



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DE TESIS

**“Estudio químico de la infusión preparada a partir de las
hojas de *Exostema caribaeum* (JACQ.) Roemer &
Schultes (Rubiaceae)”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARIANA ELISA CARRILLO PIÑA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

VOCAL: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

SECRETARIO: Dra. Araceli Pérez Vásquez

1er. SUPLENTE: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

2° SUPLENTE: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPTO. FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ARACELI PÉREZ VÁSQUEZ

SUSTENTANTE :

MARIANA ELISA CARRILLO PIÑA

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 124,
Conjunto E, Departamento de Farmacia,
de la Facultad de Química de la UNAM.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE ESPECTROS	iv
ABREVIATURAS	v
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades sobre <i>Exostema caribaeum</i>	1
1.2 Antecedentes químicos	5
1.3 Antecedentes farmacológicos	7
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
3. PARTE EXPERIMENTAL	10
3.1 Procedimientos generales	10
3.1.1 Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas	10
3.1.2 Análisis cromatográficos	10
3.2 Materia vegetal	11
3.3 Preparación de la Fracción de AcOEt a partir de la infusión de las hojas	12
3.4 Fraccionamiento primario de la Fracción de AcOEt	13
3.5 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento primario	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1 Aislamiento y elucidación estructural de las 4-fenilcumarinas (12-14)	16
4.2 Aislamiento de los Flavonoides Isoquercitrina (15) e Hiperósido (16)	22
5. CONCLUSIONES	31
6. REFERENCIAS	32
ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Árbol de <i>E. caribaeum</i>	2
Figura 2. Hojas secas de <i>E. caribaeum</i>	2
Figura 3. Flor de <i>E. caribaeum</i>	2
Figura 4. Distribución de <i>E. caribaeum</i> dentro de la República Mexicana	3
Figura 5. Distribución en el Caribe de <i>E. caribaeum</i>	3
Figura 6. Droga cruda de <i>E. caribaeum</i>	4
Figura 7. Diagrama general del proceso de preparación de la Fracción de AcOEt	12
Figura 8. Diagrama del Fraccionamiento primario de la Fracción de AcOEt	13
Figura 9. Diagrama del Fraccionamiento primario de la infusión de las hojas de <i>E. caribaeum</i>	15
Figura 10. Análisis por CLAE de la mezcla de los dos flavonoides obtenidos del estudio químico de las hojas	23
Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE de la infusión de las hojas de <i>E. caribaeum</i>	28
Figura 12. Perfil cromatográfico por CLAE del extracto orgánico de AcOEt de las hojas de <i>E. caribaeum</i>	29
Figura 13. Espectro de UV de las 4-fenilcumarinas aisladas	30

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de la corteza de <i>E. caribaeum</i>	6
Cuadro 2. Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos por CCD	11
Cuadro 3. Fraccionamiento primario	14
Cuadro 4. Fraccionamiento primario del extracto acuoso	15
Cuadro 5. Glicosidos de 4-Fenilcumarinas aisladas de las hojas de <i>E. caribaeum</i>	18
Cuadro 6. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 12	19
Cuadro 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 13	20
Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 14	21
Cuadro 9. Datos espectroscópicos de los compuestos 15 y 16	24
Cuadro 10. Composición de las hojas de <i>E. caribaeum</i>	27

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto 12	36
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del compuesto 12	36
Espectro 3a) Espectro HSCQ del compuesto 12	37
Espectro 3b) Espectro COSY del compuesto 12	37
Espectro 3c) Espectro HMBC del compuesto 12	37
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto 13	38
Espectro 4. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del compuesto 13	38
Espectro 6a) Espectro HSCQ del compuesto 13	39
Espectro 6b) Espectro COSY del compuesto 13	39
Espectro 6c) Espectro HMBC del compuesto 13	39
Espectro 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto 14	40
Espectro 8. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del compuesto 14	40
Espectro 9a) Espectro HSCQ del compuesto 14	41
Espectro 9b) Espectro COSY del compuesto 14	41
Espectro 9c) Espectro HMBC del compuesto 14	41
Espectro 10. Espectro de masas FAB^- del compuesto 12	42
Espectro 11. Espectro de masas FAB^+ del compuesto 13	42
Espectro 12. Espectro de masas FAB^+ del compuesto 14	43
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de la mezcla de los compuestos 15 y 16	44
Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de la mezcla de los compuestos 15 y 16	44
Espectro 15a) Espectro HSCQ de los compuestos 15 y 16	45
Espectro 15b) Espectro COSY de los compuestos 15 y 16	45
Espectro 15c) Espectro HMBC de los compuestos 15 y 16	45

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados Celsius
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCD	Cromatografía en capa delgada analítica
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de Masas
CG-FID	Cromatografía de gases con Detector de Ionización de Flama
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CL ₅₀	Concentración letal media
cm	Centímetro
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doblete dobleteado
δ	Desplazamiento químico
DMSO	Dimetil sulfóxido
g	Gramo
Hz	Hertz
H ₂ O	Agua
H ₂ O _{dd}	Agua desionizada
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
KBr	Bromuro de Potasio
Kg	Kilogramo
λ	Longitud de onda
m	Metro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
μ g	Microgramo
mm	Milímetro

μm	Micrómetro
MS-FAB	Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Acelerados
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear protónica
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre *Exostema caribaeum*

El género *Exostema* (familia Rubiaceae, subfamilia Cinchonoideae) contiene documentadas, 25 especies distribuidas en el continente americano, desde Perú hasta México, pasando por las islas del Caribe, Bahamas y los Cayos de la Florida. (McDowell y Bremer, 1998). Originalmente fue descrita como un subgénero de *Cinchona* y posteriormente fue reconocida como un género distinto por Bonpland en 1807 (McDowell y Bremer, 1998).

Dentro de este género encontramos a la especie *Exostema caribaeum* (Jacq.) Roemer & Schultes la cual es un arbusto originario de la República Dominicana y Cuba (Figura 1), crece en clima cálido, semicálido y templado entre los 800 y los 100 m. Está asociada al bosque tropical caducifolio y subcaducifolio; bosque espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino. Llega a medir hasta 8 m de altura y sus hojas son alargadas y puntiagudas, de color verde (Figura 2). Sus flores son blancas y en forma de campana con 5 pétalos largos (Figura 3) (Anaya, 1991; Argueta, *et al.*, 1994).

En nuestro país se distribuye en algunos estados del Sur-sureste mexicano (Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Yucatán, Veracruz), del centro (Estado de México, Morelos, Puebla), de la cuenca del Pacífico (Michoacán, Jalisco, Colima) y en el Bajío (Querétaro, Guanajuato, San Luis Potosí, Tamaulipas) (Mata, *et al.*, 1987; Anaya, 1991; Pinto, *et al.*, 1997). También, tiene una distribución caribeña: Bahamas, Cuba, República Dominicana, Haití, Jamaica, Costa Rica, Honduras, Guatemala, Puerto Rico, El Salvador, Nicaragua y los cayos de la Florida (Figuras 4 y 5).

Es popularmente conocida con los nombres de copalchi, copalche, copalchi de Michoacán, corteza de Jojutla, jocotillo del cerro, quina de Michoacán, falsa quina, palo santo, copalchi de Jojutla, planta de la quina, chaktiis y sabakche' (Anaya, 1991).



Figura 1. Árbol de *E. caribaeum*



Figura 2. Hojas secas de *E. caribaeum*



Figura 3. Flor de *E. caribaeum*



Figura 4. Distribución de *E. caribaeum* dentro de la República Mexicana
(Adaptado de: Trópicos, 2012; UNIBIO, 2013; MEXU, 2013)

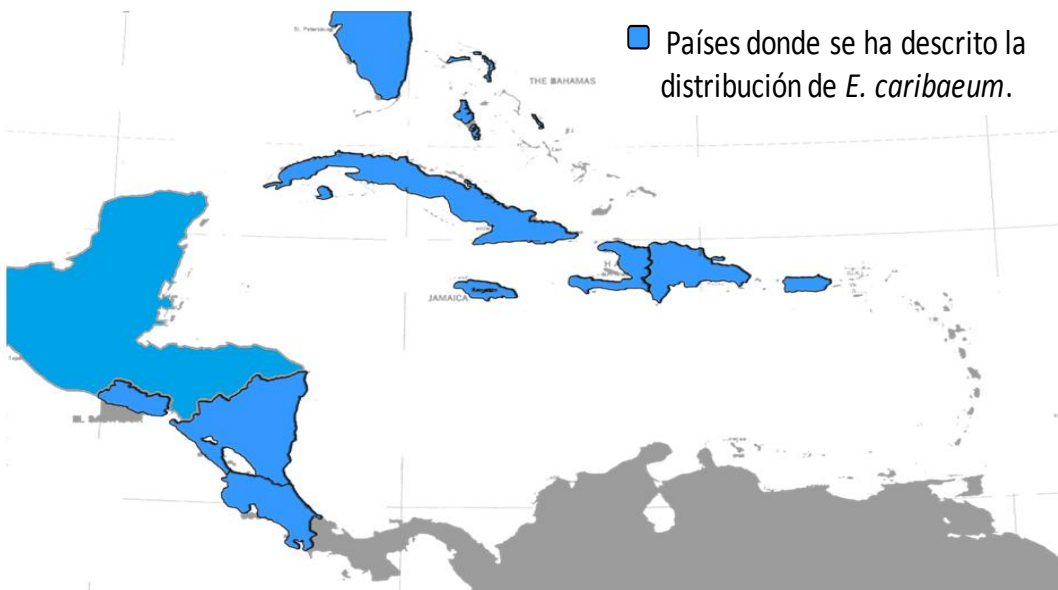


Figura 5. Distribución en el Caribe de *E. caribaeum*
(Adaptado de: Trópicos, 2012; UNIBIO, 2013; MEXU, 2013)

Por lo que respecta a sus usos, *E. caribaeum* es una especie sujeta a explotación forestal ya que es utilizada en algunos estados del sureste mexicano como leña, para obtener carbón y como madera para construcción (Reyes-García, *et al.*, 2012). En las prácticas médicas tradicionales de nuestro país la parte que se utiliza es la corteza (Figura 6). Esta se emplea para tratar padecimientos gastrointestinales, para las amibas y la solitaria (Díaz, 1976; Argueta, *et al.*, 1994). También, se ha utilizado como agente antidiabético (Anaya, 1991).



Figura 6. Droga cruda de *E. caribaeum*

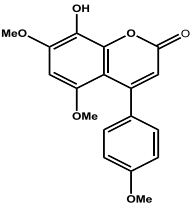
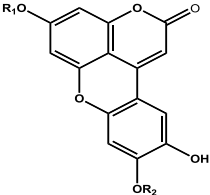
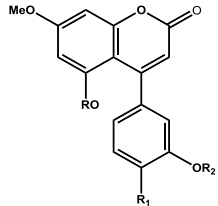
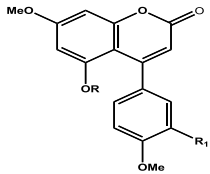
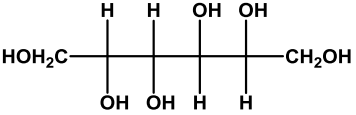
E. caribaeum junto con *Hintonia latiflora*, *Coutarea hexandra*, *Exostema mexicanum* y *Hintonia standleyana* son las especies de la familia Rubiaceae que conforman el complejo copalchi, las cuales se caracterizan por sus cortezas extremadamente amargas y útiles en el tratamiento del paludismo y la diabetes (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007).

1.2 Antecedentes químicos

La única parte de *E. caribaeum* que se ha investigado desde el punto de vista químico es la corteza del tallo de la cual se han aislado, hasta la fecha, principalmente compuestos de tipo 4-fenilcumarinas (neoflavonoides). En 1969 Sánchez-Viesca aisló a partir de un extracto bencénico la exostemina **(1)**. Posteriormente, Mata y colaboradores (1987; 1988) describieron el aislamiento de otras nueve 4-fenilcumarinas a partir del extracto metanólico: 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina **(2)**, 7,4'-dimetoxi-5'-hidroxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina **(3)**, 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxicumarina **(4)**, 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina **(5)**, 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcumarina **(6)**, 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina **(7)**, 5-O- β -D-galactopiranosil-7,4',dimetoxi-4-fenilcumarina **(8)**, 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina **(9)**, 6''acetil-5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina **(10)** (Cuadro 1).

También se ha descrito la presencia del manitol **(11)** así como del ácido clorogénico **(17)**; sin embargo, este último solamente fue identificado por cromatografía en papel (Krebs y Griesinger, 1960).

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados de la corteza de *E. caribaeum*

ESTRUCTURA	REFERENCIA
 <p>Exostemina (1)</p>	<p>Sánchez- Viesca, <i>et al.</i>, 1969</p>
 <p>2: R₁=H R₂=H 3: R₁=CH₃ R₂=CH₃ 4: R₁=CH₃ R₂=H</p>	<p>Mata, <i>et al.</i>, 1987;1988</p>
 <p>5: R=O-β-D-galactopiranosil R₁=OH R₂=H 6: R=O-β-D-galactopiranosil R₁= CH₃ R₂= H 7: R=O-β-D-glucopiranosil R₁=OH R₂=H 8: R=6''acetil-β-D-galactopiranosil R₁=OH R₂=H</p>	<p>Mata, <i>et al.</i>, 1987;1988</p>
 <p>9: R= CH₃ R₁=H 10: R= H R₁=OH</p>	<p>Mata, <i>et al.</i>, 1987;1988</p>
 <p>Manitol (11)</p>	<p>Krebs, <i>et al.</i>,1960</p>

1.3 Antecedentes farmacológicos

Por lo que respecta a la actividad farmacológica, Noster y Krauss (1990) encontraron que los productos de hidrólisis ácida de algunos extractos orgánicos que fueron preparados con acetato de etilo a partir de las cortezas de *Hintonia latiflora* y *E. caribaeum*, presentaban actividad anti-*Plasmodium falciparum* moderada en pruebas *in vitro*. La actividad biológica en ninguno de los casos fue mejor que la observada para los controles positivos (cloroquina y/o quinina).

Pinto y colaboradores (1997) evaluaron el efecto hipoglicemiante crónico en ratas normoglicémicas de un preparado herbolario alemán que se comercializa con el nombre de Sucontral®. El preparado era a base de las mezclas de las cortezas de *H. latiflora* y *E. caribaeum*. Los resultados permitieron establecer que el preparado tiene un efecto hipoglicemiante importante.

Posteriormente, Guerrero-Analco y colaboradores (2007) observaron que el extracto de CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1) de la corteza de *E. caribaeum* tenía un efecto hipoglicemiante significativo en animales normoglicémicos así como un efecto antihiperглиcémico significativo respecto al control diabético. Los autores relacionaron esta actividad a la presencia de las 4-fenilcumarinas.

En los estudios de toxicidad aguda, el extracto orgánico CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1) de la corteza de *E. caribaeum* resultó ser tóxico en roedores de acuerdo a los criterios de Lorke (DL₅₀ = 700 mg/kg), pero no presentó toxicidad para el ensayo de *Artemia salina* (CL₅₀>1000 µg/mL), y tampoco presentó mutagenicidad de acuerdo a la prueba de Ames (Déciga-Campos, *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Nuestro país se distingue por su larga tradición en el uso de plantas medicinales debido a que son parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. Cuenta con alrededor de 3000 especies medicinales documentadas en diversas fuentes (Martínez, 1989; Viesca-Treviño, 1987, 1993, 1999; Zolla y Medellín, 1993; Argueta y Aguilar, 1994; Argueta, *et al*, 1994; Lozoya, 1998; Hersch, 1999). Muchas de estas plantas actualmente son objeto de un activo comercio a nivel nacional e inclusive internacional, constituyéndose así, una opción muy importante en el tratamiento y prevención de enfermedades.

Dentro de las plantas más comercializadas en México se encuentra *Exostema caribaeum* (Anaya, 1991) la cual se utiliza en la medicina tradicional principalmente para tratar la malaria, el dengue y como antidiabético. Sin embargo, al igual que otras cortezas pertenecientes al complejo copalchi, éstas se encuentran sujetas a una demanda comercial intensa y explotación creciente, lo que ha originado que su población se esté viendo disminuida drásticamente. A partir de esta consideración, Cristians y colaboradores (2009) describen el estudio químico de las hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana* e identifican como componentes principales a diversos glicósidos de 4-fenilcumarinas y al ácido clorogénico.

En este contexto el presente trabajo tiene como objetivo principal realizar el estudio químico de la infusión obtenida a partir de las hojas de *E. caribaeum* con la finalidad de saber si están presentes metabolitos secundarios de tipo 4-fenilcumarinas, que son los principios activos descritos hasta la fecha para la corteza.

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar el fraccionamiento químico de la infusión obtenida de las hojas secas y molidas, utilizando procesos cromatográficos convencionales.
2. Aislar y purificar algunos de los compuestos mayoritarios.
3. Identificar, mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos, los compuestos aislados.
4. Establecer el perfil cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de la infusión de las hojas de *E. caribaeum*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procedimientos generales

3.1.1. Determinación de constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros en el infrarrojo se obtuvieron en pastilla de KBr en un espectro Perkin Elmer 599. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) se registraron en un aparato Varian Unity Inova el cual se operó a una frecuencia de 400 MHz para RMN-¹H y de 100 MHz para RMN-¹³C; como disolventes se emplearon el CD₃OD y DMSO, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm. Para el análisis de los espectros de RMN monodimensionales y bidimensionales se utilizó el programa MestreNova® (versión 6). Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro de masas JEOL SX 102 utilizando como método de ionización el bombardeo por átomos rápidos (FAB) en modo positivo y negativo y como matriz el glicerol.

3.1.2. Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa delgada (CCD) se realizaron sobre placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (60 F₂₅₄ Merck KGaA, Alemania) de diferentes dimensiones; estos análisis se realizaron de acuerdo a las técnicas convencionales utilizando diversos sistemas de elución. Como agentes cromógenos se emplearon solución de sulfato cérico. Para desarrollar el color fue necesario calentar a 110°C durante un minuto. Adicionalmente, la visualización de las placas se realizó con una lámpara de UV (onda corta 254nm; onda larga 365nm).

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó en columnas de vidrio de diferentes capacidades empacadas con gel de sílice (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Kieselgel 60 Merck KGaA, Alemania) o con sephadex LH20, (Pharmacia®).

Cuadro 2. Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos por CCD

Agente revelador	Composición	Referencia
Solución de sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal	12.0 g
	Ácido sulfúrico	22.5 mL
	Hielo	350 g
		-Stahl, 1969

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos de la marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un detector de UV con arreglo de fotodiodos (PDA) modelo 996 (Waters Corporation). El control del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento se efectuaron utilizando el software Empower versión 2.0 (Waters). Se utilizó una columna Symmetry® C8 (Waters corporation, USA) de 3.9 mm de diámetro interno x 150 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula. Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC.

3.2. Material Vegetal

El material vegetal (hojas de *E. caribaeum*, 186.0 g) que se empleó en este estudio fue recolectado el 29 de julio de 2010 en Tuzantlan, municipio Atenango del Río, estado de Guerrero y fue identificado por el M. en C. Sol Cristians Niizawa. Se depositaron ejemplares de referencia en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME 131347, 131348, 131349, 131355).

3.3. Preparación de la Fracción de AcOEt a partir de la infusión de las hojas

El material vegetal se sometió previamente a un proceso de secado a temperatura ambiente por aproximadamente 15 días, y posteriormente se fraccionó en un molino Willey Modelo 4.

La infusión se preparó a partir de 45 g de las hojas secas y molidas utilizando 1800 mL de agua hirviendo y dejando macerar por 30 minutos. Posteriormente, se filtró utilizando papel filtro (Whatman no. 1). Una vez que alcanzó la temperatura ambiente se extrajo con AcOEt (1800 mL x 2). La fracción orgánica se concentró a presión reducida para dar 5.7 g de fracción de AcOEt (rendimiento: 12.6% en relación al material vegetal) (Figura 7).

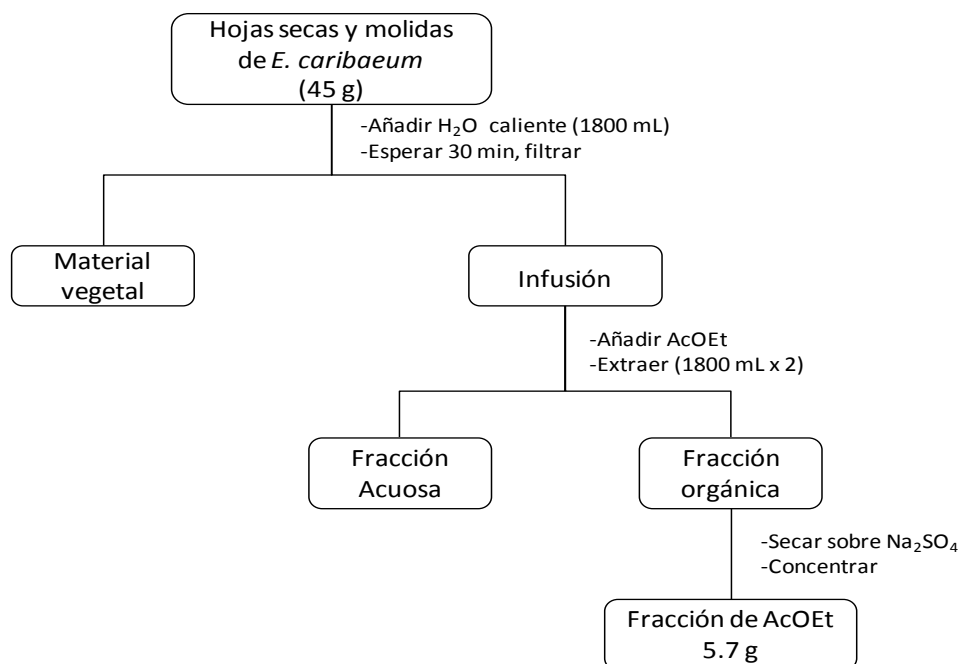


Figura 7. Diagrama general del proceso de preparación de la Fracción de AcOEt

3.4. Fraccionamiento primario de la Fracción de AcOEt

La fracción de AcOEt (4.3 g) se sometió a un fraccionamiento primario vía cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílice desactivada (25%) como fase estacionaria (426 g) y como eluyentes, Hexano–AcOEt (10:90→0:100) y AcOEt–MeOH (100:0→50:50). Este fraccionamiento generó 215 fracciones (Cuadro 3), las cuales se combinaron con base en su similitud cromatográfica para obtener 24 fracciones primarias. La figura 8 muestra un diagrama del proceso del fraccionamiento primario.

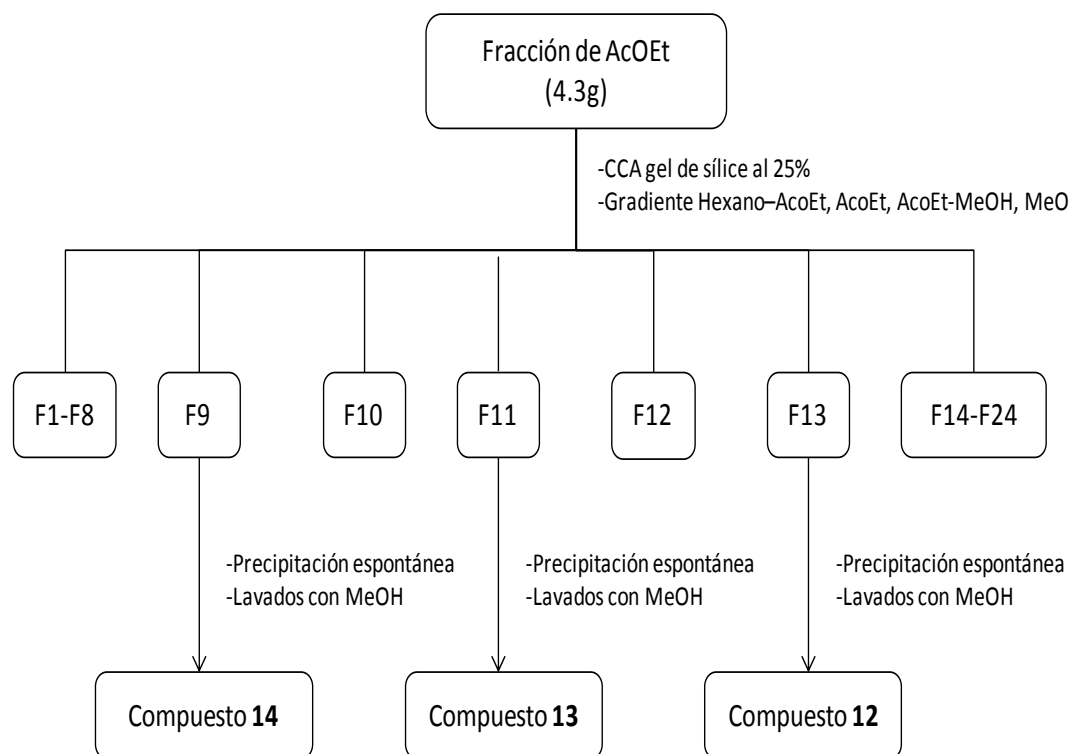


Figura 8. Diagrama del Fraccionamiento primario de la Fracción de AcOEt

Cuadro 3. Fraccionamiento primario

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
Hexano-AcOEt	10:90	1-20	1-20	F1
AcOEt	100	21-59	21-40	F2
AcOEt-MeOH	95:5	60-91	41-52	F3
AcOEt-MeOH	90:10	92-213	53-64	F4
AcOEt-MeOH	50:50	214	65-79	F5
			80-82	F6
			83-89	F7
			90-99	F8
			100	F9
			101-104	F10
			105	F11
			106-110	F12
			111-121	F13
			122-129	F14
			130-134	F15
			135-139	F16
			140-149	F17
			150-163	F18
			164-176	F19
			177-182	F20
			183-191	F21
			192-199	F22
			200-206	F23
			207-214	F24

3.5 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento primario

7.5011 g de hojas secas y molidas de *E. caribaeum* fueron utilizadas para preparar una infusión la cual se concentró al vacío. Posteriormente, el extracto acuoso obtenido (3.9803 g, rendimiento: 53 %) se reconstituyó en MeOH y se dejó macerar por 2 horas. Pasado este tiempo, se decantó y el sobrenadante obtenido se sometió a un fraccionamiento vía cromatografía en columna abierta utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria y MeOH como fase móvil. El resultado de este proceso originó 43 fracciones que por afinidad cromatográfica se reunieron para dar como resultado 5 fracciones secundarias (Cuadro 4). La figura 9 muestra el diagrama para el fraccionamiento primario de la infusión.

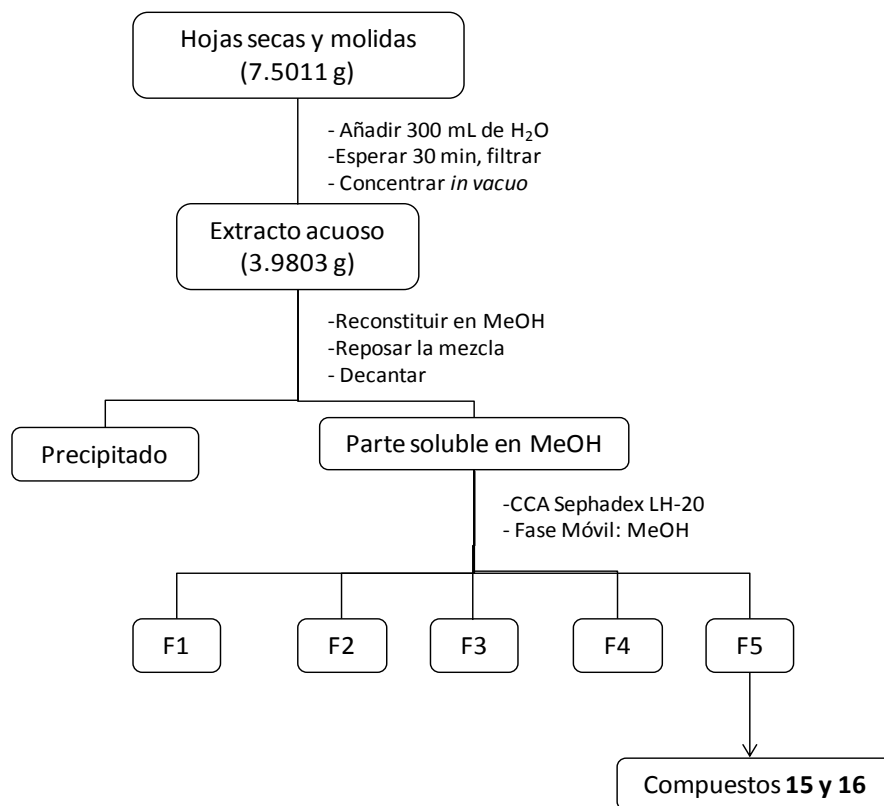


Figura 9. Diagrama del Fraccionamiento primario de la infusión de las hojas de *E. caribaeum*

Cuadro 4. Fraccionamiento primario del extracto acuoso

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave de la fracción
MeOH	100	1-43	1-19	F1
			20-25	F2
			26-30	F3
			31-37	F4
			38-43	F5

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente capítulo describe los resultados obtenidos del estudio químico realizado a la infusión de las hojas de *E. caribaeum*. Esta investigación condujo al aislamiento de tres 4-fenilcumarinas (**12-14**) y dos flavonoides (**15** y **16**) (Cuadros 5 y 9). Las estructuras de estos cinco compuestos se determinaron por la comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los descritos en la literatura. Adicional a esto, también se obtuvo un perfil cromatográfico por CLAE de las hojas utilizando fase inversa. Este perfil cromatográfico permitió conocer la composición de esta parte de la planta. A continuación se presentan y discuten los resultados.

4.1 Aislamiento y elucidación estructural de las 4-fenilcumarinas 12-14

Con la finalidad de reducir la complejidad química de la infusión, se obtuvo una fracción orgánica mediante particiones con AcOEt/agua, la cual se analizó por CLAE y se vio que contiene una alta proporción de los componentes presentes en la infusión (Figura 12), por lo que se decidió realizar su purificación. A partir de este, se aislaron tres 4-fenilcumarinas. Estos compuestos fueron identificados como la 5-O-(6''acetoxi- β -D-galactopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**), la 5-O-(6''-acetoxi- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**), y la 5-O-(6''-acetoxi- β -D-galactopiranosil)-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**14**). Los datos espectroscópicos y espectrométricos se presentan a continuación.

Los espectros de IR obtenidos de **12**, **13** y **14** fueron muy similares y presentan bandas características para grupos hidroxilos $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$, grupos alquílicos entre $3000\text{-}2980\text{ cm}^{-1}$, una banda de un carbonilo de α -pirona en $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$, y aromaticidad entre $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.

En los espectros de masas utilizando el método de bombardeo por átomos rápidos (FAB, de *fast atom bombardement*), se detectaron los iones cuasimoleculares ($[M+H]$ para los compuestos 13 y 14 y $[M-H]$ para el compuesto 12) de cada uno de los compuestos, además de la pérdida del residuo de azúcar con un grupo acetoxi; a partir de esto se determinaron sus fórmulas moleculares.

Los espectros de RMN permiten corroborar las características estructurales de estos compuestos y lograr su identificación completa. Los datos que permiten afirmar esto son los siguientes:

El análisis de la región aromática en los espectros de RMN- ^1H presenta señales para los hidrógenos H-6 y H-8 de la aglicona acoplados en *meta*, que en caso del compuesto **13** se presentan como un singulete ancho en δ 6.51 y para **12** y **14** se observan dos dobletes con $J < 2.0$ Hz alrededor de δ 6.53- δ 6.47, pertenecientes a un sistema AX.

Los hidrógenos H-2', H-5', y H-6' presentan un sistema ABX para **12** y **13**; en el caso de **14** los hidrógenos H-2', H-3', H-5', y H-6' presentan un sistema AA'BB'.

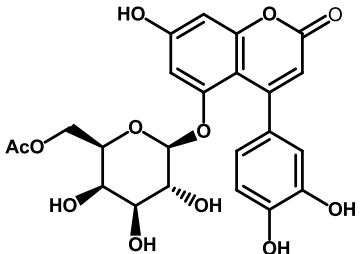
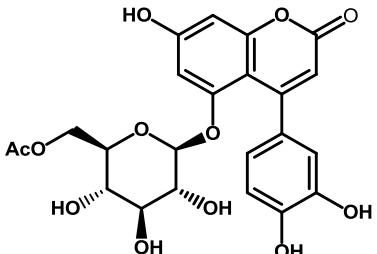
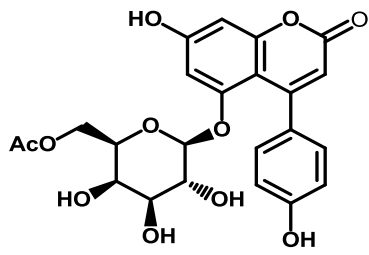
Además, los tres compuestos presentan un singulete ca. 5.9 ppm que corresponde al hidrógeno H-3 del anillo de α -pirona.

Con respecto al residuo de azúcar y como es de esperarse, el hidrógeno anomérico H-1" se encuentra ubicado a campo alto ($\sim\delta$ 4.79), característico de las 4-fenilcumarinas glicosiladas y el valor de la J ca. 7.9 Hz corrobora la conformación *axial-axial* esperada para el anómero β de las tres estructuras.

La identidad del residuo de azúcar se pudo determinar a partir del análisis de las constantes de acoplamiento que se observan principalmente para el hidrógeno H-4"; para la estructura **13**, el residuo de azúcar corresponde a la glucosa ya que los hidrógenos que se acoplan con H-4" están en posición *axial-axial* y tienen J ca. 10 Hz, y en el caso de **12** y **14** se observan $J < 3$ Hz por lo que la posición entre los hidrógenos vecinales a H-4" es ecuatorial-axial, que corresponde a la galactosa.

Los espectros de ^{13}C fueron asignados a partir de las correlaciones observadas en los experimentos HSQC y HMBC y la secuencia de los hidrógenos del residuo de azúcar se confirmó con las correlaciones observadas en el experimento COSY H-H.

Cuadro 5. Glicósidos de 4-Fenilcumarinas aisladas de las hojas de *E. caribaeum*

Compuestos aislado	Referencia
 <p>5-O-(6''-Acetoxi-β-D-galactopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (12)</p>	<p>Hojas de <i>H. standleyana</i> (Cristians, <i>et al.</i>, 2009).</p>
 <p>5-O-(6''-Acetoxi-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (13)</p>	<p>Corteza de <i>H. latiflora</i> (Mata <i>et al.</i>, 1992).</p>
 <p>5-O-(6''-Acetoxi-β-D-galactopiranosil)-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (14)</p>	<p>Hojas de <i>Hintonia standleyana</i> (Cristians, <i>et al.</i>, 2009).</p>

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **12**

$C_{23}H_{22}O_{12}$ PM: 490 uma
Soluble en : MeOH y H ₂ O
UV λ_{max} 257, 328 nm
p.f. > 250° C (sólido café)
IR (KBr) ν_{max} .3430, 1705, 1615, 1515, 1435, 1365, 1265, 1080 cm ⁻¹
EM-FAB⁻ (Glicerol) : m/z = 489 [M-H] ⁻ (20%), 285 [M-H-204] ⁻ (80%)
RMN-H¹ (400 MHz, CD₃OD): δ 6.85 (H-2' d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 6.83 (H-5' d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H) 6.74 (H-6' dd, <i>J</i> = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 6.52 (H-6 d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 6.47 (H-8 d, <i>J</i> = 1.8 Hz, 1H), 5.86 (H-3 s, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 4.70 (H-1'' d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 1H), 4.36 (H _{α} -6'' dd, <i>J</i> = 11.4, 8.3 Hz, 1H), 4.16 (H _{β} -6'' dd, <i>J</i> = 11.5, 4.1 Hz, 1H), 3.84 (H-5'' dd, <i>J</i> = 8.3, 4.1 Hz, 1H), 3.79 (H-4'' d, <i>J</i> = 2.6 Hz, 1H), 3.44 (H-3'' dd, <i>J</i> = 9.7, 2.8 Hz, 1H), 3.12 (H-2'' dd, <i>J</i> = 9.4, 7.8 Hz, 1H), 2.06 (CH ₃ COO- s, <i>J</i> = 22.4 Hz, 2H).
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 172.7 (-OCOC ₃ H ₇), 163.9 (C-7), 163.2 (C-2), 158.3 (C-5), 158.1 (C-4), 157.4 (C-8a), 147.2 (C-4'), 145.4 (C-3'), 133.0 (C-1'), 115.8 (C-5'), 112.3 (C-3), 104.1 (C-4a), 101.8 (C-1''), 100.9 (C-8), 98.3 (C-6), 74.4 (C-3'', C-5''), 71.9 (C-2''), 69.9 (C-4''), 64.5 (C-6''), 20.7 (-OCOC ₃ H ₇).

Cuadro 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **13**

$C_{23}H_{22}O_{12}$ PM: 490 uma
Soluble en : MeOH y H ₂ O
UV λ_{max} 257, 328 nm
p.f. > 250° C (sólido café)
IR (KBr) ν_{max} .3241, 2923, 1699, 1596, 1356, 1075 cm ⁻¹
EM-FAB⁺ (Glicerol): $m/z = 491 [M+H]^+$ (25%), 287 $[M+H-204]^+$ (35%)
RMN-H¹ (400 MHz, CD₃OD): δ 6.84 (H-5' d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 6.83 (H-2' d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.73 (H-6' dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.51 (H-8, H-6, 2H), 5.90 (H-3 s, 1H), 4.79 (H-1'' d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.35 (H- α -6'' dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz, 1H), 4.24 (H- β -6'' dd, $J = 11.8, 7.1$ Hz, 1H), 3.56 (H-5''ddd, $J = 9.4, 7.1, 2.3$ Hz, 1H), 3.30 (H-3'' m, 1H), 3.24 (H-4'' dd, $J = 9.4, 9.1$ Hz, 1H), 2.75 (H-2'' dd, $J = 9.1, 7.7$ Hz, 1H), 2.07 (CH ₃ COO- s, 3H).
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 171.1 (C=O), 161.9 (C-7), 161.8 (C-2), 156.9 (C-4), 156.5 (C-8a), 155.8 (C-5), 145.5 (C-4'), 144.1 (C-3'), 131.5 (C-1'), 119.3 (C-6'), 115.5 (C-2'), 114.2 (C-5'), 110.9 (C-3'), 103.2 (C-4a), 99.8 (C-1''), 99.3 (C-8), 96.8 (C-6), 76.1 (C-3''), 74.1 (C-5''), 73.1 (C-2''), 69.9 (C-4''), 63.2 (C-6''), 19.2 (MeCOO-).

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **14**

$C_{23}H_{22}O_{11}$ PM: 474 uma
Soluble en : $CHCl_3$ -MeOH (1:1)
UV λ_{max} 257, 327 nm
p.f. > 250° C (sólido amarillo)
IR (KBr) ν_{max} . 3450, 1705, 1620, 1510, 1430, 1360, 1265, 1090 cm^{-1}
EM-FAB⁺(Glicerol): $m/z = 475 [M+H]^+$ (40%), $271 [M+H-204]^+$ (55%)
RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 7.24 (H-3', H-6' d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.86 (H-2' d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.53 (H-6 d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.49 (H-8 d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 5.87 (H-3 s, 1H) 4.68 (H-1'' d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 4.36 (H $_{\alpha}$ -6'' dd, $J = 11.5, 8.2$ Hz, 1H), 4.17 (H $_{\beta}$ -6'' dd, $J = 11.5, 4.1$ Hz, 1H), 3.83 (H-5'' ddd, $J = 8.2, 4.1, 0.9$ Hz, 1H), 3.78 (H-4'' dd, $J = 3.4, 0.8$ Hz, 1H), 3.43 (H-3'' dd, $J = 9.7, 3.4$ Hz, 1H), 3.08 (H-2'' dd, $J = 9.6, 7.8$ Hz, 1H), 2.07 (CH ₃ COO- s, 2H)
RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD): δ 172.6 (-OCOCH ₃), 163.4 (C-7), 163.2 (C-2), 159.0 (C-5), 158.4 (C-4), 158.1 (C-8a), 157.5 (C-4'), 132.4 (C-1'), 115.5 (C-3'), 112.5 (C-3), 104.4 (C-4a), 101.9 (C-1''), 100.8 (C-8), 98.2 (C-6), 74.5 (C-5''), 74.4 (C-3''), 71.8 (C-2''), 69.8 (C-4''), 64.6 (C-6''), 20.7 (-OCOCH ₃).

4.2 Aislamiento de los Flavonoides Isoquercitrina (15) e Hiperósido (16)

Con la finalidad de continuar con el estudio químico y aislar los componentes más polares se decidió generar otra fracción pero ahora utilizando MeOH. A partir de un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta sobre sephadex LH-20 de este reconstituido precipitó un sólido amarillo. Este precipitado se analizó por CLAE y se pudo determinar que se trataba de una mezcla de 2 compuestos. De acuerdo a la comparación de sus datos espectroscópicos (UV y RMN) con los reportados en la literatura estos corresponden a la isoquercitrina (**15**) y al hiperósido (**16**) (Figura 10, Cuadro 9). Aunque los dos compuestos se encuentran en mezcla en los espectros de RMN, se pueden detectar las siguientes señales que nos permitieron confirmar las estructuras:

En la región de los aromáticos del espectro de RMN ^1H se observan tres sistemas de tipo AX que corresponden a los hidrógenos del anillo A acoplados en *meta*: el primero en δ 6.18 (d, $J = 2.1$) y los dos restantes alrededor de δ 6.40 (d, $J = 2.11$ y 2.15), estas tres señales integran para cuatro hidrógenos. Se detecta también dos sistemas de tipo ABX que corresponden a los hidrógenos H-5', H-2' y H-6' de los dos anillos B que resuenan alrededor de δ 6.89– δ 7.86 y que integran para seis hidrógenos. Este patrón de sustitución confirma que las dos agliconas corresponden a la quercetina. Los hidrógenos anoméricos aparecen a δ 5.27 (d, $J = 7.6$ Hz) para **15** y δ 5.18 (d, $J = 8.0$ Hz) para **16**. Una vez identificado el hidrógeno anomérico, este se correlacionó con los demás hidrógenos del residuo de azúcar y se pudo determinar que un residuo se trataba de la galactosa y otro de la glucosa. Adicional al análisis de los datos espectroscópicos, para el compuesto **15** se realizó la coelución por CLAE con un estándar adquirido comercialmente de isoquercitrina.

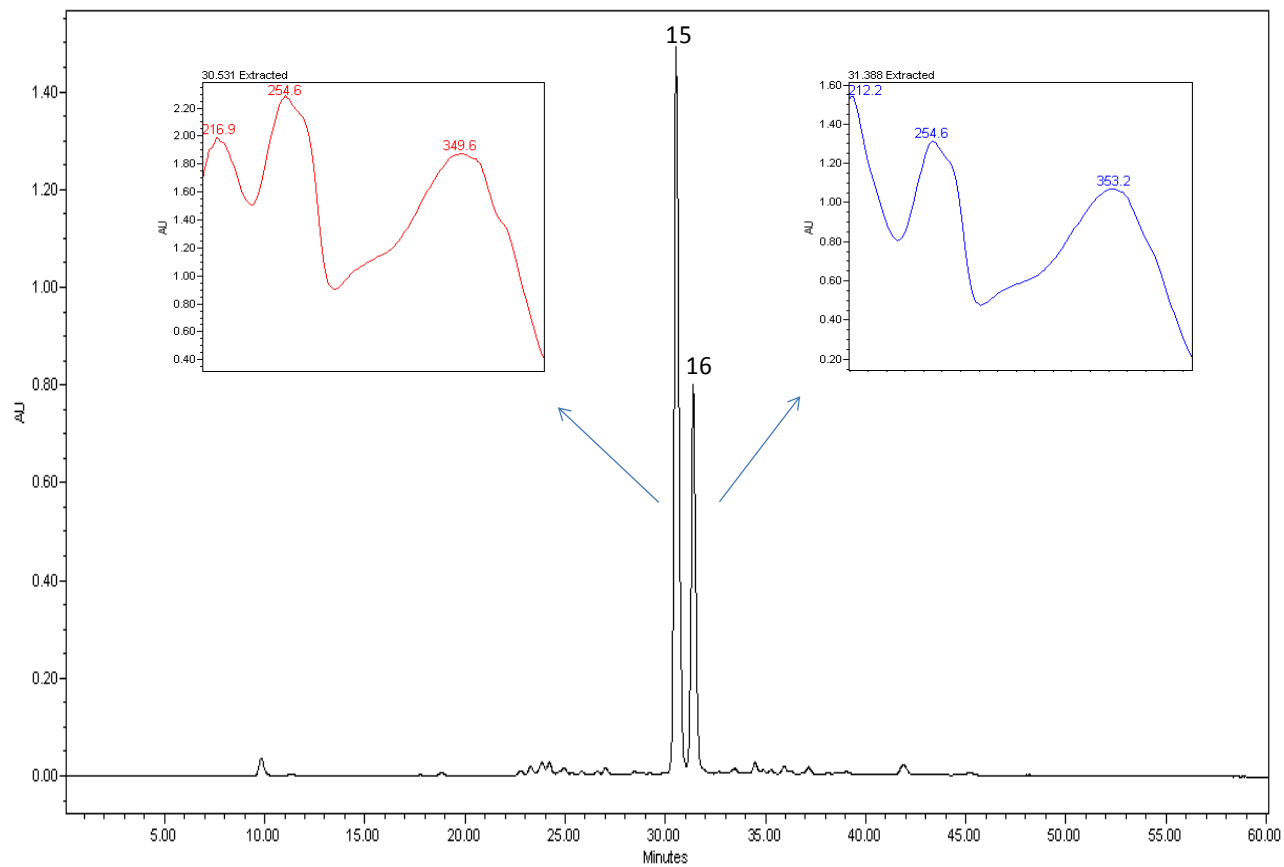
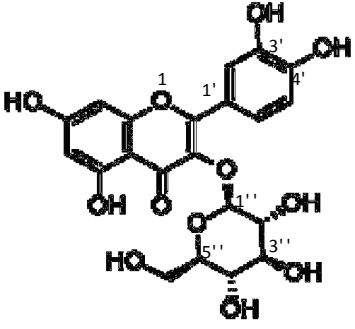
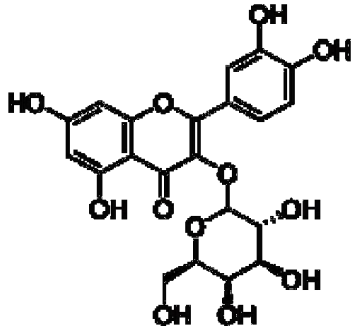


Figura 10. Análisis por CLAE de la mezcla de los dos flavonoides obtenidos del estudio químico de las hojas. Condiciones: Columna: Symetry®C8, Gradiente de ACN/ddH₂O, 0.1% ATF, [0-5 min, (10:90); 5-30 min, (10:90–19:81)], $\lambda = 327$ nm

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de los compuestos **15** y **16**

 <p>15</p>	 <p>16</p>
Sólido de color amarillo	
UV λ_{\max} : 217,255 y 350 nm	UV λ_{\max} : 212, 255 y 353 nm
RMN-^1H (400 Hz, CD_3OD): δ 7.86 (H16-2', d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.73 (H15-2' d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.61 (H15-6', H16-6' dd, $J=8.5, 2.2$ Hz, 2H), 6.89 (H15-5', H16-5' d, $J=8.5$ Hz, 1H), 6.42 (H15-8, d, $J=2.1$ Hz, 1H) 6.41 (H16-8 d, $J=2.1$ Hz, 1H), 6.22 (H15-6, H16-6 d, $J=2.1$ Hz, 2H), 5.27 (H15-1" d, $J=7.6$ Hz, 1H), 5.18 (H16-1" d, $J=7.8$ Hz, 1H)	
RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD): δ 179.8 (C15-4, C16-4), 167.0 (C15-7), 163.4 (C15-5, C16-5), 159.1 (C15-2, C16-7, 9), 158.8 (C16-2), 158.7 (C15-9), 150.3 (C16-4') 149.8 (C15-4'), 146.1 (C16-3'), 145.9 (C15-3'), 136.1 (C16-3), 135.7 (C15-3), 123.2 (C15-1', C16-1'), 123.2 (C-15-6', C16-6'), 118.1 (C16-5'), 117.6 (C15-5'), 116.4 (C15-2', C16-2'), 105.9 (C15-10, C16-10), 105.7 (C16-1''), 104.4 (C15-1''), 100.3 (C15-6, C16-6), 95.1 (C16-8), 94.8 (C15-8), 78.8 (C15-5''), 77.5 (C16-5''), 78.2 (C15-3''), 75.4 (C16-3''), 75.8 (C15-2''), 73.5 (C16-2''), 71.3 (C15-4''), 70.3 (C16-4''), 62.5 (C15-6'', C16-6'')	

Finalmente, para generar el perfil cromatográfico característico de la infusión de las hojas y conocer la proporción de cada uno de los componentes aislados, la infusión se analizó por cromatografía de líquidos (CLAE) utilizando un detector de UV.

Para el desarrollo del perfil cromatográfico se utilizó una columna analítica de fase inversa C8 (Symmetry®) y el detector de UV se ajustó a 327 nm que corresponde a la longitud de máxima absorbancia de las 4-fenilcumarinas (Mata, *et al.*, 2008; Figura 13). Se analizaron diferentes mezclas de elución y después de varios ensayos, el mejor sistema resultó ser un gradiente de ACN-H₂O acidificada (con 0.1% ácido trifluoroacético). La selección de estas condiciones cromatográficas se hizo considerando la polaridad de los compuestos analizados: glicósidos de 4-fenilcumarinas y de flavonoides. Al tratarse de compuestos altamente polares es necesario que no interaccionen con la fase estacionaria, para evitar su retención (lo que originaría tiempos demasiado largos). A partir de la selección de fase inversa C8, eluyen primero los más polares.

Primeramente, se analizó la Fracción de AcOEt y se generó su perfil cromatográfico corroborando así la presencia de todos los componentes aislados, por lo que de manera preliminar se estableció que el contenido de 4-fenilcumarinas **12–14** en las hojas es alto (Figura 12, Cuadro 10).

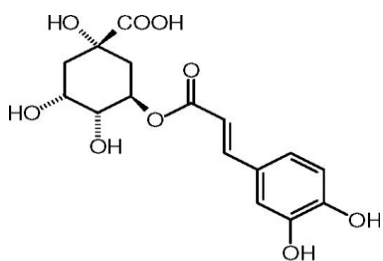
Después se analizó la infusión y se confirmó que ésta tiene como constituyentes principales a las 4-fenilcumarinas aisladas **12–14** y al ácido clorogénico (**17**), éste último identificado a partir de la coelución con un estándar adquirido comercialmente (Figura 11); también por coelución se identificó a la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**18**) la cual había sido aislada previamente de las cortezas de *H. latiflora* (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007).

El ácido clorogénico (**17**), que es un compuesto con comprobada eficacia antidiabética, antioxidante y gastroprotectora (Cristians, *et al* 2013; *inter alia*), resultó ser el mayoritario en la infusión (32.86 %) seguido de **12** y **13**, y en menor proporción encontramos a **14** y **18**; aunque es importante destacar que en su conjunto, todas las 4-fenilcumarinas sobrepasan el contenido total de **17** (32.86 % vs 58.40 %). En el caso de las 4-fenilcumarinas **12** y **14**, y del ácido clorogénico

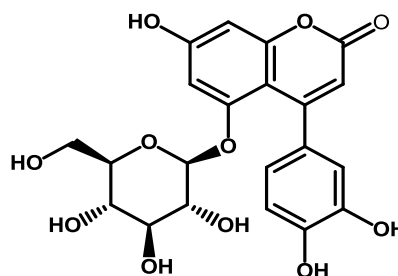
(17), estos compuestos ya han sido descritos para la infusión de las hojas de otras especies que pertenecen al complejo copalchi y que presentan actividad antidiabética como son: *H. standleyana* y *H. latiflora*. (Cristians, *et al.*, 2009; Mata, *et al.*, 2013). A partir de los resultados obtenidos de los estudios químicos y farmacológicos de las hojas de *las dos hintonias*, Mata y colaboradores (2013) demuestran que las propiedades antidiabéticas son debidas principalmente a la presencia de 4-fenilcumarinas por lo que proponen el uso de las hojas como un potencial sustituto de las cortezas, esto como parte de una estrategia de conservación de la especie.

También se encontraron, como minoritarios, a los flavonoides **15** y **16** (6.95 %) los cuales, aunque presentan una distribución ubicua en la naturaleza, constituyen el primer reporte de estos en el género *Exostema*.

Todos estos resultados demuestran que las hojas son una fuente importante de compuestos bioactivos, por lo que sería interesante analizar con más detalle esta parte de la planta y los preparados que de ella se obtengan, esto con la finalidad de conocer su efecto antidiabético, lo cual estaría directamente relacionado al contenido tan elevado de ácido clorógeno y 4-fenilcumarinas.



Ácido clorogénico (17)



5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidoxi-4-fenilcumarina (18)

Cuadro 10. Composición de las hojas de *E. caribaeum*

Compuesto	T (min)	% Área Infusión	% Área Fracción AcOEt
12	10.26	16.68	21.77
13	25.27	19.54	32.17
14	30.95	9.63	14.37
15	31.72	3.81	6.65
16	34.96	2.79	1.85
17	37.32	32.86	1.46
18	40.64	9.56	6.74
Total:		94.87	85.01

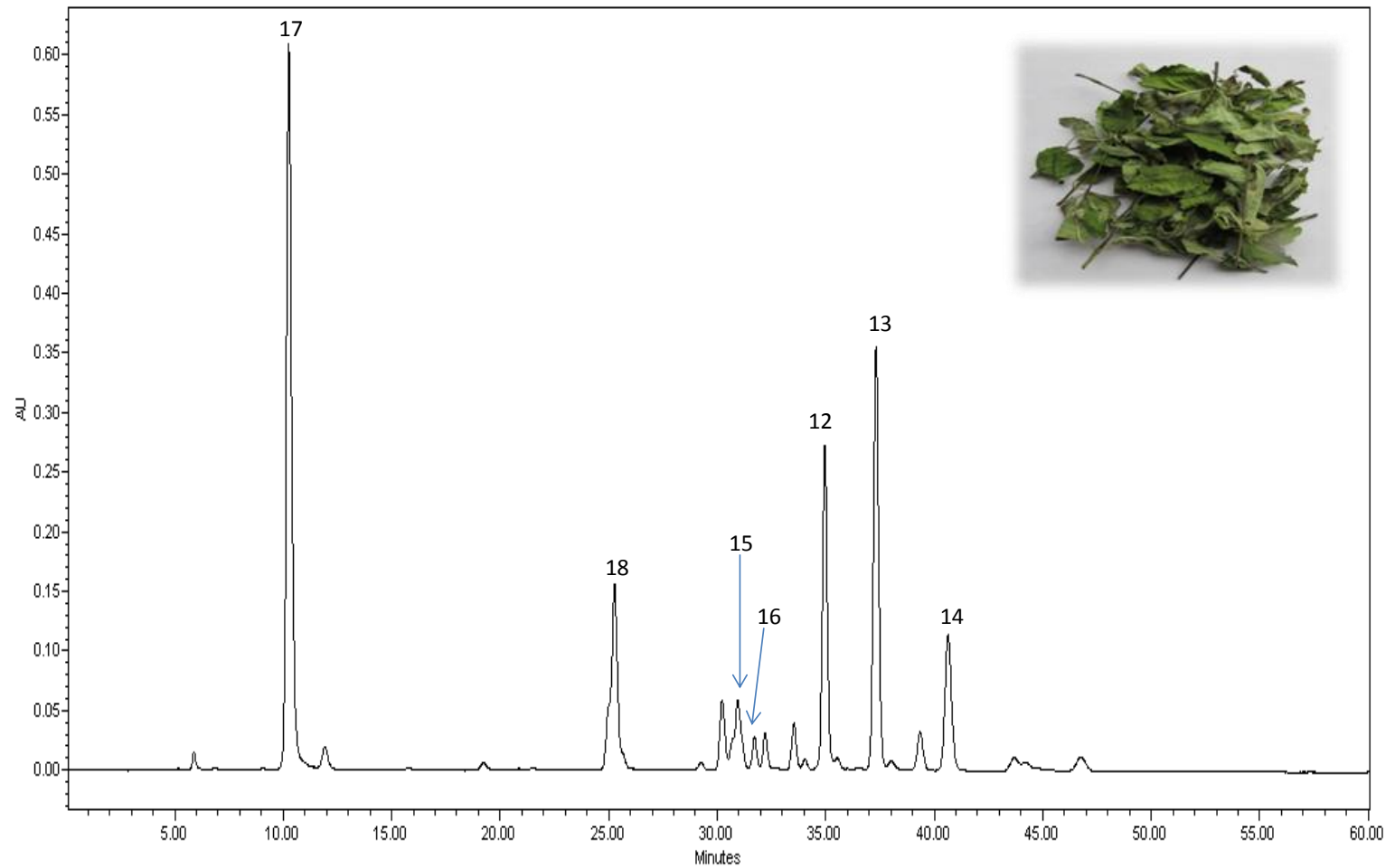


Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE de la infusión de las hojas de *E. caribaeum*
Condiciones: Columna: Symetry® C8, Gradiente de ACN/ddH₂O, 0.1% ATF, [0-5 min, (10:90);
5-30 min, (10:90–19:81)], $\lambda = 327$ nm

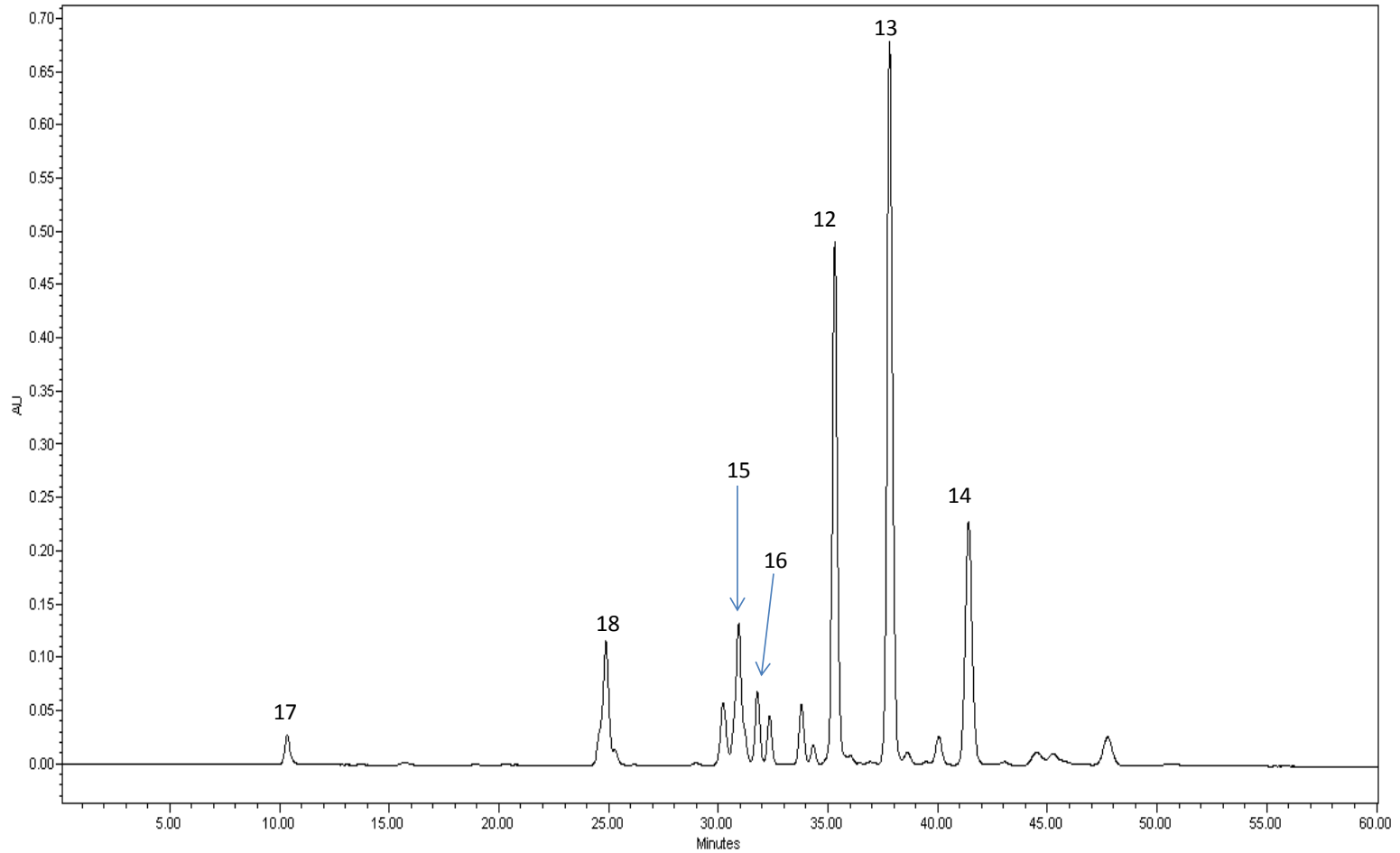


Figura 12. Perfil cromatográfico por CLAE de la Fracción de AcOEt de las hojas de *E. caribaeum*
Condiciones: Columna: Symetry® C8, Gradiente de ACN/ddH₂O, 0.1% ATF, [0-5 min, (10:90);
5-30 min, (10:90–19:81)], $\lambda = 327$ nm

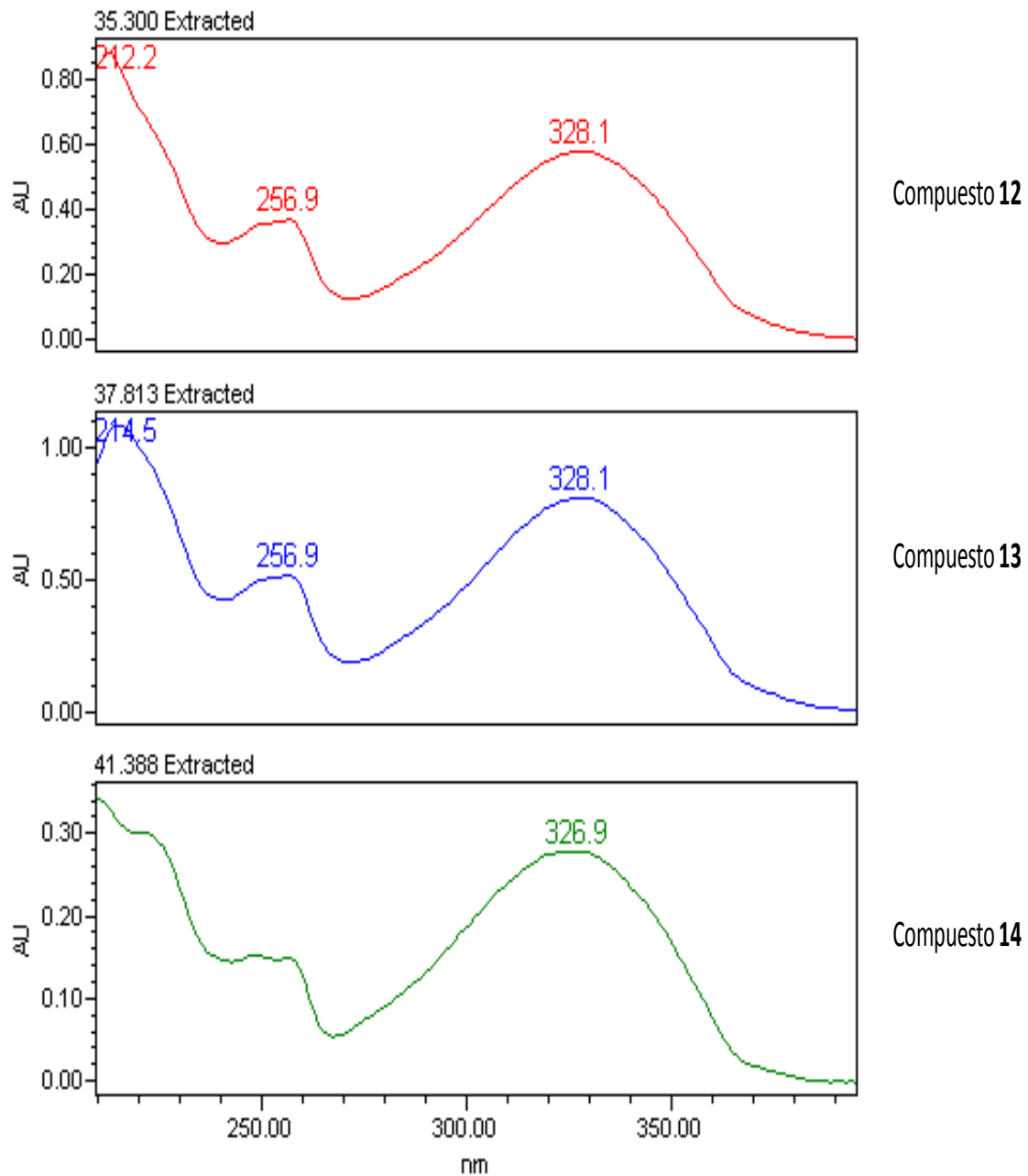


Figura 13. Espectro de UV de las 4-fenilcumarinas aisladas

5. CONCLUSIONES

Se lograron aislar tres 4-fenilcumarinas (**12-14**) y dos flavonoides (**15** y **16**) de la infusión de las hojas de *E. caribaeum*: la 5-O-(6''acetoxi- β -D-galactopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**12**), la 5-O-(6''-acetoxi- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**13**), la 5-O-(6''-acetoxi- β -D-galactopiranosil)-7,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (**14**), la isoquercitrina (**15**) y el hiperósido (**16**).

La presencia de estos metabolitos es frecuente en la familia Rubiaceae, en específico en la subfamilia Cinchonoideae, siendo éste el primer reporte de la presencia de estos en *E. caribaeum*.

Se obtuvo un perfil cromatográfico por CLAE de la infusión de las hojas en el cual se pudo confirmar además de los metabolitos aislados, la presencia del ácido clorogénico (**17**) y la 5-O- β -D-glucopiranosil-,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina (**18**).

El compuesto mayoritario en la infusión de las hojas es el ácido clorogénico, compuesto con comprobada eficacia antidiabética, antioxidante y gastroprotectora, seguido de las 4-fenilcumarinas 12 y 13 las cuales, aunque no han sido evaluadas hasta la fecha, están presentes en especies del complejo copalchi con marcada actividad antidiabética.

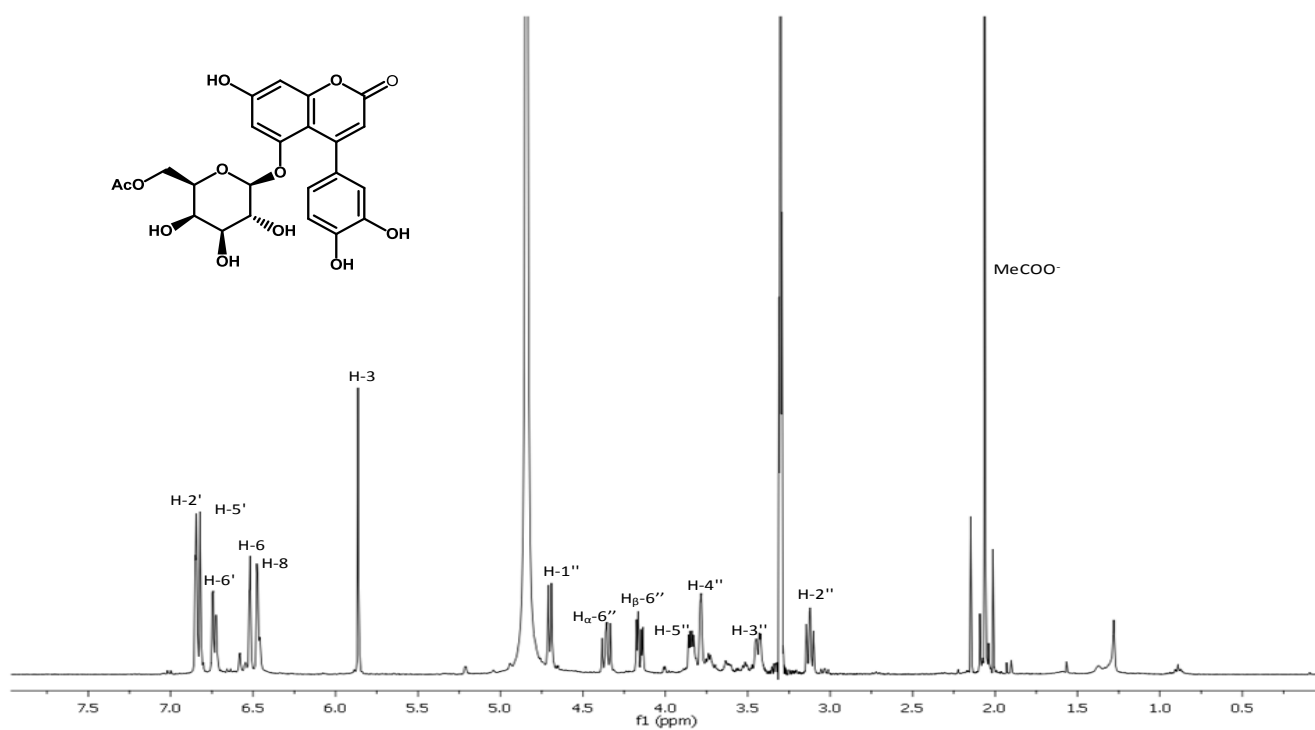
6. REFERENCIAS

- ❖ Aguilar, C., Camacho, J, Chino, S. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. **1994**.
- ❖ Anaya, D.G. Estudio etnobotánico del complejo quina en México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México. **1991**.
- ❖ Aquino, R., D'Agostino Mario, De Simone Francesco, Pizza Cosimo. **1988**. Plant metabolites. Part 10. 4-Arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry* 27, 1827–30.
- ❖ Argotte-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M.H., González-Cortazar, M., Alvarez, L. **2006**. Antimalarial 4-Phenylcoumarins from the Stem Bark of *Hintonia latiflora*. *Journal of Natural Products* 69, 1442–1444.
- ❖ Argueta, V.A., Cano, L., Rodarte, M. Atlas de las Plantas Medicinales Tradicionales Mexicanas. Instituto Nacional Indigenista. México. **1994**.
- ❖ Calera, M. R., Mata, R., Lotina-Hennsen, B., Anaya, L. **1996**. Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2966-2969.
- ❖ Cristians, S., Guerrero-Analco, J.A., Pérez-Vásquez, A., Palacios-Espinosa, F., Ciangherotti, C., Bye, R., Mata, R. **2009**. Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *Journal of Natural Products* 72, 408–413.
- ❖ Cristians, S., Bye, R., Navarrete, A., Mata, R. **2013**. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 145, 530-535.
- ❖ Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral, G., Ángeles-López, G.E., Navarrete A., Mata R. **2007**. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 334–342.
- ❖ Díaz, J.L. Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Monografías científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C. IMEPLAM. México, D.F. **1976**.
- ❖ Froelich, S., Siems, K., Hernandez, M.A., Ibarra, R.A., Berendsohn W.G., Jenett-Siems, K. **2006**. Phenolic glycosides from *Exostema mexicanum* leaves. *Pharmazie* 61, 641-644.

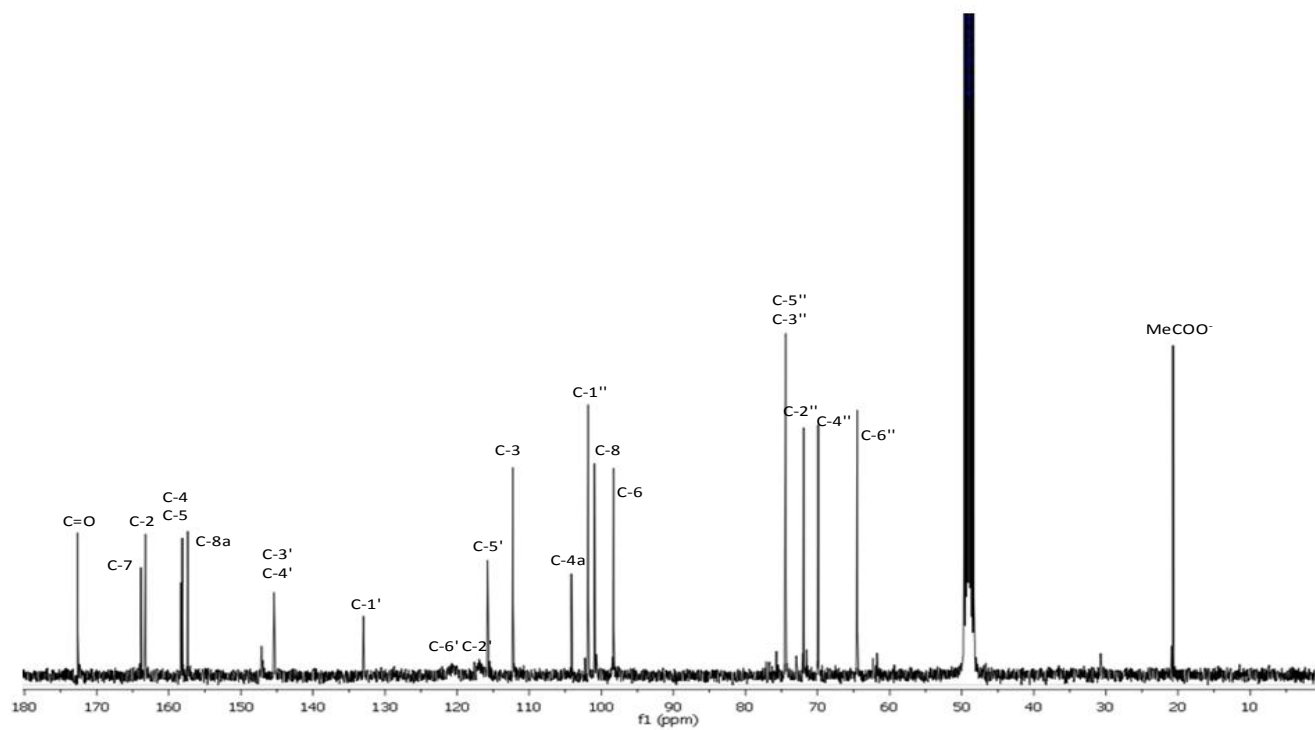
- ❖ Guerrero-Analco, J.A., Medina-Campos, O., Brindis, F., Bye, R., Pedraza-Chaverri, J., Navarrete, A., Mata R. **2007**. Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. *Phytochemistry* 68, 2087–2095.
- ❖ Herbario Nacional Mexu, <http://www.ibiologia.unam.mx/mexu/>; consultado el 30 de enero de 2013.
- ❖ Hersch, P. **1999**. De hierbas y herbolarios en el México actual. *Arqueología Mexicana VII*, 60—65.
- ❖ Ito, A., Chai, H.-B., Shin, Y.G., García, R., Mejía, M., Gao, Q., Fairchild, C.R., Lane, K.E., Menendez, A.T., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D. **2000** Cytotoxic Constituents of the Roots of *Exostema acuminatu*. *Tetrahedron* 56, 6401–6405.
- ❖ Krebs, K.G., Griesinger, E. **1960**. Ingredients of the bark of *Exostema caribaeum*. *Arzneimittel-Forschung* 10, 32–3.
- ❖ Lozoya, X. La Herbolaria en México. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Colección Tercer Milenio, México. **1998**.
- ❖ Martínez, M. Las plantas medicinales de México (6ª ed.). Ediciones Botas. México, D.F., 1989, 84-87.
- ❖ Mata, R., Calzada, F., García, M.R., Reguero, M.T. **1987**. Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, III: New 4-phenylcoumarins from *Exostema caribaeum*. *Journal of Natural Products* 50, 866–871.
- ❖ Mata, R., Calzada, F., García, M.R. **1988**. Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, VI: Additional New 4-phenylcoumarins from *Exostema Caribaeum*. *Journal of Natural Products* 51, 851–856.
- ❖ Mata, R., Camacho, M.R., Cervera, E., Bye, R., Linares, E. **1990**. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. Part XI. Secondary metabolites from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 29, 2037-40.
- ❖ Mata, R., Camacho, M.R., Mendoza, S., Cruz, M. C. **1992**. A phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 31, 3199-3201.
- ❖ Mata, R., Acevedo, L., Méndez-Bautista D.I., Guerrero-Analco, J.A., Rivero, B.E., Rodríguez, J.M. **2008**. Development and validation of liquid chromatography method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. *Pharmaceutical Biology* 46, 105-110.

- ❖ Mata, R., Cristians, S., Escandon-Rivera, S., Juarez-Reyes, K., Rivero-Cruz I.C. **2013**. Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α -Glucosidases. *Journal of Natural Products*. DOI: 10.1021/np300869g
- ❖ McDowell, T., Bremer, B., **1998**. Phylogeny, diversity, and distribution in *Exostema* (*Rubiaceae*): implications of morphological and molecular analyses. *Plant Systematics and Evolution*, 212, 215–246.
- ❖ Nassar, C.M., Saenz, R., Jose, A., Galvez, N. **1980**. Phytochemical screening of Costa Rican plants: alkaloid analysis. V. *Revista de Biología Tropical* 28, 1–11.
- ❖ Noster, S., Kraus, L. **1990**. In vitro antimalarial activity of *Coutarea latiflora* and *Exostema caribaeum* extracts on *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica* 56, 63–5.
- ❖ Pinto, A., Capasso A., Sorrentino, L. **1997**. Experimental animal studies on the hypoglycemic effects of a copalchi extract. *Drug Research* 47, 829–833.
- ❖ Reyes-García, T., Maradiaga-Ceceña F.S., Catalán-Heverástico, C., Ávila-Sánchez, P., Jiménez-Hernández, J., **2012**. Flora leñosa del municipio de Cocula, Guerrero, México. *Polibotánica* 34, 20-49
- ❖ Sánchez-Viesca, F. **1969**. Structure of exostemin, a new 4-phenyl coumarin isolated from *Exostema caribaeum*. *Phytochemistry* 8, 1821–3.
- ❖ Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org>; consultado el 25 de diciembre de 2012.
- ❖ Viesca-Treviño, C. Las plantas medicinales americanas y la medicina hipocrática. En: Memorias del Impacto del Encuentro de Dos Mundos, México. **1987**, 92.
- ❖ Viesca-Treviño, C. La herbolaria medicinal en el México prehispánico. En: La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaría de Salud, México. **1993**, 19-34.
- ❖ Viesca-Treviño, C. **1999**. Usos de las plantas medicinales mexicanas. *Arqueología Mexicana* VII, 30—37.
- ❖ Zolla, C., Medellín E.C. Las Organizaciones de Médicos Indígenas Tradicionales y las Plantas Medicinales en la Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana. Secretaria de Salud. México D.F. **1993**, 57-57.

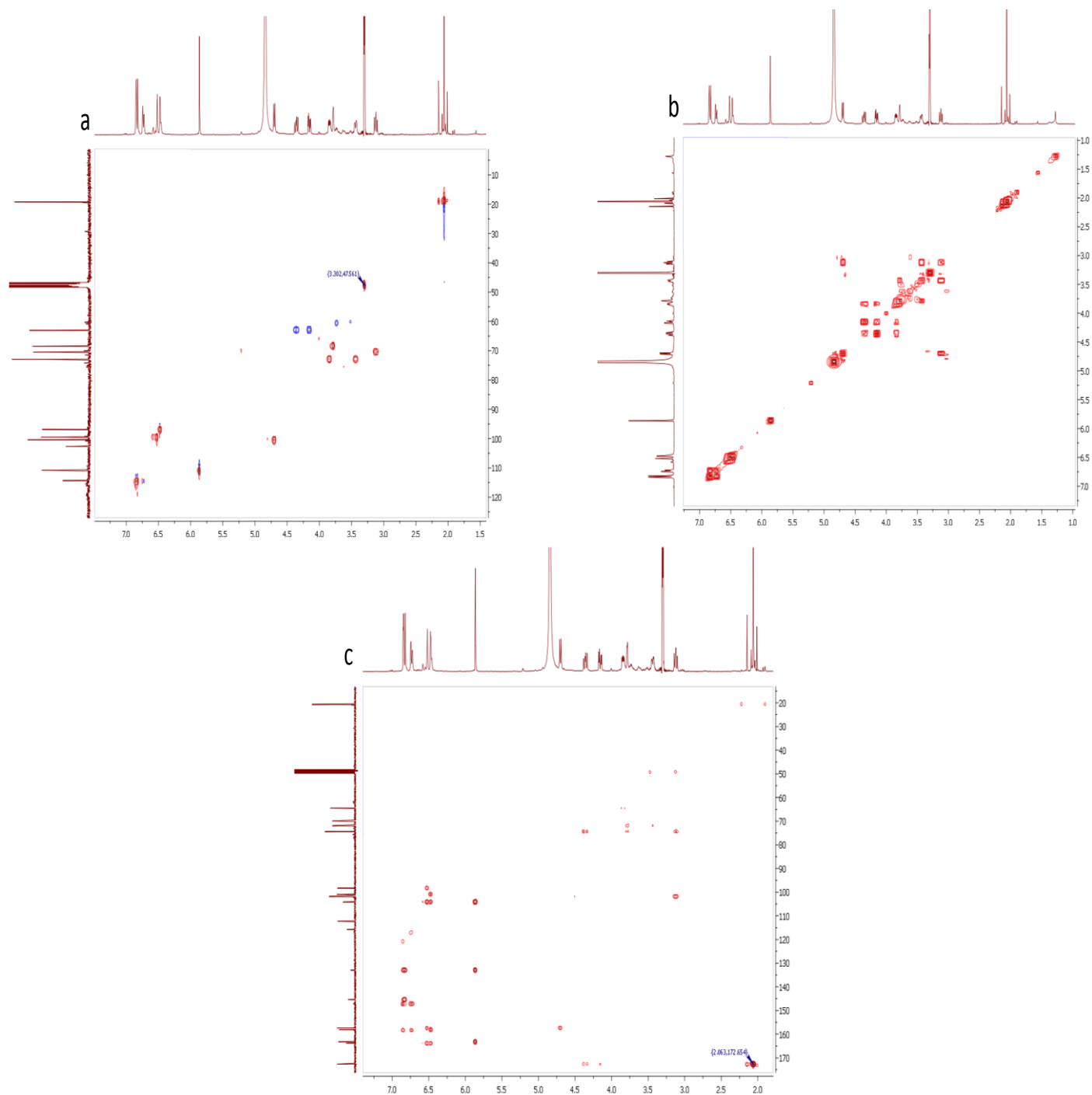
ANEXOS



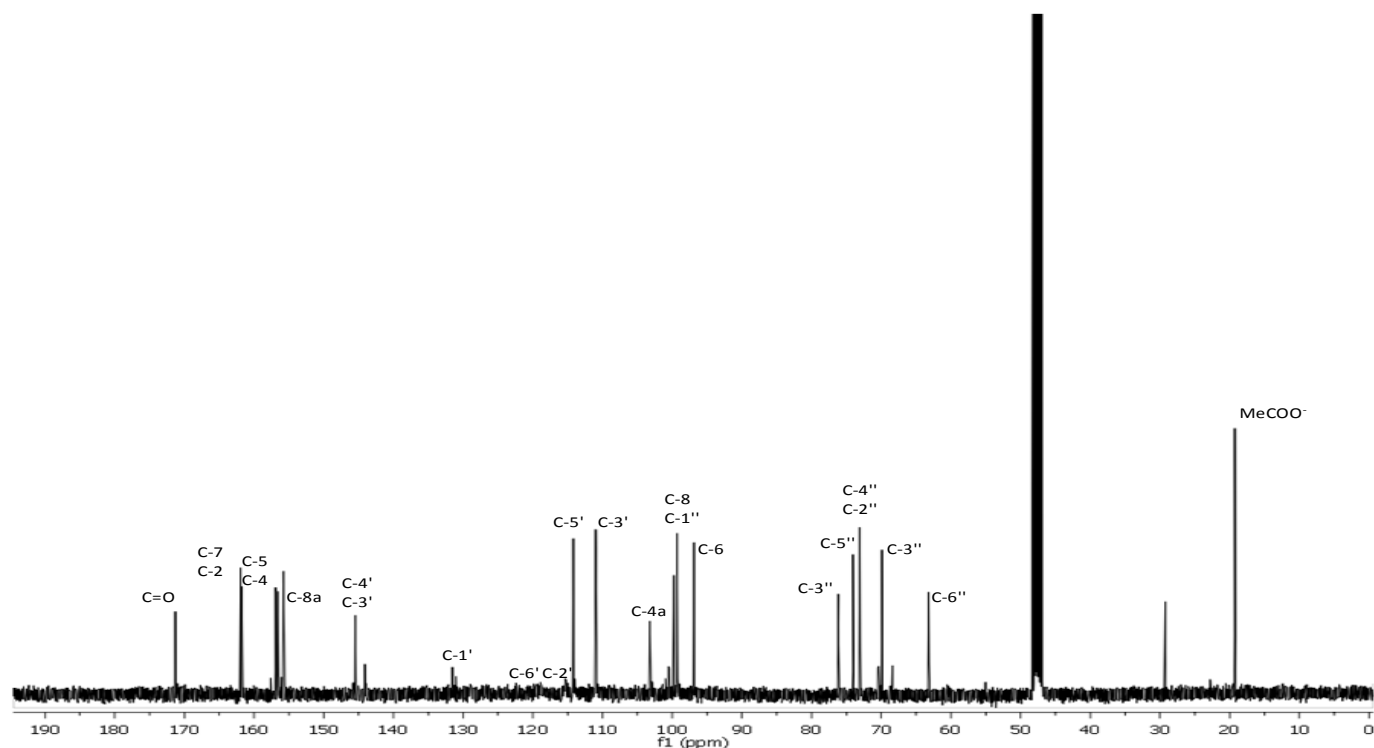
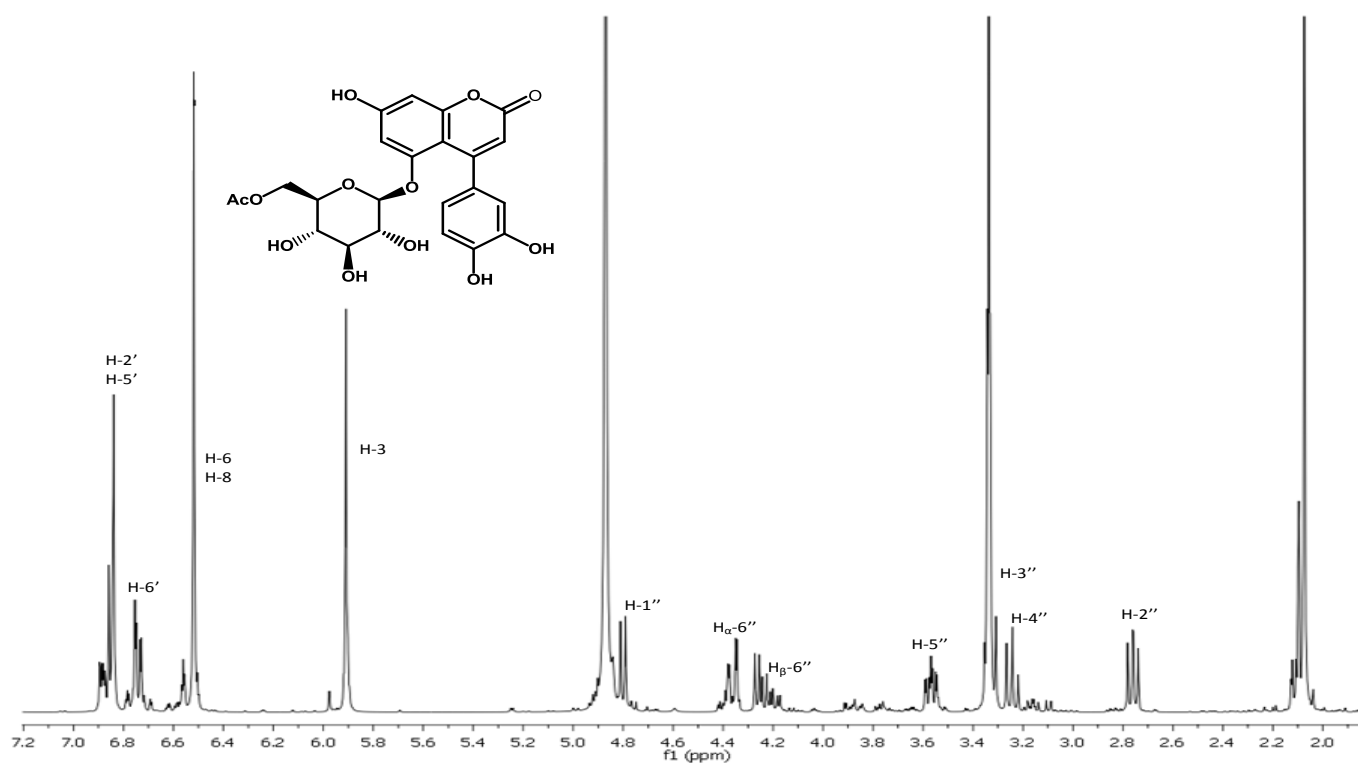
Espectro 1. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto 12

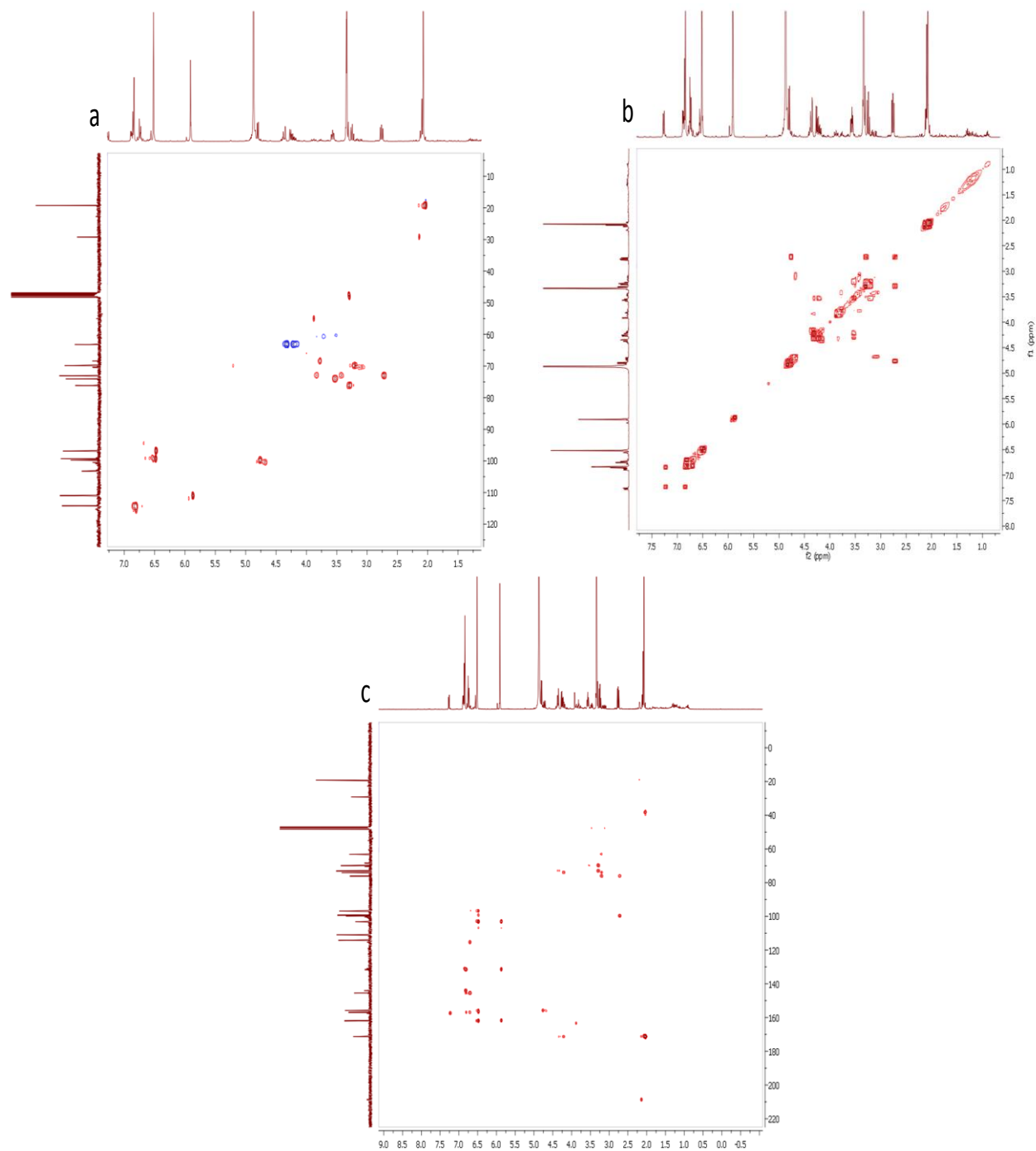


Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del compuesto 12

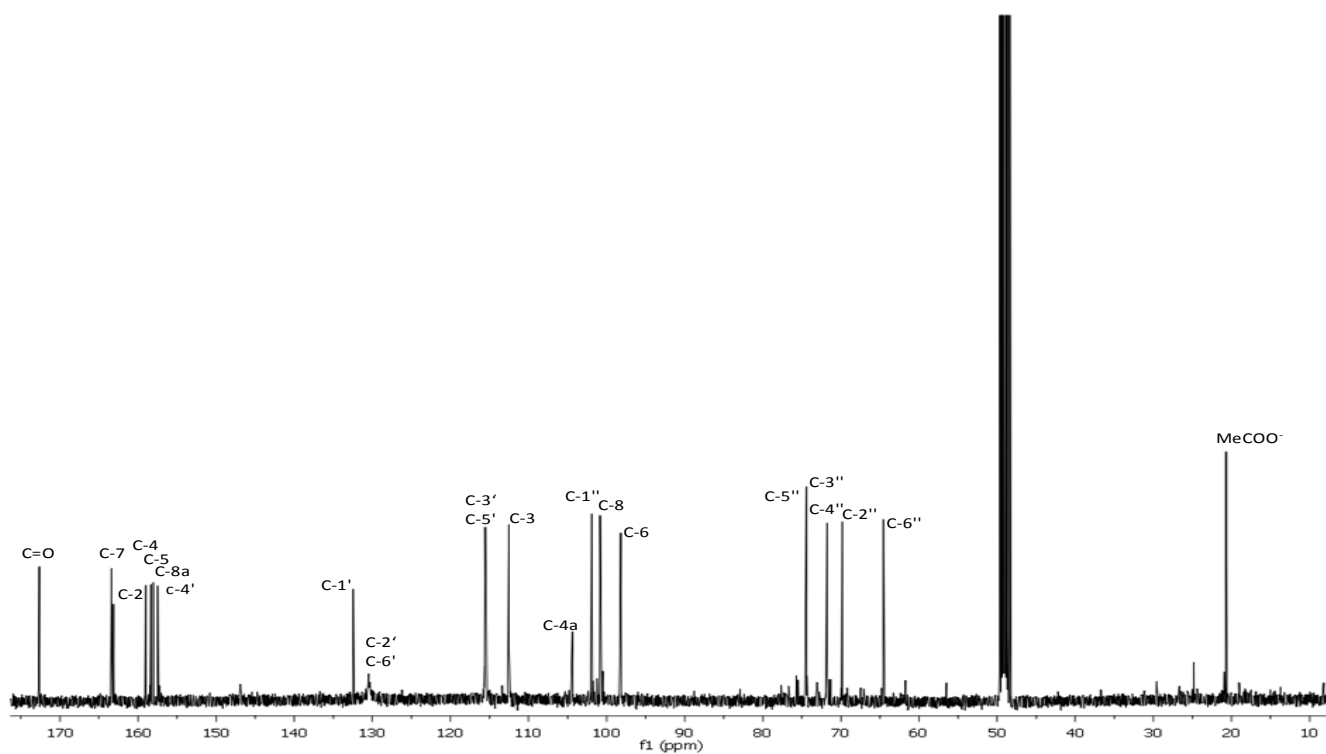
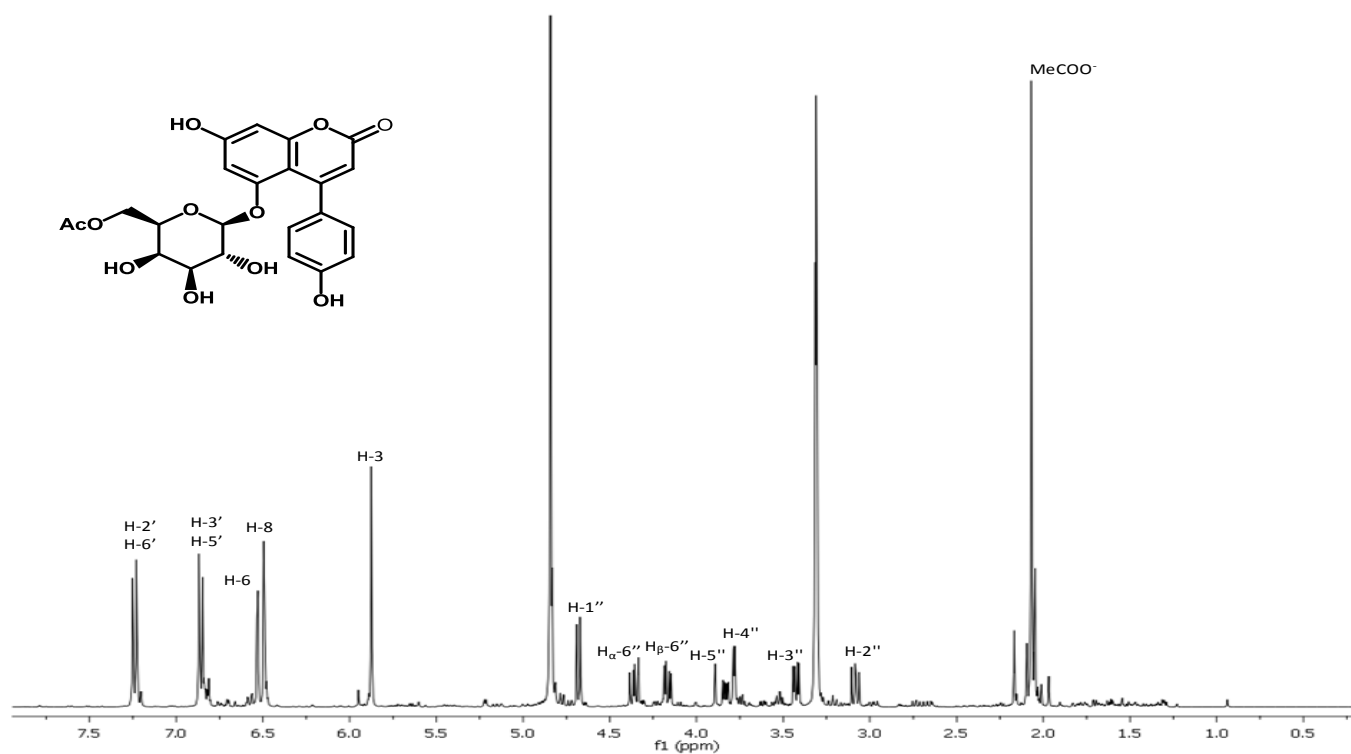


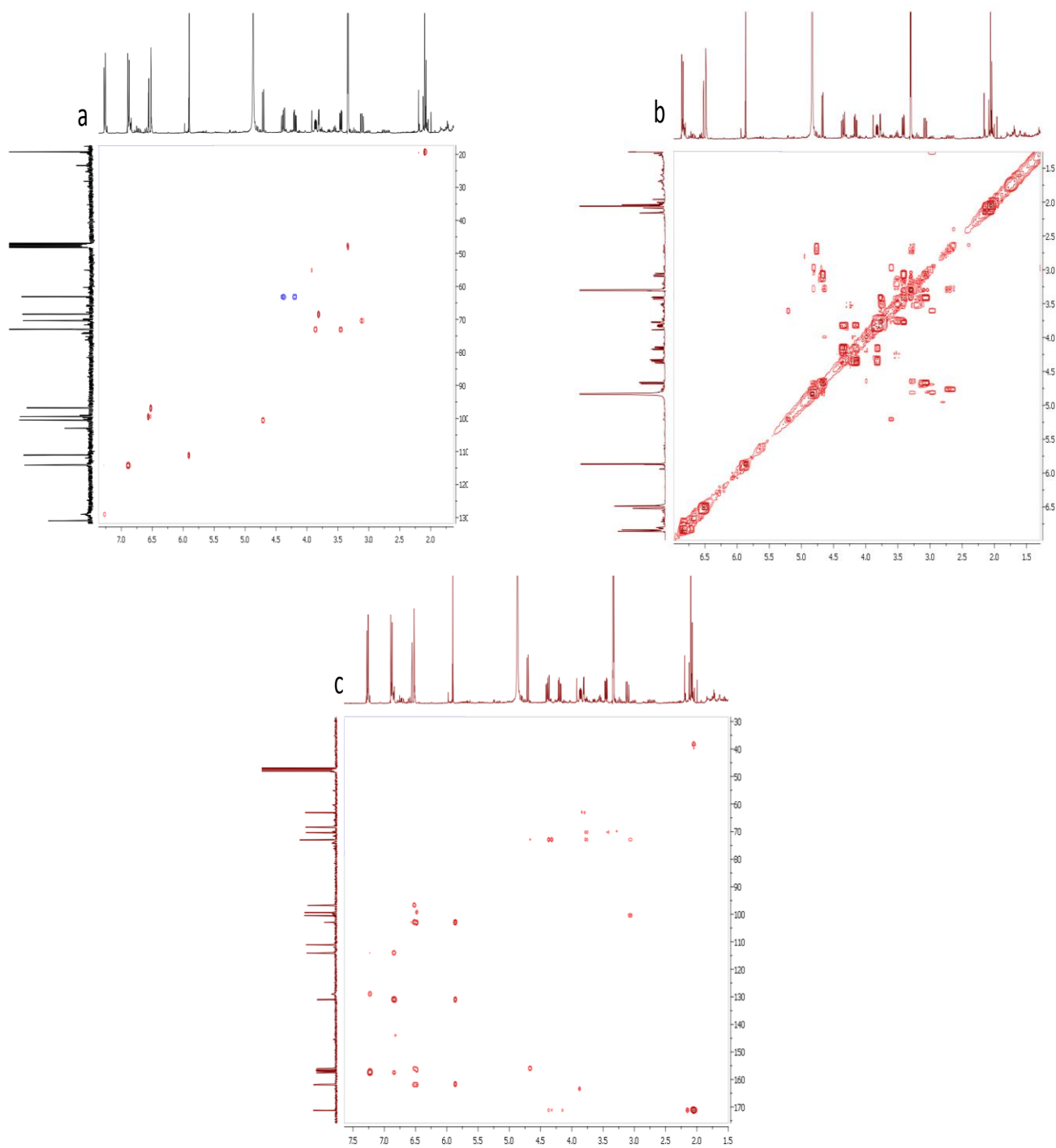
Espectro 3a) HSQC; Espectro 3b) COSY; Espectro 3c) HMBC del compuesto 12



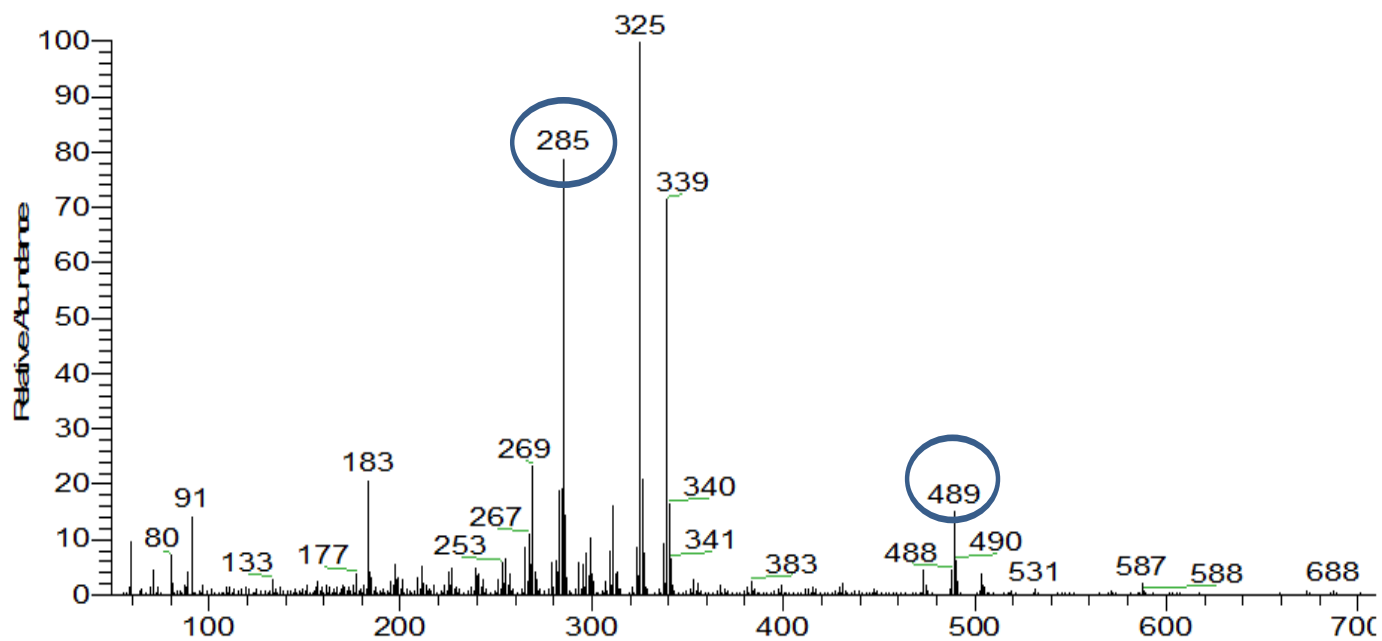


Espectro 6a) HSQC; Espectro 6b) COSY; Espectro 6c) HMBC del compuesto 13

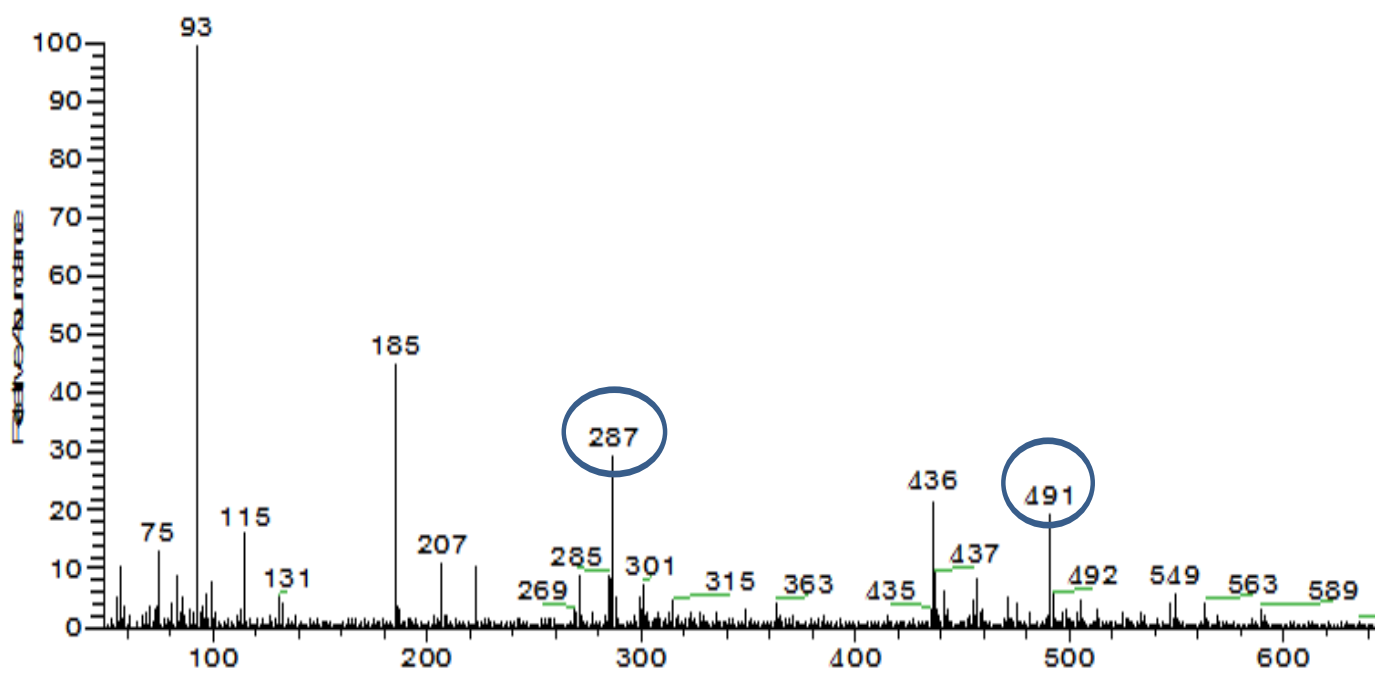




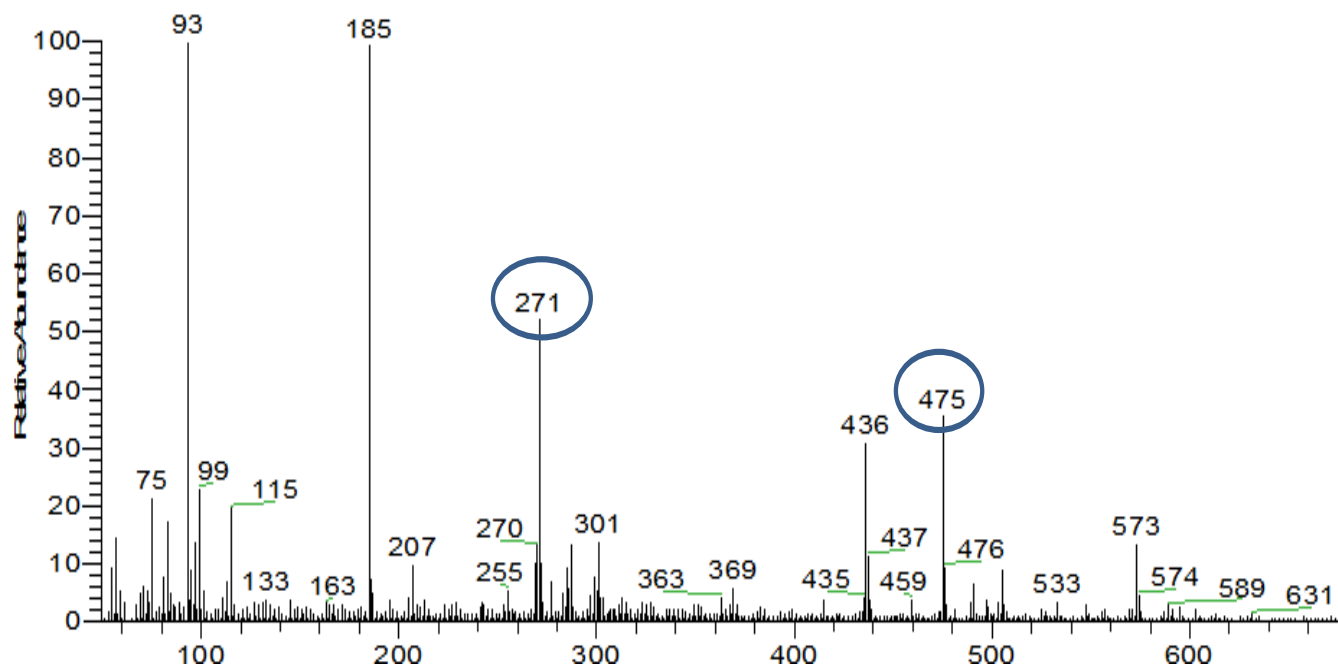
Espectro 9a) HSQC; Espectro 9b) COSY; Espectro 9c) HMBC del compuesto 14



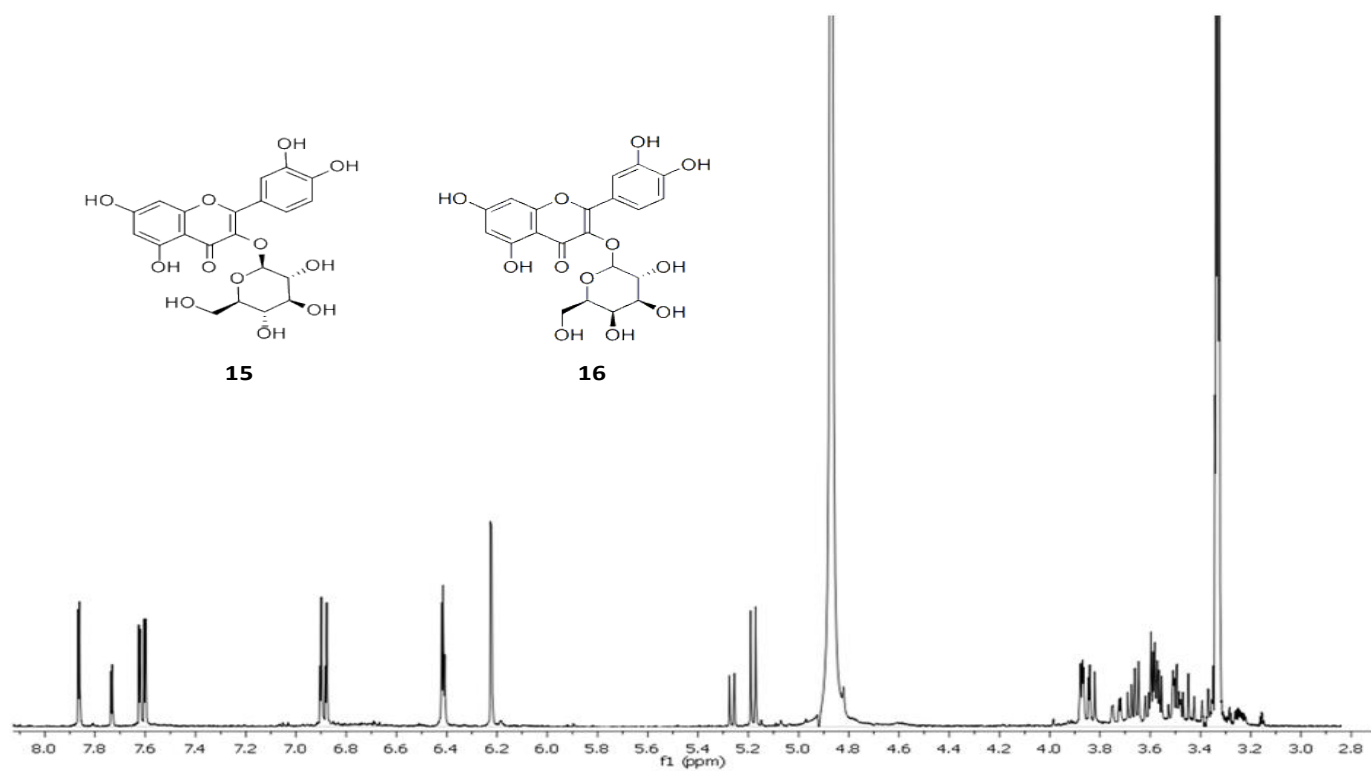
Espectro 10. Espectro de masas FAB⁻ del compuesto 12



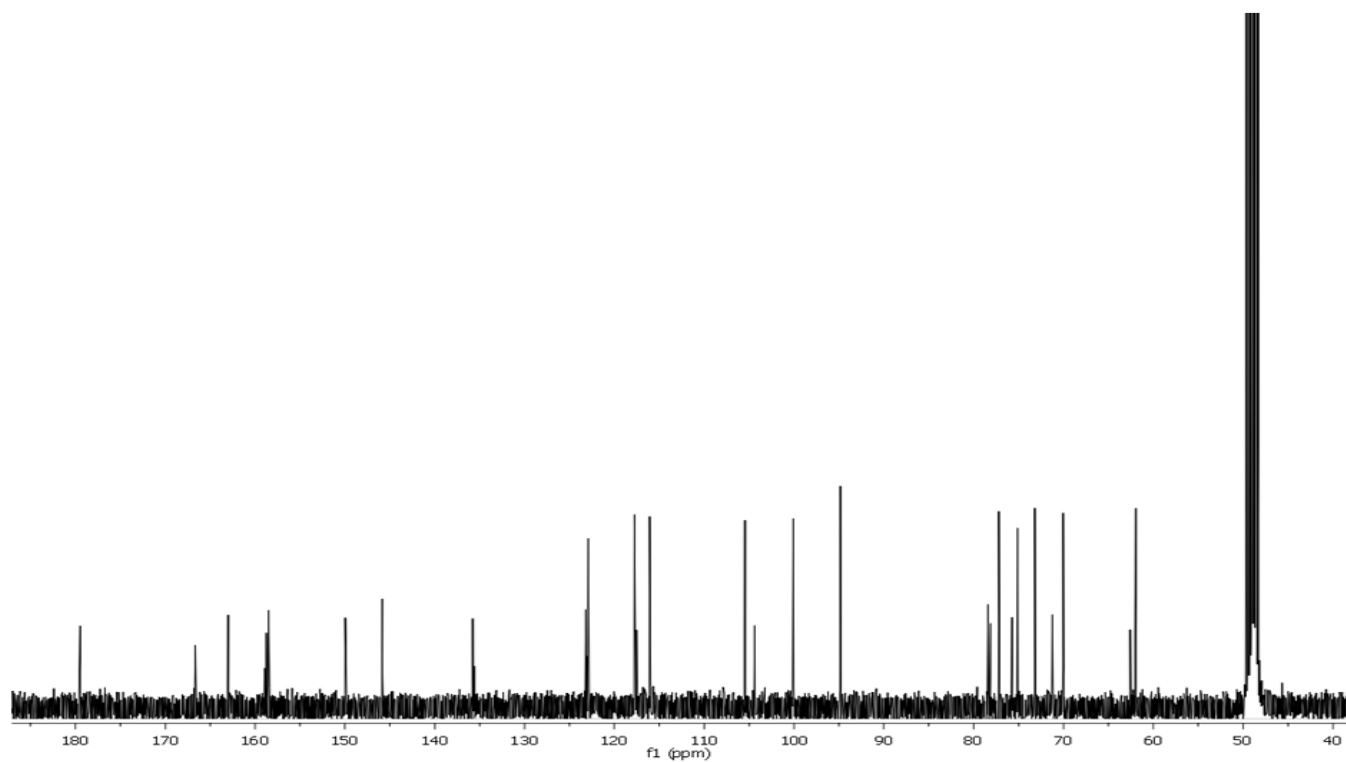
Espectro 11. Espectro de masas FAB⁺ del compuesto 13



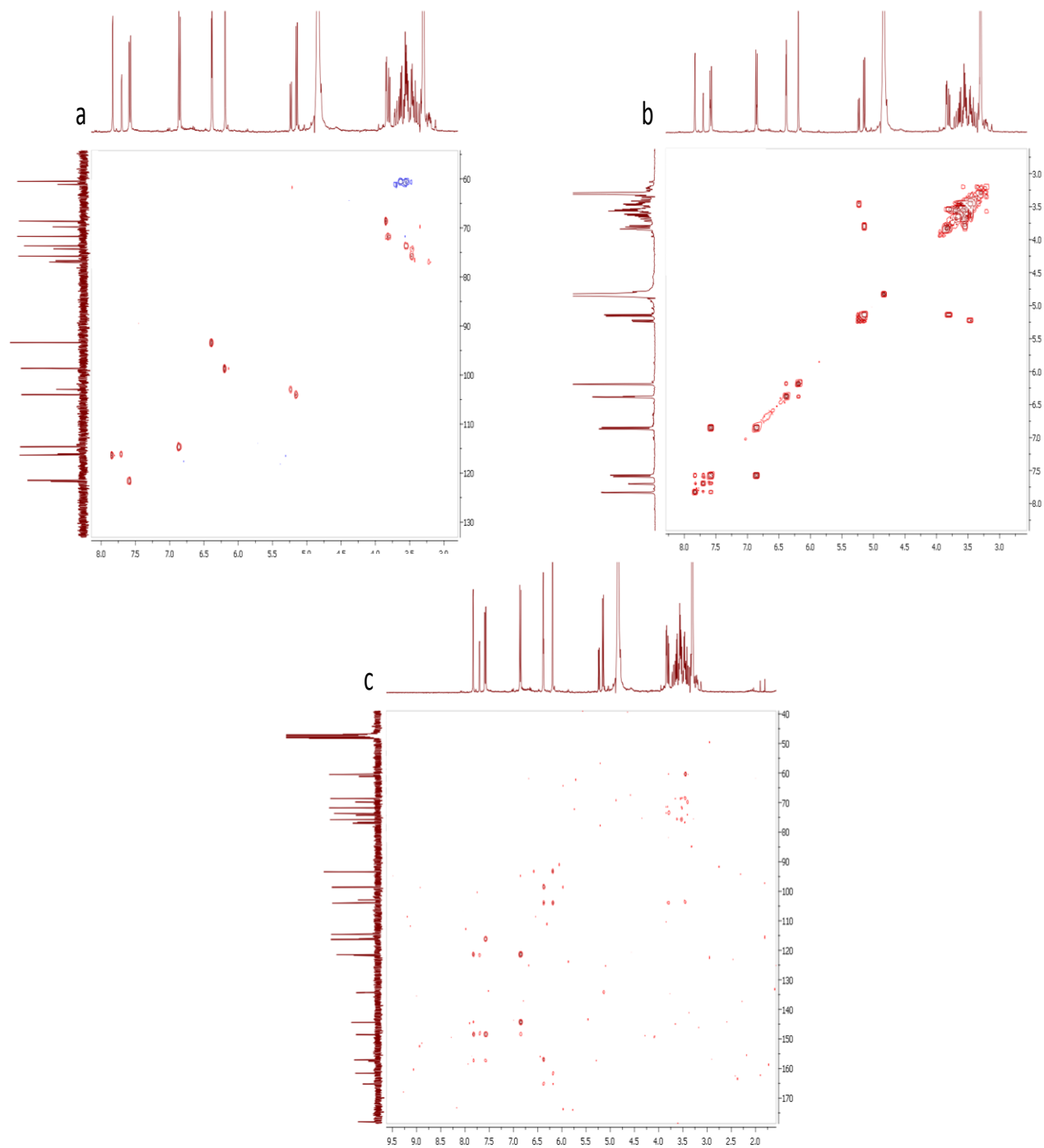
Espectro 12. Espectro de masas FAB⁺ del compuesto 14



Espectro 13. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) de la mezcla de los compuestos 15 y 16



Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de la mezcla de los compuestos 15 y 16



Espectro 15a) HSQC; Espectro 15b) COSY; Espectro 15c) HMBC de los compuestos 15 y 16