



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Aislamiento, determinación de la estructura molecular y  
Bioevaluación de los productos naturales de especies  
de *Esenbeckia***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA :**

**EDGAR ELI VERGARA HUERTA**



**México D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ FEDERICO DEL RÍO PORTILLA**

**VOCAL: Profesor: EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS**

**SECRETARIO: Profesor: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA**

**1er. SUPLENTE: Profesor: ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**

**2° SUPLENTE: Profesor: EHECATL LUIS DAVID PALEO GONZÁLEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. EDUARDO GUILLERMO DELGADO LAMAS**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**EDGAR ELI VERGARA HUERTA**

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Doctor Guillermo Delgado Lamas, por sus valiosos consejos, por la confianza brindada, por su disponibilidad, amabilidad y conocimientos que han sido imprescindibles para la realización y culminación de este trabajo.

A mis sinodales José Federico Del Río, Rogelio Gregorio Pereda, Andrés Navarrete y Ehecatl Luis David Paleo, por la revisión, sus comentarios y aceptar ser parte del jurado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Facultad de Química e Instituto de Química; que me brindaron la oportunidad de formarme cultural y académicamente.

Al CONACYT por la beca otorgada como ayudante de investigador para la realización de esta tesis y la culminación de mis estudios de licenciatura.

A la coordinadora de la carrera de QFB. Perla Castañeda, por su gran ayuda en los momentos difíciles en el trayecto de la licenciatura.

A mis padres Teresa Huerta Ciro y Filiberto Vergara Fabián por su amor, comprensión, apoyo, por ser mi inspiración y a quienes les debo lo que soy.

A mis hermanos Filiberto Vergara Huerta, Misael Vergara Huerta y Erick Josafat Vergara Huerta, por su cariño, apoyo y ayuda incondicional.

A Isabel Citlali Soriano Porras por su paciencia, por su comprensión y sobre todo por el amor que me ha brindado todos estos años.

A la familia Soriano Porras por la confianza, amistad y cariño que me han brindado a lo largo de estos años.

A toda mi familia abuelos, tíos y primos por su cuidado, apoyo y sus consejos que me han brindado hasta el día de hoy.

A mis amigos de la infancia, de la preparatoria y de la facultad de química por sus consejos, paciencia y apoyo que me han brindado a lo largo de todos estos años.

A mis compañeros del laboratorio 1C de productos naturales por la paciencia, consejos y conocimientos que me han brindado para la culminación de este proyecto.

---

---

## ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Introducción.....	2
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1 Formulación del Problema.....	3
1.2 Objetivo General.....	3
1.3 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Justificación del Estudio.....	4
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes.....	5
2.1.1 Clasificación Botánica .....	5
2.1.2 Distribución Geográfica y descripción botánica de <i>Esenbeckia</i> .....	5
2.1.3 Generalidades sobre rutáceas.....	5
2.1.4 Estudios químicos de <i>Esenbeckia</i> .....	6
2.1.5 Generalidades de flavonoides.....	19
2.1.6 Generalidades de terpenos.....	24
2.1.7 Cumarinas.....	27
Esquema 1.- Origen de las Cumarinas Simples.....	28
III. METODOLOGÍA.....	30
3.1 Tipo de Investigación.....	30
3.2 Material Vegetal.....	30
3.3 Diseño Experimental.....	30
3.3.1 Diagrama del Desarrollo de la Parte Experimental.....	30
3.3.2 Cromatografía en Columna a Presión Reducida.....	32
3.3.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	32

3.3.4	Punto de Fusión.....	32
3.3.5	Espectroscopia Infrarrojo (IR).....	33
3.3.6	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C).....	33
3.3.7	Espectrometría de Masas.....	33
3.4	Parte Experimental del Análisis Químico de <i>Esenbeckia nesiotica</i> (Rutaceae).....	33
3.4.1	Obtención de los Extractos .....	33
3.4.2	Análisis del extracto hexánico de <i>E. nesiotica</i> .....	34
3.4.3	Análisis del Extracto Metanólico de <i>Esenbeckia nesiotica</i> .....	40
3.5	Parte experimental de <i>Esenbeckia ovata</i> Kunth (Rutaceae).....	44
3.5.1	Obtención de los Extractos .....	44
3.5.2	Análisis del extracto hexánico- acetato de etilo de <i>E.ovata</i> .....	44
3.5.3	Fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Esenbeckia ovata</i> .....	53
3.6	Actividad Citotóxica.....	55
IV.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	56
4.1	Terpenos.....	56
4.1.1	β-epóxido de cariofileno.....	56
	Esquema 2. Fragmentos estructurales propuestos.....	57
4.1.2	β-sitosterol.....	58
4.1.3	Isomultiflorenol.....	59
4.1.4	Cicloneolitsol.....	61
4.1.5	Ciclobalanona.....	62
4.2	Glucósidos.....	65
4.2.1	β-D-glicopiranosido de β-sitosterilo.....	65
4.2.2	Hesperidina.....	68

---

---

4.3 Cumarinas.....	70
4.3.1 Isopimpinolina .....	70
4.3.2 Bergapteno.....	71
4.4 Prueba de citotoxicidad .....	72
V. CONCLUSIONES.....	74
5.1 Conclusiones respecto a <i>Esenbeckia nesiotica</i> y <i>E. ovata</i> .....	74
5.2 Conclusiones basadas en la actividad citotóxica .....	74
5.3 Conclusión General.....	74
VI. Bibliografía.....	76

---

---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Constituyentes químicos del género <i>Esenbeckia</i> .....	07
Tabla 2. Componentes mayoritarios del Extracto Hexánico de <i>E. nesiotica</i> .....	35
Tabla 3. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del extracto hexánico de <i>E.nesiotica</i> .....	35
Tabla 4. Número de fracciones realizadas de la fracción E.nes-01-23.....	36
Tabla 5. Componentes mayoritarios del Extracto Metanólico de <i>E.nesiotica</i> ...	41
Tabla 6. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del Extracto Metanólico de <i>E. nesiotica</i> .....	41
Tabla 7. Componentes mayoritarios del extracto hexánico-AcOEt de <i>Esenbeckia ovata</i> .....	45
Tabla 8. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del extracto hexano-AcOEt de <i>E.ovata</i> .....	46
Tabla 9. Eluatos obtenidos de la fracción denominada E.ova-22-96.....	48
Tabla 10. Componentes mayoritarios del Extracto Metanólico de <i>E. ovata</i> Kunth .....	53
Tabla 11. Fracciones obtenidas del primer fraccionamiento del Extracto Metanólico de <i>E. ovata</i> (kunth).....	54
Tabla 12. Resultados de la prueba de Citótoxicidad de los metabolitos aislados.....	73

---

Tabla 13. Datos de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto aislado (22) con los reportados en la literatura.....	57
Tabla 14. Datos de RMN $^{13}\text{C}$ de los compuestos aislados (82 y 83) con los reportados en la literatura.....	64
Tabla 15. Datos de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto aislado (73) con los reportados en la literatura.....	66
Tabla 16. Datos de RMN $^{13}\text{C}$ del compuesto aislado (81) con los reportados en la literatura.....	69

---

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta del Sikimato, biosíntesis de flavonoides.....	22
Figura 2. Ejemplos de clasificación de los terpenos.....	25
Figura 3. Ruta del Acido mevalónico, biosíntesis de terpenos.....	26
Figura 4. Diagrama del desarrollo general de la investigación.....	31
Figura 5. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto hexánico de <i>E.nesiotica</i> .....	34
Figura 6. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto metanólico de <i>E. nesiotica</i> .....	40
Figura 7. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto hexánico- AcOEt de <i>E. ovata kunth</i> .....	45
Figura 8. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto metanólico de <i>E. ovata kunth</i> .....	53

## Resumen

*Esenbeckia* es un género que se localiza principalmente en el continente americano que consta de 30 especies, de las cuales 17 se encuentran ubicadas en las regiones tropicales, principalmente en los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas.

Del estudio realizado a los extractos orgánicos de las partes aéreas de *Esenbeckia nesiotica* se aislaron y caracterizaron sustancias de tipo terpénicas como son el epóxido de cariofileno,  $\beta$ -sitosterol, e isomultiflorenol así como la flavanona hesperidina y  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo, es adecuado mencionar que isomultiflorenol y la hesperidina son metabolitos que no se encuentran informados como constituyentes químicos del género *Esenbeckia*.

En cuanto al estudio realizado a los extractos orgánicos de las partes aéreas de *E.ovata* se logró el aislamiento de sustancias tipo terpénicas como el  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -epóxido de cariofileno, cicloneolitsol, ciclobalanona y  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo, así como sustancias del tipo cumarínicas que fueron identificadas como bergapteno e isopimpinlina, las sustancias identificadas como cicloneolitsol y la ciclobalanona no han sido reportadas como constituyentes del género *Esenbeckia*.

Los metabolitos caracterizados en este estudio fueron ensayados como agentes citotóxicos, donde la mayoría de los compuestos no muestran alta toxicidad, a excepción del metabolito isopimpinlina, que mostró actividad citotóxica moderada a una concentración de 50  $\mu$ M (66.74%), específica para la línea celular de cáncer de próstata (PC-3).

---

## INTRODUCCIÓN

Los estudios referentes al análisis de los productos naturales presentes en los organismos vivos (plantas, animales, hongos, entre otras fuentes) constituyen un campo de investigación básica que se cultiva en todo el mundo, y a partir de los hallazgos obtenidos, pueden derivarse numerosas líneas de investigación, entre las cuales podemos mencionar (a) las implicaciones taxonómicas de los productos naturales aislados, (b) el entendimiento de los mecanismos de interacción biológica (planta – planta y planta – insecto, entre otros), lo cual deriva en aspectos de interés ecológico y agronómico, (c) pueden identificarse metabolitos secundarios de interés terapéutico para los seres humanos, o bien de interés veterinario, (d) aspectos alimentarios, nutricionales, etc. En resumen, los hallazgos derivados del estudio de la composición química de la vegetación pueden coadyuvar a la conservación y al aprovechamiento racional del recurso. Así en nuestro país, se han realizado investigaciones a lo largo de las últimas décadas particularmente de la flora endémica, la cual es una de las más variadas del mundo. Se ha calculado que existen aproximadamente 260,000 especies diferentes de plantas superiores que crecen en nuestro planeta, muchas de las cuales se encuentran actualmente en peligro de extinción. Sin embargo, se estima que sólo el 10% de ellas han sido estudiadas desde el punto de vista biológico o químico. Así, resulta evidente que numerosas sustancias de interés práctico en los aspectos arriba mencionados podrán ser descubiertas mediante la investigación básica que es necesario llevar a cabo.

---

## CAPÍTULO I

### Planteamiento del problema y Objetivo de la investigación

Dentro de la línea de investigación básica referente al análisis químico de la vegetación, la cual tiene como objetivo generar conocimiento sobre la estructura molecular de los productos naturales presentes en la naturaleza, se consideró pertinente el estudio de dos especies del género *Esenbeckia* (familia Rutaceae), debido a que es un grupo de plantas cuya identificación botánica ha presentado cierta complejidad, ya que existe una notable semejanza en los caracteres morfológicos entre las especies [1]. Así, se procedió a realizar estudios químicos, con el objetivo de conocer no sólo la estructura molecular de los metabolitos secundarios, sino también en explorar su actividad biológica (citotoxicidad).

#### 1.1.- Formulación del problema

Tomando en cuenta las investigaciones ya existentes de las diferentes especies del género *Esenbeckia*, se concluye que el conocimiento químico biológico sobre las especies de este género es limitado, lo cual configura al problema por resolver. Es indudable la importancia de realizar estudios de diferentes poblaciones de especies o de especies no analizadas previamente. El aislamiento y caracterización molecular de los constituyentes de los extractos orgánicos de *E. nesiotica* y *E. ovata* permitirá la disponibilidad práctica de sustancias puras que facilitarán la exploración de la actividad biológica de las mismas (específicamente la actividad tóxica frente a ciertas líneas celulares). Los resultados generados disminuirá la falta de conocimiento arriba mencionado. Adicionalmente, es presumible que este conocimiento proporcione herramientas de valor taxonómico.

---

## 1.2.- Objetivo General

Generar conocimiento referente a la estructura molecular y bioactividad de los constituyentes químicos presentes en las especies *Esenbeckia ovata* y *E. nesiotica*, mediante la extracción, el aislamiento, la determinación de la estructura molecular y la realización de bioensayos particulares.

## 1.3.- Objetivos Específicos

- Localización y colección de las especies vegetales a analizar.
- Preparación de los extractos orgánicos a analizar.
- Determinar la estructura molecular de los metabolitos aislados, mediante el análisis y la comparación de datos espectroscópicos, y espectrométricos disponibles en la literatura científica.
- Aportar información sobre las citotoxicidad de los metabolitos aislados de estas dos especies de *Esenbeckia*
- Contextualizar los resultados obtenidos con los reportados previamente en la literatura.

## 1.4 Justificación del Estudio

Los productos naturales son las sustancias derivadas del metabolismo secundario como consecuencia de los mecanismos de defensa y supervivencia. Son de gran importancia en el entendimiento de los mecanismos moleculares que operan en la naturaleza así como por las diversas actividades biológicas que presentan. Estas sustancias son características de una sola especie, o bien, están restringidas a ciertos grupos de plantas.

De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo pretende generar conocimiento que integrado con la información disponible en la literatura, permita enriquecer el perfil químico biológico de las sustancias presentes en especies de *Esenbeckia*.

## CAPÍTULO II

### Marco Teórico

#### 2.1 Antecedentes

##### 2.1.1.- Clasificación Botánica

Las especies vegetales motivo del presente estudio se ubican en:

Familia: Rutaceae

Género: *Esenbeckia*

Especies: *E. nesiotica* y *E. ovata* Kunth.

##### 2.1.2.-Distribución Geográfica y Descripción Botánica de *Esenbeckia*

Las especies de *Esenbeckia* se localizan principalmente en las zonas tropicales de América, Asia y Australia. En nuestro país, las especies de este género se encuentran ubicadas en las regiones tropicales, principalmente en los estados de Veracruz, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Chiapas [1,2]. Son árboles o arbustos de 1-15 m de altura, con tronco de 5 a 50 cm de diámetro, hojas alternadas u opuestas, inflorescencias en forma de panícula y las flores presentan un diámetro de 5-7mm con fruto capsulado.

##### 2.1.3.- Generalidades sobre Rutáceas

Las rutáceas constituyen una numerosa familia de árboles y arbustos que en algunos casos se presentan como hierbas, de gran importancia económica por ser productora de los frutos cítricos comerciales (limones, naranjas, mandarinas, limas, entre otros), también de algunas especies ornamentales, como algunas especies de *Choisya* y *Skimmia*.

---

Las rutáceas prácticamente tienen distribución cosmopolita, pero están preferentemente centradas en las regiones templadas y tropicales del hemisferio sur, en especial de Australia y África del sur. Las rutáceas comerciales se cultivan principalmente en la región del sur de Estados Unidos, México, África del sur y Australia. La familia Rutaceae está dividida en siete subfamilias que incluyen ciento cincuenta géneros, el mayor número de los cuales pertenecen a las subfamilias Rutoideae, Toddalioideae y Citroideae. Consta aproximadamente de 1500 a 2000 especies que se localizan principalmente en las zonas tropicales de América, Asia y Australia. *Esenbeckia* pertenece a la subfamilia Rutoideae [3].

Estudios químicos previos realizados a especies de esta familia han demostrado la presencia de aceites esenciales, entre los que se han caracterizados compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos. Sin embargo, la característica más distintiva de la familia de la mayoría de los géneros hasta ahora analizados (en cuanto a metabolitos secundarios) ha sido la presencia de alcaloides (derivados del ácido antranílico, de la fenilalanina, del carbazol, del imidazol, y los alcaloides indólicos). Una recopilación importante de la información sobre los constituyentes químicos de la misma, es la presentada por Waterman y Grundon en 1983 y más recientemente por Hegnauer; quienes indican que los metabolitos secundarios más frecuentemente caracterizados, pueden dividirse en los siguientes grupos: a) alcaloides, b) cumarinas, c) flavonoides y glicósidos de flavonoides, d) cromonas y acetofenonas, e) triterpenos pentacíclicos f) triterpenos altamente oxidados (limonoides y cuasinoides) [4,5]. Más adelante se describirán sucintamente algunos de los grupos estructurales mencionados.

#### **2.1.4. Estudios Químicos de *Esenbeckia***

Los estudios químicos realizados para las especies de este género, indican que los limonoides, las furanocumarinas, los triterpenos y los alcaloides derivados de la acridona son los productos naturales principales.

Anteriormente, se ha informado una revisión de los constituyentes de *Esenbeckia* [3], la cual incorporó los datos disponibles hasta 1998. En la tabla 1 se muestran los constituyentes químicos de las 19 especies de *Esenbeckia* hasta ahora estudiadas.

Tabla 1. Constituyentes Químicos del género *Esenbeckia*

Especie (parte de la planta)	Constituyente (estructura)	Referencia		
<i>Esenbeckia febrifuga</i> (corteza)	(1) rutaevina	[7,8]		
	(2) diosfenol de la limonina			
	(4) eskimianina			
	(5) maculina			
	(6) flindersiamina			
	(7) maculosidina			
<i>Esenbeckia hartmanii</i>	(1) rutaevina	[9]		
	(2) diosfenol			
	(3) limonina			
	(4) esquimianina			
	(7) maculosidina			
<i>Esenbeckia litoralis</i> (semillas y cápsulas de las semillas)	(1) rutaevina	[10]		
	(3) limonina			
	(8) kokusagina			
	(9) bergapteno			
	(10) isopimpinolina			
	(8) kokusagina			
	(10) isopimpinolina			
	(11) 1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona			
	(12) 8-hidroxibergapteno			
	(13) imperatorina			
	(14) felopterina			
	(15) alloimperatorina			
	<i>Esenbeckia litoralis</i> (hojas y semillas)		(4) esquimianina	[10]
			(15) alloimperatorina	

---

	(5) maculina	
	(9) bergapteno	
	(13) imperatorina	
	(14) felopterina	
	(16) dictamina	
	(17) evolitrina	
<i>Esenbeckia berlandieri</i> (semillas y cáscaras de fruto)	(1) rutaevina	[10]
<i>Esenbeckia flava</i> (hojas y tallo)	(1) rutaevina	[10]
	(4) esquimianina	
	(6) flindersiamina	
	(7) maculosidina	
	(16) dictamina	
	(17) evolitrina	
	(19) 3,3-di-(3-metil-2-buten)- <i>N</i> -metil-2,4-quinoldiona	
<i>Esenbeckia pilocarpoides</i> (raíz)	(5) maculina	[11]
	(6) flindersiamina	
	(8) kokusagina	
	(11) 1-hidroxi-3-metoxi- <i>N</i> -metilacridona	
	(18) kokusaginina	
	(20) isomaculina	
<i>Esenbeckia nesiotica</i> (hojas y tallo)	(21) $\beta$ - sitosterol	[12]
	(22) $\beta$ -epóxido de cariofileno	
	(23) friedelina	
	(24) (Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)- decaprenol	
	(26) lupeol	
	(25) (Z,Z,Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)-tridecaprenol	
	(27) 1-(3-metilbutanoil)-3-geranil-floroglucinol	
	(28) 1-(2-metilbutanoil)-3-geranil-floroglucinol	
	(29) 1-(2-metilpropanoil)-3-geranil-floroglucinol	

---

		(30) clovandiol	
<i>Esenbeckia</i>	<i>belizencis</i>	(6) flindersiamina	[13]
(hojas y tallo)		(18) kokusaginina	
		(21) $\beta$ - sitosterol	
		(22) $\beta$ -epóxido de cariofileno	
		(23) friedelina	
		(25) (Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)-decaprenol.	
		(31) espatulenol	
<i>Esenbeckia huertana</i>	(hojas y tallos)	(9) bergapteno	[14]
		(10) isopimpinolina	
		(14) felopterina	
		(22) $\beta$ -epóxido de cariofileno	
		(23) fridelina	
		(26) lupeol	
		(32) criptomeridiol	
<i>Esenbeckia leiocarpa</i>		(5) maculina	[15,16]
		(6) flindersiamina	
		(16) dictamina	
		(18) kokusagina	
		(34) 4-metoxi-2-(3'-pentenil)-quinolina	
		(35) 1-metil-2-(3'-pentenil)-quinolin-4-ona	
		(36) 5-isopentenilindol	
		(37) 6-isopentenilindol	
		(38) 7-isopentenilindol	
		(39) anonidina A	
		(40) anonidina C	
		(41) 7-indolcarbaldehido	
		(42) 7-indolmetanol	
		(43) leiocarpol	
		(44) leiocarpadiol	
		(45) sesamina	
		(46) metilpiperitol	

---

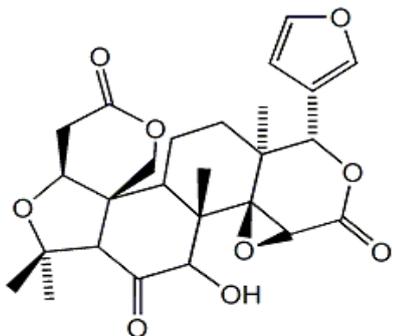
	(47) marmesina	
	(48) 4-isopropeniloxi- <i>trans</i> -cinamato de metilo	
	(49) leiocarpona	
	(50) leiocarpatriol A	
	(51) leiocarpatriol B	
	(52) 8-metoxi-1-metil-2-tridecilquinolin-4-ona	
	(53) amida A	
	(54) amida B	
<i>Esenbeckia pumilia</i> (raíz)	(55) rutina	[17]
<i>Esenbeckia almawillia</i>	(10) isopimpinelinea	[18]
	(56) 3-metoxi-4,5-metilen dioxicinamaldehído	
	(57) 3-metoxi-4,5-metilendioxicinamato de metilo	
	(58) 8-metoxi-1-metil-2-pentil-4-quinolona	
	(59) 8-metoxi-1-metil-2-hexil-4-quinolona	
	(60) 8-metoxi-1-metil-2-heptil-4-quinolona	
<i>Esenbeckia grandiflora</i> (raíz)	(5) maculina	[18]
	(6) flindersiamina	
	(18) kokusagina	
	(34) xantotoxina	
	(61) pimpinelina	
	(62) 3-(1',1'-dimetilalil) columbianetina	
	(63) 4-metoxi-1-metilquinolin-2-ona	
<i>Esenbeckia almawillia</i> (parte aérea)	(6) flindersiamina	[19]
	(7) maculosidina	
	(64) chalepina	
	(65) 2-(3'-metoxi-2-(3'-metoxi-4,5-metilendioxifenil)-1-metilenquinolin-4-ona	
	(66) 8- metoxi-2-(3'-metoxi-4,5-metilendioxifenil)-1-metilenquinolin-4-ona	
<i>Esenbeckia alata</i> (hojas)	(67) Psoraleno	[20]
	(34) xantotoxina	
	(68) xantiletina	
	(4) esquimianina	
	(26) Lupeol	

---

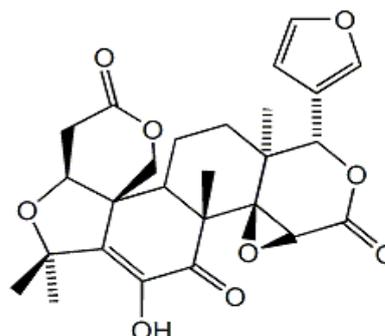
	(46) Sesamina	
<i>Esenbeckia conspecta</i> kunt (tallo)	(21) $\beta$ - sitosterol	[21]
	(69) ácido oleico	
	(70) ácido palmítico	
	(32) espatulenol	
	(31) clovandiol	
	(71) aurapteno	
	(14) felopterina	
	(72) 8-metoxi- <i>N</i> -metilflindersina	
	(6) flindersiamina	
	(7) maculosidina	
	(73) $\beta$ -D-glucopiranosido de $\beta$ sitosterilo	
<i>E. ovata</i> Kunth (hojas)	(23) friedelina	[22]
	(74) lupenona	
	(22) $\beta$ -epóxido de cariofileno	
	(26) lupeol	
	(21) $\beta$ -sitosterol	
	(9) bergapteno	
	(10) isopimpinelinea	
	(34) xantotoxina	
	(14) felopterina	
	(32) criptomeridiol	
<i>Esenbeckia stephani</i> (hojas)	(21) $\beta$ - sitosterol	[23]
	(22) $\beta$ -epóxido de cariofileno	
	(23) friedelina	
	(75) walenol	
<i>Esenbeckia pentaphylla</i> (hojas)	(13) imperatorina	[24]
	(16) dictamina	
	(76) <i>N</i> -metilflindersina	
	(6) flindersiamina	
	(18) kokusaginina	
	(77) $\gamma$ - fagarina	

(78) escopoletina

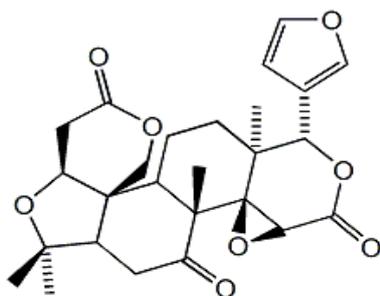
(79) 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído



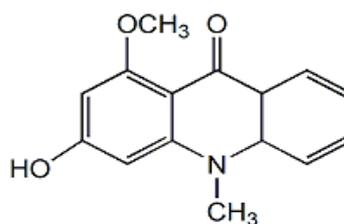
1



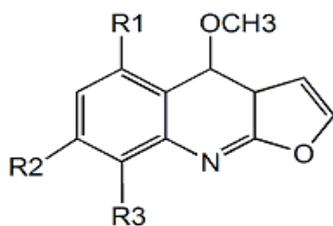
2



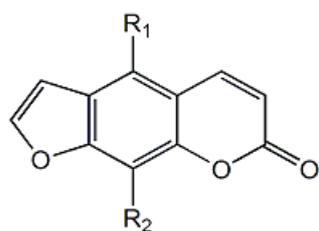
3



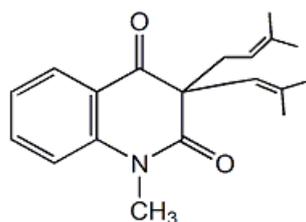
11



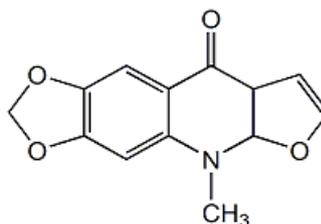
- 4  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OCH_3$   
 5  $R_1 = R_2 = OCH_2O, R_3 = H$   
 6  $R_1 = R_2 = OCH_2O, R_3 = OCH_3$   
 7  $R_1 = R_3 = OCH_3 = OCH_2O$   
 8  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OCH_2O$   
 16  $R_1 = R_2 = R_3 = H$   
 17  $R_1 = R_3 = H, R_2 = OCH_3$   
 18  $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = H$



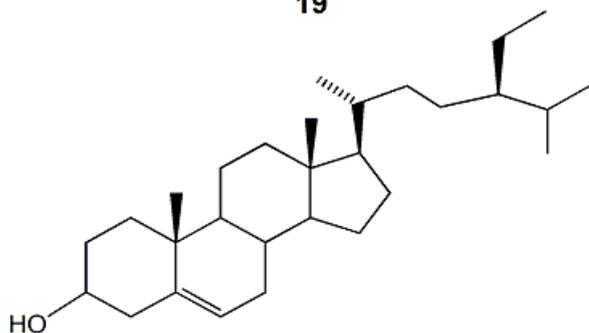
- 9  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$
- 10  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$
- 12  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$
- 13  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
- 14  $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$
- 15  $R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2, R_2 = \text{OH}$
- 34  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$



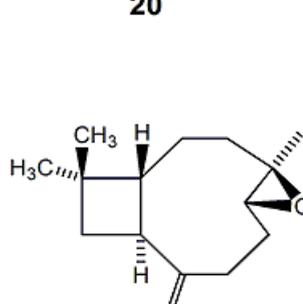
19



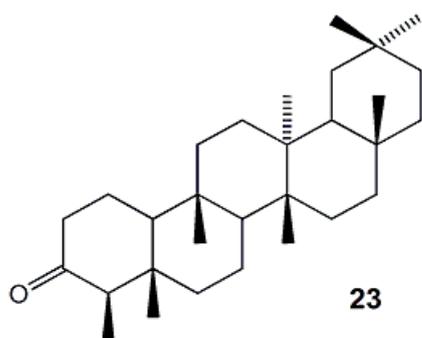
20



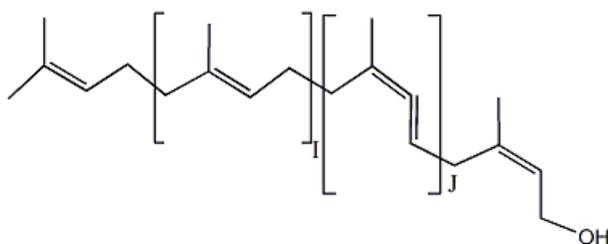
21



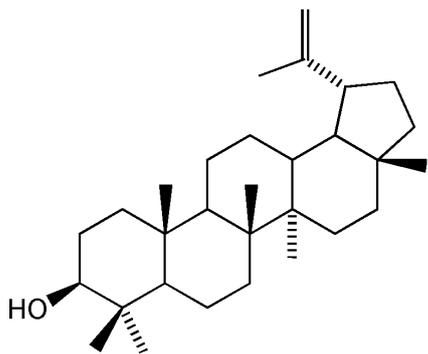
22



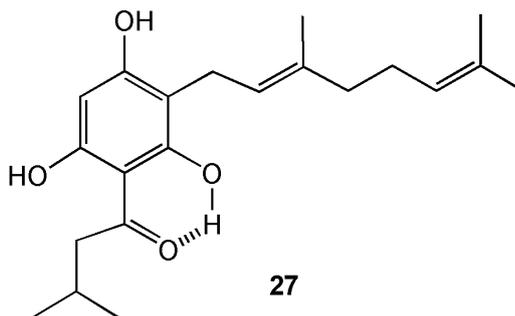
23



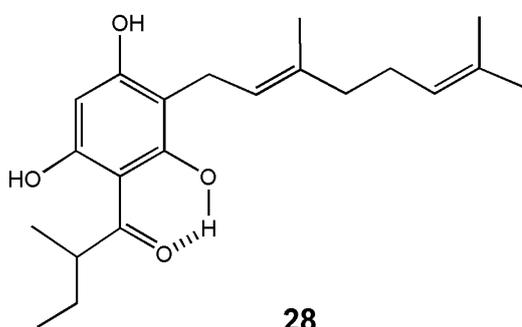
- 24  $I = 3, J = 5$
- 25  $I = 4, J = 7$



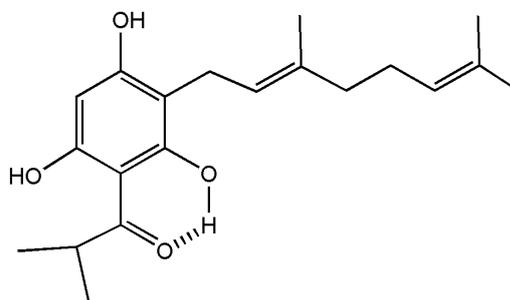
26 R= OH,  $\alpha$ -H  
74 R= O



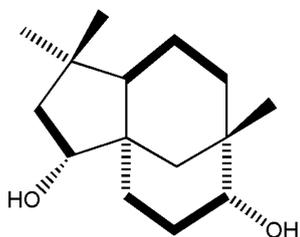
27



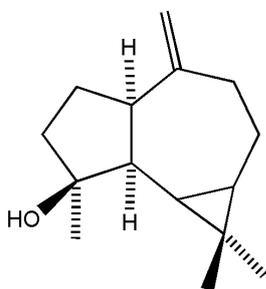
28



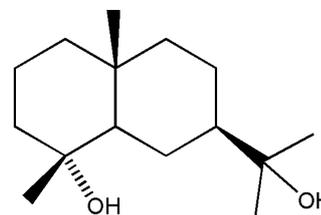
29



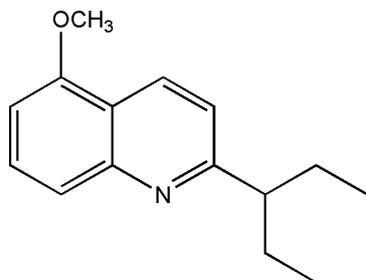
30



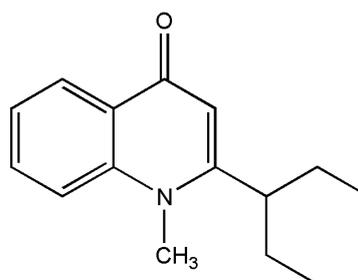
31



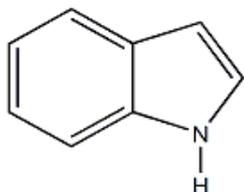
32



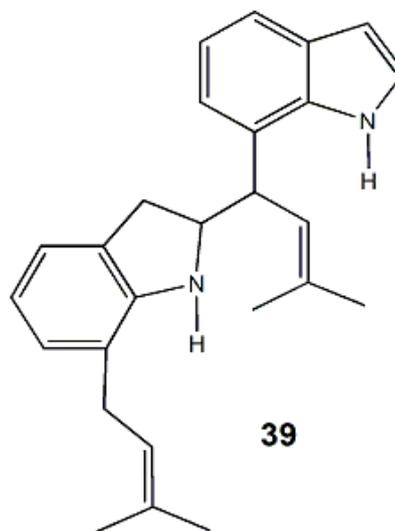
33



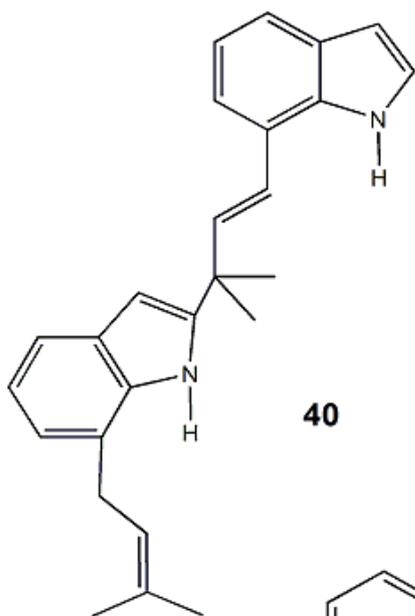
35



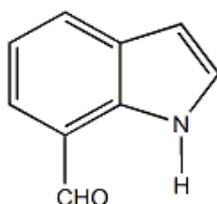
- 36** C-5 -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**37** C-6 -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
**38** C-7 -CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>



**39**



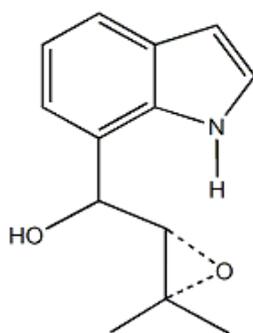
**40**



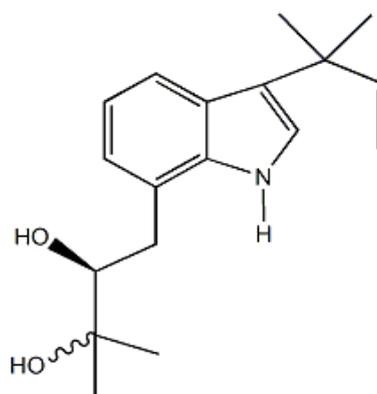
**41**



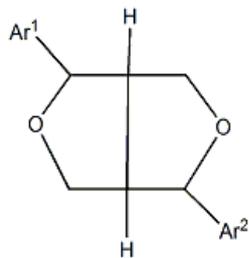
**42**



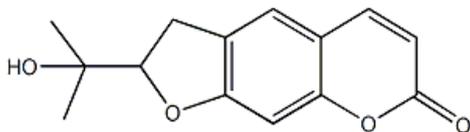
**43**



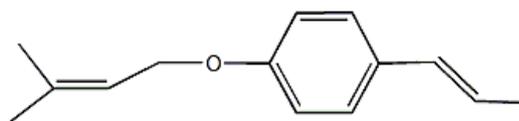
**44**



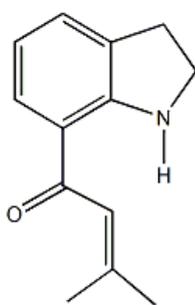
**45** Ar<sup>1</sup>= Ar<sup>2</sup>= piperonilo  
**46** Ar<sup>1</sup>= piperonilo, Ar<sup>2</sup>= veratrilo



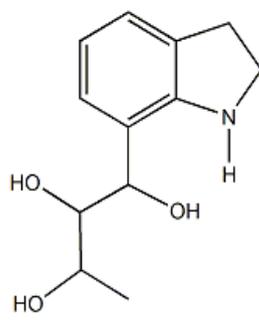
**47**



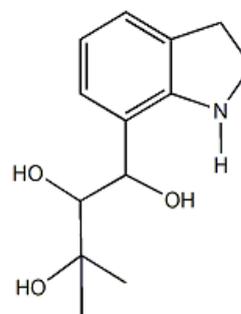
**48**



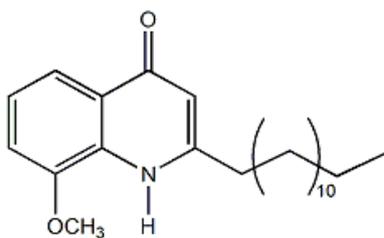
**49**



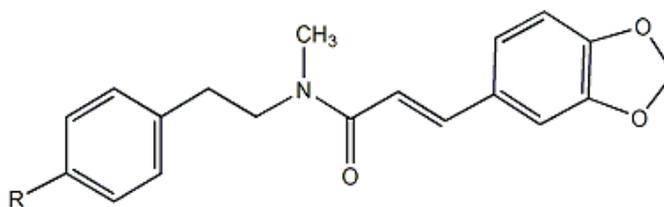
**50**



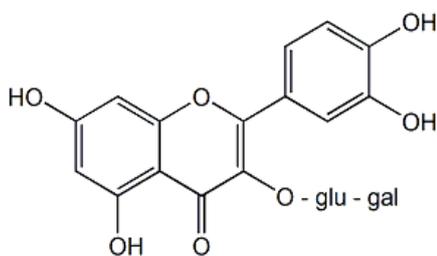
**51**



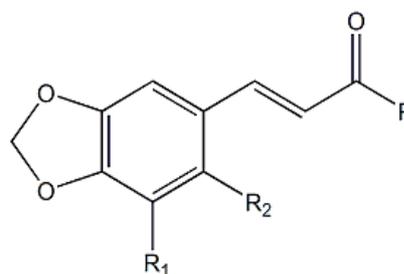
**52**



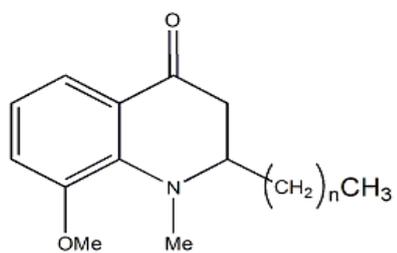
**53** R= OCH<sub>3</sub>  
**54** R=H



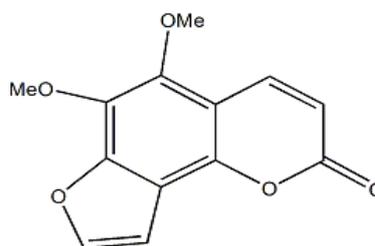
**55**



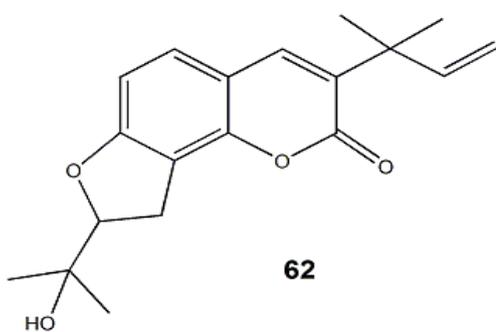
**56** R=R<sub>2</sub>=H, R<sub>1</sub>=OMe  
**57** R=R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=H



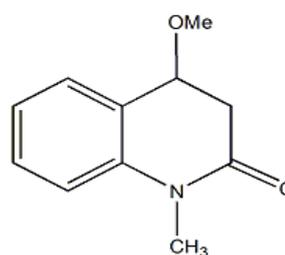
**58** n= 4  
**59** n= 5  
**60** n= 6



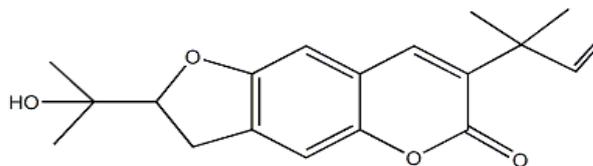
**61**



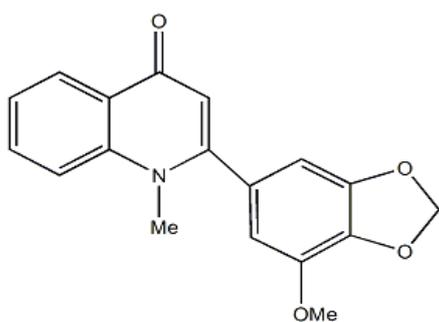
**62**



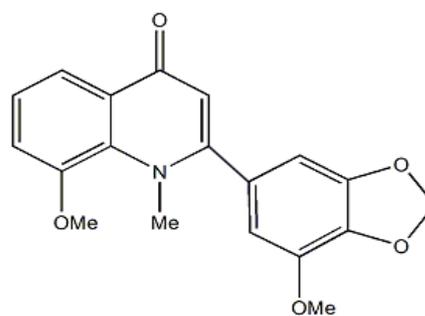
**63**



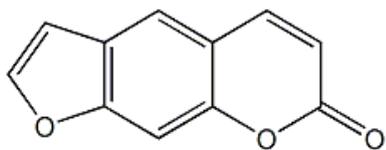
**64**



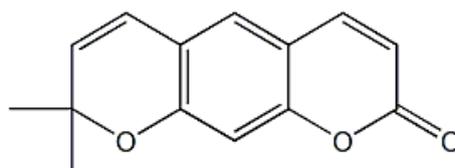
**65**



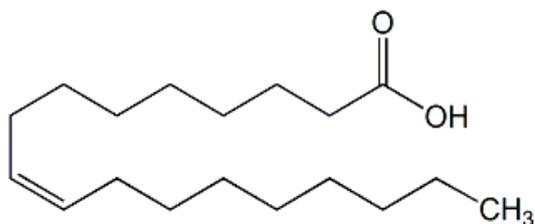
**66**



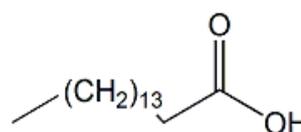
67



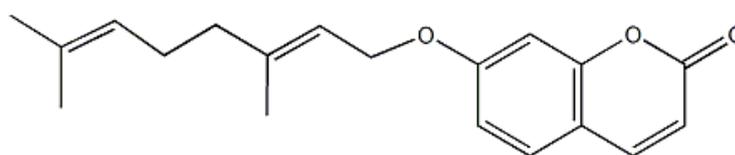
68



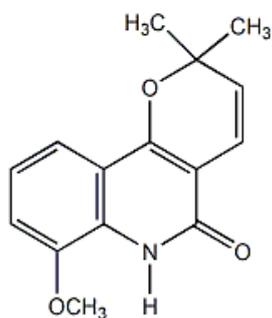
69



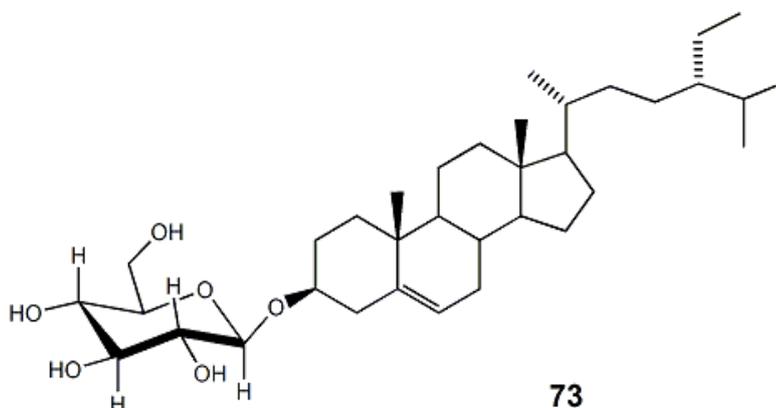
70



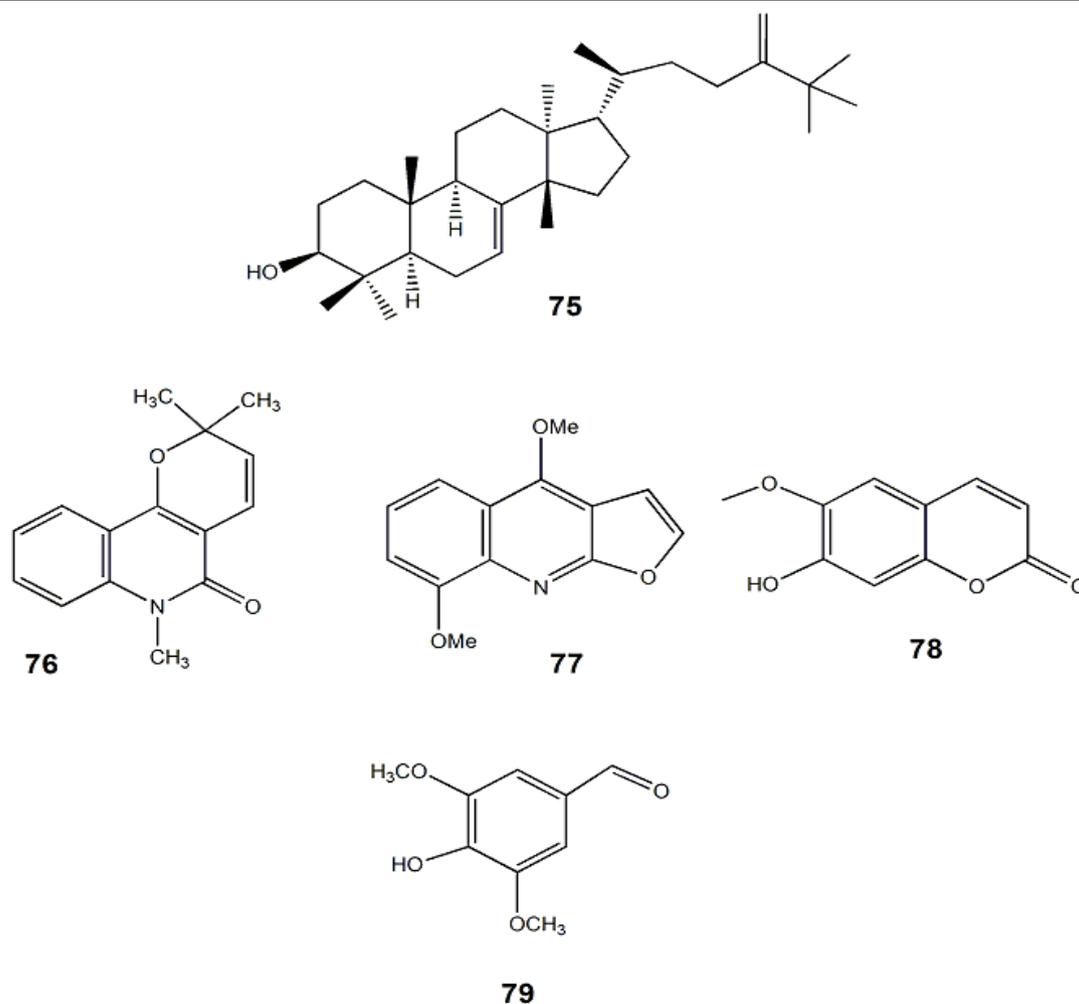
71



72



73



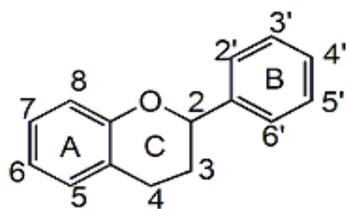
Considerando que en la presente investigación se aislaron y caracterizaron flavonoides, terpenoides y cumarinas, a continuación se describirán algunas generalidades de estos grupos de sustancias naturales.

### 2.1.5 Generalidades de Flavonoides

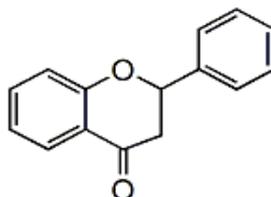
Estos metabolitos secundarios del tipo fenil propano se encuentran en fuentes naturales como O-glicósidos, agliconas o C-glicósidos. Poseen como unidad básica un esqueleto de 15 carbonos. Se representan como C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y están formados por dos anillos aromáticos (A y C) unidos por un heterociclo con oxígeno (B).

### ➤ Clasificación

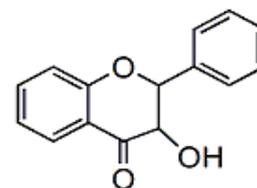
Se clasifican según la estructura del esqueleto y su nomenclatura es la siguiente [25]:



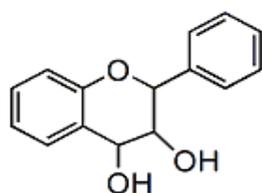
Flavonoide



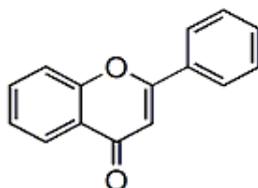
Flavanona



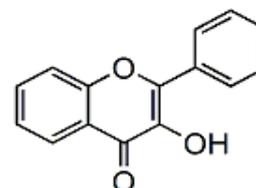
dihidroflavonol



Flavan-3,4-diol

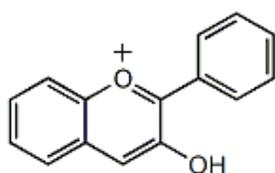


Flavona

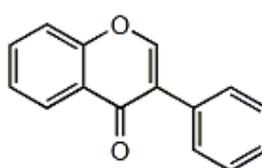


Flavonol

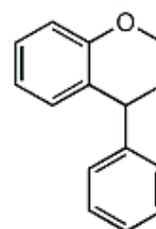
Derivados de los esqueletos principales anteriormente mencionados, se identifican grupos adicionales de flavonoides, que son los siguientes:



Antocianina

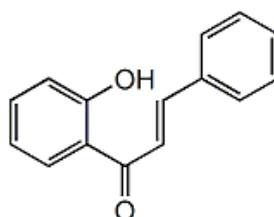


Isoflavona



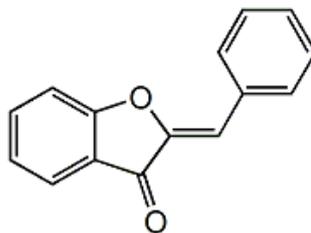
Neoflavona

Cuando el esqueleto de fenil propanoide no forma un heterociclo, se identifican las chalconas:



Chalcona

Cuando a partir del fenil propanoide se genera un heterociclo de 5 miembros, se forman las auronas:



Aurona

➤ Ruta biosintética:

Su biosíntesis es a partir de la ruta de ácido sikímico, a partir de la cual principalmente se forman compuestos aromáticos como aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano.

La fenilalanina y tirosina forman unidades básicas de  $C_6C_3$  que están en los productos naturales. Esta ruta la realizan microorganismos y plantas pero no animales [26].

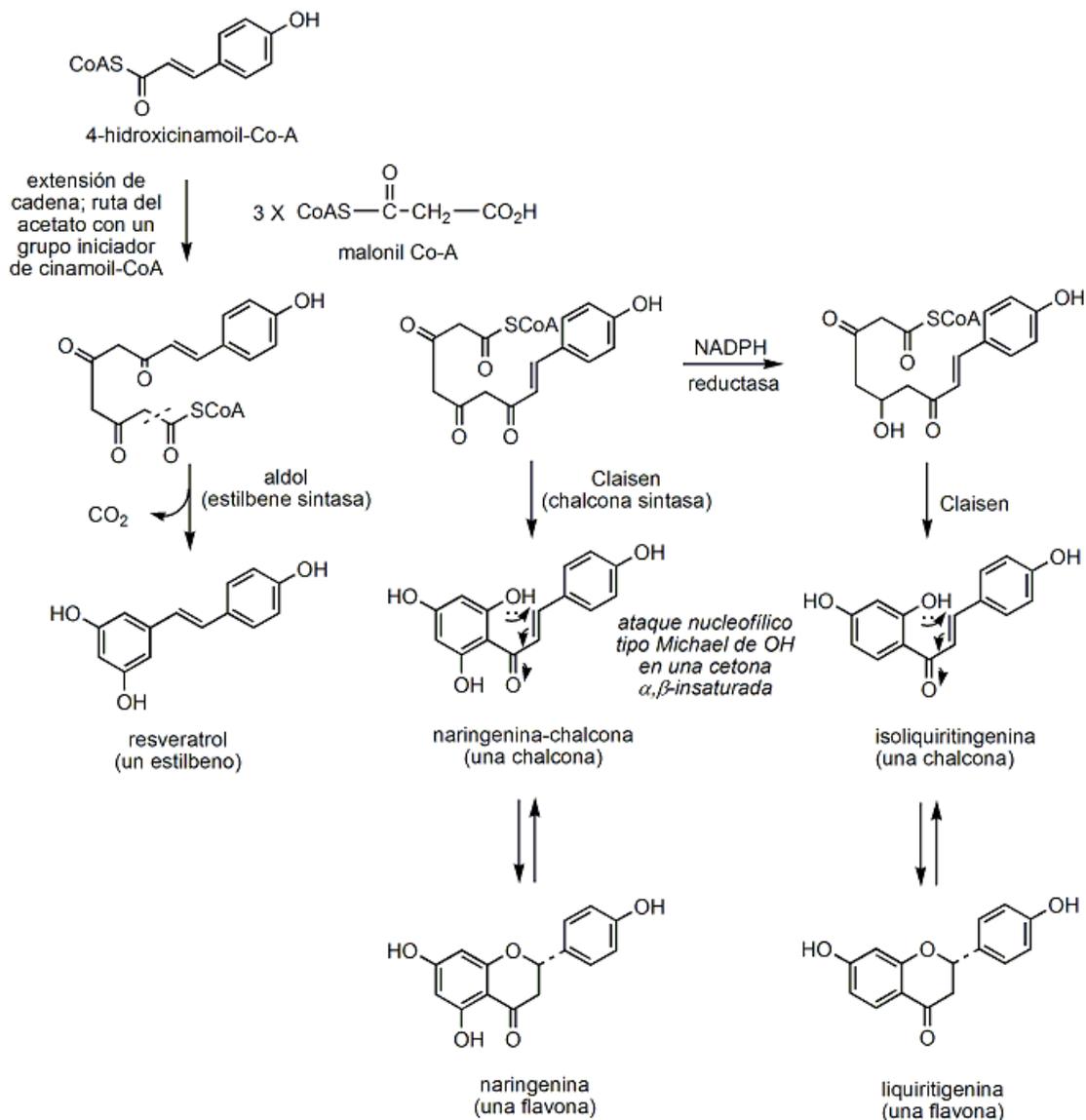


Figura 1. Ruta del Siquimato en la Biosíntesis de Flavonoides

Los flavonoides son productos de una unidad iniciadora de cinamoil Co-A con cadenas que usan tres moléculas de malonil Co-A. Esto inicialmente produce un policétido como se observa en la figura 1, el cual de acuerdo a la naturaleza de la enzima responsable, puede dividirse de dos formas diferentes. Esto permite que procedan reacciones aldólicas o de tipo Claisen, generando anillos aromáticos [27].

## Actividad biológica

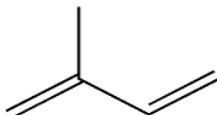
Las funciones biológicas que estos metabolitos secundarios tienen en los organismos que los producen no han sido establecidas claramente. Sin embargo, existe evidencia de las propiedades protectoras de estos compuestos en los tejidos vegetales contra la irradiación UV, como fitoalexinas, como agentes antibacterianos, además de la coloración y el sabor característico de las partes vegetales que los poseen. En años recientes se ha observado la relación de los flavonoides con las propiedades defensivas de las plantas, encontrando por ejemplo, que la presencia de algún O-glicósido evita el ataque de herbívoros en diferentes variedades de arroz, y en general, cada vez se encuentran en la literatura más reportes que informan de las propiedades alelopáticas de los flavonoides.

Actualmente, se estima que se han caracterizado aproximadamente 6400 flavonoides aislados de fuentes naturales. Entre las actividades biológicas que poseen *in vitro* [27] se pueden mencionar las siguientes.

- Actividad antiinflamatoria
- Antioxidante
- Anticancerígena
- Antibacterial
- Antiviral
- Inhibidores de enzimas

### 2.1.6 Generalidades de Terpenos

Son metabolitos secundarios con estructuras compuestas por unidades de isopreno ( $C_5$ ). Se encuentran en los diversos órganos de todas las plantas a excepción de los sesterterpenos ( $C_{25}$ ) que se encuentran en ciertos hongos y en algunos insectos, tales como *Ceroplastes albolineatus* [28].



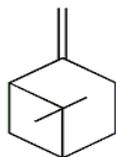
Unidad de Isopreno

#### ➤ Clasificación

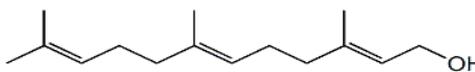
Se clasifican según el número de unidades de isopreno:

- Monoterpenos ( $C_{10}$ ) formados por dos unidades de isopreno
- Sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) formados por tres unidades de isopreno
- Diterpenos ( $C_{20}$ ) formados por cuatro unidades de isopreno
- Sesterterpenos ( $C_{25}$ ) formados por cinco unidades de isopreno
- Triterpenos ( $C_{30}$ ) formados por seis unidades de isopreno
- Politerpenos ( $C_n$ ) formados por  $n$  unidades de isopreno

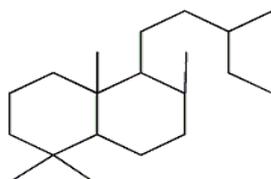
La figura 2 muestra algunos ejemplos de la clasificación de los terpenos.



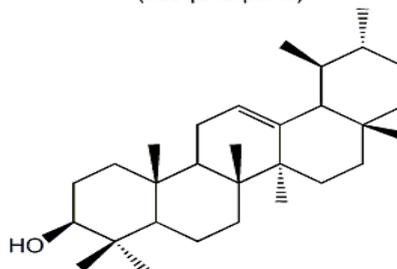
**α-pineno**  
(monoterpeno)



**farnesol**  
(sesquiterpeno)



**labdano**  
(diterpeno)



**α-amirina**  
(Triterpeno)

➤ Ruta biosintética:

Las unidades bioquímicas de isopreno pueden ser derivadas de dos rutas, una es por la ruta de intermediarios de ácido mevalónico (AMV) como se indica en la figura 3 y la otra es 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa, que según estudios recientes es probablemente el más usado en la naturaleza.

La ruta del ácido mevalónico consiste en que tres moléculas de acetil-coenzima A son usadas para formar el ácido mevalónico. Dos moléculas se combinan inicialmente en una condensación tipo Claisen para dar acetoacetil CoA, y una tercera es incorporada vía adición alcohólica estereo-específica dando el éster de cadena ramificada β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA (HMG-CoA).

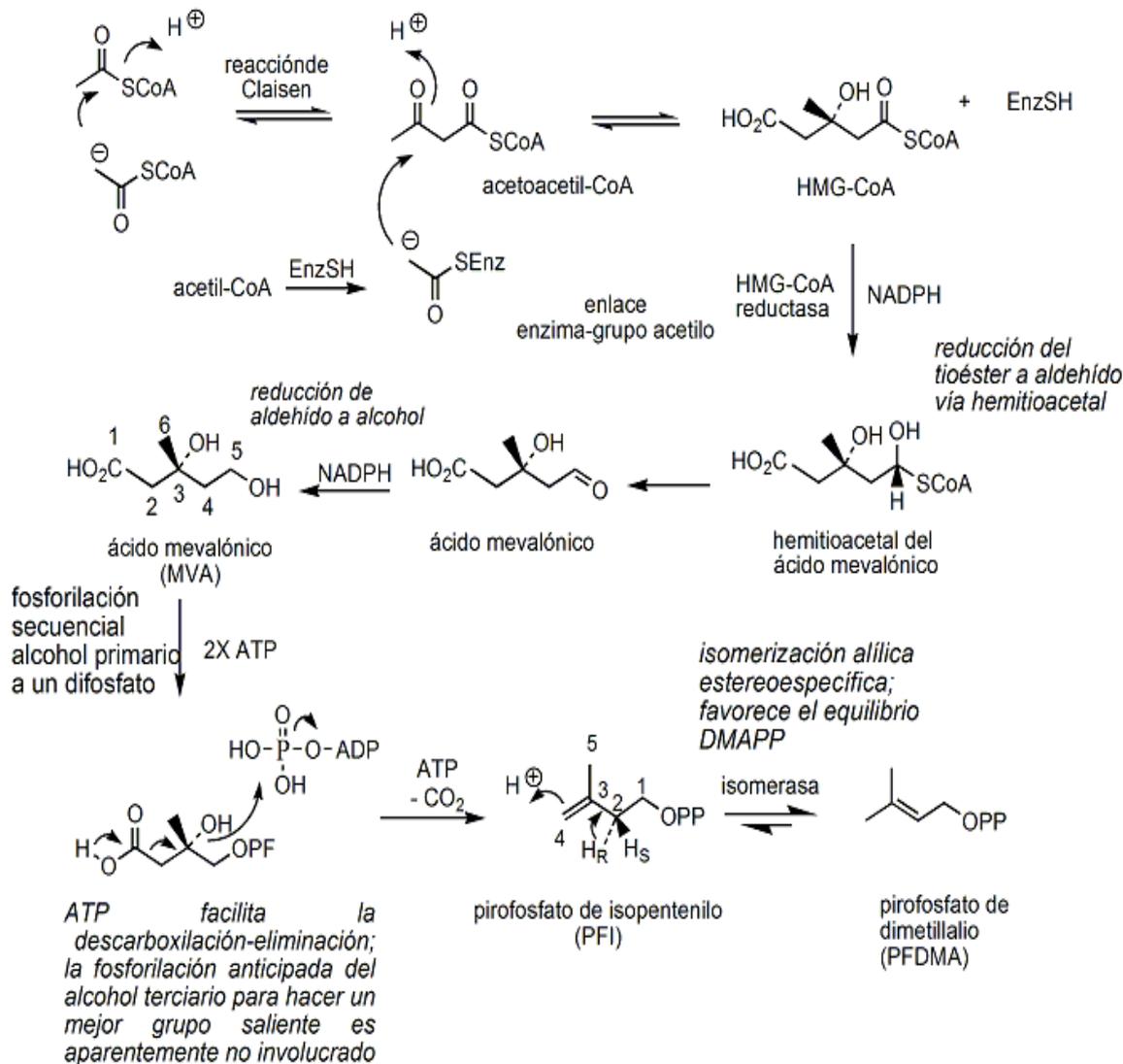


Figura 3. Ruta del ácido mevalónico. Biosíntesis de terpenos

La ruta del 5-fosfato de 1-desoxi-D-Xilulosa incluye a la ruta glicolítica con intermediarios de ácido pirúvico y el 3-fosfato de gliceraldehído, con la pérdida de carboxil-piruvato. Sin embargo, a pesar de que se tiene elucidada gran parte de esta ruta de biosíntesis, aún hay intermediarios por determinar.

Muchos organismos usan las dos rutas, pero los animales sólo usan la ruta de mevalonato porque aparentemente les falta el fosfato de desoxixilulosa.

Las plantas usan las dos rutas, así las enzimas de la ruta de mevalonato están localizadas en el citosol, mientras que las enzimas de la ruta del fosfato de desoxixilulosa han sido halladas en los cloroplastos.

---

Concordantemente, triterpenos y esteroides (productos del citosol) son formados por la ruta de mevalonato y otros terpenoides son formados en el cloroplasto y son derivados del fosfato de desoxixilulosa [28].

➤ Actividad biológica

Los terpenos tienen varias funciones, entre ellas se puede citar a los monoterpenos que inhiben la germinación de otras especies y así evitar la competencia. Otros ejemplos son los sesquiterpenos que actúan como insecticidas y las lactonas sesquiterpénicas que son reguladoras del crecimiento vegetal [29].

➤ Usos

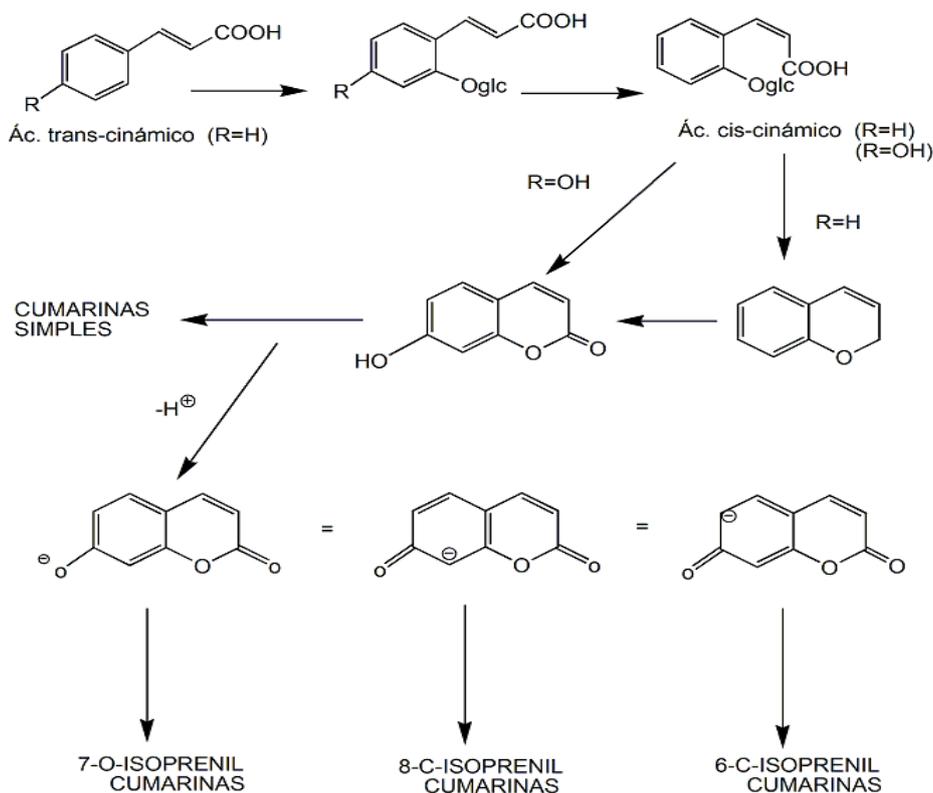
Los monoterpenos y sesquiterpenos se usan principalmente en la industria de la perfumería, se aíslan de hojas, flores y raíces. Los terpenos oxigenados generalmente de olor agradable aumentan el valor de los aceites esenciales. Algunos terpenos son intermediarios importantes de síntesis orgánicas y otros se usan como disolventes, por ejemplo, el aguarrás que es una mezcla de  $\alpha$ - y  $\beta$ - pinenos y se obtienen a partir de la corteza de pinos [29].

### 2.1.7. Cumarinas

El término cumarina se aplica, colectivamente a un gran número de compuestos que existen en la naturaleza y que poseen como núcleo a la 2H-1-benzopirano-2-ona. Muchas cumarinas que poseen el núcleo del benzopirano tienen un origen en la ciclización del ácido *cis*-cinámico oxigenado en la posición 2. Sin embargo, muchas cumarinas probablemente se formen de la mezcla ácido cinámico/ acetato vía (4-fenilcumarina) o totalmente del acetato (4-n-propilcumarina).

La cumarina, umbeliferona y herniarina, son cumarinas simples derivadas del ácido cinámico, las cuales han sido aisladas de muchas especies vegetales. Otras cumarinas presentan la adición de una unidad de 5 átomos de carbono originados del ácido mevalónico, generando cumarinas preniladas y sus derivados furano y piranocumarinas, las cuales son sustancias características de la familia *Umbeliferae* y *Rutaceae* [8, 30].

El ácido *trans*-cinámico formado de la desaminación de la fenilalanina sufre una oxidación en la posición *orto*, seguida de una glucosilación e isomerización al correspondiente ácido *cis*-cinámico. Una característica distintiva de las cumarinas aisladas de rutáceas, es que presentan una función oxigenada en el C-7, lo que sugiere que los ácidos *trans* y *cis para*-cumáricos son los precursores de las cumarinas aisladas de rutáceas, como se ilustra en el esquema 1 [31, 32, 33].



Esquema 1. Origen de las cumarinas simples

---

Las cumarinas han sido obtenidas de diversos órganos vegetales, desde raíces hasta flores y frutos. Su aislamiento se puede lograr a través del empleo sucesivo de disolventes de polaridad creciente. La mayoría de las cumarinas presentan fluorescencia azul cuando se les expone a la luz UV, las que tienen oxígeno en C-7 pueden exhibir fluorescencia con la luz visible. Dentro de las actividades biológicas que presentan las cumarinas, se ha encontrado una amplia variedad de efectos en animales, incluyendo efectos diuréticos, vasodilatadores y propiedades anticoagulantes. Finalmente, se ha encontrado que las furanocumarinas pueden inhibir la germinación de las semillas, otras han mostrado estimular el desarrollo de las plantas [30].

---

## CAPITULO III

### Metodología

#### 3.1.- Tipo de Investigación

El presente trabajo es una investigación experimental de tipo básico. La parte teórica consiste en la revisión de los antecedentes y el análisis de los resultados, y la parte experimental se refiere a las actividades prácticas en el laboratorio. Las sustancias que se aíslen y eluciden a partir de los extractos orgánicos de las especies *Esenbeckia nesiotica* y *E. ovata* son sustancias con actividad biológica potencial, por lo que los resultados de esta investigación podrían ser útiles para estudios subsecuentes.

#### 3.2.- Material Vegetal

Se colectó el material vegetal en el estado de Michoacán, México en el año 2007, el material fue colectado e identificado por la Biól. Clara Hilda Ramos y depositado en el Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México con la clave de Registro *E. nesiotica*: M-38567 y *E.ovata*: CH-27

#### 3.3.- Diseño Experimental

##### 3.3.1.- Diagrama del desarrollo de la parte experimental.

Se llevaron a cabo diversas actividades experimentales de acuerdo a los procedimientos convencionales sobre el análisis químico de material vegetal. Este procedimiento se resume en la figura 4.

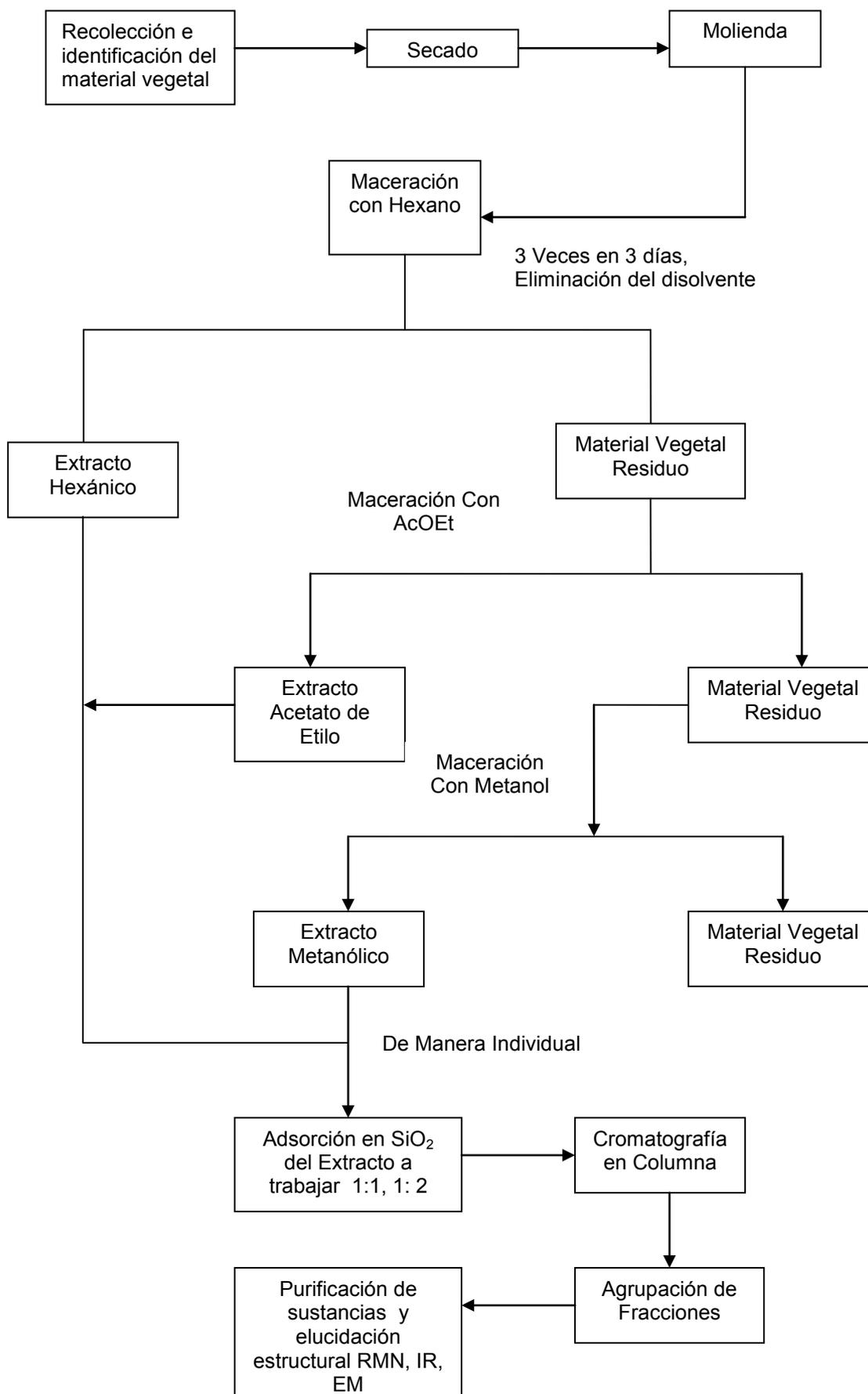


Figura 4. Diagrama del desarrollo de la investigación

---

### 3.3.2.- Cromatografía en columna a presión reducida

Este procedimiento se llevó a cabo en una columna de vidrio y se usó como fase estacionaria sílica gel MN Kieselgel 60 0.04-0.063mm/ 230-400 mesh y como fase móvil se usó mezclas de solventes en polaridad creciente *n*-hexano, *n*-hexano/AcOEt, AcOEt/Acetona. La longitud y radio de la columna pueden variar, de acuerdo a la cantidad de extracto que se requiere separar y el tipo de sílice que se emplee para llevar a cabo el fraccionamiento

### 3.3.3.- Cromatografía en capa fina (CCF)

Esta técnica cromatográfica se realizó en cromatofolios de aluminio TLC Sílica gel 60 F<sub>254</sub> de marca MERCK de 20 cm  $\times$  20 cm y 2 mm de espesor. Dependiendo del número de fracciones a analizarse comparativamente se cortan en dimensiones más pequeñas, las dimensiones utilizadas generalmente son de 3 cm  $\times$  5 cm, se dibujaron los frentes de elución dejando 5 mm en la parte superior e inferior, se aplicó la muestra con un capilar y se introdujo a una cámara que contenga el sistema de elución adecuado para la resolución de la mezcla. Las placas se observaron bajo una lámpara UV Spectroline modelo ENF-240 ( $\lambda$  254 nm y 365 nm), se revelan en una solución de sulfato cérico amoniacal [(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>] al 1% en ácido sulfúrico 2N.

### 3.3.4.- Punto de fusión

Esta determinación se realiza en un equipo de tipo Fisher-Jones de marca Cole-Parmer; se colocan unos pocos cristales de la muestra en un cubreobjetos y se observa el cambio de estado físico. Se realizan tres determinaciones en cada muestra a analizarse.

---

### 3.3.5.- Espectroscopia infrarroja (IR)

Los espectros se obtienen en un equipo FT-IR Nicolet Magna 750, la forma de obtención se especifica en cada espectro según la solubilidad de la muestra analizar.

### 3.3.6.- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C)

Este análisis se obtiene de un espectrómetro Varian modelo Unity 300 a 300 MHz y Varian modelo Unity plus 500 a 500 MHz, Se usa como disolvente CDCl<sub>3</sub>, piridina, MeOH para pruebas en 1D y 2D.

### 3.3.7.- Espectrometría de Masas

Estos espectros se obtienen en un espectrómetro de marca Jeol modelo JMS-AX505HA, usando la técnica de impacto electrónico con potencial y corriente de ionización de 70 eV y 100μA

## 3.4.- Parte Experimental del Análisis Químico de *Esenbeckia nesiotica* (Rutaceae)

### 3.4.1.- Obtención de los Extractos

1.1 Kg. de hojas secas de *E. nesiotica* fueron sometidas a maceración con *n*-hexano por tres días, el disolvente fue evaporado a presión reducida en un rota vapor obteniéndose un total de 45 g de extracto hexánico. La maceración con metanol del material vegetal previamente desengrasado permitió la obtención de 50.1 g de extracto metanólico.

### 3.4.2 Análisis del extracto hexánico de *E. nesiotica*

Se emplearon 45 g de extracto hexánico el cual se adsorbió en sílica gel en relación 1:1 (extracto - SiO<sub>2</sub>) 90 g de esta mezcla se aplicó a una columna (60 cm y 5.5 cm de diámetro) empacada con 232.8 g de sílica, eluyendo a presión reducida. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo usando como eluyente inicial hexano e incrementando la polaridad de forma gradual con mezclas de hexano, hexano - AcOEt, AcOEt, AcOEt – Acetona, de acuerdo al proceso cromatográfico. Se colectaron fracciones de 150 ml que posteriormente se concentraron a presión reducida.

Datos de elución de la columna de fraccionamiento primario

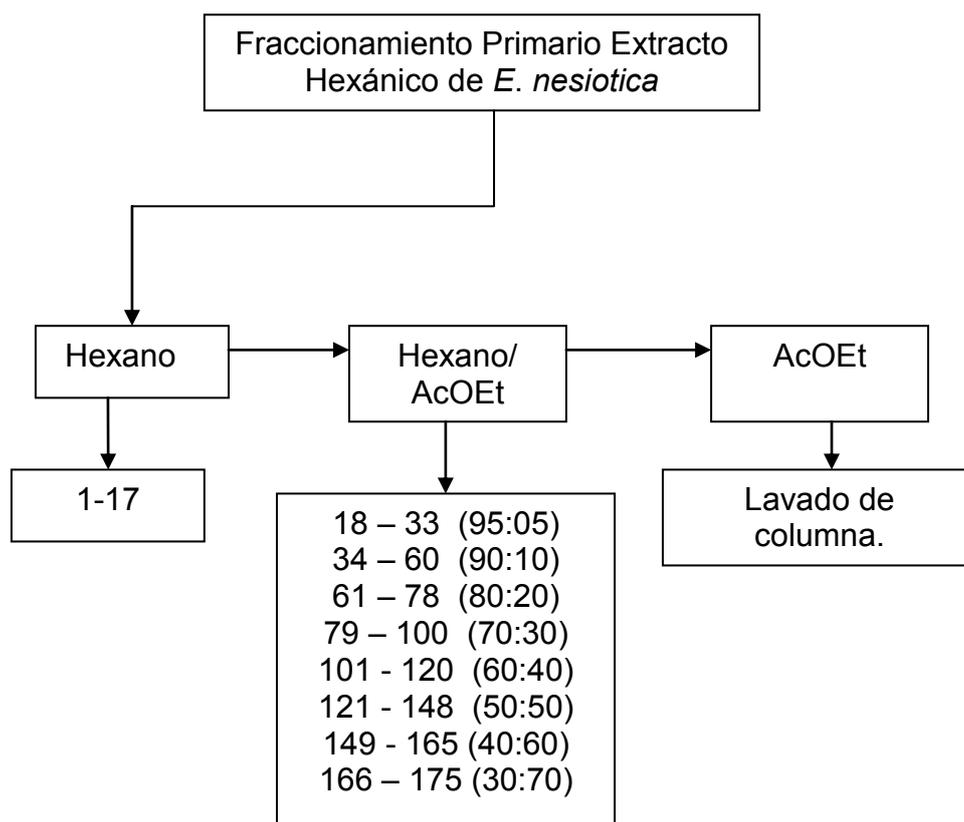


Figura 5. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto hexánico

Del fraccionamiento primario del extracto hexánico, se identificaron los siguientes compuestos:

Fracción	Compuesto identificado
01 - 22	$\beta$ -epóxido de cariofileno (22)
30 – 33	Isomultiflorenol (80)
45 – 54	$\beta$ – sitosterol (21)

Tabla 2. Componentes mayoritarios del extracto Hexánico de *E. nesiotica*

Posteriormente, se procedió a reunir las fracciones obtenidas de acuerdo a su similitud cromatográfica y comparación directa con sus componentes.

Tabla 3. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del extracto hexánico de *E.nesiotica*

Eluato	Fracción	Clave de identificación.
01-23	A	Ceras y E. nes - 01-23
23-30	B	Ceras y componentes volátiles
30-35	C	E. nes – 30-35
35-44	D	Ceras y componentes volátiles
45-54	E	E. nes – 45-54
55-60	F	Ceras y componentes volátiles
61-67	G	pigmentos
68-71	H	
71-83	I	
84-94	J	
94-110	K	

111-119	L
120-136	M
137-142	N
143-153	Ñ
154-157	O
158-175	P

La fracción denominada E. Nes 01–23 (1.2 g de muestra) fue analizada mediante una cromatografía en columna, para lo cual se adsorbió la mezcla en gel de sílice en proporción 1:1.5 y se aplicó en una columna de 40 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, esta columna fue empacada con 10.8 g de la SiO<sub>2</sub>. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo usando como eluyente hexano e incrementando la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-AcOEt.

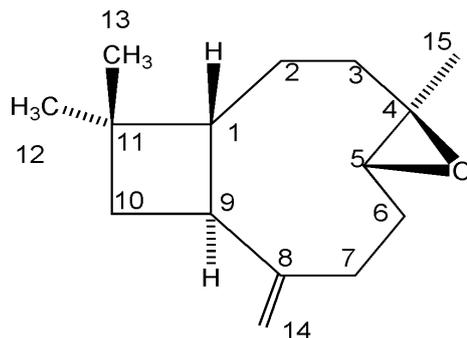
Se colectaron fracciones de 5 ml las cuales se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Número de fracciones obtenidas de la fracción E.nes -01-23

Eluyente	Proporción %	Fracciones
n-hexano	100	01 - 25
n-Hexano/AcOEt	98:02	26 – 44
n-Hexano/AcOEt	96:04	45 - 66
n-Hexano/AcOEt	95:05	67-88

### **β-epóxido de cariofileno (22).**

De las fracciones 76 – 88, obtenidas de eluir la columna E. nes 01 - 23 con una mezcla de hexano/AcOEt (95:05), se aislaron 27.5 mg (0.0025%) de una sustancia que resulto ser soluble en cloroformo, diclorometano y hexano. Esta sustancia aceitosa con olor dulce e incolora en CCF revelaba de color morado-azul, cuando se utilizaba como revelador químico sulfato cérico amoniacal.

 **$\beta$ -Epóxido de cariofileno (22)**

- Aceite incoloro (lit: [34, 35 y 36]).
- Rf: 0.32 ( hexano/ AcEOt (95:5))

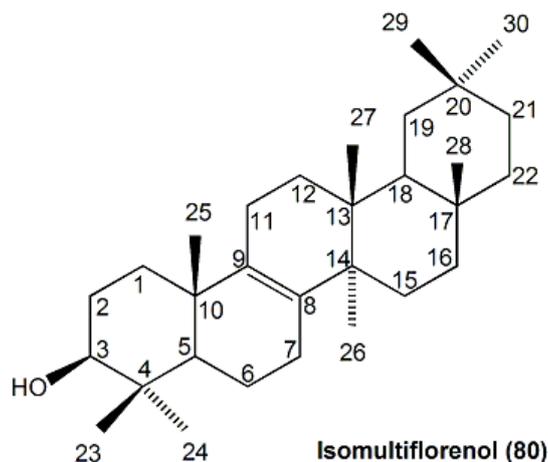
**IR**  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3 \text{ cm}^{-1}$ ). 2928, 2855, 1718, 1463, 1265.

**RMN- $^1\text{H}$**  (Espectro 1, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  4.86 (1H, d, J = 0.9, H-14a) ;  $\delta$  4.85 (1H, d, J = 0.9, H- 14b),  $\delta$  2.88 (1H, dd, J = 4.2, 10.65, H-5),  $\delta$  2.61 (1H, dd, J = 9.9, 9.6, H-9),  $\delta$  1.20 (3H, s, H-15),  $\delta$  1.00 (3H, s, H-12),  $\delta$  0.98 ( 3H, s, H-13).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (Espectro 2, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), 50.7 (C-1), 27.2 (C-2), 39.1 (C-3), 59.8 (C-4), 63.7 (C-5), 30.1 (C-6), 39.7 (C-7), 151.8 (C-8), 48.7 (C-9), 29.8 (C-10), 34.0 (C-11), 29.7 (C-12), 21.6 (C-13), 112.8 (C-14), 17.0 (C-15).

**Isomultiflorenol (80).**

De las fracciones nombradas como E. nes – 30 – 35, obtenidos al eluir la columna principal con una mezcla de hexano / AcOEt (90:10) se aislaron por medio de cristalización por par de disolventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  - MeOH) 58.6mg. (0.130 %) de un sólido cristalino de color blanco, soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CHCl}_3$  y que presentó un pf. 180 – 182 °C además de que esta sustancia revelaba en el cromatofolio de color rojo utilizando como revelador químico sulfato cérico amoniacal.



- Sólido cristalino en forma de agujas de color blanco. Pf.: 180-182°C, (lit. [37,38]).
- Rf: 0.48 ( hexano/ AcEOt (80:20))

**IR**  $\nu$  máx. (Espectro 3, KBr pastilla  $\text{cm}^{-1}$ ). 3288, 2919, 2850, 1467, 1376.

**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 4, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  0.80 (3H,s),  $\delta$  0.95 (9H,s),  $\delta$  0.98 (3H,s),  $\delta$  1.00 (3H,s),  $\delta$  1.05 (3H,s),  $\delta$  1.07 (3H,s),  $\delta$  3.23 (1H, dd, J = 4.2,11.4, H- $\alpha$ , H-3 $\alpha$ ).

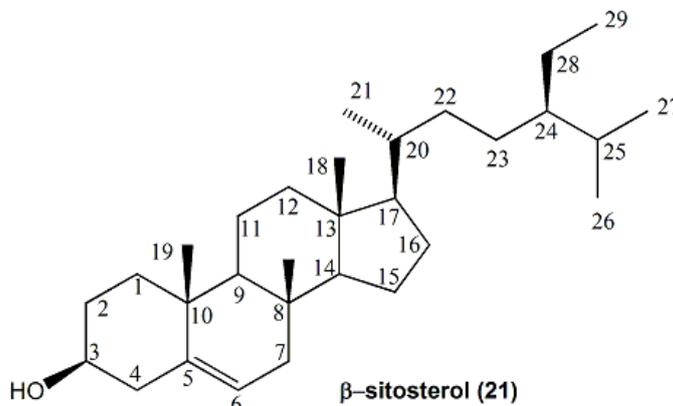
**RMN <sup>13</sup>C** (Espectro 5, 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), 34.38 (C-1), 26.29 (C-2), 79.03 (C-3), 38.81 (C-4), 50.69 (C-5), 19.24 (C-6), 27.50 (C-7), 135.08 (C-8), 133.50 (C-9), 37.60 (C-10), 20.81 (C-11), 30.67 (C-12), 37.28 (C-13), 40.99 (C-14), 27.92 (C-15), 36.70 (C-16), 30.79 (C-17), 44.11 (C-18), 34.18 (C-19), 28.32 (C-20), 36.7 (C-21), 35.02 (C-22), 28.05 (C-23), 15.60 (C-24), 19.82 (C-25), 18.98 (C-26), 24.67 (C-27), 31.50 (C-28), 34.54 (C-29), 32.98 (C-30).

**EM:** (Espectro 6) m/z (int.rel.) 426 [ $\text{M}]^+$  (65), 411 (42), 393 (10), 259 (100), 247 (55), 241 (48), 229 (52), 218 (42), 205 (85), 191 (34), 95 (75).

### **$\beta$ -sitosterol (21)**

De los eluatos nombrados como E. nes – 45 – 54, obtenidos de eluir la columna principal con una mezcla de hexano / AcOEt (90:10) se aislaron por

medio de cristalización por par de disolventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y Acetona) 0.3989g. (0.85 %) de una sustancia cristalina de color blanco, soluble en hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CHCl}_3$  y que presentó un punto de fusión de 130 – 132 °C.



- Sólido cristalino en forma de escamas de color blanco, pf. 130–132 °C., (lit.: [39, 40,41])
- Rf: 0.45 ( hexano/ AcEOt (85:15))

**IR**  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3 \text{ cm}^{-1}$ ). 3423, 2937, 2860, 1462, 1376, 1053.

**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 7, 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  0.68 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18),  $\delta$  1.00 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19),  $\delta$  0.82 (3H, t, 6.5 Hz,  $\text{CH}_3$ - 29),  $\delta$  0.85 (3H, d, 7.5 Hz,  $\text{CH}_3$ -21),  $\delta$  0.92 (6H, d, 6.5 Hz,  $\text{CH}_3$ -26, 27),  $\delta$  3.52 (1H, m, H-3),  $\delta$  5.35 (1H, m, H-6).

**RMN-<sup>13</sup>C** (espectro 8, 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), 37. 25 (C-1), 31.66 (C-2), 71.81 (C-3), 42.33 (C-4), 140. 77 (C-5), 121.71 (C-6), 31.92 (C-7), 32.00 (C-8), 50.15 (C-9), 36.52 (C-10), 21.09 (C-11), 39.77 (C-12), --- (C-13), 56.78 (C-14), 24.30 (C-15), 28.24 (C-16), 56.08 (C-17), 11.86 (C-18), 19.39 (C-19), 36.14 (C-20), 18.78 (C-21), 33.95 (C-22), 26.12 (C-23), 45.86 (C-24), 29.19 (C-25), 19.80 (C-26), 19.04 (C-27), 23.08 (C-28), 11.80 (C-29).

**EIMS: m/z (rel.int)** 414 [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup> (100), 396 (40), 303 (50), 273 (29), 255 (34), 213 (37), 159 (31), 145 (38), 107 (42), 95 (37), 55 (42), 43 (52)

### 3.4.3 Análisis del Extracto Metanólico de *Esenbeckia nesiotica*

El extracto metanólico (44.1 g) se adsorbió en sílica gel en relación 1:1 (extracto - SiO<sub>2</sub>). Este sólido (100 g) aplicó a una columna (33 cm de longitud y 6.5 cm de diámetro) empacada con 220 g de sílica y eluyendo a presión reducida. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo usando como eluyente inicial hexano e incrementando la polaridad de forma gradual con mezclas de hexano – AcOEt, AcOEt, AcOEt – Acetona, de acuerdo al proceso cromatográfico. Se colectaron fracciones de 125 ml que posteriormente se concentraron a presión reducida y se colocaron en viales de 10 ml.

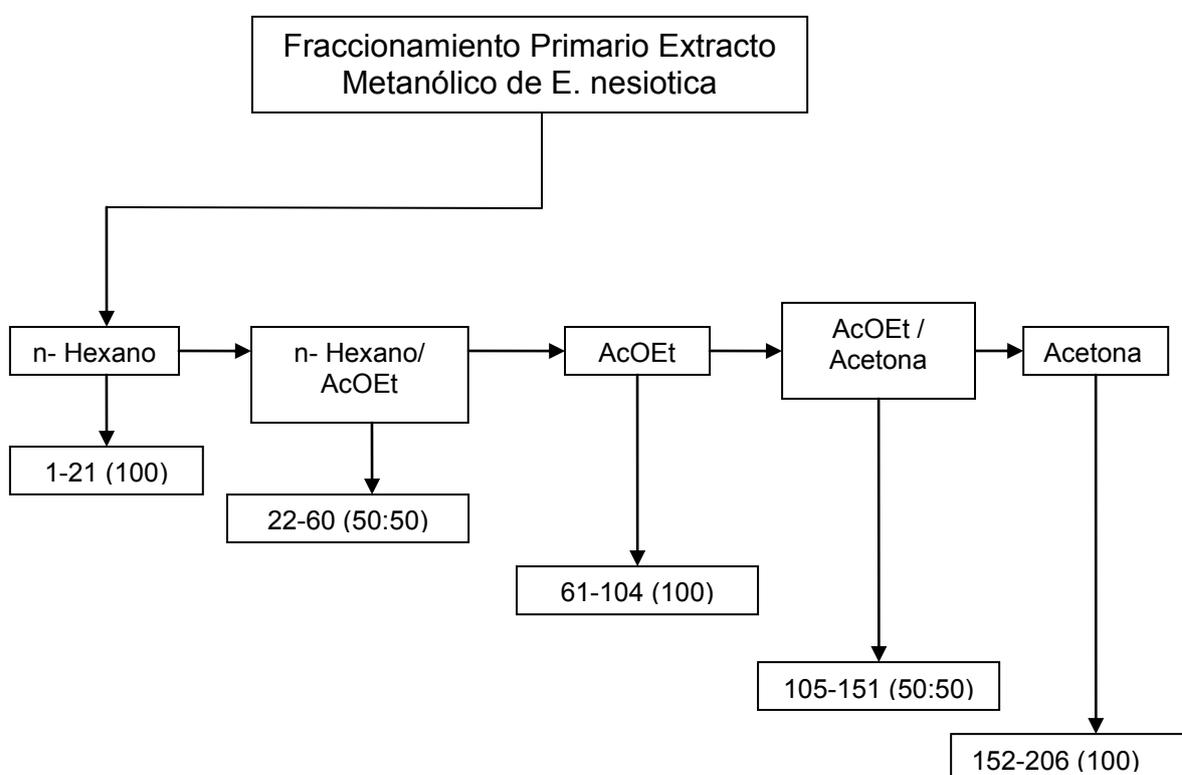


Figura 6. Diagrama del desarrollo de la investigación del extracto metanólico

Del fraccionamiento primario del extracto metanólico, se identificaron los siguientes compuestos:

Fracción	Compuesto identificado
103 - 111	$\beta$ -D-glucopiranosido de $\beta$ -sitosterilo (73)
144 - 206	Hesperidina (81)

Tabla 5. Componentes mayoritarios del extracto Metanólico de *E. nesiotica*

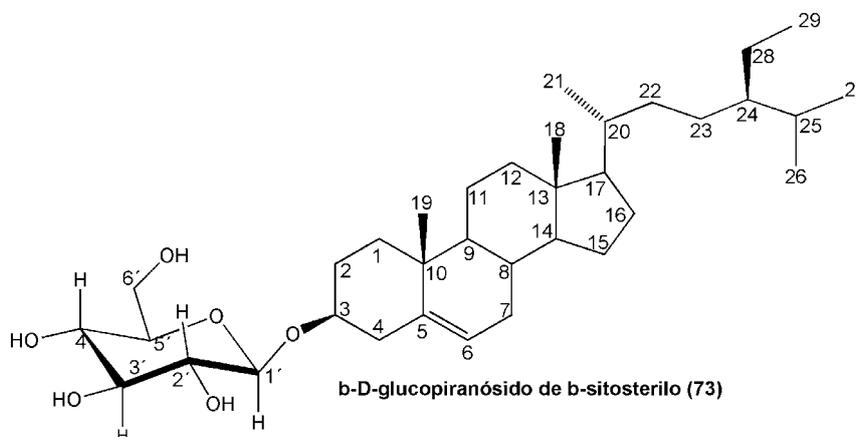
Terminado el fraccionamiento primario de este extracto se procedió a reunir los eluatos obtenidos en base a su similitud cromatográfica y comparación directa con sus componentes.

Tabla 6. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del Extracto Metanólico de *E. nesiotica*

Eluato	Fracción	Clave de identificación
01 – 31	A	
32 – 47	B	
48 – 57	C	
58 - 59	D	
60 – 67	E	
68 - 92	F	E.nesMeOH – 70 - 95
93 – 102	F	
103 – 111	F	
112 – 117	G	
118 – 123	H	
124 – 130	I	
131 – 137	J	
138 – 144	K	
145 – 151	L	
166	M	E.nesMeOH - 166
167 – 180	M	

**$\beta$ -D-Glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo (73).**

De las fracciones nombradas como E. nesMeOH – 70 – 95, obtenidos de eluir la columna principal con AcOEt (100 %) se aislaron por medio de cristalización con Acetona 50mg (0.11%), de una sustancia de aspecto polvoriento de color blanco, soluble en una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH que presentó un punto de fusión de mayor a 300 °C.



- Sólido amorfo de color blanco amarillento, pf. >300 °C, lit.: ([40, 42, 43])
- Rf: 0.52 (AcEOt / MeOH (90:10))

**IR**  $\nu_{\max}$  (Espectro 9, KBr pastilla  $\text{cm}^{-1}$ ). 3390, 2936, 2872, 1462, 1375, 1072, 1023.

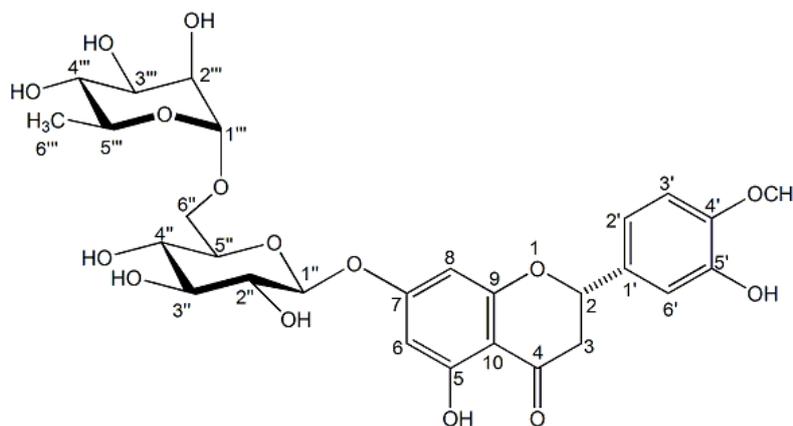
**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 10, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz)  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  0.64 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18),  $\delta$  0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19),  $\delta$  0.84 (3H, t, 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-29),  $\delta$  0.98 (6H, d, 6.5 Hz, CH<sub>3</sub>-26, 27),  $\delta$  4.42 (dd, H – 6'a, 5.5 Hz, 11.75 Hz),  $\delta$  4.56 (dd, H – 6'b, 2.5 Hz, 11.75 Hz),  $\delta$  5.0 (1H, d, 5.0 Hz, H-1'),  $\delta$  5.33 (1H, d, 5.0 Hz, H-6).

**RMN <sup>13</sup>C** (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 125 MHz)  $\delta$  (ppm) 37.52 (C-1), 30.30 (C-2), 78.15 (C-3), 39.99 (C-4), 140.98 (C-5), 121.95 (C-6), 32.11 (C-7), 32.21 (C-8), 50.39 (C-9), 36.98 (C-10), 21.32 (C-11), 39.39 (C-12), 42.54 (C-13), 56.87 (C-14), 24.55 (C-15), 28.57 (C-16), 56.30 (C-17), 12.01 (C-18), 19.46 (C-19), 36.43 (C-20), 19.05

(C-21), 34.26 (C-22), 26.46 (C-23), 46.09 (C-24), 29.53 (C-25), 19.25 (C-26), 20.00 (C-27), 23.44 (C-28), 12.19 (C-29), 102.63 (C-1'), 75.39 (C-2'), 78.52 (C-3'), 71.76 (C-4'), 78.66 (C-5'), 62.90 (C-6').

### Hesperidina (81)

De las fracciones nombradas como E. nesMeOH – 166, obtenidos de eluir la columna principal con acetona (100 %) y subsecuentemente de las fracciones 167 – 206 se aislaron por medio de cristalización con acetona 0.2303g (0.53%) de una sustancia de aspecto polvoriento de color blanco, soluble en piridina que presentó un punto de fusión de mayor a 300 °C.



**81**

- Sólido blanco de aspecto polvoriento, pf. > 300°C lit.: [44, 45,46].
- Rf: 0.75 (AcEOt / MeOH (60:40))

IR  $\nu_{\max}$  (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3474, 3422, 2920, 1647, 1132, 1071  $\text{cm}^{-1}$ ,

RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 11,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz).  $\delta$  1.54 (4H, d,  $J=6.0$  Hz, H-5''),  $\delta$  2.84 (1H, dd,  $J=17.0, 3.5$  Hz, H-3 ax),  $\delta$  3.2 (1H, dd,  $J=4.0, 17.0$  Hz, H-3 eq.),  $\delta$  3.71 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-O-C-4}'$ ),  $\delta$  4.59 (1H, d,  $J=10.5$  Hz, H-1'')  $\delta$  4.64 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-1'''),  $\delta$  5.55 (1H, dd,  $J=7.5, 2.5$  Hz, H-2),  $\delta$  6.48 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-8),  $\delta$  6.59 (1H, d,  $J=2.5$  Hz, H-6),  $\delta$  6.96 (1H, d,  $J=8.0$  Hz, H-2'),  $\delta$  7.08 (1H, dd,  $J=1.5, 8.0$  Hz, H-6'),  $\delta$  12.46 (1H, s, 5-OH).

---

**RMN <sup>13</sup>C** (Espectro 12, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 Hz). δ (ppm) 197.03 (C-4), 164.45 (C-5), 166.46 (C-7) 163.45 (C-9), 149.08 (C-4'), 148.40 (C-3'), 132.14 (C-1'), 118.09 (C-6'), 115.27 (C-2'), 112.33 (C-5'), 101.52 (C-1''), 104.32 (C-10), 97.69 (C-6), 96.43 (C-8), 79.45 (C-3''), 78.41, (C-2), 77.51 (C-5''), 74.56 (C-2''), 74.06 (C-4''), 72.73 (C-3'''), 102.43 (C-1'''), 72.07 (C-2'''), 71.26, (C-4''), 69.77 (C-5'''), 67.36 (C-6''), 43.13 (C-3), 18.54 (C-6'''), 55.90 (OCH<sub>3</sub>).

**EIMS m/z (int. rel.):** (Espectro 13), 594 [M]<sup>+</sup> (5), 516 (2), 439 (15), 395 (30), 313 (56), 277 (93), 265 (100), 220 (72), 200 (39), 188 (35), 137 (20).

### **3.5.-Parte experimental de *Esenbeckia ovata* Kunth (Rutaceae)**

#### **3.5.1.- Obtención de los Extractos**

1.2 Kg de hojas secas de *E. ovata* Kunth fueron extraídas por maceración con *n*-hexano por tres días, sucesivamente por tres ocasiones. El disolvente fue evaporado a presión reducida obteniéndose 28 g de residuo. Terminada la maceración con hexano se procedió a la obtención del extracto de acetato de etilo por medio del mismo procedimiento, obteniéndose 31.3 g de extracto correspondiente. Posteriormente, se procedió a realizar una cromatografía en placa fina comparativa entre los extractos de hexano y de AcOEt para observar su similitud. Este análisis permitió concluir que prácticamente se trataba de extractos de composición muy similar, por lo que se decidió reunirlos. El peso total del extracto fue de 59.3g. Finalmente al material vegetal se le realizaron dos maceraciones con metanol obteniéndose 50.1 g de extracto metanólico.

#### **3.5.2 Análisis del extracto hexánico- acetato de etilo de *Esenbeckia ovata***

El extracto (59 g) fue adsorbido en sílica gel en relación 1:1 (extracto - SiO<sub>2</sub>), y el sólido se aplicó a una columna de 35 cm de longitud y 6.5 cm de diámetro, empacada a presión reducida con 280 g de sílica. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo usando como eluyente inicial hexano y se incrementó la polaridad de forma gradual con mezclas de hexano - AcOEt, para

concluir con AcOEt como eluyente, de acuerdo al proceso cromatográfico. Se colectaron fracciones de 120 ml que posteriormente se concentraron a presión reducida.

Datos de elución de la columna de fraccionamiento primario de las hojas de  
*E. ovata* Rutaceae

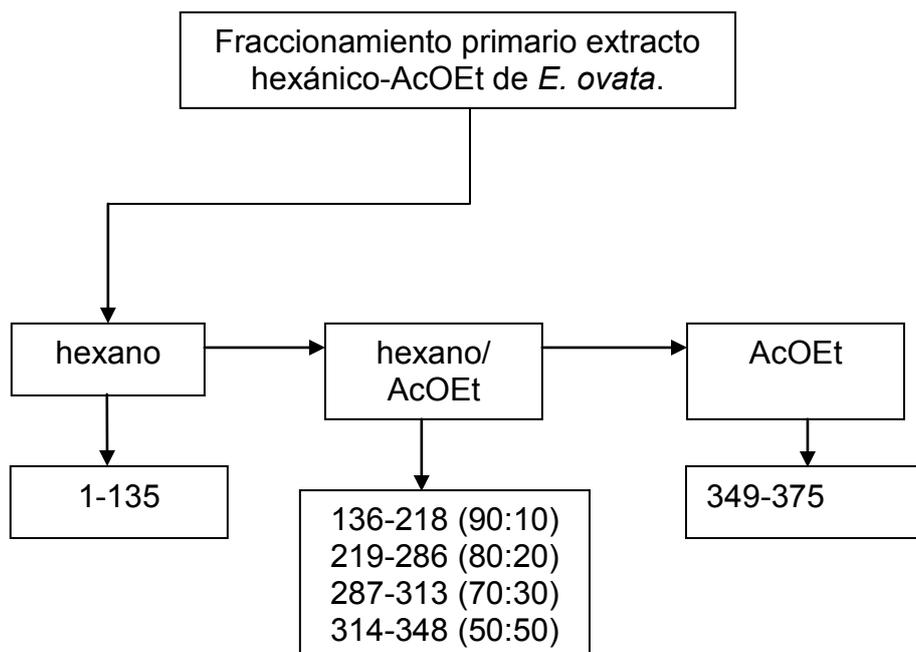


Figura 7. Diagrama del desarrollo del fraccionamiento del extracto de hexano-AcOEt.

Del fraccionamiento primario arriba descrito, se identificaron los siguientes compuestos:

Fracción	Compuesto identificado
22 - 96	$\beta$ -epóxido de cariofileno (22)
22 - 55	Ciclobalanona (82)
110 - 135	Cicloneolitsol (83)
150 - 153	$\beta$ - sitosterol (21)
175 - 200	Isopimpinlina (10)
175 - 200	Bergapteno (9)

Tabla 7. Componentes mayoritarios del extracto de *n*-hexano-AcOEt de *E. ovata*.

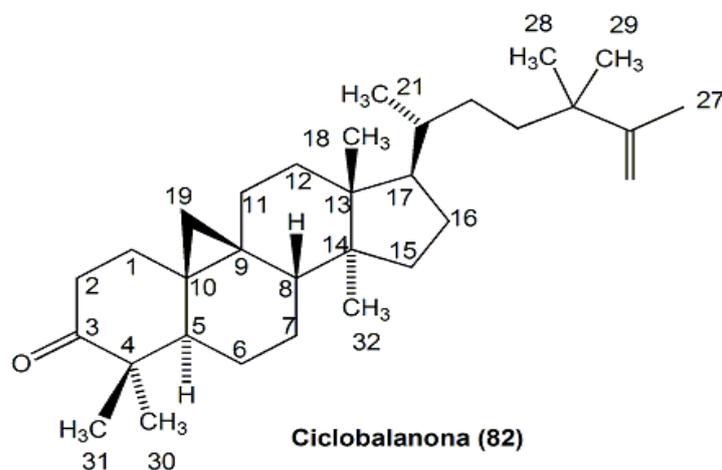
Las fracciones obtenidas del fraccionamiento primario fueron reunidas en base a su similitud cromatográfica y comparación directa con sus componentes.

Tabla 8. Fracciones reunidas después del primer fraccionamiento del extracto hexano-AcOEt de *E.ovata*

Eluato	Fracción	Clave de identificación.
1-5	A	
6-10	B	
11-16	C	
22-55	D	E.ova-22-55
56-70	E	
71-80	F	
81-93	G	
94-109	H	
110-140	I	E.ova-110-135
141-149	J	
150-166	K	E.ova-150-153
167-171	L	
172-202	M	E. ova-175-188 E.ova-175-200
203-208	N	
207-211	O	
215-244	P	
229-250	Q	
251-264	R	
266-290	S	
291-296	T	
297-316	U	
317-325	V	
326-347	W	

**Ciclobalanona (82)**

De las fracciones nombradas como E. ova-22-55, obtenidos de eluir la columna principal con hexano (100 %) se obtuvo un residuo, el cual, por adición de acetona, se precipitó un sólido de naturaleza lipídica, y en las aguas madres permaneció la sustancia por aislar. Esta sustancia fue cristalizada por de disolventes (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH), obteniéndose 0.125 g (0.21%) de una sustancia en forma de agujas de color blanco, soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, y piridina, pf 166-168°C que corresponde a **82**.



- Sólido cristalino en forma de agujas de color blanco, pf.: 166-168°C. lit.: [47,48]
- Rf: 0.5 (hexano/ AcEOt (70:30))

**IR**  $\nu_{\max}$  (Espectro 13, CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>). 2959, 2867, 1709, 1450, 1378, 1111, 887.

**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 14, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  0.57 (1H, d, 3.9 Hz, H-19),  $\delta$  0.78 (1H, d, 3.9 Hz, H-19),  $\delta$  0.86 (3H, d, 6.9 Hz, 21-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  0.89 (3H, s, 30-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  0.98 (3H, s, 18-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.02 (3H, s, 31-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.04 (3H, s, 32-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.10 (3H, s, 28-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.25 (3H, s, 29-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  1.69 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  2.32 (1H, m, H-2 $\beta$ ),  $\delta$  2.71 (1H, m, H-2 $\alpha$ ),  $\delta$  4.66 (1H, brs, H-26),  $\delta$  4.72 (1H, brs, H-26).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (Espectro 15, 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm), 33.41 (C-1), 37.30 (C-2), 216.67 (C-3), 50.23 (C-4), 48.42 (C-5), 21.49 (C-6), 28.10 (C-7), 47.88 (C-8), 21.08 (C-9), 25.94 (C-10), 25.86 (C-11), 35.55 (C-12), 45.25 (C-13), 48.49 (C-14), 32.71 (C-15), 26.70 (C-16), 52.09 (C-17), 18.03 (C-18), 29.69 (C-19), 36.56 (C-20), 18.43 (C-21), 30.67 (C-22), 37.48 (C-23), 38.70 (C-24), 152.37 (C-25), 109.30 (C-26), 19.41 (C-27), 22.16 (C-28), 20.76 (C-29), 19.29 (C-30), 27.23 (C-31), 27.52 (C-32).

**EIMS:** m/z (int.rel.) (Espectro 16) 452  $[\text{M}]^+$  (87), 437 (25), 313 (50), 175 (30), 147 (35), 121 (50), 95 (82), 83 (75), 55 (100), 41 (54).

La cromatografía comparativa de las aguas madres de las fracciones 22-55 y de los eluatos 56-96 determinó que la mayoría de los componentes de estas fracciones eran semejantes entre sí, por lo que se procedió a reunirlos. Esta fracción fue denominada E.ova-22-96.

E.ova-22-96 (2.0 g de muestra) fue separada en sus componentes mediante una cromatografía en columna, para lo cual se adsorbió la mezcla en gel de sílice en proporción 1:1.5 y se aplicó en una columna de 15 cm de longitud y 1.0 cm de diámetro empacada con 12.6 g de la  $\text{SiO}_2$ , como se describió anteriormente. El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo usando como eluyente hexano e incrementando la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-AcOEt.

Se reunieron fracciones de 5 ml las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina. El número de fracciones realizadas se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Eluatos obtenidos de la fracción E.ova -22-96.

Eluyente	Proporción %	Fracciones
hexano	100	01 - 28
hexano/AcOEt	98:02	29 - 43
hexano/AcOEt	96:04	44 - 52

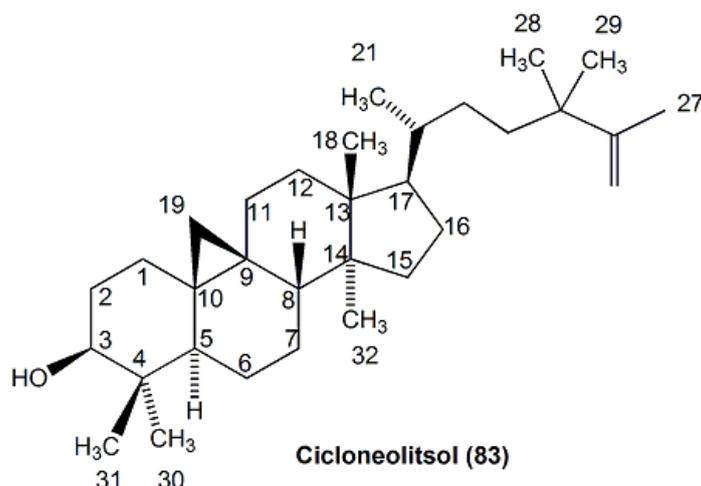
hexano/AcOEt	95:05	67-88
hexano/AcOEt	90:10	89-109
hexano/AcOEt	80:20	109-123
hexano/AcOEt	70:30	124-155

### $\beta$ -epóxido de cariofileno (22)

De las fracciones 23-49, obtenidas de eluir la columna E. ova-22-96 con una mezcla de hexano/AcOEt (98:02), se aislaron 31.3 mg (0.053%) de una sustancia soluble en cloroformo, diclorometano y hexano. Es una sustancia aceitosa con olor dulce e incolora en CCF, la cual muestra una mancha color morado-azul al revelar la cromatoplaca analítica con sulfato cérico amoniacal. Esta sustancia fue identificada como el  $\beta$ -epóxido de cariofileno (22).

### Cicloneolitsol (83)

De las fracciones 110 -135 de la columna principal (obtenidas al eluir la columna principal con hexano), se obtuvo de un sólido blanco en forma de agujas (50 mg, 0.084%), soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , e insoluble en acetona. Este metabolito fue purificado mediante cristalización por par de disolventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Acetona) y presentó punto de fusión de 170-172 °C.



- Sólido cristalino de color blanco, pf.: 166-168° C. (lit.: [47,48])
- Rf: 0.45 (hexano/ AcEOt (70:30))

---

**IR**  $\nu_{\max}$ , (Espectro 17,  $\text{CHCl}_3$   $\text{cm}^{-1}$ ), 3397, 2958, 2927, 2858, 1451, 1378, 1009, 739.

**RMN  $^1\text{H}$**  (Espectro 18,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  0.32 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-19), 0.55 (1H, d,  $J = 4.2$  Hz, H-19), 0.80 (3H, s, 28- $\text{CH}_3$ ), 0.85 (3H, d,  $J = 6.6$ , 21- $\text{CH}_3$ ), 0.88 (3H, s, 30- $\text{CH}_3$ ), 0.95 (3H, s, 18- $\text{CH}_3$ ), 0.96 (3H, s, 29- $\text{CH}_3$ ), 1.010 (3H, s, 31- $\text{H}_3$ ), 1.014 (3H, s, 32- $\text{CH}_3$ ), 1.68 (3H, dd,  $J = 0.6, 2.1$  Hz, 27- $\text{CH}_3$ ), 3.28 (1H, dd,  $J = 4.5, 10.8$  Hz, H-3), 4.65 (1H, dd,  $J = 1.8, 0.6$  Hz, H-26), 4.71 (1H, m, H-26).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 Hz), 152.41 (C-25), 109.26 (C-26), 78.86 (C-3), 52.16 (C-17), 48.81 (C-14), 47.95 (C-8), 19.39 (C-9), 47.13 (C-5), 45.27 (C-13), 40.49 (C-4), 38.72 (C-24), 37.41 (C-23), 36.60 (C-20), 35.58 (C-12), 32.89 (C-15), 31.97 (C-1), 30.77 (C-22), 30.40 (C-2), 29.68 (C-19), 28.11 (C-7), 27.50 (C-31), 27.22 (C-32), 27.22 (C-16), 26.51 (C-10), 26.14 (C-11), 25.43 (C-28), 21.11 (C-6), 20.05 (C-27), 19.31 (C-30), 18.45 (C-21), 17.96 (C-18), 13.98 (C-29).

**EIMS**  $m/z$  (int. rel.) (Espectro 19), 454  $[\text{M}]^+$  (30), 421 (72), 314 (37), 175 (58), 107 (64), 83 (98), 55 (100), 30 (60)

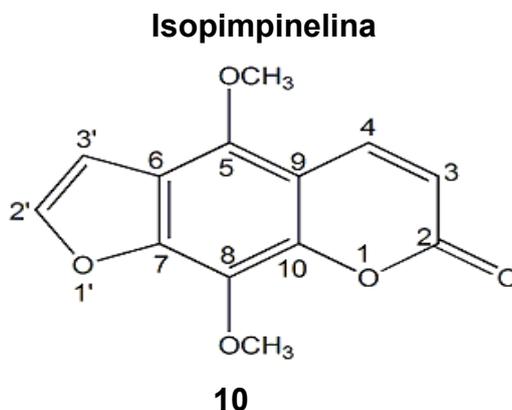
### **$\beta$ -sitosterol (21)**

De las fracciones 150–153 de la columna principal (obtenidas con una mezcla de *n*-hexano/AcOEt (90:10)), se aisló un sólido blanco cristalino, con *pf.* 130–132°C. Los datos espectroscópicos permitieron confirmar que se trataba de  $\beta$  – sitosterol (21)

### **Isopimpinina (10)**

De las fracciones 175-200 de la columna principal (eluidas hexano-Acetato de etilo (80:20)) se obtuvo (0.105 g (0.117%)) de un sólido de color amarillo que revela del mismo color cuando se le hace incidir luz ultravioleta de onda corta. Este sólido fue purificado por medio cristalización por par de disolventes

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-éter isopropílico). Esta sustancia muestra una mancha roja en cromatoplaaca analítica al ser revelada con sulfato cérico amoniacal, la cual se transforma a amarillo con el paso del tiempo. p.f. 186-187° C. esta sustancia fue identificada como isopimpinelinea (**10**).



- Sólido cristalino en forma agujas de color amarillo, pf. 186-187° C. (lit.: [49,50])
- Rf: 0.47 (hexano/ AcEOt (70:30))

**IR**  $\nu$  máx. (Espectro 20, CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>), 2945, 2846, 1727, 1591, 1477, 1400, 1148, 1101, 1001, 866.

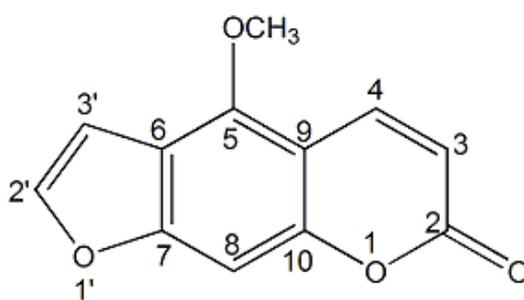
**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 21, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm), J (Hz);  $\delta$  4.16 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> X 2),  $\delta$  6.28 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-3),  $\delta$  6.99 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3'),  $\delta$  7.62 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'),  $\delta$  8.12 (1H, d, 9.6 Hz, H-4).

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm), 160.38 (C-2), 150.01 (C-7), 145.09 (C-2'), 144.29 (C-5), 143.74 (C-9), 139.31 (C-4), 128.30 (C-8), 114.89 (C-6), 112.92 (C-3), 107.72 (C-10), 105.05 (C-3'), 61.68 (C-8-OMe), 60.85 (C-5-OMe).

**EIMS** (Espectro 22) m/z (int. rel.) 246 [M<sup>+</sup>] (100), 231 (95), 203 (15), 188 (15), 175 (14), 160 (13), 147 (10), 104 (5), 76 (4).

## Bergapteno (9)

Las aguas madres obtenidas del aislamiento de la isopimpineline (10) fueron reunidas y el análisis por cromatografía en capa fina mostró una mancha azul bajo luz ultravioleta (onda corta y larga). A partir de este material se obtuvo bergapteno (9, 0.147 g, 0.25%) como un sólido que soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, e insoluble en metanol, por lo que su purificación se realizó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH. El bergapteno (9) presentó p.f. 189-191 °C.



9

- Sólido cristalino de color blanco, pf. 189-191° C.(lit.: [49,50])
- Rf: 0.4 (hexano/ AcEOt (70:30))

**IR**  $\nu$  máx. (Espectro 23, CHCl<sub>3</sub> cm<sup>-1</sup>). 3036, 2949, 2850, 1726, 1628, 1584, 1472, 1351, 1153, 1129, 1077, 827.

**RMN-<sup>1</sup>H** (Espectro 24, 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  8.16 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-4), 7.59 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-2'), 7.13 (1H, s, H-8), 7.03 (1H, d,  $J$  = 2.4 Hz, H-3'), 6.27 (1H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-3), 4.27 (3H, s, 5-OMe)

**RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm),  $\delta$  161.25 (C-2), 152.7 (C-9), 149.57 (C-5), 144.78 (C-2'), 139.27 (C-4), 112.65 (C-6), 112.54 (C-3), 106.40 (C-10), 105.03 (C-3'), 93.84 (C-8), 60.08 (C-5-OMe).

**EIMS** (Espectro 25)  $m/z$  (int. rel.): 216 [M<sup>+</sup>] (100), 201 (30), 188 (15), 173 (55), 145 (28), 89 (10), 28 (25).

### 3.5.3.- Fraccionamiento del extracto metanólico de *Esenbeckia ovata*

El extracto metanólico (50 g) fue adsorbido en sílica gel (50 g). El sólido se aplicó a una columna (50 cm de longitud y 6.5 cm de diámetro) empacada con sílice (400 g). El desarrollo de la cromatografía se llevó a cabo a presión reducida usando como eluyente hexano e incrementando la polaridad con mezclas de hexano – AcOEt, AcOEt y AcOEt – Acetona, de acuerdo al proceso cromatográfico. Se colectaron fracciones de 150 ml que posteriormente se concentraron a presión reducida.

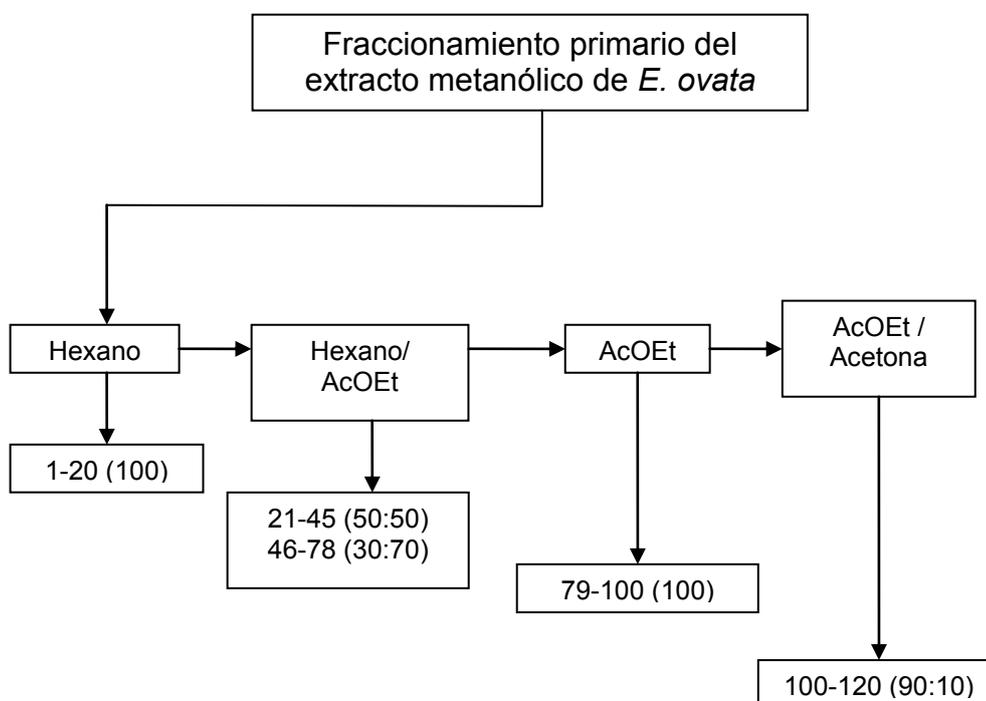


Figura 8. Diagrama del fraccionamiento del extracto Metanólico.

Del fraccionamiento primario del extracto metanólico, se identificaron los siguientes compuestos:

Fracción	Compuesto identificado
21-28	Isopimpinolina ( <b>8</b> )
89-111	$\beta$ -D-glucopiranosido de $\beta$ -sitosterilo ( <b>73</b> )

Tabla 10. Componentes mayoritarios del extracto metanólico de *E. ovata*Tabla 11. Fracciones obtenidas del primer fraccionamiento del Extracto  
Metanólico de *E. ovata*

Eluato	Fracción	Clave de identificación
1-5	A	
6-15	B	
16-20	C	
21-28	D	Isopimpinolina
29-31	E	
32-38	F	
39-48	G	
49-52	H	
54-56	I	
57-63	J	
64-68	K	
69-73	L	
74-80	M	
81-82	N	
83-86	O	
89-113	P	E.ovaOH-89-113
114-120	Q	

 **$\beta$ -D-Glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo (73).**

De las fracciones E. ovaOH – 89 – 100, obtenidas de la columna principal (al eluir con AcOEt (100 %)) se aisló por medio de cristalización de acetona un sólido blanco de aspecto polvoriento, soluble en una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH y en piridina, p.f. > 300 °C, que corresponde a **73** (65 mg, 0.130%).

---

### 3.6 Actividad citotóxica

Se realizaron pruebas de citotoxicidad con diferentes líneas celulares cancerosas humanas U251 (glía de sistema nervioso central), PC-3 (próstata), HCT-15 (colon), MCF-7 (mama), SKLU (pulmón), de acuerdo a los procedimientos aceptados para este ensayo. Específicamente se empleó la prueba del colorante sulforrodamina B, el cual es un colorante aniónico que se une a proteínas previamente precipitadas con ácido tricloroacético de células que se cultivan controladamente. Los resultados obtenidos se muestran en la parte de discusión de resultados.

---

## CAPITULO IV

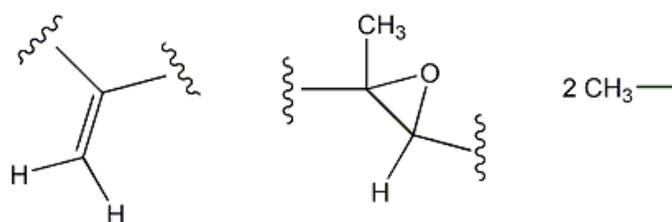
### 4. Discusión de resultados.

En este capítulo se describirá la elucidación estructural de los metabolitos secundarios aislados, mediante la integración de los resultados de los análisis físicos, espectroscópicos y espectrométricos. Las estructuras caracterizadas se encuentran informadas en la literatura, y se incluyen las referencias pertinentes. Para facilitar esta discusión, se dividieron las estructuras en grupos de terpenos, glucósidos y cumarinas. Los detalles del aislamiento y los rendimientos obtenidos de cada sustancia se encuentran descritos en el capítulo correspondiente a metodología y parte experimental.

#### 4.1 TERPENOS

##### 4.1.1 $\beta$ -Epóxido de cariofileno.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de esta sustancia se observan señales que determinan la presencia de hidrógenos vinílicos ( $\delta$  4.97 (1H, s) y 4.85 (1H, d,  $J = 0.9$  Hz)) que corresponden presumiblemente a un exometileno, ya que se observan las señales correspondientes en RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  151.8 y 112.7). También se aprecia una señal doble de doble en  $\delta$  2.88 (1H, dd,  $J = 4.2, 10.6$ ), y este desplazamiento a campo bajo sugiere que se trata de un metino unido tentativamente a oxígeno. Esto se comprueba por el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , el cual muestra las señales en  $\delta$  59.8 y 63.7, definiendo la presencia de un epóxido trisustituido. También se deduce la presencia de 3 metilos, ya que se observan tres singuletes ( $\delta$  0.98, 1.0, 1.20), donde esta última señal es atribuible a un metilo unido a un carbono de epóxido. Esta discusión permite establecer los siguientes fragmentos estructurales (Esquema 2)



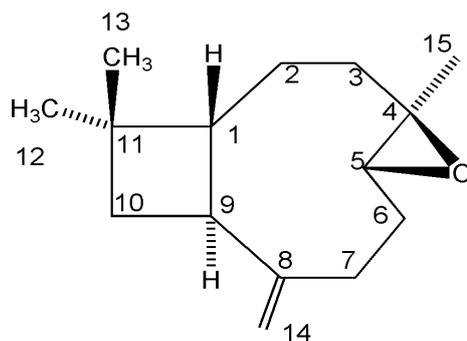
Esquema 2. Fragmentos estructurales propuestos.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostró la presencia de quince átomos de carbono, de los cuales tres son metilos, seis metilenos, tres metinos y tres cuaternarios, lo cual establece la fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}$ , la cual tiene cuatro grados de insaturación, y confirma los fragmentos arriba descritos. Considerando que el doble enlace y el epóxido constituyen dos insaturaciones, la estructura debe poseer dos ciclos para cumplir con cuatro insaturaciones. Estas evidencias sugieren al epóxido de cariofileno, una sustancia frecuentemente encontrada como producto natural, como una estructura plausible. Se encuentran reportados en la literatura los dos estereoisómeros:  $\beta$ - y  $\alpha$ - epóxido de cariofileno. La comparación directa de los datos disponibles en la literatura [34] permiten confirmar que esta sustancia se trata del  $\beta$ -epóxido de cariofileno. La tabla 13 muestra la comparación de los datos de RMN  $^{13}\text{C}$ , los cuales confirman la estructura.

Tabla 13. Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **22** ( $\beta$ -epóxido de cariofileno) con los informados en la literatura [34].

carbono	75 MHz ( $\text{CDCl}_3$ )	67.5 MHz [34]
1	50.7	50.9
2	27.2	27.3
3	39.1	39.2
4	59.8	59.7
5	63.7	63.7

6	30.1	30.3
7	39.7	39.8
8	151.8	151.8
9	48.7	48.8
10	29.8	29.9
11	34.0	34.0
12	29.7	29.9
13	21.6	21.6
14	112.7	112.8
15	17.0	17.0

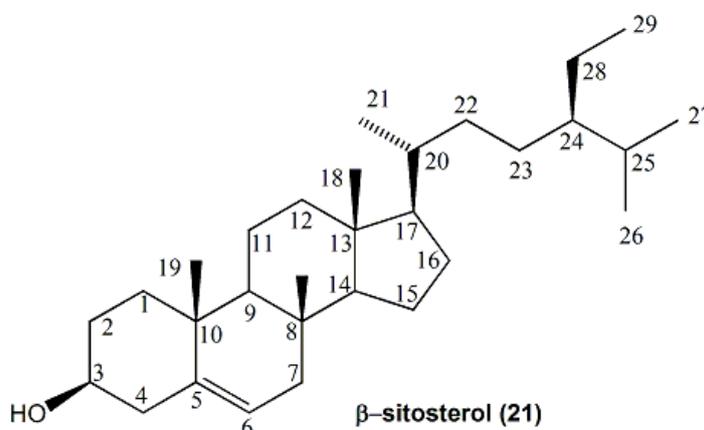


**$\beta$ -Epóxido de cariofileno (22)**

#### 4.1.2 $\beta$ -Sitosterol

Esta sustancia se aisló de *E. nesiotica* y *E. ovata*, y mostró el aspecto físico usual en los fitoesteroles, que es un sólido de p. f. 131-133 °C en forma de agujas o escamas. A continuación se mencionan las principales bandas en su espectro de IR y datos espectroscópicos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Su espectro de IR ( $\text{CHCl}_3$ ) presenta como bandas en  $3423\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al hidroxilo y bandas en  $2937$  y  $2860\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a metilos y metilenos. También se observa una banda en  $1462\text{ cm}^{-1}$  que puede atribuirse como característica a ciclohexano, y que también es localizable en los espectros de infrarrojo de otras sustancias aisladas en este trabajo.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) muestra el perfil típico de un fitoesterol. En particular, se observa en  $\delta$  3.23 una señal múltiple que integra para un hidrógeno, correspondiente al hidrógeno geminal al hidroxilo (H-3); en  $\delta$  5.35 se observa una señal amplia que integra para un hidrógeno que corresponde al hidrogeno vinílico H-6. A campo alto ( $\delta$  0.68 - 1.00) se pueden apreciar señales singuletes que corresponden a los metilos H-18, H-19, y el perfil del espectro muestra gran similitud con los espectros de muestras de  $\beta$ -sitosterol aisladas en nuestro laboratorio. La comparación con los datos informados en la literatura [39,40,41] está de acuerdo con esta propuesta estructural. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se observan las 29 señales esperables, de las cuales seis son metilos, once son metilenos y nueve metinos. Mediante el experimento DEPT es posible la identificación de tres 3 carbonos cuaternarios. El espectro de masas muestra el ion molecular en  $m/z$  414, correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ , lo cual confirma, sin lugar a dudas, de que esta sustancia es el  $\beta$ -sitosterol (**21**).



#### 4.1.3 Isomultiflorenol

Esta sustancia se aisló de *E. nesiotica* como un sólido blanco pf. 180-182°C. El espectro de IR (KBr, pastilla) de esta sustancia presenta absorción en  $3288\text{ cm}^{-1}$ , lo cual establece la presencia de un hidroxilo. También se observan bandas en  $2919$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  de metilos y metilenos.

---

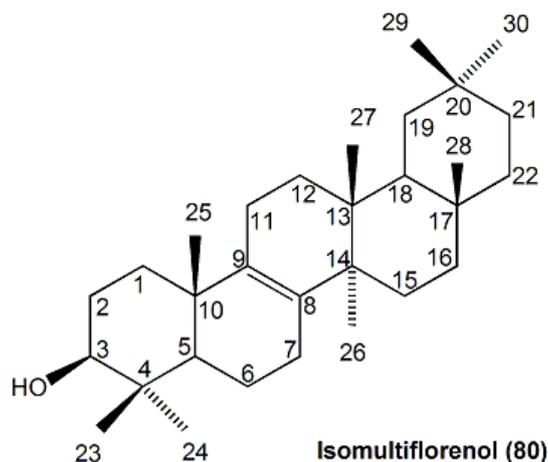
Otra banda que se identifica en el espectro es la que aparece en  $1467\text{ cm}^{-1}$ , la cual, como se mencionó anteriormente, es atribuible a ciclohexanos.

El espectro de masas muestra el ion molecular en  $m/z$  de 426, lo cual define la fórmula molecular de  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$  que corresponde presumiblemente a un triterpeno pentacíclico con una insaturación adicional. Esta presunción se confirma por los análisis que a continuación se describen. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de esta sustancia muestra una señal doble de doble en  $\delta$  3.24 (1H, dd,  $J = 4.2, 11.4, \text{H-3}\alpha$ ), la cual es característica de un metino de carbinol en C-3 de triterpenos. El espectro muestra numerosas señales a campo alto, las cuales se pueden identificar como ocho metilos singuletes, lo cual confirma que se trata de un triterpeno pentacíclico con una insaturación adicional, presumiblemente de un doble enlace tetrasustituido, ya que no se observan protones vinílicos en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

El espectro RMN  $^{13}\text{C}$  muestra un total de 30 átomos de carbono. Uno de ellos es base de oxígeno, ya que resuena en  $\delta$  79.0. Así, la ubicación del hidroxilo se localiza en C-3, como es frecuente en los triterpenos pentacíclicos. Asimismo, se confirma que la insaturación adicional corresponde a un doble enlace tetrasustituido, ya que se aprecian las señales correspondientes en  $\delta$  135.0 y 133.5 de carbonos cuaternarios.

Las anteriores afirmaciones se confirman mediante la modalidad DEPT del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , donde se contabilizan ocho metilos, once metilenos, tres metinos y ocho carbonos cuaternarios, lo cual permite proponer la estructura de un triterpeno del esqueleto de oleanano, y el doble enlace se ubica en los carbonos C-8/C-9, ya que es la única posición posible que está de acuerdo con el número de metinos y metilenos.

Esta estructura corresponde a una sustancia denominada isomultiflorenol (**80**). La comparación de los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia con los informados en la literatura, permitieron confirmar la identidad de esta sustancia [37,38].



#### 4.1.4 Cicloneolitsol

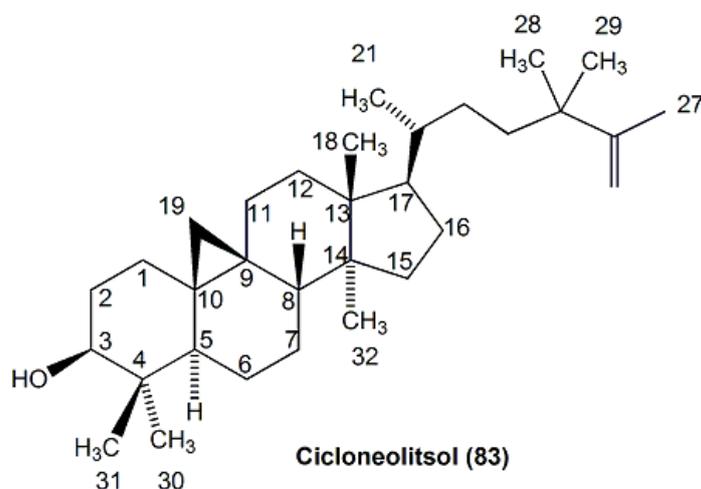
El espectro de masas de esta sustancia mostró el ion molecular en  $m/z$  454, lo cual sugiere una fórmula molecular de  $C_{32}H_{54}O$ , que estaría de acuerdo para un triterpeno o a un esteroide.

En su espectro de IR ( $CHCl_3$ ) muestra bandas de absorción en  $3397\text{ cm}^{-1}$  de grupo hidroxilo, y se observan bandas correspondientes a metilos y metilenos  $2958$  y  $2927\text{ cm}^{-1}$ . En  $1450\text{ cm}^{-1}$  se observa la absorción de una vibración característica de ciclohexanos, ya mencionada anteriormente.

En el espectro de RMN  $^1H$  se observa la presencia de ocho singuletes a campo alto correspondientes a grupos metilo; así como dos señales doble de doble (dd) en  $\delta$  0.55 ( $J = 4.2\text{ Hz}$ ) y  $\delta$  0.33 ( $J = 4.2\text{ Hz}$ ), las cuales, por su desplazamiento químico, corresponden a los hidrógenos que forman parte de un ciclopropano. La presencia de este anillo de tres miembros permite circunscribir las posibilidades estructurales a los esqueletos análogos al cicloartano, lo cual se comprobó como se describe a continuación. En el espectro de RMN  $^1H$  también se observa la señal del hidrógeno carbinólico como un doble de doble centrado en  $\delta$  3.32 ( $J = 10.8$  y  $4.5\text{ Hz}$ ), la cual se atribuye a un hidroxilo en C-3 de los cicloartanos. Las señales centradas en  $\delta$  4.71 (multiplete) y  $\delta$  4.65 ( $J = 1.8\text{ Hz}$ ) corresponden a hidrógenos vinílicos de un doble enlace disustituido geminalmente, lo cual está de acuerdo con la presencia de una cadena carbonada de un cicloartanol (es decir, con una

cadena alquílica unida a C-17), donde el doble enlace disustituido geminalmente puede ubicarse en C-27.

La sustancia denominada cicloneolitsol puede considerarse como una hipótesis estructural, ya que cumple con los fragmentos estructurales hasta el momento descritos. El experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  en la modalidad DEPT establece que esta sustancia posee cinco metinos, ocho metilos, doce metilenos y siete carbonos cuaternarios, lo cual está de acuerdo precisamente con la estructura del cicloneolitsol (83).



Cabe señalar que esta sustancia había sido aislada anteriormente de *Neolitsea aciculata* [48].

#### 4.1.5 Ciclobalanona

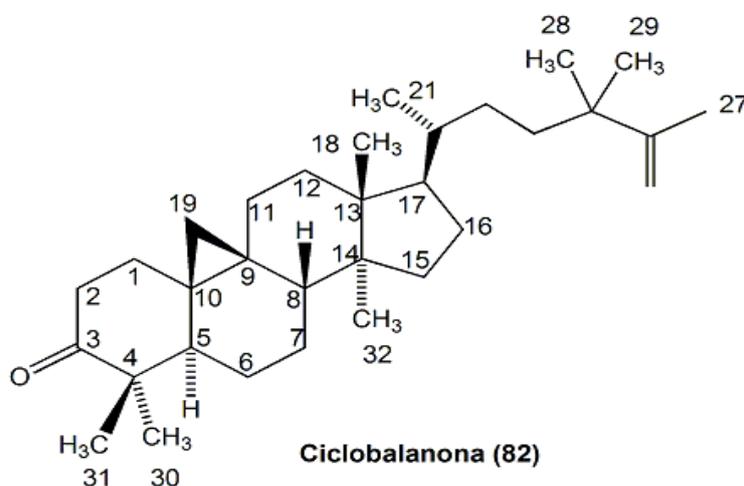
Esta sustancia se aisló de *E. ovata*, como un sólido blanco en forma de agujas pf. 166-168°C.

La fórmula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}$  fue establecida por el espectro de masas, que mostró el ión molecular  $m/z$  452, lo cual sugiere que esta sustancia es un triterpeno o un esteroide.

El espectro de IR (película) de esta sustancia presenta absorción intensa en  $1709\text{ cm}^{-1}$  lo cual determina la presencia de un carbonilo. También se observan bandas en  $2959$  y  $2935\text{ cm}^{-1}$  de metilos y metilenos. Otra banda que se identifica en el espectro es la que se identifica en  $1450\text{ cm}^{-1}$  atribuible a ciclohexanos.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observa la presencia de ocho metilos a campo alto; así como, dos señales *doble de doble* (dd) en  $\delta$  0.57 ( $J = 4.2$  Hz) y  $\delta$  0.78 ( $J = 4.2$  Hz), dicho desplazamiento corresponde a hidrógenos que forman parte de un ciclopropano (H-19). La presencia de este ciclo, como en el caso arriba mencionado, permite circunscribir las posibilidades estructurales a los esqueletos análogos al cicloartano, lo cual se comprobó como se describe a continuación. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se aprecian señales en  $\delta$  4.71 (multiplete) y  $\delta$  4.65 (d,  $J = 1.8$  Hz), las cuales corresponden a hidrógenos vinílicos del C-27, sugiriendo con ello que se trata de una doble ligadura disustituida ubicada en la cadena alquímica unida al C-17. Esta descripción permite deducir que la sustancia denominada ciclobalanona puede considerarse como una hipótesis estructural, la cual es confirmada mediante la comparación de los datos reportados en la literatura.

Del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se contabilizan 32 átomos de carbono en la molécula, uno de ellos se identifica como un carbono base de oxígeno en base a su desplazamiento químico (carbonilo,  $\delta$  216). El experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  en la modalidad DEPT establece que esta sustancia posee cuatro metinos, ocho metilos, doce metilenos y ocho carbonos cuaternarios, lo cual está de acuerdo con la estructura de la ciclobalanona. La comparación de los datos físicos y espectroscópicos de la sustancia aislada, con los informados en la literatura para ciclobalanona [47,48], confirman inambiguamente la identidad de esta sustancia.



La comparación detallada de los datos obtenidos de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de cicloneolitsol (**83**) y ciclobalanona (**82**), con los reportados con la literatura [47], confirman sus identidades estructurales, ya que las diferencias observadas son atribuibles a las diferencias experimentales.

Tabla 14. Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos aislados (82 y 83) con los reportados en la literatura [47].

Carbono	Datos	Datos	Datos	Datos
	observados 125 MHz Cicloneolitsol ( <b>83</b> )	reportados 125 MHz Cicloneolitsol ( <b>83</b> )	observados 125 MHz Ciclobalanona ( <b>82</b> )	reportados 125 MHz Ciclobalanona ( <b>82</b> )
C1	<b>31.9</b>	31.9	<b>33.4</b>	33.5
C2	<b>30.4</b>	30.0	<b>37.3</b>	37.4
C3	<b>78.8</b>	78.8	<b>216.7</b>	217.3
C4	<b>40.4</b>	40.4	<b>50.2</b>	50.3
C5	<b>47.1</b>	47.0	<b>48.4</b>	48.5
C6	<b>21.1</b>	21.1	<b>21.5</b>	21.5
C7	<b>28.1</b>	28.1	<b>28.1</b>	28.1
C8	<b>48.0</b>	48.0	<b>47.9</b>	47.9
C9	<b>19.4</b>	19.9	<b>21.1</b>	21.1
C10	<b>26.5</b>	26.4	<b>26.0</b>	26.0
C11	<b>26.1</b>	26.1	<b>25.9</b>	25.9
C12	<b>35.5</b>	35.5	<b>35.5</b>	35.6
C13	<b>45.2</b>	45.2	<b>45.2</b>	45.3
C14	<b>48.8</b>	48.7	<b>48.5</b>	48.7
C15	<b>32.8</b>	32.8	<b>32.7</b>	32.8
C16	<b>27.2</b>	27.2	<b>26.7</b>	26.7
C17	<b>52.1</b>	52.1	<b>52.1</b>	52.1
C18	<b>18.0</b>	18.0	<b>18.0</b>	18.1
C19	<b>29.7</b>	29.7	<b>29.7</b>	29.6
C20	<b>36.6</b>	36.5	<b>36.5</b>	36.6

C21	<b>18.4</b>	18.4	<b>18.4</b>	18.5
C22	<b>30.7</b>	30.7	<b>30.7</b>	30.7
C23	<b>37.4</b>	37.3	<b>37.5</b>	37.5
C24	<b>38.7</b>	38.7	<b>38.7</b>	38.7
C25	<b>152.4</b>	152.4	<b>152.4</b>	152.4
C26	<b>109.2</b>	109.3	<b>109.3</b>	109.3
C27	<b>20.0</b>	19.9	<b>19.4</b>	19.6
C28	<b>25.4</b>	25.4	<b>22.2</b>	22.2
C29	<b>14.0</b>	14.0	<b>20.8</b>	20.8
C30	<b>19.3</b>	19.4	<b>19.3</b>	19.3
C31	<b>27.5</b>	27.5	<b>27.2</b>	27.3
C32	<b>27.2</b>	27.2	<b>27.5</b>	27.6

## 4.2 Glucósidos

### 4.2.1 $\beta$ -D-glicopiranosido de $\beta$ -sitosterilo (73).

Esta sustancia se aisló de *E. nesitoica* y *E. ovata*, como un sólido amorfo de color blanco con pf. mayor a 300°C, soluble en piridina y CHCl<sub>3</sub>-MeOH.

El espectro de IR (película) de esta sustancia presenta absorción amplia e intensa en 3385 cm<sup>-1</sup> de grupo hidroxilo; también se observan bandas en 2936 y 2872 cm<sup>-1</sup> de metilos y metilenos, adicionalmente se identifican bandas en 1072 y 1023 cm<sup>-1</sup> correspondientes a una vibración tipo C-O.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 500 MHz) a campo bajo se observa un doblete que integra para un hidrógeno  $\delta$  5.33 (J = 5.0) que se asigna al H-6 vinílico. Además se observan una serie de señales alrededor de  $\delta$  3.9 a 4.2 correspondientes a hidrógenos geminales a hidroxilos, lo cual sugiere la presencia de un glucopiranosido. En  $\delta$  5.0 resuena una señal doble que integra para un hidrógeno J = 7.5 Hz asignada al hidrógeno anomérico del glucopiranosido H-1'. A campo bajo se observan dos señales doble de doble, la primera resuena en  $\delta$  4.56 (dd, H – 6'b, 2.5 Hz, 11.75 Hz) que corresponde al H-6'b y la segunda en  $\delta$  4.42 (dd, H – 6'a, 5.5 Hz, 11.75 Hz) asignada al H-6'a del glucopiranosido. A campo alto se observan señales entre  $\delta$  0.98 y 0.64

correspondientes a seis absorciones asignables a metilos, los cuales proporcionan evidencia que esta sustancia presenta señales características de un esteroil, lo que está de acuerdo con la estructura de un glicósido de b-sitosterilo.

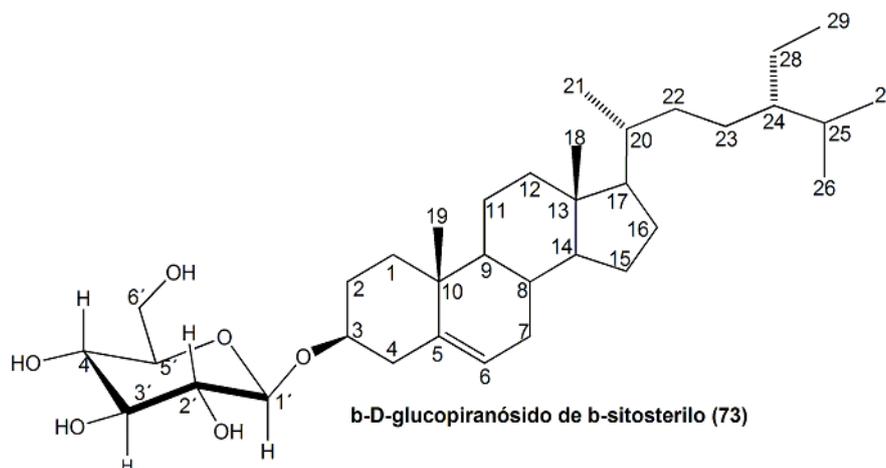


Tabla 15. Datos de RMN <sup>13</sup>C del compuesto aislado (73) con los reportados en la literatura [42].

Posición del carbono	Datos observados RMN <sup>13</sup> C (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N 125 MHz)	Datos reportados RMN <sup>13</sup> C (25.2 MHz C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N)
C1	37.52	37.6
C2	30.30	30.4
C3	78.15	78.1
C4	39.99	40.0
C5	140.98	140.8
C6	121.95	121.9
C7	32.11	32.2
C8	32.21	32.2
C9	50.39	50.4
C10	36.98	37.0
C11	21.32	21.4
C12	39.39	39.4

---

C13	42.54	42.6
C14	56.87	56.9
C15	24.55	24.6
C16	28.57	28.6
C17	56.30	56.3
C18	12.01	12.1
C19	19.46	19.5
C20	36.43	36.5
C21	19.05	19.1
C22	34.26	34.3
C23	26.46	26.5
C24	46.09	46.1
C25	29.53	29.6
C26	19.25	19.3
C27	20.00	20.1
C28	23.44	23.5
C29	12.19	12.3
C1'	102.63	102.6
C2'	75.39	75.3
C3'	78.52	78.5
C4'	71.76	71.7
C5'	78.66	78.6
C6'	62.90	62.9

---

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) se observan 35 señales, seis corresponden a metilos, doce metilenos, catorce metinos de los cuales uno se encuentra en la zona de carbonos  $sp^2$   $\delta$  121.95 (C-6), el otro se encuentra en la zona de carbonos base de oxígeno  $\delta$  102.6 que corresponde al carbón anomérico del glucopiranosido (C-1'), y tres carbonos cuaternarios, uno vinílico en  $\delta$  140.98 asignado al C-5 del esteroil. Esta descripción permite confirmar la estructura **73** para esta substancia.

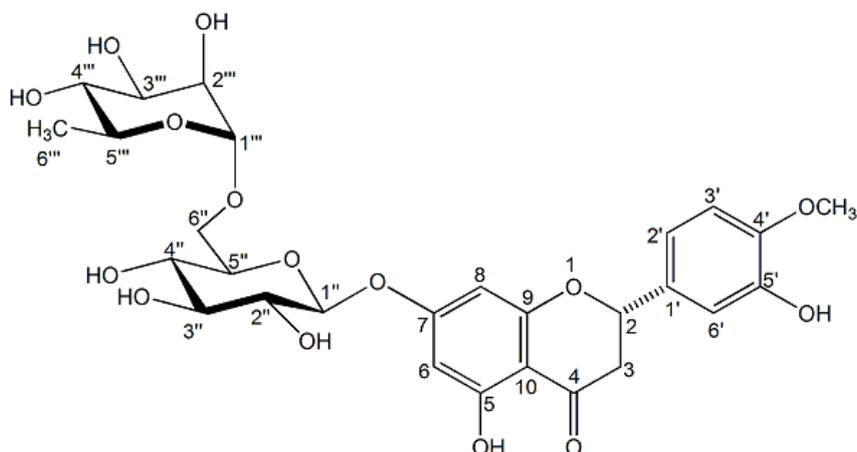
## Glucósido de Flavonoide

### 4.2.2 Hesperidina (81)

Esta sustancia se aisló de *E. nesiotica*, como un sólido blanco, soluble en piridina con pf. > 300 °C.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$ , muestra señales que sugieren una estructura de tipo flavonoide glicosilado, ya que se observan señales correspondientes a sistemas aromáticos y a unidades de azúcares presentes en la estructura. Se puede apreciar en  $\delta$  12.46 una señal típica de OH en la posición C-5, cuyo hidrógeno se encuentra quelatado con el carbonilo de C-4 de un flavonoide.

Se observan señales correspondientes a un metilo de ramnosa en  $\delta$  1.5 que se presenta como un doblete (4H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-5'''), también se observa una señal atribuible a metoxilo en  $\delta$  3.70 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-O-C-4}'$ ). Adicionalmente se observa la presencia de dos dobles de dobles en  $\delta$  2.84 (1H, dd,  $J = 17.0, 3.5$  Hz, H-3 ax) y  $\delta$  3.20 (1H, dd,  $J = 4.0, 17.0$  Hz, H-3 eq.) respectivamente, los cuales, conjuntamente con el doble de doble observado en 5.55 (H-2) indica la presencia de una estructura de tipo flavanona (hidrógenos en C-2 y en C-3). Las señales centradas en  $\delta$  4.58 (1H, d,  $J = 0.5$  Hz, H-1'') y en  $\delta$  4.64 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-1''') se atribuyen directamente a los hidrógenos anoméricos, correspondientes al hidrógeno 1'' de la glucosa y al 1''' hidrógeno de ramnosa, respectivamente.



En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  se pueden contabilizar veintiocho carbonos, y de acuerdo a la modalidad DEPT se identificaron dos metilos, dos metilenos y dieciséis metinos, obteniendo con ello por diferencia en comparación con el espectro de  $^{13}\text{C}$  ocho carbonos cuaternarios. El análisis comparativo de los datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de esta sustancia con los informados en la literatura para la hesperidina (**81**) permitieron confirmar la identidad de ambas sustancias (Tabla 16). Las diferencias observadas en los desplazamientos químicos son atribuibles a las diferencias experimentales.

Tabla 16. Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto aislado (**81**) con los reportados en la literatura [45].

Posición del carbono	Datos observados RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 125 MHz)	Datos reportados RMN $^{13}\text{C}$ (DMSO- $d_6$ )
C2	78.41	78.4
C3	43.13	42.0
C4	197.03	196.7
C5	164.45	163
C6	97.69	96.7
C7	166.46	165.2
C8	96.43	95.8
C9	163.45	162.5
C10	104.32	103.5
C1'	132.14	131.2
C2'	115.27	114.3
C3'	148.40	146.7
C4'	149.08	148.1
C5'	112.33	112.7
C6'	118.09	117.8
C1''	101.52	100.7
C2''	74.56	73.3
C3''	79.45	76.6

C4''	71.26	69.9
C5''	77.51	75.8
C6''	67.36	66.4
C1'''	102.43	99.8
C2'''	72.07	70.6
C3'''	72.73	71.0
C4'''	74.06	72.4
C5'''	69.77	68.6
C6'''	18.54	18.2
OCH <sub>3</sub>	55.90	56.0

### 4.3 Cumarinas

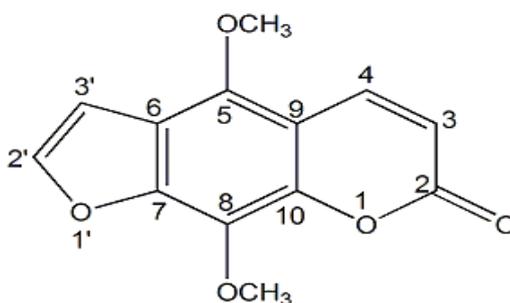
#### 4.3.1 Isopimpineline (10)

Esta sustancia se aisló de *E. ovata*, como un sólido amarillo en forma de agujas pf. 186-187°C.

El espectro de IR (CHCl<sub>3</sub>), muestra una banda de absorción intensa en 1721 cm<sup>-1</sup> de un grupo carbonilo de cumarina. En 1129 cm<sup>-1</sup> se observa una banda definida que corresponde a una vibración C-O, y en 1351 cm<sup>-1</sup> se puede apreciar una banda atribuible a una lactona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H, muestra señales que sugieren una estructura de tipo furanocumarina lineal, donde se observan señales que corresponden a sistemas aromáticos presentes en la estructura. Se aprecia en  $\delta$  4.18 una señal característica para un grupo metoxilo, esta señal integra para 6 átomos de hidrógeno, lo que permite afirmar que son dos metoxilos, los cuales se ubican tentativamente en las posiciones C-5 y C-8. En el mismo espectro se observan las señales de un sistema AB centradas en  $\delta$  6.30 y en  $\delta$  8.13 (d, J = 9.6 Hz) correspondientes a los hidrógenos H-3 y H-4 característicos de una cumarina. Se observa la presencia de dos señales dobletes centradas en  $\delta$  7.0 y en  $\delta$  7.6 (J= 2.4 Hz), las cuales corresponden a H-3' y H-4' del anillo de furano presente en la estructura.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  confirma las asignaciones anteriores, ya que se aprecian las señales correspondientes a trece átomos de carbono, donde dos de ellos corresponden a metilos de metoxilo ( $\delta$  61.6 y  $\delta$  60.8). También se observa en  $\delta$  160 la señal correspondiente al grupo carbonilo. De la espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en la modalidad DEPT se deduce que la estructura incluye dos metilos, cuatro metinos y por diferencia con los átomos contabilizados en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  siete carbonos cuaternarios.



EL espectro de de masas presentó el ion molecular en  $m/z$  246, lo cual confirma la formula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_5$  correspondiente a la isopimpinelina (10).

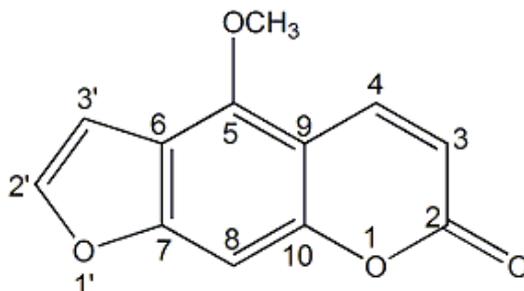
#### 4.3.2 Bergapteno (9)

Esta sustancia se aisló de *E. ovata* como un sólido de color blanco y pf. de 189-191° C.

La fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$  de esta sustancia se determinó por el espectro de masas, el cual muestra el ion molecular en  $m/z$  216.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$ , muestra señales similares a las de la isopimpinelina (10), descritas anteriormente, y sugieren que se trata de una estructura de tipo furanocumarina lineal. Efectivamente, se observan señales que corresponden a los hidrógenos aromáticos presentes en la estructura. Así se observa la presencia de dos hidrógenos dobletes en  $\delta$  7.0 y en  $\delta$  7.5 ( $J= 2.4$  Hz) correspondientes a H-3' y H-2', respectivamente, del furano de la cumarina, y una señal singulete en  $\delta$  7.13 que integra para un hidrógeno, correspondiente a H-8. Se observa la señal de un metoxilo en  $\delta$  4.18, el cual se ubica en la

posición 5. Finalmente, en el espectro se observan los hidrógenos dobles centradas en  $\delta$  6.27 y en  $\delta$  8.16 ( $J= 9.6$  Hz) característicos de H-3 y H-4 del compuesto aislado. Esta discusión permite determinar que esta estructura corresponde al bergapteno (**9**).



#### 4.4 Pruebas de citotoxicidad

Con el objetivo de explorar la actividad biológica de las sustancias aisladas de *Esenbeckia* (**9,10, 21, 73, 80-83**) fueron ensayadas como agentes citotóxicos frente a las líneas celulares cancerosas humanas U251 (glía de sistema nervioso central), PC-3 (próstata), HCT-15 (colon), MCF-7 (pecho), SKLU (pulmón). Se evaluó la actividad citotóxica de los metabolitos aislados de las dos especies de *Esenbeckia*, usando el método de evaluación de citotoxicidad de la sulforodamina B sobre diferentes líneas celulares tumorales, encontrando que la mayoría de los compuestos ensayados no muestran alta toxicidad, a excepción de la isopimpineline (**10**), que desplegó actividad citotóxica moderada (66.74%), específica para la línea celular de cáncer de próstata. Los resultados obtenidos experimentalmente se muestran en la tabla 12.

Con respecto a otras actividades biológicas, es interesante mencionar que las furanocumarinas se han usado en el tratamiento de ciertas enfermedades de la piel como psoriasis y vitiligo. El bergapteno (**9**) es usado como protector solar en formulaciones cosméticas [51]. En el capítulo 3 se mencionaron algunas actividades biológicas de los triterpenos y flavonoides.

Tabla 12. Resultados de la prueba de citotoxicidad de los metabolitos aislados

Ensayo: Citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas

Tipo de ensayo: Concentración 50 µM/ vehículo: DMSO

Muestra	Código	% de inhibición del crecimiento por la línea celular				
		U251	PC-3	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
EO-1 (Ciclobalanona <b>82</b> )	DLG-5	10.87	17.77	SA	5.15	3.7
EO-2 (Cicloneolitsol, <b>83</b> )	DLG-6	34.99	5.93	5.51	SA	2.5
EO-3 (Isopimpinolina, <b>10</b> )	DLG-7	27.19	<b>66.74</b>	22.88	31.3	15.18
EO-4 (Bergapteno, <b>9</b> )	DLG-8	13.12	25.34	5.33	9.16	4.43
EN-1 (Isomultiflorenol, <b>80</b> )	DLG-10	44.74	24.84	1.46	SA	3.6
EN-2 (β-sitosterol, <b>21</b> )	DLG-11	3.72	9.45	SA	SA	SA
EN-3 (Hesperidina, <b>81</b> )	DLG-12	5.31	25.34	SA	19.85	7.59
EN-4 (β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo, <b>73</b> )	DLG-13					
		15.84	43.25	24.06	SA	20.38

U251 (glía de sistema nervioso central), PC-3 (próstata), HCT-15 (colon), MCF-7 (pecho), SKLU (pulmón). SA: sin actividad citotóxica.

---

## CAPITULO V

### Conclusiones

#### 5.1 Conclusiones respecto a *Esenbeckia nesiotica* y *E. ovata*.

De los extractos orgánicos de las partes aéreas de *E. nesiotica* se aislaron e identificaron  $\beta$ -sitosterol (**21**),  $\beta$ -epóxido de cariofileno (**22**), isomultiflorenol (**80**),  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo (**73**) y hesperidina (**81**). **80** y **81** no habían sido reportados anteriormente como constituyentes de *Esenbeckia*.

De los extracto de las partes aéreas de *E. ovata* se aislaron e identificaron  $\beta$ -sitosterol (**21**),  $\beta$ -epóxido de cariofileno (**22**), cicloneolitsol (**83**), ciclobalanona (**82**), isopimpinlina (**10**), bergapteno (**9**) y  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo (**73**). **82** y **83** no han sido reportadas con anterioridad en la literatura científica como constituyentes de *Esenbeckia*.

#### 5.2 Conclusiones basadas en la actividad citotóxica

En cuanto a la actividad citotóxica que presentan los metabolitos aislados se concluye que isopimpinlina (**10**) es la única sustancia que presenta actividad media frente a la línea celular (PC-3) de cáncer de próstata.

#### 5.3 Conclusión General

La presencia de sustancias no aisladas con anterioridad en el genero *Esenbeckia*, tales como el isomultiflorenol (**80**), hesperidina (**81**), ciclobalanona (**82**) y cicloneolitsol (**83**), así como los terpenoides y las cumarinas, proporcionan evidencias de la variabilidad en el contenido metabólico en *Esenbeckia*, no sólo entre especies diferentes, sino que diferentes colectas de la misma especie generan resultados variables. Es ya conocido que dicha variabilidad puede ser atribuida a condiciones climáticas, ecológicas, a la edad y época del año en que es recolectado el material vegetal.

Finalmente puede concluirse que existe notable variación en el contenido metabólico en este grupo de plantas por lo que es necesario analizar especies adicionales para generar mayor conocimiento referente a este grupo de plantas.

---

---

## CAPÍTULO VI

### 6.1 Bibliografía

- 1) Ramos, C. H.; Revisión Taxonómica de *Esenbeckia* (Rutaceae) de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. **1991**.
- 2) Hegnauer, R.; Chemataxonomic der Pflanzen. Vol VII. Edit. Berkhausen Verlag Masil. London. 174-239, **1973**.
- 3) Cano, A. E.; Estudio químico de tres especies vegetales mexicanas del género *Esenbeckia* (Rutaceae). Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químicas e Ingenierías. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. **1998**.
- 4) Waterman, P. G., Grundon, M. F. (eds). Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales. Academic press. London. **1983**.
- 5) Kaastra, R. C., New Taxa and Combinations in Rutaceae. *Acta Bot. Neerl.* **1977**, 26, 471.
- 6) Williams, D., Stone, M. J., Hauck, P. R., Rahman, S. K.; Why are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized. *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 1189.
- 7) Vitagliano, J. C., Comin, J.; Studies on Argentine plants XXVIII. Alkaloids from *Esenbeckia febrifuga* Juss. *An. Asoc. Quím. Arg.* **1970**, 58, 59.
- 8) Vitagliano, J. C., Comin, J.; Studies on Argentine plants XXIX. Limonoids from *Esenbeckia febrifuga* Juss and *Helietta longifoliata* Britt. *An. Asoc. Quím. Arg.* **1970**, 58, 273.
- 9) Dreyer, D. L. Citrus bitter. Botanical Distribution and Chemotaxonomy in the Rutaceae. *Phytochemistry* **1972**, 11, 705.

- 
- 10) Dreyer, D. L.; Alkaloids, Limonoids and Furocoumarins from Three Mexican *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 941.
- 11) Bevalot, F., Fournet, A., Moretti, C., Vaquette, J.; Alkaloids from *Esenbeckias pilocarpoides*. *Planta Medica* **1984**, *50*, 522.
- 12) Rios, Y., Delgado, G.; Polyprenols and Acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 349.
- 13) Rios, Y., Delgado, G.; Terpenoids and Alkaloids from *Esenbeckia belizensis*. Spontaneous Oxidation of Furoquinoline Alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1307.
- 14) Charnichart, A. Contribución al Conocimiento de los Constituyentes Químicos de la Vegetación. Estudio Químico de *Esenbeckia huertana* (Rutaceae). Tesis de Licenciatura. UNAM. **1990**.
- 15) Chiappeta, A.; Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazz. Chim. Ital.* **1989**, *119*, 435.
- 16) Delle Monache, F., Di Benedetto, R., De Moras e Souza, M. A., Da Salette, M. and Sandor, P.; *Esenbeckia leiocarpa* II. Further Components. *Gazz. Chim. Ital.* **1990**, *120*, 387.
- 17) Kubo, I.; Recent Applications of Counter – Current Chromatography to Isolation of Bioactive Natural Products. *J. Chromatogr.* **1991**, *187*, 538.
- 18) Guilhon, G. M. P., Beatas, A. C. S., Maia, J. G. S., Conserva, L. M.; 2-Alkyl-4-quinolone Alkaloids and Cinnamic Acid Derivatives from *Esenbeckia almawilla*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1193.

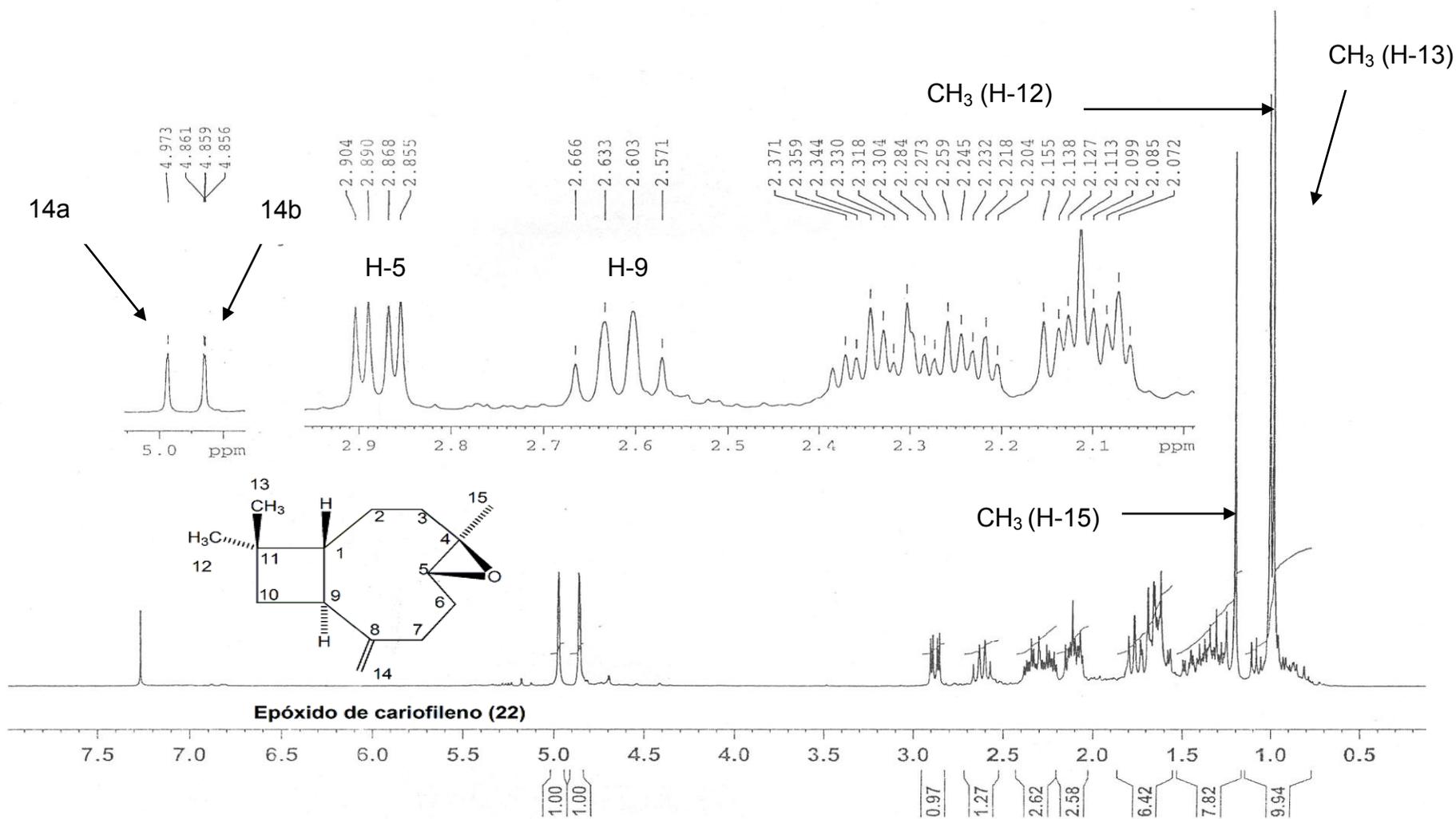
- 
- 19) Oliveira, F. M., Santana, E. G., Conserva, L. M., Maia, J. G., Guilhon, G. M. P.; Alkaloids and Coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 647.
- 20) Cuca, L. E., Coy, C. A.; Metabolites Isolated from *Esenbeckia alata* (Karst & Triana) (Rutaceae). *Biochem. System. Ecol.* **2007**, *35*, 386-388.
- 21) Rios, Y., Rosas-Alonso, E., Aguilar-Guadarrama, A.; Alkaloids, Coumarins and Sesquiterpenes from *Esenbeckia conspecta* Kunt (Rutaceae). *Biochem. System. Ecol.* **2002**, *30*, 367-369.
- 22) Rios, Y., Delgado, G.; Furocoumarins, terpenes and sterols from *Esenbeckia ovata* Kunth (Rutaceae). *Biochem. System. Ecol.* **2002**, *30*, 697-699.
- 23) Rios, Y., Aguilar-Guadarrama, A.; Terpenes and a new bishomotriterpene from *Esenbeckia stephani* (Rutaceae). *Biochem. System. Ecol.* **2002**, *30*, 1006-1008.
- 24) Simpson, D.; Jacobs H., Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia pentaphylla* (Rutaceae). *Biochem. System. Ecol.* **2005**, *33*, 841-844.
- 25) Romo de Vivar A. Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química UNAM. Edición de la UNAM y la Sociedad Química de México. **2006**. 63-64
- 26) Dewick P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Chichester. England. J. Wiley. **1997**, Cap. 4, 12.
- 27) Dewick P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Chichester. England. J. Wiley. **1997**, Cap. 4, 149.

- 
- 28) Dewick P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Chichester. England. J. Wiley. **1997**, Cap. 4, 168.
- 29) Romo de Vivar A. Productos Naturales de la Flora Mexicana. México. Limusa. **1985**, Cap. 5, 69-70.
- 30) Gray, Y. A., Waterman, P. G.; Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry* **1978**, 17, 845.
- 31) Michel, J. P.; Quinoline, Quinazoline and Acridone Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 9, 25.
- 32) Ju-ichi, M., Inoue, M., Aoki, K., Furukawa, H.; New Acridone Alkaloids from *Citrus junos* Tanaka. *Heterocycles* **1991**, 32, 1595.
- 33) Ayafor, J. F., Sondengam, B. L. Bilon, A. N.; Limonoids of *Teclea ouabanguiensis*. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 583.
- 34) Bolhmann, F.; Zdero, Ch., *Phytochemistry*. **1978**. 17, 1135–1153.
- 35) Rahman, M.M.; Khandkar P.; Gray A. I.; Terpenoids from *Atylosa Scarabaeoides* and Their Antimicrobial Activity. *J. Pharm. Sci.* **2005**, 4, 141-144.
- 36) Medeiros, C.; Abati A.; Mallmann, C.A; Pozzatti, P.; Hartz, S.; Heinzmann, B.M.; Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook and Arn., Asteraceae. *Braz. J. Pharm.* **2010**, 20, 87-92
- 37) Tanaka, R., Matsunaga S., Triterpene Constituents from *Euphorbia supina*. *Phytochemistry* **1988**, 27, 3579-3584.

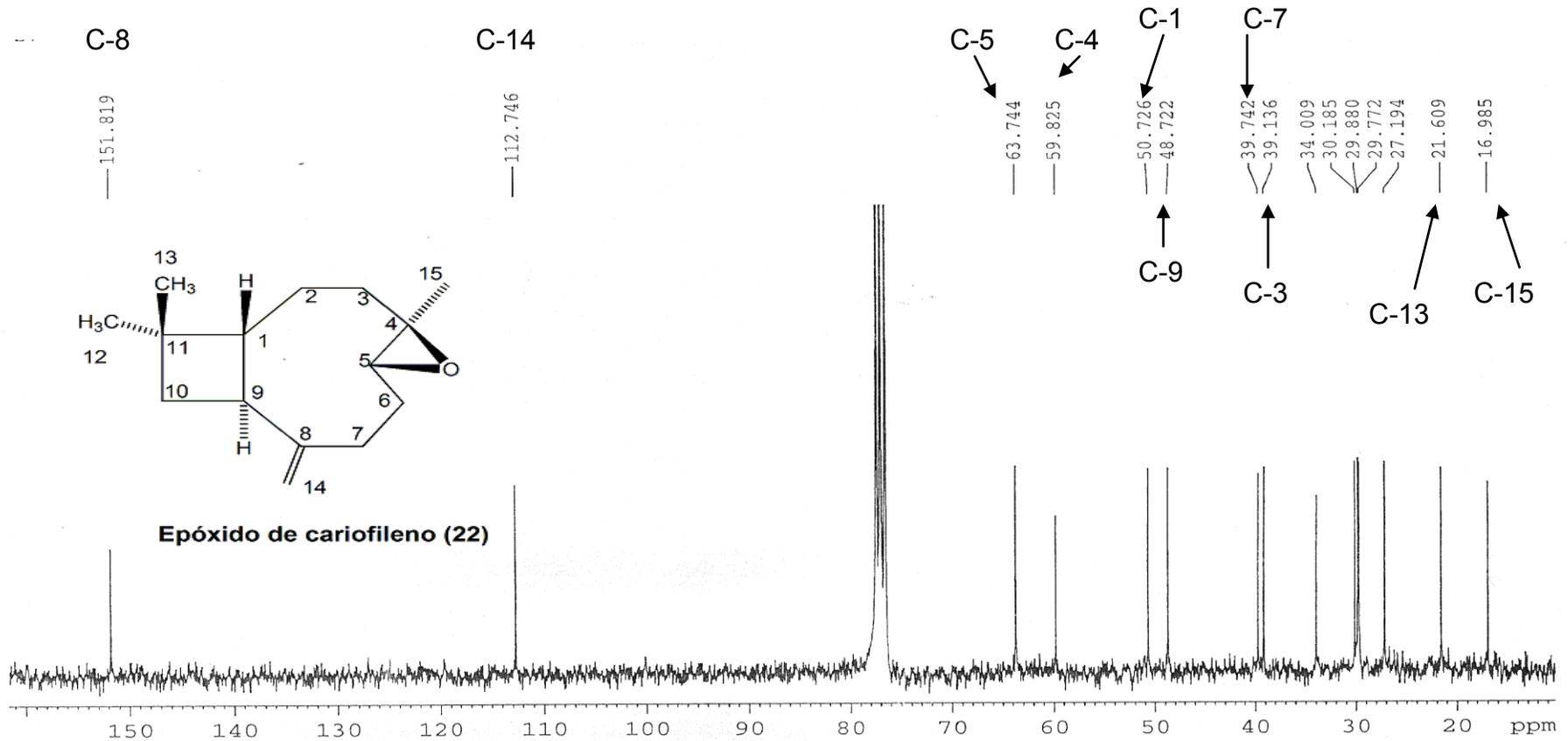
- 
- 38) Mahato, S. B., Kundu, A. P.;  $^{13}\text{C}$  NMR Spectra of Pentacyclic Triterpenoids. A Compilation and Some Salient Features. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517-1575.
- 39) Abdul, M., Mohammed, T., Sarker, A., Debasish, B., Muhammad, S.; Isolation and Identification of Compounds from the Leaf Extract of *Dillenia Indica* Linn. *Bangladesh Pharm. J.* **2010**, *13*, 49-53.
- 40) Dae, K. K., Jung, P. L., Jin, W. K., Hee, W. P., Jae, S. E.; Antitumor and Antiinflammatory Constituents from *Celtis sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* **2005**, *28*, 39-45.
- 41) Zahurul, H., Abdullah, S., Umar, A., Yusuff A., Abdullah-Al. M.; Investigations on *Terminalia Arjuna* Fruits: Part 1- Isolation of Compounds from Petroleum Ether Fractions. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2008**, *43*, 123-130.
- 42) Iribarren, A., Pomilio, A. Components of *Bauhinia candicans*. *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 752-753.
- 43) Vuyiswa, G. S.; Phytochemical Studies of *Helichrysum patulum*. Thesis of Masters of Science in the Department of Chemistry, University of the Western Cape. **2006**.
- 44) Moccelini S., Da Silva V., Ndiaye E., De Sousa P.; Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae) *Quim. Nova* **2009**, *32* 131-133.
- 45) Markham K.R., Ternai B.; Flavonoids Other Than Flavone and Flavonol Aglicones. *Tetrahedron* **1976**, *32*, 2607-2612.
- 46) Ferreira, T. D., Álvares, P.S., Houghton, P. J.; Constituintes Químicos Das Raízes de *Pyrostegia Venusta* e Considerações sobre a Sua Importância Medicinal. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 42-46.

- 
- 47) Ying, S., Xi-hua, Y., Can-kui Z., Zhi-Ben T.; C-32 Triterpenes from *Taxodium ascendens*. *Biochem. System. Ecol.* **2005**, *33*, 211-214.
- 48) Yano, K.; Akihisa, T.; Tamura, T., Matsumoto, T.; Four 4 $\alpha$ -Methylsterols and Triterpene Alcohols from *Neolitsea aciculate*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2093-2098.
- 49) Basnet, P., Kadota, S., Manandhar, K., Manandhar, M. D., Namba, T.; *Planta Medica* **1993**, *59*, 384–386.
- 50) Hongwei, Y., Bogang, L., Xiaozhen, C., Changsong, L., Guolin, Z., *Chin. J. Appl. Chemical Study on Evodia vestita. Environ. Biol.* 2010, *16*, 072-075.
- 51) Correa, J. A.; Acción Biológica de las Furanocumarinas. Revisión Bibliográfica. Universidad Nacional Seccional de Medellín. Colombia. **1994**, Cap. 3, 22-42.

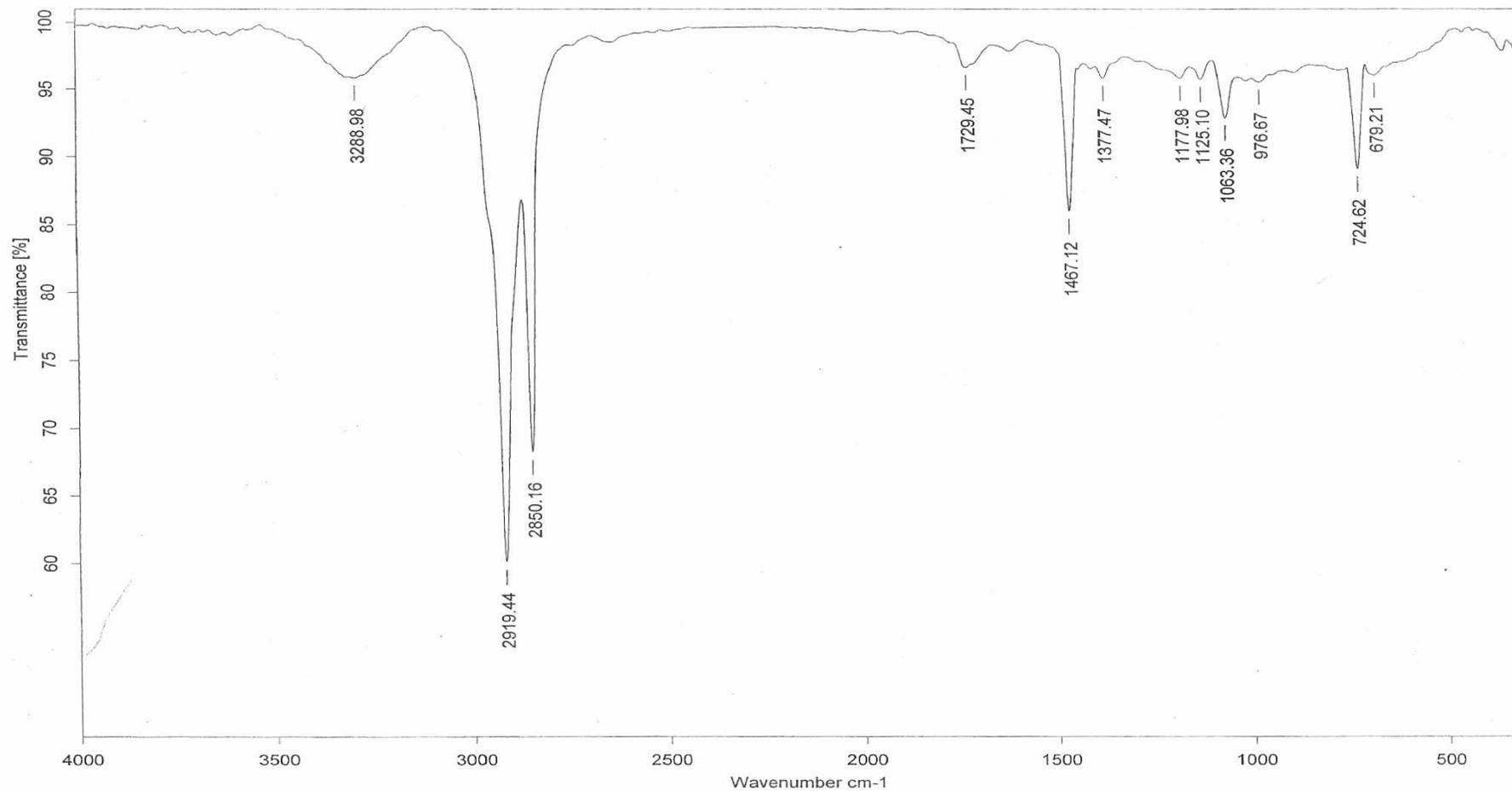
Espectro 1 : RMN -  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\beta$  - Epóxido de cariofileno



Espectro 2: RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) β-epóxido de cariofileno



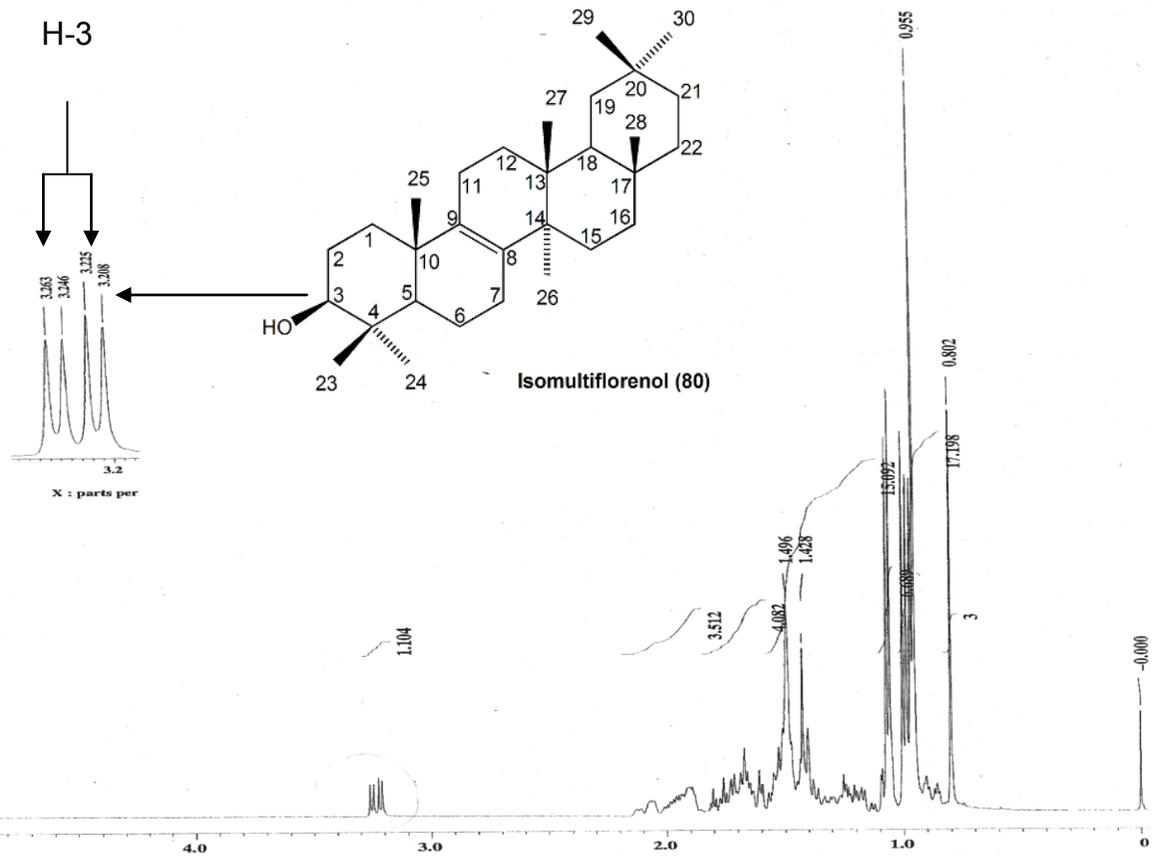
### Espectro 3: IR (KBr Pastilla) Isomultiflorenol



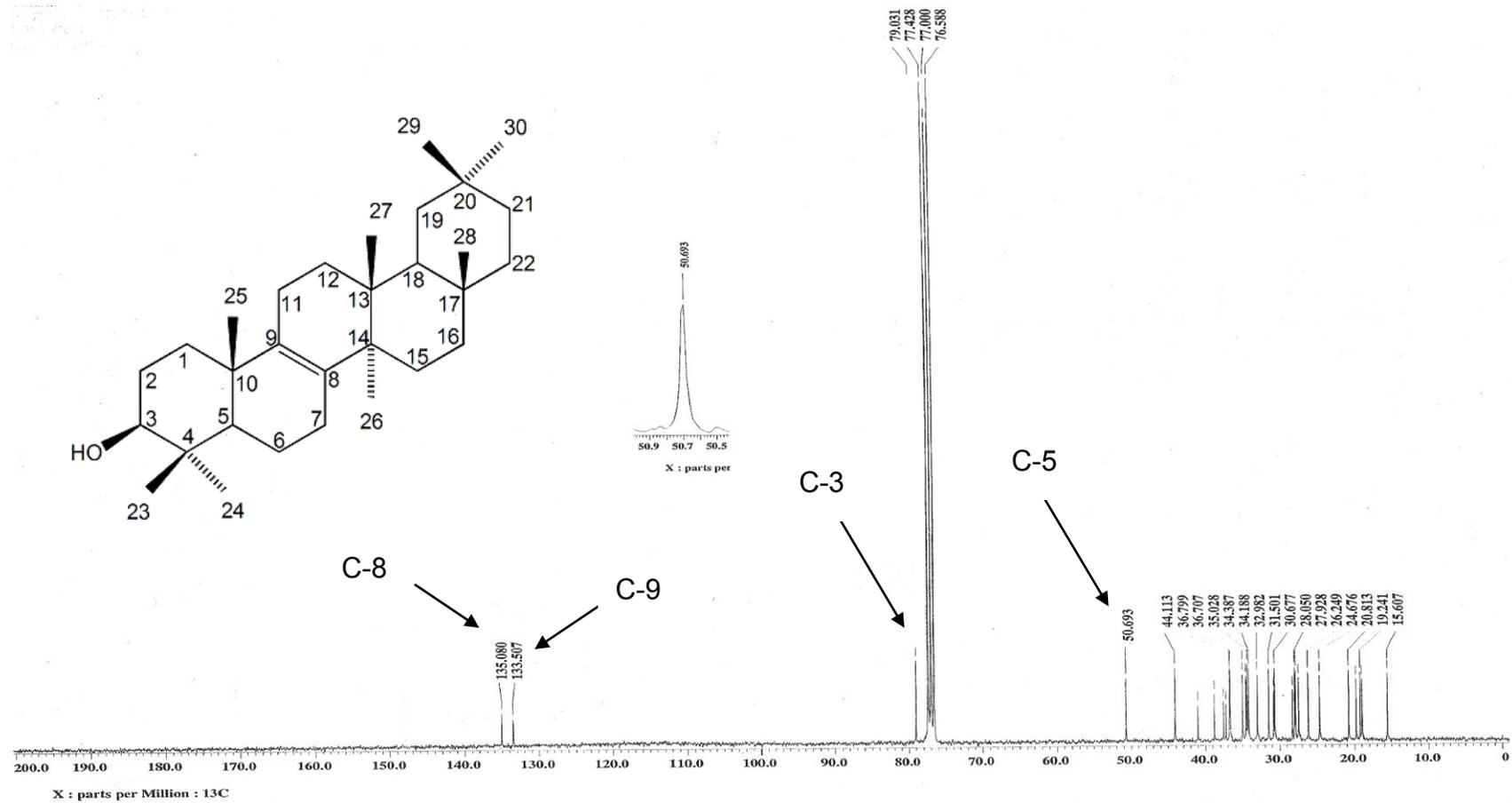
Bandas en la región 2919 y 2850  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a metilos y metilenos.  
Banda ligeramente ancha en la región de 3288 correspondiente a un grupo hidroxilo  
Banda poca intensa en la región 1467 característica para ciclohexanos.

Espectro 4: RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) Isomultiflorenol

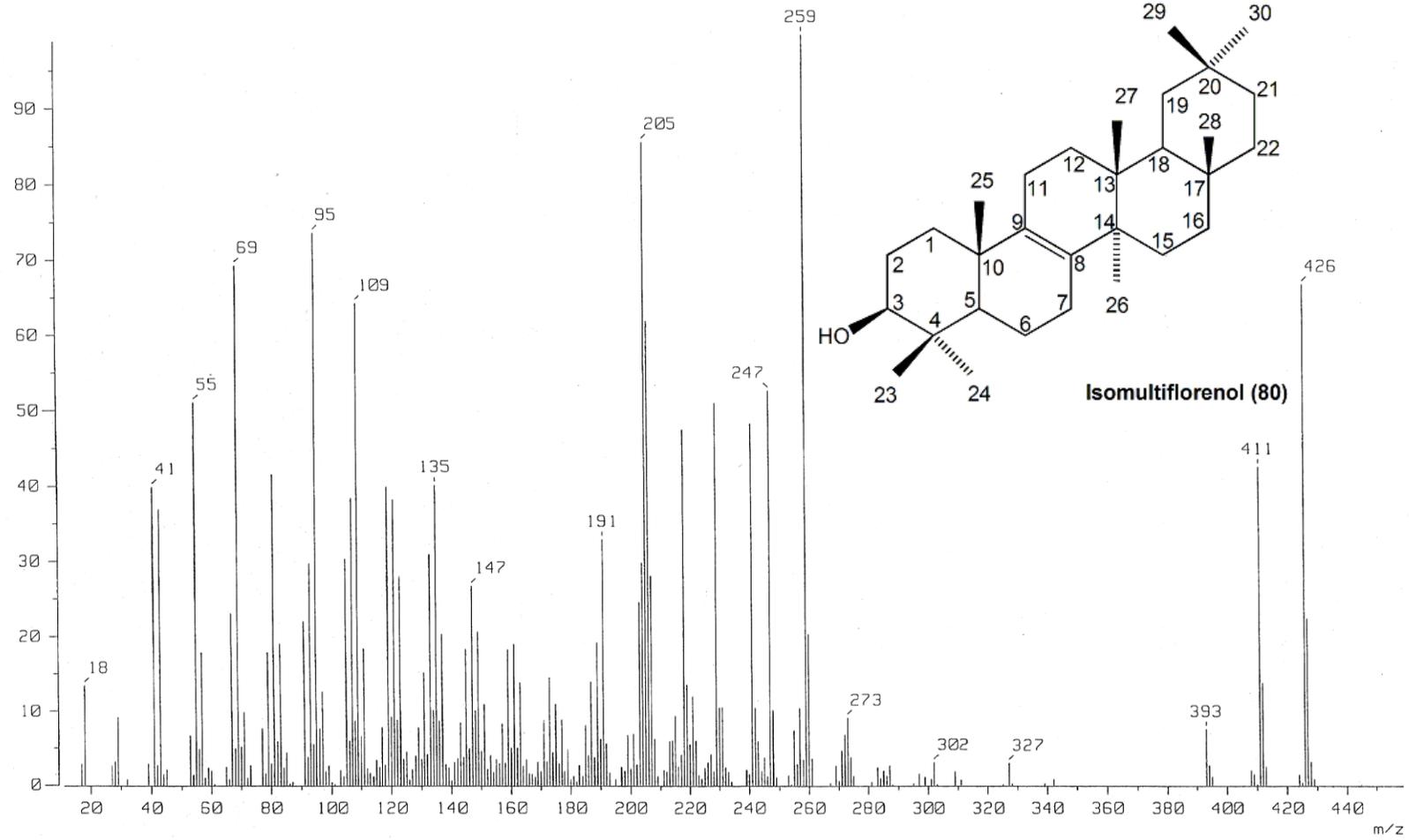
ano



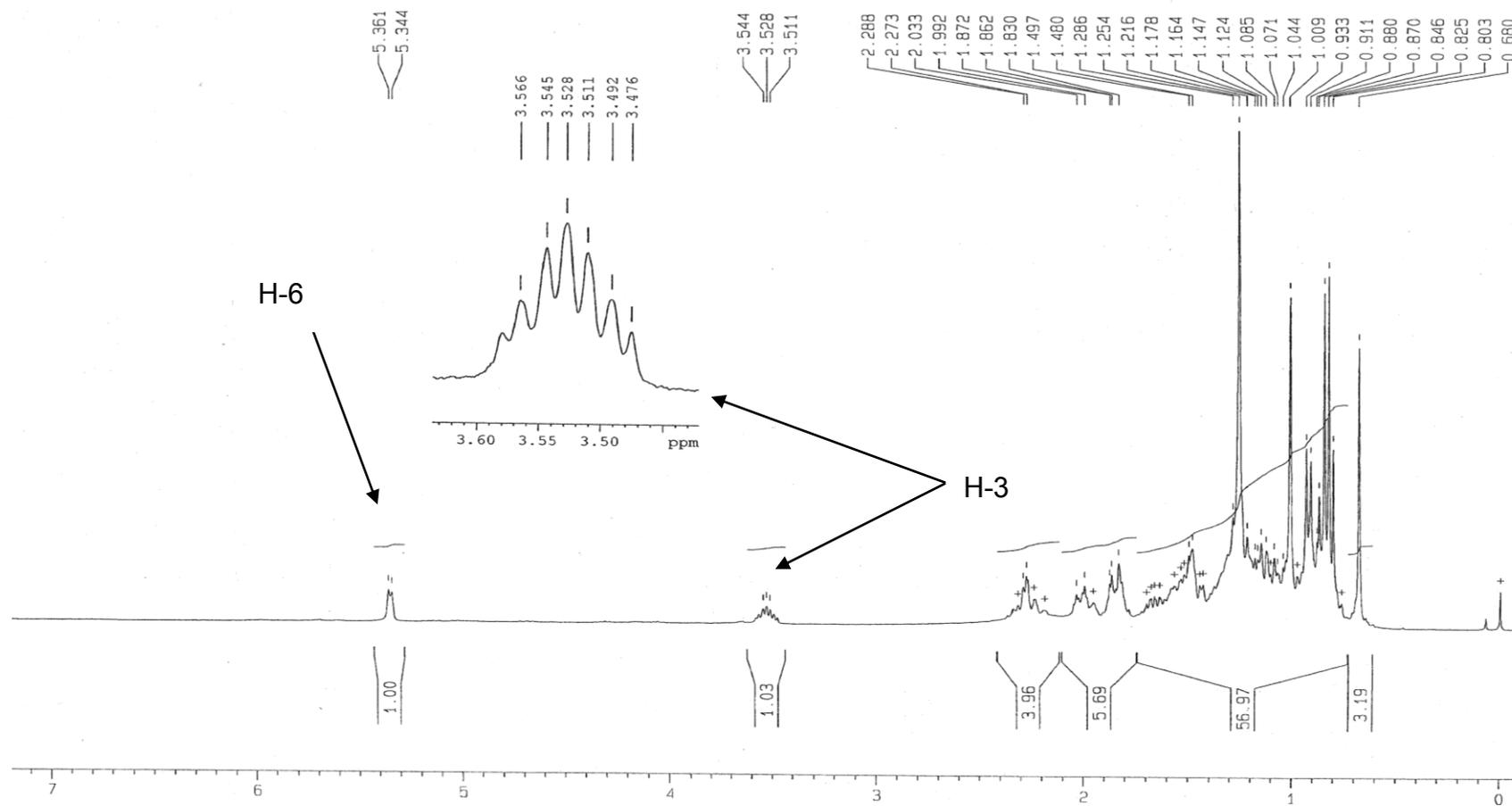
Espectro 5: RMN -  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) Isomultiflorenol



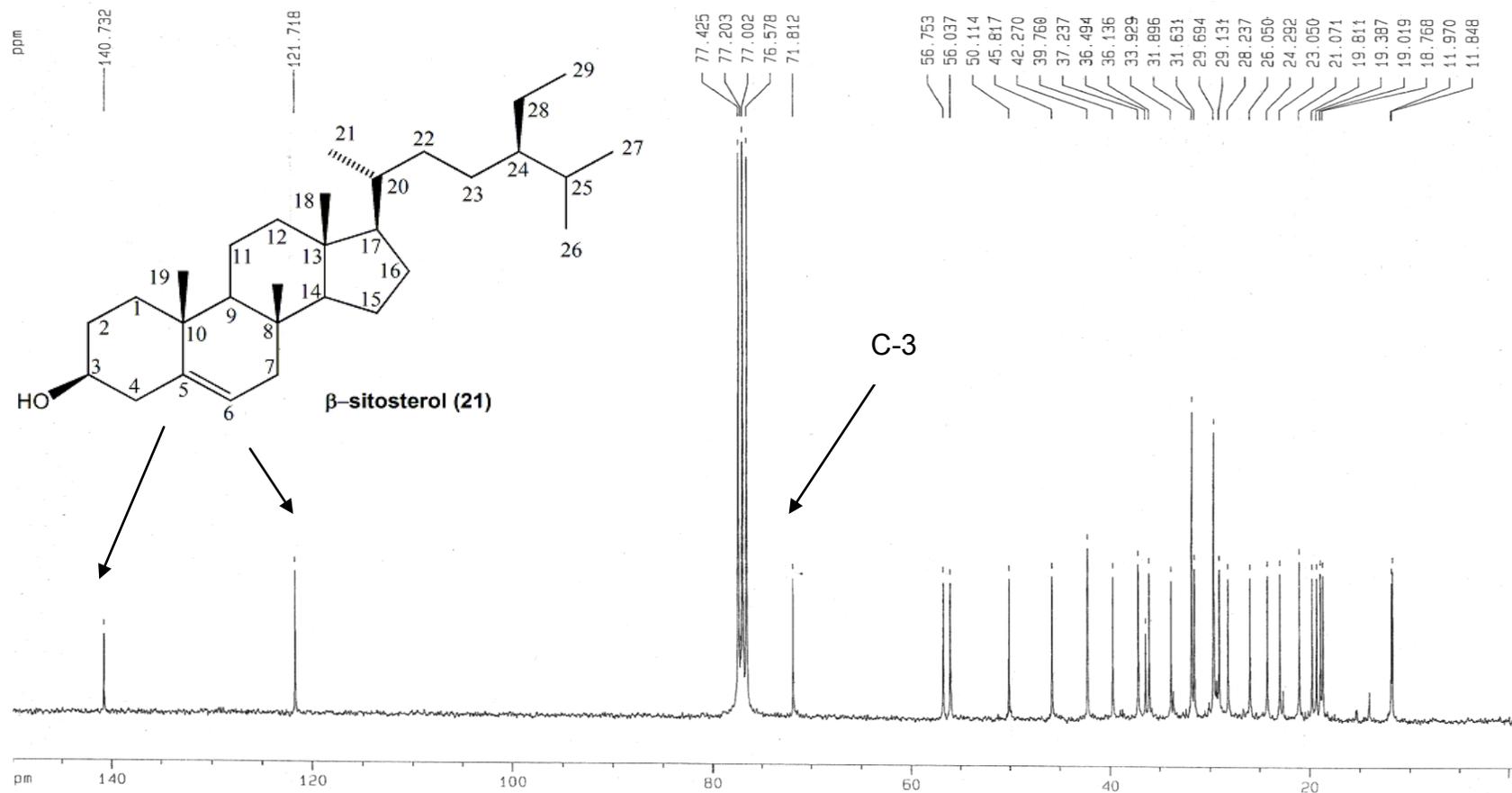
Espectro 6 : E.M. Impacto electrónico, Isomultiflorenol



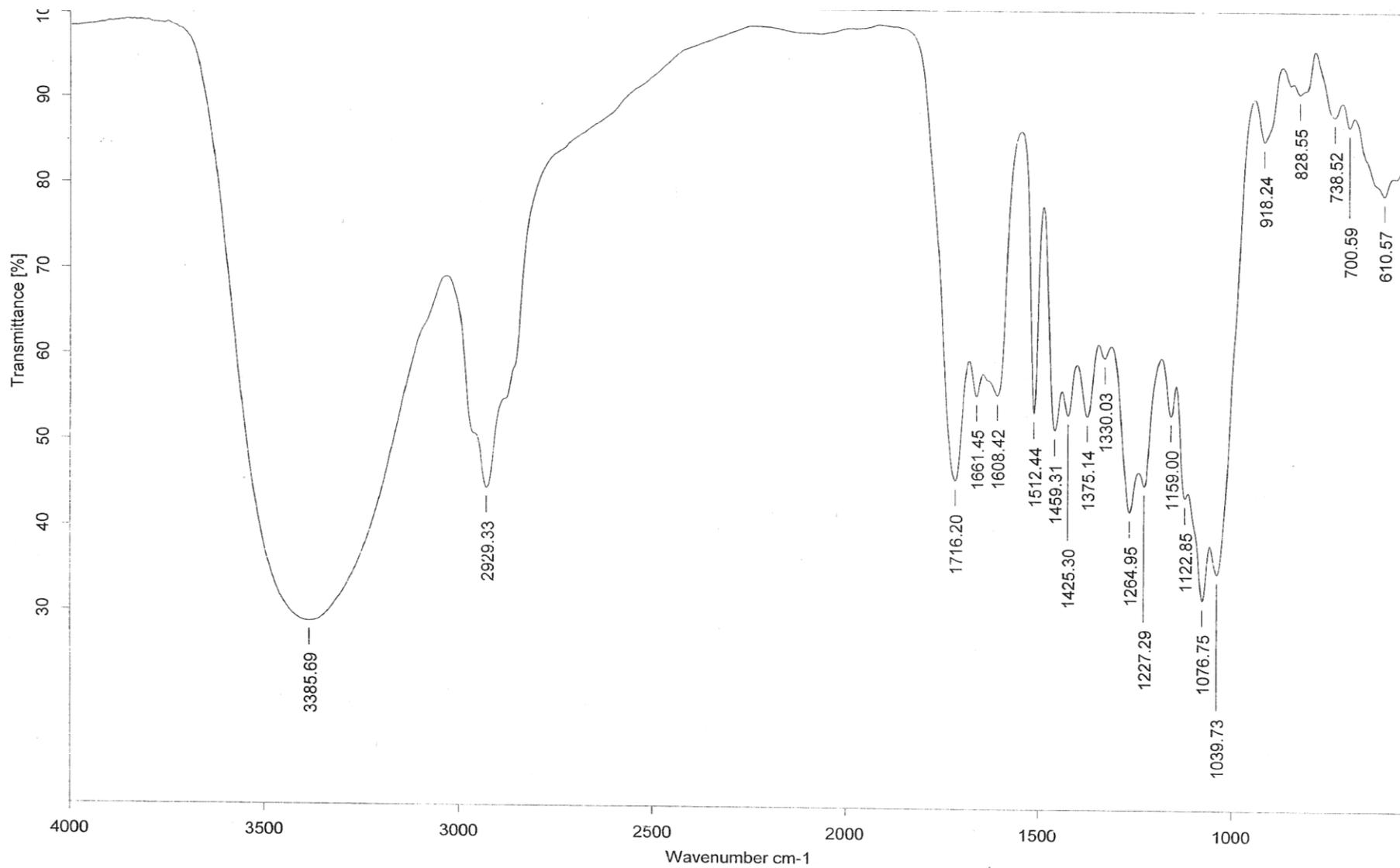
Espectro 7: RMN -  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\beta$ -sitosterol



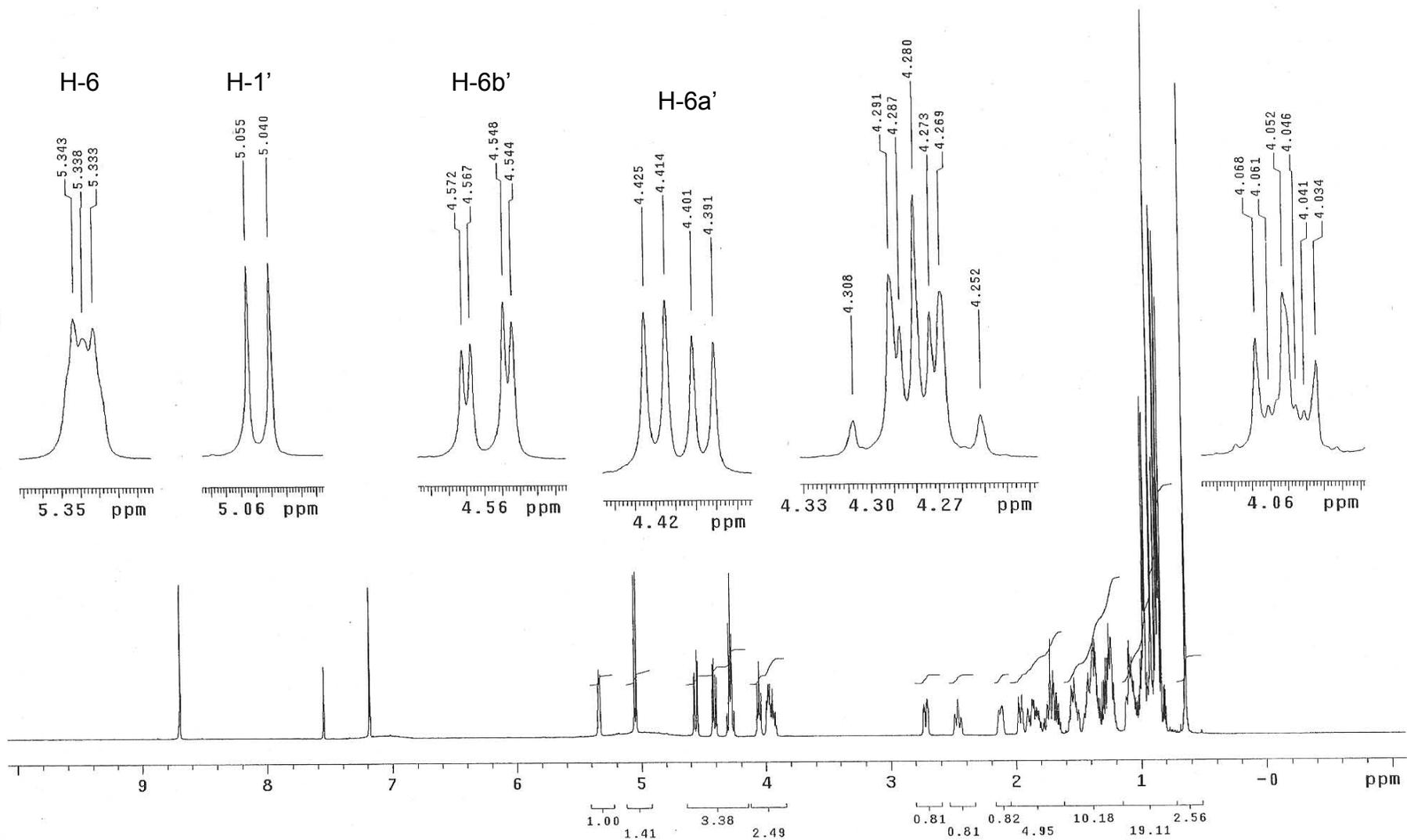
Espectro 8: RMN – <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) β-sitosterol



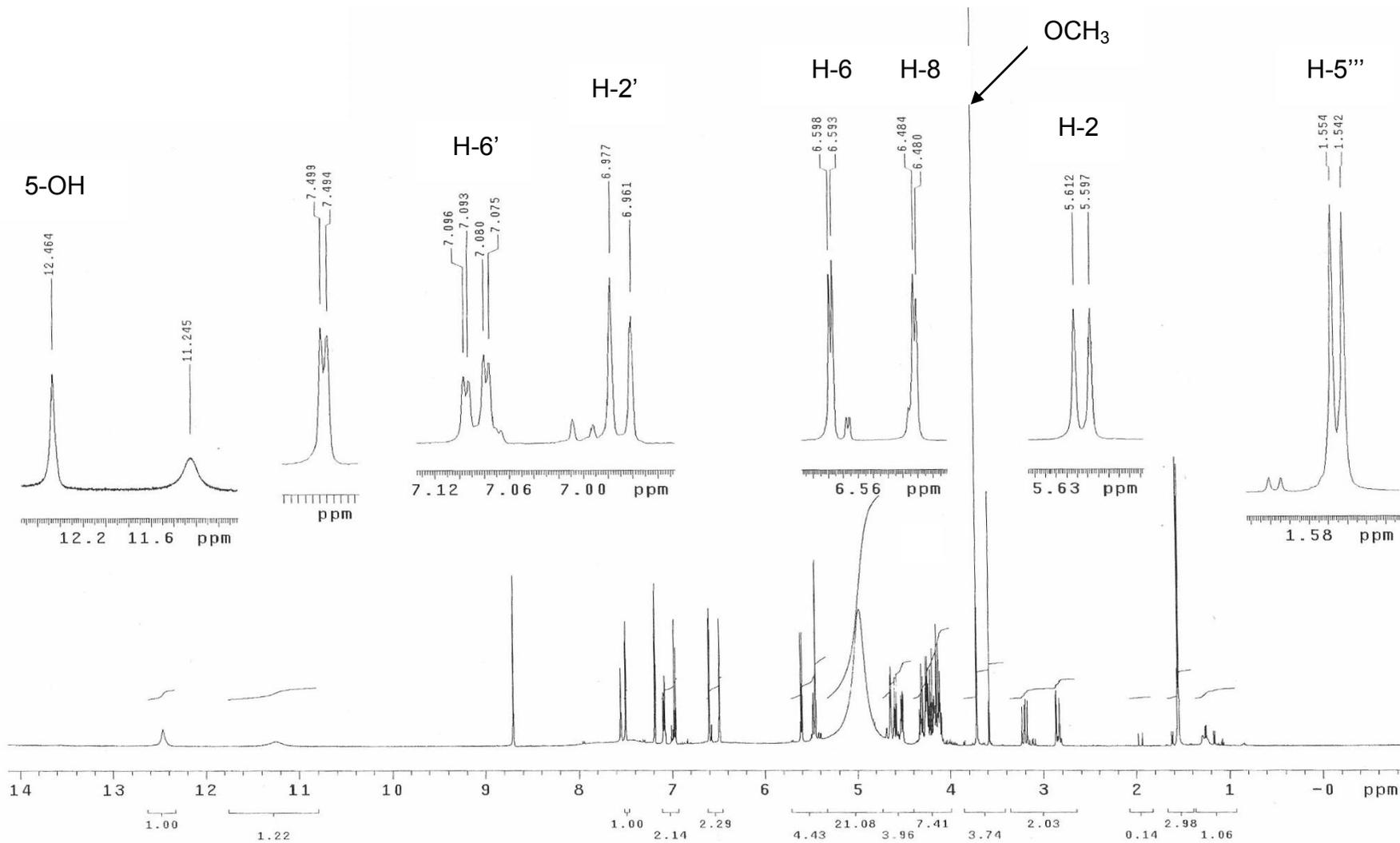
Espectro 9: IR (película)  $\beta$ -D-glucopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo



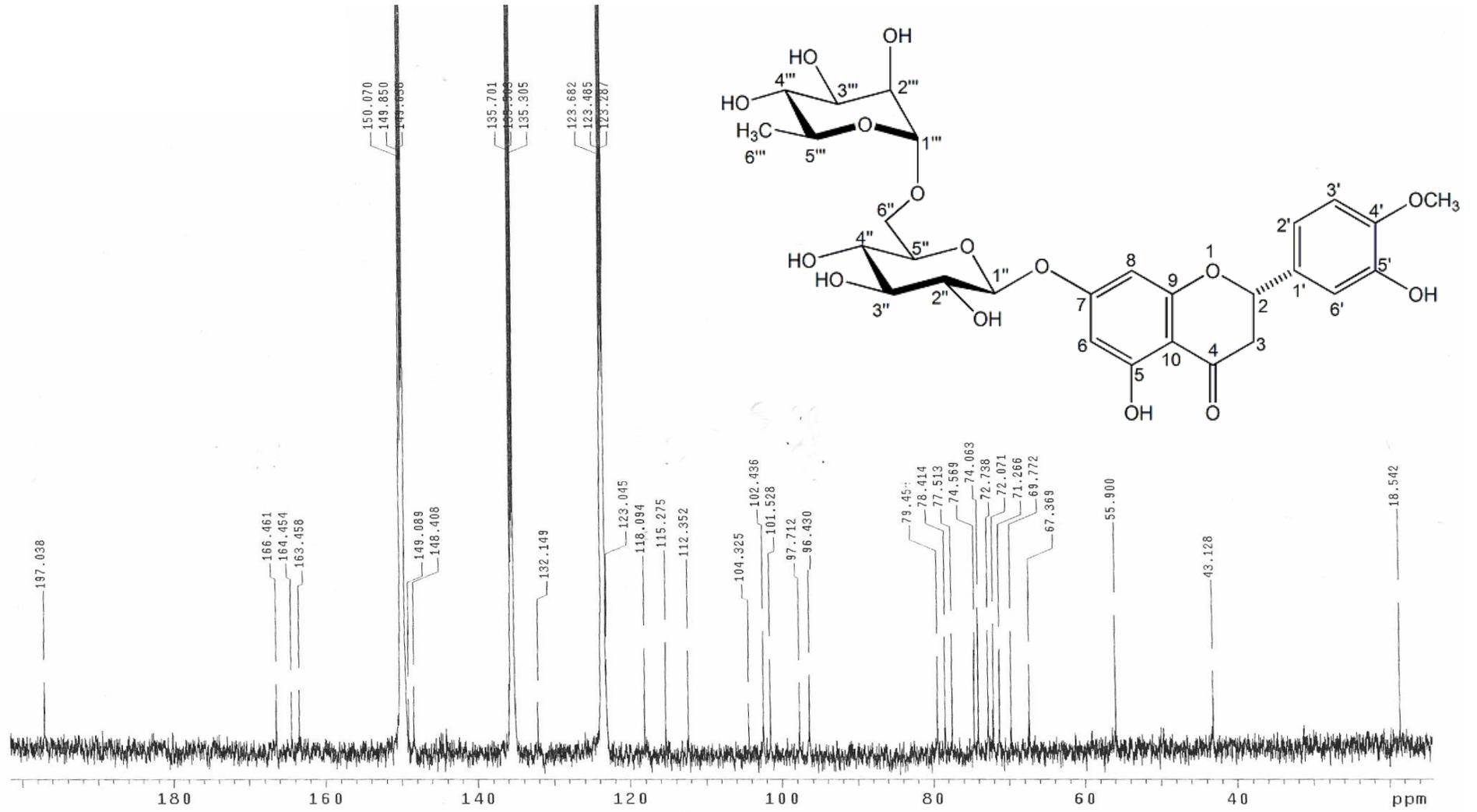
Espectro 10: RMN –  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )  $\beta$ -D-glicopiranosido de  $\beta$ -sitosterilo



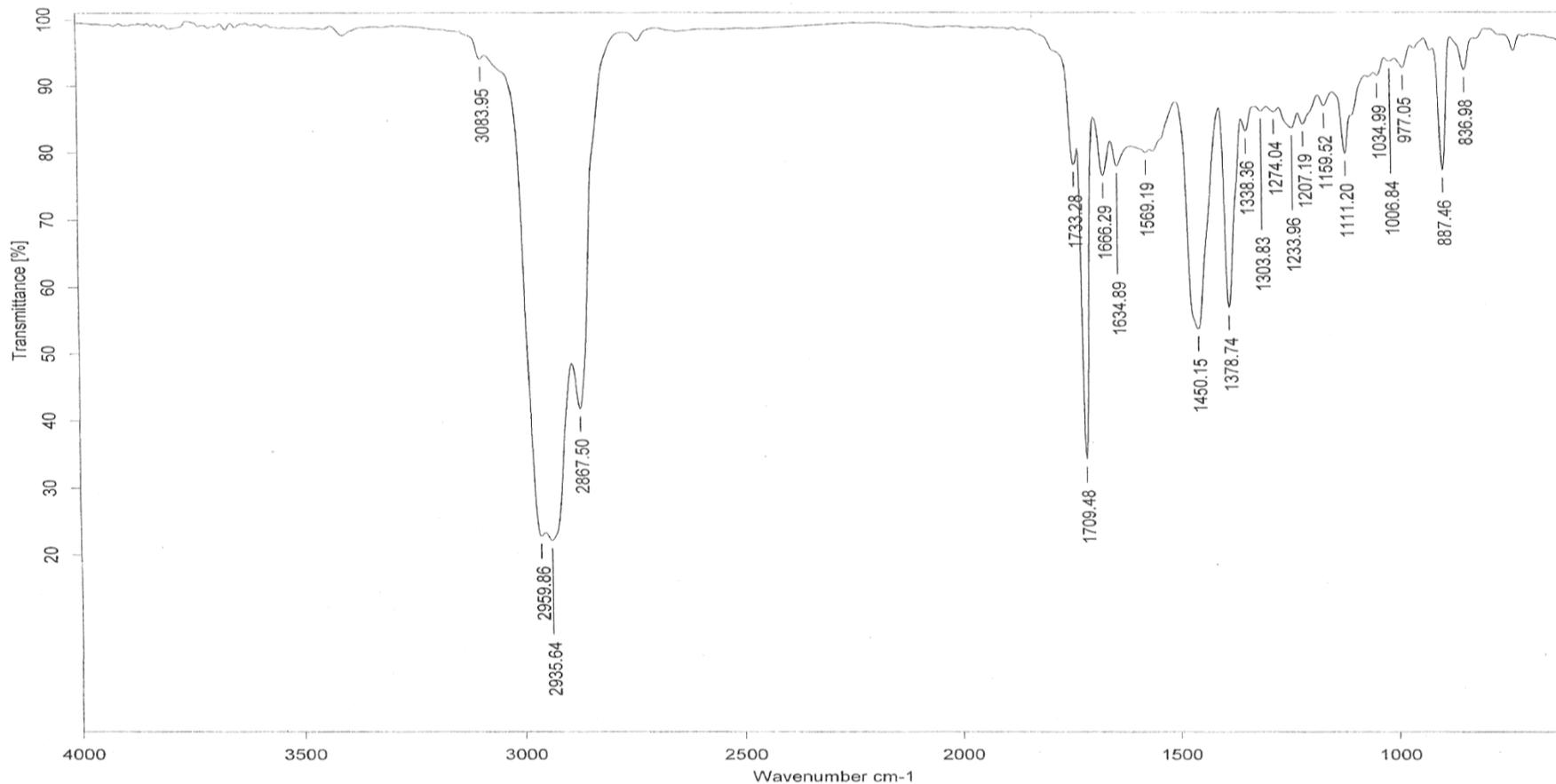
Espectro 11: RMN –  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) Hesperidina



Espectro 12: RMN – <sup>13</sup>C (125 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) Hesperidina

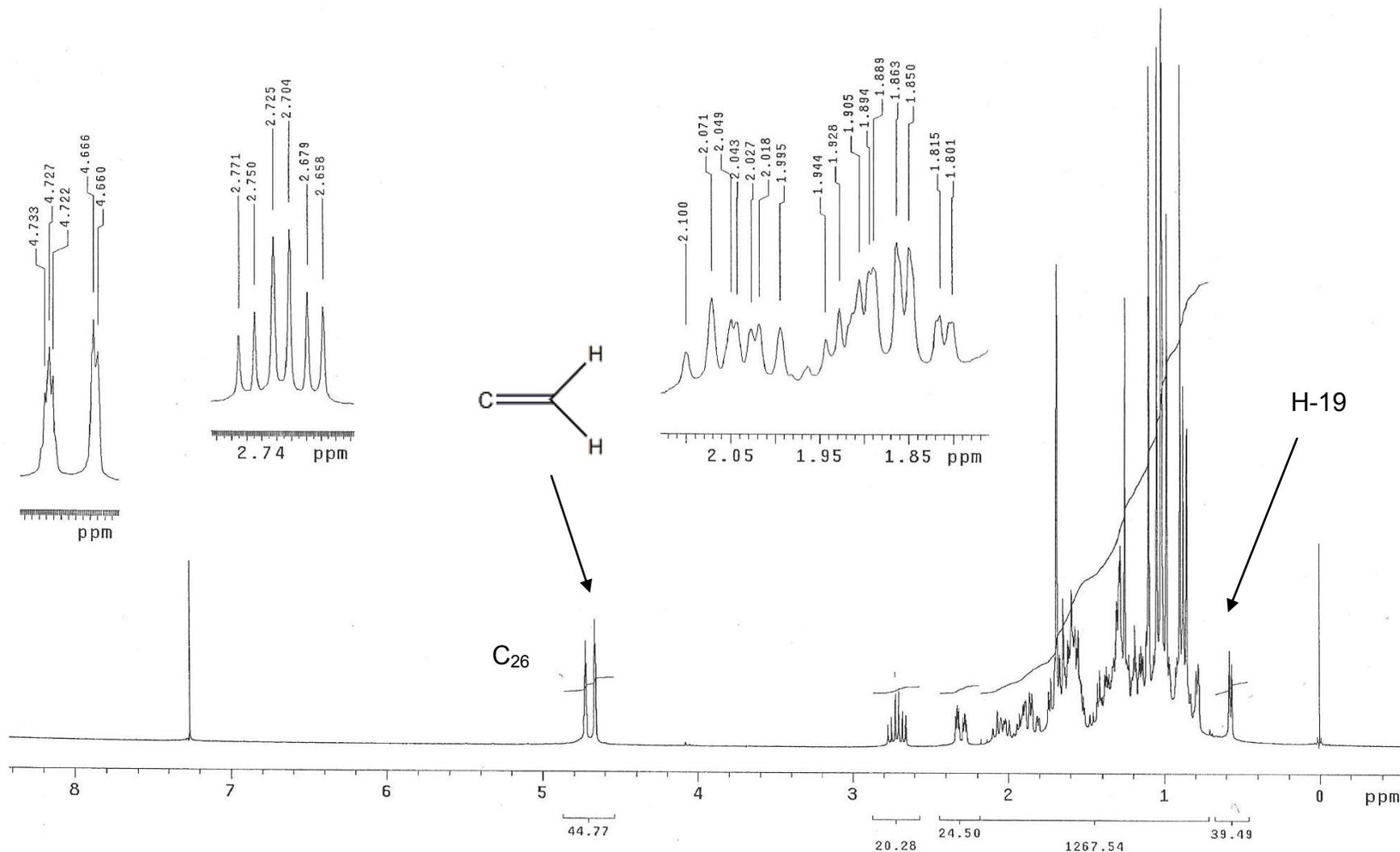


Espectro 13: IR (película) ciclobalanona

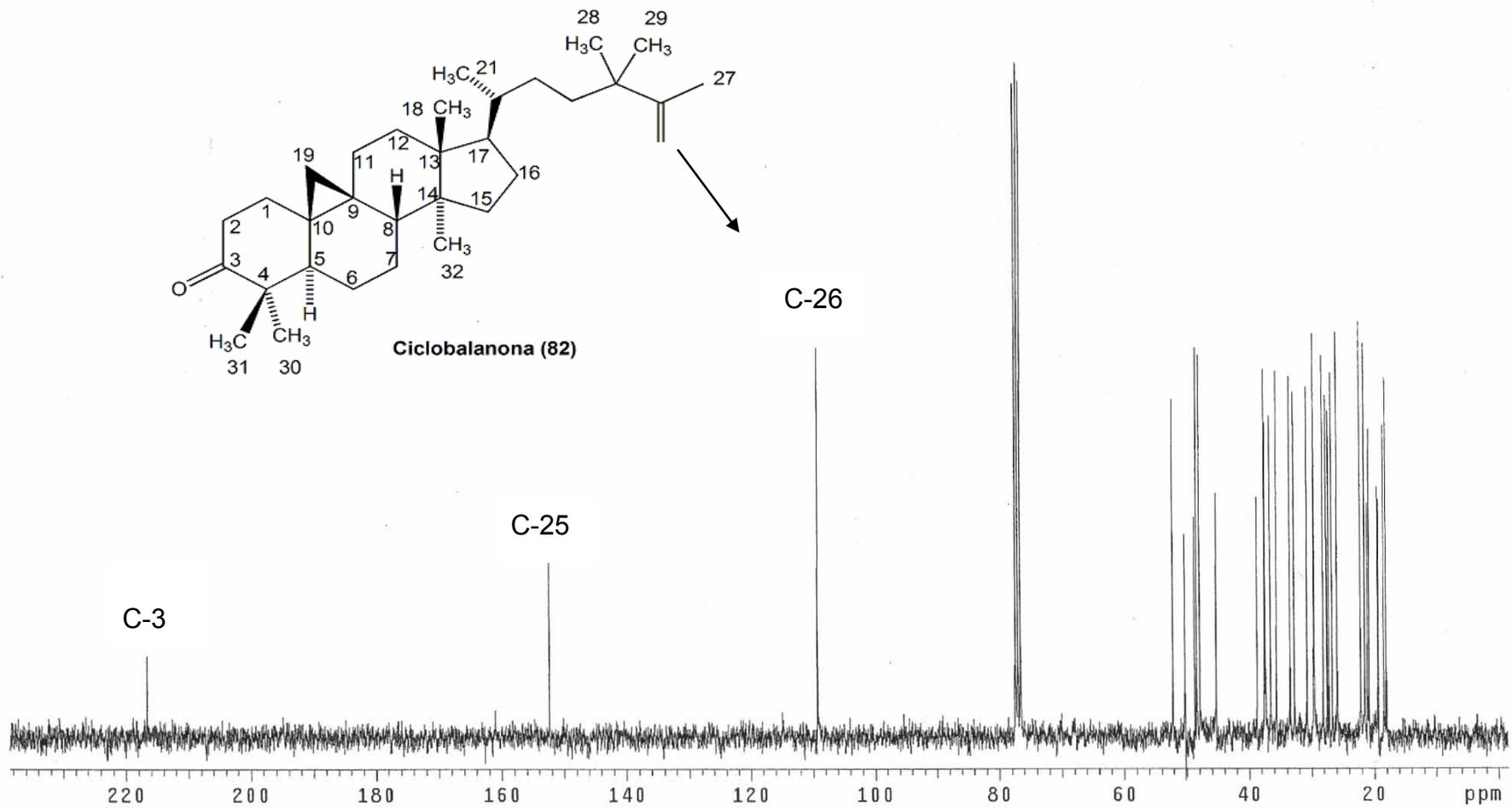


Bandas en la región 2959 y 2935 cm<sup>-1</sup> correspondientes a metilos y metilenos.  
Banda bien definida en la región de 1709 cm<sup>-1</sup> correspondiente a un grupo carbonilo  
Banda intensa en la región 1450 cm<sup>-1</sup> característica para ciclohexanos

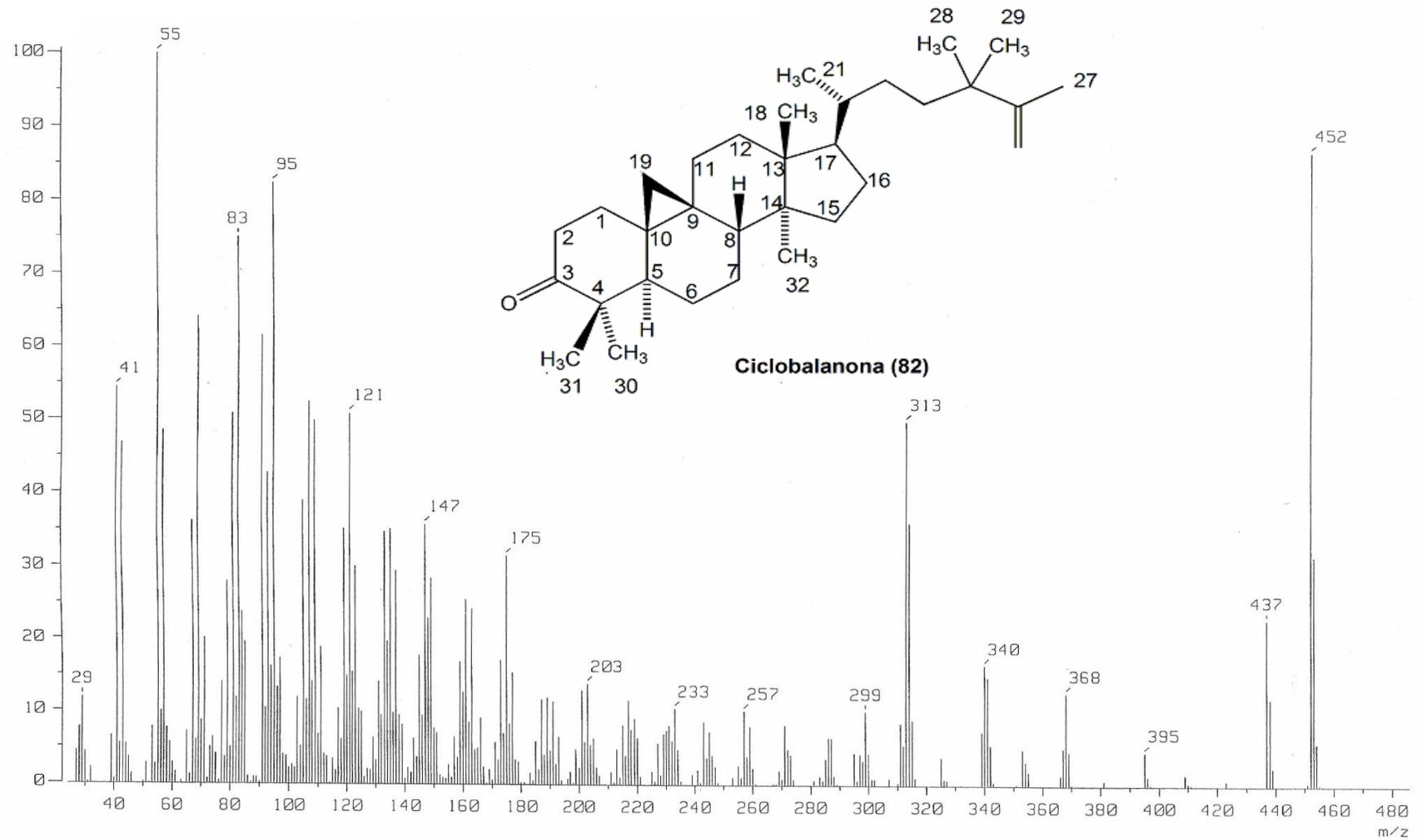
Espectro 14: RMN – <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) Ciclobalanona



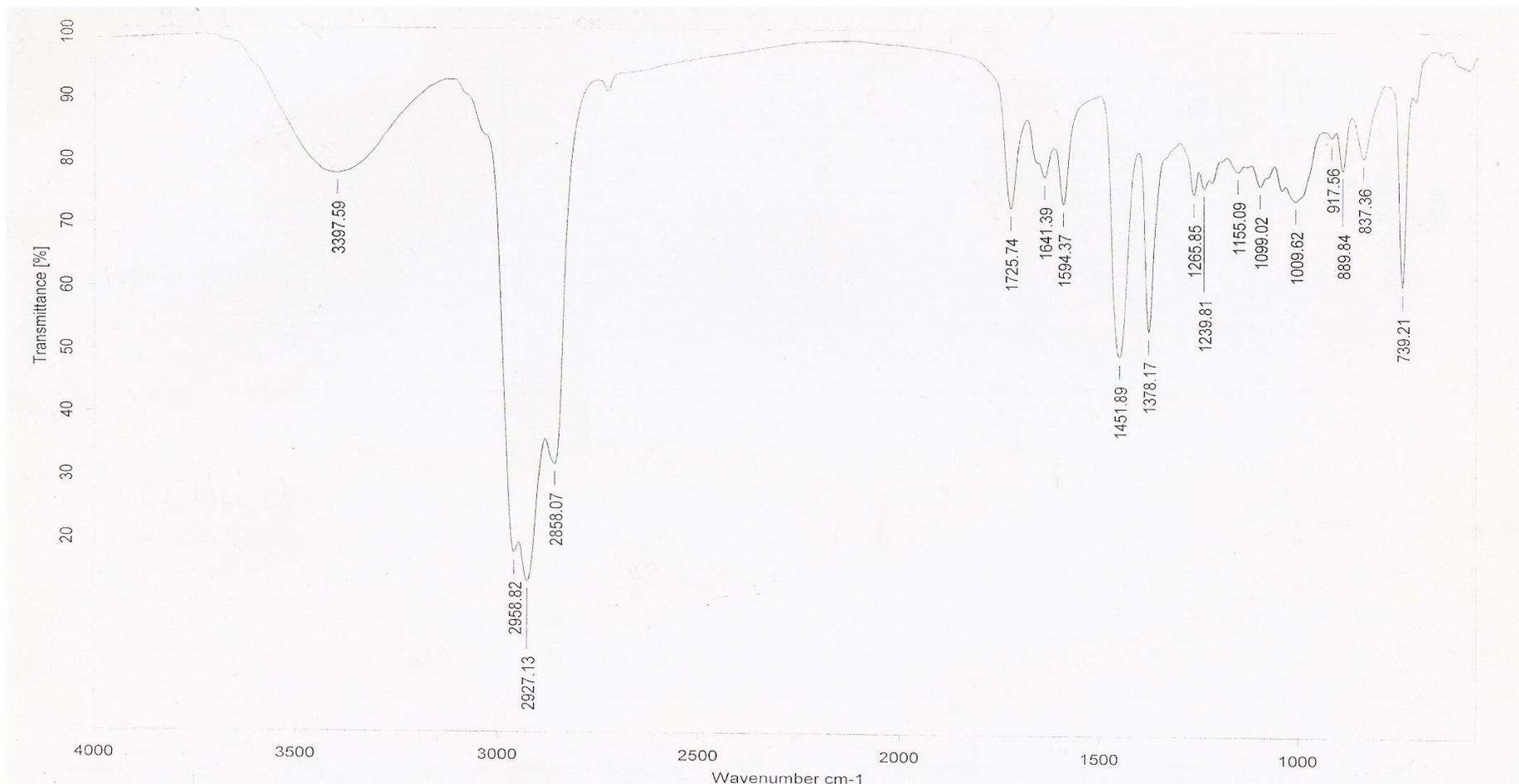
Espectro 15: RMN -  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) Ciclobalanona



Espectro 16: EM (impacto electrónico) Ciclobalanona

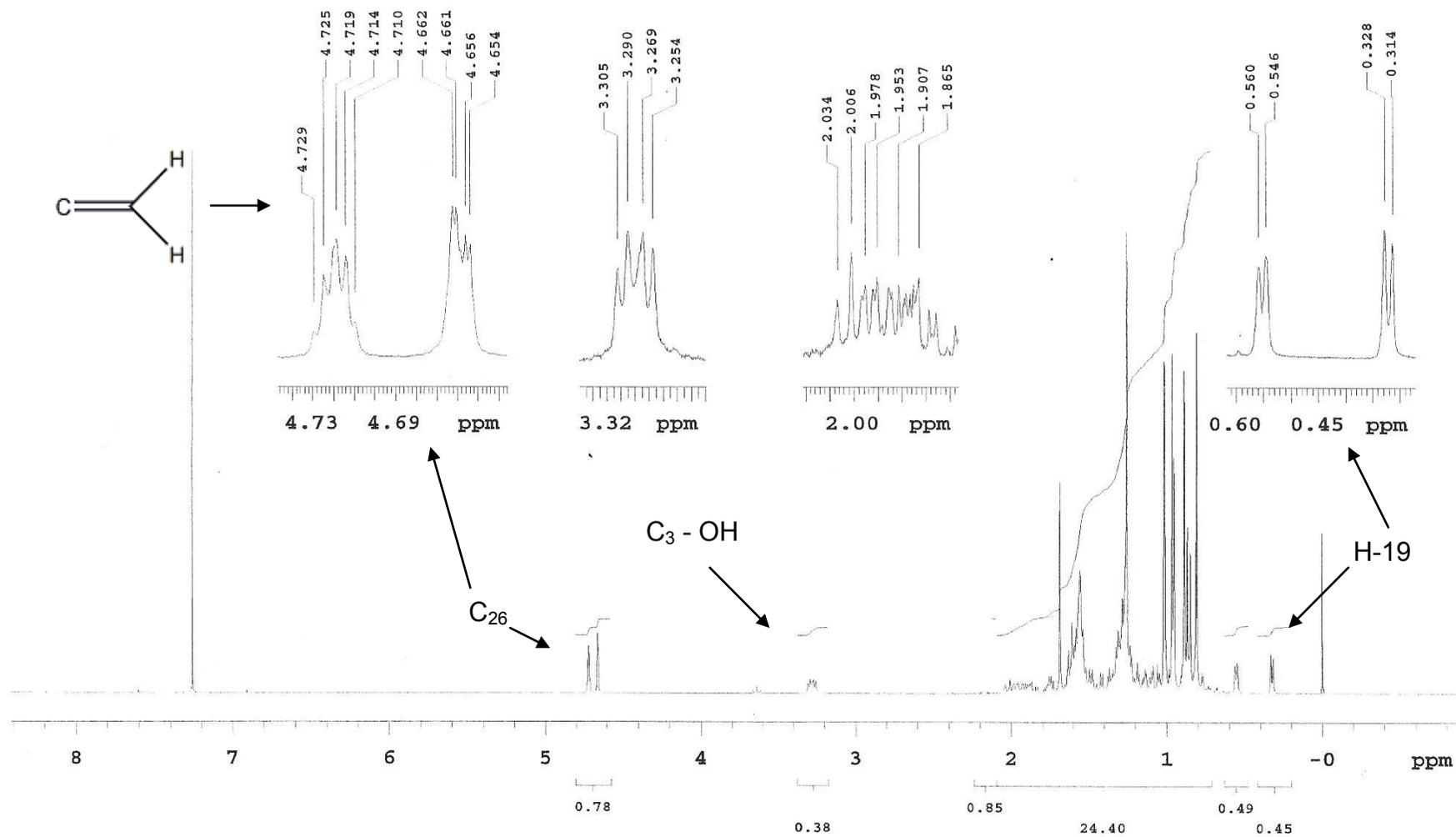


Espectro 17: IR (Película) Cicloneolitsol

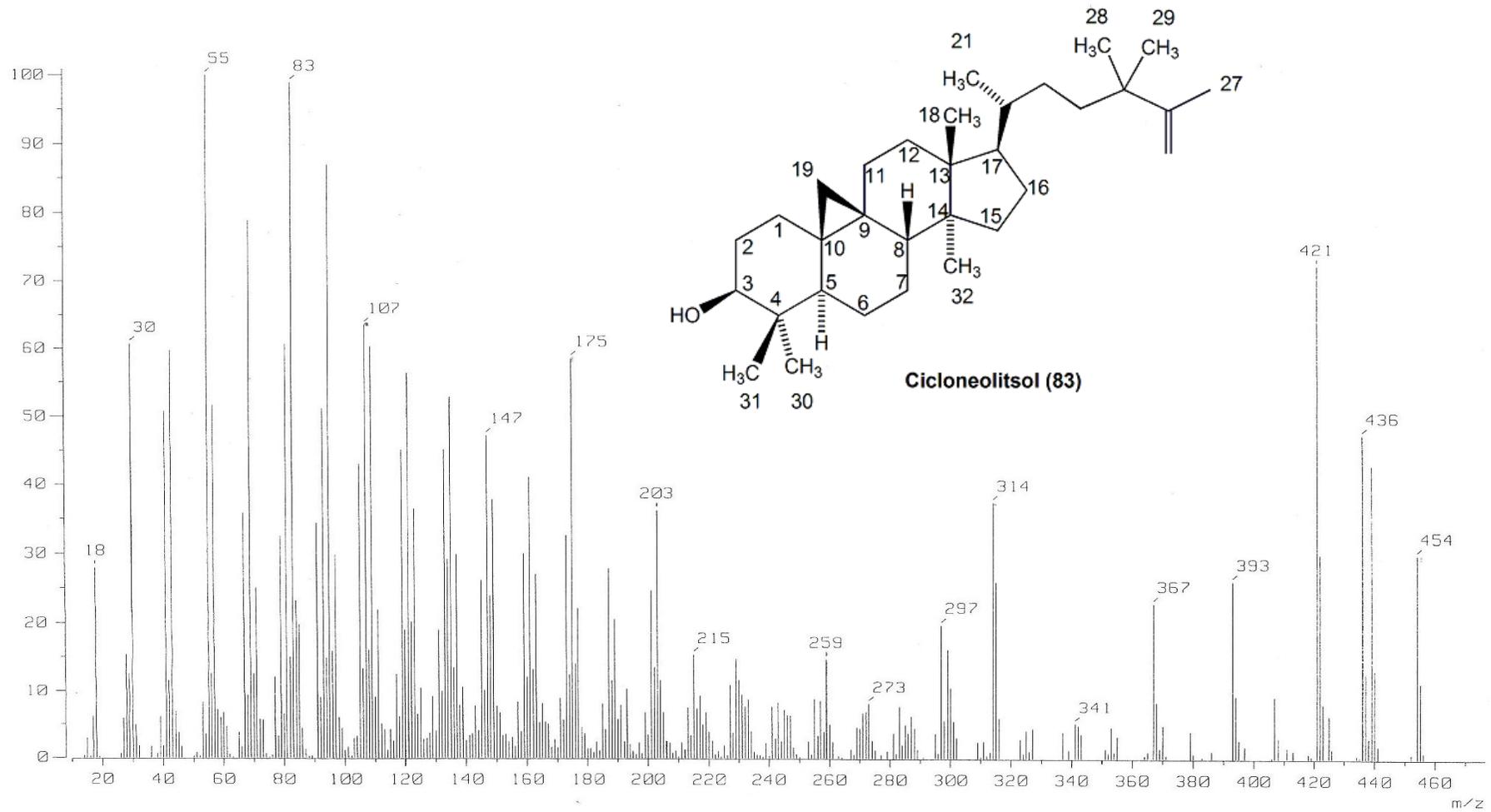


Bandas en la región 2927 y 2858  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a metilos y metilenos.  
Banda ligeramente ancha en la región de 3297  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo hidroxilo  
Banda poca intensa en la región 1451 $\text{cm}^{-1}$  característica para ciclohexanos.

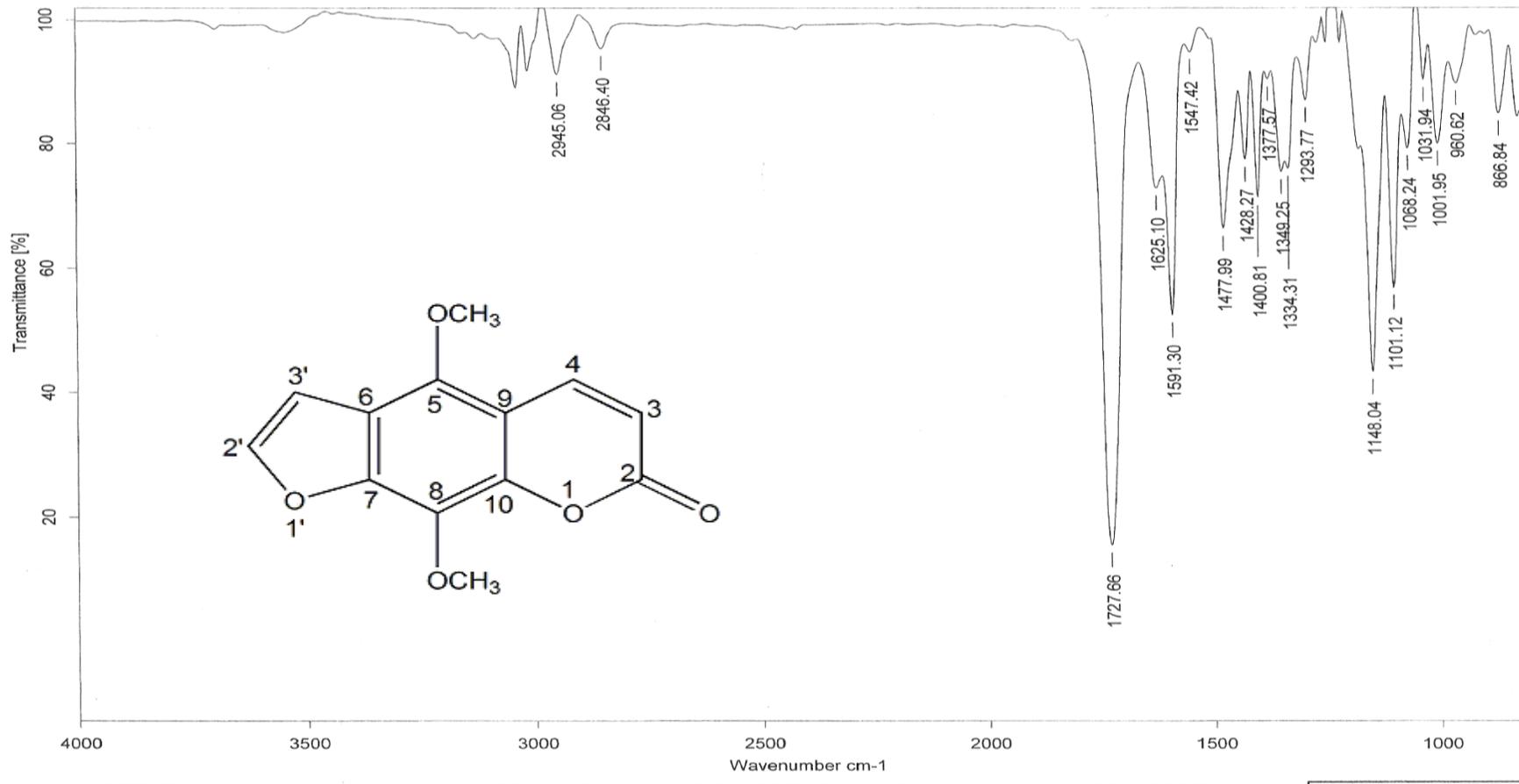
Espectro 18: RMN –  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) Cicloneolitsol



Espectro 19: EM (Impacto electrónico) cicloneolitsol

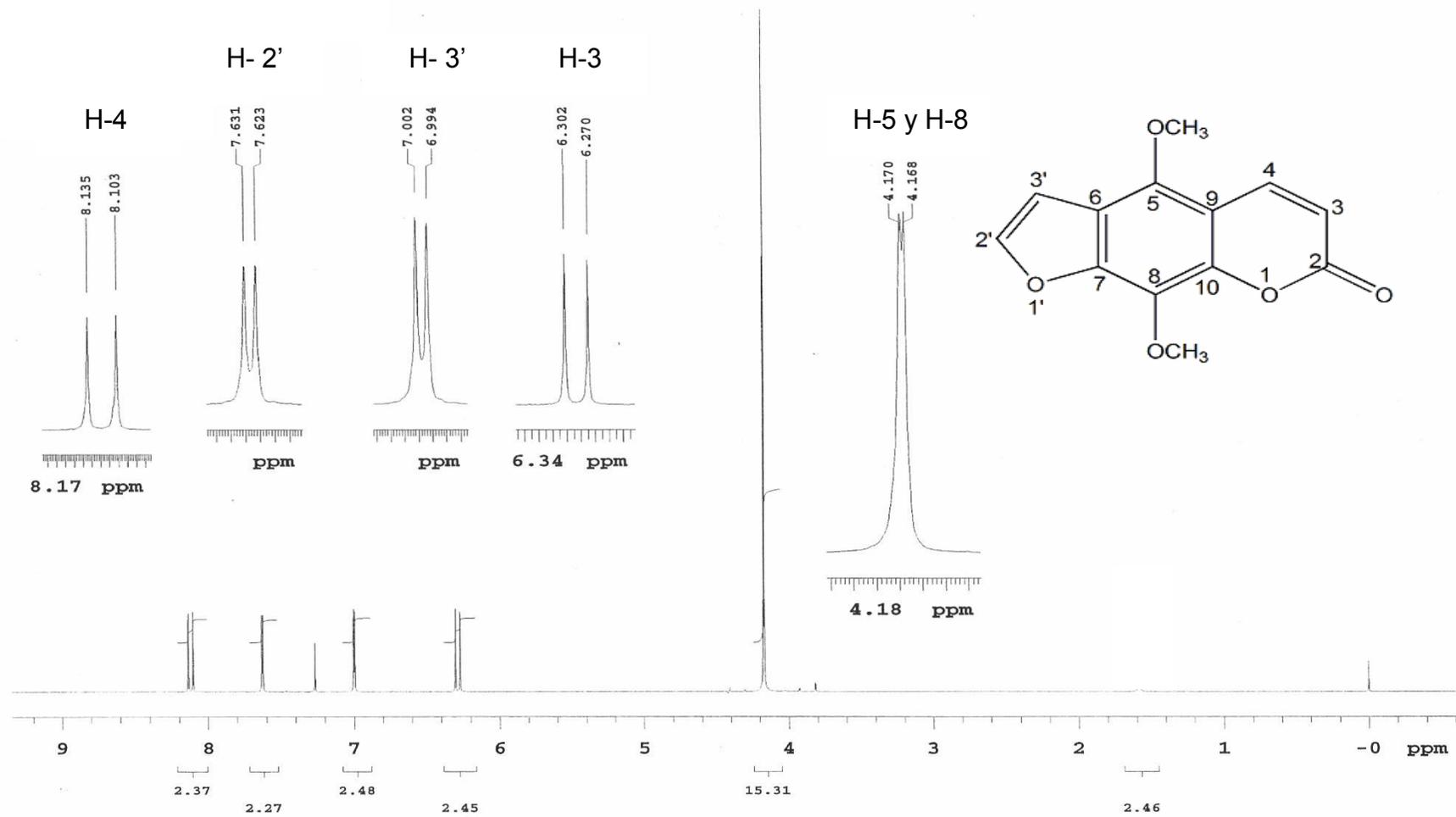


### Espectro 20: IR (CHCl<sub>3</sub>) Isopimpinina

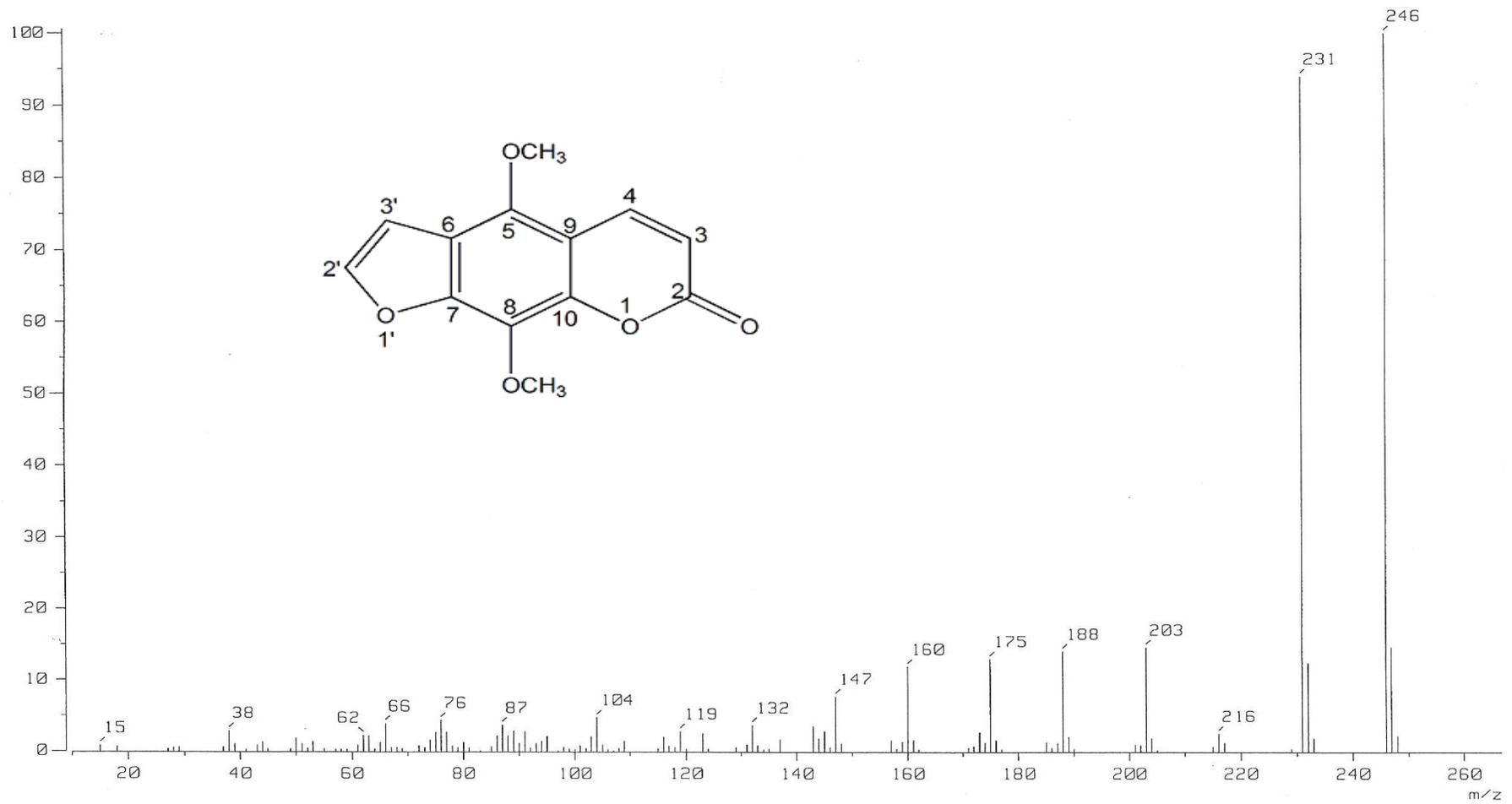


Señales débiles en 2945 y 2848 cm<sup>-1</sup> que corresponden a Metilos y metilenos.  
Señal intensa y prolongada em 1727 cm<sup>-1</sup> que corresponde a una vibración de tipo carbonilo  
Señal correspondiente a unión tipo Éter 1129 cm<sup>-1</sup>  
Aromático estiramiento C-H en 3036 cm<sup>-1</sup>  
Señal que corresponde a una vibración para un núcleo bencénico 1584 cm<sup>-1</sup>

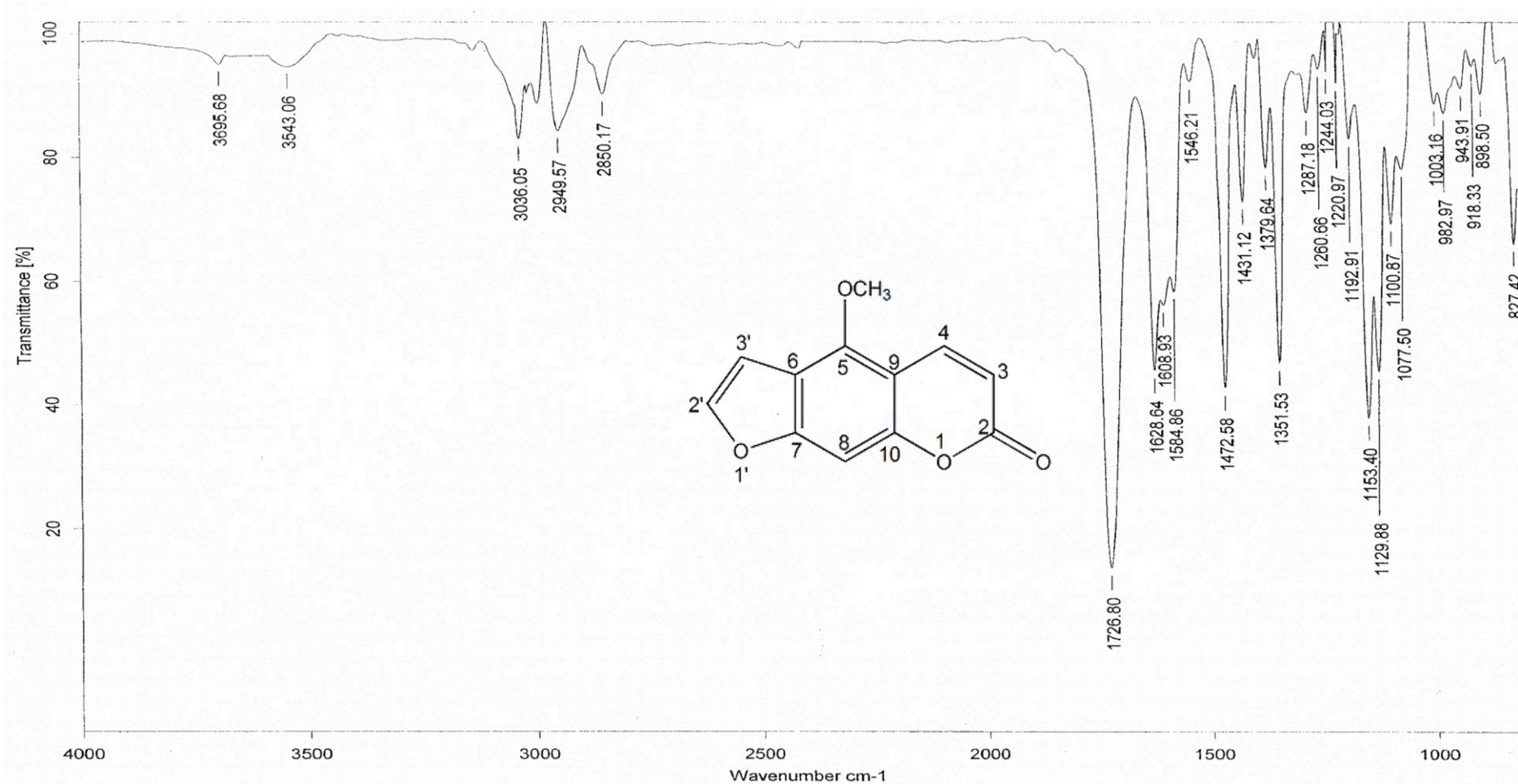
Espectro 21: RMN –  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) Isopimpineline



Espectro 22: EM (Impacto electrónico) Isopimpinina

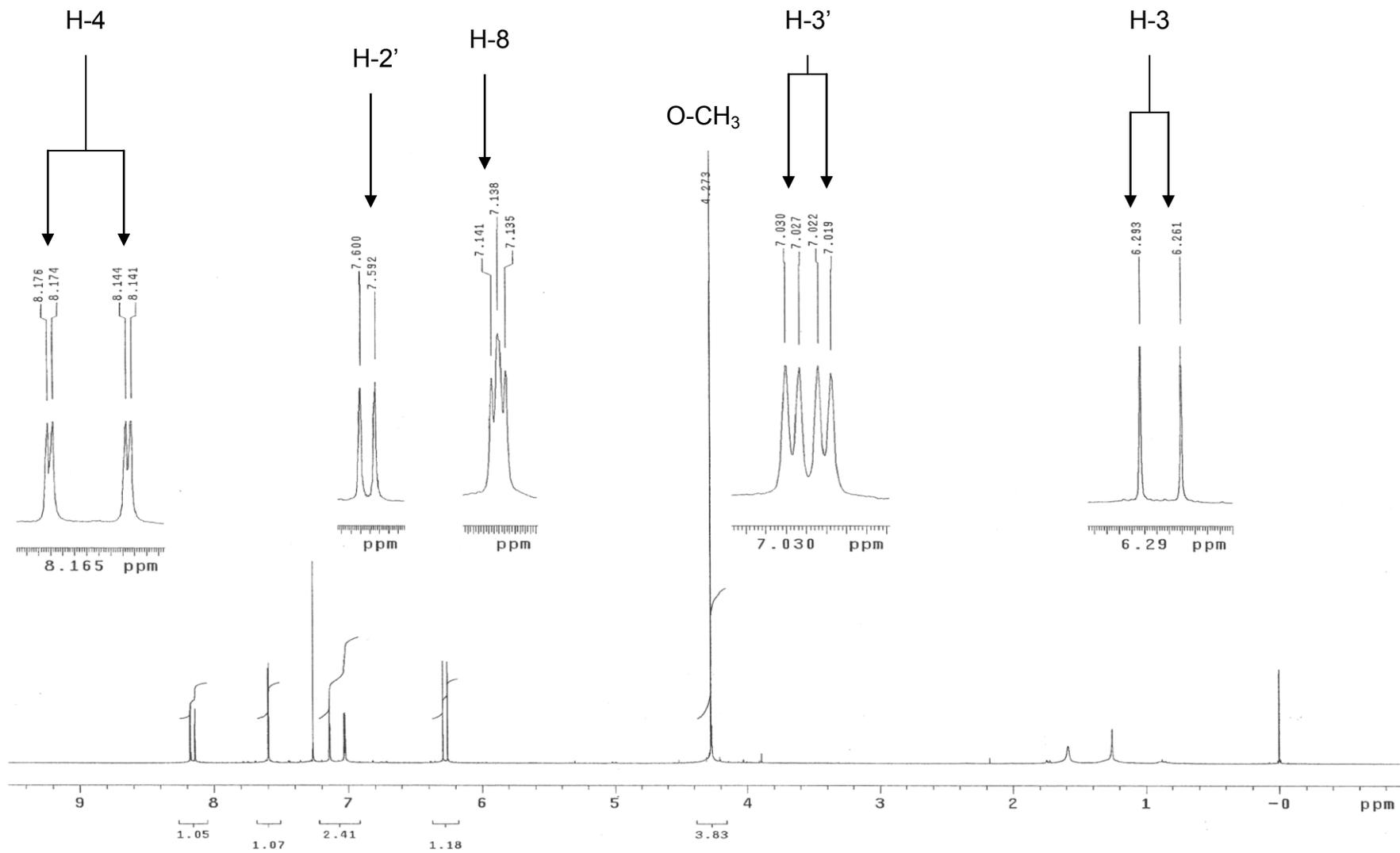


### Espectro 23: IR (CHCl<sub>3</sub>) Bergapteno



Señales débiles en 2949 y 2850 cm<sup>-1</sup> que corresponden a Metilos y metilenos.  
Señal intensa y prolongada en 1726 cm<sup>-1</sup> que corresponde a una vibración de tipo carbonilo  
Señal correspondiente a unión tipo Éter 1129 cm<sup>-1</sup>  
Estiramiento Aromático C-H en 3036 cm<sup>-1</sup>  
Señal que corresponde a una vibración para un núcleo bencénico 1584,1628 cm<sup>-1</sup>

Espectro 24: RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ), Bergapteno



Espectro 25: EM (Impacto electrónico) Bergapteno

