



15-24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SECOIRIDOIDES, TRIGLICERIDOS, MANITOL Y OTROS  
PRODUCTOS QUIMICOS EN SEMILLAS DE FRESNO

(Fraxinus uhdei (Weinzig) Lingelsheim)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Q U I M I C O**

P R E S E N T A :

**SERGIO ESCALONA SEGURA**

1991



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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

	página
I.-Introducción.....	1
Objetivos.....	3
II.-Generalidades.....	4
III.-Material y Métodos.....	9
III.1-Equipo y reacciones para la identificación de compuestos.	9
III.2-Preparación de la muestra.....	12
III.3-Desarrollo del trabajo con los extractos.....	17
III.3.1-Cuantificación y caracterización del aceite crudo.	18
III.3.2-Extractos Polares.....	21
III.3.3-Purificación y preparación de derivados de los triterpenos.....	42
IV.-Resultados y discusión.....	45
V.-Conclusiones.....	60
Apéndice I.- Abreviaturas utilizados en la tesis.....	71
Apéndice II.- Espectros.....	72
Bibliografía.....	84
Indice de tablas.....	I
Indice de diagramas.....	II
Indice analítico.....	II

## I.- INTRODUCCION.

La fitoquímica (del griego fiton, planta) es una rama de la química orgánica que trata de las sustancias formadas en el organismo de los vegetales. En la actualidad varios laboratorios están dedicados a la investigación de metabolitos secundarios de plantas, guiados por interés quimiotaxonómico, por la búsqueda de compuestos biológicamente activos, o simplemente por conocer la composición química de una especie no estudiada .

El metabolismo primario es comparable en todos los organismos y comprende el metabolismo esencial de los seres vivos, así tenemos las rutas y ciclos metabólicos de: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos carboxílicos, etc. . En el caso de los metabolitos secundarios, no son cruciales para el mantenimiento de la vida pero pueden ser de suma importancia para el metabolismo, desconociéndose en mucho la función que desarrollan y sólo más conocidos por su importancia ecológica, ya que sirven como agentes de comunicación química<sup>1</sup> .

Un metabolito secundario se caracteriza por su distribución restringida a un origen filogenético, esto es, no se encuentra distribuido en todos los organismos y es propio de la evolución de ellos. La formación de los metabolitos secundarios en un organismo es gracias a la acción de enzimas codificadas por material genético especial .

La presencia de los metabolitos secundarios, con

abundancia relativa en una planta, posibilita su utilización con fines industriales, medicinales, comestibles, insecticidas, etc. .

Aunque el fresno pertenece a la familia del olivo, cuyos frutos son ricos en aceite, no se ha encontrado reportada en la literatura la producción de aceite de fresno, por lo que se pensó en determinar la cantidad extraíble de su aceite, de los constituyentes de éste y de lo que se podría llamar "contaminantes" .

En el otoño la semilla se desprende y se dispersa ayudada por su forma alada, favoreciendo así la propagación de la especie; como muchas semillas sirven de alimento a pequeños insectos o quedan acumuladas para descomponerse y servir de abono, son pocas las semillas que llegan a germinar .

En vista de todo lo anterior pareció interesante emprender el estudio fitoquímico del fresno *Fraxinus udel* con el aislamiento, purificación y caracterización por métodos espectroscópicos y químicos de diversas sustancias que contiene .

El estudio de la semilla verde se pensó como complemento al estudio de la semilla madura; se observó que, por la cantidad de compuestos polares, es más importante para la fitoquímica .

### OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como finalidad el estudio fitoquímico de las semillas del fresno y de su aceite, para complementar los escasos estudios realizados sobre este árbol tan abundante en la naturaleza, ya sea en estado silvestre o en forma cultivada en parques y jardines.

Los estudios realizados son los siguientes :

- 1<sup>o</sup> Estudio del aceite crudo y de sus constituyentes para su posible utilización.
- 2<sup>o</sup> Caracterización de algunos componentes más polares en la semilla madura con el fin de complementar el estudio del aceite y determinar la posible presencia de compuestos tóxicos.
- 3<sup>o</sup> Caracterización de algunos de los componentes más polares en semilla verde, para comparar con los resultados obtenidos de la semilla madura.

## II.- GENERALIDADES.

### FRESNO (*Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelshelm)

El género *Fraxinus* perteneciente a la familia *Oleaceae*, comprende unas 40 especies casi todas propias de climas templados de Europa, Asia y América. En México existen alrededor de 15 especies<sup>2</sup> de *Fraxinus* (Tabla 2.1).

Tabla 2.1.- *Fraxinus* existentes en la República Mexicana:

Fresno	1ª Descripción	Descripción posterior
<i>Fraxinus americana</i>	L.	Prof. Gabriel V. Alcocer
<i>Fraxinus berlandieri</i>		
<i>Fraxinus berlandieriana</i>	Doc.	Paul C. Standley
<i>Fraxinus cuspidata</i>	Torr.	Prof. Maximino Martínez
<i>Fraxinus dipetala</i>	Hook et Arm.	" " "
<i>Fraxinus pregtii</i>	Gray.	" " "
<i>Fraxinus papillosa</i>	Lingelsh.	
<i>Fraxinus pringlei</i>	Lingelsh.	
<i>Fraxinus petiolaris</i>	Br.	Prof. Maximino Martínez
<i>Fraxinus rufococina</i>	Lingelsh.	
<i>Fraxinus schiedeana</i>	Cham. et Schl.	
<i>Fraxinus</i> sp.		G. V. Alcocer, M. Martínez P. C. Standley
<i>Fraxinus velutina</i>	Torr.	
<i>Fraxinus uhdei</i>	Wenz. et Lingelsh.	Paul C. Standley

En la República Mexicana el bosque de fresnos tiene su

mejor desarrollo a la orilla de los ríos y riachuelos, penetrando bastante al interior de la depresión central de la República. Se puede encontrar en las llanuras asociado con frecuencia al sabino (*Taxodium mucronatum*). Se reproduce rápido en zonas deforestadas<sup>3</sup>. Ha sido estudiado por los botánicos debido a que todos ellos son árboles que proporcionan sombra y buena madera .

Al fresno<sup>4</sup> (*Fraxinus uhdei*) se le conoce en algunas regiones de Chiapas como "madre de agua"; en inglés le llaman "evergreen ash". Fue clasificado por Theodor Wenzig<sup>5</sup> en 1883 y confirmado por Alexander Lingelsheim<sup>6</sup> en 1908 ; localizándolo en regiones de Sinaloa, San Luis Potosí y Jalisco .

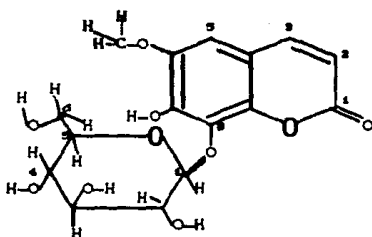
*F. uhdei* es un árbol que llega a medir unos 40 metros de altura y más de 1 m. de diámetro. Su corteza es gris, profundamente agrietada, con placas cuadrangulares. Sus hojas son opuestas (pinnadas<sup>7</sup>), con 5 a 9 hojuelas lanceoladas u oblongo-lanceoladas, menudamente serruladas, con nervadura abierta y pilosa abajo en la nervadura central, con base de la hoja decurrente. Las flores forman una panícula hasta de 20 cm., son: pequeñas, apétalas, verdosas con involucre e involucelos cafés, se desarrollan entre enero y febrero. El fruto es una sámara con una sola ala, mide de 2.5-4 cm., madurando en agosto y septiembre .

La madera de *F. uhdei* es de muy buena calidad, de color blanco algo amarillenta, con marcadas líneas de crecimiento. Es regularmente dura y fuerte, con peso medio de unos 800kg/m<sup>3</sup>. Medianamente durable. Los usos más importantes comprenden mangos para herramientas, instrumentos agrícolas, armazones para



edificios, instrumentos de atletismo, remos, muebles de cocina y de decoración interior .

En Farmacia las infusiones de la corteza interior se utilizan como tónico amargo<sup>9</sup> (contiene un glucósido llamado Fraxina<sup>9</sup> , Figura.1) . En algunas especies estudiadas se ha encontrado que la ingestión de infusiones de la corteza provoca un aumento en la actividad excretora de orina<sup>9</sup> con aumento de ácido úrico .



8- $\beta$ ,D-GLUCOSIL-7-HIDROXI-6-METOXICUMARINA

Figura.1- FRAXINA .

El cocimiento de las hojas ha sido empleado para combatir las fiebres palúdicas y la fiebre amarilla<sup>10</sup> . Se ha encontrado que el extracto de semilla, de un fresno diferente a *Fraxinus uhdel*, posee actividad bacteriostática<sup>10</sup> . En Japón se ha utilizado a la corteza de *Fraxinus japonica* Blume para combatir el reumatismo y la gota<sup>11</sup> . En China ha existido una droga llamada Chin Pie<sup>12</sup> de la corteza de *F. rhynchophylla* para combatir la disenteria y cuya actividad está también relacionada con la actividad excretora de orina .

Estudios realizados en otros países sobre la digestibilidad y poder nutricional de algunos *Fraxinus* los han clasificado como buenos a excelentes como complemento a la dieta de animales domésticos<sup>13</sup>. En algunos lugares de la República Mexicana, en los primeros meses del año se cortan las ramitas tiernas para darlas a los animales como complemento de la dieta. Se han hecho estudios de los *Fraxinus* con varios fines, los que más destacan son: la utilización de su aceite para la producción de barnices y pinturas, la aplicación con fines medicinales de compuestos extraídos de la corteza de algunos árboles de esta especie y en la utilización de la madera para la fabricación de papel.

El fresno es uno de los árboles más sanos en el Valle de México pues sólo es atacado por la "mariposa llamadora" (*Papilio daunus*), en invierno lo parasita un muérdago (que se desprende en primavera) y diversos hongos (ej. *Poliporus fraxinophilus*), que son los que más daño le pueden hacer. Al parecer la contaminación ambiental en la ciudad de México ha afectado a los fresnos, de tal forma que muchos de ellos desarrollan hojas pequeñas de color amarillento o verde claro, sin alcanzar su color verde característico.

Artículos escritos sobre *Fraxinus uhdei* tratan de estudios biológicos sobre el control de éste<sup>14</sup>.

En una revisión más o menos amplia se encontró que los *Fraxinus* comunes más citados por Chemical Abstract son en orden decreciente, los siguientes:

*Fraxinus excelsior* con variedades *hernal* y *pendula*

*Fraxinus americana*

*Fraxinus pennsylvanica* con var. *lanceolata*

*Fraxinus ornus*

*Fraxinus mandshurica*

*Fraxinus viridis*

*Fraxinus japonica*

*Fraxinus pubescens*

### III.- MATERIAL Y METODOS.

#### III.1.- EQUIPO Y REACCIONES PARA LA IDENTIFICACION DE COMPUESTOS

##### EQUIPO UTILIZADO EN LA INVESTIGACION

La semilla de *F. uhdei* fue extraída primero con disolventes de baja polaridad y posteriormente con disolventes polares. Los extractos fueron analizados mediante cromatografía en columna usando como soporte gel de sílice Silicagel 60 para columna, con tamaño de partícula de 0.063-0.200mm .

Con frecuencia se usó la llamada percolación, que consiste en utilizar como soporte silicagel Merck para placa; ésta se monta generalmente seca en una columna relativamente ancha, durante su empaque y desarrollo se utiliza vacío, siendo posible dejarla escurrir totalmente sin que se seque por completo, al agregar nuevo disolvente se puede reiniciar el proceso de elución y separación.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de FISHER-JONES y no se corrigieron. Las excepciones que se indican con las siglas ATD, después del punto de fusión, indican haberse tomado en un aparato Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin Elmer Mod. DSC-2C, siendo en éste caso pequeño el error.

Los espectros de I.R. se determinaron en aparatos Perkin Elmer Mod. 2283-B y en Nicolet FTIR Mod. 55X. Los espectros de U.V.

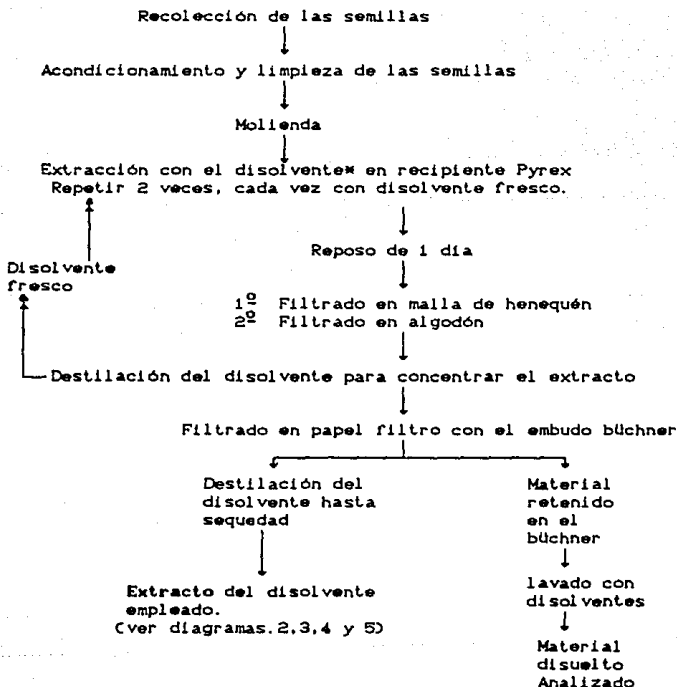
en un espectrofotómetro Perkin Elmer Mod.552. Las rotaciones ópticas en un Polarímetro JASCO Mod. DIP-360. El análisis de los ésteres de ácidos grasos se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Mod.5890 con detector de ionización de flama. Las R.M.N'H, en un Varian FT-80A para 80MHz; las R.M.N'H para 299.949MHz y de  $^{13}\text{C}$  para 75.428MHz en el equipo Varian VXR-300S. Los espectros de masas en el espectrómetro Hewlett Packard Mod.5985-B a 70eV y a una temperatura de 250°C .

#### REVELADORES Y REACCIONES PARA IDENTIFICACION

La purificación de los compuestos y el desarrollo de las reacciones se siguió por cromatografía de capa fina con placas comerciales conteniendo gel de sílice Merck F-254, antes de revelar se observó primero con luz UV para localizar el frente del eluato y asegurar una relación de frentes RF mayor o igual a 1/3 para despues revelar con sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N o con mezcla de ácido sulfúrico / ácido acético / agua destilada con relación 1:4:20 .

Para la confirmación de las estructuras se preparó los derivados acetilados , metilados o su fenilhidrazona cuando se requirió .

DIAGRAMA.1.- Obtención de extractos en general.



\* La secuencia se sigue primero con el disolvente menos polar y posteriormente, secando la semilla molida, con el disolvente más polar.

### III.2.- PREPARACION DE LA NUESTRA

Se presenta la manera en que se trabajó la semilla desde su recolección hasta la extracción con diferentes disolventes. Dando los pesos de cada extracto.

Se llevó a cabo la recolección de semillas maduras y verdes de árboles cultivados en Ciudad Universitaria durante 2 años con recolecciones en periodos de aproximadamente 6 meses, dos veces cada vez .

De las numerosas colecciones de semillas de fresno sólo se mencionaran, como ejemplo de análisis de semilla madura, la colección del 20 de junio de 1987 (primera recolección); y de semilla tierna, la del 12 de abril de 1989 (cuarta recolección).

#### PRIMERA RECOLECCION Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS

La semilla madura recolectada el 20 de junio de 1987 se dejó secar a la intemperie, hasta noviembre de ese año. Cuando esta semilla se molió dió una masa seca con peso de 1270.90g.

#### EXTRACTO NO POLAR DE SEMILLA MADURA

La semilla molida se colocó dentro de un recipiente Pyrex con capacidad para 18l , se agregó heptano hasta cubrir completamente la muestra, dejándolo en reposo un día; al otro día se pasó el extracto a través de una malla de henequén desengrasado para retener partículas gruesas. Posteriormente se filtró a través de algodón. La operación se repitió en tres días sucesivos, usando disolvente fresco en cada ocasión. El disolvente fué eliminado por

evaporación en un rota-vapor, acumulándose un polvo blanco en el fondo del matraz; éste se separó por filtración al vacío. Por cromatografía de capa fina se determinó que se trataba de un triterpeno al revelar la mancha color rosado (con revelador de sulfato cérico). Posteriormente se le identificó como ácido ursólico (figura.2). La eliminación total del disolvente residual se logró utilizando vacío con una bomba y tibiando el extracto en un baño maria. De esta manera se obtuvo el extracto heptánico con un peso de 145.39g, equivalente al 11.44 % de la semilla seca original.

#### EXTRACTO POLAR DE SEMILLA MADURA

Una vez bien escurrido el disolvente no polar se agregó una mezcla de disolventes más polares  $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  con relación 4:1, hasta cubrir con el material vegetal, después de 20hr. se procedió a filtrar y concentrar el extracto, hasta sequedad. La operación se repitió tres veces, proporcionando 72.06g de extracto seco, equiv. al 5.67% de semilla seca.

#### CUARTA RECOLECCION Y ACONDICIONAMIENTO DE LAS SEMILLAS

Las semillas verdes recolectadas el 12 de abril de 1989 se limpiaron y separaron en dos fracciones muy irregulares, la primera pesó 271.24g; la segunda, 1.0257Kg. A la primer fracción se le trabajó inmediatamente (fresca); la segunda, fue sometida a desecación dando un peso de 744.20g.

#### EXTRACCION DE SEMILLA VERDE FRESCA

Fueron maceradas con  $\text{CH}_3\text{OH}$  en un mortero de metal, agregando porciones de semillas con unos 20ml del disolvente y



machacando con la mano del mortero; una vez machacada toda la semilla y trasvasada a un matraz erlenmeyer de 250ml, se adicionó un poco más de alcohol, se calentó en una estufa de vapor y se filtró. Los residuos de la semilla fueron desechados. Se destiló el disolvente y al concentrar se formó un precipitado blanco por lo que se filtró y continuó su evaporación hasta lo más posible en un rota-vapor calentado a baño maría. El peso del polvo blanco que se identificó como ácido oleanólico (figura.5) fue 1.4203g. . Después de evaporar totalmente el disolvente quedó un líquido verde oscuro y espeso que se secó al vacío lentamente dando 20.81g. .

#### EXTRACCION DE LA SEMILLA VERDE Y SECA CON DISOLVENTE NO POLAR

La semilla molida se extrajo con hexano 3 veces y se filtró, dejando un polvo café con abundantes trozos pequeños de fibra sobre el papel filtro, su peso dió 28.6112g. y se trabajó mas adelante.

Al final el hexano se eliminó por evaporación resultando 16.42g. de extracto seco; 2.21% de la semilla seca.

#### EXTRACCION DE LA SEMILLA VERDE Y SECA CON DISOLVENTE POLAR.

La extracción se realizó con  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , siguiendo el procedimiento empleado para el extracto polar de la semilla madura. Se obtuvo un sólido verde-oscuro, con peso de 90.83g., equivalente al 12.20% de la semilla seca.

Se intentó realizar un extracto acuoso de las semillas, pero al dejarlo por un fin de semana se formó una nata, notándose

la formación de colonias de moho; por lo que tuvo que ser desechada.

EXTRACTO MeOH DE SEMILLA VERDE Y FRESCA DEL 12 DE ABRIL DE 1989

Al redissolver el extracto seco con MeOH se obtienen por filtración 4.77g de sólidos no disueltos en MeOH. Al disolvente polar se agregó agua destilada para tenerlo al 80% aprox.; posteriormente, se realizaron 7 extracciones, cada una de 100ml de una mezcla hexano/benceno 1:1. Al evaporar la mezcla de disolventes dejó 0.4019g de polvo blanco (mezcla de triterpenos según lo revelado en la cromatografía de capa fina).

A la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O, evaporada lo más posible, se le extrajo con 3 porciones de 100ml de CHCl<sub>3</sub>, las cuales proporcionaron al reunirse 1.6502g. de una pasta.

Evaporada la fase hidro-alcohólica hasta dejar casi al agua como único disolvente, se le extrajo con alcohol isobutilico; realizando 5 extracciones con 100ml cada una. El resultado fue la obtención de 3.2450g de una pasta café-amarillenta.

La fase acuosa se evaporó a sequedad obteniendo un residuo en forma de pasta café-verdosa en cantidad de 12.3785g.

EXTRACTO EtOH DE SEMILLA VERDE Y SECA DEL 12 DE ABRIL DE 1989

El polvo café sobre el papel filtro (26.61g) se lavó con MeOH pero sólo se disolvió muy poco; sin embargo de ahí se obtuvo 0.6609g de un sólido cristalino, muy soluble en agua y en disolventes polares. Una vez decolorado con carbón activado y cristalizado de acetona-MeOH, dió una sustancia cristalina con  $mp=168-180^{\circ}C$ ; cuyo espectro en IR muestra abundantes grupos

oxhidrilo.

Se preparó el derivado acetilado del poliol, tomando 100mg de la muestra y disolviéndolo en 1ml de piridina y 2ml de anhídrido acético, dejándolo por espacio de 1hr. en baño de vapor; al final se agregaron unas gotas de agua fría y se dejó cristalizar, obteniéndose cristales en forma de agujas finas. se recrystalizó de acetona-agua y se obtuvieron cristales solubles en AcOEt y en acetona, parcialmente solubles en EtOH e insolubles en agua, pf=123-124°C .

Se obtienen más cristales al trabajar el extracto EtOH, dando un total de 11.5958g (1.58% de la semilla seca), por la abundancia fue fácil cristalizar de MeOH-H<sub>2</sub>O en frío; para su identificación se compararon los pf de los cristales y del producto de acetilación, identificándolo posteriormente como manitol y su hexa-acetato (figura. 6) .

### III.3.- DESARROLLO DEL TRABAJO CON LOS EXTRACTOS

Todos los disolventes manejados fueron grado industrial por lo que tenían que ser destilados, cuando las necesidades lo requerían el disolvente se purificaba por otros procedimientos indicados en manuales químicos de purificación.

#### TRABAJO CON EXTRACTOS NO POLARES

1270g. de semilla madura proporcionaron 145.39g. de extracto heptánico del que se tomó 51.74g., se mezcló íntimamente con celita y se aplicó a una columna empacada con 1Kg de silicagel para columna. La elución se comenzó con hexano, aumentando la polaridad con AcOEt de 5% en 5%, hasta terminar con AcOEt puro. Se recolectaron fracciones de 200-300ml c/u, cada fracción se marcó en orden progresivo hasta 719 fracciones. La cromatografía en columna se siguió por placa cromatográfica y las fracciones que presentaron Rf parecido se reunieron .

La mayoría de las fracciones no fueron trabajadas por haber sido mezclas con poca cantidad de muestra, las de mayor cantidad de muestra y las que se considero importantes quedaron de la siguiente manera:

De la fracción 10-12 se extrajo una sustancia sólida de consistencia cerosa con peso de 0.1134g y punto de fusión 66-69 °C, cuyo IR Y RMN indican que es una parafina. Entre las fracciones 1-54 se notó una aglutinación que al tratar de purificar con disolventes se polimerizó. Las fracciones 49-53 , 92-121 , 122-159 y 166-184 son aceites . En la fracción 188-193 se encontró un poco del polvo blanco que se presentó al concentrar el extracto, dando igual Rf, no se pesó por estar impuro; se purificó una cantidad pequeña

dando  $pf=268-269^{\circ}C$ , que coincide con el del ácido ursólico (figura.2) .

Una vez conocidos más o menos los constituyentes mayoritarios del extracto hexánico, se procedió a caracterizar al aceite tomando en cuenta algunas normas importantes. No se refinó el aceite, por lo que todos los datos se referirán a aceite crudo y quedará definido aquí como extracto no polar de semilla madura.

### III.3.1.- CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DEL ACEITE CRUDO

Para esta parte fué necesario realizar la medición de algunos parámetros como índice de saponificación, ácidos libres, insaponificables y los ácidos grasos constituyentes del aceite. No se consideró el índice de yodo por tener ciertos inconvenientes al preparar y manipular el reactivo.

#### PREPARACION DE REACTIVOS Y SOLUCIONES NORMALIZADAS

Previamente fué necesario preparar EtOH y MeOH absolutos. Para eliminar impurezas se realizó un reflujo agregándole a 1.2l del alcohol la cantidad de 10g de NaOH y 8g de Al en tiras pequeñas (obtenidas de papel aluminio para envolturas) ; una vez reflujo, se destiló y guardó en una botella ámbar con tapón y tapa .

Para preparar soluciones acuosas se usó agua destilada y hervida, con el fin de impedir interferencias.

La normalización del ácido (HCl RA Merck) se realizó con  $Na_2CO_3$  QP, utilizando en todo caso agua destilada y hervida; los indicadores fueron anaranjado de metilo -- verde de bromocresol y

fenolftaleína, soluciones preparadas en el laboratorio.

La normalización de las soluciones de hidróxido de sodio y la de potasa hidro-alcohólicas se realizó con la solución ácida, previamente preparada (patrón secundario), utilizando como indicador fenolftaleína.

#### PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LOS PARAMETROS DEL ACEITE

El seguimiento de las reacciones de saponificación (hidrólisis alcalina de un aceite), para determinar el número o índice de saponificación, fue por retro-titulación; esto es: agregado un exceso conocido de solución de hidróxido, en seguida, hidrólisis con reflujo por una media hora y finalmente la titulación del exceso de base con el ácido normalizado, agregando indicador de fenolftaleína.

En la determinación de ácidos libres las muestras tomadas fueron de aprox. 1g-2g, se disolvían parcialmente en EtOH redistilado sobre Al/NaOH y se valoró con solución básica, utilizando como indicador fenolftaleína.

Para determinar el material insaponificable se realizó una serie de saponificaciones de una cantidad conocida de la muestra y se extrajeron con hexano; primero en medio básico (pH=10) y posteriormente, acidulando, en medio ácido (pH=4).

Las muestras analizadas fueron todos los aceites crudos.

### DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS

Para analizar el tipo de ácido graso se siguió la metodología de una tesis<sup>15</sup>, del ASTM<sup>16</sup>, del AOAC<sup>17</sup> y de un libro de la IUPAC<sup>18</sup>. Consiste en hidrolizar los ésteres del glicerol con KOH o NaOH en solución hidro-alcohólica; posteriormente, formar los ésteres metílicos de los ácidos grasos con MeOH absoluto (destilado sobre Al/NaOH), utilizando trifluoruro de boro (eterato) como catalizador. A continuación se analizó la mezcla de ésteres por medio de cromatografía de gases. En el caso presente se inyectó a una columna de 25mts. de sílice fundida con diámetro interior de 0.3mm y fase estacionaria de 5% fenilmetilsilicón, el flujo acarreador fue de 2ml/min. de hidrógeno con relación de split 40:1; las temperaturas: del inyector 250°C, del detector 250°C y de la columna programada desde 180°C a 5 °C/min. hasta 250°C.

Las fracciones 49-53 , 92-121 , 122-159 y 186-184, líquidos aceitosos que aumentan en viscosidad según el orden de elución; su color va de un amarillo tenue con enturbiamiento a un amarillo característico. La cantidad de cada uno es con el mismo orden: 28.2961g , 5.2817g , 2.0178g y 4.4205g. Todas éstas estaban muy impuras por lo que se desarrolló una percolación para la fracción 49-53 y la fracción 92-121, tomando 2g e iniciando con hexano y continuando con mezcla de hexano-acetato de etilo de 2% , 5% y 10% . Se lograron purificar un poco, obteniendo un aceite incoloro-transparente de la frac. 49-53 y un aceite amarillento-transparente para la frac. 92-121; de ahí se tomaron muestras preparándolas para : IR , RMN, cromatografía de gases.

### III.3.2. - EXTRACTOS POLARES

Esta sección trata del trabajo con los extractos polares de semilla madura y verde, la purificación de los compuestos obtenidos, así como de los compuestos derivados en caso necesario; dando algunos datos espectroscópicos esenciales.

#### ESTUDIO EN SEMILLAS MADURAS

El 20 de junio de 1987 se recolectaron semillas maduras de fresno, las que una vez secas y molidas pesaron 1.27kg, cuando estas fueron desengrasadas con heptano y posteriormente extraídas con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 4:1 dieron 72.06g de extracto, este fue adsorbido en celita y se inició su análisis el 4-abril-1989.

Se realizó extracción sólido-líquido para separar fracciones solubles en fase líquida, utilizando como fase sólida el total del material adsorbido; como fase líquida, diferentes disolventes, empezando con el de menor polaridad.

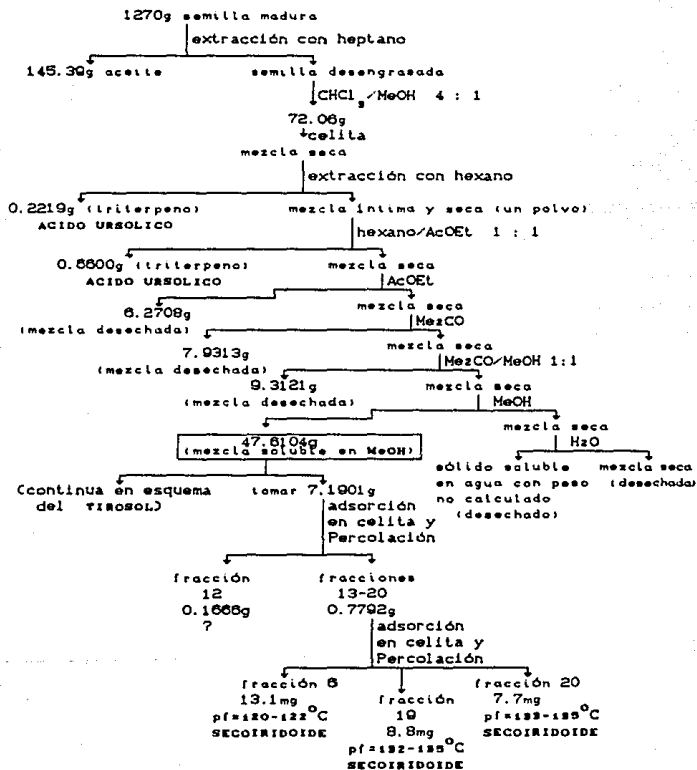
Las extracciones fueron repetidas cuatro veces por cada disolvente, utilizando 250ml en cada extracción. Los extractos se reunieron para destilar a sequedad y pesar. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.2 :

Tabla.3.1.-Resultado de las extracciones de material polar de semillas maduras adsorbidas en celita.

Disolvente	peso extraído
HEXANO	0.2219g
HEXANO/AcOEt 1:1	0.6600g
AcOEt	6.2708g
Me <sub>2</sub> CO	7.9313g
Me <sub>2</sub> CO/MeOH 1:1	9.3121g
MeOH	47.6104g



DIAGRAMA. 2- Trabajo con el extracto polar de la semilla madura.



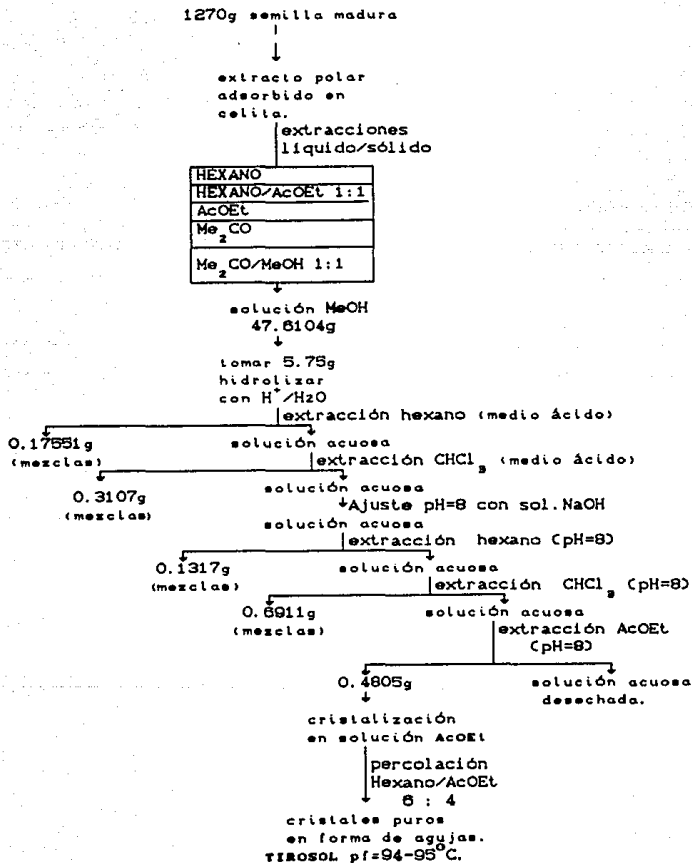
En las fracciones hexánicas y en las hechas con mezcla hexano/AcOEt 1:1 fue observada, por cromatografía de capa fina, la presencia de un triterpeno como componente mayoritario. Las tres siguientes también lo tenían, pero en menor proporción; además, se notaba la presencia de otro, en poca cantidad. Otros compuestos se observaron a partir del tercer extracto; estos eran más abundantes, pero no fue posible separarlos en placa variando las concentraciones y componentes de los eluyentes; porque sus Rf son muy parecidos y arrastran a otros de menor cantidad con características de grupos funcionales semejantes .

#### FRACCIÓN SOLUBLE EN MeOH DEL EXTRACTO POLAR ADSORBIDO EN CELITA

Del extracto metanólico (47.6g) se tomaron 5.75g, los cuales se hidrolizaron, extrayendo posteriormente con disolventes. Para empezar se disolvió con 10ml de MeOH ligeramente caliente; posteriormente, se añadió 10ml de agua destilada y 20ml de HCl al 38%, se calentó a reflujo durante 2hr. Una vez terminada la reacción se agregaron 20ml de agua destilada y después se extrajo en medio ácido, con 25ml de hexano, la operación se repitió 3 veces, después se realizaron idénticas extracciones con cloroformo; posteriormente se neutralizó con solución de sosa concentrada y se extrajo siguiendo el procedimiento antes descrito. Los resultados obtenidos fueron:

hexano en medio ácido dió 0.1751g  
 cloroformo en medio ácido aportó 0.3107g  
 hexano en medio neutro (pH = 8) dió 0.1317g  
 cloroformo en medio neutro (pH = 8) dió 0.6911g  
 AcOEt en medio neutro (pH = 8) dió 0.4805g

DIAGRAMA.3- Obtención de TIROSOL



Las soluciones se oscurecieron al concentrar, excepto la de AcOEt que empezó a cristalizar; la placa cromatográfica reveló que estos extractos estaban constituidos por mezclas complejas, y de menor polaridad que la muestra original.

Se volvió a repetir la hidrólisis con 5.2612g del extracto MeOH. Siguiendo el mismo procedimiento se obtuvieron como resultado cristales incoloros en forma de agujas estriadas, insolubles en  $\text{CHCl}_3$ , parcialmente solubles en éter isopropílico y solubles en metanol y en acetato de etilo. Se obtuvo un total de 0.1400g, que fueron purificados por medio de percolación con una relación muestra/silica-para-placas 1:12, utilizando como eluyente hexano/AcOEt 8:4, para las primeras 4 fracciones de 10ml, y se aumentó la relación a 1:1 para las 4 fracciones siguientes y se terminó con AcOEt puro.

Las fracciones 4-5 eluyeron un compuesto cristalino, que fué recristalizado de éter isopropílico-AcOEt dando un compuesto puro con  $\text{pf}=92-93^\circ\text{C}$ . Se le identificó como tirosol ( $\beta$ -Cp-hidroxifenil)etanol, figura.3) por comparación de sus constantes físicas reportadas en la literatura y por su espectroscopia. Su espectro de IR muestra la presencia de funciones alcohol, las que se confirman mediante la formación de un di-acetato. Para realizar la reacción se tomó 0.0520g de los cristales y en un matraz para 5ml se agregó 0.5ml de piridina y 0.5ml de anhídrido acético. Por espacio de 1/2hr se deja sobre una baño de vapor caliente y posteriormente se agregó unas gotas de agua. Al notarse que después de un tiempo no se formaron cristales

y la solución era turbia, se procedió a extraer con AcOEt; recuperándose 0.0809g. de un aceite incoloro, cuyo espectro de RMN<sup>1</sup>H muestra la presencia de dos metilos de acetato, uno alifático a 2.05ppm y otro aromático a 2.30ppm, el metileno bencílico permanece en 2.90ppm mientras que el metileno unido al grupo acetoxi se ha desplazado de 3.70ppm en el tirosol a 4.25ppm en el acetato.

#### PERCOLACION DEL EXTRACTO MeOH DE LA CELITA

7.1901g del extracto fueron aplicados en una columna (con relación 1:12 de muestra/silica-para-placa), iniciando la elución con CHCl<sub>3</sub> y terminando con MeOH en la fracción 60. Las fracciones fueron reunidas de acuerdo a las placa de seguimiento de la elución. Los resultados se muestran en la tabla.3 :

Tabla. 3.2. - Resultado de percolación de compuestos sólo solubles en disolvente polar (MeOH).

fracción	peso
1 - 5	-
6 - 9	1.00g
10 - 15	2.32g
16	-
17 - 24	0.90g
25 - 33	0.47g

fracción	peso
34	-
35 - 50	0.53g
51 - 54	0.25g
55 - 58	0.34g
59 - 60	0.23g

Las fracciones de 10-15 contenian tres compuestos más abundantes; por lo que se realizó otra percolación con muestra/silica-para-placas 1:12, utilizando CHCl<sub>3</sub>/MeOH en relación 9:1 y fracciones de 10ml. Las fracciones importantes fueron la 12 con 0.1666g y de la 13-20 con 0.7792g. A estas últimas fracciones se les percoló por contener a 2 compuestos mayoritarios, utilizando relación

muestra/silica-para-placas 1:12 y eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  85:15, hasta la fracción 12; posteriormente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  8:2 hasta la fracción 26, para finalmente lavar con MeOH. Las fracciones más importantes en este caso (tabla.4) fueron unos sólidos color ámbar, amorfos, que fundieron con caramelización .

Tabla. 3.3. - Compuestos polares obtenidos por extracción y percolaciones de extracto polar de semilla madura.

fracción	peso	punto de fusión
6	13.1mg	120-122 °C
19	8.8mg	132-135 °C
20	7.7mg	133-135 °C

Se mandaron a IR, con clave Fr. M-6 (pf=133-135), M-19 y M-20, los espectros en el IR de M-6 y M-19 muestran la presencia de numerosos grupos -OH, además de un carbonilo posiblemente de carboxilo a  $1700\text{cm}^{-1}$ ; M-20 también muestra carbonilo y varios -OH's, su espectro de RMN'H indicó que se trata de un glucósido de secoiridoide por presentar señales simples en 7.50 y 7.80ppm típicas para H-3 de iridoides que contienen carbonilo en C-11; se observan señales de metilos superpuestos a 1.6ppm, típicas de secoiridoide, la complejidad de ésta señales y el hecho de observar 2 señales para H-3 hace pensar que se trate de un bis-secoiridoide.

**EXTRACTO MeOH DE SEMILLA VERDE Y FRESCA DEL 12 DE ABRIL DE 1989**

Al redissolver el extracto seco con MeOH se obtienen por filtración 4.77g de sólidos no disueltos en MeOH. Al disolvente polar se agregó agua destilada para tenerlo al 80% aprox.; posteriormente, se realizó 7 extracciones de 100ml cada una, con mezcla hexano/benceno 1:1. Lo que quedo en la mezcla hexano/benceno se seco dando 0.4019g de polvo blanco (mezcla de triterpenos según lo revelado en la cromatografía de capa fina).

A la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O, evaporada lo más posible, se le extrae con 3 porciones de 100ml de CHCl<sub>3</sub>, las cuales juntas y sin disolvente dieron 1.6502g de una pasta café-verdosa.

Evaporada la fase hidro-alcohólica hasta dejar casi al agua como único disolvente, se le extrajo con alcohol isobutilico; utilizando 5 extracciones con 100ml. El resultado fue de 3.2450g de una pasta café-amarillenta.

La fase acuosa seca dejó 12.3785g, de un residuo en forma de pasta café-verdosa. No fue posible trabajarla por ser una mezcla compleja, según lo revelado en la cromatografía de capa fina.

A partir de estos resultados lo único que se pudo deducir es que la semilla verde contiene más material polar extraible en MeOH y H<sub>2</sub>O, que lo obtenido en el extracto no polar.

## RESIDUO EN SEMILLA VERDE Y SECA DEL 12 DE ABRIL DE 1989

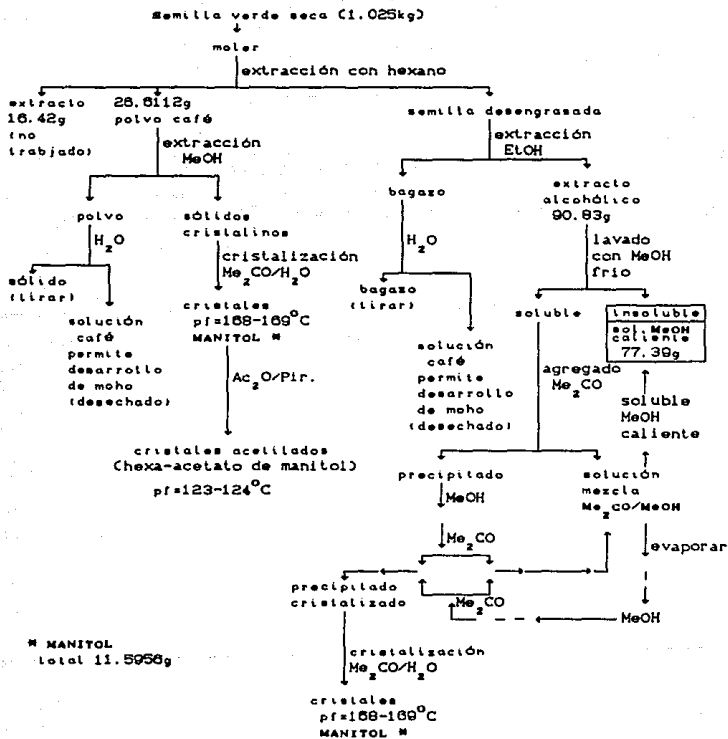
El polvo café (26.81g) se lavó con MeOH disolviéndose poca cantidad de residuo, al separar y evaporar la solución dió 0.6809g de un sólido cristalino, muy soluble en agua y en disolventes polares. Purificado con carbón activado y cristalizado de acetona-MeOH, mostró  $pf=168-169^{\circ}C$ ; en su espectro de IR se presentó abundancia de grupos oxhidrilo .

Se preparó el derivado acetilado, tomando 100mg de la muestra y disolviendolo en 1ml de piridina y 2ml de anhídrido acético, dejándolo por 1hr. en baño de vapor; al final se agregaron unas gotas de agua fría y se dejó cristalizar, obteniéndose cristales en forma de agujas finas. Al ser recristalizados de acetona-agua produjeron cristales incoloros, con  $pf=123-124^{\circ}C$ , solubles en AcOEt y en acetona, parcialmente solubles en EtOH e insolubles en agua. Su espectro de RMN'H fue idéntico al del hexa-acetato de manitol (figura.6) .

Posteriormente se obtuvieron más cristales al trabajar el extracto EtOH, dando un total de 11.5056g de manitol; que por su abundancia fue fácil cristalizar de MeOH-H<sub>2</sub>O .



## DIAGRAMA. 4- Obtención de MANITOL



## EXTRACTO ETOH DE SEMILLA VERDE Y SECA DEL 12 DE ABRIL DE 1989

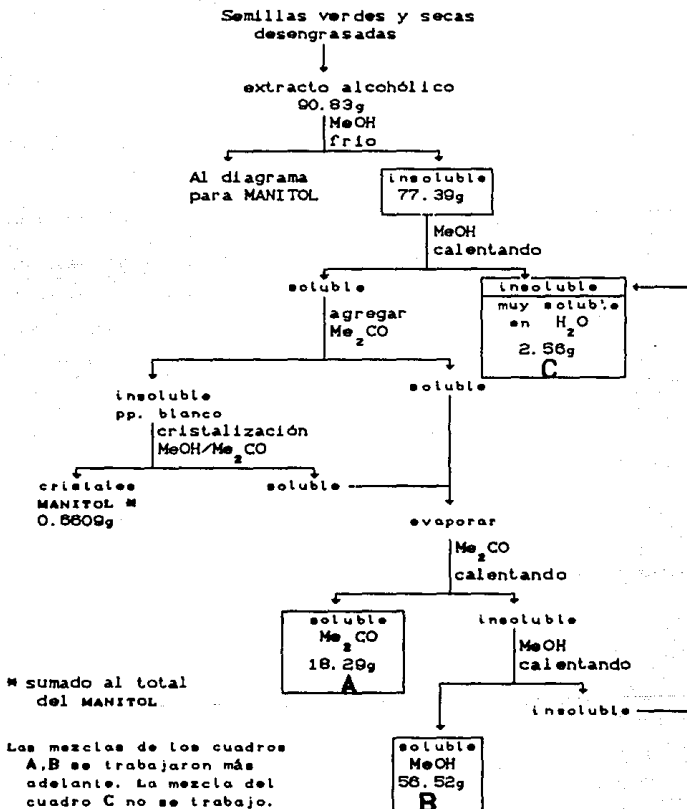
Al extracto (90.83g.), disuelto en MeOH caliente, se le agregó acetona, formandose un precipitado blanco que se separó por filtración y se lavó con acetona. El precipitado se disolvió en MeOH y se agregó acetona (hasta observar inicio de precipitación, con relación aprox. 3:1 de MeOH/Me<sub>2</sub>CO), se dejó en reposo para formar cristales de manitol con  $pf=168-169^{\circ}C$  (ver diagrama.4) .

El extracto final (peso de 77.39g), redisolto en MeOH, formó un precipitado chicloso color ámbar, al agregar Me<sub>2</sub>CO; filtrando y lavando con MeOH se disolvió parcialmente, lo que quedó en el papel filtro se hidrató al secar al vacío, formándose una pasta chiclosa. Al observar que no era soluble en MeOH se agregó agua, disolviéndose en ella. A la solución acetona-MeOH se le destiló el disolvente a sequedad, agregando acetona y disolviendo lo posible con calentamiento. Separando por filtración se obtuvo una masa ámbar chiclosa que se disolvió parcialmente con MeOH caliente; lo insoluble, fué a la otra porción disuelta en agua. Al final quedaron tres soluciones acetona, MeOH y acuosa que, destilándolas proporcionaron las cantidades indicadas en la tabla.3.4 :

Tabla.3.4. - Resultado de las separaciones con disolventes del extracto polar de semillas verdes.

DISOLVENTE	PESO RESIDUO
acetona	18.29g
MeOH	58.52g
acuosa	2.58g

DIAGRAMA.5- Separación del extracto polar de semilla verde con diferentes disolventes



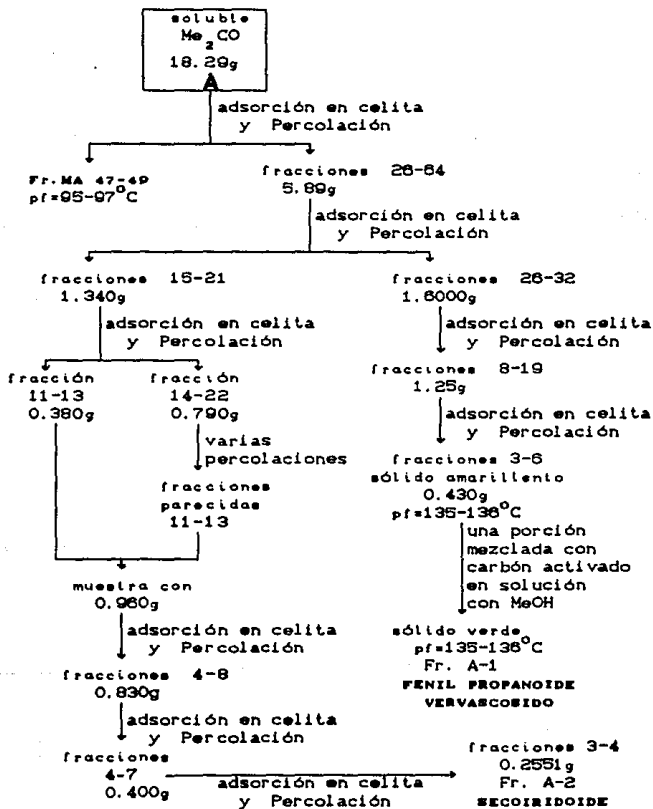
## EXTRACTO SOLUBLE EN ACETONA

La fracción de acetona (diagramas. 5 y 6, en el cuadro A) se percoló con 128.35g de sílica para placa, obteniéndose fracciones de 125ml, utilizando como eluyente AcOEt/hexano 1:1 (hasta fracción 13), AcOEt (hasta fracción 32) y posteriormente con mezcla AcOEt/acetona. De las fracciones 47, 48 y 49, eluidas con AcOEt/acetona 7:3, se obtuvo un sólido café con  $pf=95-97^{\circ}C$ ; cuyo espectro en el IR muestra la presencia de abundantes grupos oxhidrilo (banda ancha  $3200-3500cm^{-1}$ ) y grupo carbonilo ( $1700cm^{-1}$ ), su espectro en UV muestra absorciones a  $\lambda_{max}$  220, 285 y 325nm, típicos de un fenil propanoide .

Las fracciones de 26-84 reunidas proporcionaron 5.89g de residuo. Este se cromatógrafió con 80g. de sílica, utilizando como eluyente  $CHCl_3/MeOH$  92:8 (hasta la fracción 11), 85:15 (hasta la fracción 22), 8:2 (hasta la fracción 31), 7:3 (hasta la fracción 38) y con 1:8 (hasta la fracción 48). Las fracciones obtenidas estaban constituidas por mezclas, por lo que se eligió las que se presentaban menos complejas, resultando las fracciones 15-21 y 26-32.

Las fracciones 26-32 fueron 1600mg de una mezcla pastosa de color ámbar , presentándose tres componentes al revelar las cromatoplasas; por lo que se hizo una percolación con 32g de sílica, eluyente  $CHCl_3/MeOH$  8:2 con fracciones de 20ml desde la 1 hasta la 12 ; de 40ml a partir de la fracción 13 , de la fracción 23 se cambió el eluyente a  $CHCl_3/MeOH$  1:1. El resultado de esta percolación dió un compuesto mayoritario más o menos puro,

DIAGRAMA. 6- Obtención del FENIL PROPANOIDE y del SECOIRIDOIDE.



considerando que no tenía pureza para las espectroscopias se decidió percolar las fracciones 8-19, que pesaron 1.25g, con 15.08g de sílica y utilizando como eluyente  $\text{CHCl}_3/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$  5:3:2 y fraccionando con volúmenes de 20ml. De las fracciones 3-6 fué obtenido un compuesto bastante puro, como un aceite espeso color amarillo que al secar en el rota-vapor forma espuma rígida, la que se recupera raspando las paredes, quedando como polvo apelmazado, con peso de 430mg. . Para purificarlo de colorantes (que dejaban una estela amarillenta en la cromatoplaaca antes de revelar) se decidió disolver la mitad de lo obtenido en alcohol, agregando carbón activado, se calentó suavemente; posteriormente al filtrar a través de celita se observó que el color de la solución amarilla, antes de agregar el carbón, salió color verde y al destilar el disolvente en rota-vapor se comportó de la misma forma el compuesto, pero de color verde. Comparando los puntos de fusión de los polvos verdes con los amarillos se notó, en repetidas ocasiones, el mismo punto de fusión ( $\text{pf} = 135-136^\circ\text{C}$ ). Al disolver cada polvo por separado en MeOH y calentando las soluciones se comportaron estables, sin variar su correspondiente color. Por sus bandas en IR ( $3300-3400\text{cm}^{-1}$  de -OH y  $1700\text{cm}^{-1}$  de carbonilo), así como su absorción en el UV ( $\lambda_{\text{max}}$  240, 285 y 330nm) y su espectro de RMN'H donde se manifestaron los hidrógenos anoméricos en 4.90 y en 5.10ppm y señal del sistema del cinamato a 6.30 y 7.70ppm, así como del de aromático a 6.60 y 7.40ppm se dedujo se trata de un glucósido de fenil propanoide (figura.7), corroborándose con RMN' $^{13}\text{C}$  la presencia de éste.

La fracción 15-21, con 1340mg, formada por un líquido viscoso color ámbar con tres componentes, siendo uno el principal, se percoló utilizando 15.4g de sílica y eluyendo con MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1:9, las fracciones se separaron de 20 en 20ml; de estas, las fracciones más importantes fueron la 11-13 con 380mg y la 14-22 con 790mg. Tratando de separar los componentes de 14-22 con percolaciones, no se logró separar nada puro. De la fracción 11-13 se logró reunir más muestra parecida por aspecto y constituyentes con mismos Rf en una cromatoplaqa, de las percolaciones hechas a 14-22, se obtuvieron 960mg con dos componentes mayoritarios y un tercero en poca cantidad, la percolación se realizó con CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO/MeOH 5:4:1 con fracciones de 10ml; de estas, las fracciones de 4-8 con peso de 830mg se reunieron y se volvieron a percolar con CHCl<sub>3</sub>/Me<sub>2</sub>CO/MeOH 8:3:1 y obteniendo eluatos de 10ml. Finalmente en la percolación de 4-7 con 400mg de muestra (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Me<sub>2</sub>CO/MeOH 9:8:1 como eluyente), salió en las fracciones 3 y 4 un aceite espeso color amarillo casi limpio con peso de 255.1mg el cual resultó ser un glucósido de secoiridoide; porque presentó señales en 7.30ppm como singulete del protón en C-3 y carboxilo conjugado de C-11 unido a C-4, la presencia de azúcares y aromático se observa en su espectro de RMN'H y de <sup>13</sup>C (figura.10).

#### FRACCION MeOH DEL EXTRACTO DE SEMILLA VERDE Y SECA

La mayor cantidad de muestra se extrajo en esta fracción (56.52g, ver diagramas.5 y 7 en el cuadro B) ; pero no fue fácil separar esta mezcla con percolaciones, utilizando disolventes de

polaridad menor al agua. Se había observado que la solubilidad en MeOH era relativamente buena pero no separaba nada en placa; por lo que realizando cromatografías en capa fina de sílica-gel, usando como eluyentes<sup>19</sup> las siguientes mezclas  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ ,  $\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$  y  $\text{AcOEt}/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$  en proporciones variables, no se observó la suficiente resolución como para elegir alguna.

Decidida la realización de una serie de percolaciones para 43.50g del extracto, con los eluyentes mejor seleccionados, se obtuvo lo siguiente :

Primera percolación con 304.5g de sílica en columna de 5.5cm de diámetro, fracciones de 100ml con los eluyentes mostrados en la tabla.3.5. .

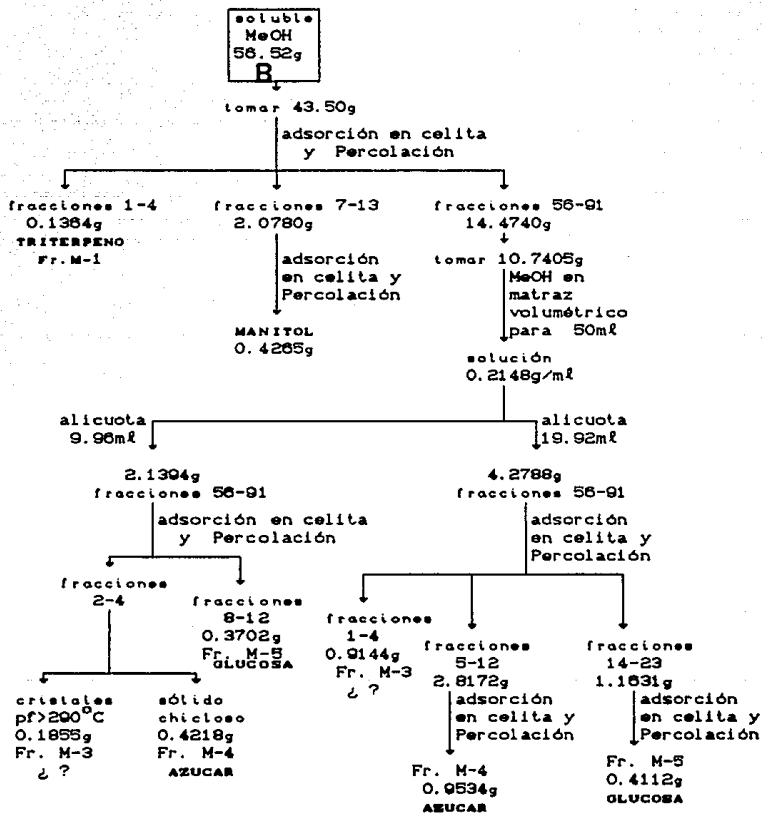
Tabla.3.5.- Variación de los eluyentes en la percolación de la parte soluble en MeOH del extracto polar de semilla verde.

A partir de fracción	Eluyente	Proporción
1	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}$	6:4
13	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	12:8:1
31	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	6:4:1
48	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	6:4:2
61	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	6:4:3
92	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	5:4:3
107	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	4:4:3
120	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	1:1:1
129	$\text{Me}_2\text{CO}/\text{MeOH}$	1:1
133	MeOH	1
138	$\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$	9:1

De la fracción 1-4 se purifican 136.4mg de un triterpeno llamándolo Fr. M-1(contrado). Para la fracción 7-13 con peso de



DIAGRAMA.7- obtención de los azúcares.



2.078g se sigue una serie de percolaciones encontrándose 426.5mg de manitol (figura. 6) .

En un intento de separar más componentes se decidió probar mezclas de disolventes cercanas a la polaridad del MeOH, siendo estos los siguientes: nBuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 12:3:5, iBuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1:1, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>/nBuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 1:5:2:4; sin embargo el recorrido del eluyente se llevó en algunos lo menos 1 día, aclarando que sólo eran placas comparativas. Se trató de realizar una placa preparativa en papel con uno de ellos, durante una semana no llegó a recorrer el eluyente lo suficiente, como para realizar una separación .

De la fracción 58-91(14.474g) que contenía cuando menos cuatro compuestos diferentes, se tomó 10.7405g, se disolvió en MeOH y se pasó a un matraz volumétrico aforando a 50ml. De ahí se tomaron alícuotas conocidas para poder hacer pruebas. Una alícuota de 0.08ml (2.1481g de muestra) se percoló con 28.95g de sílica y como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 7:1:2 , obteniendo fracciones de 20ml. De las fracciones 2-4 eluyeron 185.5mg de cristales solubles en MeOH que no funden abajo de 290°C y no revelan con los reveladores convencionales, por lo que fue desechada. Lo disuelto en la mezcla de disolventes se aplicó en cromatoplaça para determinar su pureza. A su vez lo que quedó disuelto en fracción 2-4 fue un azúcar(M-4) que no se identificó (421.8mg), de ahí se obtuvo más sólido del desechado. La fracciones 8-12 lo constituyó un compuesto con impurezas (370.2mg) al que se le caracterizó como glucosa, ya que su espectroscopía de IR, RMN'H y <sup>13</sup>C y derivados

actilado (pf=116-119°C) y fenilhidrazona (pf=205-207°C) concordaron con lo reportado.

De la fracción 56-91 contenida en MeOH fueron tomados 19.8ml (equivaliendo a 4.2532g) para percolación con 55g de sílica, eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 8:1:2 y separando fracciones de 40ml, resultados en la tabla. 3.6 .

La percolación de fracción 5-12 se realizó con 46.51g de sílica, eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH 18:1:1 hasta fracción 6 y de ahí en adelante con relación 8:2:1, dejó como resultado 0.9534g de M-4 (azúcar no identificada) con buena pureza.

De fracción 14-23 se realizó percolación con 46.0g de sílica y elución con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/AcOH con fracciones de 50ml, empezando con relación 18:1:1 para las primeras 3 fracciones, en las fracciones 4-10 con relación 16:1:3; para la 11 en adelante, con 7:1:2. Para las fracciones 12-15 se obtuvo 0.2027g que contenían bastante M-5 (glucosa), en las fracciones 16-25 salió 0.4112g de glucosa con buena pureza para espectroscopias .

Tabla. 3.8. - Resultados de percolación de la fracción 56-91.

Fracción	Contenido	cantidad
1-4	M-3, no identificado	0.9144g
5-12	M-3 y mucho M-4	2.8172g
13	M-4 y M-5	-----
14-23	M-4 y mucho M-5	1.1631g
24-27	muy poco M-5 e impurezas	-----
28	lavado con MeOH	-----

Para caracterizar a los compuestos fenil-propanoide y secoiridoide se prepararon los derivados acetilados con  $\text{Ac}_2\text{O}$ /piridina, lográndose separar, no agregando agua y destilando la mezcla de reacción con AcOEt como líquido de arrastre al evaporarse con la piridina y del anhídrido acético.

Con apoyo de la RMN<sup>13</sup>C se decidió determinar la estructura de los compuestos para concluir con sus estructuras.

### III.3.3.-PURIFICACION Y PREPARACION DE DERIVADOS DE LOS TRITERPENOS

Los triterpenos encontrados tanto en la semilla verde como en la madura, fueron purificados al practicar extracción hexano/benceno 1:1 de una disolución previa de las muestras en MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2. Los triterpenos se disuelven en MeOH y decoloraron con carbón activado para concentrarlos y que formaran cristales, para secarlos por filtración del disolvente.

Para la percolación se tomó 1g de cada grupo de los triterpenos (de semilla madura y de la semilla verde), cada uno fue disuelto en lo menos de MeOH caliente y adsorbido en celita. Posteriormente en cada caso se eluyó con hexano/acetona 8:2 en columna para 20g de sílica para placa. La presencia de los triterpenos en las fracciones se hizo notar por la formación de un polvo blanco en las paredes de los recipientes. El triterpeno principal en la semilla verde cristalizó formando cúmulos, se obtuvieron 371.2mg considerandolos como puros y con  $pf=309^{\circ}C(ATD)$  o más de  $290^{\circ}C(FISHER)$ , el cual se identificó con el ácido oleanólico (figura.5). Para el triterpeno principal en semilla madura, se obtuvo 437.4mg., considerandolos puros,  $pf=266-268^{\circ}C(FISHER)$ , el cual es el ácido ursólico (figura.2).

#### METILACION DE TRITERPENOS CON DIAZOMETANO

Utilizando 20ml de NaOH al 40% Cesta solución se enfrió una vez preparada, dejandola en baño de hielo hasta su utilización), 80ml de éter etílico lavado 3 veces con 25ml de agua helada, 1g N-nitroso-N-metilurea, embudo de separación para 125ml con llave de teflón y aprox. 1g del triterpeno.

La forma de preparar el diazometano es la siguiente:

Se colocó en el embudo de separación la sosa y el éter etílico, dejando separar las fases perfectamente. Porciones pequeñas de la N-nitroso-N-metilurea fueron adicionadas en el éter y observando la reacción en la interfase, hasta que disminuyó, se agregó un poco más. La fase etérea se fue poniendo amarilla, si se observaba que el desprendimiento de las burbujas llegaba a la superficie indicaba la saturación del éter, por lo que no se agregaba más del reactivo. Una vez preparado el diazometano en éter, era vaciada con cuidado la sosa y desechada, recibiendo el éter en un recipiente limpio con lentejas de sosa, sin raspaduras en su interior.

El reactivo preparado se mantuvo en baño de hielo o guardado en la hielera de un refrigerador, no dura mucho tiempo por lo que se le trató de utilizar inmediatamente en la reacción de metilación.

La reacción se llevó a cabo agregando un poco del diazometano a la solución sobresaturada del triterpeno en MeOH enfriado con baño de hielo, siguiendo la reacción por cromatografía de capa fina.

El ácido triterpénico en semilla verde dió un éster metílico cristalino incoloro en forma de agujas finas y largas, con dos puntos de fusión  $pf=130-132^{\circ}C$  cambiando a estructura amorfa con  $pf=198-200^{\circ}C$ . Como su  $pf$  y su espectroscopia de IR y de RMN'H coincide con la del oleonoiato de metilo, quedó el triterpeno plenamente identificado como ácido oleanólico.

El segundo ácido triterpénico dió una mezcla de productos; por lo que se sometió a una percolación con muestra/silica-para-placa 1:10 y eluyente Hexano/acetona 95:5 , dividiendo en fracciones de 5ml; saliendo el derivado en la 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> fracción, cristalizando como agujas pequeñas con  $pf=110-112^{\circ}C$ ; con las espectroscopías se le identificó como el éster metílico del ácido ursólico.

## IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.

En esta sección se presenta una serie de tablas comparativas de 2 aceites comerciales y se introducen los resultados experimentales de las semillas del fresno estudiado, como una comparación. Por otro lado se presentan los resultados de la cromatografía de gases de las 2 fracciones más importantes del aceite.

Continuando, la presentación de los compuestos obtenidos con sus datos físico-químicos y espectroscópicos característicos, así como su estructura.

### IV.1.- CONTENIDO DEL ACEITE CRUDO

Al iniciar el trabajo del aceite crudo de semilla madura se observó la formación de precipitados sólido cerosos que al calentar la solución se disolvió. Una parte lo forma una parafina cuyos datos son:

---Parafina sólida de fracción 8-9 y 10-32 con  $pf=65-67^{\circ}C$ . Fórmula  $C_{31}H_{64}$ . El espectro de IR en solución hace notar la presencia de metilenos como componente casi total del compuesto ( $2930cm^{-1}$ ,  $2860cm^{-1}$ ,  $1470cm^{-1}$ ,  $1380cm^{-1}$ ,  $1130cm^{-1}$ ). En RMN'H se observa metilenos (muchos en 1.22ppm y pocos en 1.17ppm) y los metilos (0.85ppm). El espectro de masas indica una pérdida constante de metilenos (14 unidades) siendo la  $m/z = 436$  para el  $M^+$  y . Por lo que se decidió que era  $n-C_{31}H_{64}$ .

Otro sólido es una cera con aspecto muy parecido al anterior, obtenido en la fracción 49-53 y datos siguiente:

---Sólido separado de la fracción 49-53 en percolaciones de purificación de esa fracción, con  $pf=66-68^{\circ}C$  y soluble en cloroformo y hexano. Fórmula condensada  $C_{42}H_{92}O_2$  como éster. Su IR en solución de  $CHCl_3$  muestra: Señal de metilenos  $2925cm^{-1}$ ,  $2850cm$



y  $1480\text{cm}^{-1}$ ; carbonilo a  $1720\text{cm}^{-1}$  con banda en  $1150\text{cm}^{-1}$  del enlace  $\text{C}=\text{O}$ . En el espectro de masas hay rompimiento de hidrocarburo hasta  $m/z = 239$  ( $\text{C}_{17}\text{H}_{35}^+$ ) y de  $437-564$  ( $\text{C}_{20}\text{H}_{38}^+$ ) una pérdida completa sin fragmentaciones previas, de  $592-677$  ( $\text{C}_{28}\text{H}_{46}^+$ ) con pérdida inicial de 13 unidades  $m/z = 57$  (100%), de  $257$  (52%) a  $295$  (23%) a  $313$  (15%) a  $341$  (11%) y a  $369$  (5%) con fragmentaciones intermedias muy poco notorias.,  $650$  (1.6%),  $677$  (1.4%).

Otra parte lo forma la presencia de un triterpeno que fue identificado como ácido ursólico ( $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ ), de acuerdo a su pf. y por el espectro de RMN<sup>1</sup>H, idéntico al de una muestra pura y bien caracterizada de dicho ácido. Sus datos son:

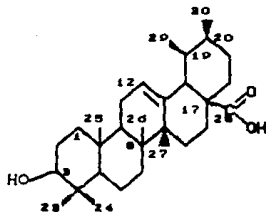


Figura.2- ACIDO URSOLICO

Precipitado en el extracto heptánico y obtenido en la percolación del mismo extracto. Un polvo blanco poco soluble en  $\text{CHCl}_3$  y parcialmente en  $\text{MeOH}$ , con  $\text{pf}=266-268^\circ\text{C}$  (FISHER). Su IR en suspensión indica grupo funcional alcohol y ácido carboxílico; bandas entre  $3500-3300\text{cm}^{-1}$  que se agudiza en esta zona y una amplia, pequeña, a  $3500-2500\text{cm}^{-1}$ . Banda de carbonilo en  $1692\text{cm}^{-1}$ . La RMN<sup>1</sup>H en  $\text{CDCl}_3$  y en  $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$ , da en  $5.25\text{ppm}$  (t, 1H) absorción de un protón vinílico, en  $3.20\text{ppm}$  (t, 1H,  $J=8\text{Hz}$ ) protón base de alcohol secundario, en  $2.95\text{ppm}$  (d,  $J=8\text{Hz}$ ), múltiples señales entre  $2.5-0.9\text{ppm}$  donde se presenta el esqueleto y los grupos intercambiadores de deuterio por  $2.20\text{ppm}$ . Singlete en  $0.8\text{ppm}$ .

La mayor parte del sólido se debe a la presencia de los

ésteres grasos con grupos de ácidos totalmente saturados y que son mas solubles.

Las fracciones 49-53 y 92-121 de la cromatografía en columna del aceite, tuvieron IR's en solución parecidos a los de aceites comestibles debido a que contienen los mismos ácidos grasos (son una mezcla de triacilglicéridos) y su diferencia radica en la proporción de cada uno de ellos. Lo mismo se presenta al comparar su RMN'H<sup>20,21</sup>. En el espectro de masas se observa el patrón de fragmentación típico para triglicéridos<sup>22</sup>.

Al revisar la tabla.4.2 se observan variaciones en porcentaje para algunos ácidos grasos, lo que se atribuye a los diferentes cultivos de estas y otras plantas, que se han extendido a muchas partes del mundo; provocando que existan, por ejemplo, varios tipos de aceites de una sola especie con ligeras variaciones de sus componentes según la región donde se producen.

La cromatografía de gases ha ayudado a la identificación y cuantificación de los ácidos grasos constitutivos de aceites. Los resultados de la cromatografía de gases de las fracciones 49-53 y 92-121, se presentan en la tabla 4.1 .

Tabla.4.1-Muestra de los principales ácidos grasos constituyentes de 2 aceites fraccionados del aceite de *Fraxinus udel.*

tiempo retención	aceite		aceite		Referido a ácido
	Fracción 49-53		Fracción 92-121		
	directo A%	corregido W% 1	directo A%	corregido W% 2	
8.92	20.576	16.430	8.644	4.731	palmitico
11.85	1.078	0.861	43.175	30.745	linoleico
11.93	57.322	45.772	35.414	25.218	oleico
12.28	10.784	8.611	2.320	1.652	esteárico

1 y 2 correcciones debidas a las reacciones y extracciones para referirias al aceite respectivo.

1 Hidrólisis 80.66% Formación del ester metilico 99% Factor x0.79

2 Hidrólisis 75.76% Formación del ester metilico 94% Factor x0.71

Los resultados del análisis del aceite crudo se presentan en comparación con el de otros aceites en la tabla.4.2 .

No es posible asegurar los valores de índice de saponificación y ácidos libres debido a que la bureta utilizada (Pyrex para 100ml) tenía precisión de 0.2ml y en cierta forma esto inducía a un error.

Al realizar las saponificaciones se decidió determinar el alcohol correspondiente, siendo éste el glicerol, con punto de ebullición mayor al del agua, fue el único encontrado. Presenta, en el IR en película con filtro de IRTRAN, banda ancha que va de  $3700\text{cm}^{-1}$  a  $2500\text{cm}^{-1}$  de alcohol primario en  $1050\text{cm}^{-1}$  y alcohol secundario en  $1100\text{cm}^{-1}$ . Presencia de agua por banda en  $1650\text{cm}^{-1}$ . Metilenos en  $2930\text{cm}^{-1}$  ,  $2880\text{cm}^{-1}$  y  $1460\text{cm}^{-1}$ . Comparando con el espectro de glicerol del Sadler<sup>23</sup> prácticamente todas las bandas son iguales .

De otras fracciones de los aceites 97-120, 139-154 y 168-184, dieron IR's donde se observa que al aumentar el número de fracción se presentaban compuestos de éster con aumento de -OH (banda en  $3500-3400\text{cm}^{-1}$ ) y con ligera notoriedad de dos tipos de carbonilo muy ligeramente diferenciados ( $1690\text{cm}^{-1}$  y  $1670\text{cm}^{-1}$ ). Además, en todos se nota la presencia de doble ligadura (en  $3005\text{cm}^{-1}$ ). Su cantidad era pequeña a la del aceite en total, por lo que no se les tomó en cuenta.

Tabla. 4.2-Muestra de los resultados del aceite de *F. uidei* comparando con datos de aceites comestibles.

	Aceite	fresno	fresno	olivo	cartamo	ajonjolí sesamo
	ORIGEN CLAVE	<i>Fraxinus uidei</i>	<i>Fraxinus excelsior</i>	<i>Olea europaea</i>	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Sesamum indicum</i>
Indice de saponificación	I.S. $\frac{mg}{g}$	153-166	167-182	187-199	186-203	187-193
Acidos libres	A.L. $\frac{mg}{g}$	3.7-4.7	4.8	0.2-1.9	0.4-1.0	1.0-1.8
Insaponifica.	Insap. %	12.3-16.6	5.52	0.4-1.3	0.3-1.3	0.9-2.3
Total aceite en semilla	A.S. %	10.9-12.5	9.7	10-40	25-37	35-57
Saturados	Sat. %		7.0	9.5-17.5	5-10	12.8-16.3
Insaturados	Insat. %		93.0			
Caproico	C <sub>6</sub>					
Caprilico	C <sub>8</sub>					
Capríco	C <sub>10</sub>					
Láurico	C <sub>12</sub>					
Mirístico	C <sub>14</sub>			1.2		traza-0.1
Palmitico	C <sub>16</sub>	5.78		9.2-15.6	6.4	8.2-9.4
Estearico	C <sub>18</sub>	1.48		2.0	3.1	3.6-5.7
Araquídico	C <sub>20</sub>			0.2-0.3	0.2	0.8-1.2
Behénico	C <sub>22</sub>					
Lignocérico	C <sub>24</sub>					
Tetradecenoico	C <sub>14:1</sub>					
Hexadecenoico	C <sub>16:1</sub>			1.6		
Oleico	C <sub>18:1</sub>	38.43		70-85.8	13.4-21.1	35.0-45.3
Eruico	C <sub>22:1</sub>					
Linoleico	C <sub>18:2</sub>	41.41		3.9-13.	72.9-79.0	40.0-48.4
Docosadienoico	C <sub>22:2</sub>					
Linoléónico	C <sub>18:3</sub>	1.18			0.04-0.13	

### CONTENIDO DEL EXTRACTO POLAR DE SEMILLA MADURA

Al hidrolizar una parte del extracto y realizar posteriormente una serie de extracciones se obtuvo un producto incoloro, cristalino con  $pf=94-95^{\circ}C$ , soluble en alcohol y en agua. Su derivado di-acetilado es líquido amarillento, soluble en acetato de etilo e insoluble en alcohol. La fórmula condensada, determinada por espectrometría de masas es  $C_8H_{10}O_2$ , sus datos físicos y espectroscópicos concuerdan con los del  $\beta$ -(p-hidroxifenil)etanol, tirosol<sup>24</sup> o alcohol 4-hidroxifenético<sup>25</sup>

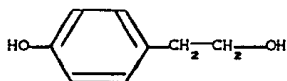


Figura.3- TIROSOL

Su espectro de IR en suspensión (Espectro.1), mostró abundantes bandas finas y largas entre  $1560-730cm^{-1}$ , destacando la de  $1512cm^{-1}$ , otras bandas más anchas entre  $3400-2600cm^{-1}$ , quedando casi limpia la región entre  $2450-1800cm^{-1}$ . Señales de -OH en  $3391cm^{-1}$  como banda fina y en  $3142cm^{-1}$  como banda mediana. Señal pequeña y fina en  $3023cm^{-1}$  indicando presencia de aromático; no hay señales entre  $1900-1600cm^{-1}$  que indiquen la presencia de insaturaciones, por lo que se corrobora con la presencia en la región de  $2000-1660cm^{-1}$  de un pequeño pico junto con ondulaciones casi desapercibidas y otro pico largo y fino en  $818cm^{-1}$  indicando sustitución para- en anillo bencénico.

El espectro de IR del derivado acetilado en solución, muestra pequeñas señales entre  $3660-2900cm^{-1}$  y señales grandes y finas entre  $1750-840cm^{-1}$ . Banda pequeña y fina en  $3143cm^{-1}$  del aromático, en  $1740cm^{-1}$  y  $1735cm^{-1}$  dos bandas grandes y sobrepuestas de carbonilo, que ocultan las demás señales del aromático, pero hay banda mediana y fina en  $847cm^{-1}$  que confirma la sustitución en para-. Se nota presencia de metilos y metilenos

por bandas  $2950\text{cm}^{-1}$ ,  $1460\text{cm}^{-1}$  y  $1380\text{cm}^{-1}$ .

En la región de campo bajo del espectro de RMN'H del tirosol en  $\text{CDCl}_3$  (Espectro.2), se observa un doblete tripleteado ( $6.85\text{ppm}$ ,  $J=8\text{Hz}$ ,  $2\text{Hz}$ ) que es señal de aromático sustituido en posición para- (sistema  $A_2B_2$ ); una señal simple que desaparece al agregar agua deuterada e integra para  $2\text{H}'\text{s}$  ( $5.20\text{ppm}$ , s), de los  $-\text{OH}'\text{s}$ ; dos tripletes bien definidos que, uno indica el metileno unido a alcohol ( $3.70\text{ppm}$ , t,  $J=8\text{Hz}$ ), el otro es de un metileno unido al aromático ( $2.73\text{ppm}$ , t,  $J=8\text{Hz}$ ). La RMN'H del tirosol acetilado, en  $\text{CDCl}_3$  (Espectro.3), da señal de aromático sustitución en para- ( $7.10\text{ppm}$ , dt,  $J=8\text{Hz}$  y  $2\text{Hz}$ ); presenta un metileno unido al oxígeno del éster ( $4.25\text{ppm}$ , t,  $J=8\text{Hz}$ ); un metileno unido al anillo aromático ( $2.90\text{ppm}$ , t,  $J=8\text{Hz}$ ); por último, 2 señales simples de los metilos de acetatos ( $2.30$  y  $2.05\text{ppm}$ , singuletes), en anillo aromático y en cadena alifática respectivamente.

En el espectro de masas para tirosol se presenta rompimientos en  $m/z = 77$  (20.8%) ion fenilio;  $108$  (100%) ion hidroxil-tropilio de escisión C- $\alpha$  y C- $\beta$ ;  $M^+$   $138$  (18%); ion tropilio  $91$  (3%) y abundante ion hidronio  $0.8$  (16.4%).

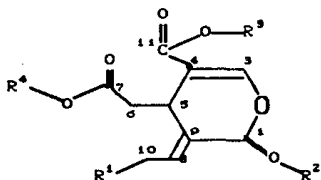
Una parte del extracto polar fue sometida a una serie de cromatografías (percolaciones) mediante las cuales se pudo obtener tres diferentes sustancias muy polares (diagrama.2), dos líquidos pastosos M-19 y M-20 y un sólido pardo M-6 ( $\text{Cp}f=133-135^\circ\text{C}$ ); sus IR's en suspensión y en pastilla presentan: banda ancha e intensa de oxhidrilo entre  $3600-2850\text{cm}^{-1}$  con aparente presencia de grupo ácido, por la forma en que la señal de  $-\text{OH}$  se presenta, extendiéndose la banda hasta  $2500\text{cm}^{-1}$ , la presencia de carbonilo es revelada por una banda en  $1702\text{cm}^{-1}$ .

La RMN'H de M-20 (Espectro.4) muestra, entre gran cantidad de señales, dos agrupamientos de glucosas  $4.92$  y  $4.85\text{ppm}$  (hidrógenos anoméricos); hidrógenos aromáticos sistema  $AA'BB'$  ( $7.30, 7.13, 7.03, 6.85\text{ppm}$ ; d,  $J=8\text{Hz}$ ) y aparentemente dos hidrógenos H-3 de iridoide ( $7.60, 7.52\text{ppm}$ ; s); la presencia de señales repetidas para H-8 y H-1 entre  $5.75-6.25\text{ppm}$  parece indicar que se

trata de un bis-secoiridoide con señales de metilos en C-10 y C-10' (1.75, 1.65ppm; d; 7Hz).

La espectroscopia de masas muestra fragmentos acreditados a la estructura con el anillo aromático, principalmente ( $m/z = 77(30\%), 91(22\%), 107(40\%), 120(80\%), 121(100\%)$ ); abundantes fragmentos menores y pocos mayores como  $m/z=165(30\%)$  que no se asignaron. El fragmento mayor fue el de  $m/z=224(3.3\%)$ .

Con estos datos se propone la estructura parcial del secoiridoide en la figura.4, a la cual se le debe adicionar un anillo aromático y la presencia de otro secoiridoide, unido posiblemente en  $R^4$  a través del anillo aromático.



$R^1 = H$ , O-azúcar, O- $R^4$ .

$R^2, R^4 =$  -azúcar, cualquier compuesto como:  
-azúcar-O-secoiridoide.  
-tirosol.

$R^3 = CH_3$  por lo general.

Figura.4- Estructura general de un secoiridoide.

#### CONTENIDO DEL EXTRACTO POLAR DE SEMILLA VERDE

La semilla tierna del mes de abril, una vez seca y molida, al ser extraída con MeOH dió precipitado blanco, que se determinó como ácido oleanólico identificado por sus

características siguientes:

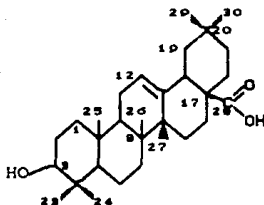


Figura.5- ACIDO OLEANOLICO

Polvo blanco poco soluble en  $\text{CHCl}_3$  y parcialmente soluble en  $\text{MeOH}$ ,  $\text{pf}=309^\circ\text{C}(\text{ATD})$ , forma cúmulos al dejar cristalizar lentamente en  $\text{MeOH}$ . Con fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ . El derivado metilado dió  $[\alpha]_D^{20} = +60$  en  $\text{CHCl}_3$ , con  $\text{pf}=110-111^\circ\text{C}$ . Su IR en pastilla manifiesta banda ancha entre  $3600-2500\text{cm}^{-1}$  y una más aguda entre  $3500-3100\text{cm}^{-1}$  indicando grupos  $-\text{OH}$ , señal de carbonilo en  $1690\text{cm}^{-1}$  y señales de metilenos  $2930\text{cm}^{-1}$ ,  $2850\text{cm}^{-1}$ , con la presencia de pocos metilos  $1450\text{cm}^{-1}$ ,  $1380\text{cm}^{-1}$ . La RMN<sup>1</sup>H en  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}-d_6$  presenta triplete en 5.25ppm de doble ligadura, triplete en 3.20ppm  $J=6\text{Hz}$ , doblete dobleteado en 2.5ppm  $J=8\text{Hz}$ , multiplete en 2.60ppm y multiples señales entre 2.5-0.9ppm donde se presenta el esqueleto y en 2.80-2.75ppm aparece un doblete con  $J=2\text{Hz}$  que comparando con el del ác.ursólico se presenta como singulete cercano a 2.90ppm. Dos singuletes en 0.80 y 0.75ppm, mientras que en el ácido ursólico se observa uno. La RMN<sup>1</sup>H del derivado metilado en  $\text{CDCl}_3$  da señales en ppm y multiplicidad siguientes: 3.37d, 3.2d, 2.85dd, 1.85d, 1.65s, 1.59s, 1.4t, 1.15s, 1.05s, 0.95s, 0.8s y 0.7s.

El extracto alcohólico de la semilla seca y desengrasada proporcionó un rendimiento poco mayor al 1% de una sustancia cristalina que se identificó como manitol por medio de sus características físicas y espectroscópicas.



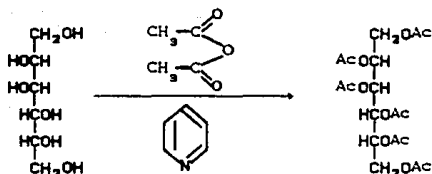


Figura.6- ACETILACION DE MANITOL

Agujas con  $pf=168-169^{\circ}C$ . Soluble en MeOH y en agua; insoluble en disolventes menos polares, como acetona, acetato de etilo o cloroformo.  $[\alpha]_D^{20} = -1.65$  en  $H_2O$ . Fórmula  $C_8H_{10}O_8$ . Confirmado con su derivado hexa-acetilado que dió  $[\alpha]_D^{20} = +26.13$  en  $CHCl_3$ , con  $pf=123-124^{\circ}C$ . El espectro de IR del manitol en pastilla presentó. banda muy notoria de oxhidrilos entre  $3600-3000cm^{-1}$  con dos picos sobresalientes en  $3387cm^{-1}$  y en  $3280cm^{-1}$ ; en  $1020cm^{-1}$  y  $1080cm^{-1}$  dos bandas grandes y finas indicando alcohol primario y secundario, respectivamente. Señales pequeñas de metilos y metilenos. El IR del manitol hexa-acetilado en solución indica banda distorcionada (aparentemente nula) de metilos y metilenos debido a una alta cantidad de carbonilos en  $1755cm^{-1}$ ,  $1745cm^{-1}$  y  $1735cm^{-1}$  que aparentan una banda con pequeños picos sobresalientes. Banda mediana en  $1370cm^{-1}$  de metilos. Banda ancha tipo éster entre  $1200-1000cm^{-1}$ .

El espectro de RMN'H del manitol hexa-acetilado en  $CDCl_3$ , presenta la señal del CHOAc intermedios (5.40ppm, d,  $J=8Hz$ ) e integra para 1H; la señal de los CHOAc inmediatos no muy definida (5.07ppm, ddd,  $J=2$ ) que integra para 1H; una serie de señales que se sobrepone de  $CH_2OAc$  del extremo (4.4ppm, 4.08ppm; dd;  $J=8Hz$ ), e integra para 2H's. Tres singuletes en 2.05ppm, 2.10ppm y en 2.12ppm de los metilos del acetato. La comparación del espectro. 5 con los datos reportado en la literatura<sup>26</sup> concuerdan perfectamente.

En el espectro de masas se presenta el ion  $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$   $m/z=43$ , como el ion más notorio. Las fragmentaciones  $m/z=73(\text{CH}_2=\text{C}^+\text{OCH}_3)$  y de  $m/z=59(\text{C}^+\text{OCH}_3)$  se notan poco, pero sus fragmentos complementarios son notorios  $m/z=115(7.9\%) (\text{HOCH}_2-\text{CH}_2-\text{C}^+\text{OCH}_3)$ ,  $381(0.4\%) (\text{M}^+-73)$  y  $375(0.1\%) (\text{M}^+-59)$ .  $\text{M}^+(434)$  no llega al detector.

#### COMPOSICION DEL EXTRACTO $\text{Me}_2\text{CO}$ DE SEMILLA VERDE

La parte soluble en acetona del extracto polar, sometida a percolaciones como se describió en la parte experimental (diagrama. 8), proporcionó sustancias de aspecto pastoso color ámbar a café obscuro. Dos de ellas se lograron separar como compuestos puros, identificando a uno como verbascósido (un glicósido de fenil-propanoide) y al otro como 10-hidroxdiligustrósido (un glucósido de secoiridoide).

**VERBASCOSIDO.** Al evaporar el disolvente en rota-vapor formó, el compuesto, espuma; al ser raspada de las paredes del matraz bola dió un polvo amarillo y apelmasado, soluble en acetona y muy soluble en  $\text{MeOH}$ . Al disolver en acetona, agregar carbón activado, filtrar y concentrar a sequedad se obtuvo un polvo verde apelmasado,  $\text{pf}=135-136^\circ\text{C}$ .  $[\alpha]_D^{20}\text{C}=-101.454$ . Cuando se agrega solución de  $\text{FeCl}_3$ , a una solución metanólica del compuesto, se desarrolla una coloración verde; indicando presencia de fenoles. Su espectro de IR en suspensión, muestra banda ancha a  $3350\text{cm}^{-1}$  (de numerosos grupos oxhidrilo), en  $1700\text{cm}^{-1}$  se observa banda de carbonilo, en  $1510\text{cm}^{-1}$  banda (más grande que la de carbonilo) mostrando anillos aromáticos y en  $810\text{cm}^{-1}$  banda de sustitución en posición para-. El espectro de ultravioleta muestra  $\lambda_{\text{max}}$  a  $290\text{nm}$  y a  $330\text{nm}$ , ( $\log.\epsilon=4.158$  y  $4.287$ , respectivamente) indicativo de un sistema carbonílico conjugado y de anillos aromáticos respectivamente.

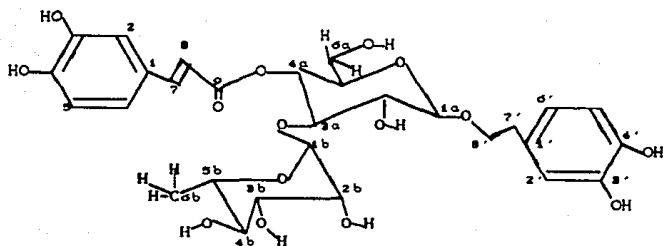


Figura.7- VERBASCOSIDO

El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro.6) muestra una señal doble asignada a un metilo secundario (1.1ppm, d); una señal equivalente a dos protones (2.75ppm,d) que se asigna al metileno C-6 de glucosa; entre 3.5 y 4.25ppm se observan señales superpuestas indicando presencia de dos azúcares (anoméricos 4.9ppm y 5.1ppm,s). A campo bajo es notable la señal de un sistema AB, típico de cinamato (6.3 y 7.7ppm,d); además, se observa hidrógenos aromáticos entre 6.6 y 7.4ppm .

El espectro de RMN<sup>13</sup>C mostró la presencia de 29 átomos de carbono, 12 de los cuales son atribuibles a dos hexosas siendo uno de ellos ramnosa, ya que todas sus señales coinciden con los datos publicados en la literatura<sup>27</sup> para dicho monosacárido. Usando el mismo argumento, se puede deducir que el otro azúcar es glucosa. La posición C-1 de la ramnosa se encuentra unido a la posición C-3 de la glucosa, lo que se deduce del desplazamiento químico de esta señal a 80.3ppm<sup>27</sup>. La glucosa se encuentra esterificada por ácido caféico cuya señal del carbonilo aparece a 164ppm, la del carbono β a 144ppm y el del α a 123.5ppm . La posición C-1 de la glucosa se encuentra esterificada por cafestol,

como lo indica la señal a 34.5ppm para su metileno alílico y las señales aromáticas de 112 a 127ppm; de acuerdo con la tabla.4.3, que fue facilitada por su espectro APT (Espectro.7) .

Por comparación de los datos mencionados con los publicados, la estructura para el glucósido de semilla verde queda identificado como verbascósido, un fenil propanoide originalmente aislado de *Verbascum sinuatum* L; presentandose en la tabla.4.3 los datos de RMN<sup>13</sup>C del compuesto y del verbascósido .

Tabla. 4.3. - RMN<sup>13</sup>C del fenilpropanoide, comparado con datos del verbascósido.

#	FRECUENCIA (en ppm)		INTENSIDAD	MULTIPLICIDAD	CARBONO
	EXPERIMENTAL	LITERATURA			
1	168.00	169.5	30.274	s	9
2	147.480	149.33	33.078	s	4
3	145.38	148.06	24.282	d	7
4	144.301	146.35	30.580	s	3
5	143.824	145.58	37.380	s	3'
6	142.205	144.10	30.118	s	4'
7	131.008	131.56	31.855	s	1'
8	128.545	127.40	28.882	s	1
9	122.880	123.38	23.833	d	6
10	121.057	121.66	47.331	d	6'
11	118.824	117.54	45.282	d	2'
12	116	117.03---		d	8
13	115.121	116.84	22.182	d	5'
14	114	115.79---		d	2
15	113.832	114.70	21.034	d	5
16	102.048	102.44	27.088	d	1a
17	101.522	101.25	33.086	d	1b
18	80.737	79.18	25.578	d	3a
19	73.85	74.61	24.838	d	2a
20	73.587	74.61	27.982	d	5a
21	71.043	72.02	30.532	t	8'
22	70.288	71.80	33.374	d	4b
23	69.894	70.61	32.890	d	2b
24	69.300	70.52	30.10	d	3b
25	68.900	69.18	24.188		4a
25	68.503		1004.23 ---	-dioxano---	75b
27	60.148	60.78	18.108	t	6a
28	34.475	35.99	31.289	t	7'
29	17.198	18.18	42.425	c	6b

En otra ruta del diagrama.6 se obtuvo un aceite espeso de color amarillo, cuya espectroscopia presenta características

típicas de glucósido de secoiridoide; difícil de caracterizar directamente, porque muestra señales adicionales, entre ellas las de glucosa.

**GLUCOSIDO DE SECOIRIDOIDE.** En el IR en película (Espectro.8), banda a  $3300\text{cm}^{-1}$  de los -OH y en  $1700\text{cm}^{-1}$  la del carbonilo; además, en  $1640\text{cm}^{-1}$ ,  $1600\text{cm}^{-1}$ ,  $1510\text{cm}^{-1}$  y en  $1500\text{cm}^{-1}$  bandas de dobles ligaduras alifáticas y aromáticas. En el UV presenta banda de absorción con  $\lambda_{\text{max}}$  a 205nm, 226nm y 277nm ( $\log \epsilon=4.08$ , 4.157 y 3.293) debidas a carbonilo conjugado y anillo aromático presente.

El espectro de RMN'H (Espectro.9) muestra la presencia de azúcares con señales entre 3-4ppm y se observa señales de aromático centradas en 6.87ppm debidas a un sistema  $A_2B_2$ ; pero la señal que da más información es un singulete que aparece a 7.3ppm, debida al protón vinílico H-3 de un iridoide con carboxilo en C-11. Se debe aclarar que la señal de 1ppm corresponde a una impureza.

El espectro de RMN' $^{13}\text{C}$  y su APT (Espectro.10) muestran la presencia de 31 átomos de carbono, lo que concuerda con una estructura de iridoide unida a dos hexosas (glucosa y ramnosa), a un feniletilo deducido como tirosol (por haber antecedentes) y a dos ésteres (siendo uno metílico). Una estructura tentativa en un principio fue la del nüzhenide (ver figura.8).

Comparando los datos de la bibliografía<sup>28</sup> se llegó a la conclusión de que no explicaba la presencia de un metilo unido a metileno, que aparece en RMN'H en 1.05ppm y en 15ppm para RMN' $^{13}\text{C}$ ; explicada por la estructura de la figura.9.

Se pensó que esta segunda estructura podía quedar bien ya que el metilo de la ramnosa concordaba con la señal de  $^{13}\text{C}$  y a la cual se asigna en la literatura por 18ppm; sin embargo no concuerda con el desplazamiento químico ni con la multiplicidad del espectro de RMN'H, ni del todo con el de RMN' $^{13}\text{C}$ .

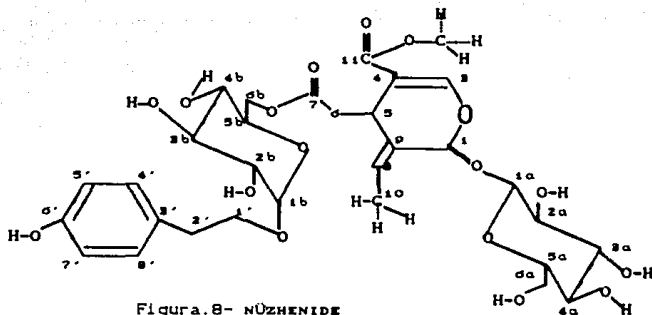


Figura.8- NUZHENIDE

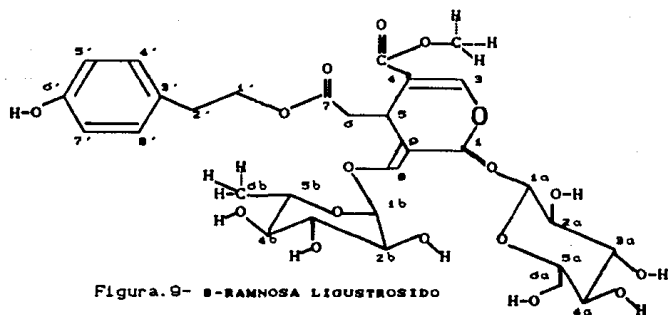


Figura.9- 8-RANNOZA LIGUSTROSIDO

Al preparar una buena cantidad del compuesto acetilado, que se logró purificar, se pudo elucidar la estructura, la que fue idéntica a la reportada para el 10-hidroxiiligustrósido<sup>20</sup> (Figura.10) .

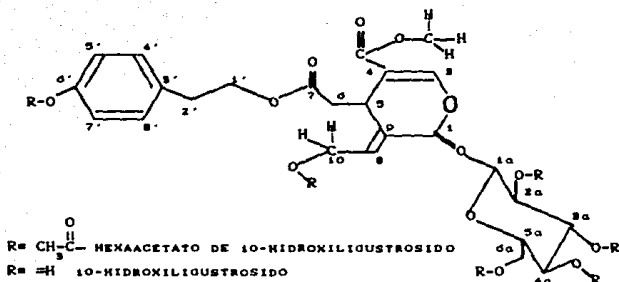


Figura.10- 10-HIDROXILIGUSTROSIDO

Esta estructura concuerda con su RMN<sup>1</sup>H (Espectro.9) y con RMN<sup>13</sup>C y APT (Espectro.10), pero más con el derivado acetilado (Espectro.11 y 12). Tablas comparativas 4.4, 4.5, 4.6 y 4.7.

Tabla.4.4.- RMN protónica comparativa del secoiridoide.

DESPLAZAMIENTO EN PPM			MULTIPLICIDAD	ASIGNACION
Exp.(C <sub>2</sub> O)	Lit. 27(C <sub>2</sub> O)	Lit. 29(C <sub>2</sub> O)		
7.3	7.54	7.31	s	1H, H-3
7.0	7.20	7.03	d	2H, H-8'
6.87	6.85, 7.11	6.72	d	2H, H-5', 7'
5.9	6.06	6.14	t ancho	1H, H-8
5.6	5.84	5.94	s ancho	1H, H-1
4.78	4.89	4.83	d	1H, H-1a
?		4.19	m	2H, H-10
?		4.15	t	2H, H-1'
?		3.86	dd	1H, H-5
2.82		2.60	t	2H, H-2'
2.4		2.71	dd	1H, H-6β
2.18		2.47	dd	1H, H-6α
■	1.68		dd	3H, 10

? en la zona de 64.2-3ppm aparecen las señales del azúcar.

■ no se observa señal entre 1.2 y 2.0 ppm.

Exp.(C<sub>2</sub>O) datos experimentales, entre paréntesis está el disolvente.

Lit. 27(C<sub>2</sub>O) referencia 27, datos de nüzhenide.

Lit. 29(C<sub>2</sub>O) referencia 29, datos de 10-hidroxiligustrosido.

Tabla. 4.5. - RMN de  $^{13}\text{C}$  comparativa del secoiridoide.

#	FRECUENCIA (en ppm)			INTENSIDAD (EXP.)	MULTIPLICIDAD	CARBONO
	(EXP.)	(LIT. 27)	(LIT. 29)			
1	173.99	174.4	172.99	51.23	s	7
2	169.12	169.8	168.37	39.01	s	11
3	155.23	155.6	155.00?	36.65	d	3
4	155.18			46.07		
5	155.10	155.1	156.87?	58.08	s	6'
6	131.02	131.1	130.90	128.06	d	4', 6'
7	130.68	131.1	130.90	60.68	s	3'
8	130.62	129.4	129.89	63.21	s	9
9	128.39	125.7	129.38	33.60	d	8
10	116.18	116.3	116.27	129.63	d	5', 7'
11	108.46	109.0	109.11	48.14	s	4
12	102.72			70.13	d	1b
13	100.33	100.5	100.79	52.10	d	1a
14	94.67	95.7		46.55	d	1
15	77.19	77.2		77.49	d	5a
16	76.74	76.6	78.28?	96.78	d	3a
17	76.67			102.03	d	2a
18	76.45			83.05	d	
19	73.96	73.8	74.64	86.92	d	2a
20	73.48	71.8		65.27	t	1'
21	70.49	70.3	71.36	85.18	d	4a
22	70.42			43.96	d	2b
23	70.23			74.91	d	4b
24	67.40			206.06--	dioxano	-----
25	66.99		66.84	112.01	t	1'
26	61.62	61.5	62.67	80.41	t	6a
27	61.51			58.84	t	6b
28	61.43		59.14	41.27	t	10
29	59.36			65.65		
30	52.70	52.6		59.72	c	OCH <sub>3</sub>
31	41.01	41.0	41.13	34.62	t	6
32	34.17	35.3	35.04	41.91	t	2'
33	31.60	31.1	32.19	40.22	d	5
34	15.13	13.6		59.30	c	10

? al C-6' le asignaron ese valor los autores, sin embargo para otros secoiridoideos asignan valores entre 144-148ppm.

(EXP.) Datos experimentales del secoiridoide.

(LIT. 27) Datos del artículo 27, NÚZHENIDE

(LIT. 29) Datos del artículo 29, 10-HIROXILIGUSTROSIDO.



Tabla. 4.6.- RMN de  $^{13}\text{C}$  comparativa del hexa-acetato del secoiridoide.

#	FRECUENCIA (en ppm)		INTENSIDAD (EXP.)	MULTIPLICIDAD	CARBONO
	(EXP.)	(LIT.29)			
1	170.56	170.48	45.37	s	COMe
2	170.49	170.34	32.97	s	COMe
3	170.07	170.24	38.30	s	7
4	169.28	169.85	40.96	s	COMe
5	169.21	169.13	39.11	s	2 X COMe
6	168.24	168.15	33.31	s	11-CO <sub>2</sub> Me
7	152.80	152.72	69.30	d	3 <sup>1</sup>
8	149.27	149.46	23.06	s	6 <sup>1</sup>
9	135.07	135.09	43.01	s	3 <sup>1</sup>
10	130.98	131.37	51.30	s	9
11	129.73	129.63	168.00	d	4 <sup>1</sup> , 8 <sup>1</sup>
12	124.15	124.17	68.96	d	8
13	121.52	121.48	164.74	d	5 <sup>1</sup> , 7 <sup>1</sup>
14	108.21	108.47	51.89	s	4
15	96.88	97.02	81.78	d	1a
16	92.61	92.88	74.28	d	1
17	72.36	72.53	86.90	d	5a
18	72.14	72.30	93.92	d	3a
19	70.58	70.87	86.04	d	2a
20	67.98	68.36	73.67	d	4a
21	64.92	64.88	73.31	t	1 <sup>1</sup>
22	61.48	61.70	56.95	t	5a
23	60.52	60.44	101.21	t	10
24	51.46	51.31	78.42	c	CO <sub>2</sub> Me
25	39.79	39.92	56.11	t	6 <sup>2</sup>
26	34.21	34.29	71.61	t	2 <sup>1</sup>
27	30.72	30.88	56.33	d	5
28	20.98	20.60	56.29	c	COMe
29	20.75	20.60	50.76	c	COMe
30	20.51		117.88		
31	20.47	20.34	111.72	c	2 X COMe
32	20.44	20.34	106.03	c	2 X COMe

(EXP.) Datos experimentales del secoiridoide. CDCl<sub>3</sub>: 677.38, 76.96, 76.83.(LIT.29) Datos del artículo 29, 10-MISONILIGUSTROSIDO. CDCl<sub>3</sub>: 675.47

Tabla. 4.7. - RMN<sup>1</sup>H del hexa-acetato de 10-hidroxiilgustrosido.

Desplazamiento (ppm)	Multiplicidad	Asignación
7.43	s	H-3
7.18	d	H-5',7'
6.98	d	H-4',8'
5.98	t	H-8
5.65	s	H-1
5.23	dd	H-3a
5.14	d	H-2a
5.10	d	H-4a
5.02	d	H-1a
4.72	dd	H-10a
4.62	dd	H-10b
4.23	td	H-1'A
4.17	td	H-1'B
4.10	d	H-6a
3.92	dm	H-5
3.75	t	H-5a
2.96	t	H-2'
2.72	dd	H-6b
2.37	dd	H-6A
2.21	s	AcO en 6'
2.00	s	5AcO

Con una técnica reciente en espectroscopia de RMN se ha logrado la asignación de los hidrógenos y carbonos correspondientes; de acuerdo a la estructura de la molécula en cuestión, los carbonos e hidrógenos asociados por uniones covalentes y/o por cercanía espacial se correlacionan debido a su interacción electromagnética.

Los espectrogramas de correlaciones en RMN (bidimensionales), se logran a través de la acumulación de información de la resonancia de los núcleos atómicos; con un ajuste de escalas en el equipo se puede asociar en el gráfico las señales en la abscisa y la ordenada, la información acumulada queda ordenadas perpendicularmente a cada eje.

En el COSY (correlation spectroscopy) se presentan las correlaciones espectroscópicas en RMN de los protones (mononuclear) del compuesto en cuestión ; para analizarlo se traza una diagonal, que parte de la intersección de los ejes al extremo opuesto, donde se acumula la información de resonancia (como curvas de nivel) para los dos ejes; cuyo espectro (picos de absorción) se presentan en el extremos superior, por lo general. La acumulación de información queda colineal a una señal determinada y perpendicular al eje , y simétricas al formarse un rectángulo con vértices correspondientes a la acumulación de datos por la interacción de los núcleos atómicos resonantes .

En HETCOR (heteronuclear correlation) la interacción que se presenta es entre dos núcleos atómicos diferentes, siendo la de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  la más común ; la acumulación de información queda colineal a una señal determinada, siguiendo la línea perpendicular a un eje se sabe a que señal corresponde la acumulación de información.

A través de la información obtenida de COSY (Espectro.11) y de HETCOR (Espectro.12) se construyó la tabla.4.8 para el hexa-acetato del secoiridoide. Las interacciones entre los núcleos atómicos quedaron acomodadas en forma lineal, para saber que núcleo interacciona con cual sólo hay que seguir el mismo renglón .

Tabla. 4.8.- Correlaciones en RMN, según HETCOR cuadros A-B y según COSY cuadros B-C, del hexa-acetato del secoiridoide.

	A		B		C
#	FRECUENCIA, ppm. (MULTIPLICIDAD)	CARBONO	FREC., ppm MULTIPLI.	PROTON	PROTON
1	152.80(d)	3	7.43(s)	H-3	
2	129.73(d)	5',7'	7.18(d)	H-5',7'	
3	124.15(d)	8	5.98(t)	H-8	H-1, H-10A
4	121.52(d)	4',8'	6.98(d)	H-4',8'	
5	96.86(d)	1a	5.02(d)	H-1a	AZÚCAR
6	92.61(d)	1	5.65(s)	H-1	H-10B, H-10A, H-8
7	72.38(d)	5a	3.75(t)	H-5a	H-1', H-6a
8	72.14(d)	3a	5.23(dd)	H-3a	
9	70.58(d)	2a	5.14(d)	H-2a	
10	67.98(d)	4a	5.10(d)	H-4a	H-5a
11	64.92(t)	1'	4.23(td)	H-1'A	H-2'
			4.17(td)	H-1'B	H-2'
12	61.48(t)	6a	4.05(d)	H-6a	H-5a
13	60.52(t)	10	4.72(dd)	H-10A	H-8
			4.62(dd)	H-10B	H-1, H-8
14	51.46(c)	CO <sub>2</sub> Me	3.30(s)	CO <sub>2</sub> Me	
15	39.79(t)	6	2.72(dd)	H-6a	H-6A
			2.37(dd)	H-6B	H-6B
16	34.21(t)	2'	2.96(t)	H-2'	H-1'
17	30.72(d)	5	3.92(dm)	H-5	H-6B, H-6A
18	20.98(c)	COMe-8'	2.21(s)	COMe-8'	COMe-AZÚCAR
19	20.75(c)	COMe en 10			
20	20.47(c)	2 X COMe			
21	20.44(c)	2 X COMe	2.00(s)	5COMe	COMe-8'

## EXTRACTO METANOLICO DE SEMILLA VERDE (Diagrama. 7)

La separación de los componentes de este extracto fue difícil, se ensayó percolaciones y cromatoplasas preparativas con malos resultados, por lo que se decidió manejar mezclas bastante polares con MeOH, AcOH. Los resultados fueron 3 compuestos Fr.M-3, M-4 y M-5, de los que M-3 se presentó en forma de cristales incoloros parcialmente solubles en MeOH y muy solubles en agua. La espectroscopia indico presecia de abundantes metilenos muy desplazados a bajo campo, como de un polimero con uniones  $-O-CH_2-O-$  pero de alguna forma como sal con cambio de constitución sin fundir. Sin poder sacar más información se le abandonó.

El compuesto M-4 se presentó como un sólido ceroso amarillento que en el espectro de IR en película muestra poco ácido acético y  $-OH$  como de poliol con gran banda entre  $3500cm^{-1}$  y  $3000cm^{-1}$  corroborandose con señales entre  $1100cm^{-1}$  y  $1030cm^{-1}$ . Hay más señales pero se cree de contaminantes. Los derivados fenilhidrazona y acetato son líquidos.

Su RMN<sup>1</sup>H en DMSO+CDCl<sub>3</sub> presenta 4.6ppm(1H,d,J=6), 4.32ppm(5H,s), 3.65ppm(1H,d,J=4), 3.35ppm(1H,d,J=8) y 330ppm(2H,t,J=6). El derivado acetilado, en CDCl<sub>3</sub>, dió 5.0ppm(m,J=8Hz), 4.8ppm(d,J=8), 4.45ppm(d,J=6), 4.17ppm(t,J=2), 3.47ppm(d,J=8), 3.42ppm(s) y 2 singuletes entre 2.15-2.0ppm de los acetatos.

Tabla. 4.9. - RMN<sup>13</sup>C de M-4, un azúcar.

FRECUENCIA (en ppm)	INTENSIDAD	MULTIPLICIDAD	CARBONO
104.21	20.53	d	1
100.22	55.24	d	1
76.88	21.74	d	3
76.78	21.50	d	5
74.07	66.53	d	2
72.57	47.37	t	
72.22	41.84	t	
70.60	48.37	t	
61.58	38.56	t	d
55.94	29.01	c	COMe

La fracción mas polar se obtuvo como líquido denso color ambar, cuyo espectro en el IR (en película) mostró la presencia de abundantes grupos oxhidrilos entre  $3500-3000\text{cm}^{-1}$  confirmando entre  $1100-1030\text{cm}^{-1}$ ; esto y su solubilidad en agua hizo sospechar de que se trataba de un azúcar, por lo que se preparó la fenilhidrazona que dió  $\text{pf}=205-207^{\circ}\text{C}$ , se preparó también un acetato que tuvo  $\text{pf}=118-119^{\circ}\text{C}$ . Como los puntos de fusión de ambos derivados corresponden a los de la glucosa, se analizó la espectroscopia del acetato.

El IR, en solución, del derivado acetilado, presentó picos muy finos entre  $3050-2900\text{cm}^{-1}$  deduciendo que son de insaturaciones por impureza, de metilos y de metilenos; además, un gran pico fino de carbonilo a  $1757\text{cm}^{-1}$  y de enlaces tipo éster entre  $1080-1030\text{cm}^{-1}$ .

La RMN'H a 300MHz del derivado acetilado muestra al hidrógeno  $\alpha$ -anomérico (H-1) como doblete en 5.72ppm, un triplete en 5.46ppm del hidrógeno unido a C-5, un doblete tripleteado a 5.2ppm de dos hidrógenos de C-6, una señal dtd en 4.2ppm del hidrógeno que esta en C-4 y un doblete multipleteado en 3.84ppm asignado al hidrógeno en C-3. También se observa varias señales entre 2.2-1.0ppm acreditandolas a los metilos de los acetatos.

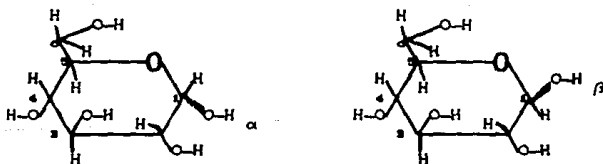


Figura.11- Anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de glucosa.

Tabla. 4.10. - RMN'  $^{13}\text{C}$  del compuesto confirmado como glucosa.

#	FRECUENCIA (en ppm)	INTENSIDAD	MULTIPLICIDAD	CARBONO
1	179.489	40.426 --	singulete----	carbonilo
2	96.724	150.965	d	1
3	92.905	94.641	d	1
4	78.747	157.188	d	2
5	76.574	157.02	d	2
6	74.958	148.358	d	5
7	73.583	90.473	d	5
8	72.301	106.839	d	3
9	72.247	110.176	d	3
10	70.489	113.319	d	4
11	70.431	108.	d	4
12	67.4	83.393 --	---dioxano---	
13	61.578	142.677	t	6
14	61.431	88.435	t	6
15	22.546	58.752---	cuadruplete--	--metilo

De acuerdo a los resultados se le reconocio como glucosa impura, presentando sus anmeros  $\alpha$  y  $\beta$  (figura.11) y arrastrando compuestos insaturados, los que al parecer le dan la coloración amarillenta.

## V.- CONCLUSIONES.

La semilla madura proporciona con mayor abundancia triacilglicéridos; entre ellos se encuentra esterificado a la glicerina los ácidos grasos linoleico y el linoléico, indispensables en la dieta de organismos superiores; al no encontrar compuestos tóxicos en el aceite (por cromatografía en columna y preparación de los aceites para cromatografía gas-líquido) y sabiendo que la purificación del aceite a nivel industrial requiere una serie de lavados donde se elimina a los compuestos no polares (ej. parafinas) a los poco polares (ej. ceras y alcoholes de cadena larga) y a los polares (ej. alcoholes de cadena pequeña, ácidos grasos, triterpenos con funciones alcohol y/o ácidos carboxílicos), se concluye que el aceite puede ser procesado para consumo humano. El único inconveniente a considerar es la cantidad de aceite extraído de la semilla ya que se encuentra en un rango bajo (del 9-11% comparado en peso con la semilla).

En cuanto a los compuestos obtenidos en la semilla madura: ácido ursólico (triterpeno común entre las plantas), una parafina, una cera y la presencia de glicósidos de secoiridoides no determinados; a ninguno se le ha considerado de toxicidad.

Algo que hay que enmarcar es que el ác. oleanólico se encontró en semilla verde, y el ác. ursólico en la madura; aunque no se niega la posibilidad de que en otros periodos, de desarrollo de la semilla, se encuentre la mezcla de los dos.

En la semilla verde se determinó la presencia de manitol



como el compuesto más importante en cantidad, ya que se presentó en aproximadamente el 1% con respecto a la semilla verde, siendo posible su procesamiento por su valor comercial.

La presencia de glucósidos de secoiridoides se determinó por espectroscopía. Al utilizar la RMN'H con ayuda de la técnica de COSY y RMN'<sup>13</sup>C con ayuda de APT y HETCOR se elucidó la estructura del secoiridoide, que se identificó con el 10-hidroxiilustrósido.

Al glicósido de fenilpropanoide se asignó una estructura que concuerda con la publicada para el verbascósido.

Por otra parte, la presencia de azúcares después de hidrólisis, indica que la mayoría de los compuestos se presentan como los glicósidos o glucósidos. Es por eso que en la semilla verde la mayor cantidad de compuestos se encuentra en la fracción más polar. Para un posterior estudio de la parte polar de la semilla verde se debe considerar esta situación para llevarse a cabo una acetilación total y separar los productos con y sin agregar agua. Además, es importante hacer notar que el extracto acuoso sirve de cultivo para moho, pero hay que considerar que previamente se había extraído con otros disolventes, lo cual quiere decir que en el extracto no hay sustancia que inhiba el crecimiento de éstos.

Los objetivos del trabajo se consideran alcanzados y la posibilidad de utilizar algunos componentes de la semilla abren opciones para estudios posteriores, ya que algunos son de interés comercial y otros en farmacología.

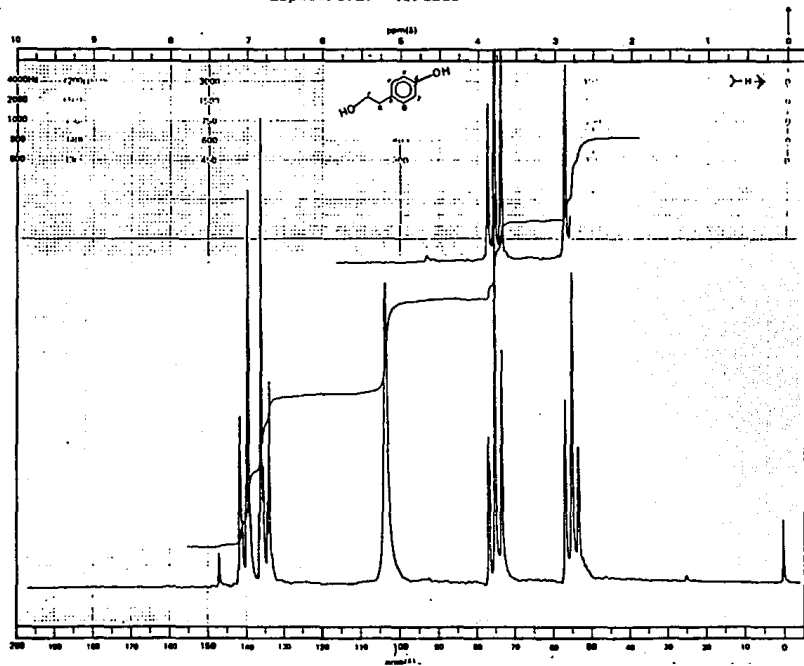
## A P E N D I C E I

## SIMBOLOS UTILIZADOS EN LA TESIS

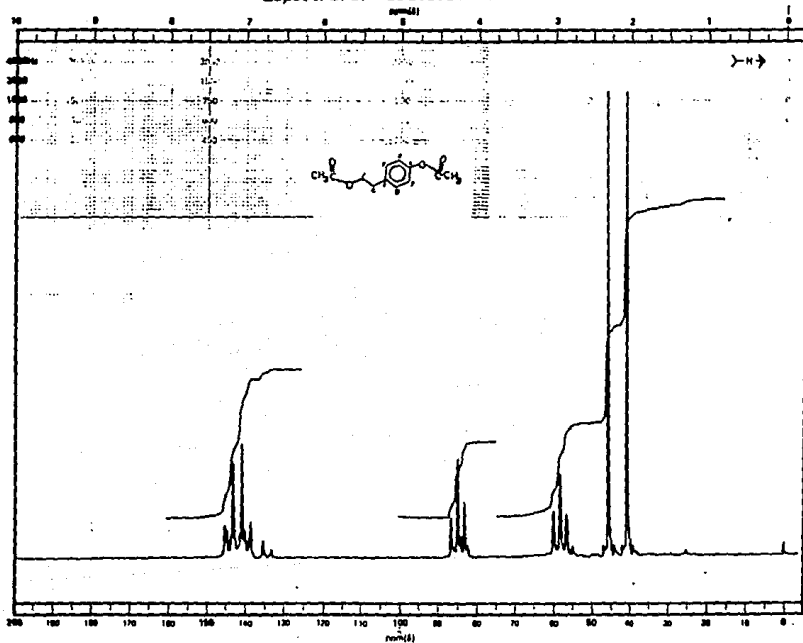
AcOH	ácido acético
AcOEt	acetato de etilo
Ac <sub>2</sub> O	anhidrido acético
ATD	análisis térmico diferencial
iBuOH	alcohol iso-butílico
nBuOH	alcohol butílico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	cloruro de metileno
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	benceno
EtOH	alcohol etílico
IR	infra-rojo
MeOH	alcohol metílico
Me <sub>2</sub> CO	dimetil éter
m/z	relación masa/carga
Multiplicidad	
c	cuadruplete o tetraplete
d	doblete
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doble
s	singulete
t	triplete
m	multiplete o poliplete
RMN <sup>13</sup> C	resonancia magnética de carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	resonancia magnética protónica
Rf	relación de frentes entre muestra/disolvente
pf	punto de fusión



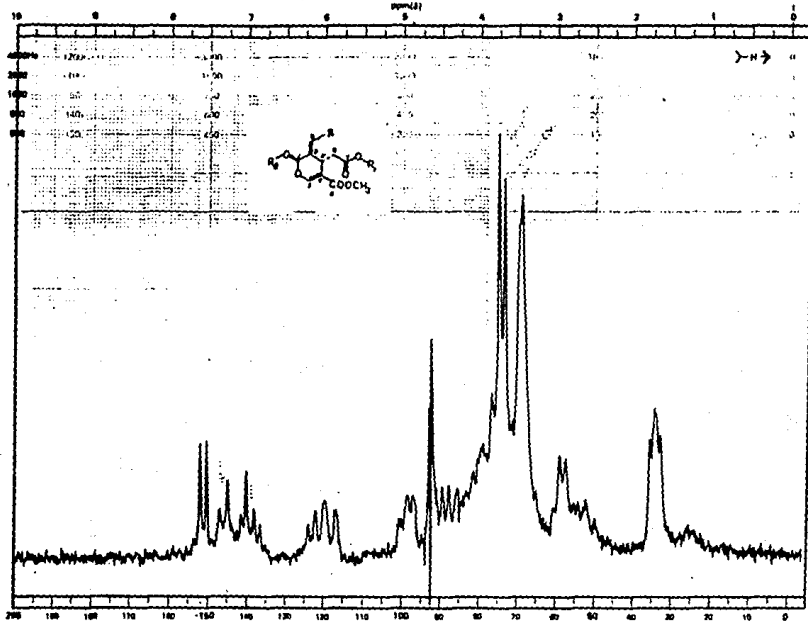
Espectro. 2. - Tirosol



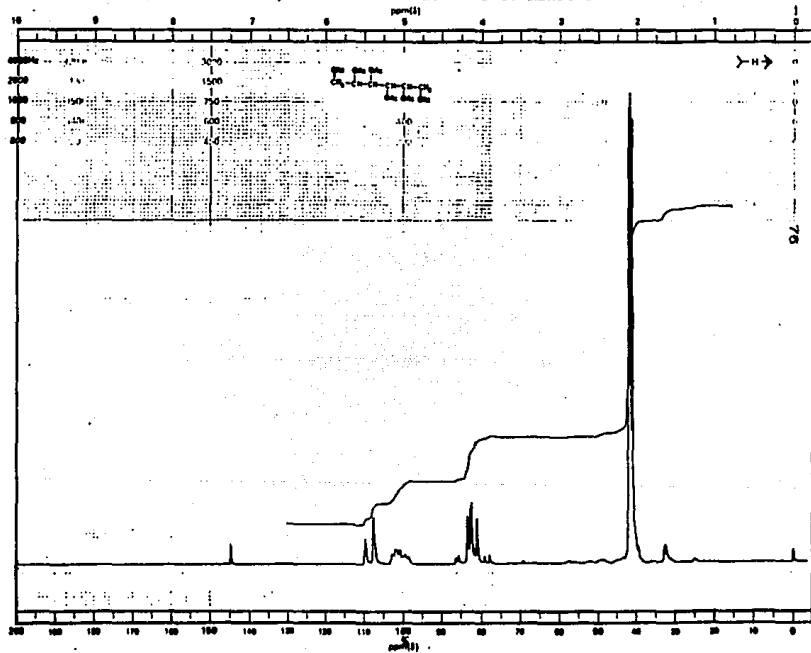
Espectro. 3. - Diacetato de Tirosol



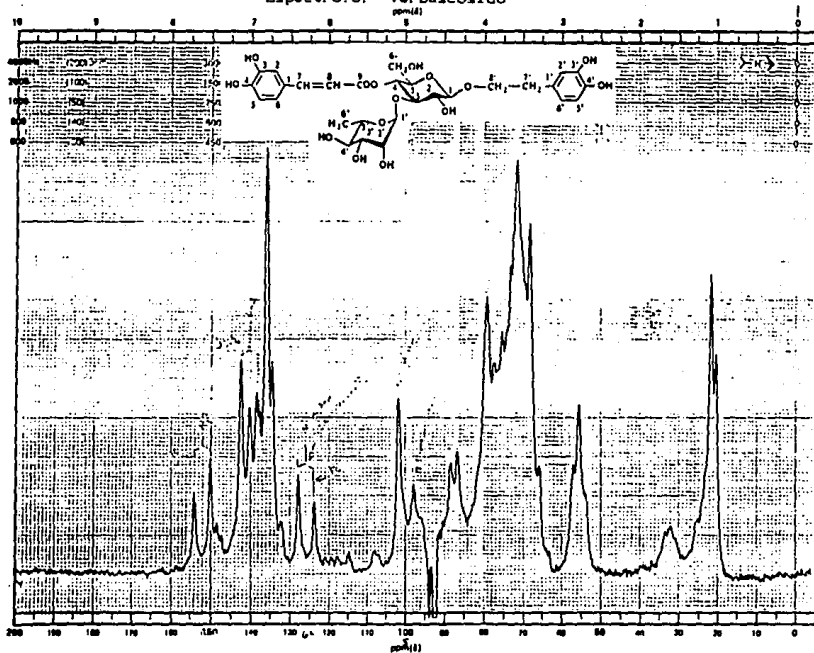
Espectro. 4.- Secoiridoide M-20



Espectro.5. - Hexaacetato de manitol

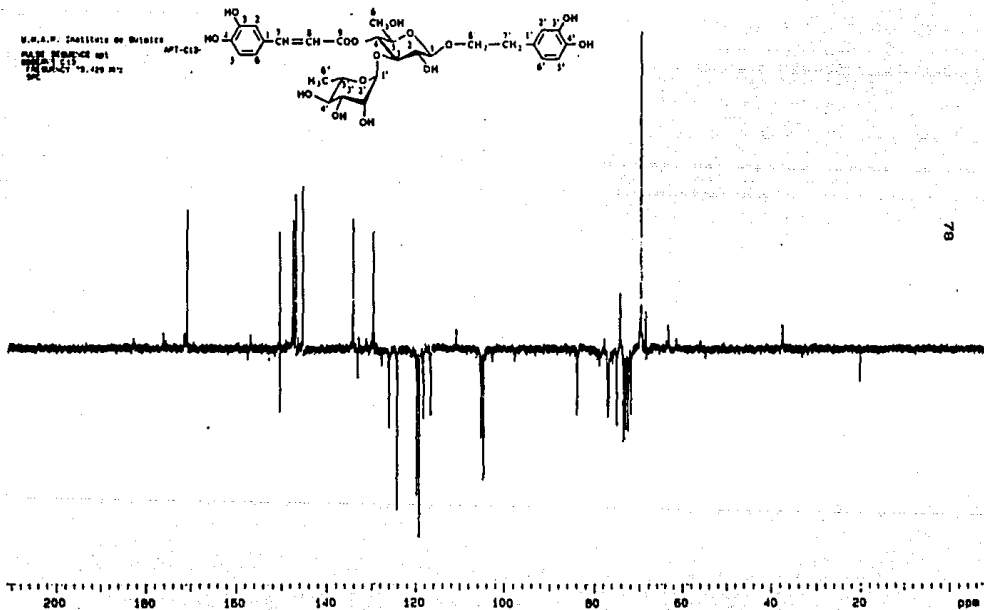


Espectro. 6. - Verbascósido

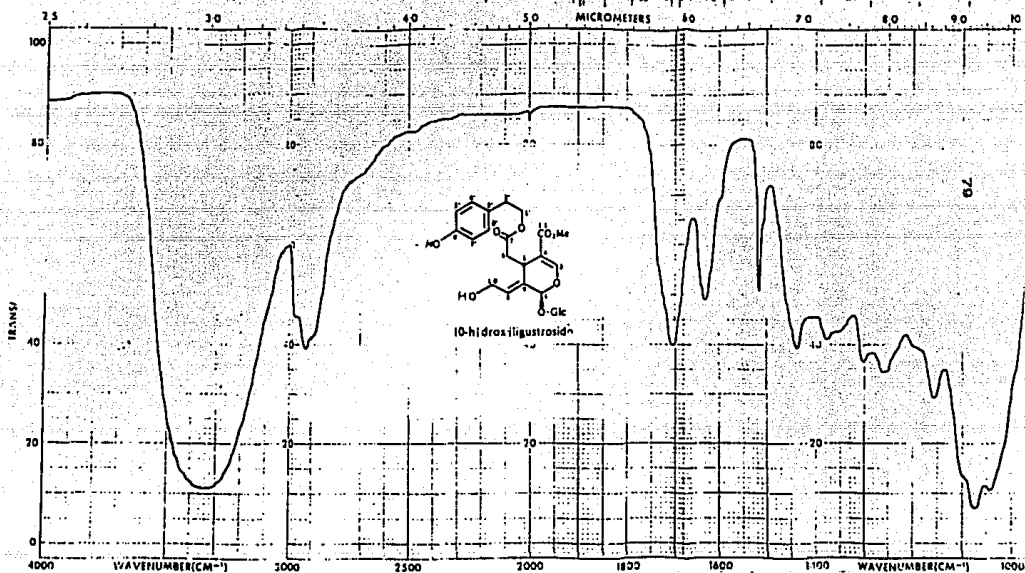




Espectro. 7. - APT del Verbascósido



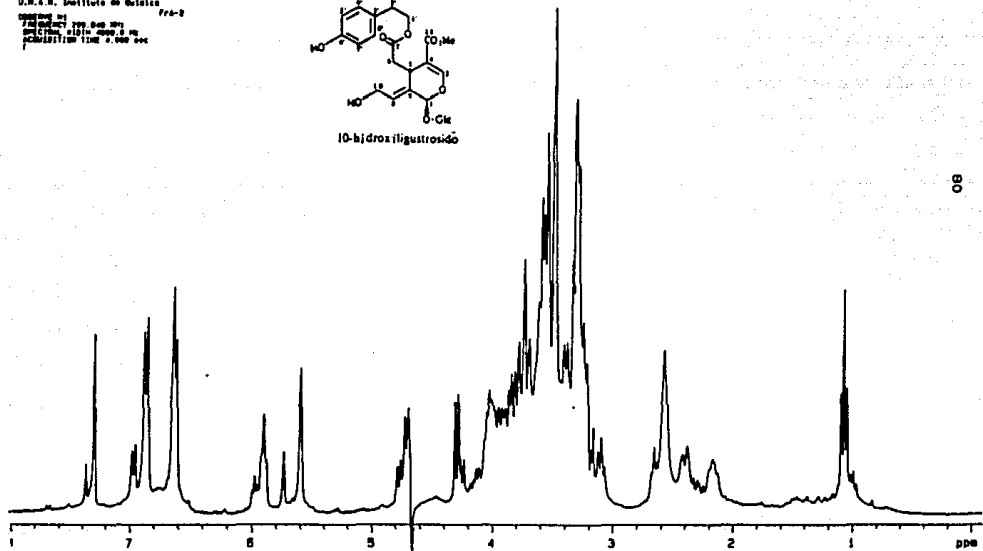
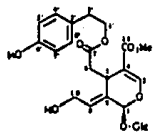
Espectro. B. - 10-Hidroxiilustrósido



ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Espectro. G. - 10-Hidroxiligustrósido

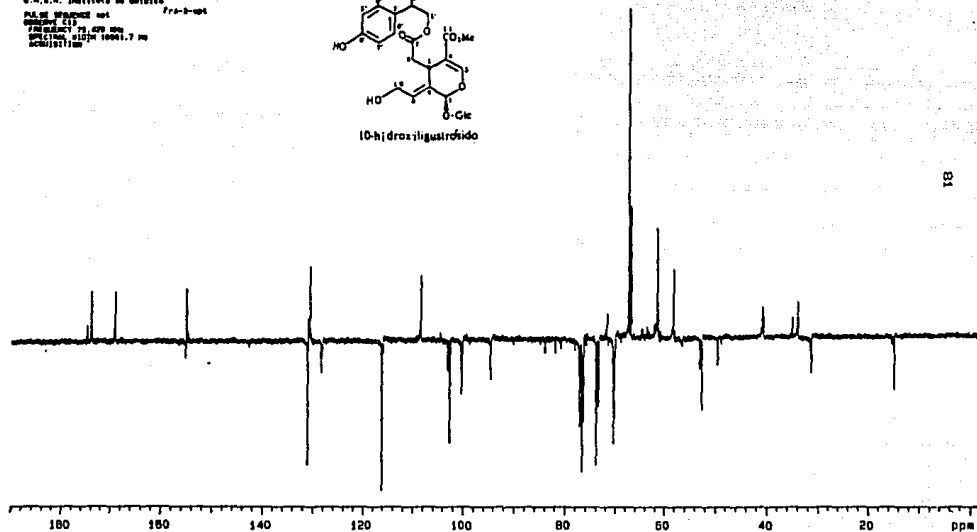
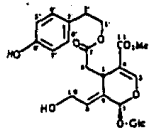
U.S.A.N. Instituto de Químico  
Fes-2  
CONDICIONES:  
Frecuencia: 100.000 Mc  
Solución: 10% en CDCl<sub>3</sub>  
Temperatura: 25°C  
Admisión: 1 cm  
Pulsos: 1000

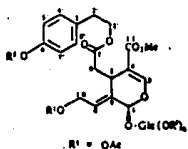


88

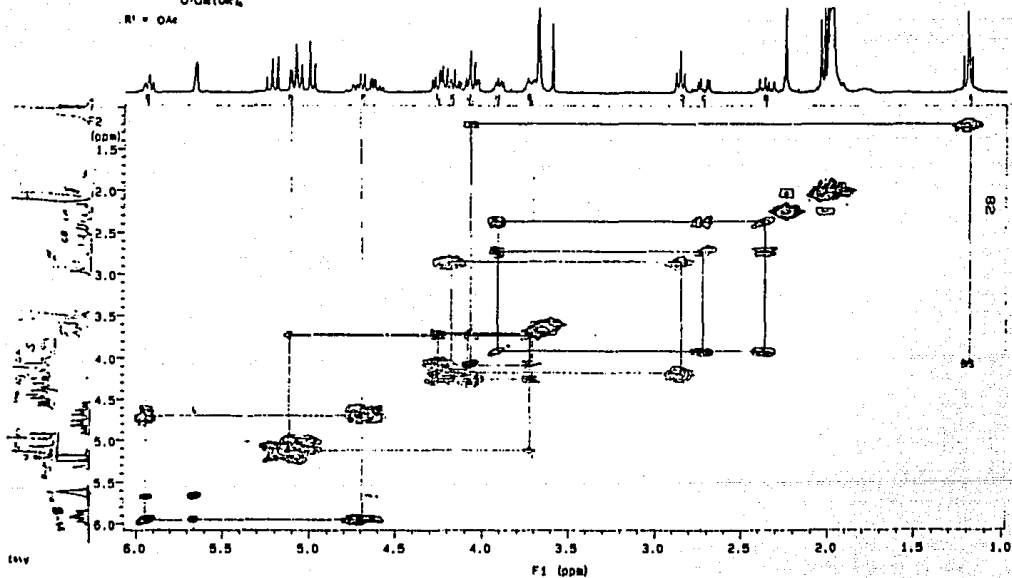
Espectro. 10. -RMN. <sup>13</sup>C del 10-Hidroxiiligustrósido

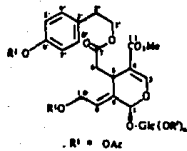
U.S.A.N. Instituto de Químico  
Frs-2-1001  
P.L.S. DE QUÍMICA org.  
QUÍMICO C.I.  
FREC. 75.000 MHz  
SOLVENTE: CDCl<sub>3</sub> 10001.7 Hz  
RESOLUCIÓN



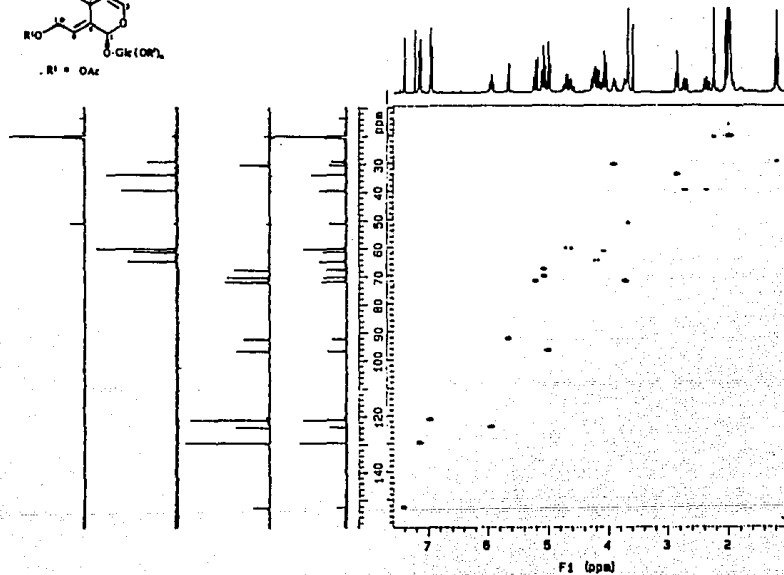


Espectro.11.- COSY del acetato del  
10-Hidroxiliguistrósido





Espectro.12.- HETCOR del del acetato del  
10-Hidroxi ligustrósido



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Keeler, R.F. and Tu, A.T.(Eds). Handbook of natural toxins . Vol.1. Plant and fungal toxins . Marcel Dekker, Inc. 1983.
- 2.- Matínez, M. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas, 2<sup>o</sup> ed.. Ed. BOTAS, México, 1937.  
     Miranda, F. La vegetación de Chiapas. Edic. del Gobierno del Estado de Chiapas, México,1952.  
     Herrera, A.L. . Catálogo Alfabético de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas que Existen en México . Secretaria de Agricultura y Fomento.. 1923.
- 3.- Rzedowski, J. Vegetación de México. Ed LIMUSA, México,1983.
- 4.- Este árbol a sido estudiado y mencionado en varios textos por botánicos como Faustino Miranda, Maximino Martínez, Villa Flores, etc.
- 5.- Wenzig, T. Die gattung Fraxinus Tourn . Bot. Jahrb. 4:185-188.2 pl. (1883).  
     Wenzig, T. Die eichen arten Amerikas . Jahrb. Botr. Gart. Berlin . 3:175-219(1884).
- 6.- Lingelsheim, A. Vorarbeiten zu einer monographic der gattung Fraxinus . Bot. Jahrb. 40:185-223(1908).
5. o La información fue obtenida de una recopilación, no fueron leídos los artículos de 4 y 5  
     Kaplan Langman, Ida. A selected guide to the literature on the flowering plants of Mexico. University of Pennsylvania Press,USA. 1984.
- 7.- Para los términos botánicos ver :  
     Moreno, N. P. . Glosario Botánico Ilustrado . CECSA . 1984.

- 9.- Martínez, M. *Plantas Útiles de México*, 2<sup>o</sup> ed. Ediciones BOTAS, México, 1936.
- 9.- Watanabe, Ch. Pharmacological study of the glycosides from *Fraxinus*. *Folia Pharmacol. Japon* . 43(2)35-9(1947).  
Chem. Abstr 47.(1953):1844d .  
Glicósidos de fraxina y fraxinina estimulan la respiración y paralizan el sistema nervioso central. Incremento del ácido úrico en la orina, depositado en el tejido.
- 10.- En la revisión bibliográfica se encontró una persistencia al estudio de las corteza y raíces de los *Fraxinus* ya que se les otorgan propiedades medicinales. Se han encontrado recientemente glucósidos de oxicumarinas e iridoides, a los que se les han acreditados esta actividad. Tres ejemplos son:  
Shao-Kung Liu, Yao-Teh Chang, Tsu-Kuang Chuan and Shi-Chieh Tan. The antimalarial drug, sinine. *Natl. Med. J. China*. 27,327-41(1941). Chem. Abstr. 35(1941):7547<sup>a</sup>.  
Saitoh, K. Inhibitory effects of the bark of *Fraxinus japonica* on the irritant-induced edema and blood capillary permeability. *Iwate Igaku Zasshi*. 23(2)227-43(1971).  
Chem. Abstr. 76(1972):135817m.  
Tsyurupa, B.N. and Balabanova, L.A. .The effect of aqueous extracts from seeds on germination. *Byull. Glavnogo Botan. Sada* (6)60-3(1953) . Chem. Abstr. 49(1955):7661e.
- 11.- Hahn, D. R. and Lee, M. W. . Coumarin glycoside from the stem bark of *Fraxinus sieboldiana* var. *angustata*. *Saengyak Hakhoe Chi* . 14(1)1-3(1983). Chem. Abstr. 99(1983):181330v.
- 12.- Pin-Fu Mei; Chieh-Ch'eng Hsu and Yu Wang . Active principles of The Chinese drug, Chin Pie, *Fraxinus rhinophylla* . *Hua Hsueh Hsueh Pao* . 28(1)25-30(1962). Chem. Abstr. 59(1963):12591f.  
Glucosido de 6,7-dihidroxicumarina inhibe el crecimiento de *Phigella flexneri*, *S. sonnei* y *S. oachmitzi* de pacientes con



disenteria, administrando oralmente (semejanza a esculetina).

- 13.- Prestehagge, K. Composition and digestibility of forest waste and other substitute feed. *Meldinger Norges Landbrukshøgskole*. 23, 301-58(1943). Chem. Abstr. 40(1946):744B<sup>3</sup>.
- Nehring, K. and Schramm, C. W. . Composition and nutritive value of leaves and branches. III Nutritive value of dead leaves and winter branches . *Arch. Tierernähr* . 6, 342-60(1951). Chem. Abstr. 46(1952):1665c.
- Sottini, E. and Geri, G. . Chemical composition, nutritive value, and utilization of buds and leaves of some plants of maquis. *Aliment Anim.* 14(3):27-38(1970) .
- Chem. Abstr. 74(1971):20877x .
- Mencionan sólo minerales donde los fresnos aportan poca cantidad de fosforo y sodio pero es bueno en elementos traza.
- Vukavi'c, D.V. and Maksimovi'c, D. . The digestive and nutritive qualities of oak and ash leaf fodder. *Archiv poljoprivredne nauke* . 9(26):59-76(1956). Chem. Abstr. 54:215371
- 14.- Costello, L.R.; Bassham, James A. and Calvin, M. Enhancement of phloem exudation from *Fraxinus uhdei* Wenz. (evergreen ash) using ethylenediamine tetraacetic acid. *Planta Physiol.* . 69(1):77-82(1982).
- 15.- Gómez Ruiz, H. R.; Labastida Rubio, R. del C. y Santarriaga Rivera, L. O. . Tesis : Métodos de análisis de aceites vegetales comestibles. Facultad de Química. UNAM. 1975.
- 16.- Annual Book of ASTM Standars 1985. Vol.06.03 Paints, related coatings and aromatics. D2245 y D2800-75
- 17.- AOAC Official Methods of Analysis of the association of official analytical chemistry. Chapter 28 . William, S.(Editor). 40<sup>o</sup> ed. USA. 1984.

- 18.- IUPAC "Standard methods for the analysis of oil, fats and soaps". Butterworths. London. 1986.
- 19.- Harborne, J.B. . Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plants analysis. 2 ed. CHAPMAN & HALL, London, 1984.
- 20.- Analysis and characterization of oil, fats, and fats products. Boekenooogen, H.A. (Editor). Vol.1. Interscience Publishers . London. 1964.
- 21.- Zafra Ramírez, S. P. . Tesis. Estudio de Aceites Vegetales Mexicanos por RMN. México. Facultad de Química. UNAM. 1979.
- 22.- Barber, M. and Merren, T.O.. The mass spectrometry of large molecules I. The triglicerides of straight chain fatty acids. *Tetrahedron Letters* 4(18>1063-1087(1964) .
- 23.- The SADTLER Standars Spectra. Standars Infrared Grating Spectra Vol. 11 número 10001K.
- 24.- Naimle, H. . Attempts to isolate and purify substances inhibitory to *Bacillus subtilis* from tree bark. *Angew. Botan.* 38(1>1-43(1964). *Chem. Abstr.* 64(1966):20191g.
- 25.- Registry Handbook [CAS 501-94-0] Bencene-ethanol , 4-Hidroxi.
- 26.- Joseph-Nathan, P.; Catillo, S.; Martínez, R.; del Río, R.E. and Cerda, C.M. . Aislamiento de manitol de *Usilaginoides vivens* y estudio de su hexaacetato por Resonancia Magnética Nuclear . *Rev. Lat. Quim.* 19(2>79-82(1988).
- 27.- Andary, C.; Wyde, R.; Laffite, C.; Privat, G. and Winternitz, F. . Structures of verbascose and orobanchoside, caffeic acid sugar ester from *Orobanche rapum-genioise*.

Phytochemistry . 21<5>1123-27(1982).

Se menciona que los dos glicósidos son agentes antihipertensivos y analgésicos.

Sasaki, H.; Nishimura, H.; Morota, T.; Chin, M. (Chen Zheng-xiona); Mitsuhashi, H.; Kamotsu, Y.; Maruyama, H.; Guo-rui, T.; Wei, H. and Yu-lang, X. . Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis*. *Planta Medica*. 55,458(1989).

Dió una idea para analizar los espectros de carbono 13 de los glucosidos no identificados señalándolos como fenilpropanoide e iridoideas.

- 28.- La Londe, R. T.; Wong, C. and Tsai, A. I. M. . Polyglucosidic metabolites of Oleaceae. The chain sequence of oleoside aglucon, tyrosol, and glucose units in three metabolites from *F. americana*. *J. Am. Chem. Sci.* 98<10>3007-13(1976) .
- 29.- Inouye, H.; Inoue, K.; Nishioka, T. and Kaniwa, M. . Two new iridoid glucosides from *Osmanthus fragrans*. *Phytochemistry* . 14,2029-32(1975).
- 30.- Ya-Ching Shen, Chia-Yin Lin and Chung-Hsiung Chen  
Secoiridoid glycosides from *Jasminum Multiflorum*  
*Phytochemistry* . 29<9>2905-12(1990).

## I N D I C E D E T A B L A S

	página
Tabla2.1.- <i>Fraxinus</i> existentes en la República Mexicana.....	4
Tabla3.1.-Resultados de las extracciones de material polar de semillas maduras adsorbidas en celita.....	22
Tabla3.2.-Resultado de percolaciones de compuestos sólo solubles en disolvente polar (MeOH).....	26
Tabla3.3.-Compuestos polares obtenidos por extracción y percolación del extracto polar de semilla madura.....	27
Tabla3.4.-Resultado de las separaciones con disolvente del extrtacto polar de semilla verde.....	31
Tabla3.5.-Variación de los eluyentes en la percolación de la parte soluble en MeOH del extracto polar de semilla verde.....	37
Tabla3.6.-Resultados de la percolación de la fracción 56-81.....	40
Tabla4.1.-Muestra de los principales ácidos grasos constituyentes de 2 fracciones del aceite de <i>Fraxinus uhdel.</i> .....	47
Tabla4.2.-Muestra de los resultados del aceite de <i>F. uhdel.</i> comparando con datos de aceites comestibles.....	49
Tabla4.3.-RMN <sup>13</sup> C del secoiridoide, comparado con datos del verbascosido.....	57
Tabla4.4.-RMN protónica comparativa del secoiridoide.....	60
Tabla4.5.-RMN de <sup>13</sup> C comparativa del secoiridoide.....	61
Tabla4.6.-RMN de <sup>13</sup> C comparativa del hexa-acetato del secoiridoide.....	62
Tabla4.7.-RMN'H del hexaacetato de 10-hidroxliligustrosido.....	63
Tabla4.8.-Correlaciones en RMN, según HETCOR cuadros A-B y según COSY cuadros B-C, del hexa-acetato del secoiridoide..	65
Tabla4.9.-RMN <sup>13</sup> C de M-4, un azúcar.....	66
Tabla4.10.-Anómeros $\alpha$ y $\beta$ de glucosa.....	68

## INDICE DE DIAGRAMAS

	página
DIAGRAMA.1-Obtención de extractos en general.....	11
DIAGRAMA.2-Trabajo con el extracto polar de la semilla madura....	22
DIAGRAMA.3-Obtención de TIROSOL.....	24
DIAGRAMA.4-Obtención de MANITOL.....	30
DIAGRAMA.5-Separación del extracto polar de semilla verde con diferentes disolventes.....	32
DIAGRAMA.6-Obtención del FENIL PROPANOIDE y del SECOIRIOIDE.....	34
DIAGRAMA.7-Obtención de los azúcares.....	38

## INDICE ANALITICO

Los números entre paréntesis indican  
espectros, los subrayados al dibujo y  
los normales donde se habla al respecto.

Aceite 1,2,7,17,18,19,20,26,35,38,45,47,48,49,69.  
 Acido graso 20,46,47,48,69.  
 APT 57,59,61,70.  
 Azúcares 36,39,40,56,59,68,70.  
   Glucosa 39,40,41,51,56,59,67,68,69.  
   Ramnosa 56,59.  
 Cera 45,70,56,59.  
 COSY 64,65,70.  
 HETCOR 64,65,70.  
 Fenilpropanoide 33,35,71,55,57.  
   Verbascosido 53,56,55,68.  
 Fraxina 6  
*Fraxinus uhdei* 4,5,6,9.  
 Manitol 16,29,37,53,54,70.  
 Parafina 17,45,70.  
 Secoiridoide 27,36,41,51,52,55,58,64.  
   10-Hidroxlígustrosido 55,59,60,70.  
   Nüzhenide 58,59.  
   8-Ramnosa ligustrosido 59.  
 Tirosol 25,26,50,51,58.  
 Triterpenos 13,15,23,28,37,42,43,46,69.  
   Acido oleanólico 14,42,53,69.  
   Acido ursólico 13,18,42,44,46,53,69.