



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR DE LA
HIPPOCRATEA EXCELSA



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
ROLANDO LOPEZ CEDEÑO

MEXICO, D.F.

1989.

TESIS CON
FECHA 18.02.89



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.

INDICE

LISTA DE TABLAS. -----	iv
LISTA DE ESPECTROS. -----	vi
LISTA DE FIGURAS. -----	viii
LISTA DE ABREVIACIONES. -----	ix
LISTA DE ESQUEMAS. -----	x
1. Introducción. -----	1
1.1 Generalidades sobre <u>Hippocratea excelsa</u> H.B.K. -	1
1.2 Poliisoprenos naturales. -----	5
2. Objetivos y justificación. -----	10
3. Materiales y metodos. -----	11
3.1 Material vegetal. -----	11
3.2 Análisis cromatográficos. -----	11
3.3 Ensayo para alcaloides. -----	13
3.4 Preparación de los extractos hexánico y metanóli- co de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> H.B.K. -	13
3.5 Separación y purificación de algunos de los constituyentes de las fracciones 126-169 en la columna de la Tabla 5, obtenidas del ex- tracto de acetato de etilo resultante del proceso de partición del extracto metanólico. --	18
3.6 Aislamiento y purificación de los constituyen- tes del extracto hexánico. -----	20
3.6.1 Aislamiento de la Friedclina <u>9</u> . -----	23
3.6.2 Aislamiento del Canofilal <u>10</u> . -----	23

3.6.3 Aislamiento del Canofilol <u>11</u> . -----	23
3.6.4 Aislamiento del Acido Canofílico <u>12</u> . -----	23
3.6.5 Aislamiento del β -Sitosterol <u>13</u> . -----	24
3.7 Obtención del <u>Trans</u> Poliisopreno de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> . -----	24
3.7.1 Obtención del <u>Trans</u> Poliisopreno del extracto clorofórmico preparado vía maceración a partir de la corteza vegetal. -----	24
3.7.2 Obtención del <u>Trans</u> Poliisopreno del extracto clorofórmico preparado vía maceración a partir del material vegetal previamente extraído con hexano y metanol. -----	24
3.7.3 Obtención del <u>Trans</u> Poliisopreno del extracto clorofórmico preparado a partir de la corteza previamente extraída con hexano y metanol, utilizando el cloroformo a una temperatura de 61-62°C. -----	24
3.8 Caracterización de las sustancias aisladas. ----	28
3.8.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas. -----	28
3.8.2 Obtención de derivados de las sustancias aisladas. -----	29
4. Resultados y discusión. -----	31
4.1 Aislamiento y caracterización de los constituyentes mayoritarios del extracto hexánico. ---	31
4.1.1 Identificación de la Friedelina <u>9</u> . -----	33
4.1.2 Identificación del Canofilol <u>11</u> . -----	39
4.1.3 Identificación del Canofilal <u>10</u> . -----	50
4.1.4 Identificación del Acido Canofílico <u>12</u> . -----	55
4.2 Caracterización del <u>Trans</u> -1,4-Poli(isopreno). --	63

	Página
5. Conclusiones. -----	70
6. Recomendaciones. -----	72
7. Apendice -----	73
8. Bibliografía -----	74

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Constituyentes aislados de las especies del género <u>Hippocratea</u> estudiadas químicamente hasta la fecha. -----	3
Tabla 2. Plantas productoras de poliisoprenos de importancia comercial . -----	6
Tabla 3. Sistemas de disolventes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina . -----	11
Tabla 4. Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina . -----	12
Tabla 5. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto acetato de etilo.-	17
Tabla 6. Productos separados del precipitado obtenido de las fracciones 126-129 de la Tabla 5. -----	18
Tabla 7. Resumen de la separación vía cromatografía en columna de las fracciones 127-177 de la Tabla 5 .-----	19
Tabla 8. Resumen de la columna cromatográfica que permitió la separación de algunos de los constituyentes del extracto hexánico. -----	22
Tabla 9. Obtención de los derivados acetilados. -----	29

	Página
Tabla 10. Rendimiento y estructuras de los compuestos aislados del extracto hexánico . -----	32
Tabla 11. Constantes físicas y espectroscópicas de la Friedelina <u>9</u> . -----	34
Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas del Canofilol <u>11</u> . -----	40
Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas del Acetil Canofilol <u>11a</u> - - -----	45
Tabla 14. Comparación de los desplazamientos químicos de los derivados acetilados del 29-hidroxifriedelana-3-ona ,del 30-hidroxifriedelana-3-ona y del compuesto <u>11a</u> . -----	46
Tabla 15 . Constantes físicas y espectroscópicas del Canofilol <u>10</u> . -----	51
Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas del Acido Canofílico <u>12</u> . -----	56
Tabla 17. Constantes físicas y espectroscópicas del del Metil Ester del Acido Canofílico.-----	60
Tabla 18. Rendimiento del <u>Trans</u> Poli(isopreno)utilizando diferentes disolventes . -----	64
Tabla 19. Desplazamientos químicos para <u>cis</u> Poli(isopreno), <u>Trans</u> Poli(isopreno) y el obtenido a partir de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> .-----	68
Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas del <u>Trans</u> -1,4-Poli(isopreno) <u>8</u> . -----	65

LISTA DE ESPECTROS

	Página
E-1. Espectro IR del compuesto <u>9</u> -----	35
E-2. Espectro masas del compuesto <u>9</u> -----	36
E-3. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>9</u> -----	38
E-4. Espectro IR del compuesto <u>11</u> -----	41
E-5. Espectro masas del compuesto <u>11</u> -----	43
E-6. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>11</u> -----	44
E-7. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>11a</u> -----	47
E-8. Espectro IR del compuesto <u>11a</u> -----	48
E-9. Espectro masas del compuesto <u>11a</u> -----	49
E-10. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>10</u> -----	52
E-11. Espectro masas del compuesto <u>10</u> -----	50
E-12. Espectro IR del compuesto <u>10</u> -----	54
E-13. Espectro IR del compuesto <u>12</u> -----	57
E-14. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>12</u> -----	58
E-15. Espectro masas del compuesto <u>12</u> -----	59

Página

E-17. Espectro IR del compuesto <u>12a</u> ----	61
E-18. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>12a</u> ----	62
E-19. Espectro IR del compuesto <u>8</u> -----	66
E-20. Espectro RMN ¹ H del compuesto <u>8</u> -----	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados de algunas especies del género <u>Hippocratea</u> . - - - -	4
Figura 2. Estructura del caucho y la guta. - - - - -	5
Figura 3. Modificaciones cristalinas de la guta. - - - -	8
Figura 4. Iones fragmento diagnóstico para los friedelanos, usando como modelo la friedelina. - - - -	37
Figura 5. Iones fragmento más importantes en el espectro de masas del compuesto <u>11</u> . - - - - -	43

LISTA DE ABREVIACIONES

CDCl_3 : cloroformo deuterado

d: doblete

DMSO-d_6 : dimetilsulfóxido hexadeuterado

D_2O : agua deuterada

EMIE: espectro de masas por impacto electrónico

Hz: hertz

IR: infrarrojo

J: constante de acoplamiento

m: multiplete

MeOH: metanol

MHz: mega hertz

m/z: masa-carga

P.eb: punto de ebullición

P.f.: punto de fusión

RMN^1H : resonancia magnética nuclear de hidrógeno

s: singulete

sa: singulete ancho

TMS: tetrametilsilano

δ : delta

LISTA DE ESQUEMAS

Página

Esquema 1. Determinación cualitativa de alcaloides en los extractos: hexánico, clorofórmico y metanólico de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> . -----	14
Esquema 2. Preparación de los extractos hexánico y metanólico de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> . -----	15
Esquema 3. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> . -----	16
Esquema 4. Fraccionamiento del extracto hexánico. -----	21
Esquema 5. Obtención del <u>Trans-1,4-Poli(isopreno)</u> del extracto clorofórmico preparado vía maceración a partir de la corteza de <u>Hippocratea excelsa</u> . -----	25
Esquema 6. Obtención del <u>Trans-1,4-Poli(isopreno)</u> del extracto clorofórmico preparado vía maceración a partir del material vegetal previamente extraído con hexano y metanol. -----	26
Esquema 7. Obtención del <u>Trans-1,4-Poli(isopreno)</u> del extracto clorofórmico preparado a partir de la corteza previamente extraída con hexano y metanol, utilizando el cloroformo a una temperatura de 61-62°C. -----	27

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES SOBRE Hippocratea excelsa H.B.K.

El género Hippocratea L. (Hippocrateaceae) comprende aproximadamente 120 especies distribuidas en el sureste de los Estados Unidos, México y en la zona tropical de Sur América. Las plantas de este género son generalmente lianas e incluyen todas aquellas especies de la familia que poseen fruto capsular (Smith, 1940).

Una de las especies mas importante debido a su amplio uso en la medicinal tradicional es la Hippocratea excelsa, H.B.K. (Sin. Hemiangium excelsa, H.B.K), conocida popularmente con los nombres de "cancerina" y "mata piojos". En la República Mexicana se encuentra principalmente, distribuida en los estados de Sinaloa, Durango y Tamaulipas.

Smith en su monografía "Las Especies Americanas de la Familia Hippocrateaceae" hace una descripción detallada de la planta (Smith, 1940).

La corteza café rojiza de la cancerina se expende en muchos mercados nacionales debido a sus múltiples propiedades curativas; los usuarios la emplean para el tratamiento de varias enfermedades entre las que destacan: afecciones de la piel, úlceras gástricas, padecimientos renales, amenorrea, e infecciones uterinas. En todos los casos se prepara una infusión a partir de la corteza machacada, sola o combinada con otras hierbas medicinales; esta infusión es consumida diariamente hasta por períodos de tres meses (Bye, 1988).

Es de hacer notar, que debido a la gran efectividad de la planta, la demanda por la misma es muy alta y en consecuencia actualmente hay el riesgo de su extinción en varias zonas del centro y sur de México.

Además de sus propiedades medicinales, la Hippocratea excelsa goza de reputación popular como agente insecticida (Bye, 1988; Smith, 1940).

Desde el punto de vista químico no se ha descrito ningún trabajo previo para la Hippocratea excelsa, sin embargo algunas otras especies de género han sido investigadas y los constituyentes aislados y caracterizados están representados por flavonoides (flavonoles, proantocianidinas, catequinas) y/o triterpenoides del tipo friedelano.

En la Tabla 1 se resumen estos estudios indicándose los diferentes metabolitos, sus fuentes naturales y las referencias pertinentes, y en la Figura 1 se ilustran las estructuras correspondientes a los compuestos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1 CONSTITUYENTES AISLADOS DE LAS ESPECIES DEL GENERO HIPPOCRATEA ESTUDIADAS QUIMICAMENTE HASTA LA FECHA.

ESPECIE	CONSTITUYENTES	No. ESTRUCTURA*	REFERENCIAS
1 <u>Hippocratea aspera</u> Lam. (<u>Prionostema aspera</u>)	PRIONOSTEMADIONA	<u>1</u>	Brüning y Wagner, 1978.
	PRISTIMERINA	<u>2</u>	Brüning y Wagner, 1978.
	PROANTOCIADINA	<u>4</u>	Brüning y Wagner, 1978.
	(-) 4'- <u>O</u> -METIL EPIGALOCATEQUINA	<u>3</u>	Brüning y Wagner, 1978.
2 <u>Hippocratea indica</u> Will. (<u>Reissantia indica</u>)	PRISTIMERINA	<u>2</u>	Brüning y Wagner, 1978.
3 <u>Hippocratea mucronata</u>	KAEMFEROL	<u>5</u>	Ilyas e Ilyas, 1986.
	3- <u>O</u> - α -D-GLUCOPI- RANOSIL KAEMFEROL	<u>6</u>	Ilyas e Ilyas, 1986.

* REFERIDO A LAS ESTRUCTURAS DE LA FIGURA 1.

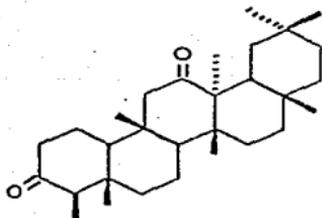
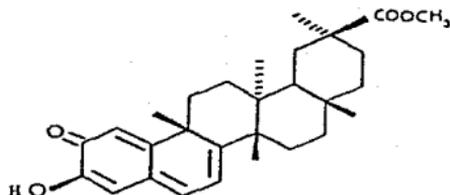
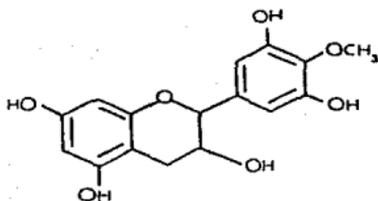
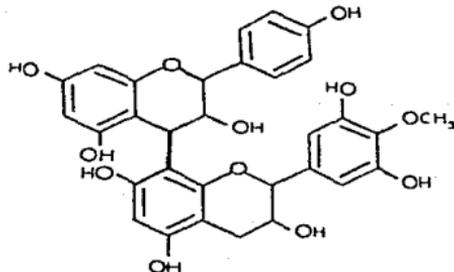
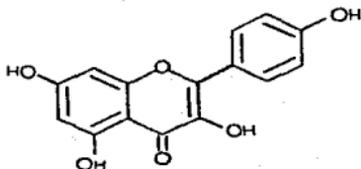
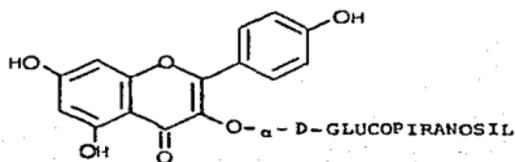
1 PRIONOSTEMADIONA2 PRISTIMERINA3 (-)-4'-O-METIL EPIGALOCATEQUINA4 PROANTOCIANIDINA5 KAEMFEROL6 3-O- α -D-GLUCOPIRANOSIL
KAEMFEROL

FIGURA 1. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE ALGUNAS
ESPECIES DEL GENERO HIPPOCRATEA.

Tabla 2.- PLANTAS PRODUCTORAS DE POLIISOPRENOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN	METODO COMERCIAL DE OBTENCION DE POLIISOPRENO
PRODUCTORES DE CAUCHO			
Apocynaceae	<u>Alstonia</u> spp	-	Insición múltiple en el tronco
	<u>Dyera</u> spp	-	Insición simple en el tronco
	<u>Funtumia elástica</u>	-	Insición múltiple en el tronco
	<u>Landolphia</u> spp	-	Insición múltiple en la parra
Asclepiadaceae	<u>Cryptostegia grandiflora</u>	-	Insición en brotes sin retoño e insición en hojas
Compositae	<u>Parthenium argentatum</u>	Guayule	Molienda total de la planta
	<u>Scorzonera tau-saghyz</u>	-	Molienda de la raíz
	<u>Solidago</u> Spp	Vara de Oro	Molienda o extracción con disolventes de la hoja.
	<u>Taraxacum kok-saghyz</u>	Diente de León Ruso	Molienda de la raíz
Euphorbiaceae	<u>Hevea brasiliensis</u>	Arbol de hule	Insición simple en el tronco
	<u>Manihot glaziovii</u>	Arbol de hule	Insición múltiple en el tronco
Moraceae	<u>Castilla</u> (Castilloa) spp	Arbol de hule	Insición múltiple en el tronco
	<u>Ficus elástica</u>	Arbol de hule de la India	Insición múltiple en el tronco

TABLA 2 PLANTAS PRODUCTORAS DE POLISOPRENOS DE IMPORTANCIA COMERCIAL (CONTINUACION)

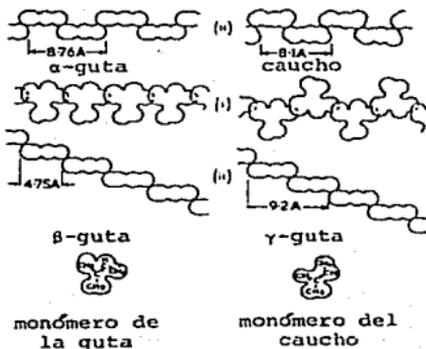
PRODUCTORES DE GUTA			
Celastraceae	<u>Euonymus europaeus</u>	Arbol Spindle*	Molienda o extracción con disolventes
Eucommiaceae	<u>Eucommia ulmoides</u>	-	Molienda o extracción con disolventes
Euphorbiaceae	<u>Cnidocolus elasticus</u>	Chiltè rojo	Múltiple insición en el tronco
	<u>Cnidocolus tepiquensis</u>	Chiltè blanco	Múltiple insición en el tronco
Sapotaceae	<u>Mimusops balata</u>	Arbol bala	Múltiple insición en la corteza, expresión de la corteza.
	<u>Palenquium gutta</u>	Arbol taban*	Insición múltiple en el tronco, maceración y decocción de las hojas.
PRODUCTORES DE CHICLE			
Sapotaceae	<u>Achras sapota</u>	Arbol Sapodilla	Insición múltiple en el tronco.

* NOMBRES REGIONALES DE LAS PLANTAS, NO EXISTE TRADUCCION

El caucho es un polímero muy elástico que puede ser estirado considerablemente antes de su ruptura y cuando cesa el estiramiento regresa a su estado original.

La guta es mucho menos elástica y más rígida. Este diferente comportamiento se debe a la diferencia en la cristalinidad entre ambas sustancias: a temperatura ambiente el caucho es amorfo y las moléculas están dispuestas al azar; cuando se extiende, las moléculas se alinean con la consecuente cristalización y endurecimiento. La guta, por el contrario, es parcialmente cristalina a temperatura ambiente y por lo tanto más dura; un calentamiento ligero puede hacerla más flexible. Análogamente cuando se enfría puede hacerse dura y menos flexible.

La guta es polimórfica y presenta tres modificaciones cristalinas la α , β y γ . A temperatura ambiente y sin estiramiento predomina la modificación γ , al estirar predomina la α y cuando se calienta por arriba de 70°C y se enfría de inmediato prevalece la β . Estas tres formas polimórficas se ilustran en la Figura 3.



- i. proyección en el plano de la doble ligadura
- ii. proyección perpendicular al plano de la doble ligadura.

FIGURA 3. MODIFICACIONES CRISTALINAS DE LA GUTA

La guta-percha es empleada en forma de solución clorofórmica como medio de aplicación de fármacos a la piel; como tejido de guta-percha se utiliza como recubrimiento para impermeabilizar telas, y en la manufactura de instrumentos quirúrgicos -- (Trease, 1986). También la guta se emplea en la fabricación de pelotas de golf, de cables submarinos, tubos y láminas (Kirk, Othmer, 1982; Archer y Audley, 1973).

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

El estudio químico de las plantas medicinales usadas en la medicina tradicional con miras a determinar sus elementos constitutivos y a la búsqueda de nuevos y/o conocidos principios activos está bien justificado, particularmente si dichos principios o la materia prima son efectivos para combatir, a un costo menor, aquellas enfermedades que más afectan a una población dada. La crítica situación económica de México y sus múltiples problemas de salud justifican aún más este tipo de proyectos.

Considerando lo antes expuesto el propósito fundamental del presente trabajo es el estudio químico de la Hippocratea -- excelsa H.B.K., planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana. Para ello se consideran pertinentes los siguientes objetivos específicos:

- 2.1 Recopilar información botánica, química y farmacológica de Hippocratea excelsa H.B.K..
- 2.2 Preparar el extracto hexánico de la corteza, siguiendo las técnicas fitoquímicas convencionales.
- 2.3 Separar y purificar el mayor número de constituyentes del extracto obtenido en el punto 2.2.
- 2.4 Preparar el extracto metanólico de la corteza previamente extraída con con hexano.
- 2.5 Fraccionar el extracto resultante del punto 2.4.
- 2.6 Separar algunos de los constituyentes del extracto metanólico.
- 2.7 Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas del extracto hexánico.
- 2.8 Correlacionar en lo posible los resultados químicos obtenidos con las actividades biológicas que se le atribuyen a esta especie.
- 2.9 Fomentar la investigación interdisciplinaria en México.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal (corteza radical y de tallo) utilizado en este estudio fué recolectado en Jaloalpan, Puebla en Octubre de 1987.

Una muestra de referencia se depositó en el Jardín Botánico exterior, Voucher: R. Bye y E. Linares, 16511.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, y posteriormente se molió en un molino de cuchillas, modelo Wiley 4 utilizando una malla No. 4.

3.2 ANALISIS CROMATOGRAFICOS

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio cubiertas de gel de sílice adquiridas comercialmente (gel de sílice 60, GF-254, Merck).

Los sistemas de disolventes y los agentes cromogénicos empleados, se resumen en las Tablas 3 y 4.

TABLA 3.-SISTEMAS DE DISOLVENTES UTILIZADOS PARA LOS ANALISIS CROMATOGRAFICOS EN CAPA FINA.

SISTEMA DE DISOLVENTES	COMPOSICION	PROPORCION %
I	Cloroformo	100
II	Cloroformo - Acetato de etilo	90 - 10
III	Cloroformo - Acetona	70 - 30
IV	Cloroformo - Metanol	95 - 5
V	Cloroformo - Metanol	90 - 10
VI	Hexano - Metanol	95 - 5
VII	Hexano - Metanol	80 - 20
VIII	Hexano - Acetona	95 - 5
IX	Hexano - Acetato de etilo	90 - 10

TABLA 4.- AGENTES REVELADORES UTILIZADOS PARA LOS ANALISIS CROMATOGRAFICOS EN CAPA FINA.

AGENTE REVELADOR	COMPOSICION	REFERENCIA
Reactivo de Dragendorff	2.6 g de carbonato de bismuto, 7 g de yoduro de sodio y 25 ml. de ácido acético glacial	Sthal, 1965
Sulfato cérico*	Sulfato cérico amoniacal 12 g, ácido sulfúrico concentrado 22.2 ml., 350 g. de hielo	Sthal, 1965
Iodo	Iodo metálico	

* Para el desarrollo de color era necesario calentar por 2 minutos, aproximadamente a 110°C.

3.3. ENSAYO PARA ALCALOIDES.

Tomando en cuenta la posible existencia de alcaloides en la muestra vegetal se hicieron ensayos con 5 g. de muestra. Cada muestra se maceró por separado durante 72 hrs. en diferentes disolventes (una con hexano, otra con cloroformo y una última con metanol); en todos los casos se utilizó 50 ml del disolvente correspondiente.

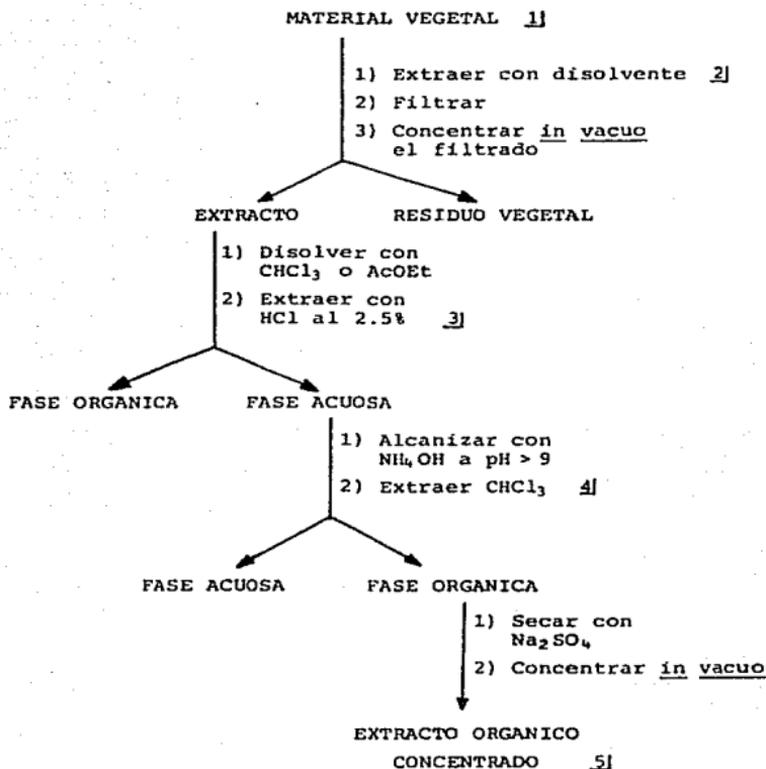
Posteriormente a cada uno de los extractos se les hizo una partición ácido-base y se probó la existencia de alcaloides, con los reactivos de Mayer y Dragendorff de acuerdo a la metodología previamente descrita (Harborne, 1984).

El procedimiento para realizar las pruebas anteriores se resume en el Esquema 1.

3.4. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS HEXANICO Y METANOLICO DE LA CORTEZA DE Hippocratea excelsa H.B.K

El material vegetal (3.55 Kg) se trató según el procedimiento mostrado en el Esquema 2 y el extracto metanólico se fraccionó a grosso modo siguiendo la metodología señalada en el Esquema 3. Parte del extracto de acetato de etilo (120 g) obtenido de la partición (Esquema 3) se fraccionó mediante una cromatografía en columna, usando como adsorbente gel de sílice (1500 g de Sílica Gel G-60, Merck 0.2-0.5 mm).

El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones; se obtuvieron un total de 318 fracciones de 500 ml. cada una, uniéndose 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.



1] 5 g de muestra

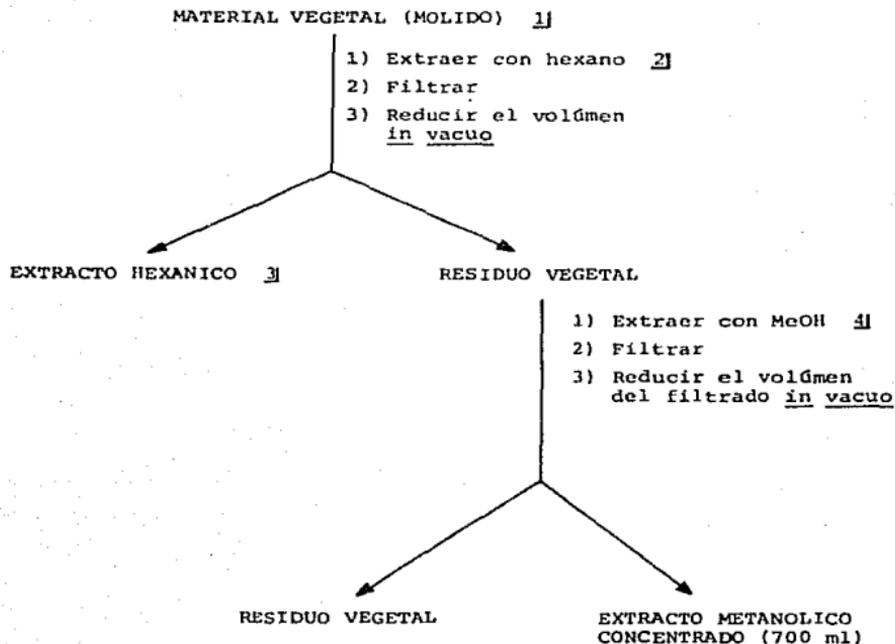
2] Se usó hexano cloroformo o metanol (50 ml) y cada extracción se hizo por separado.

3] 4 extracciones de 20 ml en los tres casos.

4] 4 extracciones de 25 ml en los tres casos.

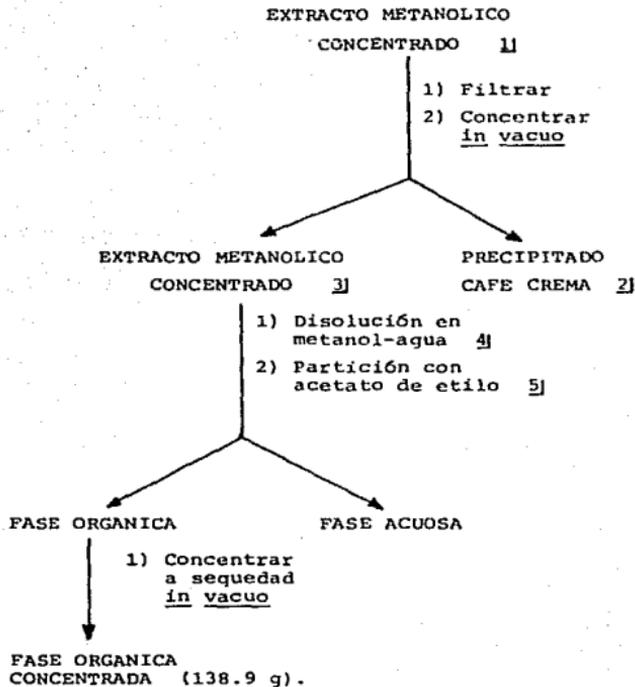
5] Sobre este extracto se realizaron las pruebas para alcaloides.

Esquema 1. DETERMINACION CUALITATIVA DE ALCALOIDES EN LOS EXTRAC-
TOS HEXANICO, CLOROFORMICO Y METANOLICO DE LA CORTEZA
DE Hippocratea excelsa.



- 1] Cantidad del Material Vegetal: 3.55 Kg.
- 2] Extracción vía Maceración (2 veces por periodos de 48 hrs. cada vez, con un volúmen aproximado de 10 l.)
- 3] Volúmen del extracto hexánico 300 ml.
- 4] Extracción vía maceración (4 veces por periodos de 48 hrs. cada vez, con un volúmen aproximado de 8 l), a temperatura ambiente.

ESQUEMA 2. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS HEXANICO Y METANOLICO DE LA CORTEZA DE Hippocratea excelsa.



1] Ver Esquema 2.

2] Precipitó en forma espontánea, 20 g.

3] Peso del extracto metanólico, 280 g

4] Los 280 g de extracto metanólico se disolvieron en un litro de agua y 200 ml de metanol.

5] Volúmen de extracción del acetato de etilo, un litro por vez. Se realizaron 55 extracciones.

ESQUEMA 3. FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO METANOLICO DE LA CORTEZA DE Hippocratea excelsa.

TABLA 5.- RESUMEN DE FRACCIONAMIENTO VIA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO ACETATO DE ETILO

ELUYENTE	PROPORCION	No. FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS.
Hexano	100	1-19	1-11
Hexano-Cloroformo	90:10	20-43	12-18
Hexano-Cloroformo	80:20	44-56	19-27
Hexano-Cloroformo	70:30	57-67	28-46
Hexano-Cloroformo	50:50	68-82	47-56
Hexano-Cloroformo	25:75	83-94	57-89
Cloroformo	100	95-117	90-100
Cloroformo-Metanol	99:1	118-162	101-108
Cloroformo-Metanol	97:3	163-186	109-116
Cloroformo-Metanol	95:5	187-203	117-126
Cloroformo-Metanol	90:10	204-220	127-169
Cloroformo-Metanol	80:20	221-259	170-177
Cloroformo-Metanol	70:30	260-292	178-215
Cloroformo-Metanol	60:40	293-307	216-221
Cloroformo-Metanol	50:50	308-318	222-227
			228-236
			237-251
			252-257
			258-264
			265-269
			270-287
			288-297
			298-307
			308-318

3.5 SEPARACION Y PURIFICACION DE ALGUNOS DE LOS CONSTITUYENTES DE LAS FRACCIONES 126-169 EN LA COLUMNA DE LA TABLA 5, - OBTENIDAS DEL EXTRACTO ACETATO DE ETILO RESULTANTE DEL PROCESO DE PARTICION DEL EXTRACTO METANOLICO

De las fracciones 126-169 (Tabla 5) precipitó un polvo de color blanco que luego de sucesivas lavadas con metanol originó 426.7 mg de un polvo cristalino (RL-84") P_f.380°C con descomposición.

El análisis cromatográfico del producto anterior, utilizando como eluyente el sistema II, indicó que el mismo era una mezcla de varias sustancias, visibles a la luz ultravioleta ; estas sustancias también fueron visualizadas al exponer la cromatoplaca en una cámara de I₂.

La separación de los componentes de la mezcla cristalina, se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, utilizando placas de gel de sílice (placa sílica gel, F-254, de 20 x 20, 0.25 mm. espesor) y como fase móvil el sistema III.

En cada placa fue posible visualizar 7 componentes diferentes, los cuales se separaron de acuerdo a la metodología convencional.

Los productos separados se indican en la Tabla 6, con sus respectivas claves.

TABLA 6.- PRODUCTOS SEPARADOS DEL PRECIPITADO OBTENIDO DE LAS FRACCIONES 126-129 DE LA TABLA 5.

CLAVE	PESO (mg)
RL-10 A	6.5
RL-10 B	31.6
RL-10 C	14.2
RL-10 D	20.6
RL-10 E	204.8
RL-10 F	31.8
RL-10 G	20.8

Actualmente tres de estos componentes se encuentran en proceso de caracterización.

Las aguas madres de las fracciones 126-169 se combinaron con las fracciones 117-177 de la columna de la Tabla 5. Como resultado de esta combinación se obtuvieron 14.7 g. de un residuo amarillo naranja; 10g. de este fueron cromatografiados sobre una columna de alúmina neutra (106 g.). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-acetona y acetona en diferentes proporciones. En total se obtuvieron 149 fracciones de 50 ml cada una. Todos los datos relacionados con esta columna se resumen en la Tabla 7.

TABLA 7.- RESUMEN DE LA SEPARACION VIA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE LAS FRACCIONES 127-177 DE LA TABLA 5.

ELUYENTE	PROPORCION	No.FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano	100	1-10	1-14
Hexano-Acetona	95:5	11-20	15-29
Hexano-Acetona	90:10	21-48	30-46
Hexano-Acetona	85:15	49-62	47-62
Hexano-Acetona	75:25	63-105	63-113
Hexano-Acetona	60:40	106-122	114-127
Hexano-Acetona	50:50	123-137	128-149
Acetona	100	137-147	

De las fracciones 63-113 de la columna resumida en la Tabla 7, se obtuvo un polvo blanco ligero; para purificarlo se disolvió en la mínima cantidad posible de acetona y se precipitó con hexano; al filtrar el precipitado se obtuvieron 502.1 mg. de un polvo blanco con P.f.=155-160°C Este compuesto también se encuentra en proceso de caracterización.

3.6 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORI- TARIOS DEL EXTRACTO HEXANICO

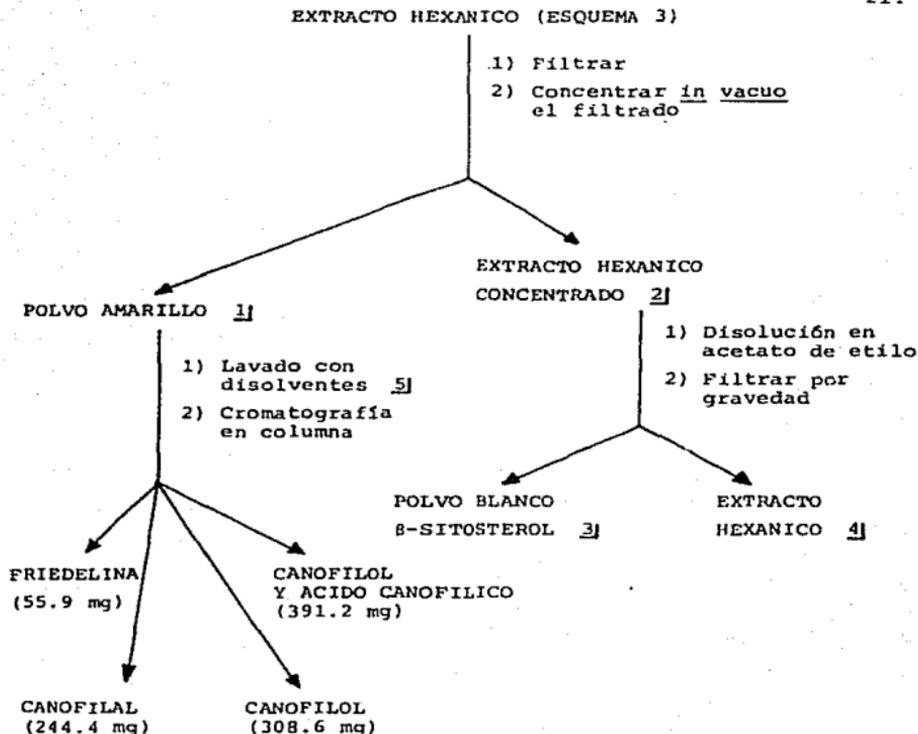
Al reducir el volúmen del extracto hexánico precipitó en forma espontánea 2.0144 g, de un polvo amarillo constituido por varios componentes de acuerdo con el análisis cromatográfico en capa fina.

Para eliminar el pigmento amarillo, el polvo se lavó repetidas veces con una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1) y finalmente con acetona; en ambos casos el disolvente se calentó a una temperatura menor a la del punto de ebullición.

Al cabo de este proceso se obtuvo un polvo blanco (1.2684 g), que posteriormente se cromatografió en una columna de gel de sílice (23.37 g, sílica gel G-60, ART-7734, 0.063-0.2 mm).

El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo, y cloroformo-acetato de etilo en diferentes proporciones; se recogieron un total de 330 fracciones de 15 ml cada una.

El Esquema 4 muestra el proceso de fraccionamiento del extracto hexánico y en la Tabla 8 se resume la información correspondiente a la separación cromatográfica de algunos de los constituyentes del extracto hexánico.



1] Peso del polvo: 2.0144 g.

2] Peso extracto hexánico: 25.7491 g.

3] Precipita en forma de gel, peso 686.9 mg (β -sitosterol).

4] Peso extracto hexánico: 25.0622 g.

5] Lavados con mezcla hexano-acetato de etilo (1:1) y acetona.

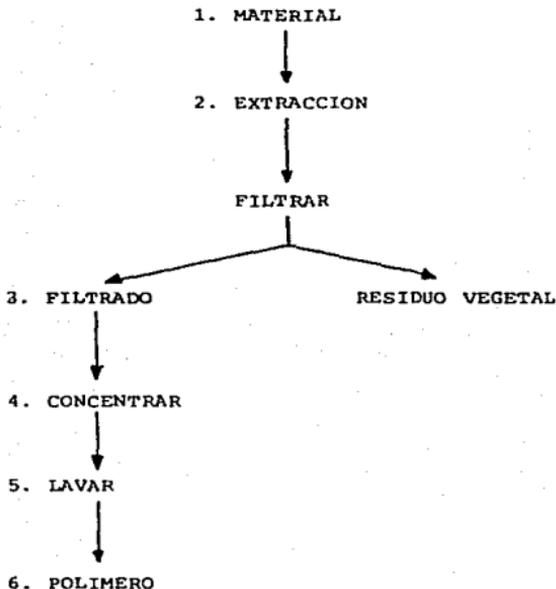
ESQUEMA 4. FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTO HEXANICO.

TABLA 8. RESUMEN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA QUE PERMITIÓ
LA SEPARACIÓN DE ALGUNOS DE LOS CONSTITUYENTES
DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

ELUYENTE	PROPORCIÓN	No. FRACCIONES	COMBINACIÓN DE FRACCIONES
Hexano	100	1-13	1-19
Hexano-Cloroformo	75-25	14-64	20-49
Hexano-Cloroformo	50-50	65-233	50-60
Hexano-Cloroformo	40-60	234-260	61-87
Hexano-Cloroformo	20-80	261-274	88-116
Cloroformo	100	275-299	117-125
Cloroformo-Ac. de etilo	90-10	300-312	126-262
Cloroformo-Ac. de etilo	80-20	313-322	263-305
Cloroformo-Ac. de etilo	50-50	323-330	306-330

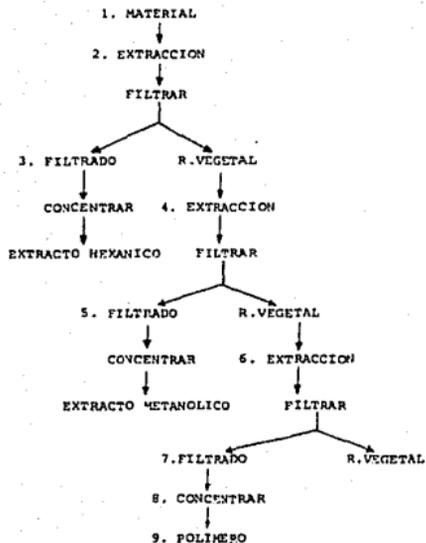
- 3.6.1 AISLAMIENTO DE LA FRIEDELINA 9: De las fracciones 20-49 de la columna de la Tabla 8 se obtuvieron 55.9 mg de un polvo blanco cromatograficamente puro, P.f. = 250-252°C (MeOH).
- 3.6.2 AISLAMIENTO DEL CANOFILAL 10: De las fracciones 64-87 de la columna de la Tabla 8 se obtuvieron 244.4 mg de un sólido blanco cristalino, homogéneo en varios sistemas cromatográficos, P.f. = 250-255 °C (MeOH).
- 3.6.3 AISLAMIENTO DEL CANOFINOL 11: De las fracciones 88-116 de la columna de la Tabla 8, cristalizaron 308.6 mg de un compuesto puro de P.f. = 272-275 °C (MeOH).
- 3.6.4 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ACIDO CANOFILICO 12: De las fracciones 117-262 de la columna de la Tabla 8, se obtuvieron 391.2 mg de un polvo blanco; cromatograficamente este polvo resulto ser una mezcla de Canofilol, 11, y de otra sustancia de R f. muy similar.
- La resolución de la mezcla en sus componentes individuales se realizó acetilando el alcohol y posterior separación cromatográfica. Para ello la mezcla original se trato con anhídrido acético (4 ml) y piridina (4 ml); al cabo de la reacción el crudo fue procesado siguiendo el procedimiento usual, obteniendose 362.2 mg de una mezcla de dos productos de diferente R f.. Luego de cromatografiar la mezcla anterior vía cromatografía preparativa en capa gada (gel de sílice como adsorbente y CHCl₃ como eluyente) se obtuvieron 54.33 mg de Acido Canofílico, 12, P.f.= 317 °C (MeOH) y 318.4 mg del Acetil Canofilol, 11a, P.f.= 166 °C. La cantidad del derivado acetilado corresponde a 336 mg adicionales de Canofilol 11. El rendimiento total de 11 fue de 644.6 mg.

- 3.6.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL β -SITOSTEROL, 13: Al disolver el extracto hexánico en acetato de etilo precipito un polvo café, que luego de varias lavadas con metanol origino 687 mg de una sustancia pura de color blanco nacar y P.f.= 140°C. Este producto fue identificado como β -Sitosterol por comparación con una muestra auténtica siguiendo la metodología convencional.
- 3.7 OBTENCION DEL TRANS POLIISOPRENO DE LA CORTEZA DE HIPPOCRATEA EXCELSA.
- 3.7.1 OBTENCION DEL TRANS-POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO VIA MACERACION A PARTIR DE LA CORTEZA VEGETAL: El procedimiento seguido para la obtención del polimero utilizando cloroformo como disolvente se resume en el Esquema 5.
- 3.7.2 OBTENCION DEL TRANS-POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO VIA MACERACION A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL PREVIAMENTE EXTRAIDO CON HEXANO Y METANOL: Esta extracción así como los datos relacionados con la misma se resumen en el Esquema 6.
- 3.7.3 OBTENCION DEL TRANS-POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO A PARTIR DE LA CORTEZA PREVIAMENTE EXTRAIDA CON HEXANO Y METANOL, UTILIZANDO EL CLOROFORMO A UNA TEMPERATURA DE 61-62°C: Este proceso se encuentra condensado en el Esquema 7. Esencialmente fue igual al anterior, difiriendo tan solo en la temperatura del disolvente.



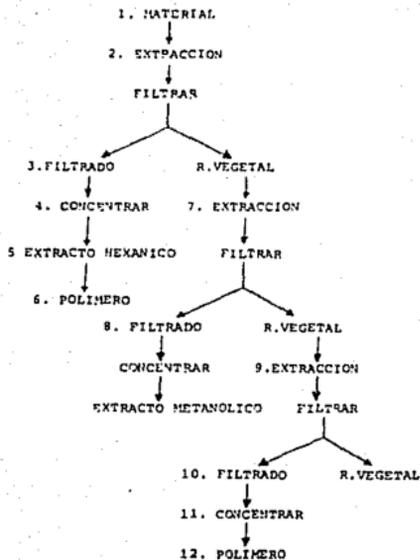
1. Corteza radical y de tallo de Hippocratea excelsa H.B.K., se usaron 5.0 g.
2. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 horas) a temperatura ambiente usando 100 ml de cloroformo por vez.
3. Filtrado, líquido amarillo brillante.
4. Se concentró a sequedad in vacuo, obteniéndose una película amarilla.
5. Lavado con CHCl_3 - acetato de etilo (1:1), 10 ml por vez hasta obtener una película blanca.
6. El peso de la película fué de 330 mg que equivale al 6.6% de la muestra total.

ESQUEMA 5. OBTENCION DEL TRANS POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO VIA MACERACION A PARTIR DE LA CORTEZA VEGETAL.



1. Corteza radical y de tallo de Hippocratea excelsa H.D.K., se usaron 5.93 g de muestra.
2. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 hrs.) a temperatura ambiente, usando 100 ml de hexano por vez.
3. Filtrado, líquido rojo naranja.
4. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 hrs) a temperatura ambiente usando 100 ml de metanol por vez.
5. Se obtuvo un filtrado rojo oscuro.
6. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 hrs) a temperatura ambiente, usando 100 ml de cloroformo por vez.
7. El filtrado obtenido da un líquido incoloro ligeramente viscoso.
8. Concentrar in vacuo, formándose una película blanca.
9. El peso de la película es de 200 mg que equivale al 3.3% del peso total de la muestra.

ESQUEMA 6. OBTENCION DEL TRANS POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO VIA MACERACION A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL PREVIAMENTE EXTRAIDO CON HEXANO Y METANOL



1. Corteza radical y de tallo de Hippocratea excelsa H.B.K., se utilizaron 5.70 g.
2. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 hrs.) a temperatura ambiente usando 100 ml de hexano cada vez.
3. El filtrado obtenido es un líquido rojo naranja.
4. Se concentró in vacuo obteniéndose una película amarilla naranja.
5. Se lavó el extracto concentrado con cloroformo-acetato de etilo (1:1) con volúmenes de 10 ml cada vez.
6. Se obtuvo una película blanca que pesó 75.3 mg que equivale al 1.3% del peso total de la muestra.
7. Extracción vía maceración (3 veces durante 48 hrs.) a temperatura ambiente, usando 100 ml de metanol por vez.
8. Se obtuvo un filtrado de color rojo obscuro.
9. La extracción se realizó sin maceración, (5 veces) con cloroformo a 61-62°C, usando un volumen de 40 ml por vez.
10. Filtrado incoloro ligeramente viscoso.
11. Se concentró in vacuo formando una película incolora.
12. Película blanca que pesó 563.7 mg que equivale al 9.7% del peso total de la muestra. El porcentaje total del polímero de la muestra fue de 11.04, que equivale a 639 mg, tomando en cuenta lo obtenido en extracción con hexano.

ESQUEMA 7. OBTENCION DEL TRANS-POLIISOPRENO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO PREPARADO A PARTIR DE LA CORTEZA PREVIAMENTE EXTRAIDA CON HEXANO Y METANOL, UTILIZANDO EL CLOROFORMO A UNA TEMPERATURA DE 61-62°C.

3.8 CARACTERIZACION DE LAS SUTANCIAS AISLADAS

3.8.1 DETERMINACION DE CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Buchi 530 y no estan corregidos, los espectros de IR. fueron registrados en un instrumento Perkin-Elmer 599-B en pastilla de KBr. Los espectros de RMN¹H se determinaron en un instrumento FT-80 Varian, utilizando como disolventes CDCl₃ y/o DMSO-d₆ y como referencia interna TMS.

Los espectros de masa fueron obtenidos en un aparato Hewlett-Packard 59-88A. El termograma para el polímero se efectuó en un termógrafo Perkin-Elmer II; la determinación del peso molecular del mismo se efectuó en una columna de permeación en gel Waters modelo 3 y finalmente, la viscosidad se determinó por picnometría. Los tres últimos análisis fueron realizados en el departamento de fisicoquímica de la Facultad de Química bajo la supervisión del Dr. Joaquín Palacios A.

3.8.2 OBTENCION DE DERIVADOS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS

A) Obtención del Acetato de Sitosterilo 13a y del Acetil Canofilol 11a

Para formar los derivados acetilados se emplearon 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de muestra. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó 14 hrs. a temperatura ambiente, y al cabo de este tiempo se proceso de la manera habitual (Shriner, Fuson y Curtin 1980).

En la tabla 9 se resumen los compuestos que fueron acetilados, así como los rendimientos y punto de fusión de los compuestos obtenidos.

TABLA 9 OBTENCION DE LOS DERIVADOS ACETILADOS

COMPUESTO	PESO DEL COMPUESTO	PRODUCTO	PESO DEL ACETILADO	PUNTO DE FUSION
β -Sitosterol	100 mg	Acetato de Sitosterilo <u>13a</u>	40 mg	115-117°C
Canofilol <u>11</u>	100 mg	Acetil Canofilol <u>11a</u>	92.1 mg	166°C

B) OBTENCION DEL ACIDO CANOFILICO 12 A PARTIR DE CANOFILAL 10.

A 75 mg de Canofilal 10, en 17 ml de acetona se añadieron 285 mg de KMnO_4 . La mezcla se reflujo con agitación durante 2 hr., al cabo de este tiempo se añadió al crudo de la reacción 10 ml de cloroformo y la mezcla se extrajo sucesivamente con una solución de bisulfito de sodio al 10% (5 ml), H_2SO_4 al 10% (5 ml), y agua destilada. Finalmente, la fase orgánica se seco con sulfato de sodio anhidro, y el residuo cristalino resultante luego de

eliminar el disolvente se recrystalizó de metanol para originar 79.8 mg de Acido Canofílico 12 , P.f.= 260-263°C, idéntico al producto natural.

C) OXIDACION DE CANOFILOL 11 A CANOFILAL 10

A 50mg de Canofilol en 0.3 ml de piridina se le agregó una mezcla de piridina y trióxido de cromo (30mg/0.3ml). La mezcla se dejó reaccionar durante 3 hrs. con agitación y a una temperatura de 0°C.

Después de este tiempo al crudo de la reacción de le agregaron 10 ml de cloroformo, y la mezcla se extrajo sucesivamente con HCl 1 N (5 ml) y agua destilada.

Posteriormente la fase orgánica se seco con sulfato de sodio anhidro, y el residuo resultante luego de eliminar el disolvente se recrystalizó de metanol para producir 15.2 mg de Canofilal 10 de P.f.=264-269°C.

D) PREPARACION DEL METIL ESTER DEL ACIDO CANOFILICO 12a .

Para la obtención del derivado metilado se utilizó una solución etérea de diazometano , por cada 100 mg de muestra se utilizaron 20 ml de una solución de diazometano preparado 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 . La muestra (60 mg) se disolvió previamente en 10 ml de éter, y la mezcla se dejó reaccionando a temperatura ambiente durante 12 hrs.

Después de efectuada la reacción se obtuvieron 58.3 mg del producto 12a, P.f.= 222-224°C.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Aislamiento y caracterización de los constituyentes mayoritarios del extracto hexánico.

Del extracto hexánico de la corteza (radical y de tallo) de -- Hippocratea excelsa H.B.K., se obtuvo una mezcla de sustancias triterpenoides de tipo friedelano. La resolución de la mezcla anterior por métodos cromatográficos permitió aislar en forma pura los siguientes compuestos: Friedelina 9, Canofilal 10, Canofilol 11 y Acido Canofílico 12. También del extracto hexánico fue posible obtener el común esteroide β -Sitosterol 13. Las estructuras y los rendimientos de cada una de las sustancias 9-13 se resumen en la Tabla 10.

La caracterización de los compuestos aislados se hizo en base a métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos, y a continuación se presentaron las evidencias que permitieron proponer las estructuras de cada uno de los compuestos, 9-13.

TABLA 10. RENDIMIENTOS Y ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL EXTRACTO HEXANICO

NUMERO	NOMBRE	CANTIDAD OBTENIDA	% EN RELACION A LA PLANTA SECA	ESTRUCTURA
9	FRIEDELINA (FRIEDELAN-3-ONA)	55.9 mg	0.0015	
11	CANOFILOL (28-HIDROXI-FRIEDELAN-3-ONA)	664.6 mg	0.0181	
10	CANOFILAL (28-AL-FRIEDELAN-3-ONA)	244.4 mg	0.0068	
12	ACIDO CANOFILICO (28-CARBOXI-FRIEDELAN-3-ONA)	54.33 mg	0.0015	
13	8-SITOSTEROL	686.9 mg	0.0193	

4.1.1 IDENTIFICACION DE LA FRIEDELINA 9.

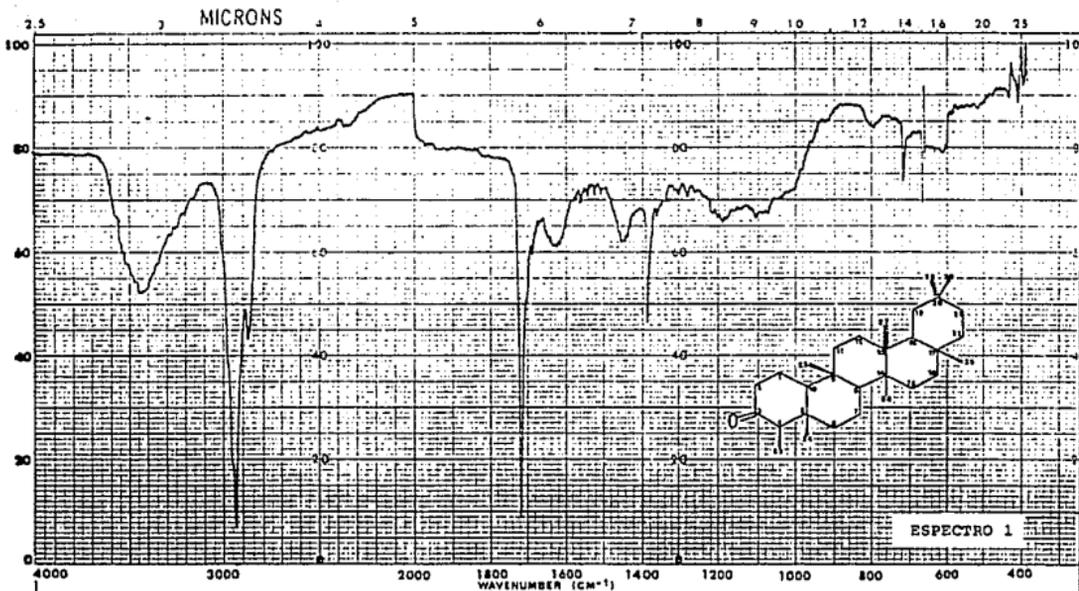
De las fracciones 20-49 de la columna de la Tabla 8 se obtuvo un polvo blanco, insípido y cromatográficamente homogéneo. Las constantes físicas y espectroscópicas de esta substancia se resumen en la Tabla 11.

El análisis global de los datos de la Tabla 11 permitieron establecer que este sólido era la Friedelina 9, y a continuación se resumen los aspectos mas importantes de este análisis:

- A) El espectro de IR. (Espectro 1) presentó bandas de absorción características para estiramiento carbono hidrógeno -- (2935 cm^{-1}), y para carbonilo de cetona en anillo de 6 miembros (1720 cm^{-1}).
- B) El espectro de masa (Espectro 2) presentó un ión molecular de m/z 426 ($C_{30}H_{50}O$), y otros picos importantes se observaron a m/z 411, 341, 302, 273, 205, 123 y 55 (pico base). Esos iones se producen mediante las fragmentaciones comunes para la serie de los triterpenos del tipo friedelan-x-ona los cuales se ilustran en la Figura 4 (Courtney, et al, 1963; Sengupta et al, 1968; Budzikiewicz et al, 1963). Como todas las rupturas señaladas de la Figura 4 ocurren con la pérdida de un hidrógeno adicional de la especie cargada, y como la mayor parte son originadas por la ruptura de dos enlaces presentan un valor de m/z impar. Es de hacer notar que el pico a m/z 55 (pico base) era consistente con la ubicación del único grupo carbonilo de la molécula en C-16 en C-3.
- C) El espectro de RMN¹H (Espectro 3), presentó señales para 7 metilos terciarios a δ 0.72, 0.87, 0.95, 1.04, 1.17, y un metilo secundario a δ 0.87 (d, $J=7\text{Hz}$), en concordancia con un núcleo friedelano. Las restantes señales no presentaron la resolución suficiente para ser asignadas; sin embargo el múltiple centrado a δ 2.19 era indicativo de tres protones vecinos al carbonilo de la molécula, y que de acuerdo al análisis del espectro de masas debía estar ubicado en la posición C-16 en C-3 de la molécula.

TABLA 11: CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DE LA FRIEDELINA 9

PUNTO DE FUSION	250-252°C	ESTRUCTURA
FORMULA MOLECULAR	$C_{30}H_{50}O$	
IR (KBr), cm^{-1} (ESPECTRO 1)	2935 1720 1390	
EMIE m/z (4) (ESPECTRO 2)	426 [M^+ (2)], 411 (1), 34 (1) 302 (2), 273 (5) 205 (7), 123 (26), 109 (35) 95 (50), 69 (80) 55 (99)	
RMN ¹ H (80 MHz, CDCl ₃) (ESPECTRO 3)	0.72 (3H, S) 0.87 (3H, S) 0.95 (3H, S) 0.99 (6H, S) 1.04 (3H, S) 1.17 (3H, S) 0.87 (3H, d, J=7Hz, H-23) 2.19 (3H, m, H-4, H-2, H-2')	



SAMPLE *RL-23*

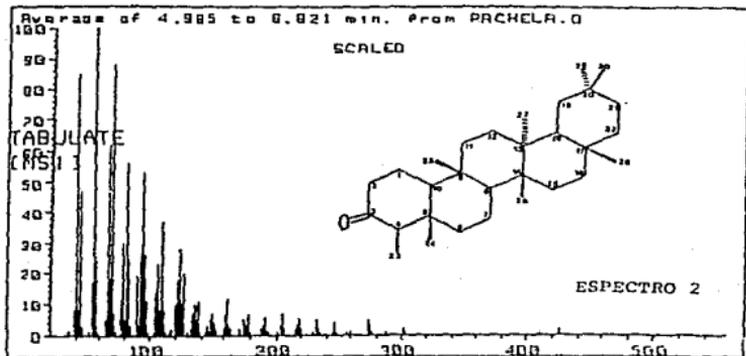
SOLVENT *EBA*
 CONC _____
 CELL PATH _____
 REFERENCE *arc*
 PERKIN ELMER

SCAN *EX 4*
 SLIT *W*
 OPERATOR *Chick*
 DATE *8-11-68*
 No. 5107-1000

SINGLE B. _____
 T.D. SPEED _____
 ORD. EXP. _____
 T.CONST _____
 REF. No. *20609*

REMARKS.

ORIGIN *Rachel Hata*



Para ubicar correctamente el carbonilo en la estructura se compararon los datos de la Tabla II con los previamente descritos en la literatura para Friedelina, resultando idénticos (Kapadia, 1964; Bhakuni, 1971 inter alia).

La comparación con el monocetoderivado en el carbono 1 no fué posible, ya que hasta la fecha no se encuentra reportado como producto natural.

Las evidencias antes mencionadas permitieron establecer que la sustancia aislada era la Friedelina.

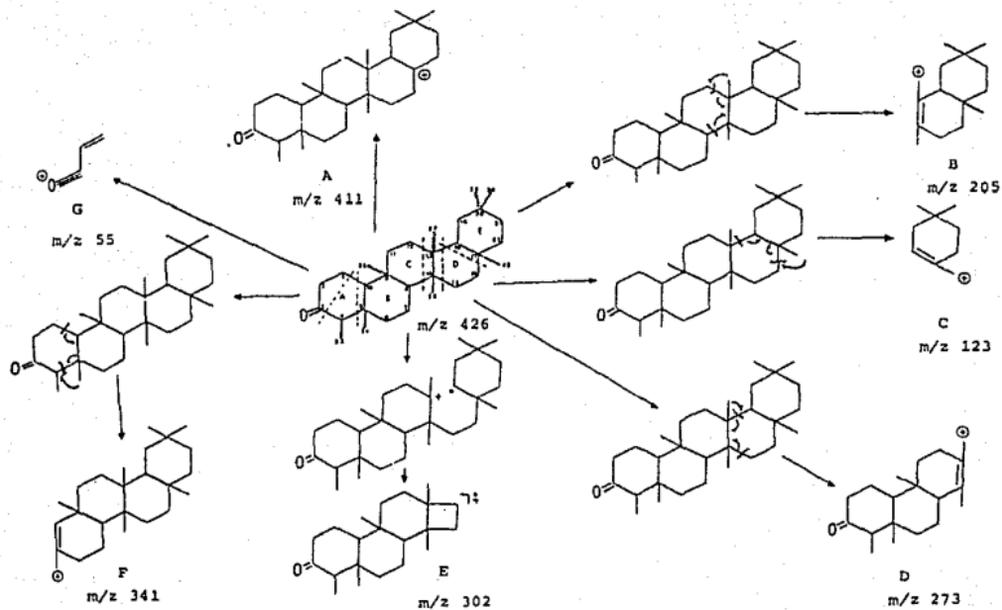


FIGURA 4.- IONES FRAGMENTOS CARACTERISTICOS PARA LOS FRIEDELANOS, USANDO COMO MODELO LA FRIEDELINA.

4.1.2 IDENTIFICACION DEL CANOFILOL 11.

El Canofilol 11 se obtuvo como un polvo blanco cristalino a partir de las fracciones 88-116 de la Tabla 8, sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 12.

La fórmula molecular de 11 se determinó como $C_{30}H_{50}O_2$ (espectrometría de masas), la cual permitía el mismo número de insaturaciones que la Friedelina.

En terminos generales las propiedades espectroscópicas y espectrométricas de este compuesto eran muy similares a las de la Friedelina. Su espectro de IR. (Espectro 4) mostró además de la absorción para cetona a 1700 cm^{-1} , una banda ancha a 3420 cm^{-1} característica de hidróxilo libre de un alcohol. El tratamiento de 11 con anhídrido acético y piridina generó el acetil derivado 11a corroborando su naturaleza carbinólica. Las características espectroscópicas y la estructura de este derivado se resumen en la Tabla 13.

El espectro de masa (Espectro 5) de 11 exhibió un ión molecular de m/z 442 (16 unidades de masa mas que la Friedelina), y presentó básicamente el mismo patrón de fragmentación que la Friedelina: m/z 55 (pico base), 411 (M^+ , CH_2OH), 357 (Fragmento F), 302 (Fragmento E), 273 (Fragmento D), 221 (Fragmento B), 137 (Fragmento C).

La pérdida de 31 unidades de masa del ión molecular era consistente con la naturaleza primaria de la función alcoholica presente, y los valores de masa correspondientes a los fragmentos F (m/z 357), B (m/z 221) y C (m/z 137) eran congruentes con la ubicación de este grupo funcional en los carbonos 28, 29 o 30 del esqueleto friedelano.

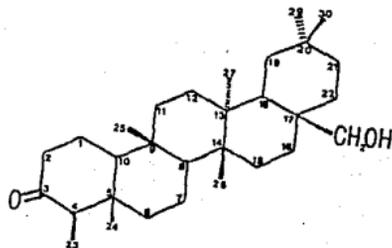
Todos los fragmentos antes mencionados se ilustran en la Figura 5.

Es de hacer notar, que la moderada intensidad del ión en m/z 411 permitía inferir a priori que muy probablemente el hidróxilo metileno se encontraba en la posición 28. (Delle Menache, et al, 1972).

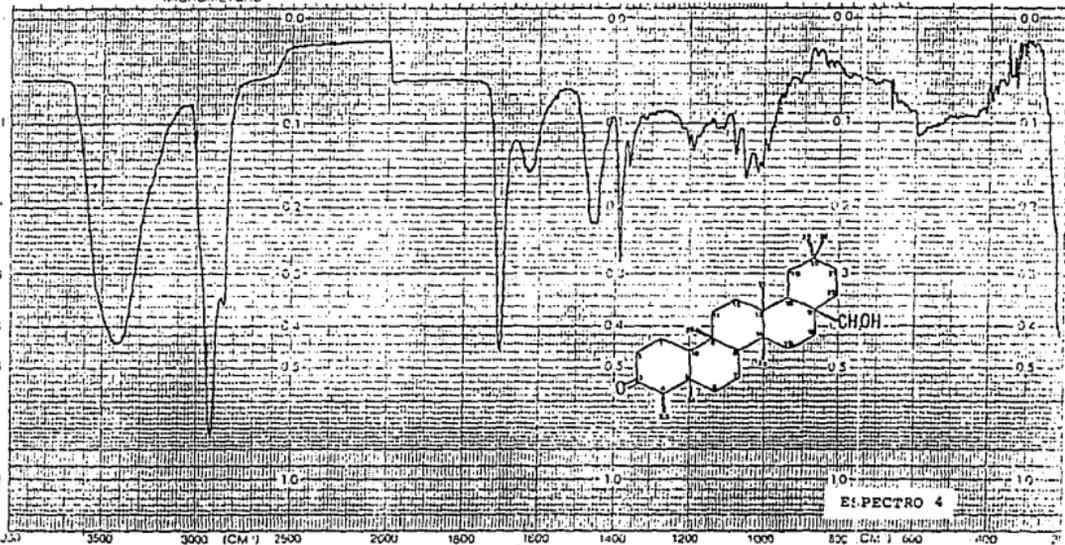
TABLA 12: CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL CANOFIOL 11

PUNTO DE FUSION	272-275°C
FORMULA MOLECULAR	C ₃₀ H ₅₀ O ₂
IR (KBr), cm ⁻¹ (ESPECTRO 4)	3420 (3600-3100) 2940, 1700, 1625, 1450, 1385.
EMIE m/z (int.rel) (ESPECTRO 5)	442(1), 427(1), 411(2180), 357(90), 302(158), 301(596) 273(2041), 247(1083) 233(388), 221(261) 203(573), 137(8544) 55(11426)
RMN ¹ H (80 MHz, CDCl ₃) (ESPECTRO 6)	0.71 (3H,S) 0.86 (3H,d, J=7 Hz, H-23) 0.86 (3H,S) 0.92 (3H,S) 0.97 (6H,S) 1.12 (3H,S) 2.20-2.34 (3H, m, C-2, C-4) 3.00 (1H,m,OH) 3.52 (2H,sa, H-28)

ESTRUCTURA



23 3 MICROMETERS PERKIN ELMER 6 (CHART #199-104) 6 10 12 14 16 20 25 50



ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REP. SCAN <u>—</u> SINGLE BEAM
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE <u>12</u>
SAMPLE <u>66-22</u>		REMARKS <u>Org. Still</u>		SPLIT PROGRAM <u>L</u>	OPERATOR <u>Hawels</u> DATE <u>25-1-67</u>
ORIGIN <u>Dra Rachel Mata</u>				SOLVENT <u>KCl</u>	CELL PATH <u>—</u>
				CONCENTRATION <u>—</u>	REFERENCE <u>CHC</u>

El espectro de RMN¹H (Espectro 6) mostró resonancias para:

- A) Seis grupos metilos terciarios [δ 0.71, 0.86, 0.92, 0.97 (6 H) y 1.12].
- B) Un metilo secundario (δ 0.86)
- C) La función carbinólica primaria a δ 3.52 (2H, S.a)

Esta señal se desplazó a campo bajo en el derivado acetilado 11a (Espectro 7) donde se observa como un sistema AB centrado en δ 4.10

- D) Un hidróxilo a δ 3.00 y que desaparecía luego de equilibrar el espectro con D₂O.

Para determinar la ubicación del grupo hidroximetileno en la molécula, la comparación de los desplazamientos químicos de 11a con aquellos correspondientes a los acetil derivados del 29 - hidroxí - friedelan 3-ona y del 30 - hidroxí - friedelan 3-ona fue de gran utilidad (Betancor, et al 1980; Govindachari, 1963). En la Tabla 14 se resumen en forma comparativa los desplazamientos químicos de los tres acetil derivados y claramente se puede observar que cuando la función oxigenada se encuentra en 29 ó 30 la señal del metileno aparece como un singulete a δ 3.90 y δ 3.75 respectivamente. En el caso del acetil derivado 11a la misma señal, como ya se indicó, aparece como un sistema AB centrado en δ 4.10.

En base al análisis anterior fue posible entonces identificar al alcohol como el canofilol (28-hidroxí-friedelan-3-ona) el cual ha sido aislado previamente de otras fuentes naturales (Kulshreshtha, 1970; Courtney, et al 1963; Govindachari, 1967). Las constantes físicas y espectroscópicas del producto 11 y su acetil derivado 11a concordaban perfectamente con las descritas previamente.

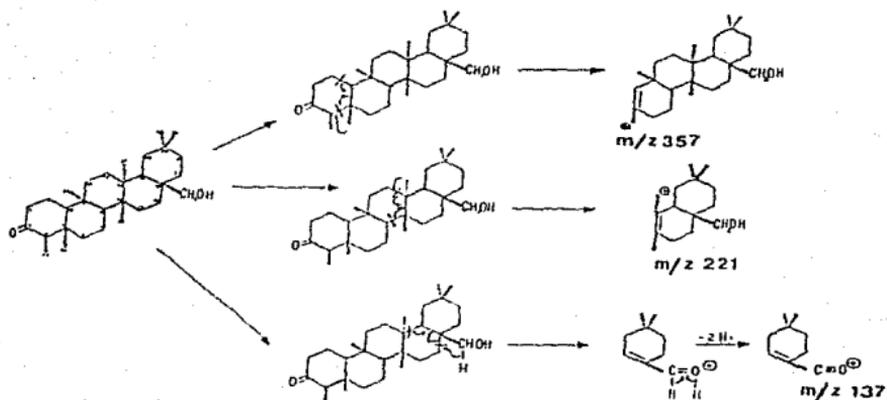
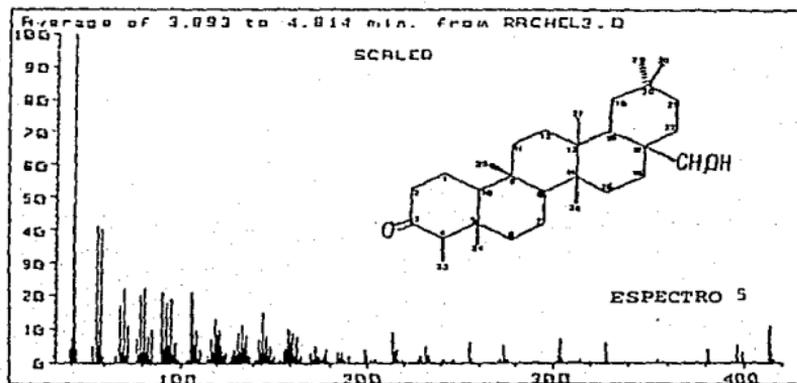


FIGURA 5 IONES FRAGMENTOS MAS IMPORTANTES EN EL ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO 11.



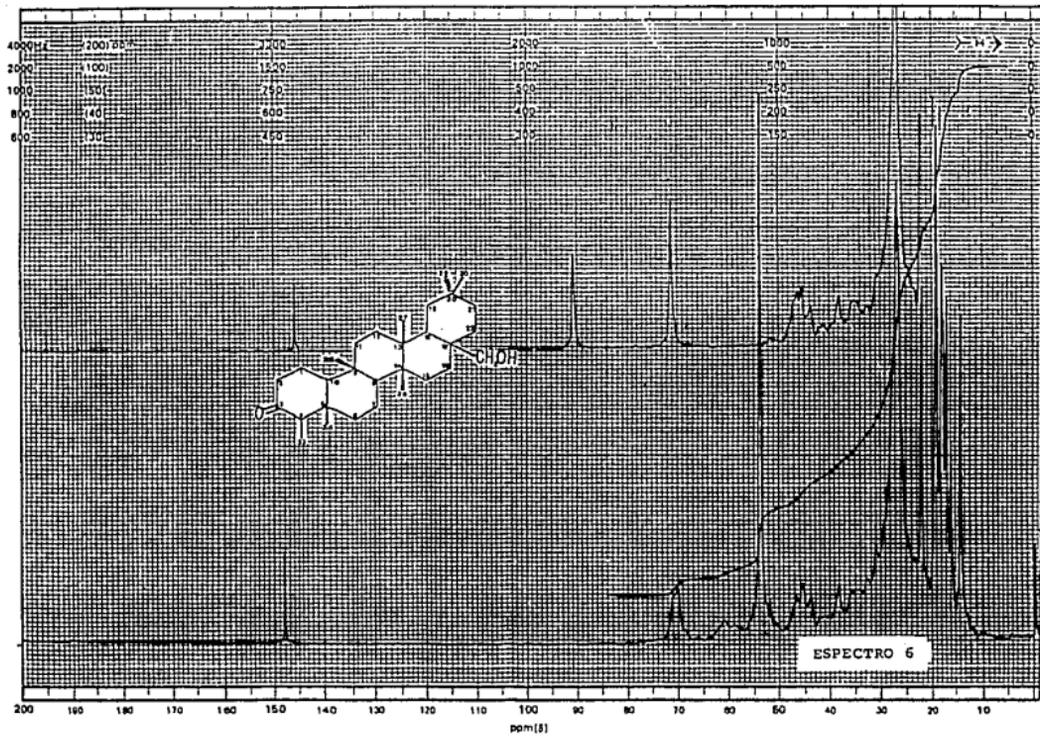
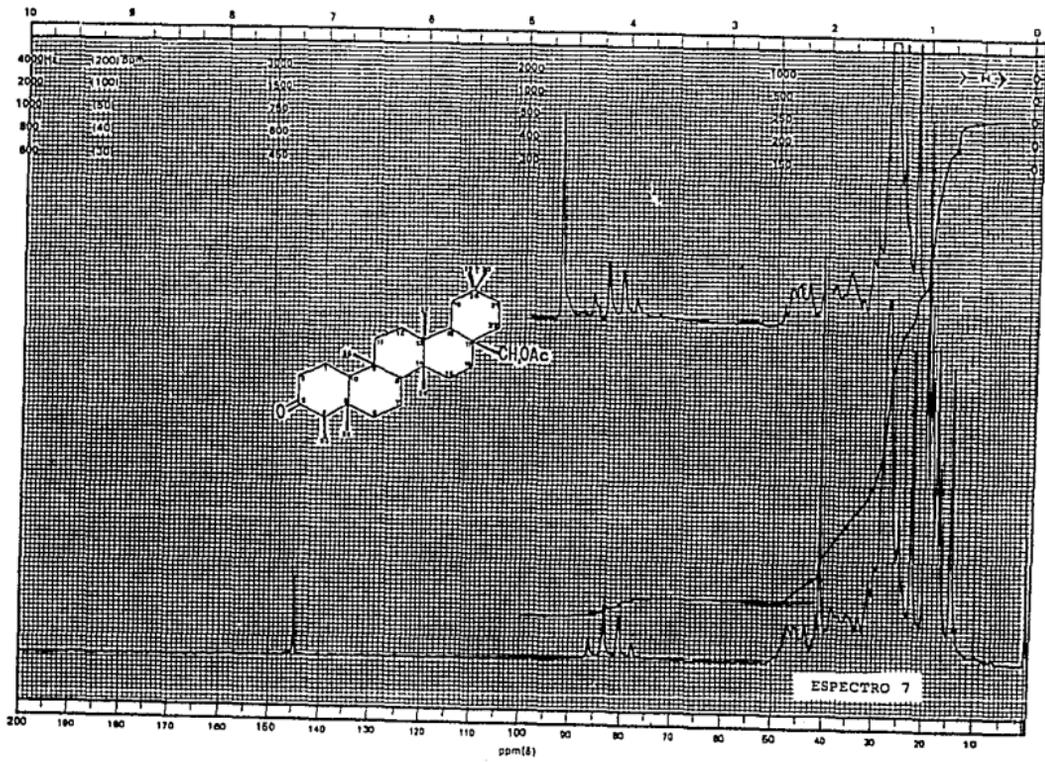
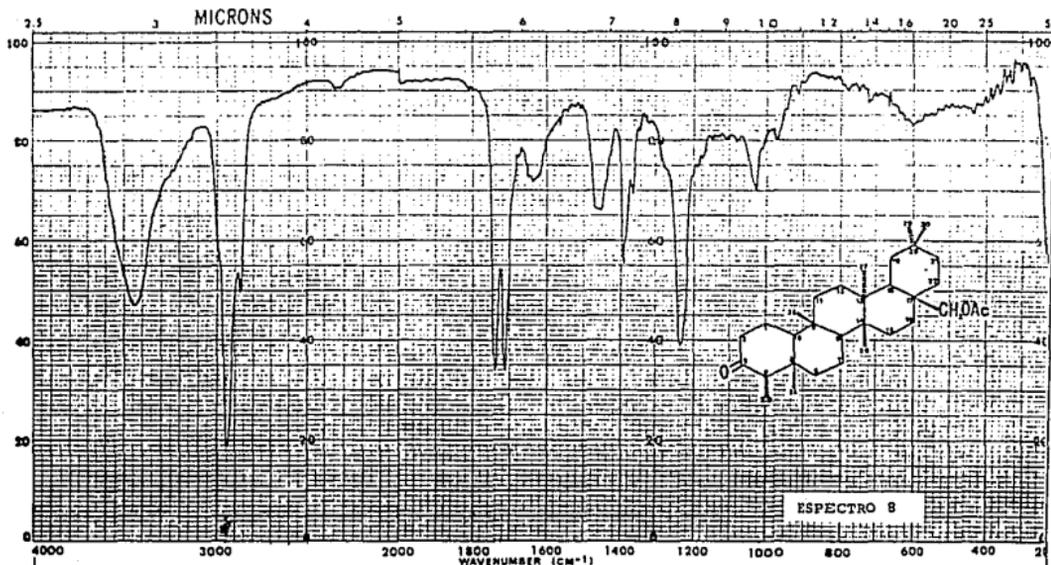


TABLA 13: CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL ACETIL CANOFILOL 11a

PUNTO DE FUSION 166°C	ESTRUCTURA
FORMULA MOLECULAR C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
IR (KBr) , cm ⁻¹ 34, 2950, 1740, 1460, 1390, 1235	
EMIE m/z (%) 424 [M ⁺ 60 (1)] , 411 (7), (ESPECTRO 9) 273 (11), 177 (14), 163 (10), 150 (18), 137 (28), 135 (16), 123 (29), 94 (34), 55 (61), 43 (100).	
RMN ¹ H (80MHz, CDCl ₃) 0.72 (3H, s), 0.87 (3H, s) (ESPECTRO 7) 0.94 (3H, s), 0.97 (6H, s) 1.12 (3H, s), 2.05 (3H, s, CH ₃ -C=O) 2.15- 2.40 (3H, m, H-2, H-4) 3.95 (d, 1H, J=10Hz, H-29) 4.25 (d, 1H, J=10Hz, H-28')	

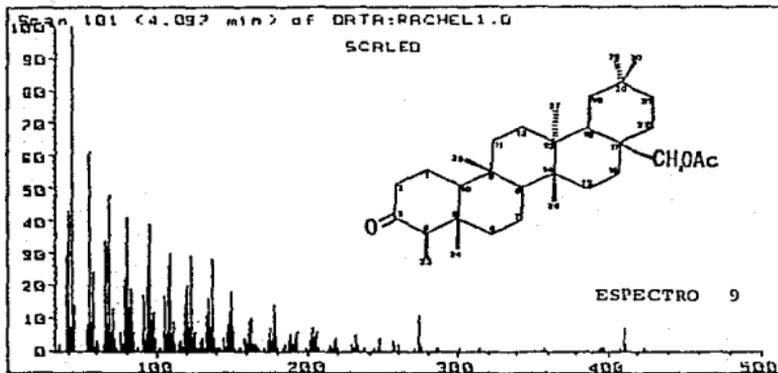




SAMPLE <i>R1-22 Acetilado</i>	SOLVENT <i>KBr</i>	SCAN <i>12</i>	SINGLE B. _____	REMARKS
	CONC _____	SLIT <i>N</i>	T.D. SPEED. _____	<i>pastille</i>
ORIGIN <i>Dra Rachel Hah</i>	CELL PATH _____	OPERATOR <i>Mausk</i>	ORD. EXP. _____	
	REFERENCE <i>oile</i>	DATE <i>9-VI-88</i>	T.CONST <i>1</i>	
PETRIN-ELMER		No. 5102-1000	REF. No. <i>20613</i>	

TABLA 14.- COMPARACION DE LOS DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS (RMN¹H) DE LOS DERIVADOS ACETILADOS DEL 29-ACETOXI-FRIEDELAN-3-ONA, 30-ACETOXI-FRIEDELAN-3-ONA Y DEL PRODUCTO 11a

<u>δ 11a</u>	δ DEL ACETOXI DERIVADO EN 29	δ DEL ACETOXI DERIVADO EN 30
0.72 (3H,S)	0.72	0.72
0.86 (3H,d,J=7Hz,C-23)	0.87	0.87
0.87 (3H,S)	1.0	1.04
0.94 (3H,S)	1.07	1.05
0.97 (6H,S)	1.18 (18H,S)	1.22 (18H,S)
1.12 (3H,S)	0.87 (3H,d,J=7Hz,C-23)	0.86 (3H,d,H=7Hz,C-23)
2.05 (3H,S,CH ₂ C=O)	2.08 (3H,S,CH ₂ C=O)	2.07 (3H,S,CH ₂ C=O)
2.15-2.40 (3H,M,H-2,H-4)	3.90 (2H,S,-C-29)	3.75 (2H,S,C-30)
4.10 (d.d,2H,C-28)		



4.1.3 IDENTIFICACION DEL CANOFILAL 10

De las fracciones 64-87 de la columna de la Tabla 8 se obtuvo otro sólido cristalino color blanco, cuyas constantes físicas y espectroscópicas se muestran en la Tabla 15.

De manera general el perfil de los espectros de IR, RMN'H y de masas de este compuesto fue similar al de los dos compuestos previamente discutidos.

El análisis detallado de los espectros de masa y de RMN'H permitió concluir que este compuesto presentaba una función aldehído angular en la posición 28, en lugar del metilo de la Friedelina 9 y del hidroximetileno del Canofilol 11.

Las principales diferencias observadas en relación a los dos últimos compuestos mencionados fueron las siguientes:

- A) El espectro de RMN'H (Espectro 10) presentó una señal a δ - 9.5 (1H), característica para un proton aldehídico en vez de la absorción a δ 3.52 para la función carbinólica en el Canofilol y del metilo a δ 1.17 en la Friedelina.
- B) En el espectro de masas (Espectro 11) el ión molecular se observó en m/z 440, y en este caso el fragmento a m/z 411 resultaba de la pérdida del grupo aldehído ($M^+ - 29$).

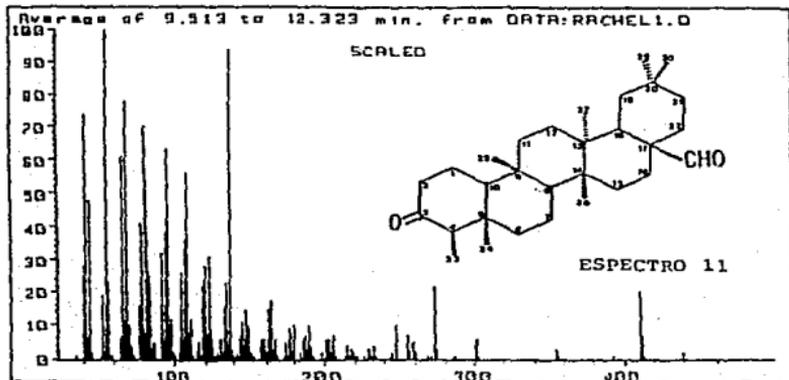
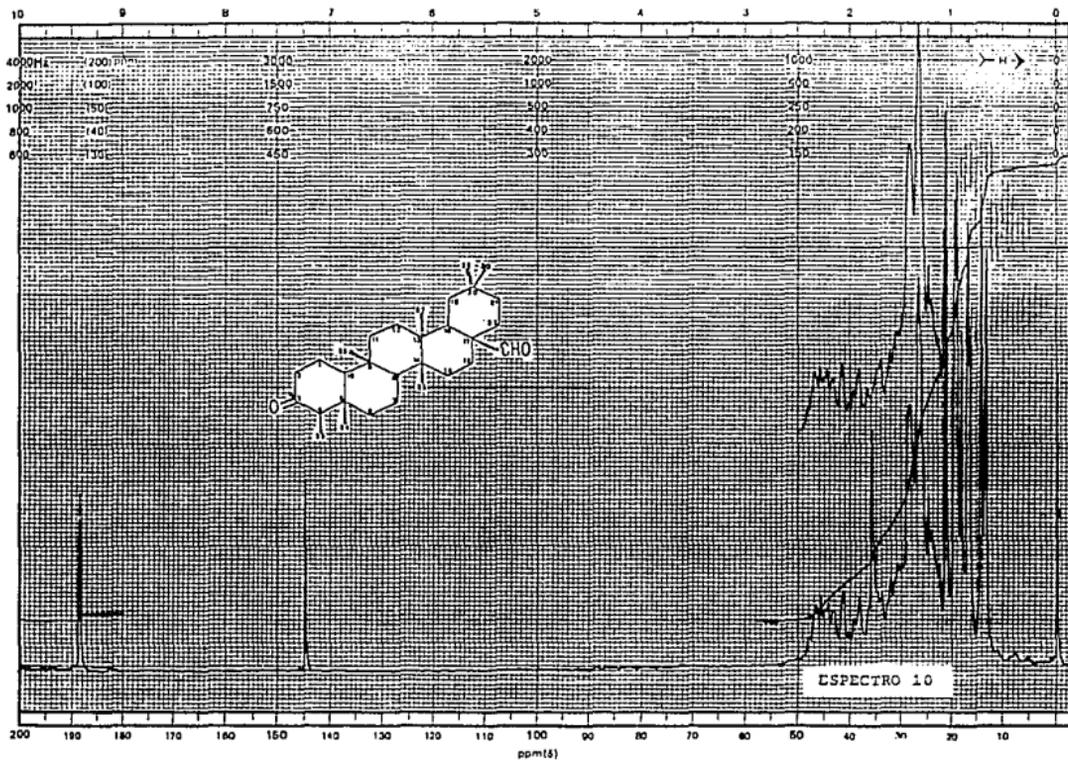


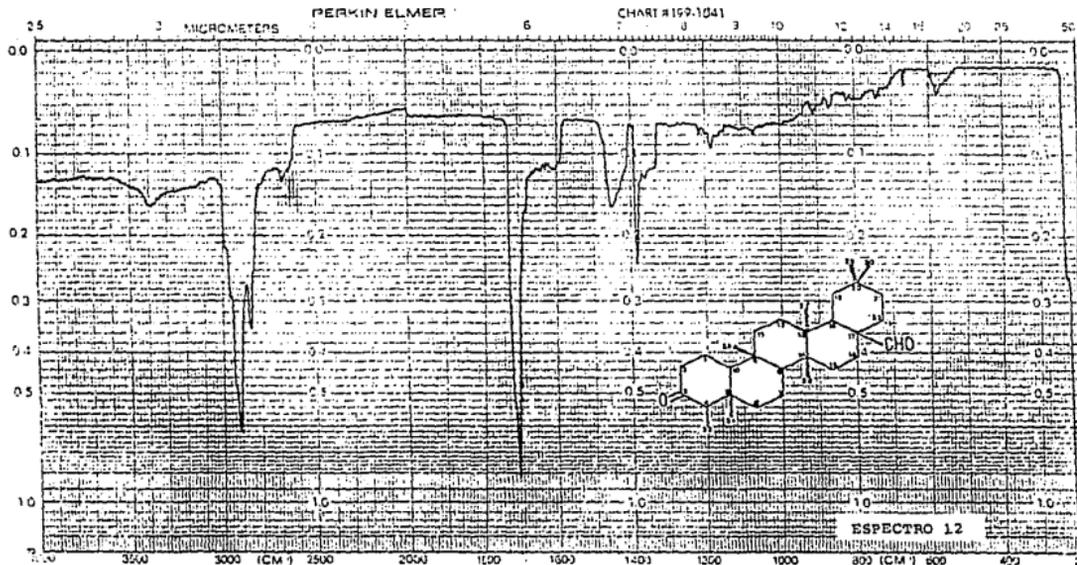
TABLA 15. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL CANOFILAL 10.

PUNTO DE FUSION	250-275°C	ESTRUCTURA
FORMULA MOLECULAR	$C_{30}H_{44}O_2$	
IR (KBr), cm^{-1}	2915	
(ESPECTRO 12)	2680	
	1710	
	1450	
	1385	
EMIE m/z (λ)	440 (2), 411 (21)	
(ESPECTRO 11)	355 (1), 301 (6)	
	273 (22), 247 (10)	
	205 (7), 191 (10)	
	137 (94), 55 (100)	
RMN'H		
(80 MHz, $CDCl_3$)	0.62 (s, 3H)	
(ESPECTRO 10)	0.71 (s, 3H)	
	0.85 (s, 3H)	
	0.86 (3H, d, $J=7Hz$, H-23)	
	0.95 (s, 3H)	
	0.97 (s, 3H)	
	1.07 (s, 3H)	
	9.45 (1H, s, H-28)	
	2.15-2.40 (3H, m, H-2, H-4)	



C) En el espectro de IR. se observó claramente el sobretono típico de C=O de aldehído a 2080cm^{-1} , y la banda correspondiente al estiramiento carbono oxígeno ($\nu\text{C-O}$) apareció superpuesta a la de la cetona (Espectro 12).

La oxidación del Canofilol con trióxido de cromo-piridina (parte 3.8.2) permitió la obtención de un aldehído idéntico en todos sus aspectos al producto natural. Esta reacción permitió entonces correlacionar químicamente ambos compuestos y establecer inequívocamente la identidad del producto como 28-al-friedelan-3-ona (Govindachari, et al, 1967; Betancor, et al, 1980).



ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>6X</u>		REP. SCAN SINGLE BEAM	
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER <u>1</u>		TIME DRIVE	
		ABS		SLIT PROGRAM <u>12</u>		OPERATOR <u>Paula</u>	
SAMPLE <u>R1-21</u>		REMARKS <u>1.1.1.1.1.1.</u>		SOLVENT		CELL PATH	
ORIGIN <u>Rochelet Hete</u>				CONCENTRATION		REFERENCE <u>REF</u>	
						DATE <u>5-14-88</u>	

4.1.4. IDENTIFICACION DEL ACIDO CANOFILICO 12

El análisis cromatográfico de las fracciones 117-262 de la columna de la Tabla 8 demostró que el polvo obtenido era una mezcla de dos sustancias diferentes, una de ellas presentaba -- igual Rf. que el Canofilol 11.

Los diferentes intentos para separarlas mediante métodos cromatográficos no fueron exitosos; por lo tanto considerando -- que en el espectro de IR de la mezcla no se observaba banda para carbonilo de acetato se procedió a separarlas derivatizando el alcohol presente, mediante una reacción de acetilación, con la posterior purificación de los productos de la -- reacción mediante una cromatografía preparativa tal como se especificó en la parte experimental (parte 3.6.4)

Este proceso permitió obtener 336 mg adicionales de Canofilol 11 como su acetyl derivado (11a) y 54.33 mg de Acido Canofilico 12; los parámetros físicos y espectroscópicos del mismo se resumen en la Tabla 16.

Su espectro de absorción al IR (Espectro 13) presentó una banda ancha a 3440 cm^{-1} (OH), un pico intenso a 1710 cm^{-1} (C=O), y otro a 1690 cm^{-1} (-COOH). La esterificación de esta molécula con CH_2N_2 produjo el ester metílico 12a, confirmando la naturaleza ácida de este producto.

Las características del espectro de RMN¹H (Espectro 14) sugirieron una estructura estrechamente relacionada con los compuestos anteriores. Este espectro mostró, señales para:

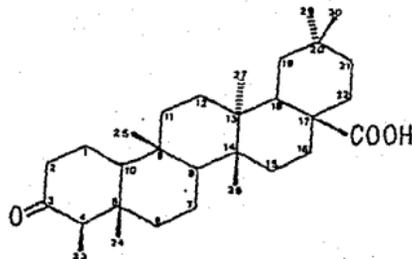
- A) Seis metilos angulares (δ 0.71, 0.81, 0.91, 1.03)
- B) Un metilo secundario (δ 0.87)
- C) Un hidroxilo a δ 5.20 que desaparece al equilibrar el espectro con D_2O .

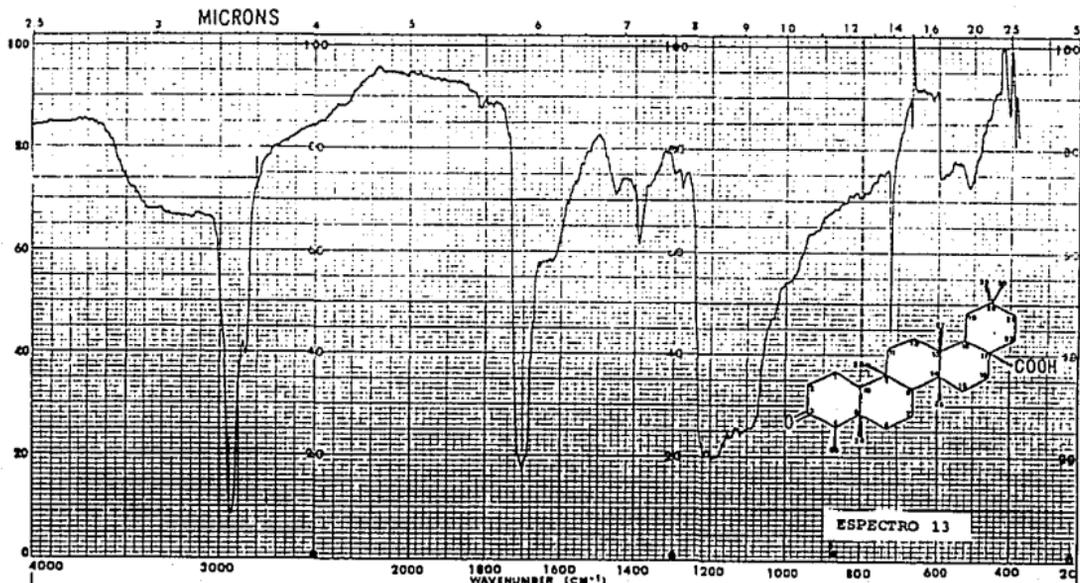
Los principales fragmentos observados en el espectro de masas (Espectro 15) confirmaron que el compuesto era también un triterpeno del tipo friedelano. El ión molecular se observó a m/z 456, y la presencia del ión m/z 411 (fragmento A de la figura 4) proporcionó una evidencia adicional de la presencia del

TABLA 16. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL ACIDO CANOFILICO 12

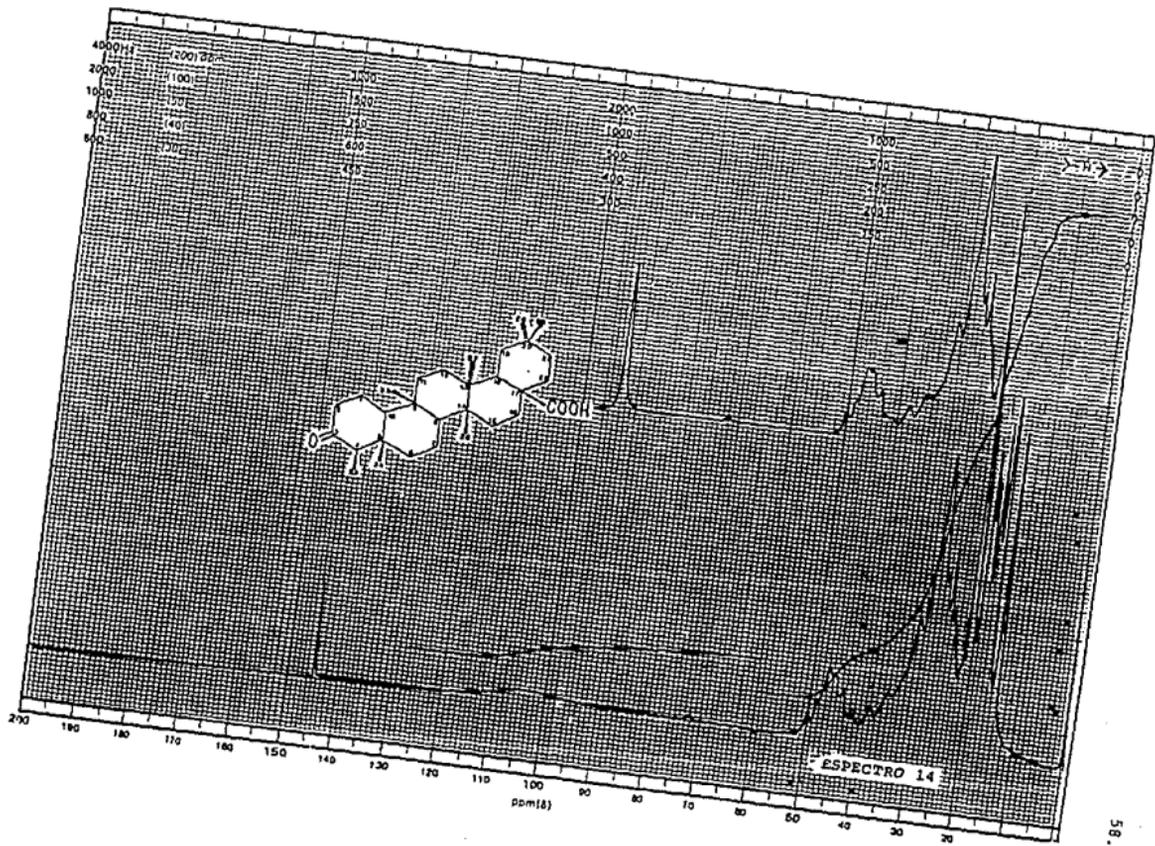
PUNTO DE FUSION	317°C
FORMULA MOLECULAR	C ₃₀ H ₄₄ O ₃
IR (KBr) , cm ⁻¹ (ESPECTRO 13)	3440 2925 1710 1450 1385
EMIE m/z (4) (ESPECTRO 15)	456 [M ⁺ (1)], 411 (1) 371 (1), 303 (1) 273 (6), 235 (2) 231 (5), 155 (4) 109 (33), 107 (33) 55 (100).
RMN ¹ H (80MHz, CDCl ₃) (ESPECTRO 14)	0.71 (3H, s) 0.81 (6H, s) 0.87 (3H, d, J=7Hz, H-23) 0.91 (3H, s) 1.03 (6H, s) 2.15-2.51 (3H, m, H-2, H-4) 5.20 (1H, s)

ESTRUCTURA



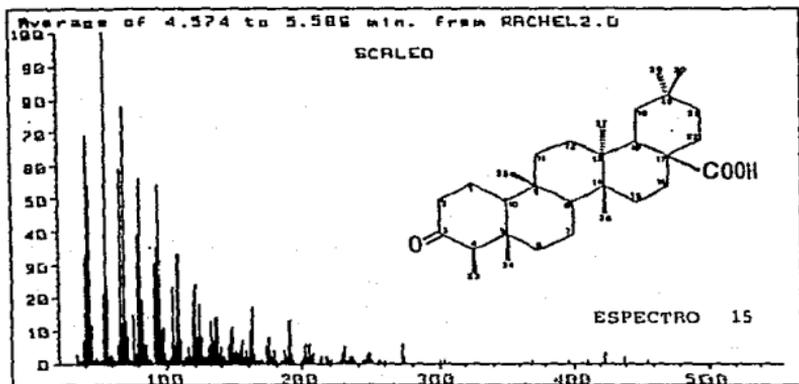


SAMPLE <i>RL-21 oxidado</i>	SOLVENT <i>KOx</i>	SCAN <i>6X1</i>	SINGLE B. _____	REMARKS.
	CONC _____	SLIT <i>W</i>	T.O. SPEED. _____	
ORIGIN <i>Rachel Hata</i>	CELL PATH _____	OPERATOR <i>Alba</i>	ORD. EXP. _____	
	REFERENCE <i>air</i>	DATE <i>17-VI-81</i>	T.CONST _____	
	PERKIN-ELMER	No. 5102-1000	REF. No. <i>20690</i>	



grupo carboxilo en la molécula.

Así mismo el ión m/z 273 indicó que los anillos A, B y C eran idénticos a los de los productos 9, 10 y 11.



Por analogía con los compuestos anteriores era factible predecir a priori que el grupo carboxilo de la molécula estaba ubicado en C-28.

La oxidación del aldehído con $KMnO_4$ - acetona (parte 3.8.2) permitió confirmar la anterior propuesta, ya que el producto de oxidación resultó idéntico al ácido natural. Este constituye el segundo reporte del Ácido Canofflico como producto natural; previamente el ácido había sido aislado de la planta Calophyllum inophyllum Linn. (Govindachari, et al, 1967).

TABLA 17. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL METIL ESTER DEL ACIDO CANOFILICO 12a

PUNTO DE FUSION

222-224°C

ESTRUCTURA

FORMULA MOLECULAR

$C_{31}H_{50}O_3$

IR (KBr); Cm^{-1}
(ESPECTRO 16)

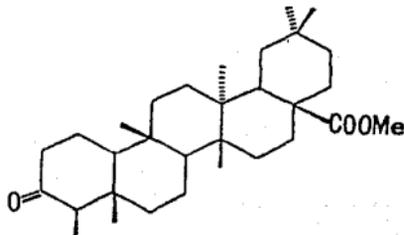
2900

2850

1750

1620

1377



RMN¹H
(80 MHz., $CDCl_3$)
(ESPECTRO 18)

0.72 (9H, s)

0.87 (3H, s)

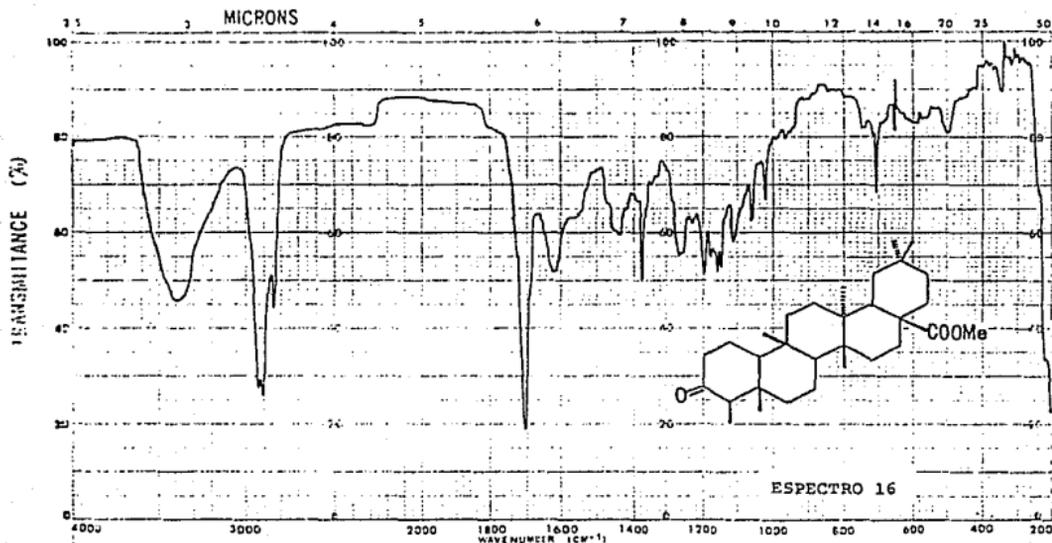
0.88 (3H, d, $J=7Hz$, H-23)

0.98 (3H, s)

10.6 (3H, s)

2.23-2.43 (3H, m, H-2, H-4)

3.65 (3H, s)

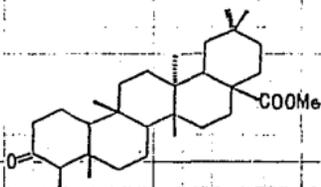


SAMPLE	21 OX. METILADO	SOLVENT	KBr	SCAN	12	SINGLE I.		REMARKS	
		CONC	-	SLOT	11	T.D. SPEED.		part 11	
		CELL PATH	-	OPERATOR	Manich	GRD. I.P.			
		WELDING	air	DATE	17.01.58	TECH.			
REF. NO.	Dja Rachel Meta	PREPARED BY	ELMER	NO.	1167-1000	MIT. NO.	27109		

START OF SWEEP

END OF SWEEP

20ppm	1200Hz	1600	400	600	400	200	0
10ppm	600	800	400	300	200	100	0
5ppm	300	400	200	150	100	50	0
2ppm	120	160	80	60	40	20	0
1ppm	60	80	40	30	20	10	0
0.5ppm	30	40	20	15	10	5	0



+2.0

ESPECTRO 18

ppm (δ) 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMPL. 2.00 sec SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H. SAMPLE: *Dr. Rachel H. G.*
 LOCK POWER _____ mG FILTER 0.5 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS. *at ex. 121.66*
 DECOUPLE POS. _____ ppm
 DECOUPLING POWER _____ mG RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP _____ ppm SAMPLE TEMP. C SOLVENT: *CDCl₃*

4.2 CARACTERIZACION DE TRANS-1,4-POLI (ISOPRENO)

Durante la preparación de la muestra de la corteza de Hippo - cratea excelsa para su estudio químico preliminar, se observó que esta contenía una buena cantidad de un material elástico, por lo que se procedió a investigar un método adecuado para su extracción selectiva y posterior purificación .

Se probaron varios sistemas de extracción; inicialmente, se realizó una maceración con hexano y en este caso se obtuvo una película elástica amarillo naranja pero en poca cantidad; posteriormente , se ensayó una extracción con metanol y otra con -- cloroformo; en el primer caso el extracto no mostró la tendencia de formar la película plástica ; en el segundo si se obtuvo una película de color amarillo y en mayor cantidad que en el caso de la extracción con hexano .

Después de observar los resultados anteriores se decidió tratar de optimizar el método de extracción ,ya que a pesar de haber obtenido el material elástico en las maceraciones con hexano y cloroformo, el residuo obtenido, no presentaba buen grado de pureza.

Entonces, para optimizar el método de obtención se realizaron tres extracciones en forma sucesiva sobre una misma muestra y los disolventes utilizados en orden de extracción fueron: hexano, metanol y finalmente cloroformo; mediante este proceso se logró obtener el material plástico con un excelente grado de pureza y con un rendimiento del 3.3%. Al repetir el mismo proceso pero utilizando el cloroformo a una temperatura de 61-62°C (P.eb.), el rendimiento se incrementó notablemente hasta un -- 11.0%.

Los rendimientos obtenidos de acuerdo al disolvente utilizado para la extracción se muestran en la Tabla 18. El material -- plástico obtenido presentaba color blanco y era soluble en cloroformo, tolueno , benceno y hexano, pero insoluble en acetato de etilo, etanol y metanol.

TABLA 18 RENDIMIENTO DE TRANS-1,4-POLI (ISOPRENO) UTILIZANDO DIFERENTES DISOLVENTES DE EXTRACCION

DISOLVENTE	RENDIMIENTO (%)
A) HEXANO	1.2
B) CLOROFORMO	6.6
C) CLOROFORMO PREVIA EXTRACCION CON HEXANO Y METANOL	3.3
D) CLOROFORMO A 61-61°C PREVIA EXTRACCION CON HEXANO Y METANOL	11.0 (RENDIMIENTO DE A + B)

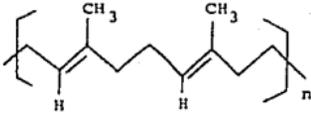
Las constantes físicas y espectroscópicas utilizadas para la caracterización del material plástico se muestran en la Tabla 20. Su espectro de IR (Espectro 19) mostró bandas de estiramiento para C-H a 3060 y 2980 cm^{-1} y banda de estiramiento para C=C a 1670 cm^{-1} , estas absorciones sugirieron la naturaleza olefínica del compuesto.

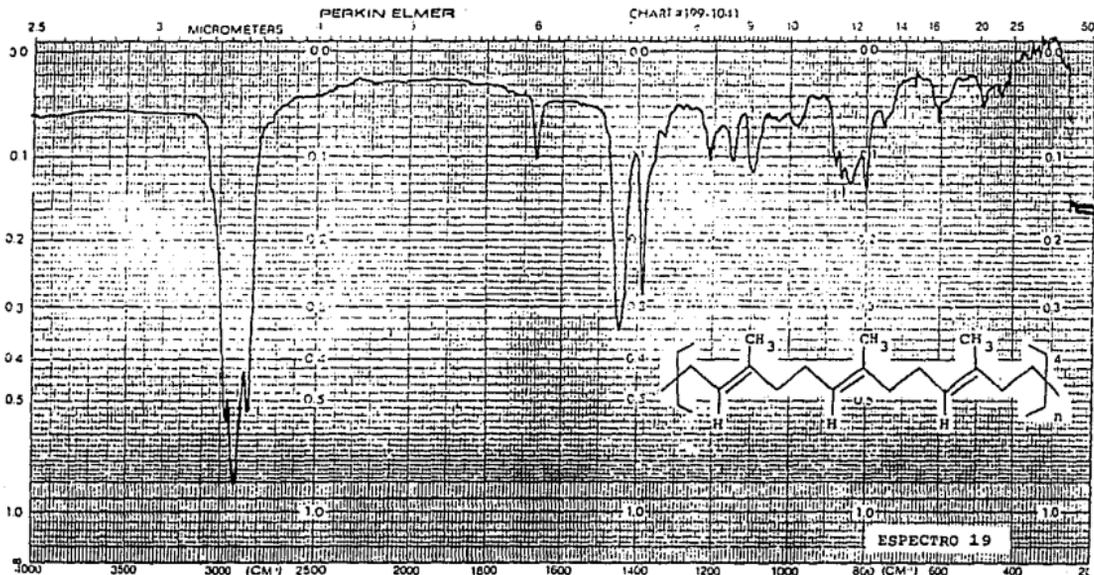
El espectro RMN'H (Espectro 20) presentó las siguientes características: a δ 5.02 se observó un multiplete típico para un protón olefínico; a δ 2.02 se encontraba un singulete atribuible a un metileno unido a un carbono de tipo olefínico, y por último a δ 1.62 se observó una señal simple asignable a un metilo unido también a un carbón olefínico. La integración de cada una de estas señales indicó que cada uno de los tres tipos de protones presentes en la molécula se encontraban en una proporción 1:4:3, respectivamente.

La ausencia de bandas de absorción para otros grupos funcionales en los espectros de IR y RMN'H indicó la naturaleza hidrocarbonada del compuesto.

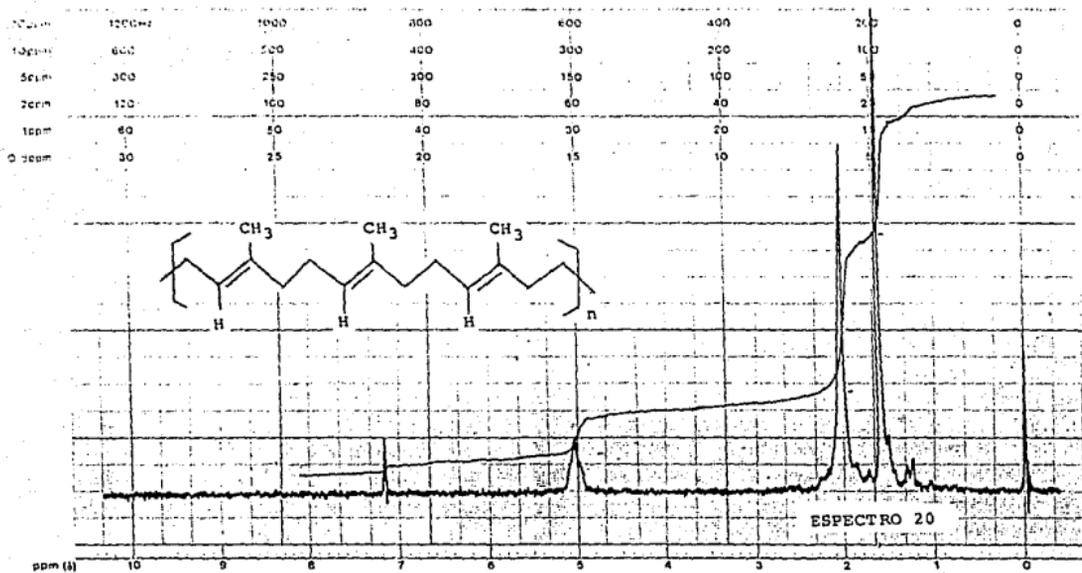
La información previa en conjunto con la apariencia del material obtenido, sugirieron en principio el carácter polimérico del mismo, y más concretamente su naturaleza poliisoprenica.

TABLA 20. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL TRANS-1,4-POLI(ISOPRENO)

DENSIDAD	0.9400 g/ml	ESTRUCTURA
TEMPERATURA DE DESCOMPOSICION	430°C	
PESO MOLECULAR	5.3×10^5	
TEMPERATURA DE TRANSICION CRISTALINA	71°C	
IR. (KBr, cm^{-1}) (ESPECRO 19)	3060, 2980, 2920, 2580, 1670, 1450, 1380, 890, 870, 800.	
RHN 'H (80MHz, CDCl_3)	1.62 (s, =C-CH ₃) 2.20 (sa, -CH ₂ -C=) 5.02 (m, -C=C-H)	



ABSCISSA	ORDINATE	SCAN TIME <u>1.5</u>	REP SCAN <u> </u> SINGLE BEAM
EXPANSION	EXPANSION	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE <u>3"</u>
	ABS	SLIT PROGRAM <u>1</u>	OPERATOR <u>Lowell</u> DATE <u>5/1/59</u>
SAMPLE <u>1-1-104-1</u>	REMARKS <u> </u>	SOLVENT	CELL PATH
ORIGIN <u>370.4.2 of U-4</u>		CONCENTRATION	REFERENCE <u> </u>



LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMP. 5 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H SAMPLE: Rawl OPERATOR G. Lee
 LOCK POWER _____ mG FILTER 91 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS RL Pol I DATE 9-11-82
 DECOUPLE POS. _____ ppm RF POWER 0.4 mG END OF SWEEP 5 ppm SAMPLE TEMP. _____ C SOLVENT. CDCl₃
 DECOUPLING POWER _____ mG

La banda de absorción a 1670cm^{-1} en el espectro de IR (Binder y Ransw, 1957) y la resonancia a δ 5.02 en el espectro de RMN¹H sugirieron que el poliisopreno correspondía al tipo de la guta, es decir a un Trans Poli(isopreno); si el polímero correspondiese al del caucho el estiramiento C=C se hubiese observado a 1660cm^{-1} , y la resonancia correspondiente al grupo metilo estaría desplazada paramagnéticamente a δ 1.69. En la Tabla 21 se especifican en forma comparativa los desplazamientos químicos previamente descritos para el Trans Poli(isopreno), el Cis Poli(isopreno) y los observados para el polímero aislado de la planta (Chen, 1962; Buchanan, et al, 1978; Golub, et al, 1962)

TABLA 19 DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS PARA EL CIS POLI(ISOPRENO) EL TRANS POLI(ISOPRENO) Y PARA EL POLIMERO OBTENIDO DE LA CORTEZA DE Hippocratea excelsa.

TIPO DE PROTON	δ <u>CIS</u>	δ <u>TRANS</u>	δ DEL POLIMERO AISLADO
- CH ₃	1.69	1.62	1.60
- CH ₂ -	2.0	2.0	2.0
= CH-	5.0	5.0	5.0

El análisis térmico diferencial, realizado bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{K}/\text{min}$, arrojó los siguientes resultados:

- Temperatura para la transición cristalina (T_g): 71° [Lit. - $T_g = 73^\circ$, (Gent, 1965)].
- Temperatura para la fusión: 40°C (Forma α)
- Temperatura de descomposición: 430°C

La densidad fue obtenida por picnometría, obteniéndose un valor de 0.9400 g/cc (ASTM, 1979).

Finalmente, el peso molecular promedio (\bar{M}) fué determinado por cromatografía de permeación en gel (C.P.G.) obteniéndose un valor promedio de 5.3×10^5 (el grado de dispersión calculada fué de 1.3). Previamente se han aislado otros polímeros naturales de \bar{M} muy semejantes (Hager, et al, 1979).

En base a la información previa se concluyó inequívocamente que el material elástico obtenido correspondía a un polímero del tipo de la guta.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico preliminar de la corteza de Hippocratea excelsa H.B.K., objetivo fundamental del presente trabajo, resultó en el aislamiento y la identificación de seis metabolitos de origen mevalónico. Cuatro de ellos resultaron triterpenos pentacíclicos del tipo friedelano: la Friedelina 9, Canofilol 11, Canofilal 10 y el Ácido Canofflico 12. El quinto resultó el común estero, β -Sitosterol 13 y finalmente el último fué caracterizado como un polisopreno, de peso molecular promedio 5.3×10^5 , del tipo de la guta. También este trabajo permitió el aislamiento de 7 compuestos adicionales cuya caracterización y evaluación biológica constituye uno de los objetivos de otra propuesta de tesis.
2. Los triterpenos pentacíclicos con esqueleto del tipo friedelano constituyen metabolitos secundarios característicos de la familia Celestraceae, estrechamente relacionada con la familia Hippocrateaceae. Sin embargo, todos los friedelanos aislados previamente del género Hippocratea son del tipo Pristimerina, es decir 1,3-dicetonas como el compuesto 2 (Figura 1); por lo tanto los compuestos triterpénicos aislados en este estudio constituyen nuevos metabolitos para el género Hippocratea. Cabe hacer notar que los friedelanos aislados difieren únicamente en el grado de oxidación del carbono en la posición 28 y que su coexistencia es de importancia biogenética. Fácilmente se puede especular que la Friedelina es el precursor inmediato del alcohol 11 el cual a su vez por sucesivas oxidaciones se transforma primero en el aldehído 10 y finalmente en el ácido 12.
3. El presente reporte constituye el primer caso de la obtención de Trans Poli (isopreno) a partir de un miembro de la familia Hippocrateaceae, y aún es prematuro indicar si la presencia en gran cantidad del polímero es de importancia quimiotáxonomica, como ha sido el caso en otras familias (Buchanan, et al,

1979).

El alto contenido de guta en Hippocratea excelsa es mayor al contenido de caucho en Phartenium argentatum (guayule) y al contenido de guta en otras especies (Archer, Audley, 1975; Buchanan, et al, 1978, 1979), por lo tanto esta planta puede ser considerada como una fuente potencial práctica de guta.

4. La presencia de Friedelina en esta planta podría estar correlacionada con la actividad insecticida que se le atribuye a la misma, ya que previamente Abbassy et al demostraron in vitro la actividad antialimentaria del triterpeno (Abbassy, et al, 1977).
5. La Friedelina y compuestos relacionados han sido considerados para el tratamiento de cáncer de ureter, convulsiones, inflamaciones, úlceras de la piel, inflamaciones de origen reumático, fiebre y disentería (Brüning, Wagner, 1978). La existencia entonces de estos compuestos en la "cancerina" podría explicar algunas de sus propiedades medicinales. Finalmente, el alto contenido de Trans Poli (isopreno) en la corteza de la planta podría estar relacionado con su uso como agente antiulcérico. Posiblemente el polímero actúa como una película protectora en el tracto gastrointestinal. En este sentido, cabe hacer notar, que el polímero es extraído al preparar una infusión o una decocción acuosa tal como se utiliza la planta en la medicina popular.

RECOMENDACIONES

1. Proseguir el estudio fitoquímico de la planta.
2. Caracterizar y evaluar biológicamente los 7 compuestos aislados del extracto de acetato de etilo, resultante de la partición del extracto metanólico.
3. Optimizar el método para la obtención del Trans Poli(isopreno).
4. Estudiar la distribución del polímero en la planta completa.
5. Como comentario final es importante hacer notar que debido a su eficiente actividad curativa, esta especie está a punto de ser extinguida en algunas zonas del centro y sur de México, por lo que sería recomendable garantizar su preservación y propagación en el territorio Nacional.

APENDICE

La toxicidad de los compuestos: Canofilal 21, Canofilol 22 y Acido Canofflico 24 para Artemia salina fue determinada a concentraciones de 100,10, y 1 ppm. Ninguno de los compuestos resulto activo a las concentraciones indicadas .

Sin embargo, considerando que la Friedelina presenta actividad insecticida y que el ensayo antes indicado se usa como prueba preliminar para la búsqueda de agentes agroquímicos , sería deseable evaluar los compuestos a una mayor concentración.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abraham, D.J., Trojaneck, J., Munzing, H.P., Fong, H.H.S. y Farnsworth, N.R., (1971), Journal of Pharmaceutical Sciences, 60, 1085.
- 2.- Annual Book of ASTM Standards, (1979), PART 35, ANSI/ASTM D-792-66, pp. 331, American Society for Testing and materials, Philadelphia.
- 3.- Archer, B.L. y Audley, B.G., (1975), Phytochemistry, (Miller, L.P.ed.), Vol. II, pp. 310, Van Nostrand Reinhold, New York.
- 4.- Betancor, C. y González, A.G., (1980), Phytochemistry, 19, 1085.
- 5.- Bhakuni, D.S., Gupta, N.C., Satish, S., Sharma, S.C., Shulka, Y.N. y Tandon, J.S., (1971), Phytochemistry, 10, 2247.
- 6.- Binder, J.L. y Ranw, H.C., (1967), Analytical Chemistry, 29, 502.
- 7.- Bruning, R. y Wagner, H., (1978), Phytochemistry, 17, 1821.
- 8.- Buchanan, R.A., Cull, I.M., Otey, F.H. y Russell, C.R., (1978), Economic Botany, 32, 131.
- 9.- Buchanan, R.A., Cull, I.M., Otey, F.H. y Russell, C.R., (1978), Economic Botany, 32, 146.
- 10.- Buchanan, R., Swanson, Ch.L., Weisleder, D. y Cull, I.M., (1979), Phytochemistry, 18, 1069.
- 11.- Bye, R., (1988), Comunicación personal.
- 12.- Chandler, F.R. y Hooper, S.N., (1979), Phytochemistry, 18, 711.

- 13.- Chen, H.Y., (1962), Analytical Chemistry, 14, 1973.
- 14.- Courtney, J.L. y Sannon, J.L., (1963), Tetrahedron Letters, 13.
- 15.- Courtney, J.L. y Sannon, J.L., (1963), Tetrahedron Letters, 173.
- 16.- Delle Monache, F., de Melló, J.F., Marini Betolo, G.B., Goncalvez de Lima, O. y D'Albuquerque, I.L., (1972), Gazzeta Chimica Italiana, 102, 636.
- 17.- Gent, A.N., (1965), Journal Polymeric Science, 3, 1387.
- 18.- Golub, M.A., Fuquia, S.A. y Bhacca, M.S., (1962), Journal American Chemical Society, 84, 4981.
- 19.- Govindachari, T.R., Viswanathan, N., Pai, B.R., Ramadas, U.R. y Srinivasan, M., (1967), Tetrahedron, 23, 1901.
- 20.- Hager, T.A., MacArthur, D. y MacIntyse, R., (1979), Rubber -- Chemistry Technology, 52, 693.
- 21.- Harbone, J.B., (1984), Phytochemical Methods, 2a. ed., pp.194, Chapman and Hall, New York.
- 22.- Ilyas, M. y Ilyas, N., (1986), Niger Journal Pharmaceutical, 2, 99.
- 23.- Kapadia, G.L., Kapadia, G.G., y Mosby, J.R., (1964), Lloydia, 27, 233.
- 24.- Kirk, R.E., y Othmer, D.F., (1982), Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 20, 3a. ed., pp.468, Wiley Interscience Publication, New York.
- 25.- Kulshrestha, D.K. y Rastogi, R.P., (1971), Phytochemistry, 10, 2831.

- 26.- Martínez, H., Corona, M.M., Vélez, S.C. y Rodríguez, H.L., (1988), Journal of Natural Products, 51, 793.
- 27.- Shriner-Fuson-Curtin, (1980), Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos, Limusa, México.
- 28.- Smith, A.C., (1948), Brittania, 3, 341.
- 29.- Sthal, E., (1962), Thin Layer Chromatography, pp. 487, Academic Press Inc., New York.