano S. and Miyanchi Y. (1979), Chem. Pharm. Bull., 27, 1125.
- Q. Wenjuan, Wu Xive, Zhao Junjie, Yoshiyasu Fukuyama, Toshihide Yamada and Kazuyuki Nakagawa, Phytochemistry Vol. 25, No. 4, pp. 913-916, 1986. Printed in Great Britain.