

Foja 105



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“ESTUDIO FITOQUIMICO DE
LA CIGARRILLA MEXICANA”**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A N :

**LIZETH MARGARITA RIOS PINEDA
MARIA DEL RAYO CAMACHO CORONA**



MEXICO, D. F.

1987.

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vi
LISTA DE ESQUEMAS -----	viii
LISTA DE ABREVIACIONES -----	xii
LISTA DE ESPECTROS -----	ix
INTRODUCCION -----	1
OBJETIVOS -----	13
Objetivos generales -----	13
Objetivos específicos -----	14
CONSTITUYENTES de la <u>Cigarrilla mexicana</u> -----	15
MATERIALES Y METODOS -----	15
1. Material vegetal -----	15
2. Determinación de alcaloides -----	15
3. Análisis cromatográficos -----	15
4. Preparación del extracto metanólico -----	16
5. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico ---	16

	Página
6.0 Aislamiento y purificación de los compuestos -----	24
6.1 Aislamiento de D-manitol, <u>9</u> . -----	24
6.2 Aislamiento de ácido oleanólico, <u>10</u> y ursólico <u>11</u> . -	24
6.3 Aislamiento del ácido-3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28- oico, <u>12</u> , ácido ursólico, <u>11</u> , cucurbitacina E, <u>13</u> , isocucurbitacina B, <u>14</u> y epi-isocucurbitacina B, <u>15</u> --	25
7.0 Caracterización de los compuestos aislados -----	28
7.1 Determinación de las constantes físicas y espectros- cópicas -----	28
7.2 Preparación de derivados -----	28
7.2.1 Acetilaciones -----	28
7.2.2 Metilaciones -----	29
7.2.3 Formación del acetónido del compuesto, <u>12c</u> --	30
RESULTADOS Y DISCUSION -----	31
1. Identificación del ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-12-en- 28-oico, Compuesto <u>12</u> -----	33
2. Identificación del ácido oleanólico <u>10</u> y ácido ursó- lico <u>11</u> -----	42
3. Identificación de la cucurbitacina E (compuesto <u>13</u>) -	46
4. Identificación de la iso-cucurbitacina B (compuesto <u>14</u>) -----	54
5. Identificación de la 3- <u>epi</u> -isocucurbitacina (compues- to <u>15</u> -----	59

	Página
CONCLUSIONES -----	62
RECOMENDACIONES -----	63
BIBLIOGRAFIA -----	64
APENDICE -----	69

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Familia Rubiaceae <u>sensu</u> Verdcourt (Verdcourt, 1965, 1976) -----	4
Tabla 2. Algunos géneros representativos de Rubiáceas (Verdcourt, 1965, 1976) -----	5
Tabla 3. Ejemplos de metabolitos secundarios farmacológicamente activos obtenidos de especies de plantas de la familia Rubiáceae -----	6
Tabla 4. Perfil fitoquímico de la familia Rubiaceae -----	7
Tabla 5. Distribución de triterpenos en Rubiaceae -----	9
Tabla 6. Sistemas de disolventes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	19
Tabla 7. Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	19
Tabla 8. Resumen del fraccionamiento vfa cromatografía en columna del extracto metanólico de la <u>Cigarrilla mexicana</u> -----	20
Tabla 9. Fraccionamiento vfa cromatografía en columna de las fracciones 457-586 de la columna original -----	27

	Página
Tabla 10. Preparación de derivados acetilados -----	29
Tabla 11. Preparación de derivados metilados -----	30
Tabla 12. Rendimiento de los compuestos aislados -----	32
Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos <u>12</u> , <u>12a</u> , <u>12b</u> , <u>12c</u> -----	34
Tabla 14. Constantes físicas y espectroscópicas de los com- puestos <u>10</u> , <u>10a</u> , <u>10b</u> y <u>11</u> -----	44
Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos <u>13</u> y <u>13a</u> -----	47
Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos <u>14</u> y <u>15</u> -----	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esqueletos de triterpenos de Rubiaceas -----	12
Figura 2. Patrón de fragmentación tipo retro-Diels-Alder del compuesto <u>12</u> -----	36
Figura 3. Reacción de formación de la Bromolactona -----	45
Figura 4. Disposición relativa y estereoquímica de los grupos carbinólicos primario y secundario -----	38
Figura 5. Tipos de acetónidos que formarían las estructuras parciales A y B de la Figura 5 -----	40
Figura 6. Estructura del compuesto <u>12</u> , <u>12a</u> y <u>12b</u> -----	41
Figura 6. Estructura del compuesto <u>12c</u> -----	41
Figura 7. Elementos estructurales del compuesto <u>13</u> -----	49
Figura 8. Esquema de fragmentación de la cucurbitacina E (Compuesto <u>15</u>) -----	50
Figura 9. Estructura de los anillos A y B del compuesto <u>13</u> -	51
Figura 10. Estructura de la cadena lateral del compuesto <u>13</u> -	52
Figura 11. Estructura de la cucurbitacina E y la cucurbitacina E triacetilada (<u>13</u> y <u>13a</u>) -----	53

	Página
Figura 12. Esquema de fragmentación del compuesto <u>14</u> y <u>15</u> ---	57
Figura 13. Estructura del anillo A del compuesto <u>14</u> -----	56
Figura 14. Formación del ión a m/z 334 por fragmentación tipo Mc Lafferty -----	58
Figura 15. Estructura de la isocucurbitacina B, <u>14</u> y <u>epi</u> -iso- cucurbitacina B, <u>15</u> -----	60

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Proceso seguido para determinar la presencia de alcaloides en <u>Cigarrilla mexicana</u> -----	17
Esquema 2. Extracción de la <u>Cigarrilla mexicana</u> -----	18

LISTA DE ESPECTROS

	Página
E-1. Espectro U.V. del compuesto <u>12</u> -----	70
E-2. Espectro I.R. del compuesto <u>12</u> -----	71
E-3. Espectro de Masas del compuesto <u>12</u> -----	72
E-4. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>12</u> -----	73
E-5. Espectro I.R. del acetónido <u>12c</u> -----	74
E-6. Espectro de RMN ¹ H del acetónido <u>12c</u> -----	75
E-7. Espectro de Masas del acetato <u>12b</u> -----	76
E-8. Espectro de RMN ¹ H del acetato <u>12b</u> -----	77
E-9. Espectro de Masas del éster metílico <u>12a</u> -----	78
E-10. Espectro de RMN ¹ H del éster metílico <u>12a</u> -----	79
E-11. Espectro I.R. de la mezcla <u>10</u> y <u>11</u> -----	80
E-12. Espectro de Masas de <u>10</u> y <u>11</u> -----	81
E-13. Espectro de RMN ¹ H de <u>10</u> y <u>11</u> -----	82

	Página
E-14. Espectro I.R. del compuesto <u>11</u> -----	83
E-15. Espectro de Masas del compuesto <u>11</u> -----	84
E-16. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>11</u> -----	85
E-17. Espectro I.R. de la bromolactona oleanónica <u>10a</u> -----	86
E-18. Espectro de Masas de la bromolactona oleanónica <u>10a</u> --	87
E-19. Espectro de RMN ¹ H de la bromolactona oleanónica <u>10a</u> --	88
E-20. Espectro I.R. del éster metílico <u>10b</u> -----	89
E-21. Espectro de RMN ¹ H del éster metílico <u>10b</u> -----	90
E-22. Espectro U.V. del compuesto <u>13</u> -----	91
E-23. Espectro I.R. del compuesto <u>13</u> -----	92
E-24. Espectro de Masas del compuesto <u>13</u> -----	92
E-25. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>13</u> -----	94
E-26. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>13a</u> -----	95
E-27. Espectro I.R. del compuesto <u>14</u> -----	96
E-28. Espectro de Masas del compuesto <u>14</u> -----	97

	Página
E-29. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>14</u> -----	98
E-30. Espectro de Masas de <u>14</u> y <u>15</u> -----	99
E-31. Espectro de RMN ¹ H de <u>14</u> y <u>15</u> -----	100
E-32. Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>9</u> -----	101
E-33. Espectro de RMN ¹ H de <u>9a</u> -----	102

LISTA DE ABREVIACIONES

- CDCl₃**: Cloroformo deuterado
d: doblete
dd: doble de dobles
D₂O: Agua deuterada
DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EH-I: Extracto hexánico
EMIE: Espectro de masas obtenido por impacto electrónico
Fig: Figura
Hz: Hertz
IR: Infrarrojo
J: Constante de acoplamiento
MHz: Mega Hertz
PF: Punto de fusión
ppm: partes por millón
RMN¹H: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s: singlete
t: triplete
TMS: Tetrametilsilano
UV: Ultravioleta
sa: singlete ancho
δ: delta
Ac: acetato
Ra: Reactivo analítico

INTRODUCCION

Las Rubiáceas constituyen una familia muy grande que contiene de 6000 a 7000 especies agrupadas en unos 500 géneros. Las especies son principalmente tropicales y están adaptadas a numerosos ambientes. Desde el punto de vista taxonómico se han propuesto numerosas clasificaciones y una de las más acentadas es la descrita por Verdcourt en 1958 con posteriores modificaciones en 1976. (Verdcourt, 1965, 1976) en la Tabla 1 se resume la división de la familia de las Rubiáceas sensu Verdcourt y en la Tabla 2, se representan algunos géneros representativos de las diferentes tribus. Indicadas en la Tabla 1.

Muchas especies de esta vasta familia constituyen fuentes primordiales de numerosos compuestos farmacológicamente activos, algunos de los cuales como la Quina, la quinidina y la emetina son de gran importancia terapéutica. En la Tabla 3 se especifican ejemplos de estos compuestos y sus respectivas propiedades medicinales. Es de hacer notar que todos los compuestos indicados en la Tabla 3 se han obtenido a partir de plantas de amplio uso en la medicina popular de diversas regiones del mundo.

Las Rubiáceas mexicanas ofrecen muchas posibilidades en la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de principios activos ya que muchas especies gozan de reputación folklórica, como agentes medicinales (Lozoya, 1982; Martínez, 1969; Aiello, 1979,

Paris, 1960; Martínez del Campo, 1906; Inter alia). Un ejemplo de estas plantas lo constituye la Cigarrilla mexicana (Zucc. et Martius ex DC) Aiello, la única especie del género el cual es endémico de México. Se encuentra distribuida principalmente en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León. Crece generalmente en zonas áridas sobre terrenos calizos y a lo largo de las barrancas, pero también se le puede conseguir en lugares húmedos y arbolados ó, en orillas de los ríos. Generalmente es un árbol pequeño que mide hasta tres metros de altura, las hojas y las cortezas son extremadamente amargas y sus flores muy vistosas. Aiello en una reciente monografía acerca de varios géneros de Rubiáceas hace una descripción botánica detallada de la planta (Aiello, 1979).

Popularmente esta planta es conocida con los nombres de "cigarrilla" ó "cigarro", ya que al secarse sus hojas se enrollan dando el aspecto de papel de cigarro. También se le llama "cacalo-xochilt" (flor de cuervo) en San Luis Potosí y, "Flor de San Pedro" en el estado de Hidalgo (Simeon, 1963).

Como ya se indicó previamente la planta es usada con propósitos medicinales en varias regiones del país: en el estado de Hidalgo es muy popular como emético y para este fin generalmente los nativos ingieren una decocción acuosa preparada con las hojas y ramas de la planta (Aiello, 1979). Por otra parte en muchos mercados de Xalapa las partes aéreas se venden como antiambiano (Lorence, 1986).

Además de sus usos medicinales, las flores de esta planta son muy apreciadas para fines ornamentales, así tenemos que en Santa Catarina (Hidalgo) las iglesias son decoradas con las flores de la Cigarrilla durante la celebración de las fiestas patronales de San Isidro (Aiello, 1979).

Desde el punto de vista fitoquímico no se ha descrito ningún estudio previo de la Cigarrilla mexicana, pero los múltiples estudios químicos realizados sobre Rubiáceas hasta la fecha, permiten establecer el perfil fitoquímico que se resume en la Tabla 4.

Como se puede observar en la Tabla 5 los triterpenos pentacíclicos reportados corresponden a los del tipo oleanano, ursano, lupano, friedelano, "taraxano y a los modificados del tipo meliacina y limonoides; en cambio, entre los tetracíclicos sólo se han descrito los del tipo cucurbitano (Reguero et al., 1967). En la Tabla 5 se señalan ejemplos representativos de los diferentes triterpenos encontrando en la familia, así como sus fuentes naturales, sus esqueletos básicos y las referencias correspondientes.

En la Figura 1 se ilustran las correspondientes estructuras tipo de los triterpenos resumidos en la Tabla 5.

Tabla 1. Familia Rubiaceae Sensu Verdcourt (Verdcourt, 1965,1976).

Subfamilia	Tribus
Cinchonoideae	Naucleaeae, Cinchoneae, Cephalantheae, Virectarieae, Rodeletieae, Mussaendeae, Heinsieae, Catesbaeeae, Gardenieae, Coffeaeae, Retiniphyllaeae, Altberteae, Vanguerieae, Chiacocceae
Rubioideae	Psychotrieae, Coussareae, Morindeae, Triainolopideae, Schradereae, Urophyllaeae, Craterispermeae, Knoxieae, Paederieae, Argostemmataeae, Ophiorrhizeae, Hamelieae, Cruckshanksieae, Hedryotideae, Anthospermeae, Spermacoceae, Rubieae
Guettardoideae	Gettardeae
Helleoideae	Helleae
Henriquezieae	Henriquezieae

Tabla 2. Algunos géneros representativos de Rubiaceae (Verdcourt, 1965, 1976).

<u>Tribu</u>	<u>Género</u>
Subfamilia - Cinchonoideae	
Naucleaeae	<u>Nauclea</u> , <u>Adina</u> , <u>Anthocephalus</u>
Cinchoneae	<u>Uncaria</u> , <u>Capirona</u> , <u>Exostemma</u> , <u>Coutarea</u> , <u>Remijia</u> , <u>Mytragyna</u> , <u>Cinchona</u> , <u>Corynanthine</u> , <u>Cinarrilla</u> <u>Coutaportia</u>
Rondeletiaeae	<u>Rondeletia</u> , <u>Hintonia</u> , <u>Pogonopus</u>
Mussaendeae	<u>Isertia</u>
Gardenieae	<u>Gardenia</u> , <u>Genipa</u> , <u>Randia</u>
Coffeaeae	<u>Coffea</u>
Subfamilia - Rubiaideae	
Psychotrieae	<u>Psychotria</u> , <u>Cephaelis</u>
Morindeae	<u>Morinda</u>
Urophyllaeae	<u>Urophyllum</u>
Hedyototideae	<u>Bouvardia</u> , <u>Hedyotis</u> , <u>Oldenlandia</u>
Spermacoceae	<u>Borreria</u>
Rubiaeae	<u>Rubia</u> , <u>Galium</u>
Subfamilia - Guettardoideae	
Guettardeae	<u>Guettarda</u>

Tabla 3. Ejemplos de metabolitos secundarios farmacológicamente activos obtenidos de especies de plantas de la familia Rubiaceae

COMPUESTO	PROPIEDAD MEDICINAL	REFERENCIA
Quinina	Antimalárico	Boit, 1961
Quinidina	Antifibrilante	Boit, 1961
Emetina	Antiamibiano Emético Antitumoral	Boit, 1961; Fujii et.al. 1983
Rondeletina	Antitumoral	Koike, 1980
Panamesina	Antitumoral	Koike, 1980
Geniposido	Laxante	Sticher, 1976
Acido genpico	Antimicrobian	Sticher, 1976
Bouvardina	Antitumoral	Zalacain, 1982
Camptotecina	Antitumoral	Talur, 1976
Yohimbina	Hipotensor	Lang, 1966
Ajmalicina	Hipotensor	Kronenberg, 1956

Tabla 4. Perfil fitoquímico de la familia Rubiaceae

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA	
TERPENOIDES			
Monoterpenoides	Iridooides	Sticher, 1976	
	Secoiridooides	Bock <u>et.al.</u> , 1976	
Diterpenoides	Kaurenos	Ducroix, 1975	
	Dolabradienos	Koike <u>et.al.</u> , 1980	
Triterpenoides	Pentacíclicos	Ursanos	
		Oleananos	
		Lupano Friedelano	
	Tetracíclicos	Cucurbitanos	Hegnauer, 1973; Pant, <u>et. al.</u> , 1979 Das <u>et. al.</u> , 1983
	Modificados	Meliacinas Limonoides	Reguero, 1987 Hegnauer, 1973 Vitagliana, 1970
ANTRAQUINONAS Y ANTRAQUINOLES			
		Adesogau, 1973	
NAFTALENOS			
		Hegnauer, 1973	
COMPUESTOS AROMATICOS SIMPLES			
	C_6-C_1 y C_6-C_3	Hegnauer, 1973	
FLAVONOIDES			
	Flavonas	Wilson <u>et.al.</u> , 1984	
	Flavonoles	Harborne, 1975; Harborne, 1982	
CROMONAS			
		Hegnauer, 1973	
CUMARINAS SIMPLES			
		Hegnauer, 1973	

Tabla 4. Continuación: Perfil fitoquímico de la familia Rubiaceae

TIPO DE COMPUESTO	VARIACION ESTRUCTURAL	REFERENCIA
NEOFLAVONOIDES		Monache <u>et. al.</u> , 1984
XANTINAS		Hegnauer, 1973
TANINOS		Hegnauer, 1973
ESTEROIDES	Esteroides	Hegnauer, 1973
ALCALOIDES		
Indol-iridoides	Tipos C, D y V	Heningway <u>et. al.</u> , 1980
Indol-noiridoides	Simples	Heningway <u>et. al.</u> , 1980
	Beta carbolinas	
	Poliindoleninas	
Quinolina-iridoides		Heningway <u>et. al.</u> , 1980
Quinolina-noiridoides		Parry <u>et. al.</u> , 1978
Isoquinolina-iridoides	Tipo emetina	Boit, 1961
	Tipo proto-emetina	Fujii <u>et. al.</u> , 1983
	Tipo ipecosido	
Indol-isoquinolinas		Heningway, 1980
Piridínicos		Schlitter <u>et. al.</u> , 1978
Peptídicos		Zalacain <u>et. al.</u> , 1982

Tabla 5. Distribución de triterpenos en Rubiáceas.

Sustancia	Fuente natural	Esqueleto básico	Grupos funcionales	Referencia
Acido oleanólico	<u>H. auricularia</u> <u>O. difussa</u> <u>Paederia chinensis</u> <u>R. sinensis</u>	<u>1</u>	3 β -OH, Δ^{12} -28-COOH	Hegnauer, 1973
Acido 3-epi-siarsindólico	<u>Gardenia latifolia</u>		3 α , 19 α -(OH) ₂ , Δ^{12} -28-COOH	Reddy, et.al., 1975
Acido cántico	<u>Canthium dicoccum</u>		3 β -7 β -(OH) ₂ ; Δ^{12} -28-COOH	Chatterjee, et. al., 1979
19 α -hidroxi-erithrodioi	<u>Gardenia aumifera</u>		3 β , 19 α , 28(OH) ₂ ; Δ^{12}	Reddy et.al., 1977
Acido cadambagénico	<u>Anthocephalus cadamba</u>		3 β -OH, Δ^{12} , 27, 28-(COOH) ₂	Sahu et. al., 1974
3 β -hidroxi-olean-12-en-27-28-dioico	<u>Antifea chinensis</u> <u>Randia sp</u>		3 β -OH- Δ^{12} , 27, 28-(COOH) ₂	Hegnauer, 1973
Betulina	<u>Adina pilulifera</u> <u>Ixorachinensis</u> <u>Lasianthus chinensis</u>	<u>4</u>	3 β -28-(OH) ₂ , Δ^{20} (29)	Hegnauer, 1973
3-epi-betulina	<u>Canthium dicoccum</u>		3 α , 28-(OH) ₂ , Δ^{20} (29)	Das et.al., 1971
Friedelina	<u>Antifea chinensis</u>	<u>5</u>	3-ceto	Hegnauer, 1973
Fridelan-3 β -01 friedelina	<u>Antifea chinensis</u> <u>ophiorrhiza japonica</u>			

Tabla 5. Distribución de triterpenos en Rubiáceas (continuación).

Sustancia	Fuente natural	Esqueleto básico	Grupos funcionales	Referencia
Dammaranediol II	<u>Elaegia utilis</u>	<u>6</u>	3 β ,20,26(OH) ₃ ; Δ^{24} ;	Biffu.T. <u>et.al.</u> , 1978
Dammaraneriol	<u>Elaegia utilis</u>		3 β ,20,26(OH) ₃ ; Δ^{24} ;	-
Tisanolactona	<u>Thyranospermum diffusum</u>	<u>7</u>	2,3-seco; 2+3-lactona; 1 β ,3 β -epoxi; $\Delta^{22}(30)$	Aimi <u>et.al.</u> , 1981
7 α -acetoxidihidronomilina	<u>Uncaria gambleo</u>	<u>8</u>	1 α -7 α -(OA) ; 3,4-seco; 16,17-seco,14 β ,15 β -epoxi; 3-4; 16-17 dilactona	Ahmed <u>et.al.</u> , 1978
Acido quinóvico	<u>Adina pilulifera</u> <u>Antracephalus cadamba</u> <u>Antirbea chinensis</u> <u>Mitragyna sp</u> <u>Nuclea orientalis L.</u> <u>Randia sp.</u>	<u>2</u>	3 β -OH, $\Delta^{12,27,28}$ - (COOH) ₂	Hegnauer, 1973
Tetrahidro-cucurbitacina F	<u>Hintonia latiflora</u>	<u>3</u>	2 β -3 α ,16 α ,20 β ,25-pentahidroxi-11,21-diceto	Aplin <u>et.al.</u> , 1971
Tetrahidro-cucurbitacina F-25 acetato			2 β -3 α ,16 α ,20 β -tetrahidroxi,25 acetato, 11,21 diceto	Reguero <u>et.al.</u> , 1987

Tabla 5. Distribución de triterpenos en Rubiáceas. (continuación)

Sustancia	Fuente natural	Esqueleto básico	Grupos funcionales	Referencia
Acido ursólico	<u>Antirhea chinensis</u> <u>Borreria, bispida</u> <u>H. auricularia</u> <u>Knoxia corymbosa</u> <u>K. zeylanica</u> <u>Morinda umbellata</u> <u>O. diffusa</u> <u>Pygmaeothamnus</u>	2	3 β -OH Δ^{12} , 28-COOH	Hegnauer, 1973
Acido Ribocoumá- rico	<u>Rubia cordifolia</u>		3 β -O- β -coumaro11; Δ^{12} , 30-OH; 28-COOH	Talapatra <u>et.al.</u> , 1981
Acido Rubifólico	<u>Rubia cordifolia</u>		3 β , 30-(OH) ₂ ; Δ^{12} ; 28-COOH	-
Acido uncárico	<u>Uncaria gamblea</u>		3 β , 6 β , 18 β -(OH) ₃ ; Δ^{12} -30-COOH	Herath <u>et.al.</u> , 1979
Acido dicetouncá- rico	<u>Uncaria gamblea</u>		3,6-dioxo-18 β -OH; Δ^{12} ; 30-COOH	-
Acido diacetil- uncárico	<u>Uncaria gamblea</u>		3 β -6 β -(OAc) ₂ ; 18 β - OH; Δ^{12} ; 30-COOH	-

*El número se refiere al correspondiente en la Figura 1.

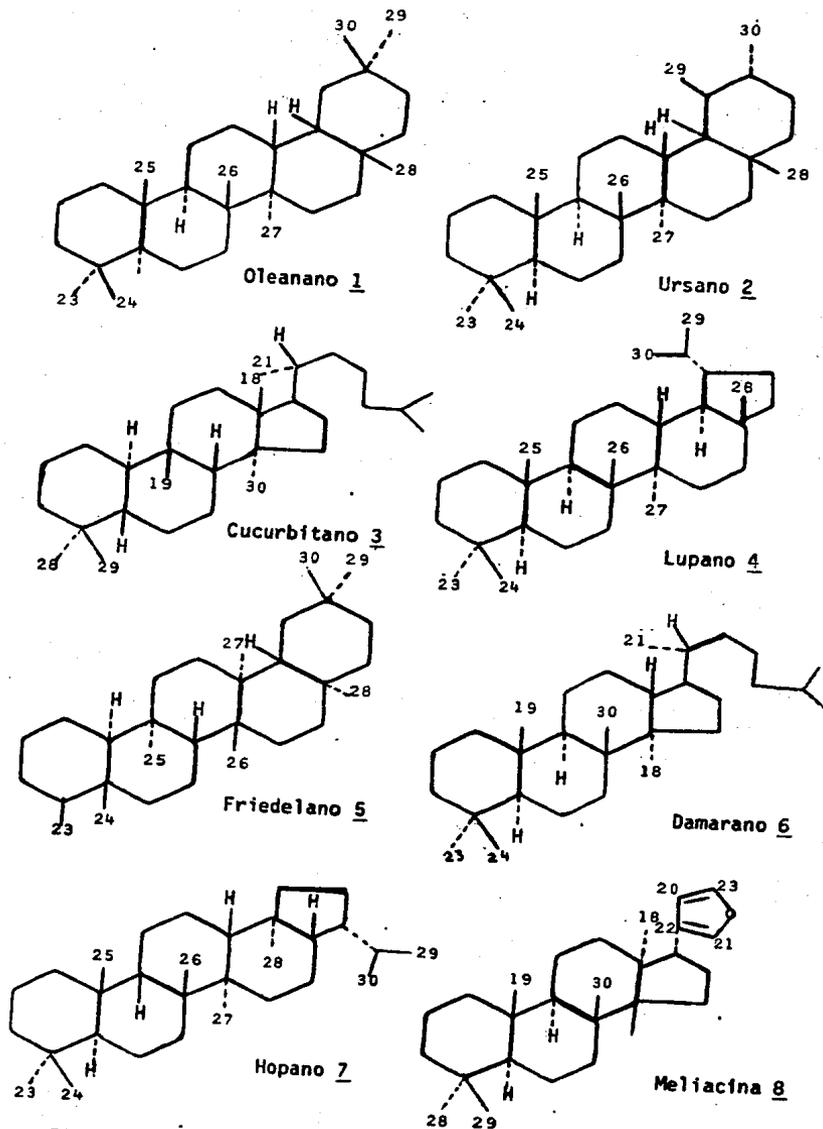


Figura 1. Esqueletos de triterpenos de Rubiáceas.

OBJETIVOS

1. Objetivos Generales

El propósito del siguiente trabajo fué realizar la investigación fitoquímica preliminar de la Cigarrilla mexicana (Zucc et. martius ex U.C.) Aiello como parte de un estudio sistemático de algunas Rubiáceas mexicanas usadas en medicina tradicional.

Las consideraciones generales tomadas en cuenta para establecer dicho objetivo fueron las siguientes:

- a) Numerosas Rubiáceas mexicanas son ampliamente usadas en medicina tradicional.
- b) Es cada vez más necesario considerar la medicina tradicional como una posible alternativa para resolver algunos de los problemas de salud en México y por ende, cualquier proyecto que se aboque al estudio sistemático de algunos de los aspectos (en este caso el químico) de los recursos de que hace uso esta medicina esta bien justificado.
- c) El estudio químico de las plantas usadas en medicina tradicional por una parte contribuyen al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana y además al hallazgo de nuevos y/o conocidos agentes medicinales.

2. Objetivos Especificos

- 2.1 Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de la Cigarrilla mexicana.
- 2.2 Determinar la presencia ó ausencia de alcaloides en partes aéreas de la planta, considerando que algunas especies de géneros relacionados son ricas en alcaloides y que, previamente se ha reportado como dudosa presencia de los mismos en la Cigarrilla mexicana.
- 2.3 Fraccionar el producto vegetal mediante los métodos adecuados.
- 2.4 Separar y purificar algunos de los constituyentes de las diferentes fracciones.
- 2.5 Identificar mediante métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos las sustancias aisladas.
- 2.6 Correlacionar los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a:
 - A) Composición química de las especies estudiadas.
 - B) Actividad biológica de las sustancias aisladas y su posible relación con las propiedades medicinales de la planta.

Constituyentes de la Cigarrilla mexicana
(Zucc. et martius ex DC.) Aiello

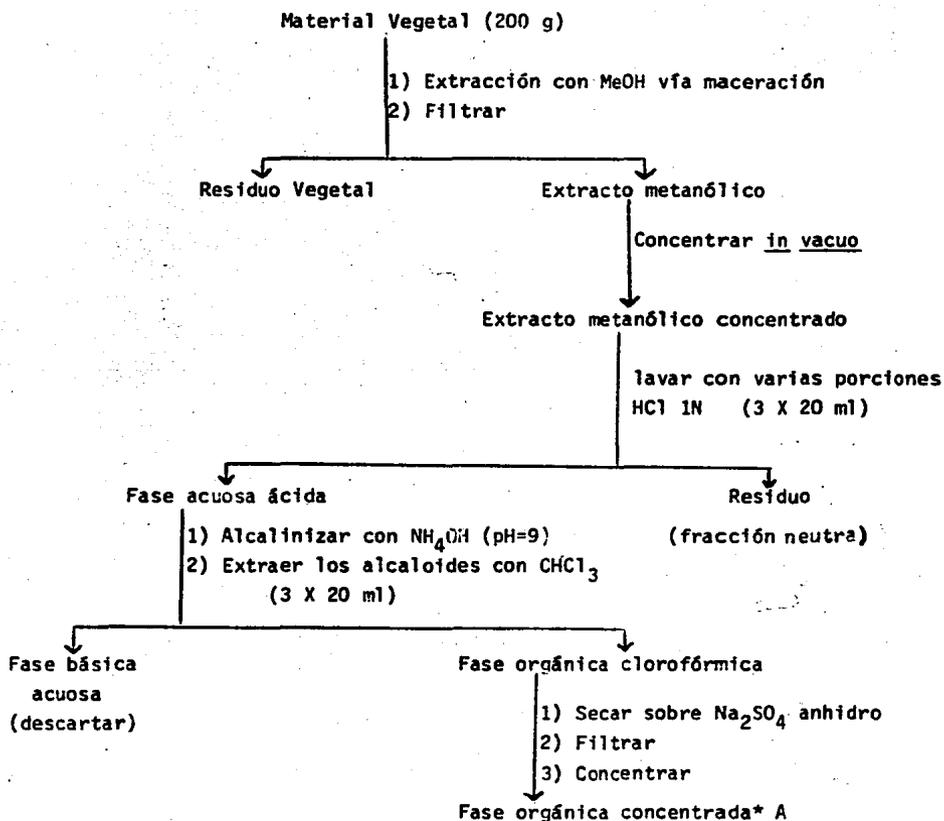
Materiales y Métodos

1. Materia Vegetal. La planta (partes aéreas) fué colectada en la barranca de Tolantongo, Hidalgo, el 23 de abril de 1986 y fué identificada por el Dr. David Lorence del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra se depositó en el Herbario Nacional (Voucher DL 5040). El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se cortó en trozos pequeños; posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos Modelo Wiley 4.
2. Determinación de alcaloides. La determinación de alcaloides se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Harborne (Harborne, 1984), la cual se resume en el Esquema 1.
Como reactivos se emplearon el de Dragendorff y el de Mayer y, para realizar ambas determinaciones, se disolvió una pequeña cantidad de la fase orgánica A en metanol, la solución resultante se acidificó mediante HCl 1N y finalmente se le agregó cada uno de los reactivos. En ambos casos se utilizó un blanco y un patrón adecuado para confirmar la veracidad de las reacciones.
3. Análisis cromatográficos. Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utili-

zando placas de vidrio cubiertas de gel de sílice (gel de sílice 60 GF₂₅₄, Merck).

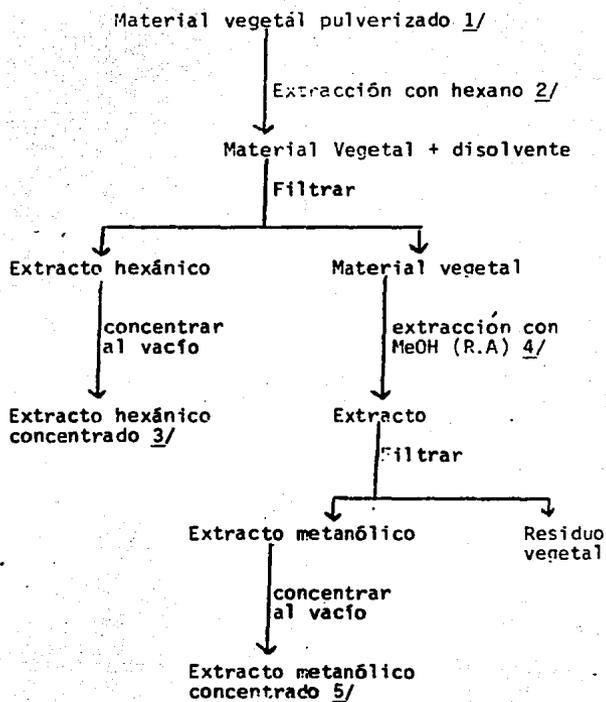
Los sistemas de disolventes y los agentes cromogénicos empleados, se resumen en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

4. Preparación del extracto metanólico. 3.4 Kg de partes aéreas secas y pulverizada de la planta se extrajeron según el procedimiento señalado en el Esquema 2.
5. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico. Una parte del extracto metanólico (588.52 g) se fracciono preliminarmente mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice desactivada al 30% con agua destilada (3 Kg, gel de sílice G-60 Merck de 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con hexano, cloroformo, Ac^oEt y metanol en diferentes porciones, las cuales se muestran en la Tabla 8. Se recogieron un total de 939 fracciones de 500 ml cada una; cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. En la Tabla 8 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y observaciones adicionales.



A* sobre este extracto se realizaron las pruebas de Meyer y Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides.

Esquema 1. Proceso seguido para determinar la presencia de alcaloides en Cigarrilla mexicana.



1/ 3.407 Kg

2/ Vía maceración por períodos de 72 horas utilizando 2.5 l de hexano

3/ Cantidad total del extracto hexánico: 109 g.

4/ Vía reflujo 3 extracciones por 2 hr. cada una, utilizando 3.5 l de MeOH (R.A.)

5/ Cantidad total del extracto metanólico: 1288.5 g

Esquema 2. Extracción de Cigarrilla mexicana.

Tabla 6. Sistemas de disolventes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE DISOLVENTES	COMPOSICION	PROPORCION (%)
I	Hexano	100
II	Hexano:cloroformo	diversas proporciones
III	Cloroformo	100
IV	Cloroformo:AcOEt	diversas proporciones
V	Acetato de etilo	100
VI	AcOEt:MeOH	diversas proporciones
VII	CHCl ₃ :MeOH	diversas proporciones

Tabla 7. Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

AGENTE REVELADOR	COMPOSICION	REFERENCIA
Reactivo de Dragendorff	2.6 g de carbonato de bismuto; 7 g de yoduro de sodio y 25 ml de ácido acético glacial	Harborne, 1984
Sulfato cérico	Sulfato cérico amónico 12 ₃ ; ácido sulfúrico concentrado 22.2 ml; 350 g hielo picado.	Stahl, 1969

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

Tabla 8. Resumen del fraccionamiento *via* cromatografía en columna del extracto metanólico de la *Cigarrilla mexicana*.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor	Observaciones adicionales	
Hexano:cloroformo	9:1	1- 70	4- 23	Sólido	blanco verdoso	parafina	-	
			24- 34	Aceitoso				
			35- 46					
			47- 54					
			55- 71					
Hexano:cloroformo	8:2	71- 91	72- 92	Sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina	-	
			93-100					
Hexano:cloroformo	5:5	92-106	101-104	Sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina	-	
Cloroformo	100	107-159	105-108	Sólido aceitoso amorfo	blanco verdoso	parafina	-	
			127-140					
Cloroformo	100	160-419	141-165	Sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina	-	
Cloroformo:AcOEt	9:1							166-170
								171-175

+ Fracciones estudiadas
- Fracciones descartadas

Tabla 8. Continuación: Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto metanólico de la Cigarrilla mexicana.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fraciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor	Observaciones adicionales
Cloroformo:AcOEt	9:1	176-181	176-181	Sólido-quebradizo	blanco verdoso	No	-
			182-183	Sólido-quebradizo	blanco verdoso	No	-
			184-199	Sólido-quebradizo.	verdoso	No	-
			200-222	Sólido-quebradizo	verdoso	No	-
			223-230	Sólido-amorfo	blanco verdoso	No	-
			231-245	Sólido-amorfo	blanco amarillo	No	+
			246-288	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+
			259-267	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+
			268-285	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+
			286-296	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+
			297-312	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+
			313-347	Sólido-amorfo	amarillo canario	No	+

+ Fracciones estudiadas

- Fracciones descartadas

22.

Tabla 8. Continuación: Resumen del fraccionamiento vfa cromatografía en columna del extracto metanólico de la Cigarrilla mexicana.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor	Observaciones adicionales
			348-397	Sólido-amorfo	amarillo verdoso	No	+
Cloroformo-AcOEt	8:2	420-476	398-456	Sólido-amorfo	blanco verdoso	No	+
			457-472	Sólido-amorfo	amarillo verdoso	Amargo	+
	7.5:2.5	477-500	473-510	Sólido-amorfo	amarillo verdoso	Amargo	+
			501-519				
	6:4	520-539	511-526	Sólido-amorfo	amarillo verdoso	Amargo	+
			527-543	Sólido-amorfo	amarillo verdoso	Amargo	+
	5:5	540-612	544-556	Sólido-amorfo	amarillo tenue	Amargo	+
			557-586	Sólido-amorfo	amarillo canario	Amargo	+
4:6	613-634	587-614	Sólido-amorfo	amarillo canario	Amargo	+	

+ Fracciones estudiadas

- Fracciones descartadas

Tabla 8. Continuación: Resumen del fraccionamiento vfa cromatografía en columna del extracto metanólico de la Cinarrilla mexicana.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor	Observaciones adicionales
	4:6						
	3:7	635-706	615-691	Sólido-amorfo	blanco verdoso	Amargo	+
	2:8	707-722	692-711	Sólido-amorfo	blanco verdoso	Amargo	+
	1:9	723-753	712-738	Sólido-amorfo	blanco verdoso	Amargo	+
Cloroformo:AcOEt	1:9						
Cloroformo:MeOH	9:1	754-869	739-758	Sólido-cristalino	blanco verdoso	Amargo	+
AcOEt:MeOH	9:1		759-813	Sólido-cristalino espumoso	amarillo canario	Amargo	+
			814-841	Sólido-espumoso	verde	Amargo	+
	7.5:2.5	870-905	842-900	Sólido-espumoso	verde	Amargo	+
	7.5:2.5		901-904	Sólido-amorfo	ambar	Amargo	+
	5:5	906-939	905-939	Sólido-amorfo	ambar	Amargo	+

+ Fracciones estudiadas
- Fracciones descartadas

6.0 Aislamiento y purificación de los compuestos.

6.1 Aislamiento de D-manitol, 9.

Al disolver en cloroformo la fracción neutra del esquema 1 precipitó un sólido blanquecino amorfo de p.f. 167°, el polvo anterior fue muy soluble en metanol caliente pero insoluble en cloroformo, y éter. El rendimiento total de este producto fue de 48 mg y se caracterizó como manitol por comparación con una muestra auténtica.

6.2 Aislamiento de ácido oleanólico, 10 y ursólico 11.

De las fracciones 223-456 de la columna original Tabla 8, se obtuvo 33.19 g de un polvo amorfo p.f. 270-273°. 1 g de este polvo fue tratado con una solución de 50 mg de bromo en 16 ml de metanol, la reacción se favoreció con agitación magnética y calentando en baño maría; la mezcla de reacción se dejó por un tiempo de 2 horas. Al cabo de este tiempo el crudo de reacción se trasvasó a un vaso de precipitado que contenía agua fría dando lugar a la formación de un precipitado el cual se lavó con varias porciones de agua destilada. Al analizar cromatográficamente el sólido obtenido (1.12 g) se observaron 2 compuestos, los cuales fueron separados por cromatografía en columna de gel de sílice desactivada al 30% con agua destilada; la elución se inició con hexano: cloroformo (5=5), cloroformo:AcOEt (8:2) y acetato de etilo 100% se recogieron un total de 122 fracciones de 25 ml cada una, cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina combinándose aquellas cromatográficamente simi-

lares. De la fracción 35-66 de esta misma columna se obtuvieron 0.35 g de 12 α -bromo-13,28-lactona oleanólica 10a en forma de agujas cristalinas de p.f. 225°; de las fracciones 110-117 de esta misma columna se obtuvieron 0.2 g de ácido ursólico, 11, p.f. 278-279°.

300 mg del compuesto 10a se refluaron con 7.5 ml de ácido acético y 1.8 g de Zn durante 3 hr. La mezcla de la reacción se filtro y al filtrado se le añadió hielo para producir un sólido blanco (170 mg) que fué colectado por filtración y lavado con agua. El polvo anterior fue purificado por c. en columna y el producto obtenido fue posteriormente metilado con diazometano; el sólido cristalino resultante del proceso de metilación se recristalizó sucesivamente de cloroformo/metanol para obtener 90 mg del compuesto 10b con p.f. 198-200°.

6.3 Aislamiento del ácido-3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico, 12, ácido ursólico, 11, cucurbitacina E, 13, isocucurbitacina B, 14, y epi-isocucurbitacina B, 15.

Las fracciones 457-586 (6.0 g) de la columna original (Tabla 8). Se recromatografiaron en una columna empacada con 180 g de gel de sílice (desactivada al 10%); la elución se inició con una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1) aumentando progresivamente la cantidad de acetato de etilo. Se recogieron un total de 300 fracciones de 125 ml cada una; cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina combinándose aquellas cromatográficamente similares, en la Tabla 9 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las

fracciones combinadas. De las fracciones 58-72 de esta columna eluida con hexano:AcOEt (7:3) se obtuvo un sólido blanco amarillento que luego de sucesivas recristalizaciones de CHCl_3 -AcOEt (1:1) originó 0.2 g adicionales de 11, el rendimiento de ácido ursólico fue de 6.8 g. De las fracciones 136-160 de esta columna, eluidas con hexano:acetato de etilo (6:4), se separaron 100 mg de 12, de un sólido cristalino en forma de agujas blancas con p.f. 283-287° (MeOH).

De las fracciones 115-122 de esta misma columna cristalizaron 21 mg de cucurbitacina E, 13, en forma de agujas con p.f. 230-231°, de las fracciones 123-130 de esta misma columna cristalizaron 4 mg de isocucurbitacina B, 14, como agujas de p.f. 220-222°. Finalmente de las fracciones 131-135 cristalizaron 50 mg de una mezcla de los compuestos, 14 y 15; p.f. 204-210°.

Tabla 9. Fraccionamiento vfa cromatografía en columna de las fracciones 457-586 de la columna original.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones adicionales
Hexano/AcOEt	90:10	29	1- 29	-	-
Hexano/AcOEt	80:20	27	30- 57	-	-
Hexano/AcOEt	70:30	56	58- 72	<u>11</u>	Sólido blanco
			73-114	-	-
Hexano/AcOEt	60:40	132	115-122	<u>13</u>	Sólido cristalino blanco
			123-130	<u>14</u>	Sólido cristalino blanco en forma de agujas
			131-135	<u>14 y 15</u>	Sólido cristalino
			136-160	<u>12</u>	Sólido cristalino blanco en forma de agujas
			161-247	-	-
Hexano/AcOEt	50:50	27	248-275	-	-
AcOEt	100	14	276-290	-	-

7. Caracterización de los compuestos aislados.

7.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros I.R. fueron registrados en un instrumento Nicolet FT-IR 5X de un sólo haz, en pastilla de KBr o en solución de cloroformo por el señor Alejandro Correa de la Compañía Negromex. Los espectros de RMN¹H se determinaron en un espectrómetro FT-80 Varian utilizando como disolventes CDCl₃ y/o DMSO-d₆ y como referencia interna TMS. Los espectros U.V. se obtuvieron en un espectrómetro de doble Haz Hitachi 2205.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D en el Instituto de Química de la UNAM. Las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin-Elmer 241.

7.2 Preparación de derivados.

7.2.1 Acetilaciones: para formar los derivados acetilados de los productos aislados se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó por 12 horas a temperatura ambiente; pasado este tiempo la mezcla de reacción se le adicionó hielo con el fin de hidrolizar el exceso de anhídrido acético. Posteriormente se extrajo con CHCl₃ (2 veces) y la fase clorofórmica así obtenida se lavó primero con una solución de HCl 1N, y luego con una solución de bi-

carbonato de sodio al 10% (2 veces) y, por último con agua destilada. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad obteniéndose así los productos acetilados.

A continuación en la Tabla 10 se resumen los compuestos que fueron acetilados así como la cantidad de producto, y los puntos de fusión de los compuestos obtenidos.

Tabla 10. Preparación de derivados acetilados.

Compuesto	Cantidad del compuesto	Producto	Cantidad de producto obtenido	punto de fusión
<u>9</u>	100 mg	9a	90 mg	105-109°
<u>12</u>	13 mg	12b	10 mg	118-120°
<u>13</u>	20 mg	13a	17 mg	-

7.2.2 Metilación. Para obtener los derivados metilados de los productos aislados se utilizó una solución etérea de diazometano. Por cada 100 mg de producto a metilar se utilizaron 20 ml de una solución de diazometano preparada con 4 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%, 20 ml de éter etílico y 2 g de N-nitroso-N-metil-urea.

En todos los casos el producto a metilar se disolvió en 10 ml de etanol ó en 10 ml de éter, y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas.

A continuación en la Tabla 11, se indican los compuestos sometidos a metilación, así como la cantidad de producto, y los puntos de fusión de los compuestos obtenidos.

Tabla 11. Preparación de derivados metilados.

Compuesto	Cantidad del compuesto	Producto	Cantidad de producto obtenido	Punto de fusión
<u>10</u>	100 mg	10b	100 mg	198-200°C
<u>12</u>	25 mg	12a	20 mg	205-210°C
<u>11</u>	30 mg	11a	20 mg	168-171°C

7.2.3 Formación del acetónido del compuesto, 12c.

A 25 mg del compuesto, 12a, se le adicionaron 3 ml de acetona anhidra (para lo cual se le adicionó Cl_2Ca , se puso a reflujo 1 hr. y posteriormente se destiló) y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla resultante se dejó en agitación por 1 hora, posteriormente el producto obtenido; disuelto se purificó mediante una pequeña columna con alumina básica.

RESULTADOS Y DISCUSION

Del extracto metanólico de las partes aéreas de la Cigarrilla mexicana (zucc. et martius D.C.) Aiello, luego de un fraccionamiento preliminar vfa una cromatografía preparativa en columna sobre gel de sílice y, posterior recromatografía en columna de algunas de las fracciones originales, se aislaron: tres ácidos triterpénicos pentacíclicos, tres cucurbitacinas y el polialcohol manitol.

Los ácidos triterpénicos obtenidos fueron: el ácido ursólico, 11, el ácido oleanólico, 10, y el ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico, 12, representando este último un nuevo producto natural. Los cucurbitanos fueron caracterizados como la cucurbitacina E, 13, la iso-cucurbitacina B, 14, y la epi-isocucurbitacina B, 15. Los rendimientos de cada uno de estos compuestos se resumen en la Tabla 12.

En general la caracterización de los compuestos aislados se hizo mediante métodos químicos y espectroscópicos.

Tabla 12. Rendimientos de los compuestos aislados.

COMPUESTO	CANTIDAD DE COMPUESTO EN 588.52 g DE EXTRACTO (g)	CANTIDAD REFERIDA AL EXTRACTO TOTAL 1288.5 g (g)	% EN RELACION A PLANTA SECA
<u>9</u>	0.3734	0.8176	0.0239
<u>10</u>	2.998	6.5640	0.2069
<u>11</u>	6.838	14.971	0.43940
<u>12</u>	0.100	0.2189	0.00643
<u>13</u>	0.0210	0.04597	0.00135
<u>14</u>	0.014	0.028	0.00064
<u>15 y 14</u>	0.024	-	-

1. Identificación del ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico,
Compuesto, 12.

El compuesto 12 se aisló al recromatografiar las fracciones 457-586 de la columna original según se indica en la Tabla 9 y, se obtuvo como un sólido blanco cristalino en forma de agujas p.f. 266-268°, ópticamente activo, parcialmente soluble en cloroformo y soluble en metanol. Su fórmula molecular se estableció como C₃₀H₄₈O₄.

Las constantes físicas y espectroscópicas utilizadas en su caracterización se resumen en la Tabla 13.

El espectro U.V. (Espectro, E-1) mostró sólo absorción terminal y el I.R. (Espectro, E-2) presentó bandas características para grupos hidroxilos de alcoholes primario y secundario (3450, 3389, 3365, 1041 y 1100 cm⁻¹), ácido carboxílico (3000-2500 y 1702 cm⁻¹) y doble ligadura (1640 cm⁻¹).

El espectro de masas (Espectro, E-3) presentó un ión molecular a m/z 472 y, otros picos importantes se observaron a m/z 454 (M-18), 249, 248 (pico base), 223, 205 (223-18), 203 (248-COOH) y 133. El pico intenso a m/z 248 es típico de ácidos triterpénicos del tipo Δ^{12} oleanenos ó Δ^{12} ursenos y resulta de una ruptura de tipo retro-Diels-Alder como se indica en la Figura 2 (Ogonkoya, 1981).

Por tratamiento con diazometano y anhídrido acético-piridina se obtuvieron el éster metílico 12a y el diacetato 12b respectivamente, confirmando químicamente la presencia de un ácido y de los grupos carbinólicos en la molécula; las propiedades espectroscópicas de estos derivados también se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido 3 β -24-dihidroxi-urs-12-en-28-oico, 12, y su acetónido 12c.

	<u>12</u>	<u>12c</u>
p. f.	266-268°	—
U. V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	204 (3.6060), 280 (2.0497)	—
I. R. KBr cm^{-1}	3450, 3389, 3365, 2944, 2925, 1702, 1463, 1379, 1041	2928, 2857, 1718, 1601, 1458, 1382, 1255, 1192, 1164, 1111, 1064, 1029, 1000, 957, 917, 861, 828
EMIE m/z (%)	472 (1.1, M ⁺), 454 (0.6, M-18), 446 (0.3), 441 (0.3), 249 (17.7), 248 (100), 223, 205 (223-18), 203 (46.3, 248-COOH), 175 (12), 133 (30.7)	—
RMN^1H (80MHz CDCl_3 -DMSO- d_6)	0.84 (s, 6H, H-26, H-24), 0.90 (d, 3H, J=6Hz, H-29), 0.96 ^a (d ^b , 3H, H-30), 1.08 (s, 3H, H-25), 1.13 (s, 3H, H-27), 2.17 (d, 1H, J=11Hz, H-10), 3.29 (d, 1H, J=11.5Hz, H-23), 3.60 (d, 1H, J=11.5Hz, H-23), 3.57 (dd, 1H, J=6, 11Hz, H-3), 5.20 (m, 1H, H-12)	• 0.74 (s, 3H, H-26), 0.83 (s, 3H, H-24), 0.90 ^a (d ^b , 3H, H-29), 0.95 (d ^b , 3H, H-30), 1.05 (s, 3H, H-25), 1.10 (s, 3H, H-27), 1.41 y 1.44 (s, 6H, metilos de isopropilideno), 2.4 (d, 1H, J=11Hz, H-18), 3.45 (sa, 2H, H-23), 3.58 (s, 3H, -OCH ₃), 3.6 sa, H-3), 5.24 (n, 1H, H-12). ^a Señal sobrepuesta ^b CDCl_3

Tabla 13. Continuación.

	12a	12b
p.f.	205-210°C	118-120°C
I.R. KBr cm^{-1} max	3500, 2987, 2957, 1718, 1460, 1380, 1040	3020, 2950, 1724, 1731, 1605, 1459, 1370, 1260, 1029.
EMIE m/z (%)	486 (1.0, M ⁺), 468 (0.5), 426 (1), 262 (100), 224 (15), 203 (30), 189 (21), 187 (60), 133 (40)	556 (0.5, M ⁺), 512 (0.5), 496 (3), 436 (3), 249 (23), 248 (96), 203 (25), 202 (3), 189 (50), 133 (20), 43 (100)
RMN^1H (80MHz, CDCl_3 -DMSO d_6)	0.85 (s, 3H, H-24), 0.83 (s, 3H, H-25), 0.90 (d, 3H, 6Hz, * H-29), 0.96 (d ^a , 3H, H-30), 1.05 (s, 3H H-25), 1.13 (s, 3H, H-27), 2.18 (d, 1H J= 11 Hz, H-18), 3.29 (d, 1H, J=11.5 Hz, H-23), 3.60 (d, 1H, J=11.5 Hz, H-23), 3.59 (dd, 1H, J=11.6 Hz, H-3), 5.2 (m, 1H, H-12), 3.59 (s, 3H, OCH_3)	0.75 (s, 3H, H-26), 0.81 (s, 3H, H-24), 0.89 (d ^a , 3H, H-29), 0.96 (d ^a , 3H, H-30), 1.05 (s, 3H, H-25), 1.22 (s, 3H, H-27), 2.00 (s, 3H, Ac-), 2.03 (s, 3H, Ac-), 2.17 (d, 1H, J=11Hz, H-18), 3.65 (d, 1H, J=11.5Hz, H-23), 3.90 (d, 1H, J=11.5Hz, H-23), 4.74 (dd, 1H, J=11.6Hz, H-3), 5.25 (m, 1H, H-12).

* Espectro registrado en CDCl_3 ^aSeñal sobrepuesta

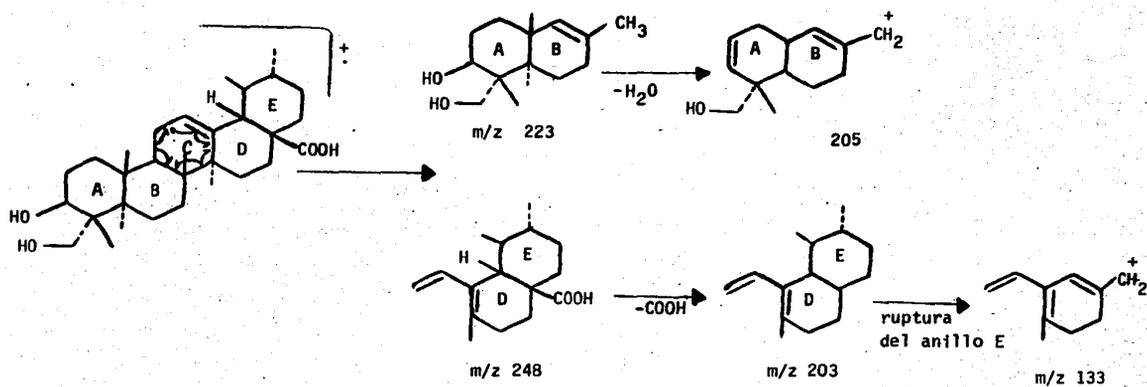


Figura 2. Patrón de fragmentación tipo retro-Diels-Alder del Compuesto 12.

El espectro de RMN^1H (Espectro, E-4) permitió comprobar inequívocamente que el compuesto 12 era el ácido de un triterpenoide con esqueleto básico del tipo Δ^{12} -urseno (Cheung, et. al., 1969) ya que se observaron señales para:

1. Seis metilos a δ 0.84, 0.96, 1.08 y 1.13
2. Un protón metínico a δ 2.17 (d, $J=11\text{Hz}$) característico del H-13 de un ácido urs-12-en-28-oico.
3. Un sistema AB centrado en δ 3.30 (δ 3.29 y δ 3.60, $J=11.5\text{Hz}$) típico de un hidroximetileno.
4. Un doblete de doblete a δ 3.57 ($J=11.6\text{Hz}$) correspondiente al protón beta de un alcohol secundario.
5. Un multiplete a δ 5.20 asignable al H-12 de la estructura tipo.

Una vez establecido el esqueleto básico del compuesto y encontrado los elementos estructurales adicionales que satisfacían las exigencias de la fórmula molecular, solo restaba por asignar la disposición y estereoquímica de los grupos carbinólicos primario y secundario. En este sentido, el fragmento a m/z 223 en el espectro de masas de 12 (E-3, Figura 3) y la formación del acetónido estable, 12c, por tratamiento de 12a con acetona anhidra y ácido sulfúrico concentrado, indicaron que la disposición relativa de los grupos hidroxilos podría ser cualquiera de las señaladas en las estructuras parciales A, B y C de la Figura 4. A, B y C satisfacían la relación

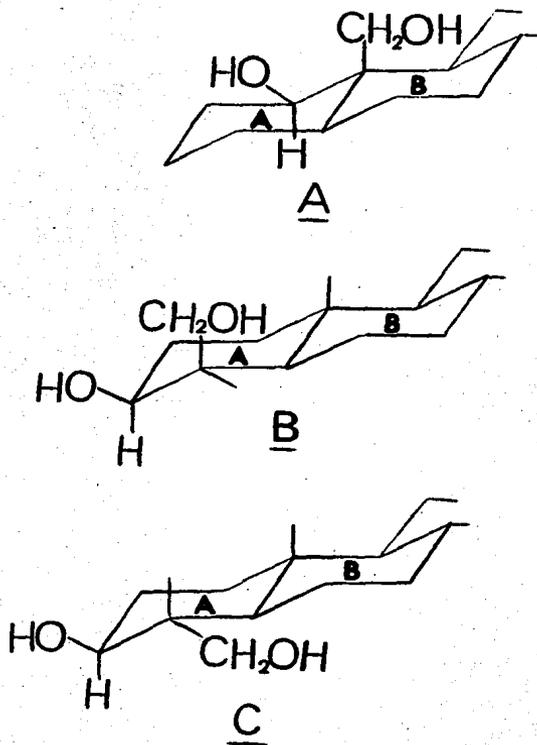
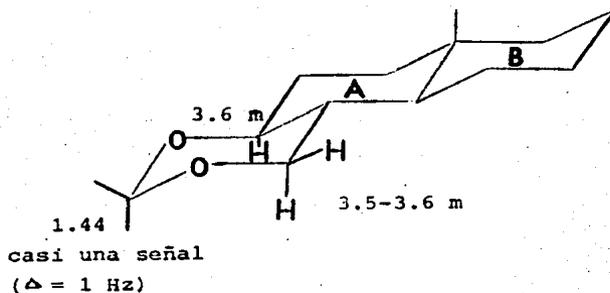


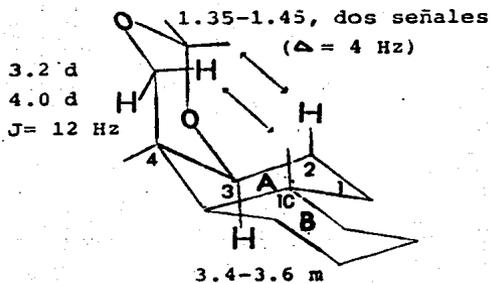
Figura 4. Disposición relativa y estereoquímica de los grupos carbonílicos primario y secundario.

1,3-diol requerida para la formación del acetónido y eran consistentes con el patrón de acoplamiento observado para el protón base del alcohol secundario (dd, $J=11,6\text{Hz}$).

En base a consideraciones biogénéticas, así como la comparación de los desplazamientos químicos de los protones de los metilos C-23, C-24 y C-25 con aquellos del ácido ursólico permitieron descartar, en principio, la posibilidad A. De las estructuras parciales restantes C era la más factible debido a la estabilidad de 12c y, a los desplazamientos químicos observados para H-3, H-23 y los metilos del grupo isopropilideno en el del compuesto 12c (Tsuda, et. al., 1974). En la Figura 5 se ilustran los tipos de acetónidos que originaría el 1,3-diol de las estructuras parciales B y C de la Figura 4, respectivamente, así como los desplazamientos químicos que se esperarfa para los protones señalados de acuerdo a modelos conocidos (Tsuda, et. al., 1974; Takani et. al., 1977). Como se puede apreciar, los desplazamientos químicos y la multiplicidad de las señales para los protones del acetónido resultante de la estructura parcial C coinciden con los observados para el acetónido 12c; en tanto que, los correspondientes a la estructura B no son concordantes. Por otra parte, el acetónido de la estructura B serfa un tanto inestable debido, a las interacciones entre uno de los metilos del grupo isopropilideno y el H 2-B y, así como entre los metilos 24B y 10. En consecuencia su formación requerirfa condiciones más drásticas que las utilizadas para la obtención de



ESTRUCTURA PARCIAL DEL ACETONIDO C



ESTRUCTURA PARCIAL DEL ACETONIDO B

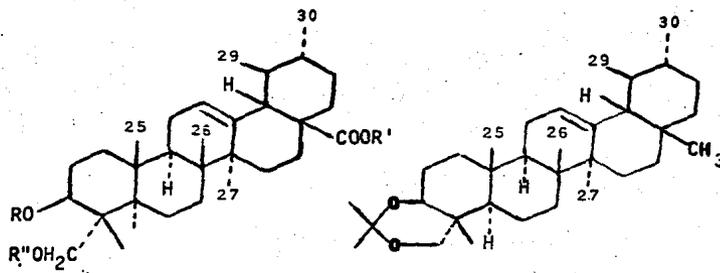
Figura 5. Tipos de acetónidos que formarían las estructuras parciales A y B de la Figura 4.

12c (Tsuda *et. al.*, 1974).

En concordancia con la disposición y estereoquímica propuestas, se encontraban los desplazamientos químicos observados para H-3 y H-23 en 12 y 12b (Cheung *et. al.*, 1969; Tsuda *et. al.*, 1974).

En base a la discusión anterior se identificó al compuesto 12 como el ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico, el cual representa un nuevo producto natural.

La estructura de 12 y sus derivados se indican en la Figura 6.



12 R = R' = R'' = H

12a R = R'' = H, R' = CH₃

12b R = R'' = Ac, R' = H

12c

Figura 6. Estructuras del compuesto, 12 y sus derivados.

2. Identificación del ácido oleanólico 10 y del ácido ursólico 11.

De las fracciones 223-347 de la columna de la Tabla 8 se obtuvieron 33.19 g de un sólido amorfo, p.f. 270-273°. Las características espectroscópicas de este compuesto eran las típicas de un ácido triterpénico pentacíclico del tipo oleaneno ó urseno.

a) En el espectro I.R. (Espectro,E-11) al igual que en el compuesto 12, se observaron bandas características a 3443 y 3423 cm^{-1} (OH libre), 3050-2500 cm^{-1} (OH de carboxilo), 2927 cm^{-1} (estiramiento C-H), 1693 cm^{-1} (C=O de ácido), 1633 cm^{-1} (olefina), y 1386 cm^{-1} (grupos gem-dimetilo).

b) En el espectro de RMN¹H (espectro,E-13) se observaron absorciones para un protón vinylico trisustituido a δ 5.25 (t, 1H) y para un protón base de alcohol secundario a δ 3.17 (m); finalmente en la zona comprendida entre δ 0.75-1.25 se encontraban señales para 7 metilos.

c) El espectro de masas (Espectro,E-12) presentó un ión molecular a m/z 456 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$) y un pico base a m/z 248. Este último fragmento resulta de una ruptura retro-Diels-Alder que como ya se señaló es característica de un triterpeno pentacíclico del tipo urseno o oleaneno con una doble ligadura entre C-12 y C-13.

La comparación de este producto con muestras auténticas de ácido oleanólico ó ácido ursólico demostraron que el compuesto no era ninguno de ellos, sino más bien, una mezcla de los dos ó, de otros compuestos diferentes con la misma estructura básica.

Para resolver la mezcla en sus componentes individuales se decidió derivatizar el Δ^{12} oleaneno presente bajo la forma de una bromolactona (Radzan, et. al., 1982; Lewis, et. al., 1983), tal como se indicó en la sección experimental. Posteriormente se pudieron separar cromatográficamente la bromolactona del ácido oleanólico, 10a y el ácido ursólico 11. La bromolactona 10a se transformó en ácido oleanólico 10 por tratamiento con Zn. en medio ácido.

El ácido 10 finalmente fué caracterizado como ácido oleanólico, bajo la forma de su éster metílico, 10b, por comparación con una muestra auténtica. Igualmente el ácido 11 se identificó como ácido ursólico siguiendo los métodos clásicos (IR, RMN¹H, c.c.f.) por comparación con una muestra original. Las reacciones que permitieron la obtención del ácido oleanólico y del ácido ursólico en forma pura se señalan en la Figura 3 y, las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos 10a, 10b y 11 se indican en la Tabla 14. Los espectros correspondientes se encuentran ilustrados en el apéndice al final de la tesis. (10a E-1 , E-1' , E- ; 10b E-2 , E-2 ; 11 E-1 , E-1' , E-1).

Tabla 14. Concentraciones y composiciones para la serie de unidades de estudio, DCA (fundición alemana), del tipo 10000 del 4. (continuación) y 1. En los símbolos.

	III	IIIa	IIIb	II
P.C.	270-275 (sección)	275-280	190-200°C	270-275°C
I.R. $\frac{200}{200}$ $\frac{cm^{-1}}{cm^{-1}}$	862, 867, 873, 870-870, 911, 959, 986, 993, 1002, 1067, 1200, 1111, 1027	1100, 740, 760, 1170, 1400, 1300, 1210, 1295, 1240, 1215, 1165, 1135, 1105, 1075, 1055, 965, 905, 875	3461, 3436, 1984, 1351, 2808, 2059, 1727, 1640, 1465, 1395, 1260, 1190, 1163, 1032, 996	1117, 1156, 2206, 2207, 2071, 1697, 1457, 1307, 1266, 1259, 1040, 996
PMH $\frac{m/z}{(.)}$	450 (3.4), 249 (21.5), 248 (100), 234 (3.2), 207 (24), 203 (59.9), 185 (13), 133 (19)	517 (0.5), 536 (1.4), 535 (0.7), 524 (1.5), 207 (100), 203 (48.9), 81.2 (50.5), 43 (67.7)	470 (M^+ $C_{10}H_{10}$), 117, 455 ($M-15$), 411 (M-59, -5.0), 410 (M-60, -4.3), 382 (M-220), 207 (16.2), 203 (100), 109 (26), 133 (25)	450 (0.1), 457 (0.7), 456 (3.2), 447 (0.2), 240 (100), 207 (23.1), 203 (28.6), 133 (32.6)
PMH $\frac{m/z}{(.)}$	0.75 (s, 30, 1, 2, 3 (s, 60)), 1.0 (s, 30), 1.2 (s, 30), 1.25 (s, 60), 2.25 (ad, 10, 10-10), 3.2 (ad, 20, 10-2), 5.25 (t, 10, 4-2)	0.74 (s, 30, 10-26), 0.90 (s, 60, 10-24, 10-23), 1.0 (s, 30, 10-23), 1.23 (s, 30, 10-23), 1.45 (s, 30, 10-29), 3.2 (ad, 10), 1.50 (s, 30, 10-30), 4.20 (m, 10, 10-12)	0.75 (s, 30, 10-26), 0.8 (s, 30, 10-24), 0.9 (s, 60, 10-25, 10-29), 1.0 (s, 30, 10-30), 1.15 (s, 30, 10-23), 1.25 (s, 30, 10-27), 2.85 (ad, 10, 10-10), 3.2 (ad, 10, 10-2), 5.25 (t, 10, 10-12)	0.7 (s, 30, 10-26), 0.8 (s, 60, 10-24, 10-24), 0.91 (s, 60, 10-25), 0.90 (s, 30, 10-23), 1.1 (s, 30, 10-27), 2.25 (d, 10, 10-10), 3.2 (ad, 10, 10-2), 4.3 (s, 10, 10, 10 desaparece), 5.20 (t, 10, 10-12)

TESIS CON:
FALLAS DE ORIGEN

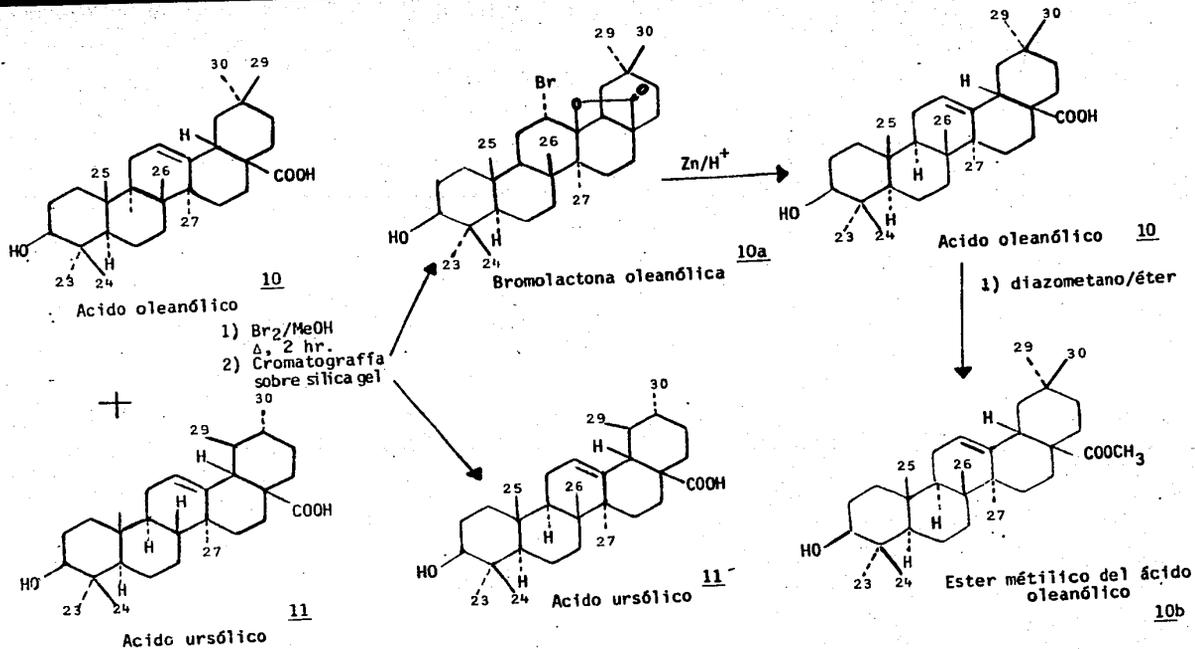


Figura 3. Reacciones de formación de la Bromolactona oleanólica.

3. Identificación de la cucurbitacina E (Compuesto 13).

De las fracciones 115-122 de la columna de la Tabla 9 se obtuvo un polvo cristalino de p. f. 230-231° soluble en metanol, parcialmente soluble en acetato de etilo, cloroformo y acetona. Sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 15.

Su fórmula molecular se estableció como $C_{32}H_{44}O_8$ que permite un índice de insaturación de 11. Su espectro IR (Espectro E-23) mostró bandas características para: 1. grupos hidroxilos (3505 y 3371 cm^{-1}), 2. carbonilo de éster (1720 cm^{-1}), 3. cetona en anillo de 6 miembros (1689 cm^{-1}), 4. cetona α,β insaturada (1682 cm^{-1}), 5. doble ligadura de un sistema diosfenol (1664 cm^{-1}) y doble ligadura conjugada (1630 cm^{-1}). El espectro de U.V. (Espectro E-24) confirmó la presencia de un sistema diosfenol con la banda a 268 nm .

El espectro de RMN^1H (Espectro E-25) presentó las siguientes características:

- a) A campo alto se observaron señales para 8 metilos a δ 0.97, 1.05, 1.24, 1.35, 1.37, 1.42, 1.54 .
- b) Una señal para acetato a δ 2 .
- c) Un multiplete centrado en $\delta=4.27$ asignable al protón base de un alcohol secundario.
- d) A $\delta=5.67$ y $\delta=5.92$ se observaron 2 multipletes atribuibles a protones vinílicos trisustituídos. La señal a δ 5.92 era consistente con la presencia de diosfenol.
- e) Finalmente, se observó un sistema AB característico de una doble

Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina E, 13, y su derivado triacetilado, 13a.

	<u>13</u>	<u>13a</u>
p. f.	230-231°C	—
UV. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ)	206 (1.6343), 234 (2.5764), 268 (1.548)	—
I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm^{-1})	3505, 3371, 2980, 2959, 1720, 1682, 1689, 1664, 1630, 1402, 1368, 1258, 1232, 1126, 657, 614	3500, 2981, 1725, 1682, 1665, 1630, 1400, 1365, 1259, 1230, 1125, 650
EMIE m/z (%)	496 (M-60, 4), 478 (M-18, 1), 401 (1), 383 (1), 164 (14.7), 113 (11.7), 96 (100), 43 (20.1)	—
RMN^1H (80MHz, CDCl_3)	0.97 (s, 3H, H-9), 1.05 (s, 3H, H-13), 1.24 (s, 3H, H-28), 1.35 (s, 3H, H-29), 1.37 (s, 3H, H-30), 1.42 (s, 3H, H-21), 1.54 (s, 6H, H-26 y H-27), 2.0 (s, 3H, Ac-25), 3.47 (m, 1H, H-10), 4.27 (m, 1H, H-16), 5.67 (m, 1H, H-6), 5.92 (m, 1H, H-1), 6.43 (d, 1H, J=15Hz, H-23), 7.05 (d, 1H, J=15Hz, H-24)	1.01 (s, 6H), 1.22 (s, 3H), 125 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.54 (s, 6H), 1.84 (s, 3H, Ac-16), 1.99 (s, 3H, Ac-25), 2.17 (s, 3H, Ac-2), 2.67 (d, 1H, H-17), 3.20 (d, 1H, H ₁₂), 3.53 (m, 1H, H ₁₀), 5.17 (m, 1H, H-16), 5.77 (m, 1H, H-6), 6.33 (m, 1H, H-1), 6.37 (d, 1H, J=15Hz, H-23), 7.13 (d, 1H, J=15Hz, H-24)

ligadura trans disustituida a δ 6.43 (d, J=15Hz) y δ 7.05 (d, J=15Hz). La ausencia de protón base de éster y la presencia del singlete a 2 ppm claramente indicaban que el acetato presente en la molécula era terciario.

La acetilación del compuesto 13, en condiciones usuales permitió obtener el derivado triacetilado 13a. El espectro de RMN¹H (espectro E-25) de este derivado, además de la señal correspondiente al metilo del acetato terciario de 13, aparecieron 2 señales adicionales a δ 1.84 y 2.17. Asimismo se pudo apreciar que las señales δ 4.27 y δ 5.92 en el espectro del compuesto, 13, se encontraban desplazadas a δ 5.17 y 6.33, respectivamente, confirmando definitivamente la presencia del diosfenol y de un alcohol secundario en 13.

Los elementos estructurales encontrados hasta el momento se resumen en la Figura 7 y como se puede observar 7 de los 8 oxígenos y 7 de las 11 insaturaciones requeridas por la fórmula molecular habían sido asignados.

El gran número de señales para metilos observados en los espectros de RMN¹H, el número de átomos de carbonos requeridos por la fórmula molecular (32), así como las 4 insaturaciones restantes permitieron inferir que el compuesto 13, era un triterpeno tetracíclico. El análisis detallado del espectro de masas (E-24) permitió comprobar que efectivamente, 13, era un triterpeno del tipo cucurbitano, cuya estructura base se indicó en la Figura 1, estructura 3.

La información del espectro de masas que sustentó la hipótesis anterior se resumen en la Figura 8, y los aspectos más importantes

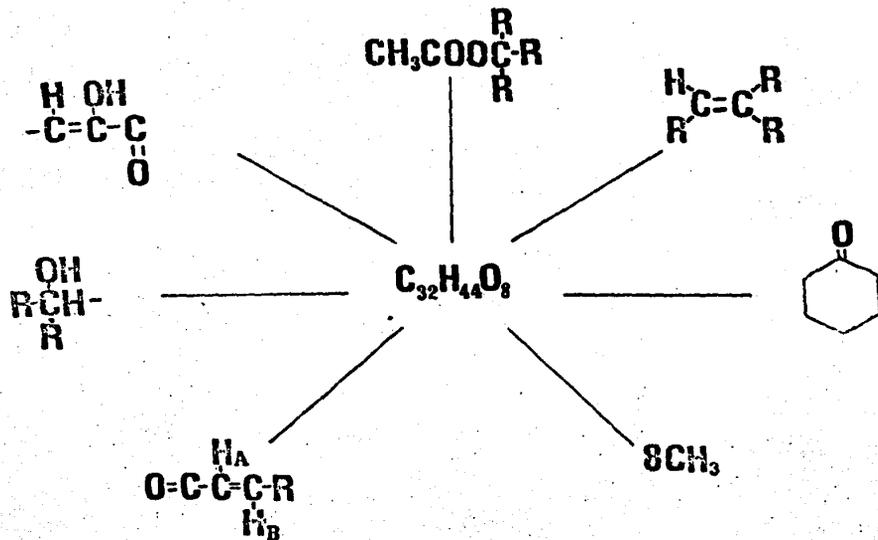
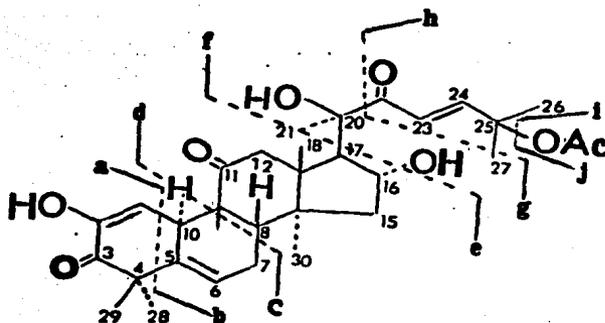


Figura 7. Elementos estructurales del compuesto 13.



ROMPIMIENTO	FRAGMENTO m/z	ORIGEN
a-----b	133 95	112+H, C ₆ H ₃ O ₂ 113-H ₂ O
c-----d	164 331	392-H-60
e-----f	356 139 121	199-60 199-60-H ₂ O
g-----h	401 383 358 96	401-H ₂ O 401-43 155-60+H
i-----j	496 60	

Figura 8. Esquema de fragmentación de la cucurbitacina E (Compuesto, 13).

fueron los siguientes:

- a) La presencia del fragmento a m/z 164 resultante de la ruptura d-c (Figura 8) permitió concluir que el sistema diosfenol se encontraba en el anillo A y que entre C-5 y C-6 se encontraba la doble ligadura trisustituida (Audier *et. al.*, 1966), pudiendo entonces escribirse la estructura parcial que se indica en la Figura 9.

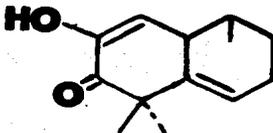


Figura 9. Estructura de los anillos A y B del compuesto 13.

- b) El fragmento a m/z 401 ($M-155$, $C_{24}H_{33}O_5$), resultante de la fragmentación h-g de la Figura 8, permitió concluir, que el acetato terciario estaba ubicado en la posición C-25. Si el acetato se hubiese encontrado en la posición C-20, que era la otra alternativa, el fragmento anterior se hubiese observado a m/z 460. Por otra parte este mismo fragmento a m/z 401 sugirió que en la posición C-20, se encontraba un hidroxilo terciario, (Duncan *et. al.*, 1968, Arisawa *et. al.*, 1984). Con este grupo hidroxilo en C-20

se complementaba el número de oxígenos establecidos por la fórmula molecular.

c) El ión a m/z 96 (pico base) resultante de las rupturas h-g y j-i, estaba en concordancia con la ubicación del acetato terciario en C-25 y con la presencia de la cetona α,β insaturada en la cadena lateral.

En base a la discusión anterior se pudo proponer la estructura de la cadena lateral como se indica en la Figura 10.

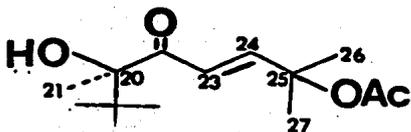
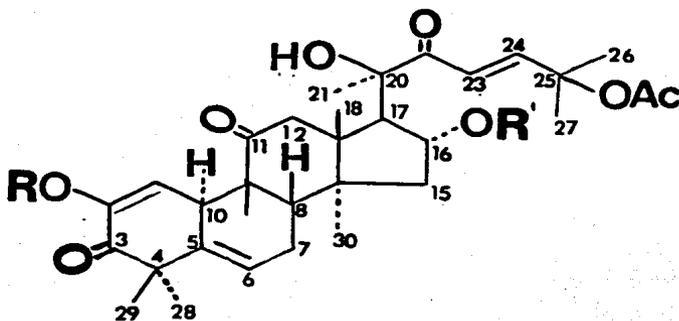


Figura 10. Estructura de la cadena lateral del compuesto 13.

La asignación del hidroxilo secundario en C-16 se hizo en base al protón de acoplamiento observado para la señal a 5.17 ppm en el espectro de RMN¹H de 13a. Como se puede apreciar en el Espectro 26 esta señal aparece como un triplete ($J=7.5\text{Hz}$), lo cual solo era factible si el oxhidrilo estuviese α orientado en la posición 16

(Arisawa *et. al.*, 1984; Hylard *et. al.*, 1986; Cattel *et. al.*, 1978; *inter alia*). La disposición del carbonilo restante en la posición 11 se hizo sobre consideraciones biogénicas (Lavie *et. al.*, 1971). Consistente con esta ubicación del carbonilo era el doblete, (parte de un sistema AB) que observaba para uno de los protones de H-12 a δ 3.20 (J=16) en el espectro de 13a.

En base a la discusión anterior se pudo concluir que la estructura del compuesto 13a era la cucurbitacina E, cuya estructura se indica en la Figura 11.



13 R = R' = H.

13a R = R' = Ac

Figura 11. Estructura de la cucurbitacina E, compuesto 13, y cucurbitacina E triacetilada compuesto 13a.

La evidencia definitiva se tuvo al comparar su espectro IR con aquel de una muestra auténtica y que proporcionará gentilmente el Dr. Casaddy de la Universidad de Purdue.

4. Identificación de la iso-cucurbitacina B (compuesto, 14).

De las fracciones 123-130 de la columna de la Tabla 9 se obtuvo un sólido cristalino en forma de agujas de p.f. 219° , soluble en metanol, parcialmente soluble en acetato de etilo, cloroformo y acetona. Las constantes físicas y espectroscópicas utilizadas para identificación se resumen en la Tabla 16.

Su fórmula molecular se estableció como $C_{32}H_{46}O_8$ que permite un índice de insaturación de 10.

El espectro de I.R. (Espectro E-27) era similar al del compuesto, 13, diferenciándose fundamentalmente en la ausencia de la señal a 1664 cm^{-1} . Igualmente el espectro de RMN^1H (Espectro E29) era semejante, observándose también:

- a) Señales para 8 metilos a δ 0.81, 0.96, 1.18, 1.26, 1.32, 1.41, 1.54.
- b) Una señal para acetato a δ 2.0
- c) Una señal para hidroxilo intercambiable con agua deuterada a δ 4.25.
- d) Un multiplete centrado a δ 4.33, integrando para un protón asignable a la base de un alcohol secundario.
- e) Un multiplete a δ 5.92 atribuible a una doble ligadura trisustituida.
- f) El sistema AB de la doble ligadura trans disustituida a δ 6.42 (d, 1H, J=15.6Hz) y δ 7.07 (d, 1H, J=15.6Hz).

Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la isocurbitacina B, 14 y la epi-isocurbitacina B, 15

	<u>14</u>	<u>15</u> *
p. f.	219°C	204-210°C
I. R. $\frac{\text{KBr}}{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$	3565, 3511, 3463, 2968, 2929, 1721, 1694, 1627, 1258, 1127, 1023, 989. (Espectro 27)	3565, 3511, 3463, 2968, 2929, 1721, 1694, 1627, 1258, 1127, 1023, 989 (Espectro)
EMIE m/z. (%)	498 (M^+ -60, 3.4), 480 (M^+ -60-18, 1), 403 (2), 385 (4), 369 (1), 219 (1), 203 (1), 164 (4), 113 (24), 97 (10), 96 (100)	498 (M^+ -60, 3.4), 480 (M^+ -60-18, 1), 403 (2), 385 (5), 369 (1), 219 (1), 203 (1), 164 (4), 113 (24), 97 (10), 96 (100)
RMN^1H (80MHz, CDCl_3)	0.81 (s, 3H, H-19), 0.96 (s, 3H, H-18), 1.18 y 1.26 (2s, 6H, H-28, H ₂₉), 1.31 (s, 3H, H-30), 1.41 (s, 3H, H-21), 1.54 (s, 6H, H-26, H-27), 2.0 (s, 3H, Ac-25), 3.89 (brs, 1H, H-3), 4.24 (brs, 1H, H-20, intercambiable D_2O), 4.33 (m, 1H, H ₁₆), 5.90 (m, 1H, H-6), 6.42 (d, 1H, J=15.6Hz, H-23), 7.07 (d, 1H, J=15.6Hz, H-24)	0.85 y 0.96 (2s, 6H, H-19, H-18), 1.07 y 1.26 (2s, 6H, H-28, H-29), 1.31 (s, 3H, H-30), 1.41 (s, 3H, H-21), 1.54 (s, 6H, H-26, H-27), 2.0 (s, 3H, Ac-25), 4.11 (s, 1H, H-3), 4.24 (brs, 1H, H-20 intercambiable D_2O), 4.33 (m, 1H, J=7.4Hz, H-16), 5.9 (m, 1H, H-6), 6.42 (d, 1H, J=15.6Hz, H-23), 7.07 (d, 1H, J=15.6Hz, H-24)

*Se sustraen las señales correspondientes a la isocurbitacina, B.

Como diferencia fundamental se observó un singulete a δ 3.85 que de acuerdo al desplazamiento químico debía ser la base de un protón unido a una función oxigenada; posiblemente un hidroxilo.

Los elementos estructurales hasta ahora mencionados eran casi iguales a los mostrados en la Figura 7, solo que en lugar del diosfenol, el compuesto 14 poseía una función carbinólica secundaria adicional.

El espectro de masas confirmó que, 14, era también un cucurbitano ya que se observaban los fragmentos que se resumen en la Figura 12. La naturaleza de la cadena lateral se hizo en base a las consideraciones mencionadas para el compuesto, 13, y la posición de uno de los hidroxilos secundarios se asignó igualmente en C-16 en base al patrón de acoplamiento observado para la señal a δ 4.33. La asignación del otro hidroxilo secundario en el anillo A se hizo considerando el pico a m/z 166 el cual se originó de una fragmentación de tipo retro-Diels-Alder (Audier *et. al.*, 1966). El ión a m/z 166 permitió entonces proponer la estructura parcial de la Figura 13.

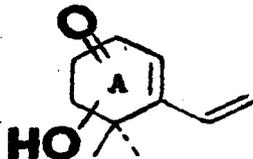
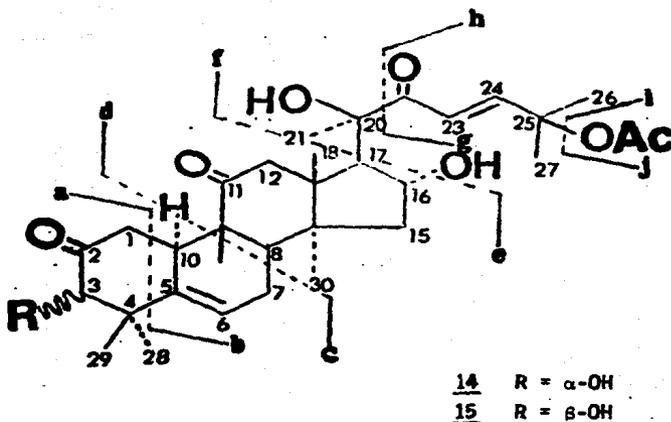


Figura 13. Estructura del anillo A del compuesto 14.



ROMPIMIENTO	FRAGMENTO m/z	ORIGEN
a-----b	113	114-H ₂ C ₆ H ₁₀ O ₂
	95	114-H-H ₂ O
	367	444-H ₂ O-59
c-----d	116	
e-----f	358	
	121	199-60-H ₂ O
g-----h	404	403 + H
	385	403-H ₂ O
	96	155-60+H
i-----h	498	
	60	

Figura 12. Esquema de fragmentación de los compuestos 14 y 15.

La disposición del grupo carbonilo en 2 y del hidroxilo en 3 se hizo en base al singulete observado a δ 3.85 en el espectro de RMN^1H , para el H_3 .

El pico a m/z 334 resultante de una fragmentación del tipo Mc Lafferty (Figura 14) permitió en este caso ubicar inequívocamente el carbonilo en C-11 (Audier).

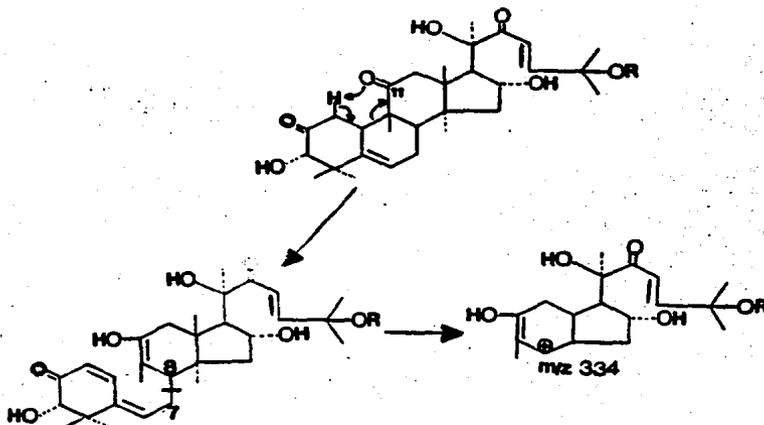


Figura 14. Formación del ión a m/z 334 por una fragmentación de tipo Mc Lafferty.

El conjunto de la discusión anterior permitió caracterizar el compuesto, 14, como la isocucurbitacina B; la cual resultó idéntica en todos sus aspectos a una muestra patrón también proporcionada por el Dr. J. Cassady.

5. Identificación de la 3-epi-isocucurbitacina (Compuesto, 15).

Finalmente, de las fracciones 131-135 (Tabla 9) se obtuvo un sólido cristalino de p.f. 204-210° cuyas características espectros cópicas se resumen en la Tabla 16. Como se puede apreciar el espectro de resonancia (E-31) de esta sustancia era prácticamente igual a la de la isocucurbitacina B observándose señales adicionales a 0.85, 1.07 y 4.11 ppm. Por otra parte el espectro de masas resulto ser idéntico.

La gran similitud de los espectros de RMN^1H y la presencia de una señal adicional para otro protón base de un alcohol hizo pensar que el producto, 15, era una mezcla de, 14, y una sustancia isomérica. Esta sustancia isomérica, a juzgar por el singulete adicional observado a δ 4.11, debía diferir tan solo en la orientación del hidroxilo en C-3. En el caso la isocucurbitacina B la señal correspondiente aparecía en δ =3.89, y era consistente con un H- β -axial, por lo tanto el mayor desplazamiento químico a δ 4.11 era indicativo de un protón α -ecuatorial.

La única sustancia isomérica de la isocucurbitacina B, que podía diferir tan solo en la orientación del hidroxilo en la posición C-3, era la epi-isocucurbitacina B, 15. La revisión detallada de las características químicas y espectroscópicas de la epi-isocucurbitacina B y el hecho de que previamente ha sido aislada conjuntamente con la isocucurbitacina B (Arisawa *et. al.*, 1984), permitieron concluir que el sólido obtenido era una mezcla de isocucurbita-

cina B y epi-isocurbitacina B, cuyas estructuras se ilustran en la Figura 15.

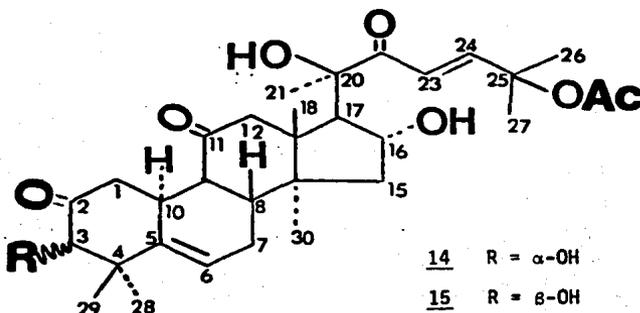


Figura 15. Estructura de isocurbitacina B, 14 y epi-isocurbitacina B, 15.

La presencia de cucurbitacina E, isocurbitacina B y epi-isocurbitacina B, en la Cigarrilla mexicana es de importancia quimiotaxonomía y farmacológica. La importancia quimiotaxonomía radica en el hecho de que recientemente se reportó por vez primera, la presencia, en grandes cantidades, de cucurbitacinas en una Rubiaceae. En esa ocasión la planta estudiada fue la Hintonia latiflora (Sesse et Moc ex DC) Bullock y las cucurbitacinas aisladas fueron la tetrahydrocucurbitacina F y la tetrahydrocucurbitacina F-25-acetato (Reguero et. al., 1987). Como consecuencia de esta investigación se especu-

16 que posiblemente otras especies relacionadas de los géneros Coutaportia, Cigarrilla, Coutarea y Exostema, entre otros, también con cortezas extremadamente amargas, podfan contener cucurbitacinas como metabolitos secundarios comunes. La existencia de las cucurbitacinas antes mencionadas en la Cigarrilla mexicana, especie estrechamente relacionada con Hintonia desde el punto de vista filogenético, confirma parcialmente la hipótesis anterior.

A diferencia con la Hintonia latiflora el rendimiento de las cucurbitacinas fue muy pequeño, tal como sucede en especies de otras familias ricas en cucurbitacinas. Entre estas familias se pueden mencionar: Burseraceae, Cucurbitaceae, Cruciferae, Liliaceae, Scrophulariaceae y Polemoniaceae (Lavie *et. al.*, 1971). Por otra parte, es de hacer notar que es la segunda ocasión que se describe el aislamiento de la epi-isocucurbitacina B como producto natural; previamente habfa sido descrita en la planta Ipamopsis aggregata (Polemoniaceae) (Arisawa *et. al.*, 1984).

Desde el punto de vista farmacológico, las tres cucurbitacinas encontradas poseen actividad citotóxica y antitumoral (Kupchan *et. al.*, 1967; Arisawa *et. al.*, 1984). Estos compuestos fueron evaluados mediante ensayos in vivo e in vitro (Kupchan *et. al.*, 1967; Arisawa *et. al.*, 1984).

CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico preliminar del extracto metanólico de las partes aéreas de la Cigarrilla mexicana permitió el aislamiento e identificación de tres ácidos triterpénicos pentacíclicos, tres cucurbitacinas y el polialcohol manitol. Los ácidos triterpénicos obtenidos fueron el ácido ursólico 11, el ácido oleanólico, 10, y el ácido 3 β -23-dihidroxi-urs-12-en-28-oic, 12, representando este último un nuevo producto natural; en tanto que, los cucurbitanos fueron caracterizados como la cucurbitacina E, 13, la iso-cucurbitacina B, 14, y la epi-isocucurbitacina B, 15.
2. La presencia de cucurbitacinas en la C. mexicana es de importancia quimiotaxonómica y farmacológica. La importancia quimiotaxonómica radica en que las cucurbitacinas parecen ser metabolitos característicos de algunas especies de Rubiaceae estrechamente relacionadas fitogenéticamente, y que se caracterizan por poseer cortezas extremadamente amargas. La importancia farmacológica reside en que las tres cucurbitacinas caracterizadas poseen actividad citotóxica y antitumoral; sin embargo, como estos compuestos no han sido evaluados previamente como antiambianos, no es posible correlacionar su presencia con la actividad antiambiana que se atribuye a la planta.

3. La preparación de la bromolactona del ácido oleanólico resultó ser un método químico adecuado para la separación de un oleaneno y de un urseno.

RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio de las fracciones de mayor polaridad, cuyo sabor extremadamente amargo sugiere la presencia de otras cucurbitacinas.
2. Evaluar a las cucurbitacinas aisladas como posibles agentes anti-amibianos.

BIBLIOGRAFIA

1. S.K. Adesina, J. Reisch, Phytochemistry, 24, 3003 (1985).
2. E.K. Adesogau, Tetrahedron, 29, 4099 (1973).
3. F.R. Ahmed, S. Ang y A.G. Fallis, Can. J. Chem., 56, 1020 (1978).
4. N. Aimi, K. Yamaguchi y Y. Iitaka, Tetrahedron, 37, 983 (1981).
5. Aplin, R.T.C., J. Chem. Soc., C, 1971, 1067 (1971)
6. M. Arisawa, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, G.A. Cordell, N.R. Farnsworth, J. of Pharm. Sci., 73, 411 (1984).
7. H.E. Audier, B.C. Das., Tetrahedron Letters, 20, 2205 (1966).
8. T. Biffu y R. Stevenson, J. Chem. Soc. Perkin Trans, 1, 360 (1978).
9. K. Bock, S.R. Jersen y B.J. Niefen, Acta Chem. Scand. B., 30, 743 (1976).
10. H.G. Boit, "Ergebnisse der Alkaloid chemie bis 1960", Akademie-Verlag, Berlin, p. 370 (1961) y referencias allí citadas.
11. B.H. Rudzikiewics, J.M. Wilsor, C. Djerassi, J. Am. Chem. Soc., 85, 3688 (1963).
12. T.K. Chatterjee, A. Basak, A.K. Barua, K. Mulkerjee y L.N. Roy., Trans. Bose Res. Inst., Calcutta 85 (1979).

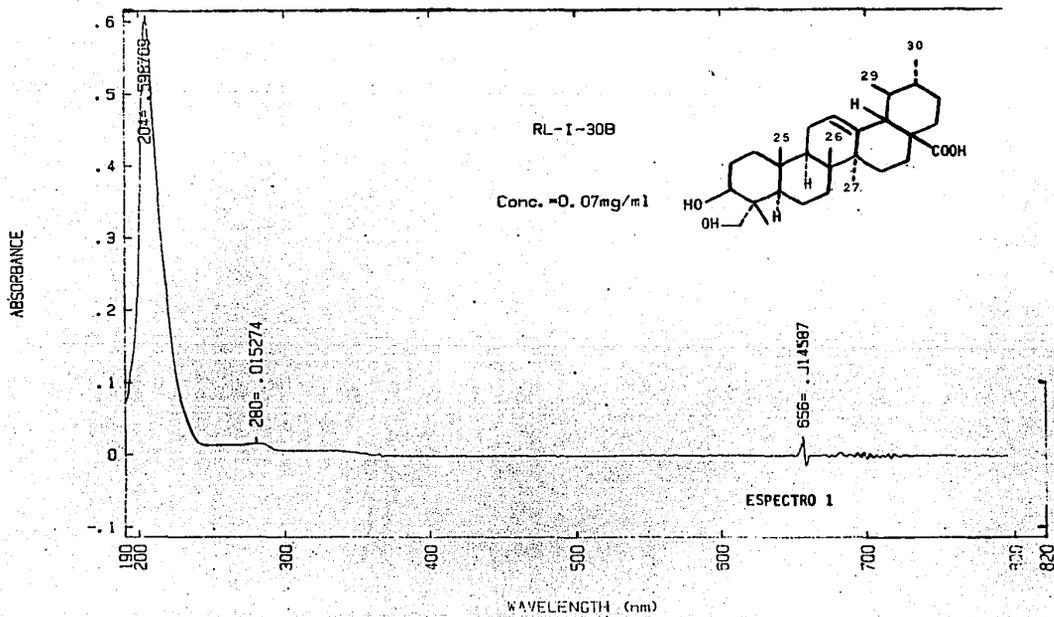
13. M.C. Das y S.B. Mahato, Phytochemistry, 22, 1071 (1983).
14. S.C. Das., Chem. Ind., 1531 (1971).
15. A. Ducroix, Café, cacao, Theu, 19, 57 (1975).
16. G.R. Duncan, D.D. Levy y R. Pyttel., Planta. Med., Heft. 2, 224 (1968).
17. T. Fujii y M. Ohba, "The Alkaloids", Vol. 22, Ed. por A. Brossi Academic Press, New York (1983), p. 1 y referencias allí citadas.
18. J.B. Harborne, Phytochemical ethods, Chapman and Hall, London, 2a. Ed. (1984).
19. R. Hegnauer, "Chemataxonomic der Pflanzen", Vol. 6, Birkhouser, Basel, p. 130 (1973).
20. S.R. Heningway y J.D. Phillipson. Indole and Biogenetically related alkaloids. (Ed. J.D. Phillipson and M.H. Zenk), Academic Press, London, 63 (1980).
21. W.H.M.W. Herath, M.U.S. Sultanbawa y G.P. Wannigama, Phytochemis-try, 17, 1979 (1978).
22. A. Ikuta, H. Itokawa, Phytochemistry, 25, 1625 (1986).
23. K. Koike, G.A. Cordell, A.A. Freer, C.J. Gilmore y G. Sim., Tetrahedron, 36, 1167 (1980).
24. G. Kronenberg, K. Graff, L.W. Overbeck, Arch. Exp. Path. and Pharmacol., 228, 169 (1956).

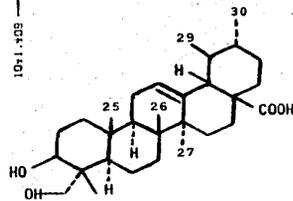
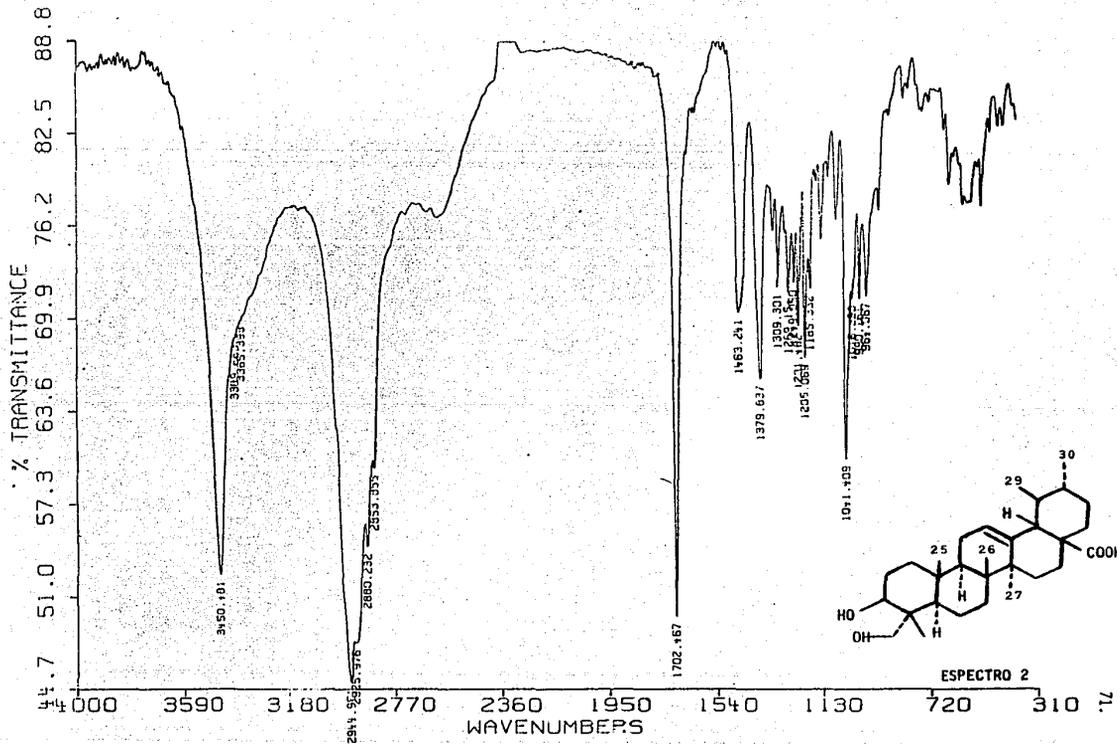
25. S.M. Kupchan, A.H. Gray, M.D. Grove, J. Med. Chem., **10**, 337 (1967).
26. S.M. Kupchan, H. Meshulam, A.T. Sneden, Phytochemistry, **17**, 767 (1978).
27. S.K. Kupchan, G. Tsou, C.W. Sigel., J. Org. Chem., **38** (7), 1420 (1973).
28. W.J. Lang, B. Korol, M.L. Brown y S. Gershon, Med. Pharmacol. Exp., **15**, 24 (1966).
29. K.G. Lewis, D.J. Tucker, Aust. J. Chem., **36**, 2297 (1983).
30. D. Lorence, Instituto de Biología, UNAM, Comunicación Personal (1986).
31. C. Manik, S.B. Mahato, Phytochemistry, **22** (5), 1071 (1983).
32. F.W. Mc Lafferty, Analyt. Chem., **31**, 82 (1959).
33. J. Martínez del Campo, An. Inst. Med. Nac. México, **8**, 332 (1906).
34. G.D. Monache, Botta y Alves de Lima., Phytochemistry, **23**, 1813 (1984).
35. H. Okabe, Y. Miyahara., Chem. Pharm. Bull., **30**, 3977 (1982).
36. R.R. Paris y M. Bastren, Ann. Pharm. Franc., **18**, 205 (1960).
37. K.P. Parry y G.P. Smith, J. Chem. Soc. Perkin I, 1671 (1978).

38. A. Aiello, Journal of The Arnold Arboretum, 60, 94 (1979).
39. Pushpa Pant y R.P. Rastogi, Phytochemistry, 18, 1095 (1979).
40. T.K. Razdan, V. Kachroo, S. Harkar, G.L. Koul, K.L. Dhart Phytochemistry, 21, 409 (1982).
41. G.C.S. Reddy, K.N.N. Ayengar y S. Rangswami, Indian J. Chem., 13, 749 (1975).
42. G.C.S. Reddy, S. Rangaswami, R. Sunder, Planta Med., 32, 206 (1977).
43. M.T. Reguero, R. Mata, G. Delgado, Journal of Natural Products, en prensa (1987).
44. C.A. Rice, K.S. Rymal, O.L. Chambliss, F.A. Johnson, J. Agric. Food Chem., 29, 194 (1981).
45. N.P. Sahu, S.B. Mahato, N. Banerji y R.N. Chakravarti, Indian Journal of Chemistry, 12, 284 (1976) [a través de C.A., 82, 285414 (1975)].
46. Pereda-Miranda, R., G. Delgado y A. Romo de Vivar, J. Nat. Prod., 49, (1986)
47. Schlitter y Spitaler, U., Tetrahedron Letts., 2911, (1978).
48. E. Stahl, Thin Layer Chromatography, George Allen and Unwin Ltd, London, 2nd. Edition (1969).
49. O. Sticher, New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutical Activity (Ed. H. Wagner y P. Wolff), Spinger Verlag, Berlin, p. 153 (1976).

50. S.K. Talapatra, A.C. Sarkar y B. Talapatra, Phytochemistry, 20, 1923 (1981).
51. S. Talur, J.D. Nelson, D.C. DeLong y G.H. Swoboda, Lloydia, 39, 261 (1976).
52. Y. Tsuda, T. Sano, K. Isobe, M. Miyauchi, Chem. Pharm. Bull., 22, 2396 (1974).
53. J. Vitagliana, An. Asoc. Quim. Argent., 58, 273 (1970) | a través de C.A., 74, 121356 (1971) |.
54. R. Wilson, N.Z.J. Bot., 22, 195 (1984).
55. Y. Yamada, K. Hagiwara, K. Iguchi, S. Suzuki, Hong-Yen Hsu., Chem. Pharm. Bull., 26, 3107 (1978).
56. M. Zalacain, E. Zaera, D. Vázquez y A. Jiménez, FEBS Letters, 148, 95 (1982).

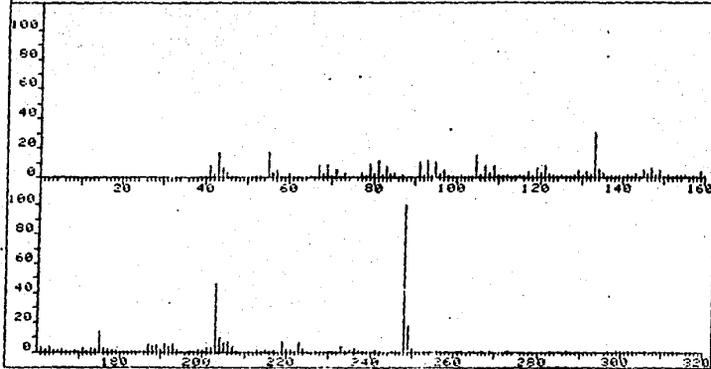
APENDICE



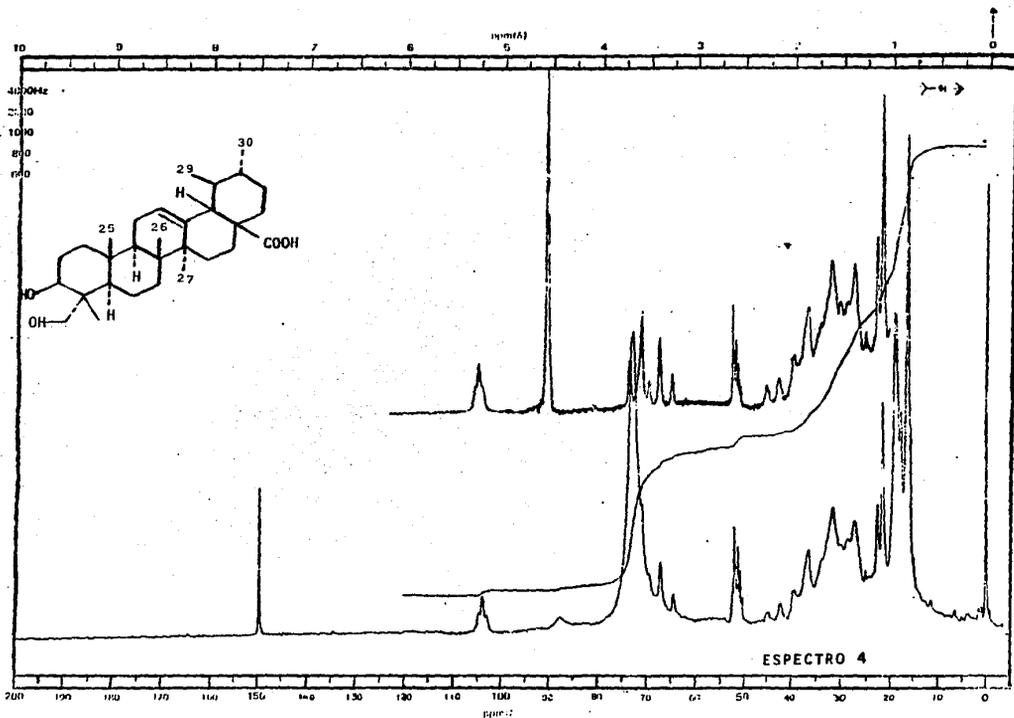


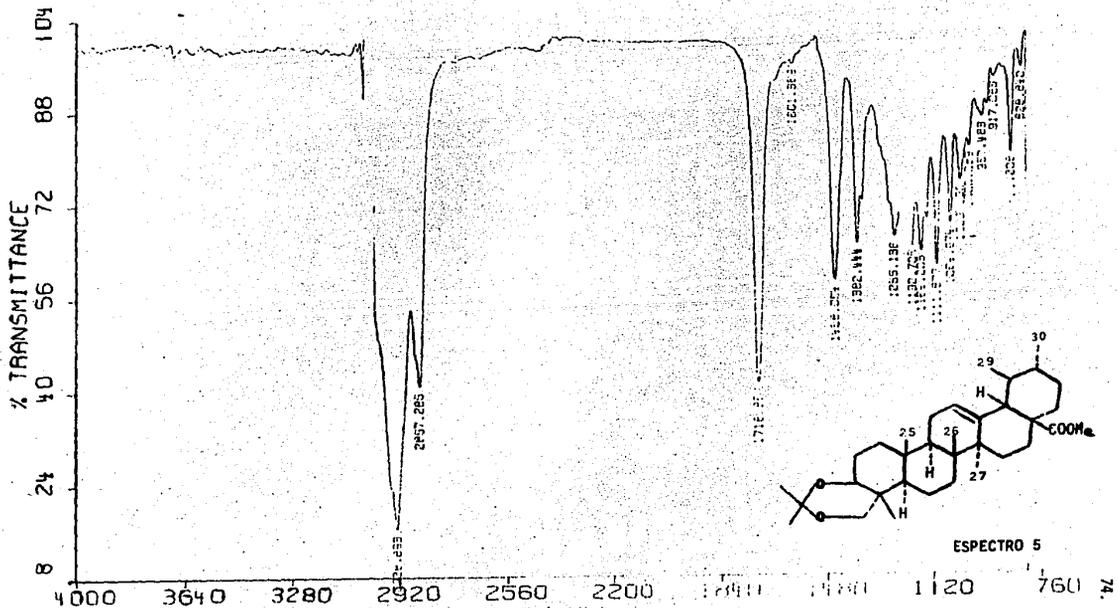
ESPECTRO 2

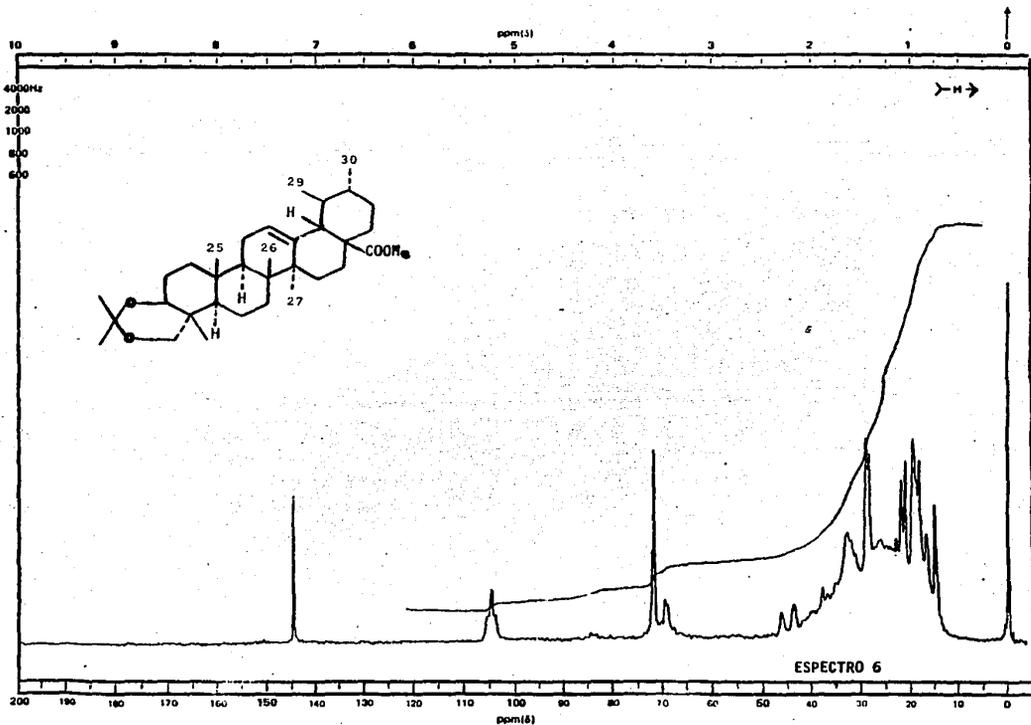
FRN 5119	SPECTRUM 33		RETENTION TIME 1.6	
LARGST 4:	248.3, 100.0	203.3, 46.3	133.2, 30.7	249.3, 17.7
LAST 4:	441.5, .3	446.2, .3	454.4, .6	472.4, 1.1 ^{ea}
			PAGE 1	Y = 1.00



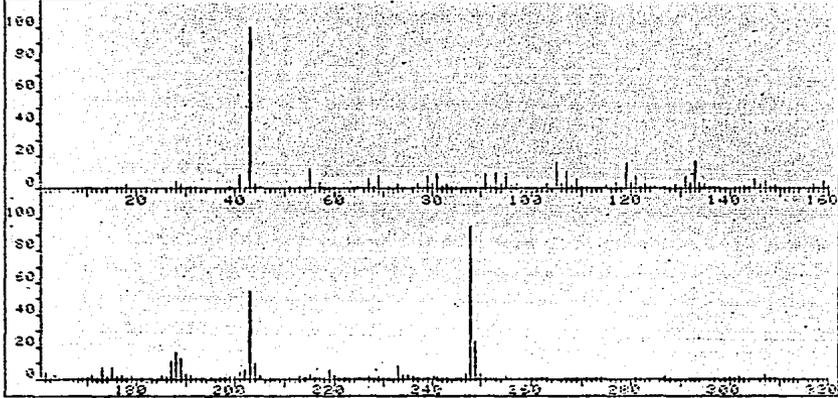
ESPECTRO 3



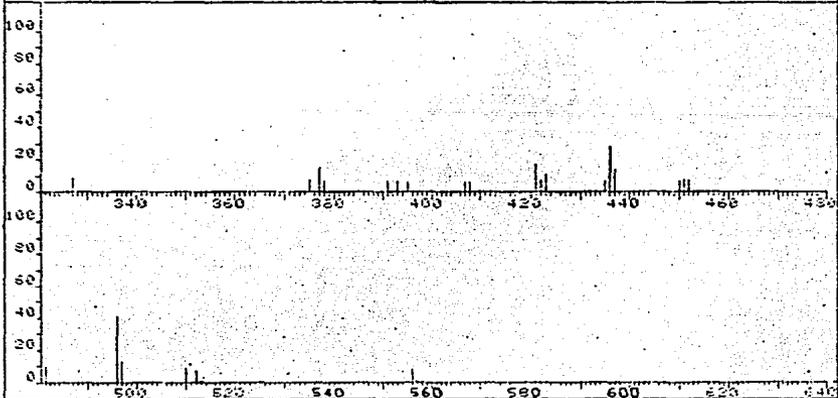




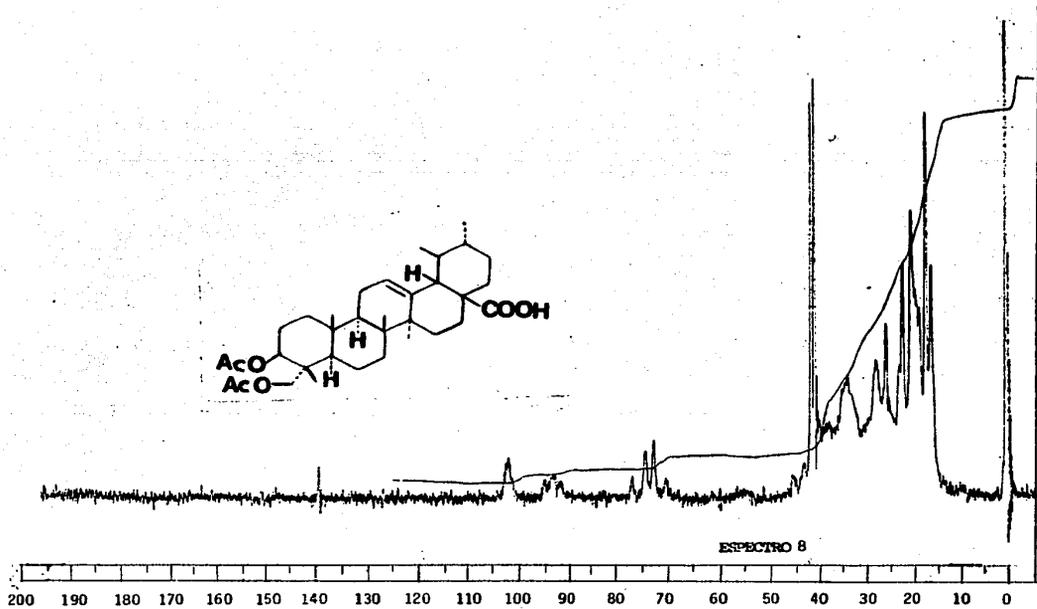
FILE 5041 / SPECTRUM RETENTION TIME
LRACT 4: 43.1, 100.0 246.3, 94.7 349.3, 22.9
LRACT 4: 497.4, .3 510.3, .5 556.4, .5
PAGE 1 V = 1.00

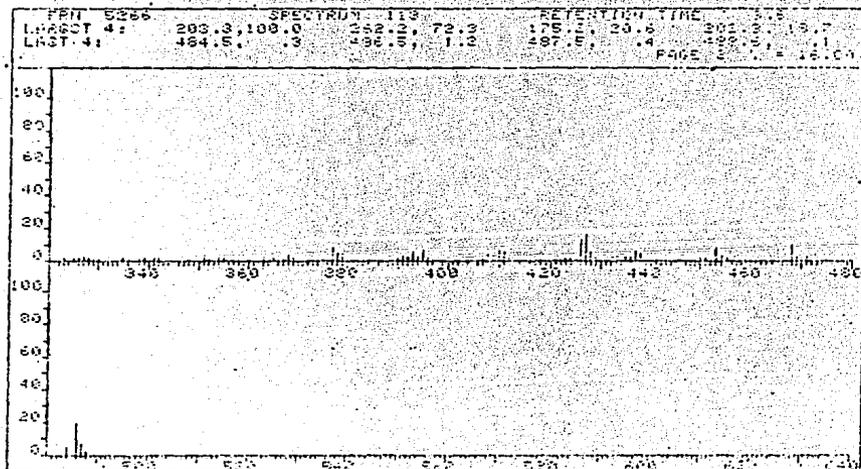
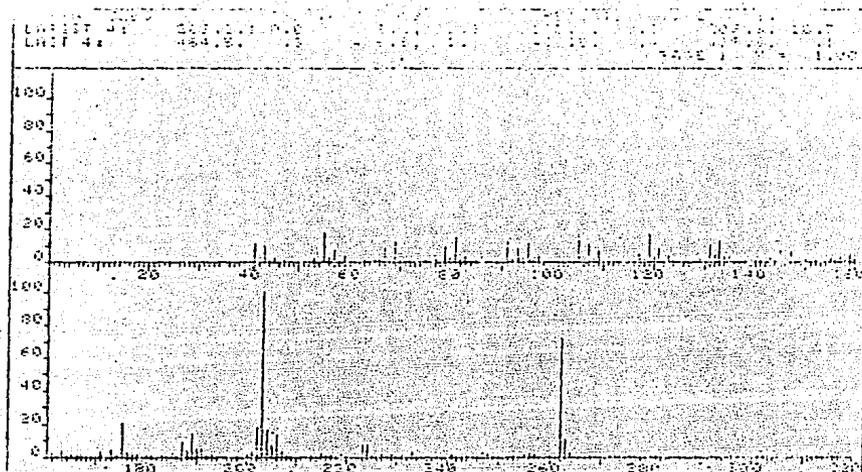


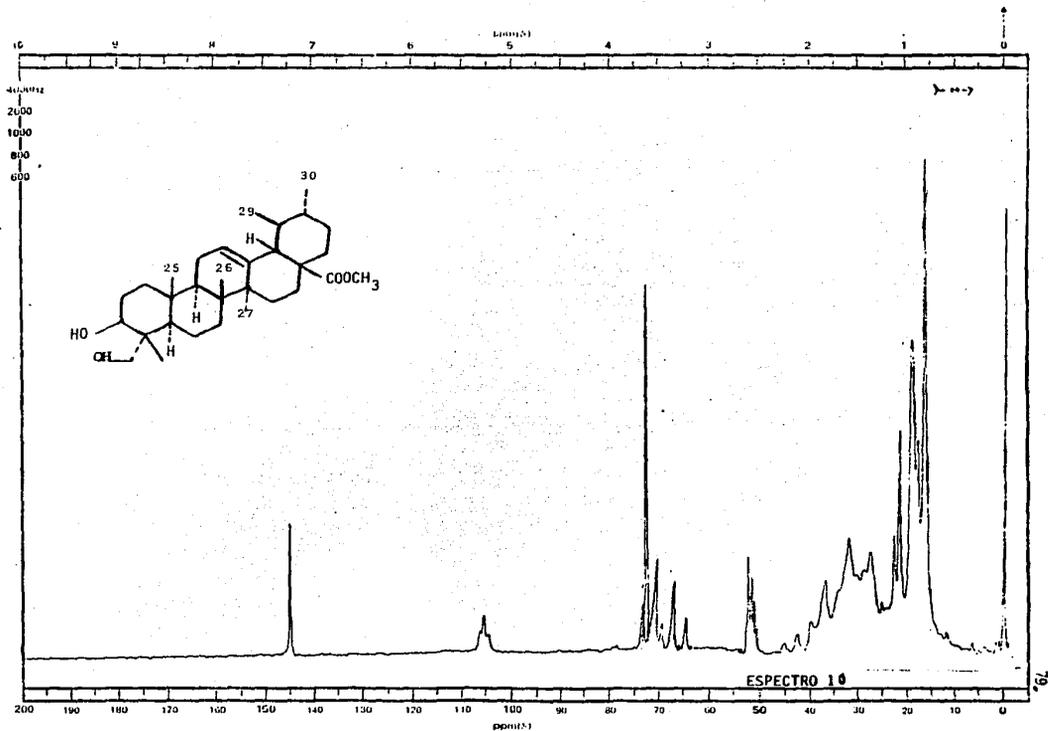
FILE 5041 / SPECTRUM RETENTION TIME
LRACT 4: 43.1, 100.0 246.3, 94.7 349.3, 22.9
LRACT 4: 497.4, .3 510.3, .5 556.4, .5
PAGE 2 V = 16.00

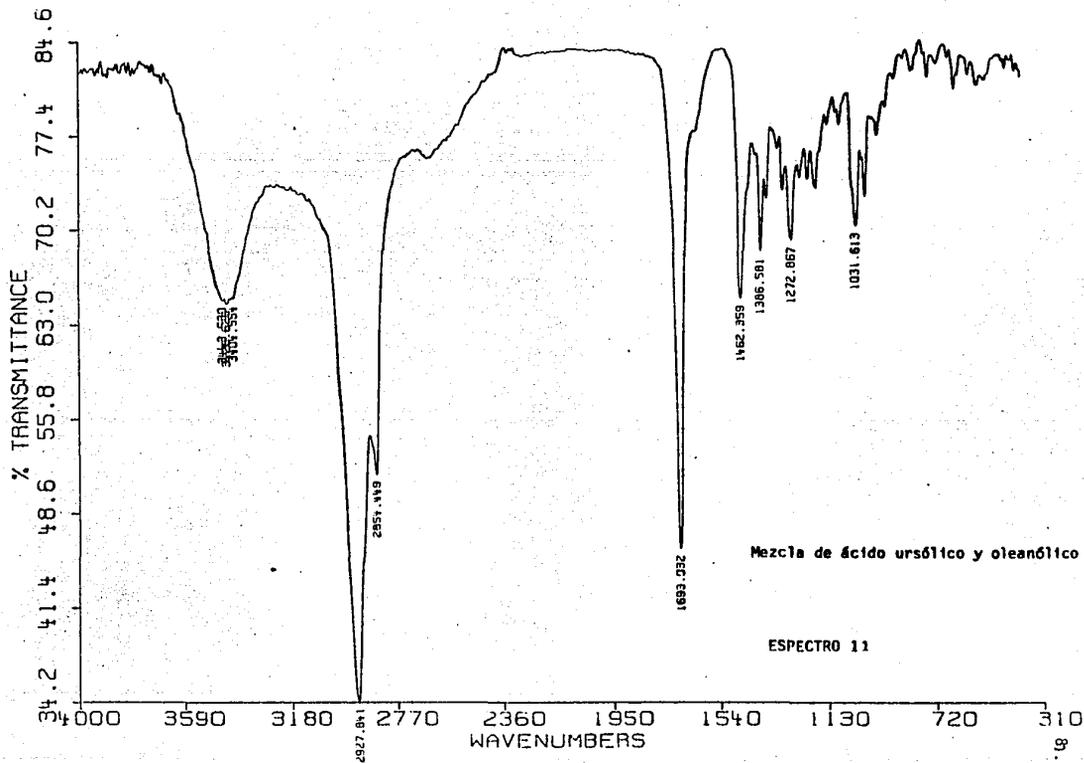


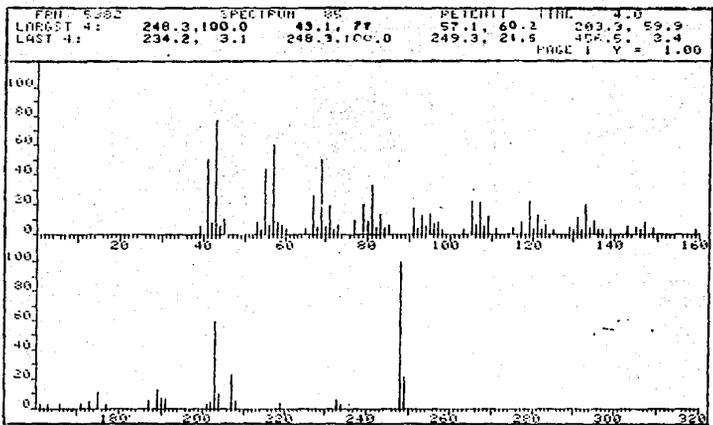
SPECTRO 7





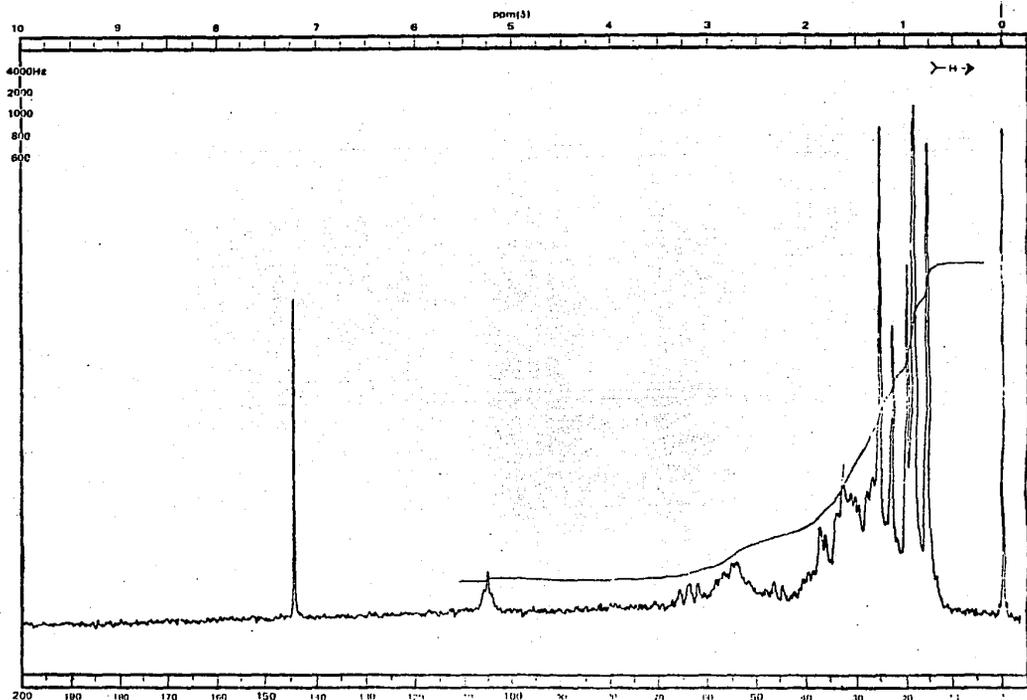






Mezcla de ácido ursólico y oleanólico

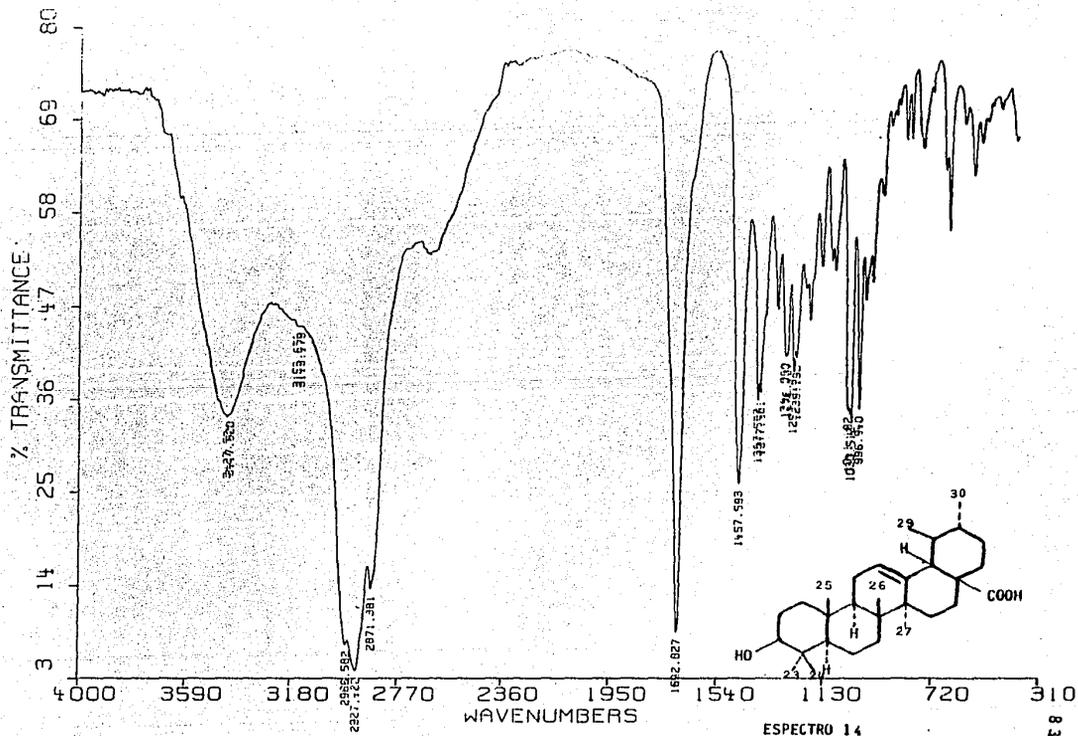
ESPECTRO 12



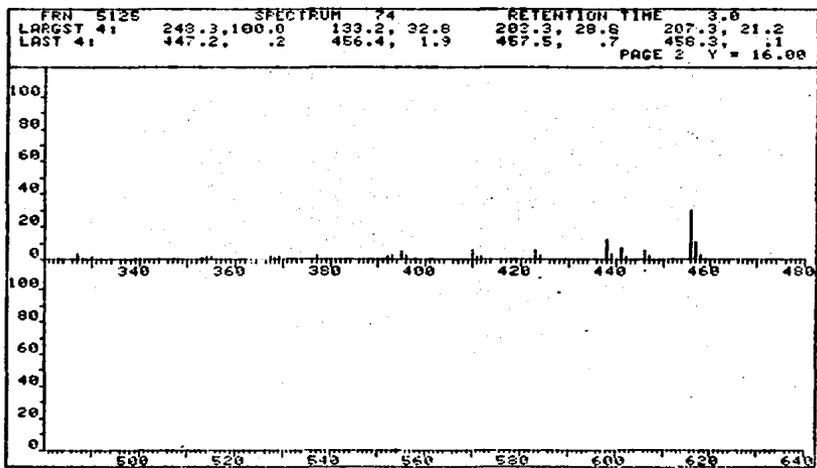
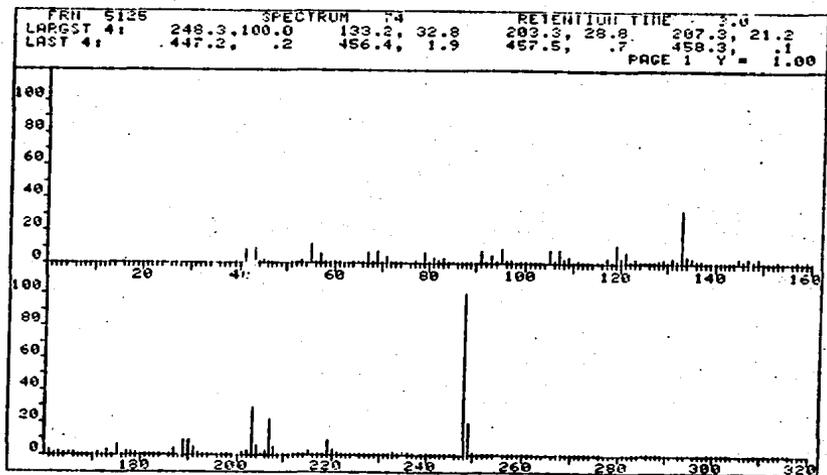
Mezcla de ácido ursólico y oleanólico

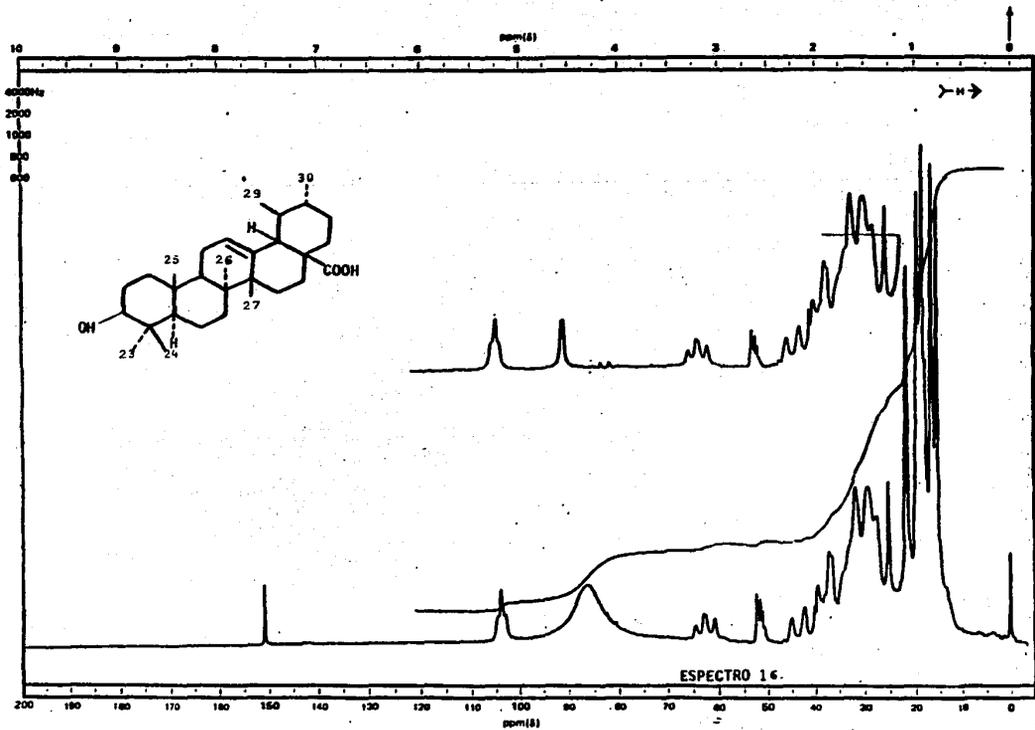
ESPECTRO 13

82

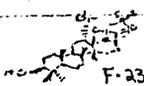
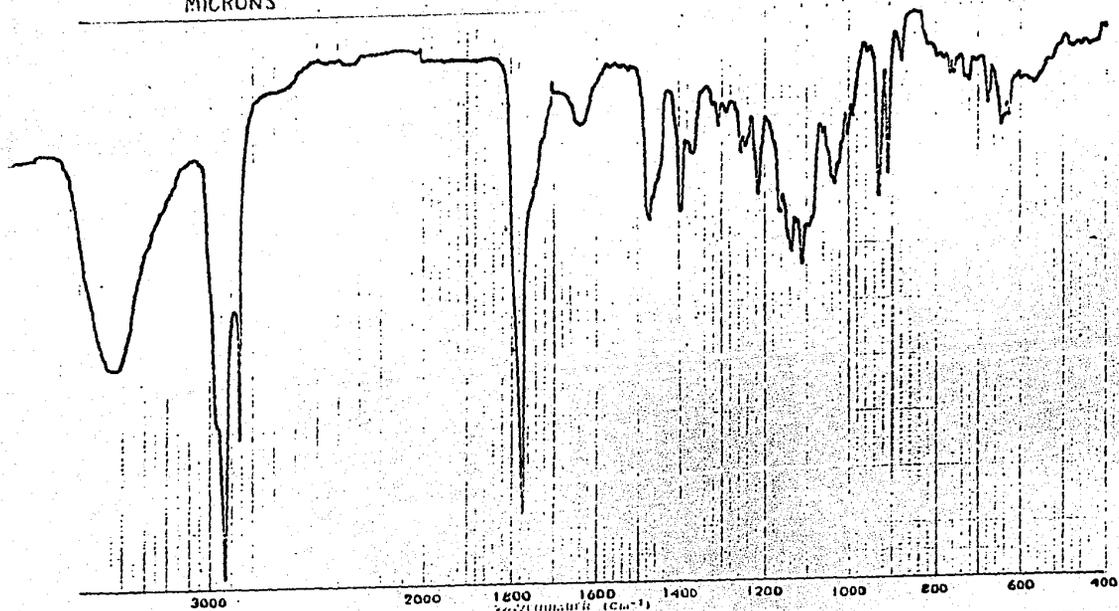


ESPECTRO 14





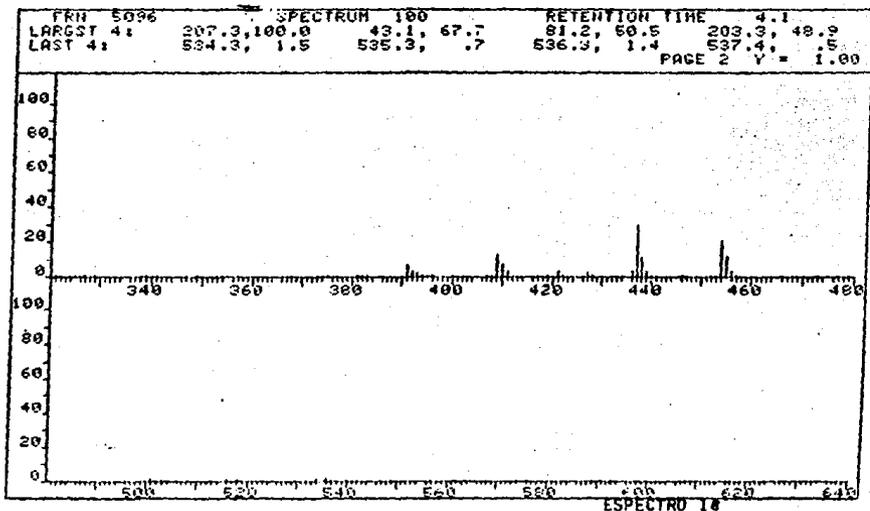
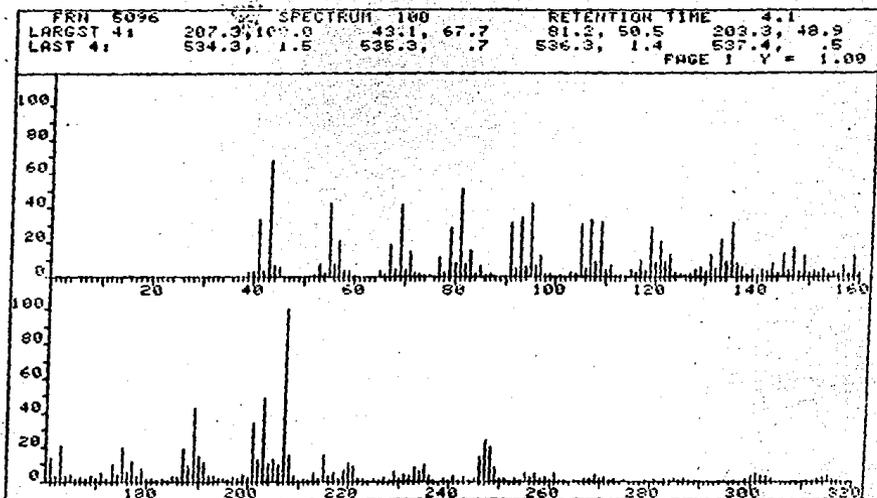
MICRONS

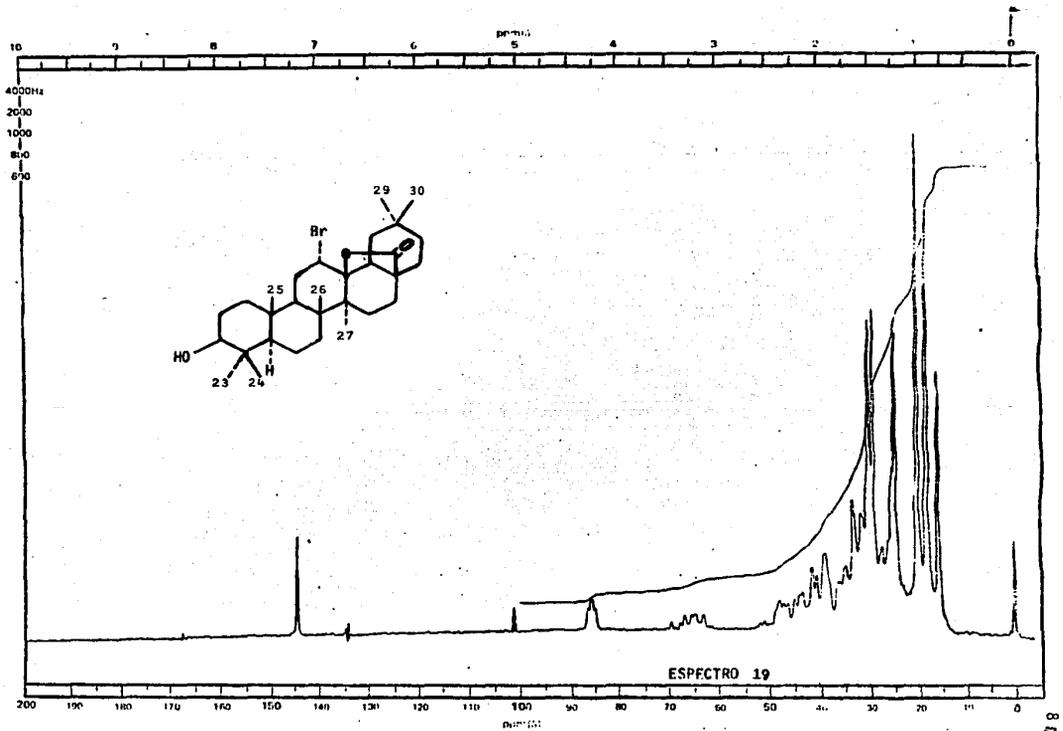


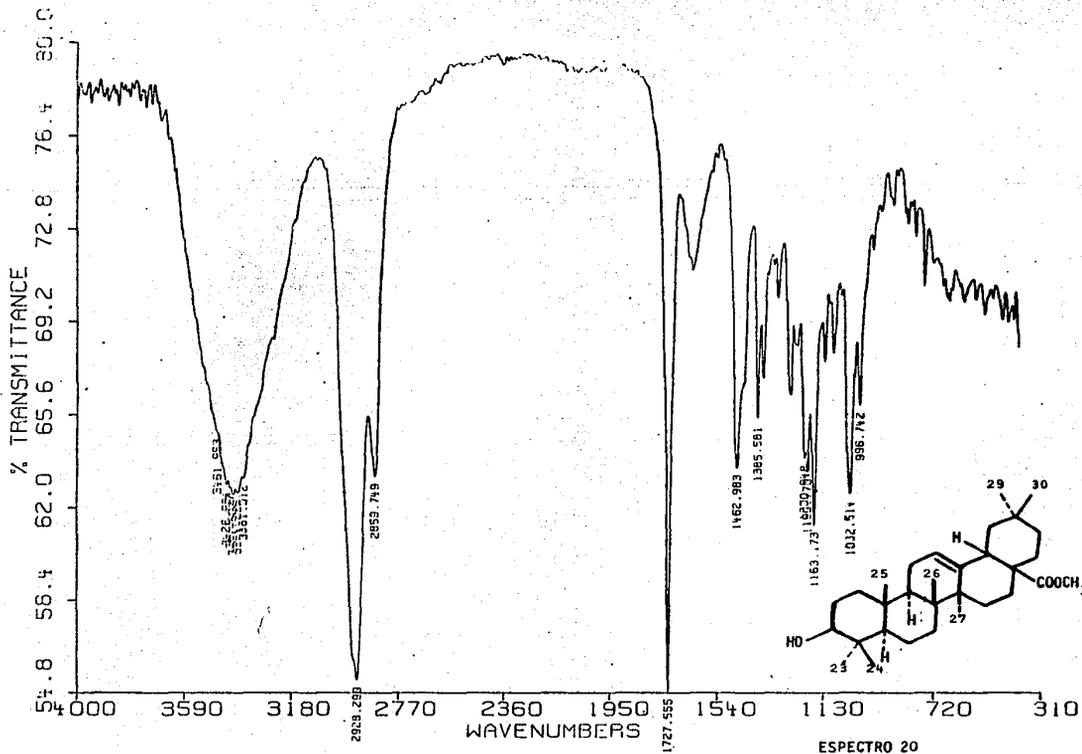
F-231-215

NAME	SOURCE	PREPARED BY	REMARKS
DATE	TYPE OF SAMPLE	ANALYST	
INSTRUMENT	OTHER DATA		

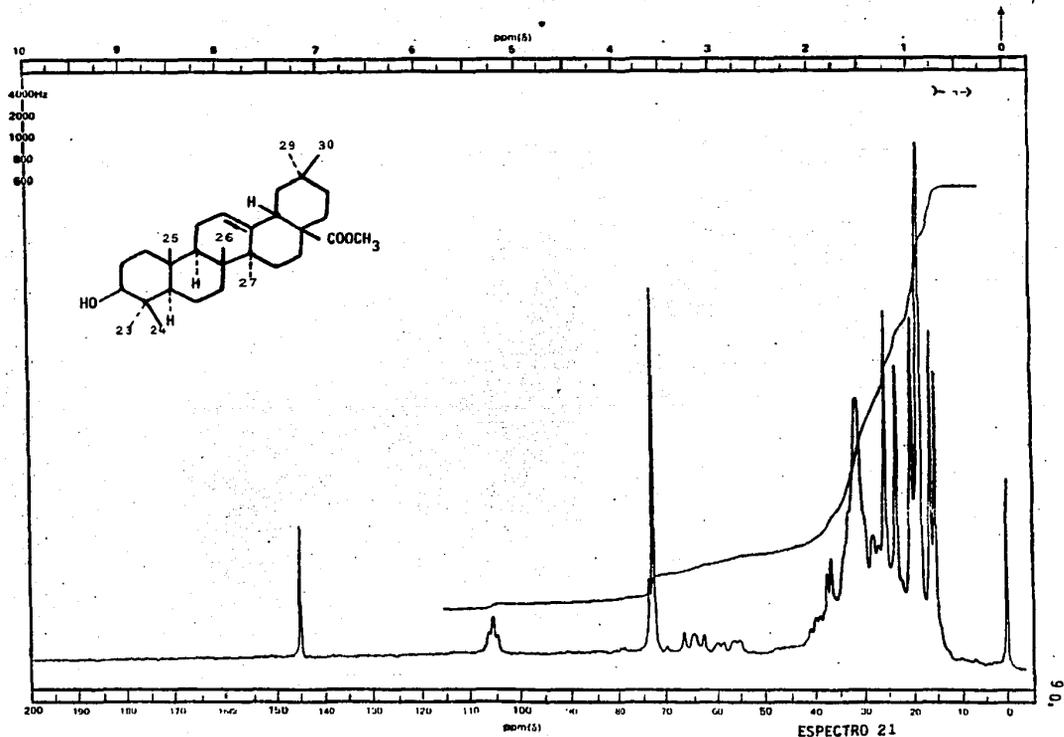
ESPECTRO 17



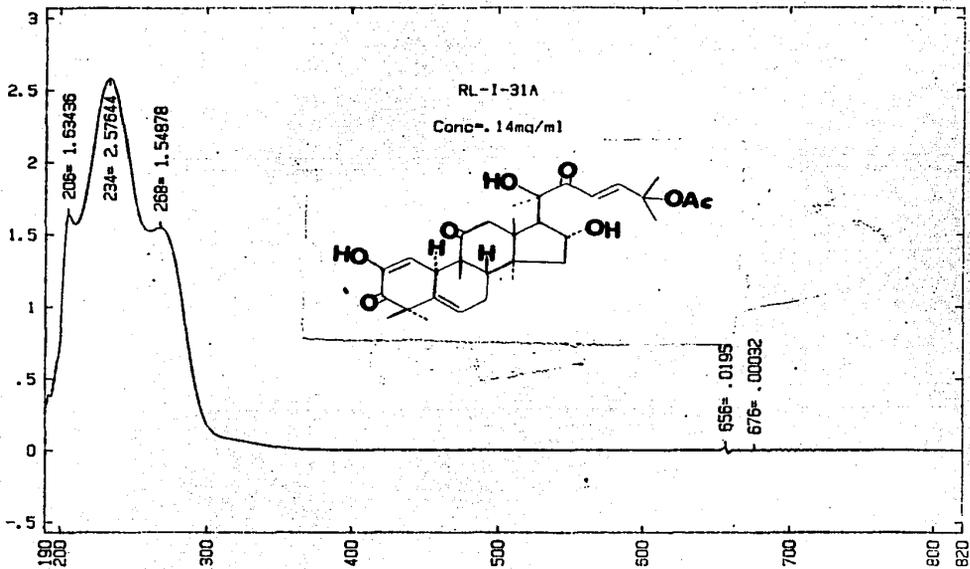




ESPECTRO 20



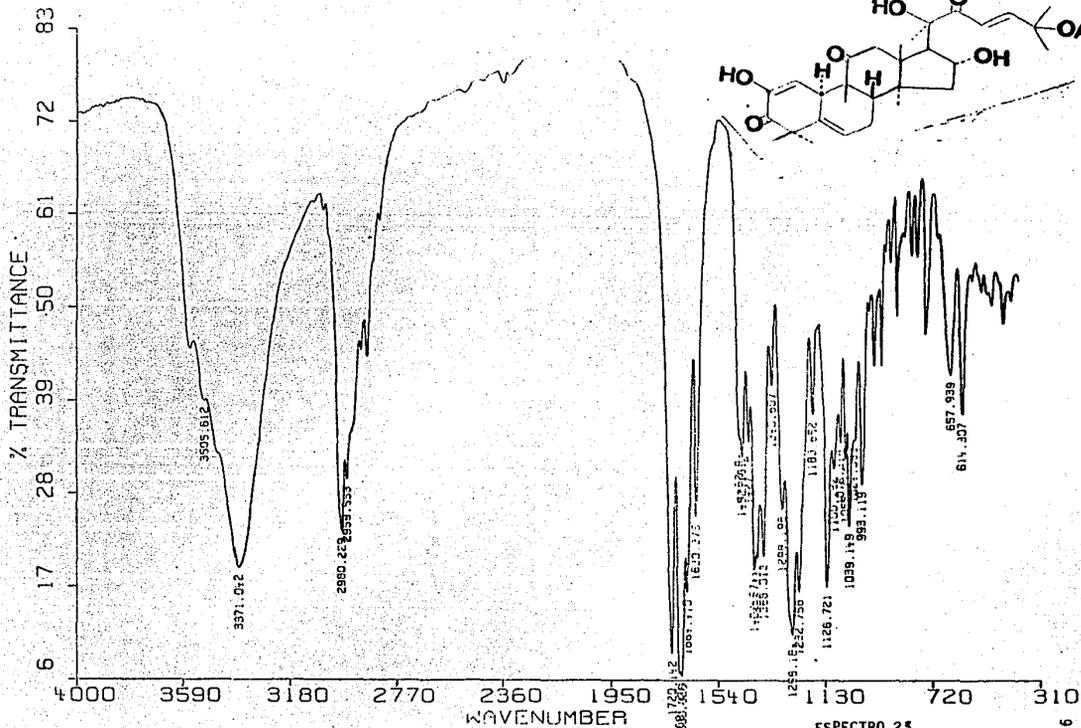
ABSORBANCE



WAVELENGTH (nm)

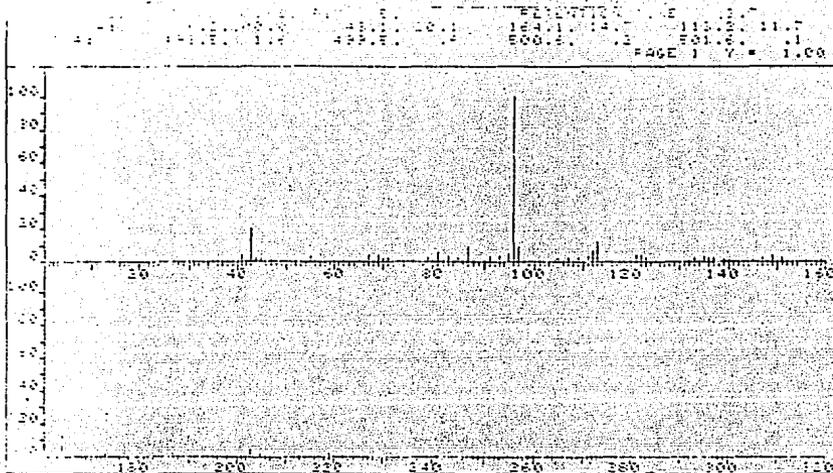
ESPECTRO 22

16

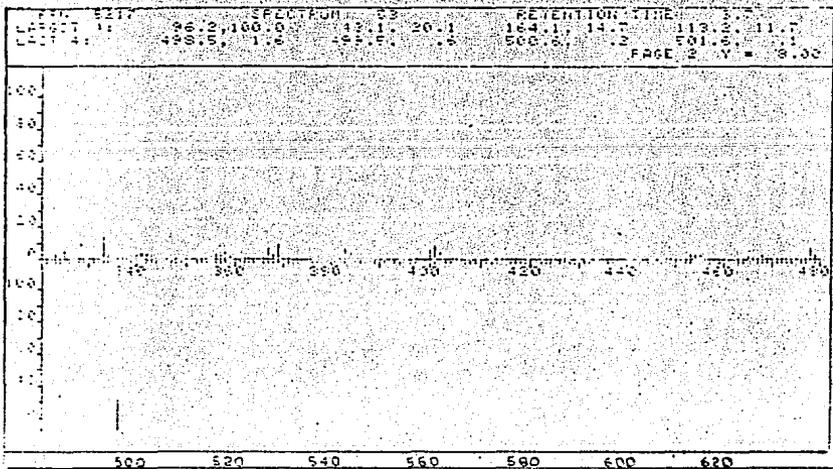


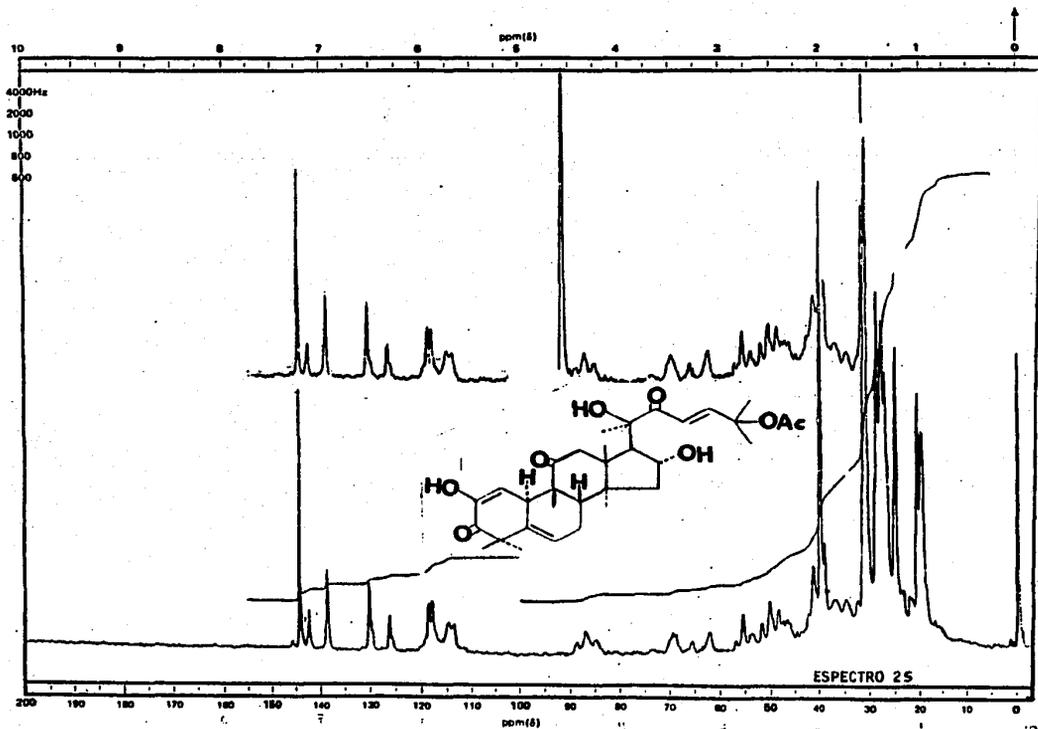
ESPECTRO 25

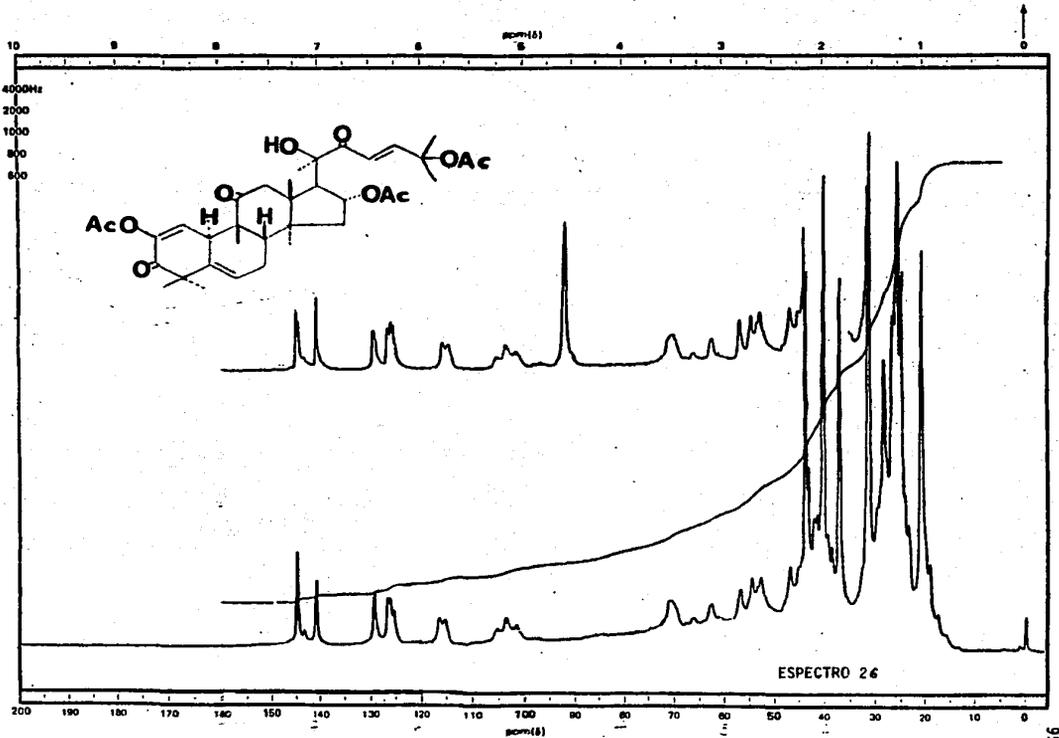
26

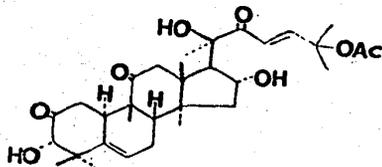
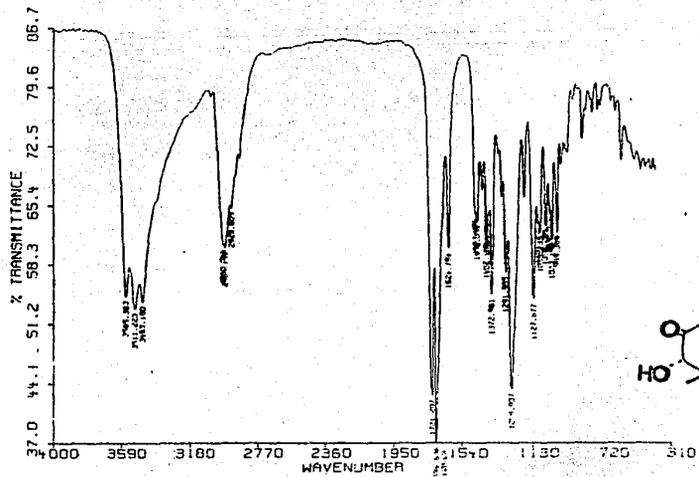


ESPECTRO 24

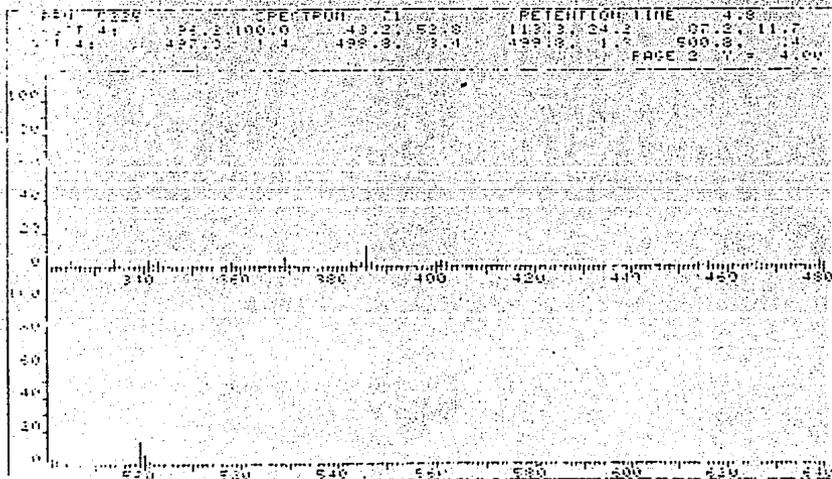
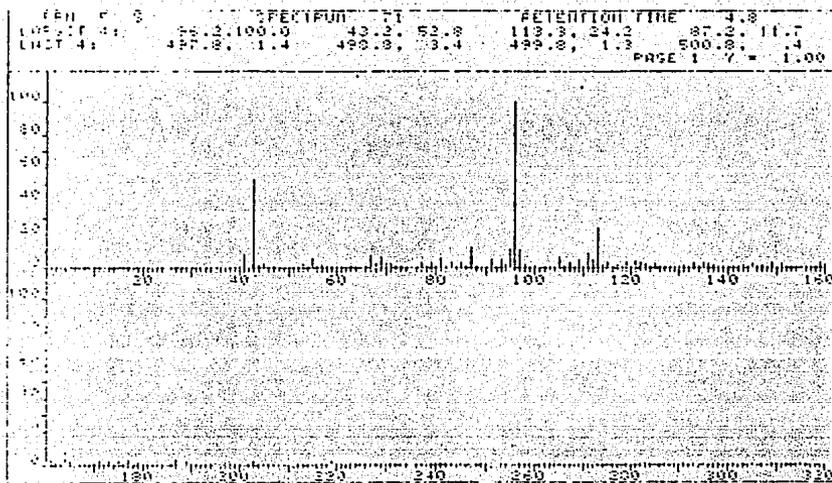


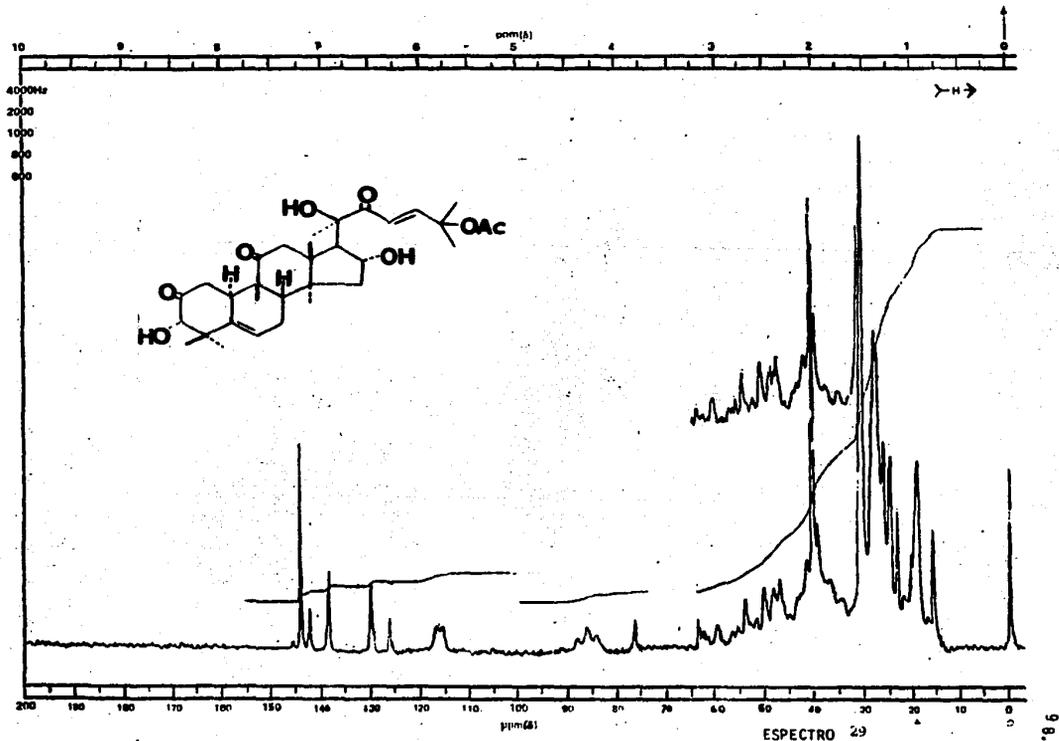


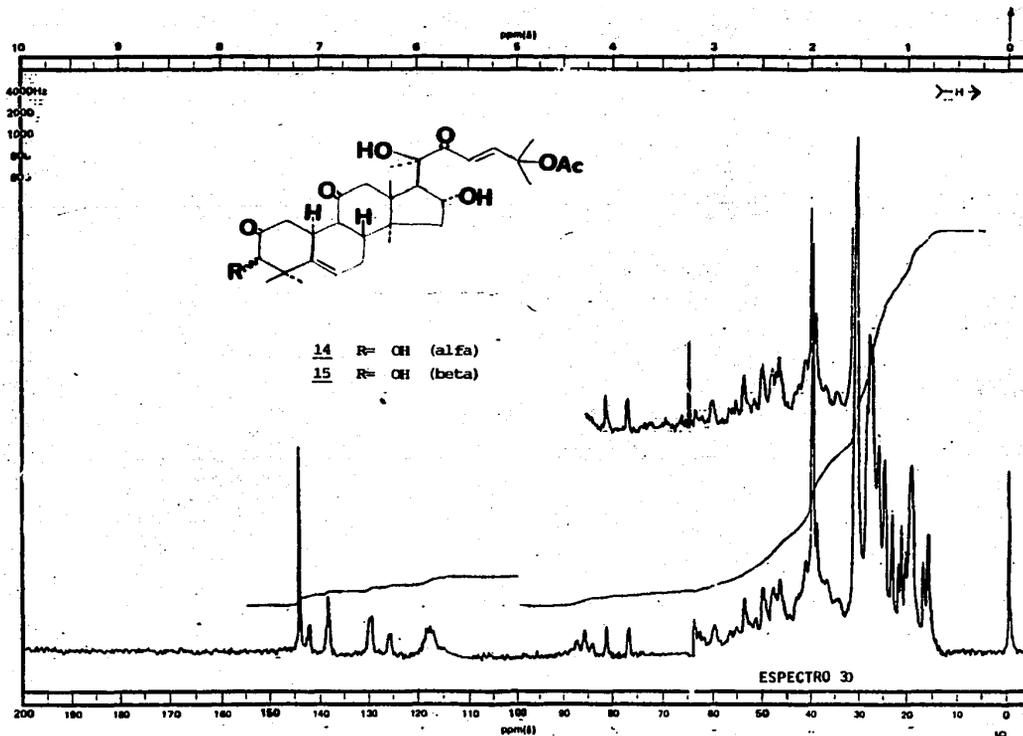




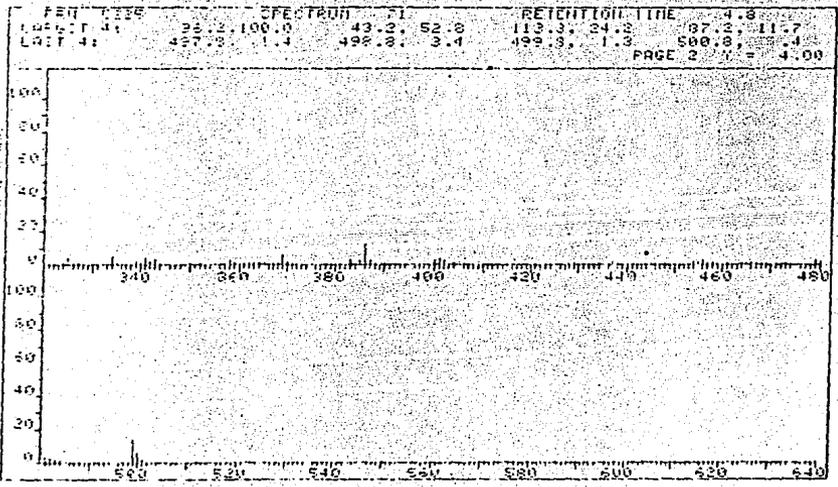
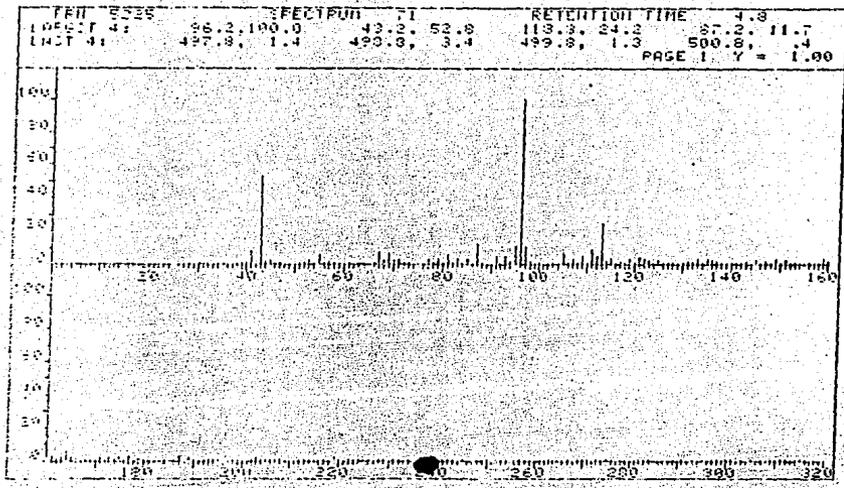
ESPECTRO 27

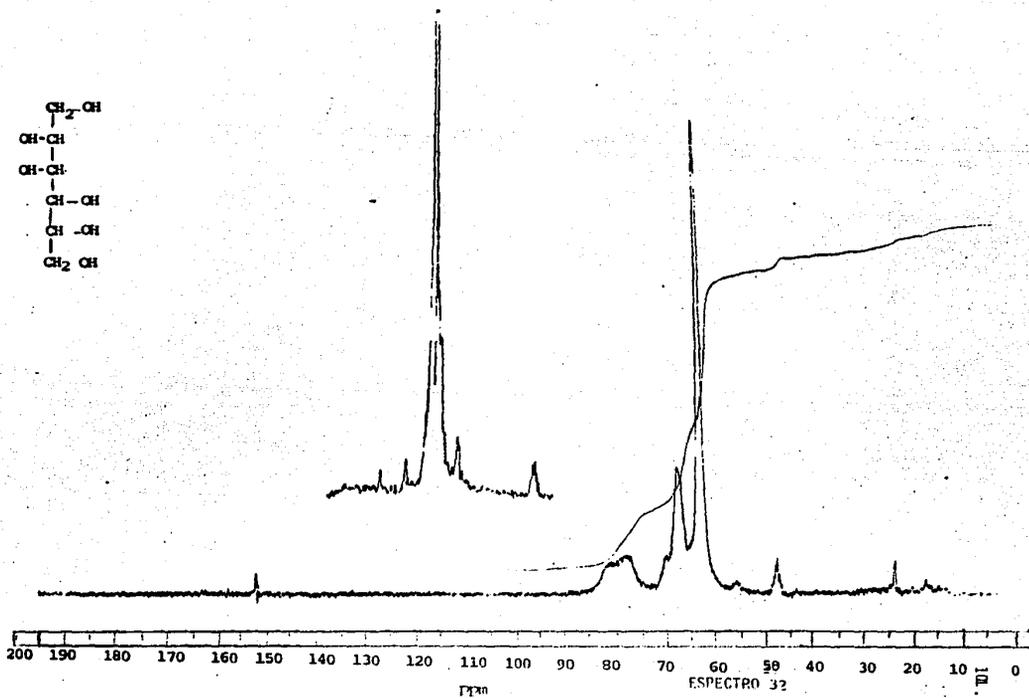
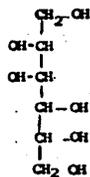


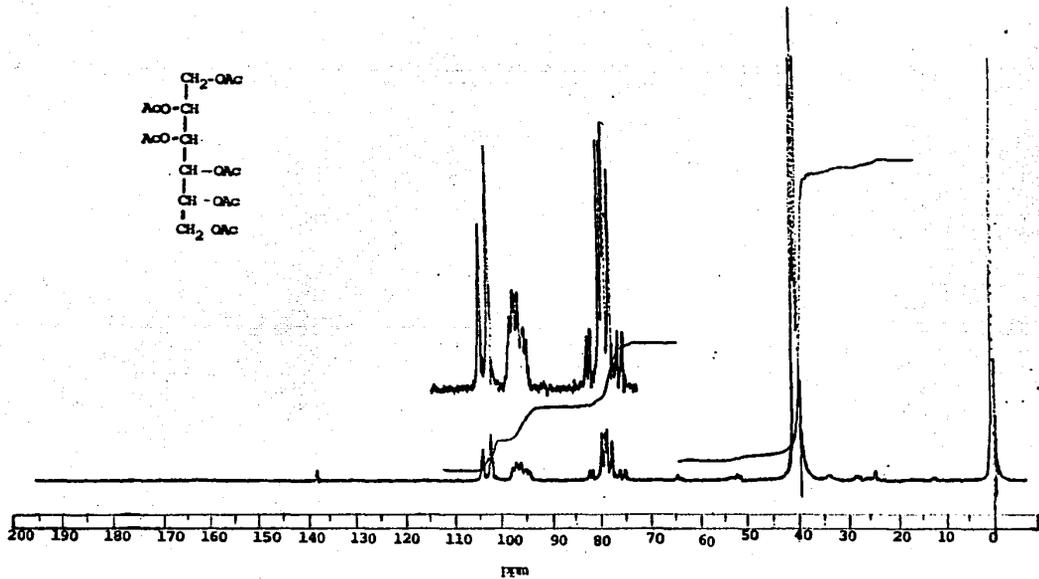
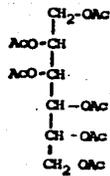




100.







ESPECTRO 33