

24/16



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“ ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA PLANTA
DE LA QUINA ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FERNANDO CALZADA BERMEJO

MEXICO, D. F.

1987.



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.

I N D I C E

	Página
LISTA DE TABLAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vi
LISTA DE ESQUEMAS -----	vii
LISTA DE ESPECTROS -----	viii
LISTA DE ABREVIATURAS -----	xii
INTRODUCCION -----	1
OBJETIVOS -----	10
MATERIALES Y METODOS -----	12
Material vegetal -----	12
Análisis cromatográficos -----	12
Determinación de alcaloides -----	12
Métodos de extracción y fraccionamiento -----	15
Aislamiento y purificación de los compuestos -----	15
Aislamiento de manitol, <u>1</u> , (FC-I-2A) -----	15

Página

Aislamiento del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'- dihidroxi-4-fenilcoumarina, <u>4</u> , (FC-I-6B) -----	15
Identificación del compuesto 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7- metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, <u>4</u> , (FC-I-6B) ---	18
Determinación de datos físicos y espectroscópicos ----	18
Prueba de Molisch para carbohidratos -----	18
Hidrólisis enzimática del compuesto, <u>4</u> -----	19
Hidrólisis del compuesto, <u>4</u> y su derivado metilado el 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>5</u> , -----	19
Determinación de galactosa en los productos de hidró- lisis ácida y enzimática del compuesto, <u>4</u> -----	21
Obtención de la 7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil- 5,2'-oxido coumarina, a partir de la 5,3',4'-trihí- droxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	21
Obtención de los derivados metilados -----	22
Obtención de los derivados acetilados -----	22
RESULTADOS Y DISCUSION -----	25
CONCLUSIONES -----	46

	Página
BIBLIOGRAFIA -----	47
APENDICE -----	50

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies del género <u>Exostema</u> L. <u>Richard</u> -----	3
Tabla 1. Especies del género <u>Exostema</u> L. <u>Richard</u> (Conti- nuación) -----	4
Tabla 2. Especies mexicanas del género <u>Exostema</u> -----	5
Tabla 3. Estructuras de 4-fenilcoumarinas reportadas en <u>Coutarea hexandra</u> Jacq. y <u>Hintonia latiflora</u> (Sesse et Moc ex D.C.) -----	8
Tabla 4. Sistema de eluyentes y agentes cromogénicos uti- lizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	14
Tabla 5. Hidrólisis ácida mediante HCl 1N de los compuestos <u>4</u> y <u>5</u> .-----	20
Tabla 6. Obtención de los derivados metilados de los com- puestos <u>4</u> , <u>6</u> y <u>8</u> . -----	23
Tabla 7. Preparación de derivados acetilados de los com- puestos <u>4</u> , <u>6</u> y <u>7</u> .-----	24
Tabla 8. Comportamiento cromatográfico del compuesto <u>4</u> .----	27
Tabla 9. Comportamiento cromatográfico del compuesto <u>6</u> .----	30

	Página
Tabla 10. Desplazamientos inducidos por la piridina en los protones aromáticos de la aglicona <u>6</u> .-----	41
Tabla 11. Comparación de los desplazamientos químicos calculados para las posibilidades estructurales "A" y "C" de la Figura 6, con los observados para el compuesto, <u>6</u> .-----	43
Tabla 12. Constantes físicas y datos espectroscópicos de los compuestos, <u>4</u> , <u>11</u> y <u>5</u> .-----	28
Tabla 13. Constantes físicas y datos espectroscópicos de los compuestos, <u>6</u> , <u>12</u> , <u>9</u> , <u>13</u> y <u>7</u> .-----	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras del manitol, <u>1</u> , exostasmina, <u>2</u> , y su derivado oxidado, <u>3</u> , -----	6
Figura 2. Estructura base de una 4-fenilcoumarina -----	37
Figura 3. Resumen parcial de la elucidación estructural del compuesto, <u>4</u> -----	34
Figura 4. Patrón de fragmentación de una 4-fenilcoumarina -	35
Figura 5. Alternativas en relación a la naturaleza del sustituyente en C-7 para la aglicona <u>6</u> -----	39
Figura 6. Posibilidades estructurales para la aglicona <u>6</u> --	40
Figura 7. Estructura del glicósido, <u>4</u> -----	45
Figura A-1. Hidrólisis ácida y enzimática del compuesto <u>4</u> -	51
Figura A-2. Obtención de los derivados acetilado, <u>11</u> y metilado, <u>5</u> -----	51
Figura A-3. Obtención de los derivados <u>7</u> y <u>13</u> -----	52
Figura A-4. Obtención de los derivados <u>9</u> , <u>12</u> , <u>10</u> y <u>8</u> -----	52

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
ESQUEMA 1. Obtención de la exostesmina de la <u>E. caribaeum</u> -	9
ESQUEMA 2. Preparación del extracto para la determinación de alcaloides en <u>E. caribaeum</u> Jacq. -----	13
ESQUEMA 3. Extracción de la corteza de <u>E. caribaeum</u> Jacq. -	16
ESQUEMA 4. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de <u>E. caribaeum</u> Jacq. -----	17

LISTA DE ESPECTROS

	Página
ESPECTRO A-1. Espectro U.V. del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> --	53
ESPECTRO A-2. Espectro I.R. del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> -----	54
ESPECTRO A-3. Espectro de RMN ¹ H del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> --	55
ESPECTRO A-4. Espectro RMN ¹ H del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> -----	56
ESPECTRO A-5. Espectro de RMN ¹³ C del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> --	57
ESPECTRO A-6. Espectro de RMN ¹³ C del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>4</u> --	58
ESPECTRO A-7. Espectro IR del 5- <u>0</u> - β -D-tetracetoxi-7-metoxi-3',4'-diacetoxi-4-fenilcumarina, <u>11</u> -----	59
ESPECTRO A-8. Espectro de RMN ¹ H del 5- <u>0</u> - β -D-tetracetoxi-7-metoxi-3',4'-diacetoxi-4-fenilcumarina, <u>11</u> -	60
ESPECTRO A-9. Espectro de RMN ¹ H del 5- <u>0</u> - β -D-tetracetoxi-7-metoxi-3',4'-diacetoxi-4-fenilcumarina, <u>11</u> -	61

	Página
ESPECTRO A-10. Espectro IR del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>5</u> -----	62
ESPECTRO A-11. Espectro de RMN ¹ H del 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>5</u> -----	63
ESPECTRO A-12. Espectro de masas I.E. de la 5;3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	64
ESPECTRO A-13. Espectro U.V. de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	65
ESPECTRO A-14. Espectro IR de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	66
ESPECTRO A-15. Espectro de RMN ¹ H de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	67
ESPECTRO A-16. Espectro de RMN ¹ H de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	68
ESPECTRO A-17. Espectro de RMN ¹³ C de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> -----	69
ESPECTRO A-18. Espectro de RMN ¹ H de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>12</u> -----	70
ESPECTRO A-19. Espectro de RMN ¹ H de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>12</u> -----	71

	Página
ESPECTRO A-20. Espectro de RMN ¹ H de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>12</u> -----	72
ESPECTRO A-21. Espectro de masas I.E. de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina, <u>9</u> -----	73
ESPECTRO A-22. Espectro U.V. de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina, <u>9</u> -----	74
ESPECTRO A-22b. Espectro I.R. de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina, <u>9</u> -----	75
ESPECTRO A-23. Espectro de RMN ¹ H de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina, <u>9</u> -----	76
ESPECTRO A-24. Espectro de masas I.E. de la 5-acetoxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>13</u> -----	77
ESPECTRO A-25. Espectro I.R. de la 5-acetoxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>13</u> -----	78
ESPECTRO A-26. Espectro de RMN ¹ H de la 5-acetoxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>13</u> -----	79
ESPECTRO A-27. Espectro de masas I.E. de la 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>7</u> -----	80
ESPECTRO A-28. Espectro I.R. de la 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>7</u> -----	81

	Página
ESPECTRO A-29. Espectro de ^{1}H de la 5-hidroxi-7,3',4'- trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>7</u> -----	82
ESPECTRO A-30. Espectro U.V. de la 7-metoxi-4',5'-dihidroxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, <u>8</u> -----	83
ESPECTRO A-31. Espectro I.R. de la 7-metoxi-4',5'-dihidroxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, <u>8</u> -----	84
ESPECTRO A-32. Espectro de ^{1}H de la 7-metoxi-4',5'- dihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, <u>8</u> ---	85
ESPECTRO A-33. Espectro de I.R. de la 7,4',5'-trimetoxi-4- fenil-5,2'-oxidocoumarina, <u>10</u> -----	86

LISTA DE ABREVIACIONES

- A:** Apéndice
c: cuarteto
CDCl₃: cloroformo deuterado
d: doblete
dd: doble de dobles
D₂O: agua deuterada
DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EIE: Espectro de masas obtenido por impacto electrónico
Hz: Hertz
IR: Infrarrojo
J: Constante de acoplamiento
m: multiplete
MHz: Mega Hertz
Pf: Punto de fusión
Piridina-d₅: Piridina pentadeuterada
ppm: partes por millón
RMN¹H: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono-13
s: singulete
t: triplete
TMS: Tetrametilsilano
UV: Ultravioleta

INTRODUCCION

El género Exostema L. Richard (Familia: Rubiaceae; Subfamilia: Cinchonoideae; Tribu: Cinchoneae), comprende aproximadamente 26 especies. El mayor número de ellas se encuentra en las Indias Occidentales, en las regiones montañosas de Sur América y en México. Taxonómicamente Exostema se encuentra estrechamente relacionada con los géneros Coutarea, Coutaportia, Portlandia, Cigarrilla y Cinchona (Aiello, 1979). En la Tabla 1 se resumen las diferentes especies del género incluyendo su distribución geográfica y sinonimias (Standley, 1918; Standley y Williams, 1975).

Como se puede observar en la Tabla 1 en México sólo se conocen cuatro especies bien diferenciadas. En la Tabla 2 se especifican las especies mexicanas, incluyendo su distribución local, sinonimias, uso popular medicinal y nombre común.

La E. caribaeum (Jacq) R. et S. es muy utilizada en la medicina popular como sucedáneo de la quina y tiene la particularidad de poseer la corteza y las hojas extremadamente amargas (Aiello, 1979). Roig en su libro Plantas Medicinales aromáticas y venenosas de Cuba hace una descripción detallada de la planta, la cual es un arbusto o arbolito de hasta 8 metros de altura con un tronco hasta veces de 1 metro de diámetro (Roig, 1974).

Desde el punto de vista fitoquímico son escasos los estudios realizados sobre especies del género, y quizás la más investigada ha sido la E. caribaeum. El primer trabajo químico sobre esta planta fue efectuado por Krebs y Griesinger quienes reportaron el aislamiento e identificación del manitol, 1, (Figura 1) (Krebs y Griesinger, 1960). Posteriormente Sánchez Viesca et. al., describieron la obtención y caracterización de la exostesmina 2. Esta sustancia resultó ser un nuevo producto natural y, la primera 4-fenilcoumarina reportada en un miembro de la familia Rubiaceae (Sánchez-Viesca et. al., 1967).

Inicialmente Sánchez Viesca et. al. propusieron la estructura 2 como tentativa. La elucidación estructural estuvo basada en los datos

Tabla 1. Especies del género Exostema L. Richard.

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	DISTRIBUCION
<u>Exostema coulteri</u> Hook	-	México
<u>Exostema spinosum</u> Le Vavass	<u>Cinchona spinosa</u> Le Vavass <u>Catesbaea vavassorif</u> Spreng <u>Catesbaea elliptica</u> Spreng <u>Exostema vavassorif</u> Griseb.	Cuba, Sto. Domingo
<u>Exostema stenophyllum</u> Britton.	-	Cuba
<u>Exostema longiflorum</u> Lamb.	<u>Cinchona longiflora</u> Lamb.	Cuba, Sto. Domingo
<u>Exostema salicifolium</u> Griseb.	-	Cuba
<u>Exostema acuminatum</u> Urban.	<u>Exostema salicifolium</u> Griseb.	Haiti
<u>Exostema purpureum</u> Griseb.	-	Cuba
<u>Exostema caribaeum</u> Jacq.	<u>Cinchona caribaea</u> Jacq. <u>CINCHONA JAMAICENSIS</u> Wright <u>CINCHONA MYRTIIFOLIA</u> Stokes <u>CINCHONA PACMOSA</u> Schrank <u>EXOSTEMA TONGATENSE</u> Oerst.	Cuba, Costa Rica, México, Indias Occidentales.
<u>Exostema angustifolium</u> Sw.	<u>Cinchona angustifolia</u> Sw.	Santo Domingo
<u>Exostema lineatum</u> Vahl.	<u>Cinchona lineata</u> Vahl. <u>Exostema PICAPUË</u> Krug.	Santo Domingo
<u>Exostema subcordatum</u> Krug		Haiti
<u>Exostema triflorum</u> Wright	<u>Cinchona triflora</u> Wright <u>Exostema ellipticum</u>	Jamaica
<u>Exostema rupicola</u> Urban	-	Santo Domingo
<u>Exostema brachycarpum</u> Sw.	<u>Cinchona brachycarpa</u> Sw.	Jamaica
<u>Exostema floribundum</u> Sw.	<u>Cinchona floribunda</u> Ws. <u>Cinchona montana</u> Badier <u>Cinchona luciana</u> Vilm.	Antillas
<u>Exostema rotundatum</u> Griseb.	<u>Exostema ellipticum</u>	Cuba

Tabla 1. Especies del género Exostema L. Richard. (Continuación).

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	DISTRIBUCION
<u>Exostema ellipticum</u>	-	Cuba
<u>Exostema elegans</u> Krug.	-	Haiti
<u>Exostema parviflorum</u> Rich.	<u>Exostema valenzuelae</u> Rich. <u>Cinchona parviflora</u> Brign. <u>Solenandra ixoroides</u> Hook <u>Staudelago ixoroides</u> Kuntze <u>Exostema corightii</u> Krug.	Cuba
<u>Exostema crassifolium</u> Standley	-	Cuba
<u>Exostema shaferi</u> Standley	-	Cuba
<u>Exostema velutinum</u> Standley	-	Cuba
<u>Exostema barbatum</u> Standley	-	Cuba
<u>Exostema mexicanum</u> A. Gray	-	México, Honduras Salvador, Costa Rica,
<u>Exostema indutum</u> Standley	-	México

Tabla 2. Especies mexicanas del género Exostema

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	NOMBRE COMUN	DISTRIBUCION	USO POPULAR
<u>Exostema scouleri</u> Hook	-	-	Zimapan Hidalgo	-
<u>Exostema caribaeum</u> Jacq.	<u>Cinchona caribaea</u> Jacq. <u>Cinchona jamaicensis</u> Wright. <u>Cinchona myrtifolia</u> Stokes <u>Cinchona racemosa</u> Schrank <u>Exostema longicaule</u> Oerst.	Zabacche, chaetsis Copaicho de Jajutla Jocotillo de Cerro Quina de Michoacán Planta de la Quina Falsa quina	San Luis Potosí, Colima, Guerrero, Yucatán	Sustituto de la quina hipoglucemiante
<u>Exostema mexicanum</u> A-Gray.	-	Quina, melena de león, Sabac-ché	Veracruz, San Luis Potosí	Antipalúdico
<u>Exostema indutum</u> Standley	-	-	Oaxaca	-

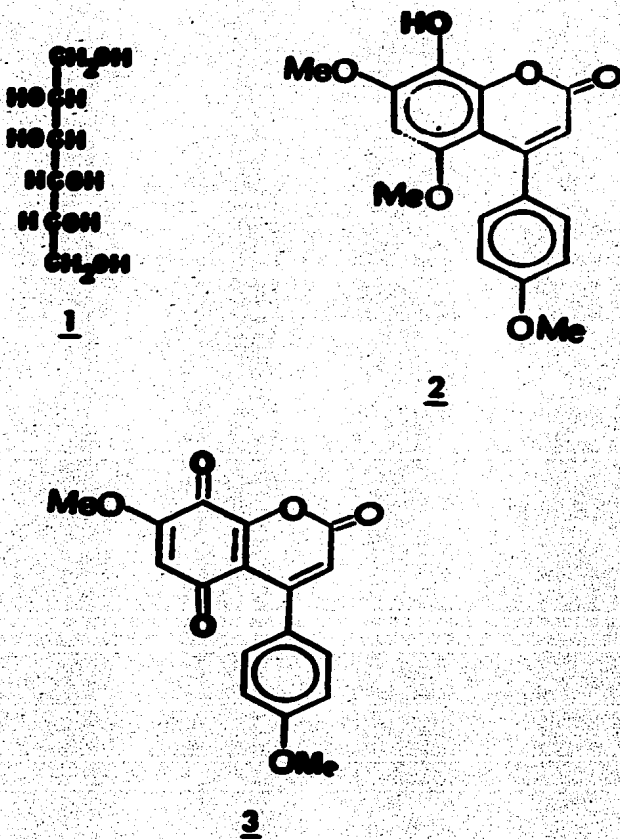


Figura 1.- Estructuras del manitol 1, exosteamina 2, y su derivado oxidado 3.

químicos y espectroscópicos del producto natural y de su derivado oxidado 3, cuya estructura también se indica en la Figura 1. El derivado 3, se obtuvo por tratamiento de 2 con CrO_3 y la posibilidad de que 3 fuese una ortoquinona se descartó en base a una reacción negativa de 3 con carbonato de guanidina.

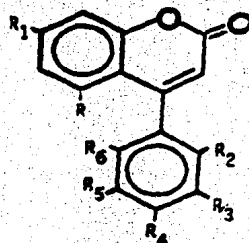
En otros trabajos posteriores la estructura 2 fue cuestionada por Mukerjee *et. al.* (Mukerjee *et. al.*, 1968) ya que, los puntos de fusión del compuesto 2 y sus derivados no eran concordantes con los productos obtenidos por síntesis. Finalmente, Sánchez-Viesca confirma la estructura 2 para la exostesmina y corrige la anomalía de los puntos de fusión. Sin embargo, la posibilidad de un arreglo de los sustituyentes en las posiciones 5, 6 y 7 del anillo A no ha sido totalmente descartada.

El procedimiento seguido para la obtención de la exostesmina se resume a grosso modo en el Esquema 1 (Sánchez-Viesca *et. al.*, 1967; Sánchez-Viesca *et. al.*, 1969).

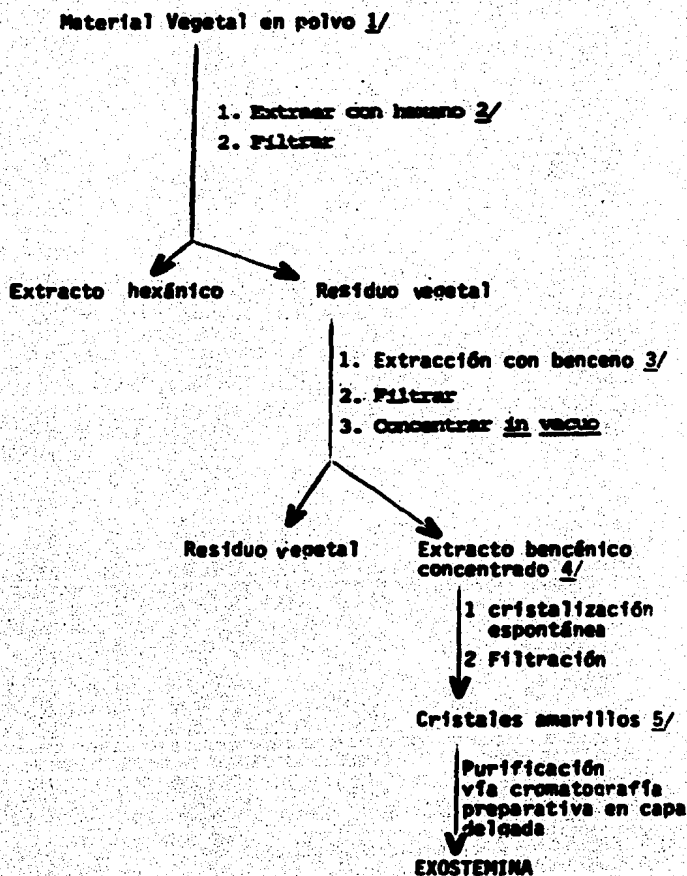
Cabe descartar que luego del aislamiento de la exostesmina otras fenilcoumarinas han sido reportadas en otros miembros de la familia Rubiaceae. Las estructuras de estos compuestos y sus fuentes naturales se resumen en la Tabla 3.

Otra especie de Exostema estudiada es la E. floribundum Sw. en la que se reportó la presencia de oxalato de calcio, taninos e hidroxycoumarinas (Roem, Schuit, 1946; Paris y Pointet, 1954).

Tabla 3. Estructuras de 4-Fenilcoumarinas reportadas en Coutarea hexandra Jacq. y Hintonia latiflora (Sesse et Moc ex D.C.) Bullock



	R	R ₆	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	FUENTE NATURAL
1	OMe	H	-OMe	H	H	OMe	H	<u>Coutarea hexandra</u>
2	OMe	H	OMe	H	H	OH	H	"
2a	OMe	H	OMe	H	H	OAc	H	"
3	OMe	H	OMe	H	OH	OMe	H	"
3a	OMe	H	OMe	H	OAc	OMe	H	"
4	OMe	H	OMe	H	OH	OH	H	"
4a	OMe	H	OMe	H	OAc	OAc	H	"
5	OMe	H	OMe	H	OMe	OMe	H	"
6	OMe	H	OMe	H	OMe	OH	H	"
6a	OMe	H	OMe	H	OMe	OAc	H	"
7	OMe	H	OMe	H	-O-CH ₂ -O-		H	"
8	OH	H	OMe	-OH	H	H	-OH	"
9	OH	H	OH	H	H	OMe	H	"
10	OH	H	OH	H	H	OH	H	"
11	OH	H	OH	H	OMe	OH	H	"
12	OH	H	OH	H	-O-CH ₂ -O-		H	"
13	-O-		-OMe	H	OH	OH	H	<u>Hintonia latiflora</u>



1/ Cantidad de material vegetal: 450 g.

2/ Vía Soxhlet (4 l hexano/12 hr.)

3/ Vía Soxhlet (3.5 l de benceno/12 hr.).

4/ El extracto se concentró hasta un volumen de 100 ml.

5/ Prismáticos, color amarillo (3 g); P_f: 157-160°C.

ESQUEMA 1. Obtención de la Exostemina de la E. caribaeum.

OBJETIVOS

Objetivos generales

El propósito del presente trabajo fue realizar la investigación fitoquímica preliminar de la E. caribaeum Jacq; como parte de un estudio sistemático de Rubiáceas mexicanas usadas en medicina tradicional.

Objetivos específicos

1. Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de la E. caribaeum Jacq.
2. Determinar la presencia o ausencia de alcaloides en la corteza de la planta, considerando que algunas especies de géneros relacionados, son ricas en alcaloides y que recientemente se ha reportado como dudosa la presencia de los mismos en E. caribaeum Jacq.
3. Establecer mediante ensayos fitoquímicos preliminares el método más adecuado para efectuar la extracción del material vegetal.
4. Preparar el extracto total de acuerdo con los resultados obtenidos en los puntos 2 y 3.
5. Fraccionar el extracto vegetal mediante los métodos fitoquímicos adecuados.

6. Separar y purificar al menos un constituyente de las diferentes fracciones.
7. Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
8. Correlacionar en lo posible los resultados químicos obtenidos con la actividad biológica que se le atribuye a la planta.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

La corteza de *E. caribaeum* fue recolectada en Coyuca de Catalán a 30 minutos de Zihuatanejo, Guerrero, y fue identificada por el Dr. David Lorence del Instituto de Biología, U.N.A.M.

Una muestra de referencia se depositó en el Herbario del Instituto de Biología, U.N.A.M. (25.V.1986 Col: F.Calz. E. Castro I).

El material vegetal se secó en una estufa a una temperatura de 30°C y se cortó en trozos pequeños.

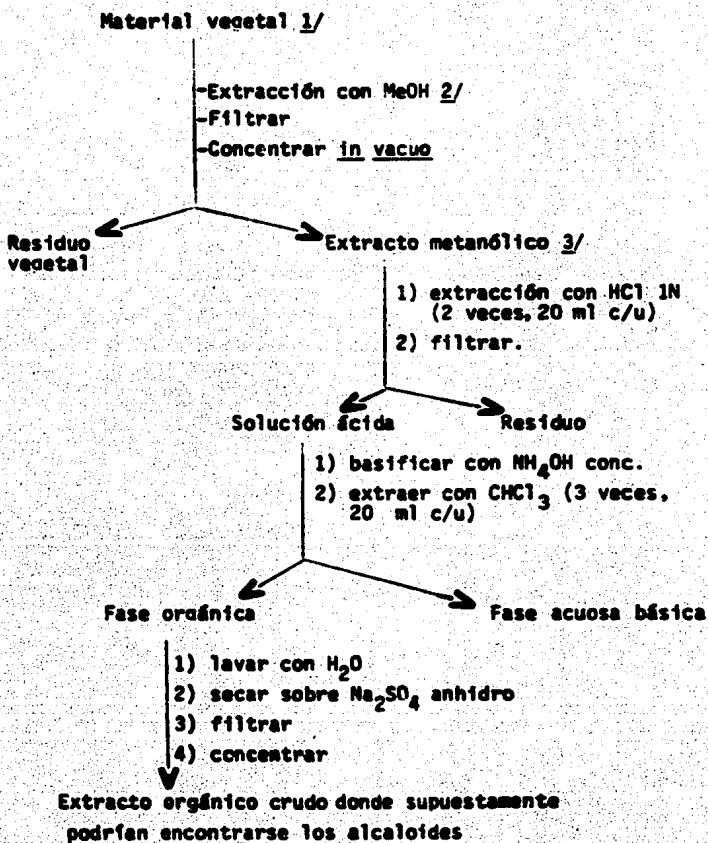
Análisis Cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (Silicagel 60 GF₂₅₄, Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos.

Los sistemas de eluyentes y reactivos reveladores empleados se encuentran resumidos en la Tabla 4.

Determinación de alcaloides

El material vegetal fue extraído con metanol según el procedimiento señalado en el Esquema 2. El extracto obtenido se procesó mediante una partición ácido-base y finalmente la determinación de los alcaloides se realizó con los reactivos de Drarendoff y Mauer (Harborne 1984)



- 1/ Cantidad de material vegetal 45.56 g.
2/ Extracción vía maceración (250 ml de MeOH-2 días).
3/ Cantidad total de extracto metanólico 5.7 g.

ESQUEMA 2. Preparación del extracto para la determinación de alcaloides en E. caribaeum Jacq.

Tabla 4. Sistema de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en cada fina.

<u>SISTEMA DE ELUYENTES</u>			
SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION	REFERENCIA
I	Isopropanol AcOEt-H ₂ O	83:11:6	Stahl, 1969
II	MeOH-CHCl ₃ -acetona-NH ₄ OH (c)	42:16.5:25:16.5	"
III	CHCl ₃ -MeOH	60:40	"
IV	Acetona-H ₂ O	90:10	"
V	Acetona-H ₂ O-CHCl ₃ -MeOH	75:5:10:10	"
VI	n-Propanol-H ₂ O	85:15	"
VII	CHCl ₃ -MeOH	90:10	"
VIII	n-Butanol-AcOH-H ₂ O	4:1:5	Kirchner, 1978
IX	Benceno-acetona	90:10	"
X	Benceno-AcOH-acetona	17:1:2	"
XI	Benceno-EtOH	92:8	"
XII	n-Butanol-AcOH-H ₂ O	6:2:2	Stahl, 1969
XIII	CHCl ₃	1	-
XIV	CHCl ₃ -EtOH	8:2	-

<u>AGENTES CROMOGENICOS*</u>		
REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Acido sulfúrico (A)	Acido sulfúrico 0.4N	Sánchez-Viesca, 1967
Sulfato cármico (B)	12 g de sulfato cármico 22.2 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 350 g de hielo	Stahl, 1969
Anisaldehido (C)	0.5 ml de anisaldehido 9 ml de etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 1.0 ml de ácido acético	Stahl, 1969
Dragendorff (D)	2.6 g de carbonato de bismuto básico 7 g de yoduro de sodio 25 ml de ácido acético glacial 89 ml de acetato de etilo; 0.5 ml de agua	Stahl, 1969

*En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas con luz U.V. (onda corta y larga).

Métodos de extracción y fraccionamiento

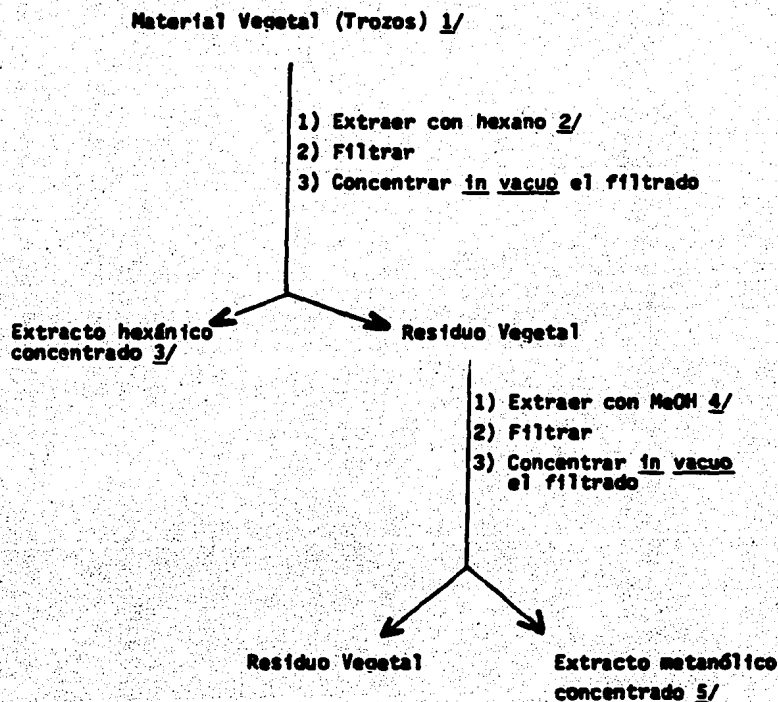
El material vegetal se extrajo según el procedimiento señalado en el Esquema 3.

Una parte del extracto metanólico total fué fraccionado siguiendo el procedimiento descrito en el Esquema 4.

Aislamiento y purificación de los compuestos

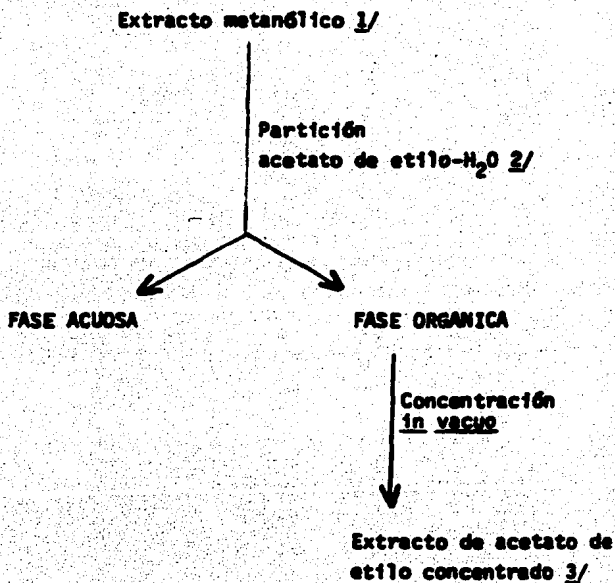
Aislamiento de manitol 1 (FC-1-2A): Del extracto metanólico de la corteza desengrasada en E. caribaeum Jacq. precipitó un polvo cristalino de color amarillo de $pf = 157^{\circ}C$, sabor dulce, soluble en agua e insoluble en disolventes orgánicos. El rendimiento total de este producto fué de 2.2668 g (0.050% en peso seco de la corteza). La sustancia fué identificada como manitol por comparación con una muestra auténtica.

Aislamiento del 5-O- β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, 2: (Ver página 46): De la fase orgánica procedente del proceso de partición acetato de etilo-agua, cristalizó espontáneamente un sólido que fué filtrado y lavado repetidas veces con una mezcla de acetona agua (9:1) y se obtuvo así un polvo de color blanco crema de $pf = 220-225^{\circ}C$. Este compuesto se recrystalizó repetidas veces de una mezcla de acetona-etanol, hasta punto de fusión constante. Así se obtuvieron 23.21 g de un compuesto cristalino de $pf = 228-$



- 1/ Cantidad de material vegetal 4.5 Kg.
- 2/ Extracción vía maceración (3 veces por periodos de 2 días cada vez, 19.5 l hexano).
- 3/ Cantidad total de extracto hexánico 11 g.
- 4/ Extracción vía maceración (3 veces por periodos de 2 días cada vez, 17.5 l de metanol).
- 5/ Cantidad total de extracto metanólico 1.3657 Kg.

ESQUEMA 3. Extracción de la corteza de E. caribaeum Jacq.



- 1/ 382 g de extracto metanólico se disolvieron en 650 ml de agua destilada-200 ml de NaOH.
- 2/ Cantidad de acetato de etilo: 2.5 l. Se usó un extractor líquido-líquido, para líquidos menos densos que el agua.
- 3/ Peso del extracto de acetato de etilo concentrado: 104.5 g.

ESQUEMA 4. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de E. caribaeum Jacq.

231°C, soluble en metanol, etanol y parcialmente soluble en agua; el rendimiento total de este producto fué de 1.84% en relación al peso seco de la corteza.

Identificación del compuesto 5-O- α ,D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, 4.

Determinación de datos físicos y espectroscópicos.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johnes, se reportan sin corregir; los espectros de IR fueron registrados en un instrumento Nicolet FT-JR5X de un solo haz, aparato Perkin-Elmer 599-BIR en pastilla de KBr por el Sr. Alejandro Correa de la compañía Negromex, S.A. Los espectros de RMN¹H y de RMN¹³C se determinaron en un espectrómetro FT-80 Varian utilizando como disolvente: CDCl₃, DMSO-d₆ y Piridina-d₅ 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 RMVG0 en el Instituto de Química de la UNAM. El análisis elemental del glicósido se efectuó en Galbraith Laboratories Inc.; Knoxville, Tenn, USA.

Prueba de Molisch para carbohidratos.

A una pequeña cantidad del compuesto 4, disuelto en 3 ml de agua destilada, se le adicionó 1 ml de solución reactivo de α -naftol (10% en etanol), seguidamente se agregaron por las paredes del tubo 2 go-

tas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos. La coloración observada era indicativa de una prueba positiva para carbohidratos.

Hidrólisis enzimática del compuesto 4.

A una solución de 0.5 mg del compuesto, 4, en 0.5 ml de agua destilada, se adicionó una pequeña cantidad de β -glicosidasa (Aldrich). La mezcla de reacción se dejó en reposo por 30 minutos a 28°C. El término de la hidrólisis fue verificado cromatográficamente, utilizando los sistemas I, III, IV, VII, XII y los agentes cromogénicos B y C de la Tabla 4.

Hidrólisis del compuesto 4 y su derivado metilado el 5-0- β ,D-galactosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, 5

Para efectuar la hidrólisis ácida de los compuestos glicosídicos 4 y 5, (ver página 52) se utilizaron, por cada 100 mg de producto, 10 ml de ácido clorhídrico 1N, la mezcla de reacción se refluxo durante 1 hora. En todos los casos el producto de reacción se separó por filtración, posteriormente se lavó repetidamente con agua destilada. El término de la hidrólisis se verificó de la misma manera que la hidrólisis enzimática.

En la Tabla 5 se indican los compuestos sometidos a hidrólisis ácida el rendimiento de los productos obtenidos y sus puntos de fusión.

Tabla 5. Hidrólisis ácida mediante HCl 1N de los compuestos 4 y 5

COMPUESTO*	PESO DEL COMPUESTO	PRODUCTO*	PESO DEL PRODUCTO HIDROLIZADO	PUNTO DE FUSION °C
5-O-β-D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenil coumarina, <u>4</u>	1 g	5,3',4'-trihidroxi 7-metoxi-4-fenil coumarina, <u>6</u>	600 mg	138-140
5-O-β-D-galactosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenil coumarina, <u>5</u>	100 mg	5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenil coumarina, <u>7</u>	32.2 mg	185-187

*Ver estructuras en la página 51.

Determinación de galactosa en los productos de
hidrólisis ácida y enzimática del compuesto 4

La presencia de galactosa fué determinada por medio de cromatografía en capa fina utilizando los sistemas I, III, IV, VII, XIV, VIII, y los agentes cromogénicos B, C de la Tabla 4.

Como patrones de referencia se utilizaron: arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manitol, sacarosa, sorbitol, sorbosa y xilosa.

Obtención de la 7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina, 8, a partir de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 6.

25 mg del compuesto, 6, se disolvieron en 10 ml de una solución metanólica de hidróxido de potasio al 5%. La mezcla de reacción se dejó en reposo por 3 horas a temperatura ambiente y después se neutralizó con 25 ml de ácido clorhídrico 1N, la solución acuosa se extrajo con 2 porciones de 50 ml de acetato de etilo y la fase orgánica resultante se lavó con 2 porciones de agua destilada de 10 ml c/u, finalmente se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo, obteniéndose 14.7 mg de, 8. (Ver página 52). El compuesto fué recrystalizado en EtOH, y era insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos (hexano, acetona, acetato de etilo, cloroformo, etanol, metanol); soluble en piridina y presentó un pf: >280°C.

Obtención de los derivados metilados.

Para obtener los derivados metilados, se utilizó una solución etérea de diazometano. Por cada 100 mg de producto a metilar se utilizaron 20 ml de una solución etérea 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-metilurea. En todos los casos el producto a metilar se disolvió en 10 ml de metanol.

La mezcla de reacción resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 horas. Cuando en los medios de reacción se formaron productos sólidos se separaron por filtración.

En la Tabla 6 se indican los compuestos que se metilaron, el rendimiento de los productos obtenidos y sus puntos de fusión.

Obtención de los derivados acetilados.

Para formar los derivados acetilados se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de muestra. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó durante 12 horas a temperatura ambiente y al cabo del tiempo señalado se procesó de manera habitual (Shriner, Fuson-Curtin, 1980).

En la Tabla 7 se resumen los compuestos que fueron acetilados, así como los rendimientos y puntos de fusión de los compuestos obtenidos.

Tabla 6.- Obtención de los derivados metilados de los compuestos 4, 6 y 8.

COMPUESTO ^a	PESO DEL COMPUESTO	PRODUCTO ^a	PESO DEL PRODUCTO METILADO	PUNTO DE FUSION °C
5-O- β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenil-coumarina, <u>4</u>	500 mg	5-O- β -galactosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>5</u>	507 mg	178-180°C
5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u>	100 mg	5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina, <u>9</u>	90 mg	166-168°C
7-metoxi-4'-5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'- δ -oxido-coumarina, <u>8</u>	8 mg	7,4',5'-trimetoxi-4-fenil-5,2'- δ -oxido-coumarina, <u>10</u>	-	258°C

^aVer estructuras en las páginas 51 y 52.

Tabla 7. Preparación de derivados acetilados de los compuestos 4, 6 y 7

COMPUESTO*	PESO DEL COMPUESTO	PRODUCTO *	PESO DEL PRODUCTO ACETILADO	PUNTO DE FUSION °C
5- <u>0</u> - β -D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenil-coumarina, <u>4</u>	210 mg	5- <u>0</u> - β -D-tetra-acetoxigalactosil-7-metoxi-3',4'-acetoxi-4-fenil-coumarina, <u>11</u>	210 mg	80-81°C
5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u>	100 mg	5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenil-coumarina, <u>12</u>	90 mg	169-170°
5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, <u>7</u>	32.2 mg	5-acetoxi-7,3',4'-trimetoxi-4-fenil-coumarina, <u>13</u>	30 mg	-

*Ver estructuras en las páginas 51 y 52.

RESULTADOS Y DISCUSION

Como resultado del estudio químico preliminar de la corteza de la Exostema caribaeum Jacq fué posible aislar e identificar el poli-alcohol manitol 1 y la 5-O- β -D-galactosil-7-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, un nuevo producto natural. La estructura del glucósido se estableció fundamentalmente por medio de métodos químicos y espectroscópicos y, será el objetivo fundamental de la siguiente discusión. Es de hacer notar que, con la finalidad de facilitar el seguimiento del presente trabajo los espectros del producto natural y sus derivados, algunas de las reacciones químicas realizadas y las estructuras de los diferentes derivados se ilustran en el apéndice al final de la tesis.

Varios experimentos preliminares con pequeñas cantidades de extracto metanólico de la corteza seca de la E. caribaeum Jacq., permitieron establecer que una partición acetato de etilo-agua, según se indicó en el Esquema 4, era la forma más efectiva de efectuar el fraccionamiento inicial. Este proceso permitió la separación en la fase acuosa de una gran cantidad de manitol y otras sustancias de naturaleza muy polar tales como azúcares y pigmentos.

El análisis cromatográfico en capa fina de la fracción acuosa, utilizando placas de gel de sílice los eluyentes I, II, III, IV, V, VI y XII de la Tabla 4 y como agentes reveladores los reactivos A, B, C, D, (Tabla 4) y luz U.V., indicó que dicha fracción contenía fundamentalmente azúcares. Es de hacer notar que en ningún caso se ob-

servó sustancias fluorescentes al visualizar las placas con luz U.V. onda larga. Por el contrario, al efectuar el análisis de la fracción orgánica mediante los sistemas III, IV, VII, IX, XI, XIII, XIV de la Tabla 4 y los agentes cromogénicos antes mencionados, previa visualización con lámpara U.V. (onda corta y onda larga), se detectaron numerosos compuestos, casi todos fluorescentes a la luz U.V. onda larga. Es de hacer notar que al revelar con el reactivo de Dragendorff (D) no se visualizó la coloración rojo naranja característica para alcaloides. Esta última observación fué consistente con los resultados negativos al realizar las pruebas de detección de alcaloides con los reactivos de Mayer y Dragendorff, según se indicó en el Esquema 3.

Al reducir el volumen del extracto de acetato de etilo obtenido del proceso de partición, precipitó en forma espontánea un polvo de color café, que luego de sucesivas lavadas con una mezcla de acetona-agua (9:2) y posteriores recristalizaciones de acetona-etanol (8:2) originó 23.21 g (1.84% de rendimiento en relación al peso seco de la planta) de un compuesto cristalino de color blanco crema; mp 228-231°C, ópticamente activo, soluble en metanol, parcialmente soluble en acetona, agua y etanol, e insoluble en cloroformo, acetato de etilo y benceno.

El comportamiento cromatográfico en capa fina del compuesto 4 (ver estructura en la página 45), en cinco sistemas cromatográficos se resume en la Tabla 8, y los datos físicos y espectroscópicos utilizados en su identificación se indican en la Tabla 12.

La alta solubilidad del compuesto 4 en disolventes polares así

Tabla 8. Comportamiento cromatográfico del compuesto 4.

AGENTE CROMOGENICO	ACIDO SULFURICO	SULFATO CERICO	REACTIVO DE DRAGENDORFF	U.V. ONDA LARGA	U.V. ONDA CORTA	LUZ VISIBLE	*
REACCION OBSERVADA	Café tenue	Café pardo	ninguna	fluorescencia azul	café rojizo	amarillo tenue	amarillo canario
SYSTEMA DE ELUYENTES	I	III	IV	VII	XIV		
R.F.	0.73	0.70	0.61	0.17	no migro		

*Calentamiento de la cromatoplaqa y observación posterior a la luz visible.

TABLA CON FALLAS DE ORIGEN

Tabla 12.- Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos 4, 11 y 5

	4-G-1-02-8-0-0-galactonil-7-metanil-3',6'-dihidranil-6-Fenilacetamido; 4	5-G-0-0-tetrapropionilactonil-7-metanil-3,6'-dihidranil-6-Fenilacetamido; 11	6-G-0-0-galactonil-7,3'-6'-trimetanol-6-Fenilacetamido; 5
PE °C	220-225	80-81	170-180
CMR (M ₂) (G)	200 (M ₂ , 100); 272 (OH), 237 (22.9); 117 (G); 60 (10)		
MR (M ₂) (M)	205, 220		
IR (M ₂) (cm ⁻¹)	3450, 3300-3000, 1710 (M), 1615.90, 1422.9, 1265.76, 1160-600, 1000.2, 946.26 Espectro A-1	2920.50-3121.20, 1783.00, 1610.17, 1566.07, 1432.00, 1017.525, 1370.12, 1263.66-1017.74, 903.73 Espectro A-7	3200-3050, 1650, 1730, 1620, 1600, 1600-1500, 1500-1120, 950-700 Espectro A-10
CMR ^{1H} (CMR ₂ , CMR ₃ -d ₂ , ppm)	9.75 (s, 2H, OH); 6.6-6.60 (m, 6H); 5.82 (s, 1H, H-3); 4.76 (d, 1H, J=7Hz, H-1'); 3.95 (s, 2H, -OH); 2.0-3.00 (m, 6H); 1.5 (s, 6H, CH ₃) Espectro A-1	7.15-7.55 (m, 2H); 6.05 (d, 1H, J=2.5Hz); 6.00 (d, 1H, J=2.5Hz); 5.05 (s, 1H, H-3); 5.00 (dd, 1H, J=8.0Hz); 3.16 (d, 1H, J=7Hz); 3.06 (dd, 1H, J=10.7Hz); 4.26 (s, 2H); 3.76 (s, 2H, -OH); 1.95, 2.0, 2.10, 2.20 (s, 18H, CH ₃) Espectro A-0	
CMR ^{13C} (CMR ₂ , glicolato-d ₂ , ppm)	6.08 (s, 2H, OH); 7.30 (d, 1H, J=2.5Hz); 7.20 (d, 1H, J=2.5Hz); 7.00 (d, 1H, J=2.5Hz); 6.92 (dd, 1H, J=4.2, 5.4Hz); 5.82 (s, 1H, H-3); 6.20 (s, 2H, H-1'); 6.00 (d, 1H, J=7Hz, H-1'); 4-4.5 (m, 6H); 1.67 (s, 3H, -CH ₃) Espectro A-0	7.10-7.25 (m, 2H); 6.05 (d, 1H, J=2.5Hz); 6.52 (d, 1H, J=2.5Hz); 6.10 (s, 1H, H-3); 3.05 (s, 2H, -OH); 5.35 (d, 1H, J=2Hz), 3.60-4.50 (m, 2H); 1.80, 1.52-1.60, 1.50 (s, 18H, -CH ₃); 1.05 (d, 1H, J=7Hz, H-1') Espectro 9	
CMR ^{19F} (CMR ₂ , CCl ₄ , ppm)			
CMR ^{1H} (CMR ₂ , CMR ₃ -d ₂ , CCl ₄ , ppm)			
CMR ^{13C} (CMR ₂ , CMR ₃ -d ₂ , ppm)	55.80 (s, C-2); 60.03 (t, C-0'); 60.10 (d, C-0'); 70.12 (s, C-1'); 72.0 (d, C-7'); 75.00 (s, C-1'); 80.72 (d, C-0); 85.50 (d, C-4); 100.12 (t, C-1'); 101.21 (s, C-2); 110.20 (d, C-2); 110.30 (d, C-2); 111.00 (s, C-2); 115.20 (s, C-2); 120.00 (t, C-1'); 140.1 (s, C-2'); 145.71 (s, C-0'); 151.00 (s, C-3); 156.00 (s, C-2); 156.30 (s, C-4); 156.52 (t, C-2); 162.70 (s, C-2) Espectro A-4 y A-0		6.50 (s, 2H); 6.50 (s, 2H); 5.00 (s, 1H, H-3); 6.50 (s, 1H, J=7Hz, H-1'); 3.00 (s, 2H, -OH); 3.00 (s, 2H, -OH); 3-3.0 (s, 18H) Espectro A-11

como resultados positivos de una prueba de Molisch sugirieron la posibilidad de una sustancia de naturaleza glicosídica. Las hidrólisis ácida (con HCl 1N) y enzimática (con una β glicosidasa) de una pequeña cantidad del producto natural confirmaron esta sospecha. Aun más, el análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis ácida y enzimática permitió detectar a la galactosa como único azúcar presente y a una aglicona cuyo compartamiento cromatográfico se resume en la Tabla 9. Para determinar cromatográficamente el azúcar se procedió como se especifica en la sección experimental y se emplearon los sistemas I, III, IV, VII, XIV y VIII y como agente revelador una solución reactivo de anisaldehído en ácido sulfúrico (Reactivo C). En todos los casos la galactosa se observó como un cromóforo de color verde pálido.

Inicialmente el análisis por espectrometría de masas permitió establecer para FC-I-68 un peso molecular de 300 u.m. que correspondía a la fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$. Sin embargo, ante la demostración de que el compuesto era un glicósido el espectro de masas no estaba indicando el verdadero ión molecular ya que es bien conocido que muchos de estos compuestos son inestables bajo las condiciones de operación de las espectrometrías de masa de los tipos impacto electrónico e ionización química, descomponiéndose habitualmente en sus partes componentes. Ante la imposibilidad de obtener un espectro de masas del tipo desorción de campo su fórmula molecular se determinó como $C_{22}H_{24}O_2$ mediante un análisis elemental. Esta fórmula permitía

Tabla 9. Comportamiento cromatográfico del compuesto, 6.

AGENTE CROMOGENICO	ACIDO SULFURICO	SULTATO CERICO	REACTIVO DE DRAGENDORFF	U.V. ONDA LARGA	U.V. ONDA CORTA	LUZ VISIBLE	*
REACCION OBSERVADA	Amarillo tenue	amarillo canario	Ninguna	Verde	Café rojizo	Amarillo	Amarillo canario
SISTEMAS DE ELUYENTES	I	III	IV	VII	XIV		
R.F.	0.83	0.87	0.85	0.54	0.58		

*Calentamiento de la cromatoplaqa y observación posterior a la luz visible.

un índice de insaturación de 12. Cabe destacar que el número de átomos de carbono observado en el espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado estaba en concordancia con el número de carbonos requeridos por la fórmula molecular.

El espectro IR (Espectro A-2) presentó bandas características para hidroxilos libres (3650 cm^{-1}) y combinados ($3334\text{-}3403\text{ cm}^{-1}$, ancha e intensa), carbonilo de α pirona (1711 cm^{-1}) y aromaticidad (1536 cm^{-1}).

Los espectros de RMN ^1H en piridina- d_5 y DMSO- d_6 (Espectro A-4 y A-3) confirmaron:

a) La naturaleza glicosídica del compuesto 4 ya que a δ 5.26 y δ 4.75, respectivamente, se observaron los dobletes ($J=7\text{Hz}$) característicos para el carbono anomérico del azúcar. Es más, el valor de la constante de acoplamiento indicó que el enlace era β -Q-glicosídico (Markham, 1982).

b) El carácter aromático debido a la presencia de señales por bajo de δ 6.5. En el caso específico del espectro en piridina- d_5 (Espectro A-4) se observó claramente un sistema ABC para un anillo aromático trisustituido (δ 6.92, dd, $J=8.25\text{Hz}$; δ 7.20, d, $J=8\text{ Hz}$; δ 7.38, d, $J=2.5\text{Hz}$) y dos señales dobles para dos protones meta relacionados, a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento, $J=2.5\text{Hz}$: (δ 6.57 y δ 7.08).

Así mismo, ambos espectros de RMN ^1H mostraron las señales restantes para la porción azucarada, un singulete característico para un metoxilo (δ 3.67, Espectro A-4, y a δ 3.85, Espectro A-3) y un singulete que integraba para un protón, atribuible a un hidrógeno vinílico,

alfa al grupo carbonilo en un sistema conjugado (δ 5.82, Espectro A-3, y δ 6.2, Espectro A-4).

La información anterior, en conjunto con los máximos de absorción registrados en el Espectro UV (Espectro A-1) (Donnelly, 1973) y la fluorescencia azul observada al visualizar las cromatoplaques bajo luz UV onda larga (ver Tabla 8), permitieron inferir a priori que el compuesto 4, era el β -D-galactósido de una 4-fenilcoumarina, cuya estructura base se indica en la Figura 2

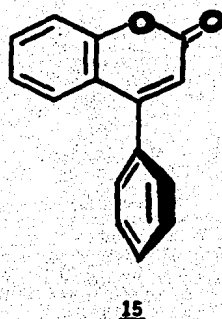
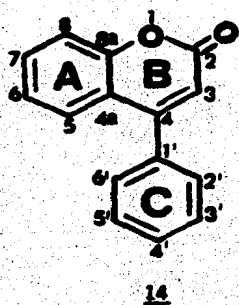


Figura 2.- Estructura base de una 4-fenilcoumarina

El análisis detallado de los espectros de RMN ^{13}C (Espectros A-5 y A-6) sustentaron aún más esta proposición ya que, de las 22 señales observadas, las resonancias a δ 101.12 (d), ($J_{\text{C-H}}=16\text{ Hz}$) 75.90 (d), 73. (c), 70.13 (d),

68.10 (d) y 60.43 (t), demostraron inequívocamente que la β -D-galactosa era el único carbohidrato presente en el compuesto (Chopin, 1977); en tanto que, las absorciones a δ 159.52 (s), 156.3 (s), 112.2 (d) confirmaban los carbonos C-2, C-4 y C-3 de la porción α pirona de una fenil coumarina (Pelter, 1976). Finalmente, de las 13 señales restantes el cuartero a δ 55.90 era fácilmente asignable a un grupo metoxilo y, las otras 12 a los carbonos aromáticos de esqueleto básico. La multiplicidad observada para estas últimas (Espectro A-6) indicó que uno de los anillos bencénicos debía ser trisustituido y el otro tetrasustituido. Los desplazamientos químicos de las resonancias a δ 162.7 (s), 156.00 (s), 155.44 (s), 145.71 (s) y 144.10 (s), sugirieron carbonos cuaternarios unidos a oxígenos; uno de estos carbonos debía corresponder a C-8_a de acuerdo a la estructura base de la Figura 2, otro al carbono aromático base del metoxilo y un tercero al carbono unido a la galactosa a través de un enlace β -O-glicosídico; los otros dos carbonos restantes debían ser, entonces, carbonos base de hidroxilos fenólicos a fin de satisfacer los requerimientos exigidos por la fórmula molecular en cuanto al número de oxígenos e hidrógenos se refiere. Es de hacer notar que el valor de la constante de acoplamiento ($^1J_{C-H}=160\text{Hz}$) observado para la señal del carbono anomérico era consistente con el enlace β -O-glicosídico.

La obtención de un derivado trimetilado, 5, y de otro hexaacetilado, 11, al tratar el glicósido con diazometano y anhídrido acético-piridina, respectivamente, (Figura A-2), demostró la naturaleza difenólica del producto natural (ver estructuras en la página 51).

En la Tabla 12 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados 5 y 11, antes mencionados.

El análisis global anterior, cuyo resultado se resume en la Figura 3, permitió proponer que el compuesto 4 era el D-galactósido de una metoxi-4-fenilcoumarina difenólica y que uno de los anillos aromáticos del esqueleto básico, 14, era trisustituido y el otro tetrasustituido.

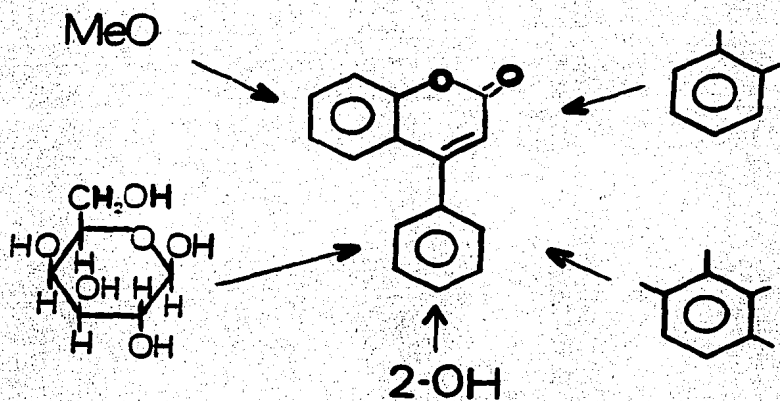


Figura 3.- Resumen parcial de la elucidación estructural del compuesto 4

Los análisis espectroscópicos y espectrométrico (Tabla 13) de la aglicona 6, obtenida por la hidrólisis ácida del glicósido (Figura A-1, página 51) fueron consistentes con las conclusiones parciales anteriores y, las observaciones más importantes de dicho análisis fueron las siguientes:

a) el espectro de masas (Espectro A-12) presentó los fragmentos característicos de una 4-fenilcoumarina, observándose iones importantes a m/z 300 (M^+ , pico base), a m/z 272 ($M^+ - CO$) y a m/z 257 ($M^+ - CO - 15$); el fragmento a 272 resulta de la pérdida de una molécula neutra

de monóxido de carbono para originar un catión benzofurano, tal como se indica en la Figura 4. (Donnelly, 1968).

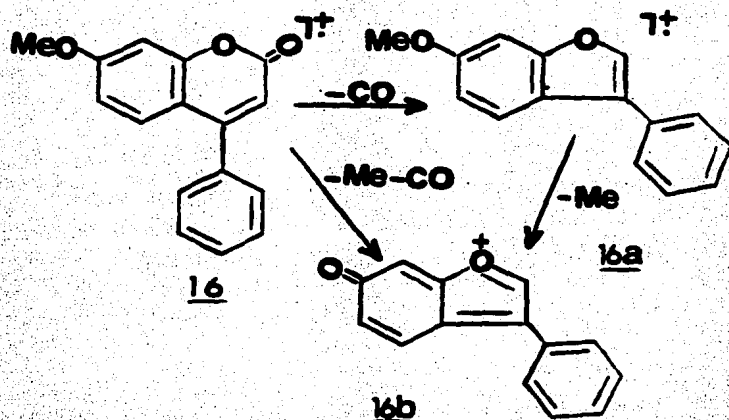


Figura 4. Patrón de fragmentación de una 4-Fenilcoumarina

b) el espectro de RMN¹³C (Espectro A-17) mostró señales para 16 átomos de carbono y difería fundamentalmente del espectro del glicósido en la ausencia de las señales características de la galactosa.

c) el espectro de U.V (Espectro A-13) mostró esencialmente los mismos máximos de absorción que el glicósido.

d) los espectros de RMN¹H en piridina-d₅ y DMSO-d₆-CDCl₃ (Espectros A-16 y A-15) presentaron al igual que los correspondientes del glicósido:

d.1 El singulete del metoxilo (δ 3.70 en el espectro en piridina- d_5 y δ 3.85 en el espectro en DMSO- d_6 - $CDCl_3$).

d.2 El singulete correspondiente a H-3 (δ 6.06 y δ 5.88 respectivamente).

d.3 El sistema ABC de un anillo aromático trisustituido (δ 6.90, dd, $J=8, 2.5$ Hz; δ 7.06, d, $J=8$ Hz; δ 7.24, d, $J=2.5$ Hz en el caso del espectro en piridina- d_5)

d.4 El sistema AB formado por los dos protones meta relacionados del anillo tetrasustituido (δ 6.48 y 6.58, d, $J=2.5$ Hz en piridina- d_5 y δ 6.25 y 6.40, d, $J=2.5$ Hz en DMSO- d_6 - $CDCl_3$)

La aglicona 6, por tratamiento con diazometano originó el derivado tetrametilado 9 (Figura A-4), en tanto que la acetilación con anhídrido acético y piridina en las condiciones usuales originó un derivado triacetilado, 12, (Figura A-4). Estos resultados indicaron que la aglicona poseía tres hidroxilos fenólicos libres. Las constantes físicas y espectroscópicas de estos derivados se resumen también en la Tabla 13.

Los desplazamientos a campo más alto observados, por una parte para la señal de uno de los metoxilos (δ 3.48) en el espectro de RMN 1H del derivado tetrametilado 9 (Tabla 13, Espectro A-23) y, por la otra, para las absorciones de los metilos de acetato (δ 1.59 y δ 1.42) en el espectros de RMN 1H de los derivados triacetilado 12 y monoacetilado 13 (Figura A-3), respectivamente, sugirieron que en la posición C-5 de la aglicona se encontraba un hidroxilo fenólico libre (Tabla 13, Espectros A-19 y A-26). (ver estructuras de 9, 12 y 13 en la página 52).

Como en los derivados 11, 5 y 7 (este último obtenido al hidrolizar, 5) no se observó el efecto diamagnético en ninguna de las señales correspondientes a los metilos de los grupos metoxi ó acetoxi. Era obvio concluir que el enlace β -0- glicósido se formaba entre el hidroxilo del carbono anomérico de la galactosa y un hidroxilo fenólico ubicado en el carbono C-5 de la 4-fenilcoumarina.

Las absorciones, a campos más altos de los usuales, observados para los metilos de los grupos funcionales -OMe y -OAc de los derivados 9, 12 y 13, se debe a que cualquier sustituyente en la posición C-5 de una 4-fenilcoumarina del tipo señalado en la estructura 14 (Figura 2) se encuentra protegido por la nube electrónica del anillo de la posición C-4; este fenilo se encuentra perpendicular al plano de la benzopirona, de tal manera que el sustituyente en C-5 estará siempre sobre la nube electrónica del mismo (ver, 15, Figura 2).

La ubicación inequívoca de un grupo hidroxilo en la posición C-5 de la aglicona, 6, así como, los patrones de acoplamiento observados para los protones del sistema ABC del anillo aromático trisustituido (Espectros A-15 y A-16) y del sistema AB del anillo aromático tetrasustituido, permitieron concluir, por una parte, que el anillo C debía ser el trisustituido y, por la otra, que al anillo A era 5,7 disustituido. En el caso de una estructura trisustituida en el anillo A, en la cual el grupo hidroxilo debía estar en la posición C-5 se hubiesen esperado tres interacciones orto y dos meta; el patrón de acoplamiento antes señalado no era compatible con el observado en los espectros de RMN¹H de la aglico-

na ya que, solo habian dos interacciones orto y dos meta. Así mismo, el par de dobletes ($J=2.5\text{Hz}$) a δ 6.48 y 6.58, indicativos de protones meta relacionados, eran consistentes con la disposición de otro sustituyente en la posición C-7 del anillo A.

En relación a la naturaleza del sustituyente en C-7, las dos alternativas señaladas en la Figura 5 podfan ser consideradas.

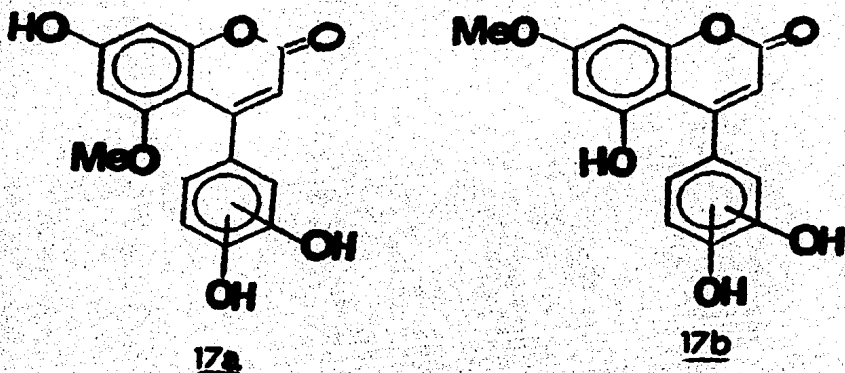


Figura 5.- Alternativas en relación a la naturaleza del sustituyente en C-7 para la aglicona 6

La posibilidad 17a de la Figura 5 se descartó al analizar la diferencia de los desplazamientos químicos de los protones H-6 y H-8 de la aglicona 6, con respecto a aquellos correspondientes del derivado acetilado 12. Para H-6 se observó un $\Delta=+0.57$ ($\delta 6.82-\delta 6.25=0.57$, Espectros A-19 y A-15 y Tabla 13), en tanto que para H-8 la diferencia fue mucho menor

($\Delta = 0.018$, Espectros A-19 y A-15, Tabla 13). Estos valores indicaron que sólo H-6 se desprotege al acetilar y que, por lo tanto en C-7 debía estar ubicado el grupo metoxilo (Estructura 17b de la Figura 5). Es de hacer notar que estos resultados fueron congruentes con los cambios de desplazamiento químico inducidos por la piridina (Tabla 10).

Respecto al patrón de sustitución del anillo C, eran factibles las tres posibilidades que se indican en la Figura 6.

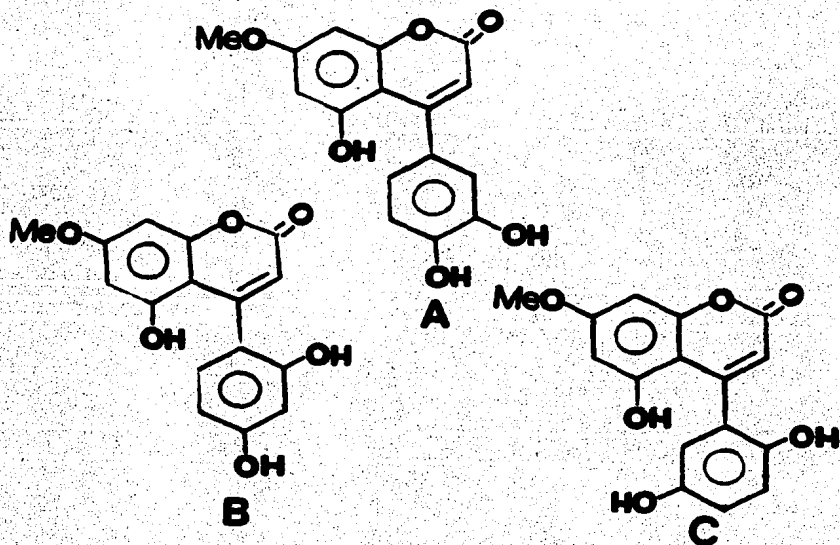


Figura 6. Posibilidades estructurales para la aglicona 6

Las estructuras B y C de la Figura 6 se descartaron en base a las siguientes evidencias:

Tabla 10.- Desplazamientos inducidos por la piridina en los protones aromáticos de la Aglicona 6.

COMPUESTO	δ DMSO- d_6 -CDCl $_3$	δ Piridina- d_5	Δ^*
5, 3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, <u>6</u> .	6.25 d	6.58	0.33
	6.40 d	6.48	0.08
	6.87 d	7.06	0.19
	6.86 d	7.24	0.38
	6.72 dd	6.90	0.18

* $\Delta = \delta$ DMSO- d_6 -CDCl $_3$ - δ piridina- d_5

a.- Al tratar en compuesto 6 en medio ácido, de acuerdo a las condiciones previamente reportadas, no fué posible obtener ningún derivado del tipo 4-fenil-5 ,2'-oxido-coumarina (Bhanu et al., 1972).

b.- Los valores de los cambios de desplazamiento químico inducidos por la piridina, en el espectro de RMN ^1H de la aglicona 6, no corresponden en ningún caso a la desprotección que se esperaba para un protón orto a dos grupos hidroxilos (caso de la estructura B). En la Tabla 10 se indican los cambios observados para los protones del sistema ABC por efecto de la piridina.

c.- La comparación de los desplazamientos químicos calculados para los carbonos de las estructuras A y C de la Figura 6, con los observados en el Espectro A-17 del compuesto 6, permitieron descartar también a la estructura C. Los cálculos mencionados se hicieron en base a la teoría del desplazamiento químico utilizando como modelo la 7-metoxi-4-fenilcoumarina (Pelter, 1976) y los resultados se ilustran en la Tabla 11.

Es de hacer notar que aunque las constantes espectroscópicas del compuesto 6 eran casi idénticas a las previamente reportadas por Reher et al para la estructura C, los puntos de fusión de ambos compuestos presentan una notable diferencia. Así mismo, vale la pena mencionar que en el trabajo descrito por los autores antes señalados no se especifican claramente los criterios que sustentaron el patrón de sustitución propuesto para la estructura C.

En base a la discusión anterior era obvio que la estructura A

Tabla 11.- Comparación de los desplazamientos químicos calculados para las posibilidades estructurales "A" y "C" de la Figura 6, con los observados para el compuesto 6.

CARBONO	COMPUESTO 6 (δ)	ESTRUCTURA "C" (δ)	ESTRUCTURA "A" (δ)	MODELO*(δ)
2	160.00 s	160.90 s	160.90 s	160.90 s
3	110.64 d	111.73 d	111.73 d	111.73 d
4	156.81 s	155.84 s	155.84 s	155.84 s
4a	102.02 s	99.70 s	99.70 s	112.40 s
5	156.20 s	154.70 s	154.70 s	127.80 d
6	98.30 d	99.40 d	99.40 d	112.10 d
7	162.70 s	162.61 s	162.61 s	162.61 s
8	92.90 d	93.72 d	93.72 d	101.02 d
8a	157.03 s	157.00 s	157.00 s	155.60 s
1'	130.44 s	124.12 s	129.52 s	135.42 s
2'	114.72 d	147.80 s	116.90 d	128.20 d
3'	144.20 s	117.34 d	142.84 s	128.64 d
4'	148.70 s	118.10 d	143.60 s	129.40 d
5'	115.60 d	148.24 s	117.34 d	128.64 d
6'	118.94 d	117.40 d	122.80 d	128.70 d
OCH ₃	55.60 c	55.70 c	55.70 c	55.70 c

* 7-Metoxi-4-fenilcoumarina

correspondía a la aglicona 6. Dos evidencias adicionales que sustentaban aún más esta proposición fueron las siguientes:

1. Las constantes físicas y espectroscópicas de la aglicona totalmente metilada, 9, resultaron ser idénticas a las previamente reportadas por Monache et. al. para la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenil-coumarina (Monache et. al., 1983).

2. El tratamiento de la aglicona 6 con KOH metanólico permitió obtener la 7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-óxido-coumarina, 8, cuyos parámetros físicos y espectroscópicos fueron similares a los previamente reportados (Rehe: et. al., 1984). Es de hacer destacar que la transformación de 6 a 8 en condiciones básicas representa un nuevo método para obtener 4-fenil-5,2'-óxido-coumarinas a partir de 4-fenilcoumarinas. Bhanu et. al. hicieron esta transformación tratando varias 4-fenilcoumarinas oxigenadas en C-5 y C-2' con HI. En ese caso la formación del anillo heterocíclico involucra la pérdida de una molécula de agua (Bhanu et. al., 1972) entre los hidroxilos en C-5 y C-2'.

Sin embargo, en condiciones básicas no es necesario tener sustituyentes oxigenados en C-2' y la reacción en estas condiciones puede proceder vía dehidrogenación oxidativa o bien, un proceso de acoplamiento fenólico.

Finalmente cabe destacar que muy posiblemente la biosíntesis de 5,2'-óxido-coumarinas a partir de 4-fenilcoumarinas se realizó mediante un proceso similar.

En conclusión la información presentada en la presente discusión permitió concluir que el nuevo producto natural era el 5-O- β -D-galactosil-7-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, cuya estructura se ilustra en la Figura 7.

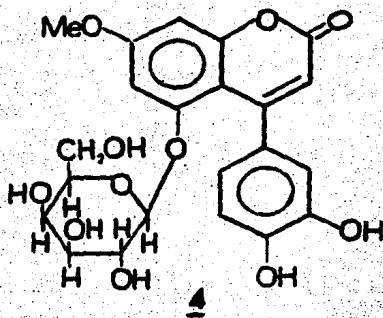


Figura 7. Estructura del glicósido 4.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1.- Se realizó el estudio fitoquímico preliminar de la Exostema caribaeum Jacq., planta de amplio uso en la medicina popular mexicana.
- 2.- Del extracto metanólico de la corteza de la planta se aisló y caracterizó el polialcohol manitol, el cual es particularmente abundante en muchas especies de la familia Rubiaceae.
- 3.- De la fracción orgánica resultante de el proceso de partición acetato de etilo-agua del extracto metanólico de la corteza se aisló un nuevo metabolito secundario, el cual fué identificado como 5-O-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina.
- 4.- La 5-O-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina, representa la primera sustancia de naturaleza glicosídica descrita dentro del grupo de las 4-fenilcoumarinas.
- 5.- El patrón de sustitución encontrado para los anillos A y C es similar a los previamente reportados para otras fenilcoumarinas de Rubiaceae. Esta información podría eventualmente ser de importancia quimiotaxonomica, ya que las 4-fenilcoumarinas presentes en otras familias (Leguminosae y Gutiferae) son monosustituidas o carecen de sustitución en el anillo C.
- 6.- El tratamiento con KOH metanólico a temperatura ambiente de una 5-hidroxi-4-fenilcoumarina, representa un nuevo método para la obtención de una 4-fenil-5,2'-dixidocoumarina. Esta transformación, posiblemente biomimética, puede proceder vía una dehidrogenación oxidativa o bien, por un proceso de acoplamiento fenólico.
- 7.- La presencia del glicósido a tan alta concentración no permite inferir que sea el responsable de la actividad antimalárica que se atribuye a la planta.

BIBLIOGRAFIA

- Aiello, A.A., Journal of The Arnold Arboretum, 60, 38 (1979).
- Bhanu S., T. Soroja, T.R. Sishadri and S.K. Mukerjee, Indian J. Chem., 10, 577 (1977).
- Crombie, L., Games, D.E., Journal Chemical Soc., 1967, 2553 (1967).
- Chopin, J., Dellamonica, G., Besson E., Phytochemistry, 16, 1999 (1977).
- De Lima R., Monache D.G., Botta B., Rev. Lat. Quimica, 13, 61 (1982).
- De Marco P.V., Farkas E., Doddrell D., J. of The American Chem. Soc., 90, 5480 (1968).
- Donnelly B.J., Donnelly D.M.X., O'Sullivan A.M., Tetrahedron, 24, 2617 (1968).
- Donnelly D.M.S., O'Reilly J., Thompson J., Phytochemistry, 11, 823 (1972).
- Donnelly D.M.X., Thompson J., J.C.S. Perkin I, 1973, 1737 (1973).
- Filho R.B., Gottlieb O.R., Mourao A.P., Phytochemistry, 14, 261 (1975).
- Grover K.S., Jain A.C., Seshadry T.R., Tetrahedron, 20, 555 (1964).
- Hegnauer R., Chemotaxonomic der Pflanzen. Birkhauser Verlag, Basel Stuttgart, 6, 130 (1973).

- Harborne, J.B. and Mabry, T.J., The Flavonoides, Advances in Research, Chapman and Hall, London, 1982, 801.
- Kirchner, J.G., Thin Layer Chromatography. 2a. Edición, John Wiley & Sons, 801, (1978).
- Krebs, Griesinger, Arzneimitt. Forsch., 10, 32 (1960).
- Monache G.D., Botta B., Monache F.D., Phytochemistry, 24, 1365 (1985).
- Monache G.D., Botta B., De Lima R.A., Phytochemistry, 23, 1813 (1984).
- Monache G.D., Botta B. Neto A.S., De Lima R.A., Phytochemistry, 22, 1657 (1983).
- Mukerjee S.K., Saroja T., Seshadri T.R., Tetrahedron, 24, 6527 (1968).
- Nassar C., Maryssia, Saenz R., Jose A., Rev. Biol. Trop., 28, 1 (1980).
- Paris R.A., Michel P., Ann. Pharm. Franc., 11, 81 (1953).
- Pelter A., Ward R.S., Gray T., J.C.S. Perkin I, 1976, 2475 (1976).
- Polhill R.M. Flora of Tropical East Africa Rubiaceae (Part I). Crown Agents for Oversea Governments and Administrations London, 1976, pp. 414.
- Raheer G., Kraus V., Phytochemistry, 22, 1524 (1983).
- Raheer G., J. of Natural Products, 47, 172 (1984).
- Roig J.T., Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica. Instituto del Libro La Habana, 1974, 273.

Sánchez V.F., Dfaz E., Chávez G., Ciencia Max., XXV, 135 (1967).

Sánchez V.F., Ciencia Max., XXVIII, 1, 33 (1969).

Sánchez V.F., Phytochemistry, 8, 1821 (1969).

Seligmann O., Wagner H., Tetrahedron, 34, 3299 (1978).

Shriner, Fuson, Curtin, Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Limusa, México, (1980).

Stahl E., Thin Layer Chromatography, 2a. Edición, 1969, pp. 833-834

Standley, Williams. Flora of Guatemala. Field Museum of Natural History, 24, 69-70 (1975).

Tetto O.S., J. of Pharmaceutical Sci., 53; 231 (1964).

Mehrtl, Wirthin. Interpretation of carbon-13 NMR spectra, Heyden and Son LTD, London, 1978.

A P E N D I C E

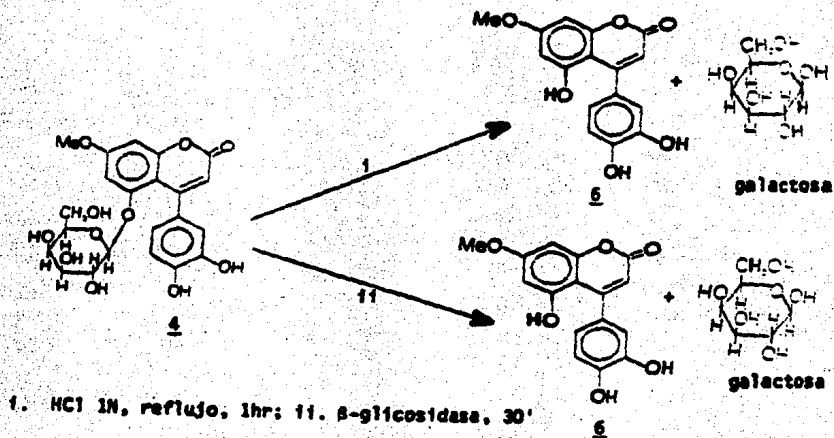


Figura A-1.- Hidrolisis ácida y enzimática del compuesto 4

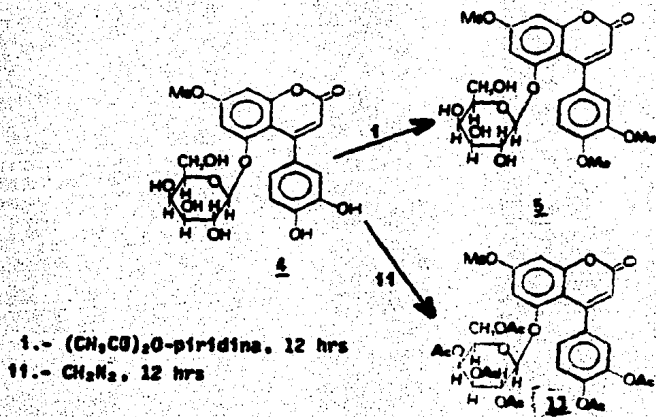


Figura A-2.- Obtención de los derivados acetilado, 11, y metilado 5.

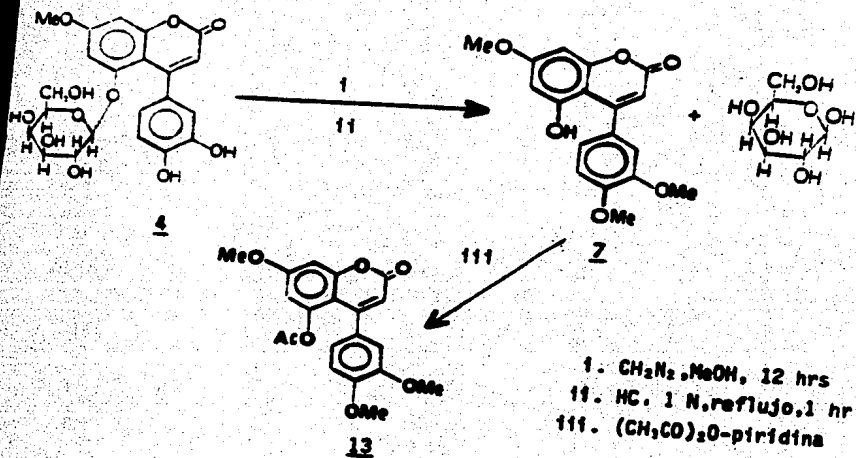


Figura A-3.- Obtención de los derivados **7** y **13**

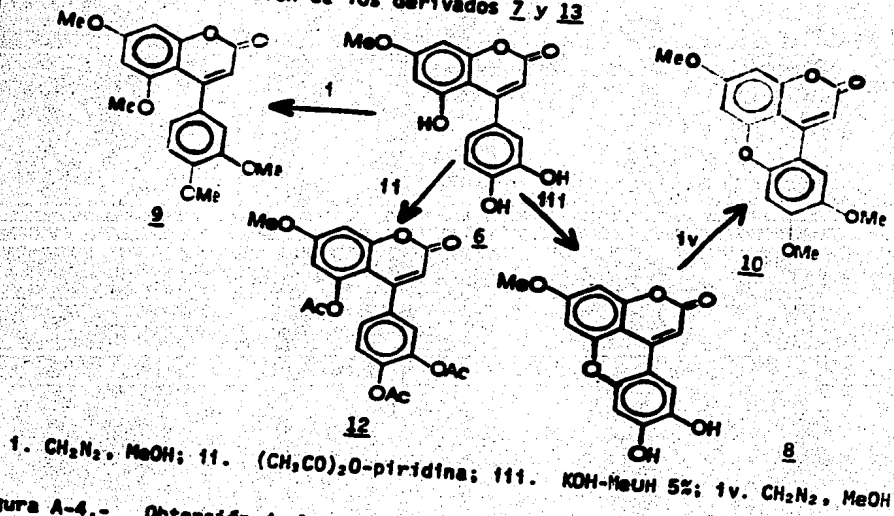
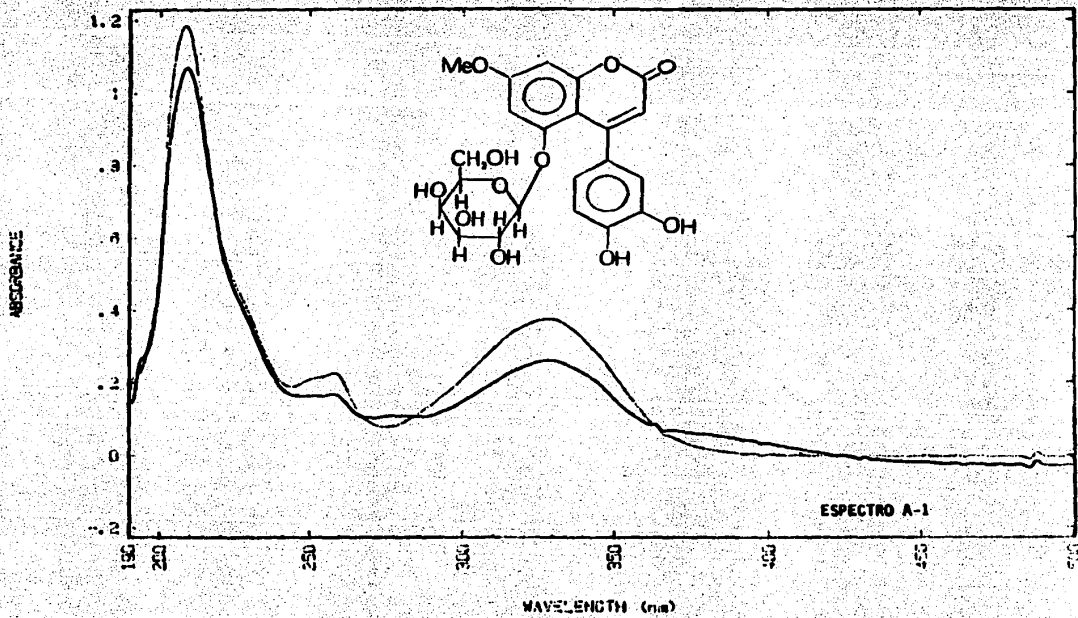
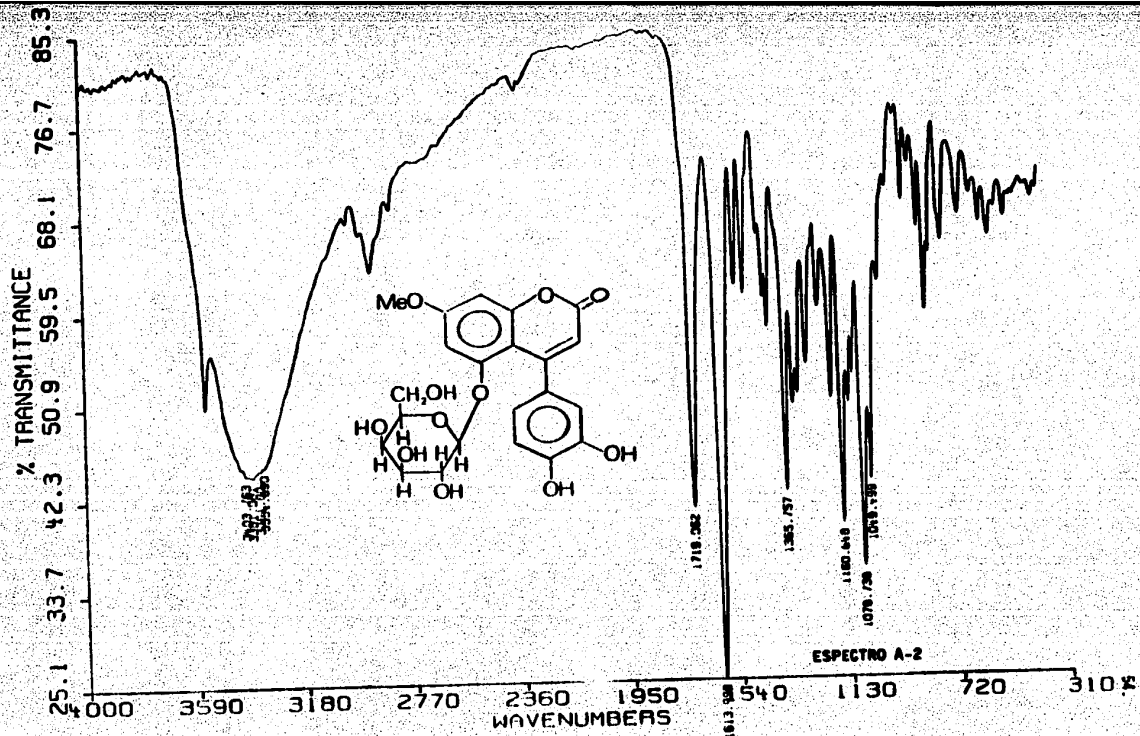
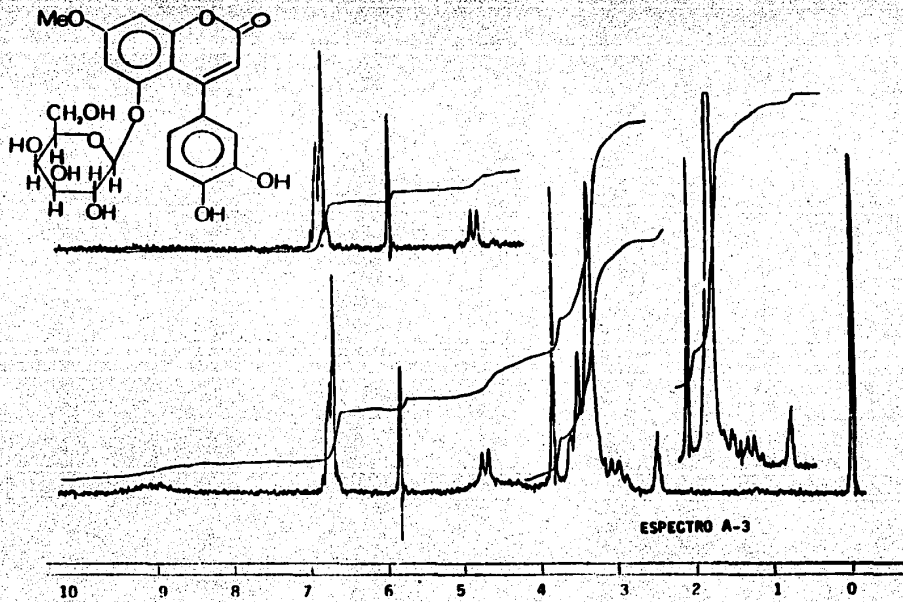
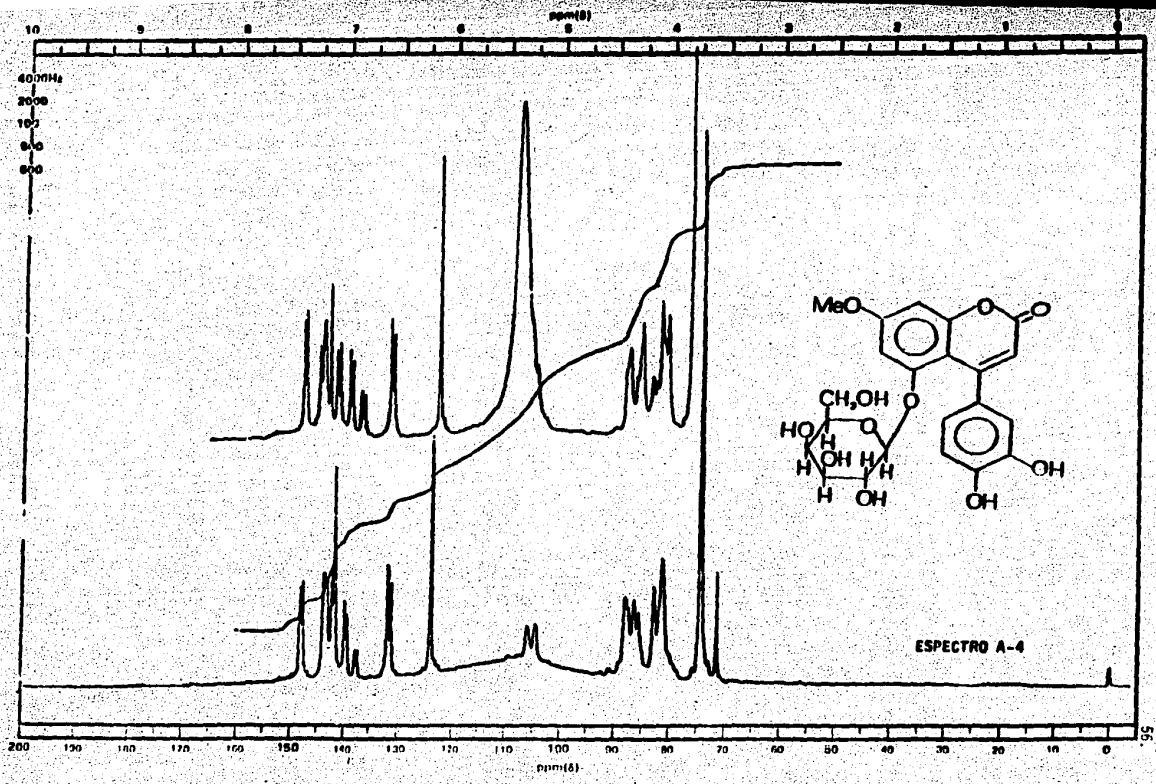


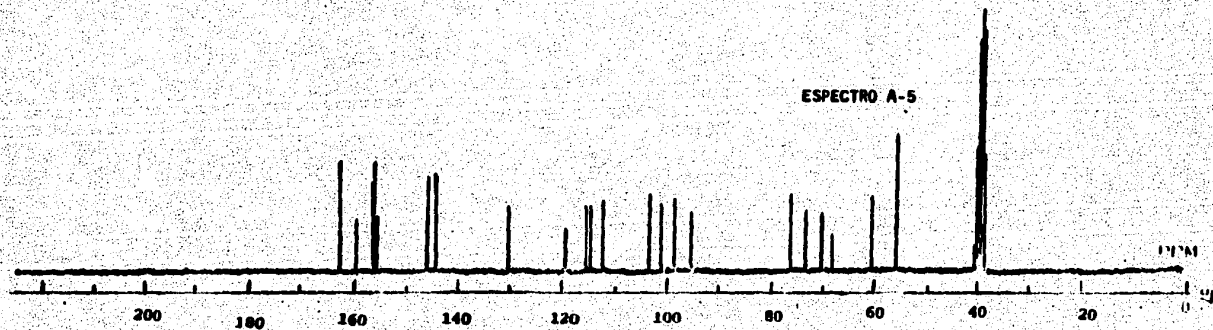
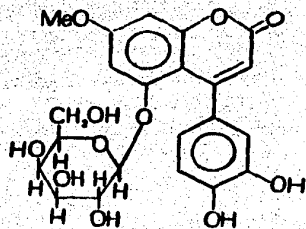
Figura A-4.- Obtención de los derivados **9**, **12**, **10** y **8**.

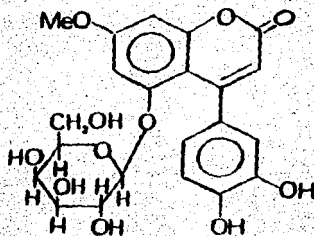




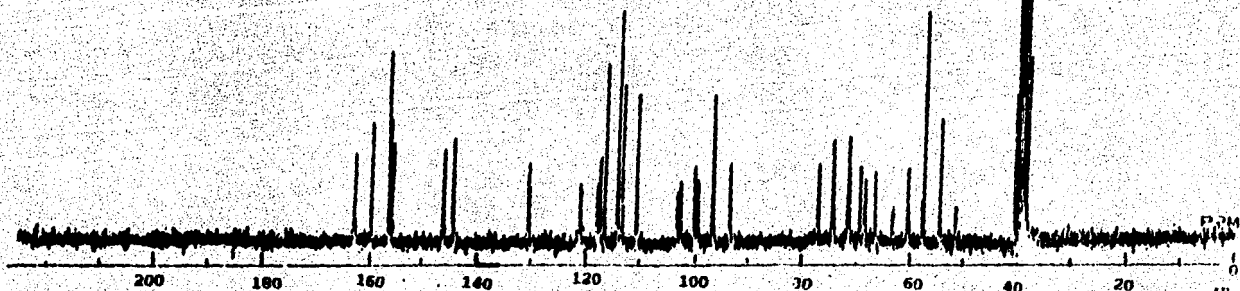




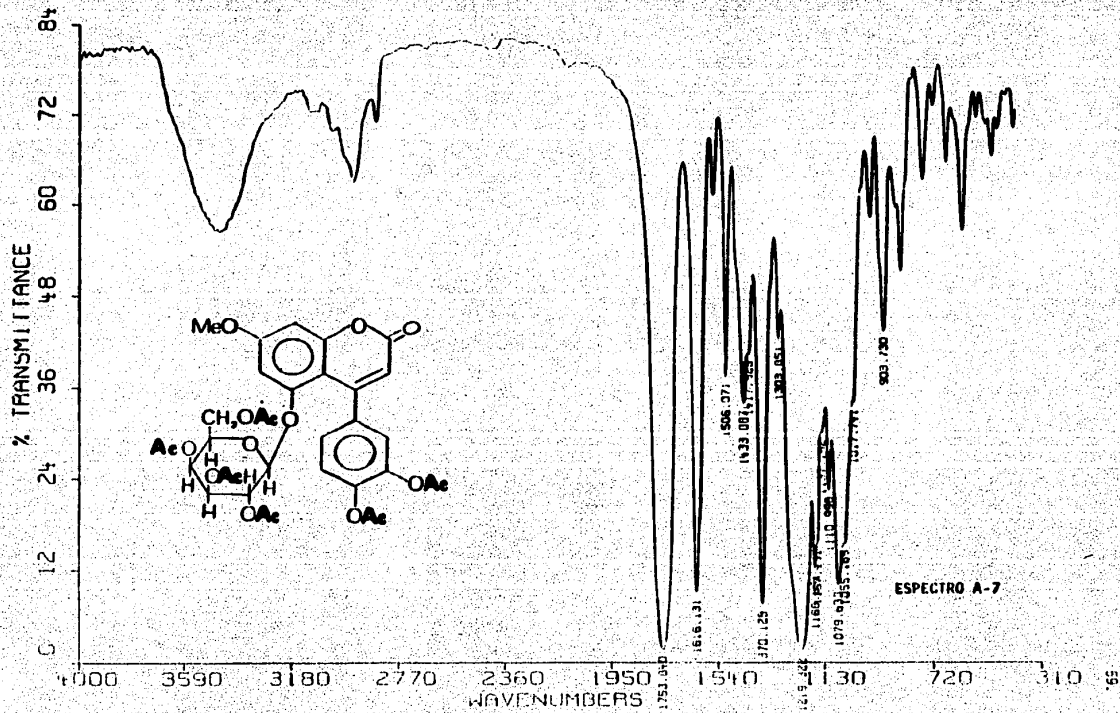


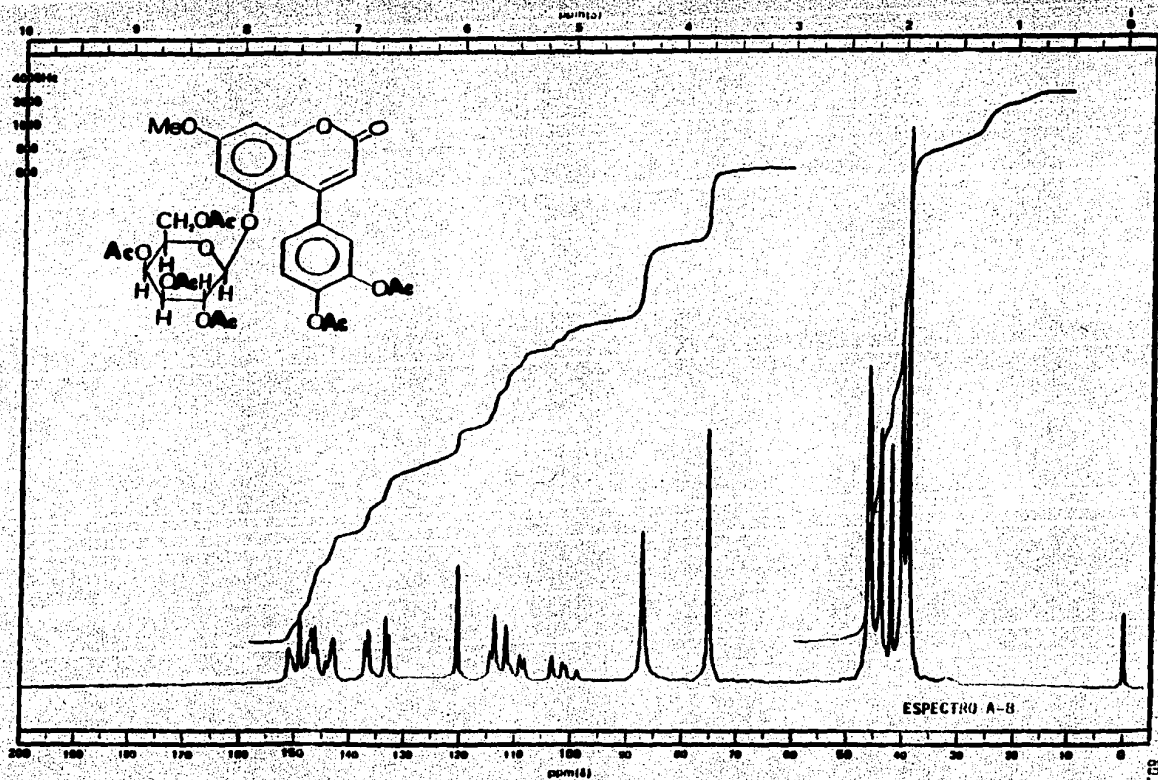


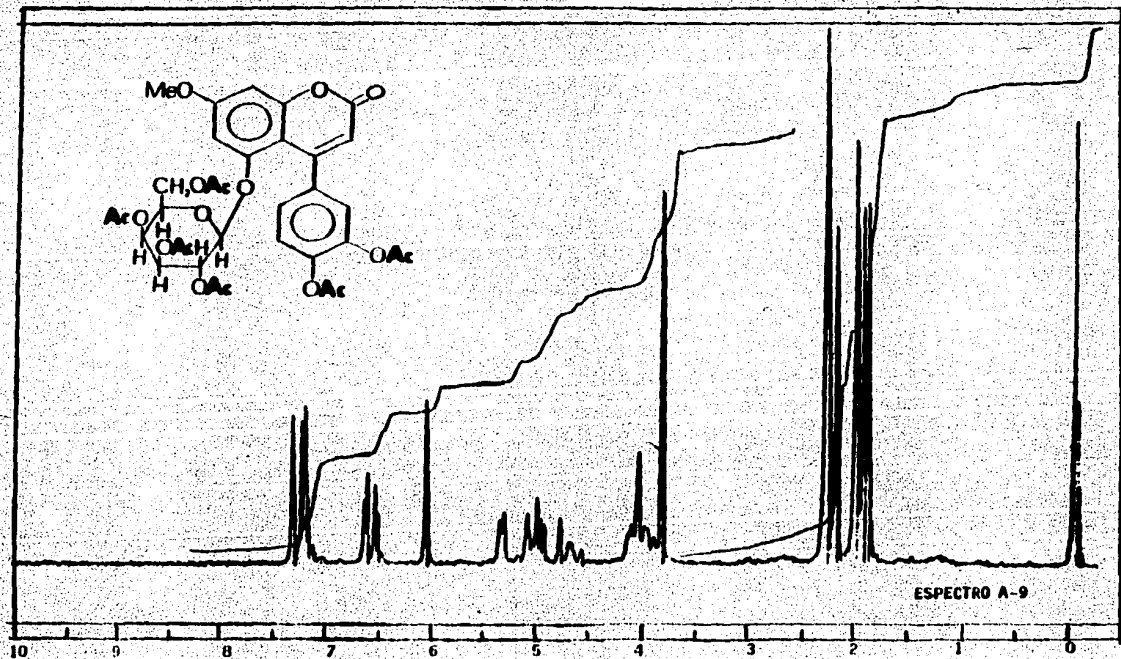
ESPECTRO A-6

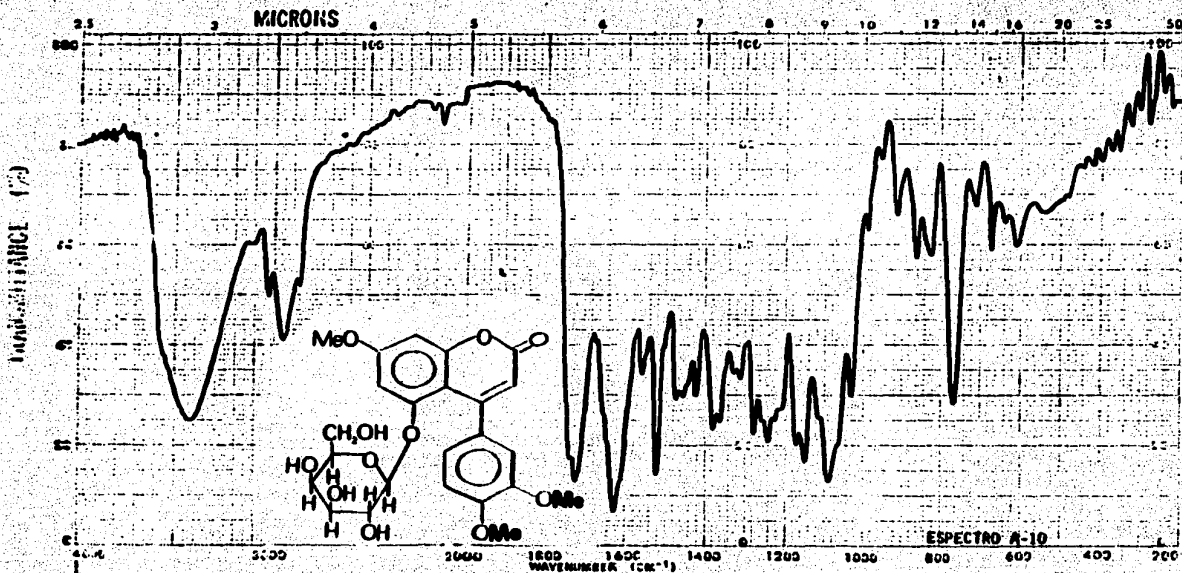


F.7M

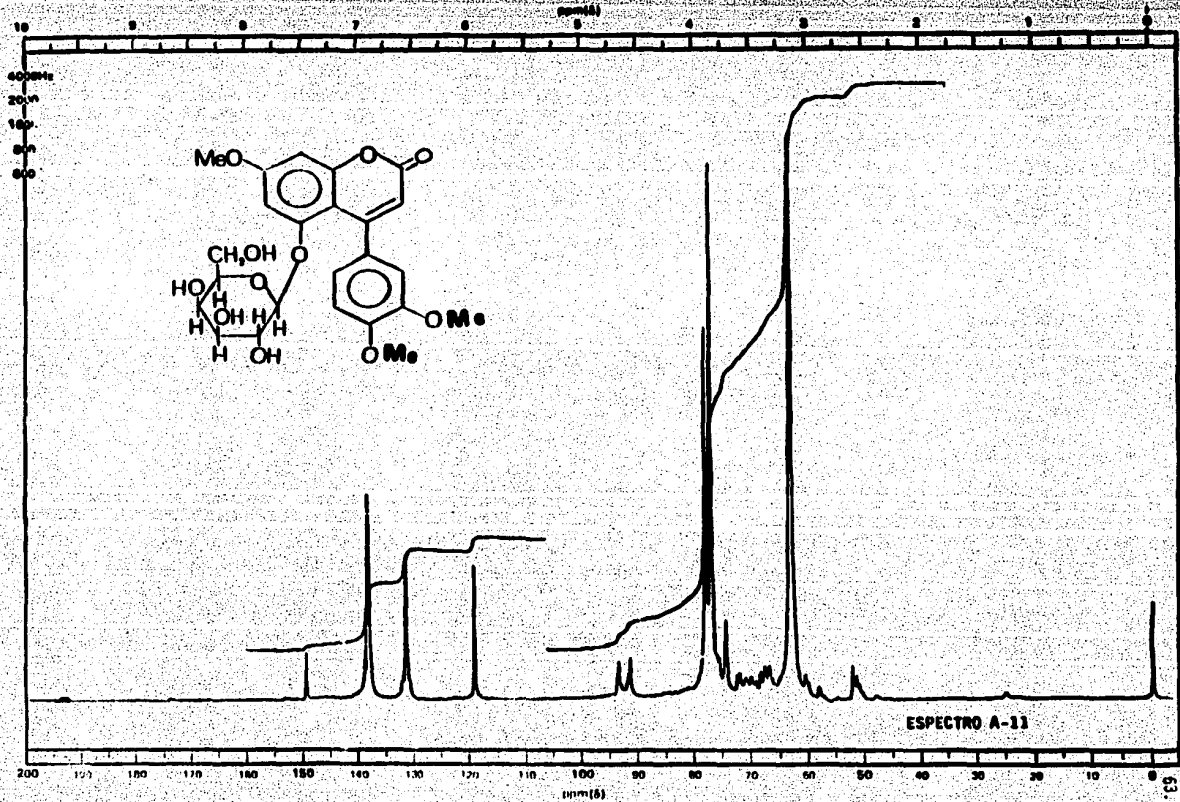




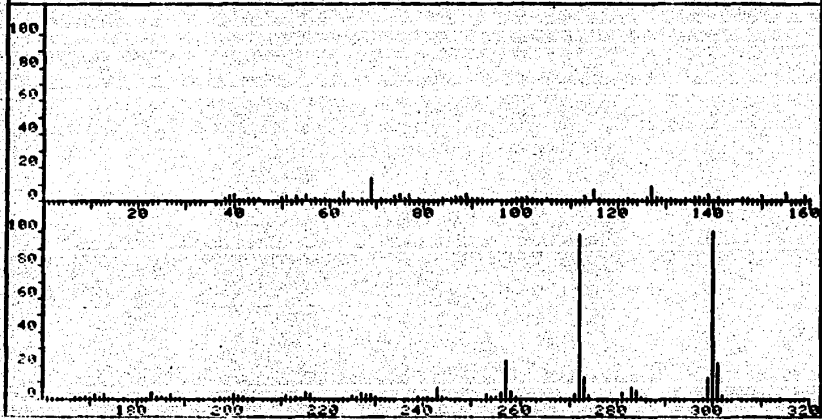




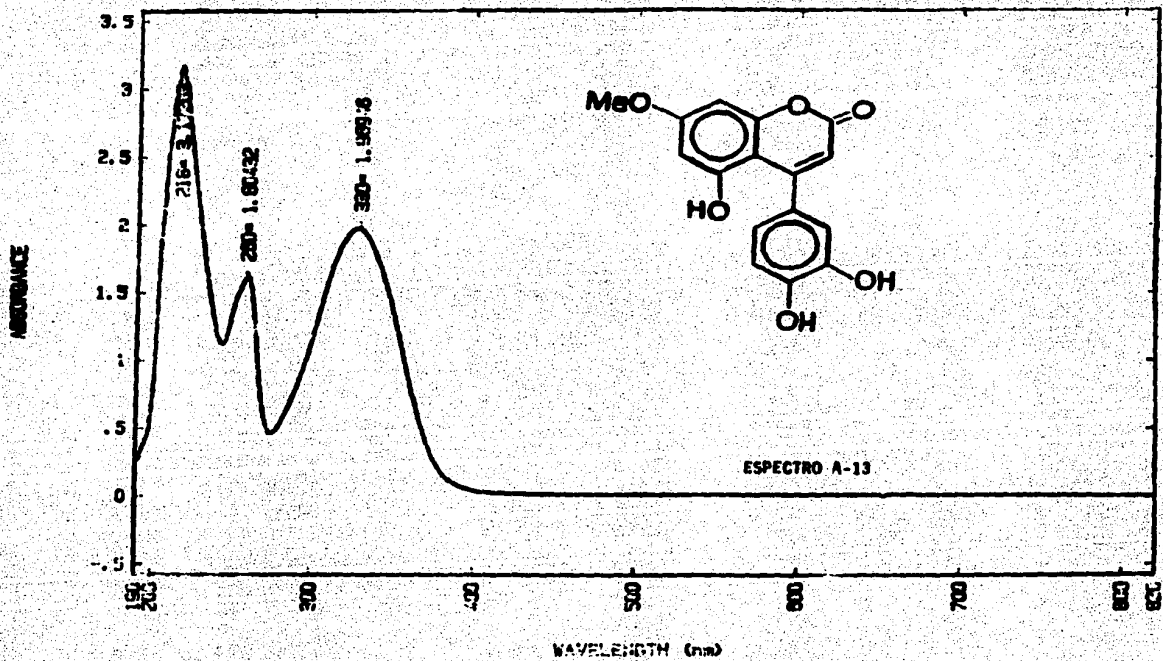
SAMPLE	SOLVENT	SCAN	SINGLE B.	REMARKS <i>pellets</i>
	CONC.	NIT	T.D. SPEED	
SPECIM. N.	CELL PATH	OPERATOR	ORD. EXP.	
	REFERENCE	DATE	T.COUNT	
	PERKIN ELMER	NO. 5102-1000	RT. NO. 15013	

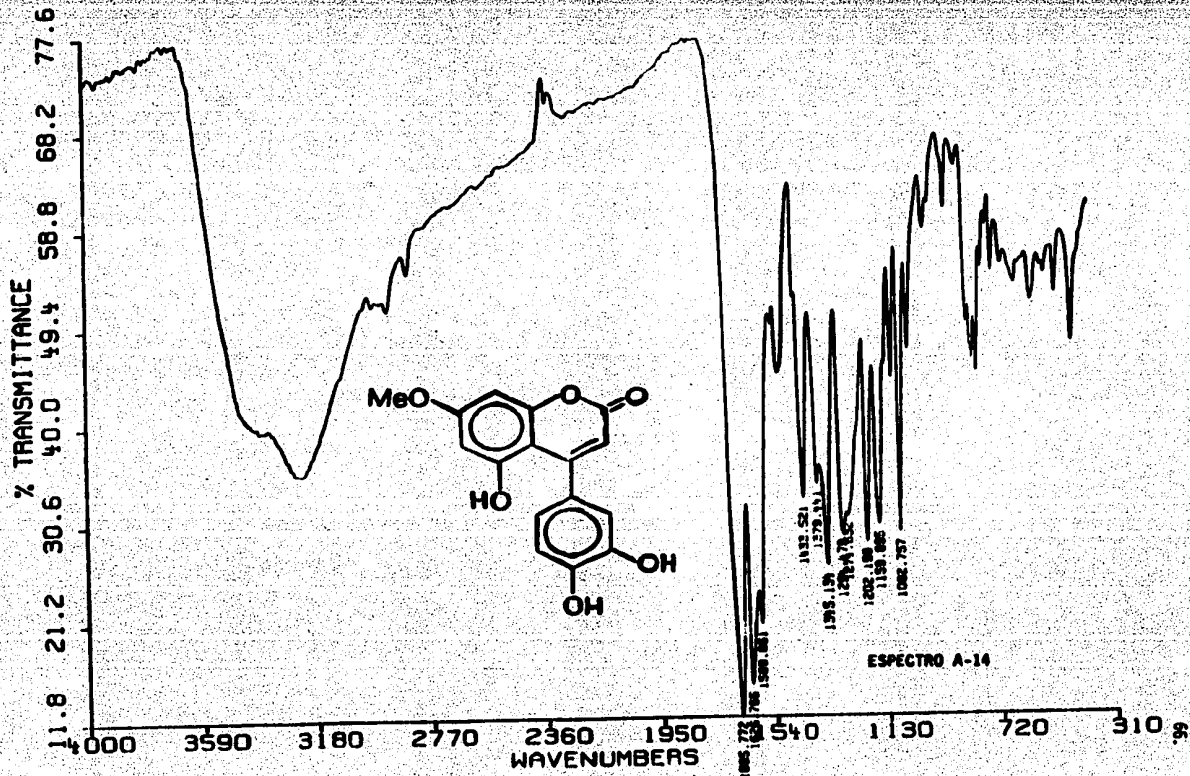


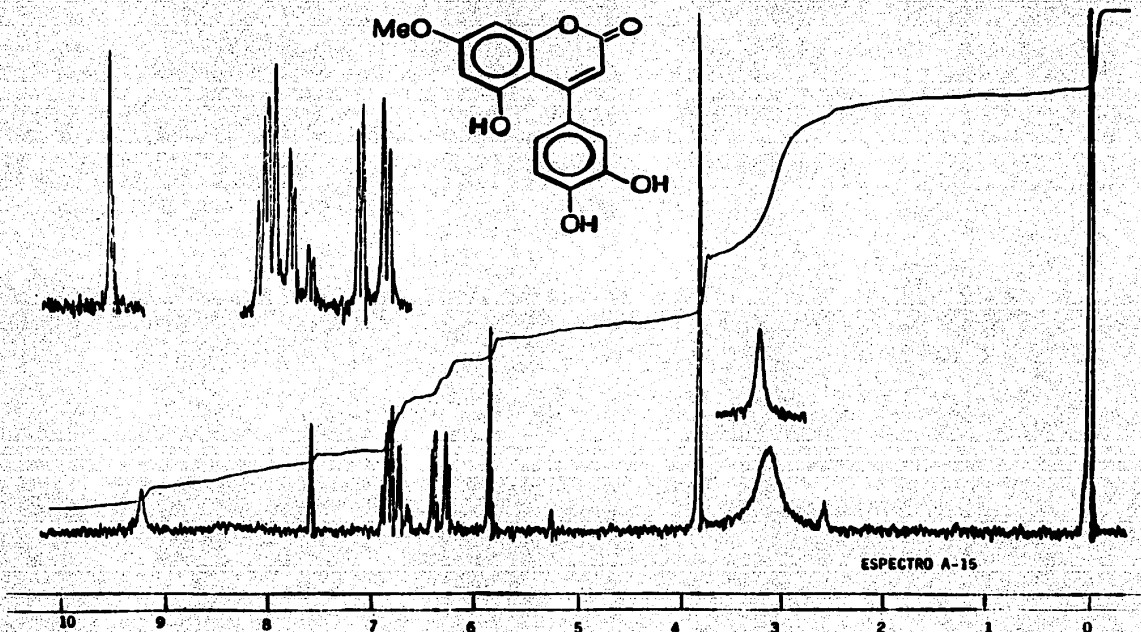
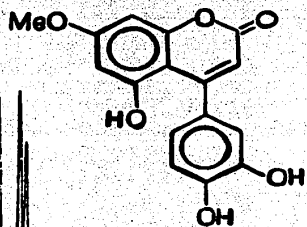
FRN 6278	SPECTRUM 91	RETENTION TIME 6.1
LARGST 4: 300.1, 100.0	272.0, 96.3	257.0, 22.0
LRST 4: 303.1, .6	314.1, .6	301.0, 21.2
		356.1, .5
		PAGE 1 V = 1.00

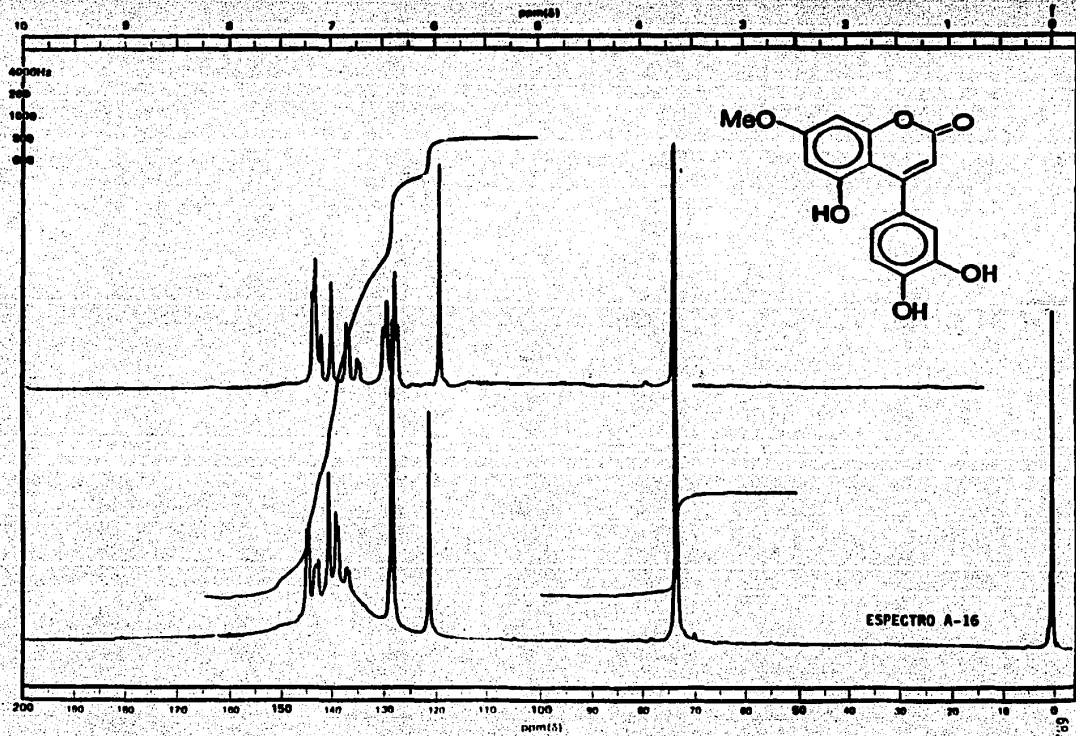


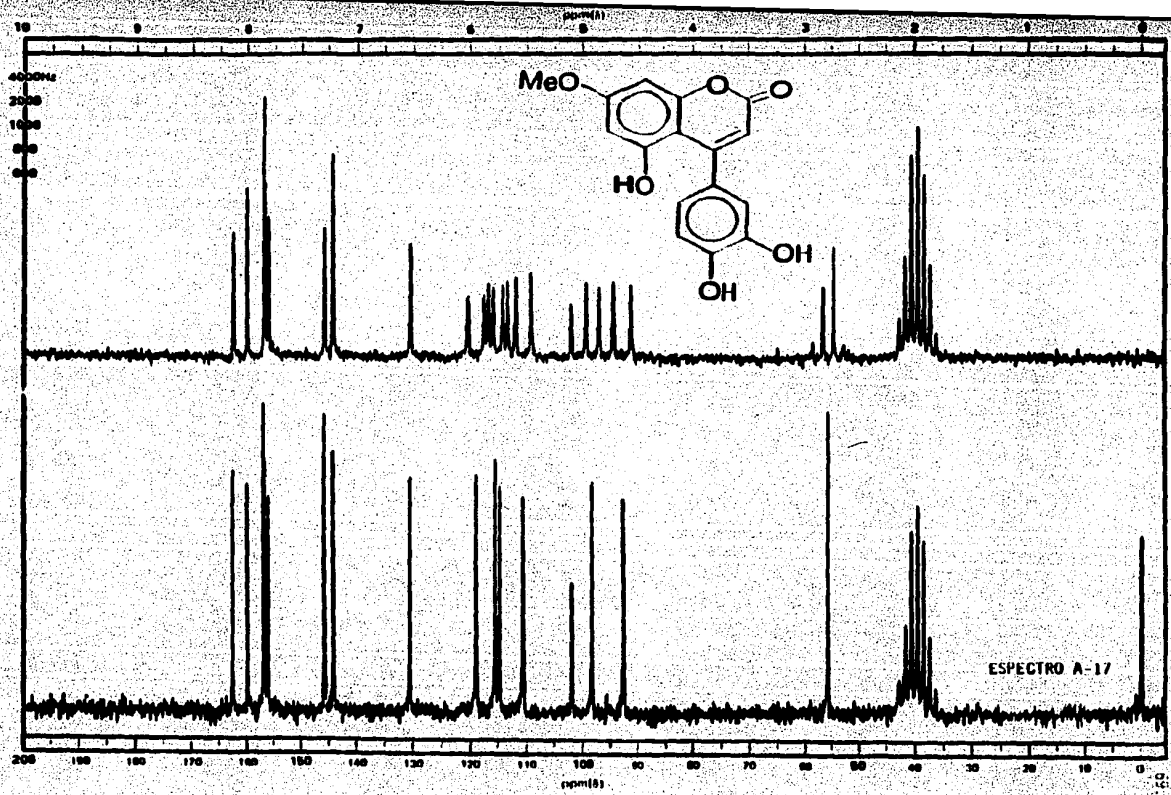
ESPECTRO A-12

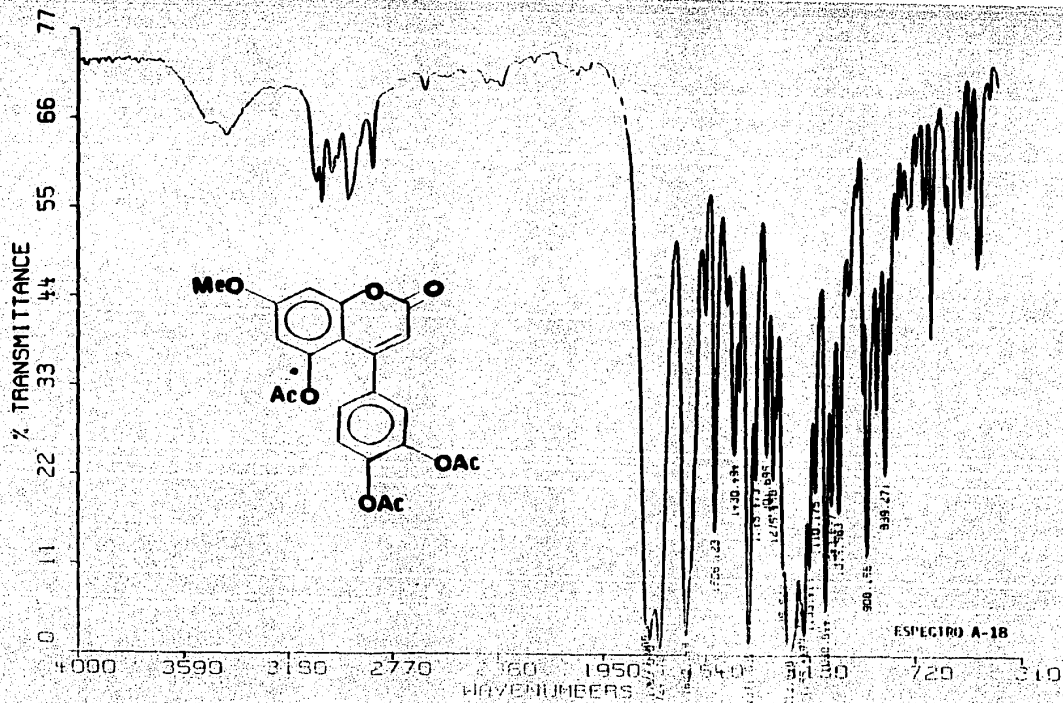




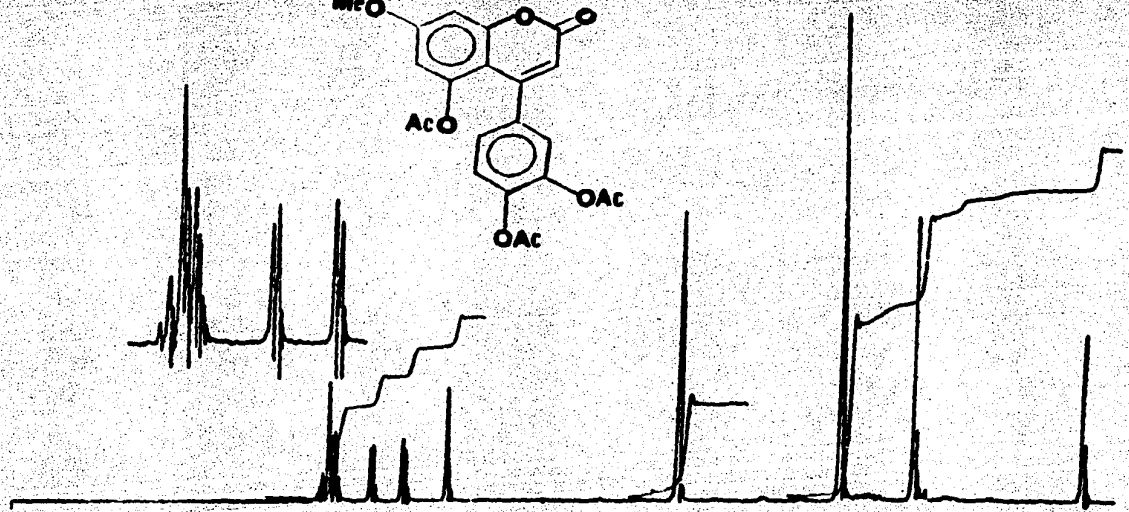
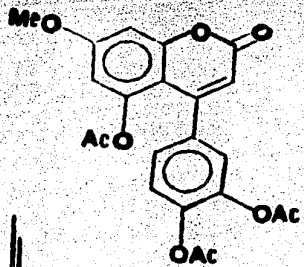




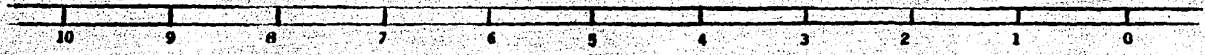


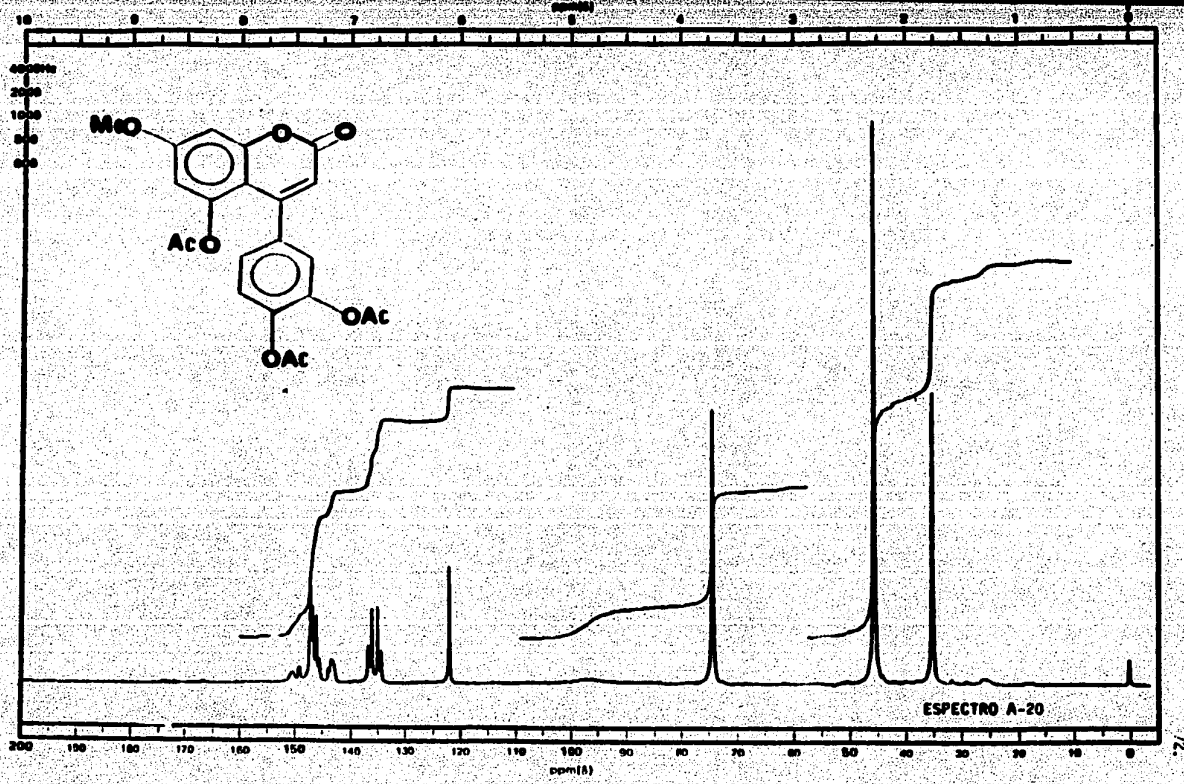


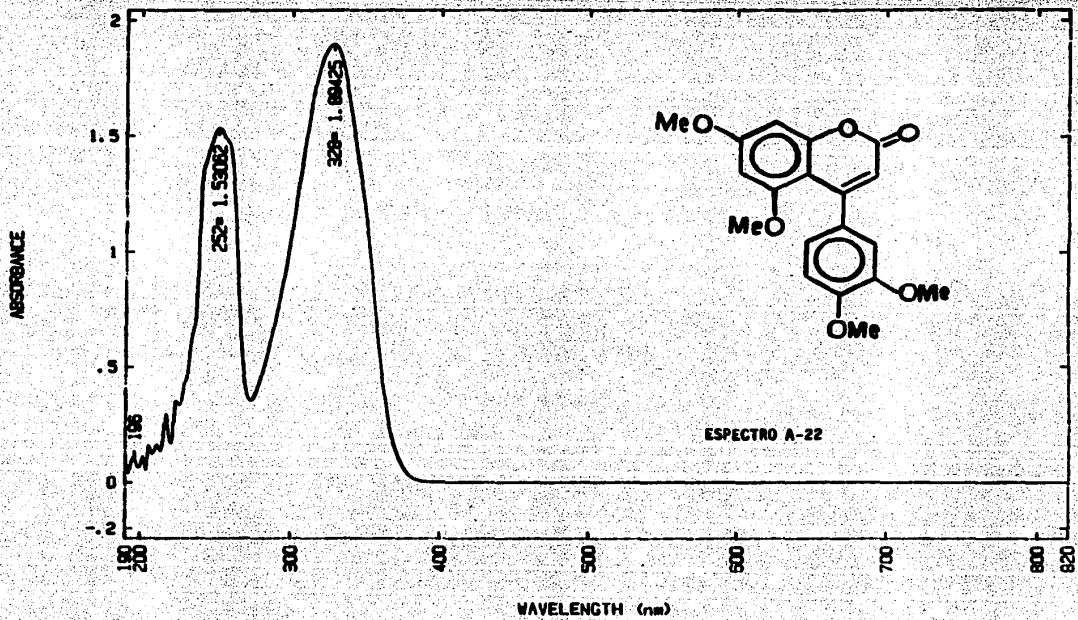
ESPECTRO A-18



ESPECTRO A-19

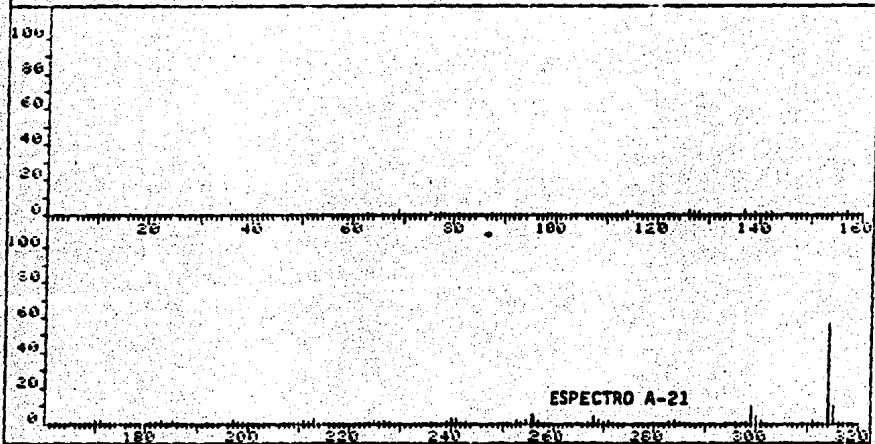






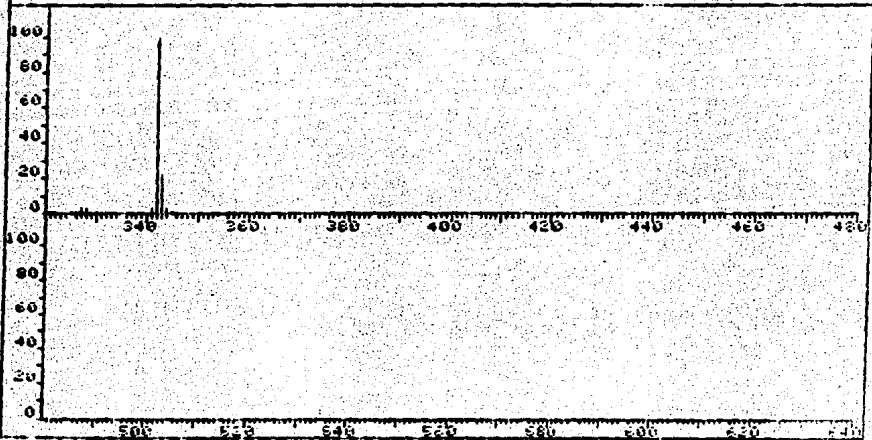
PK#	RT	AREA	PERCENT	RT	AREA	PERCENT
1	342.1	100.0	100.0	343.1	21.9	21.9
2	356.1	.8	.8	357.2	.2	.2
3	446.0	.2	.2	447.2	.1	.1
4	447.2	.1	.1	447.2	.1	.1

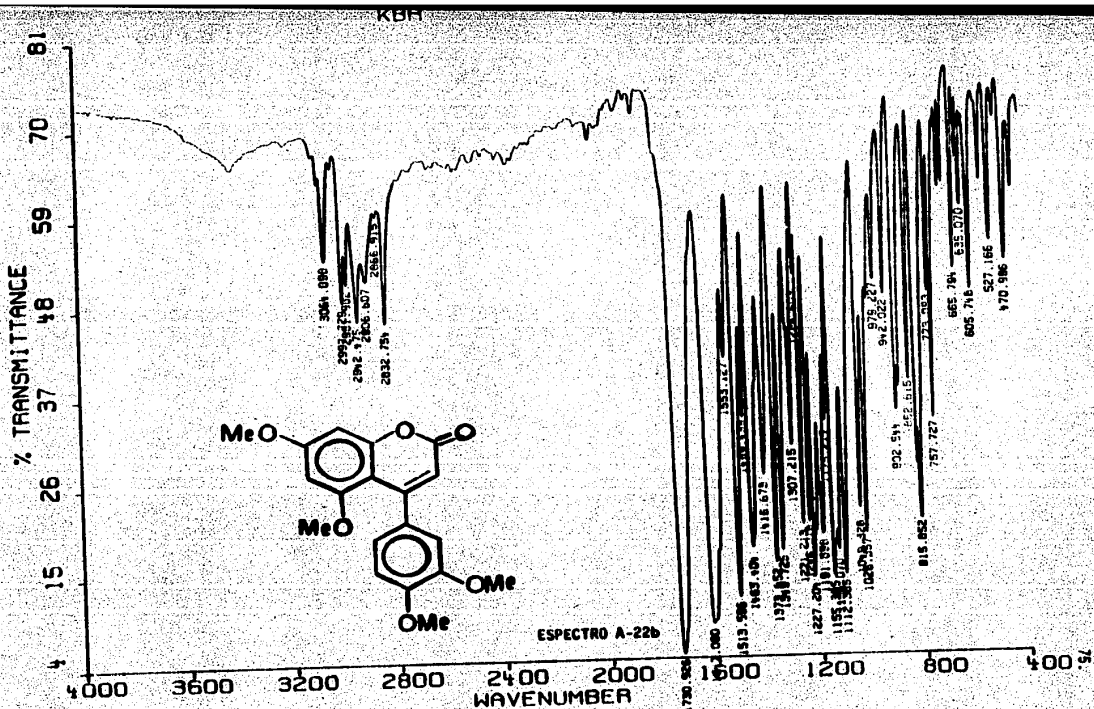
PK# 5132 SPECTRUM 60 RETENTION TIME 2.5
 LARGST 4: 342.1, 100.0 314.1, 66.9 343.1, 21.9 315.1, 10.1
 LAST 4: 356.1, .8 357.2, .2 446.0, .2 447.2, .1
 PAGE 1 Y = 1.00

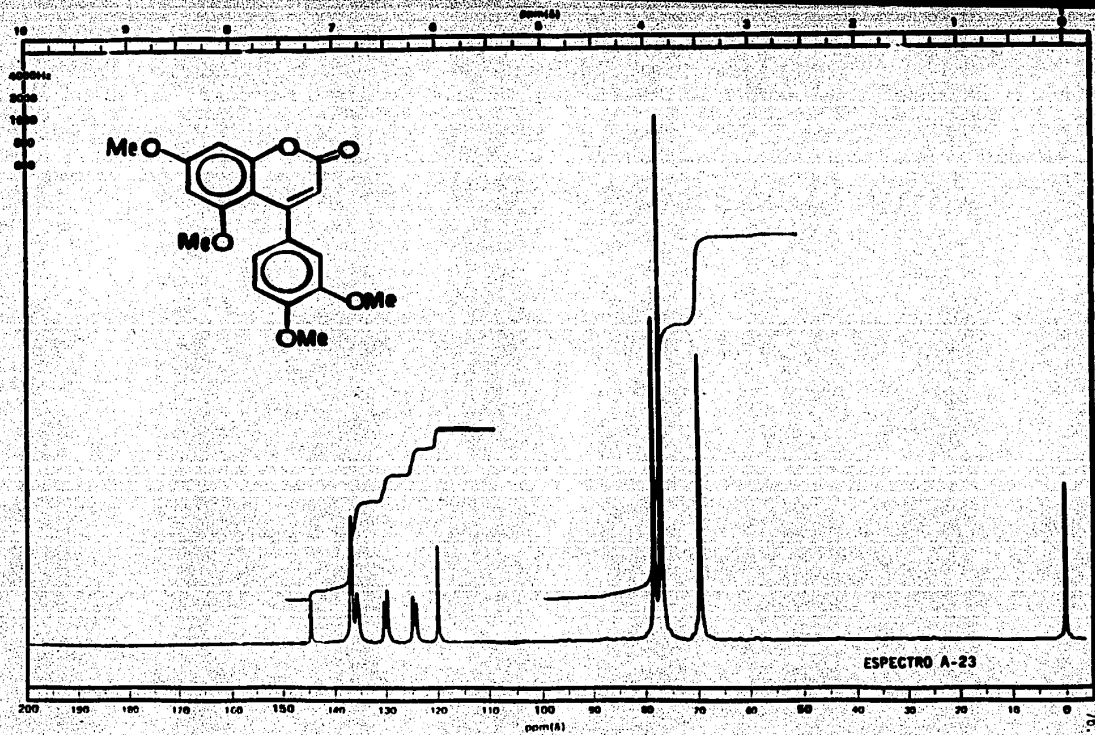


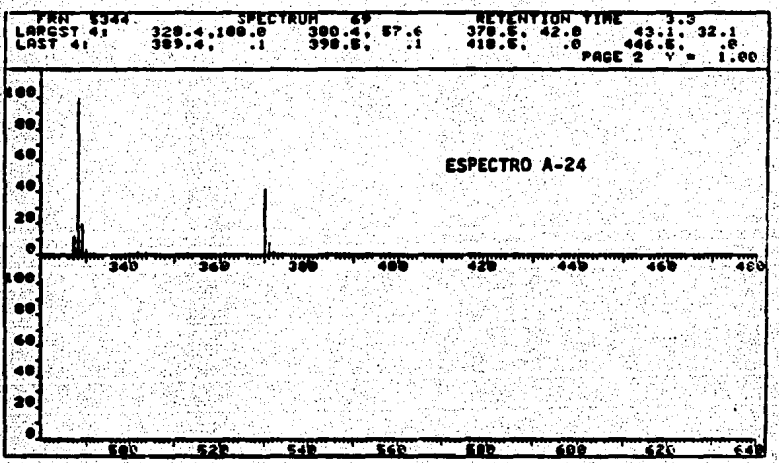
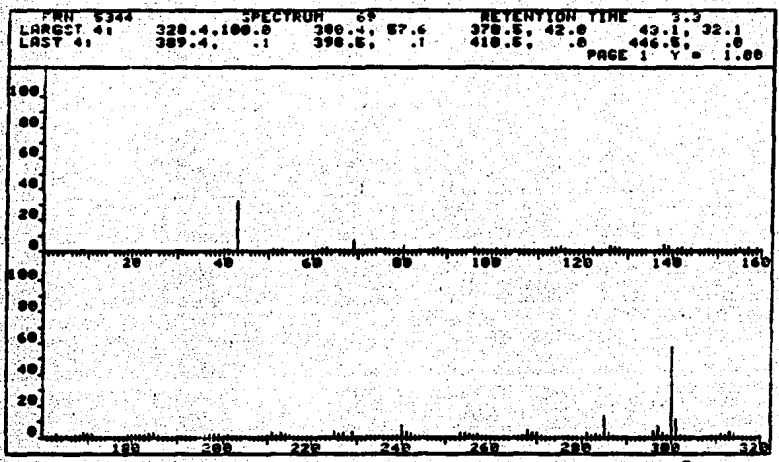
PK#	RT	AREA	PERCENT	RT	AREA	PERCENT
1	342.1	100.0	100.0	343.1	21.9	21.9
2	356.1	.8	.8	357.2	.2	.2
3	446.0	.2	.2	447.2	.1	.1
4	447.2	.1	.1	447.2	.1	.1

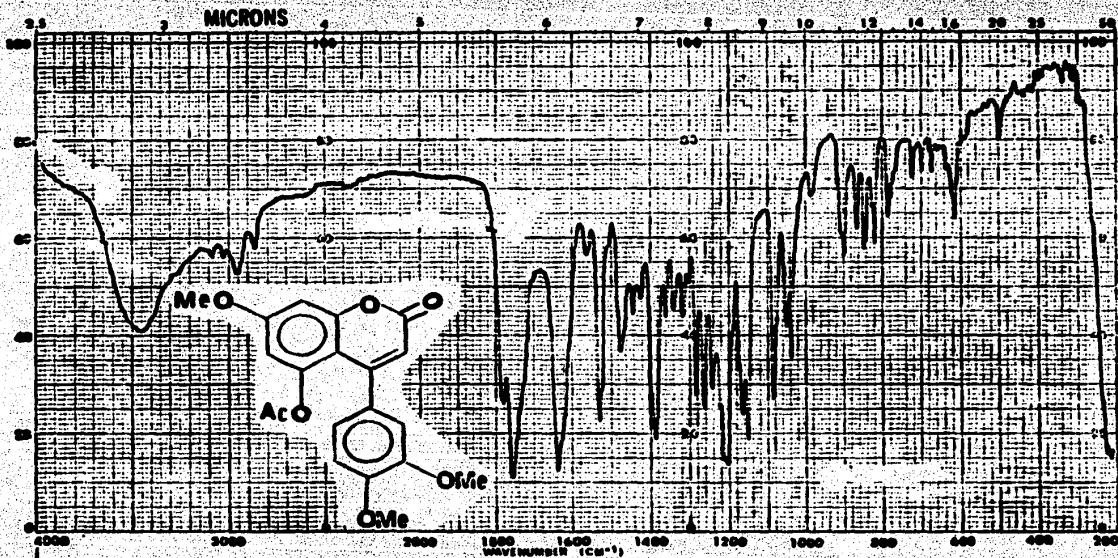
PK# 5132 SPECTRUM 60 RETENTION TIME 2.5
 LARGST 4: 342.1, 100.0 314.1, 66.9 343.1, 21.9 315.1, 10.1
 LAST 4: 356.1, .8 357.2, .2 446.0, .2 447.2, .1
 PAGE 2 Y = 1.00



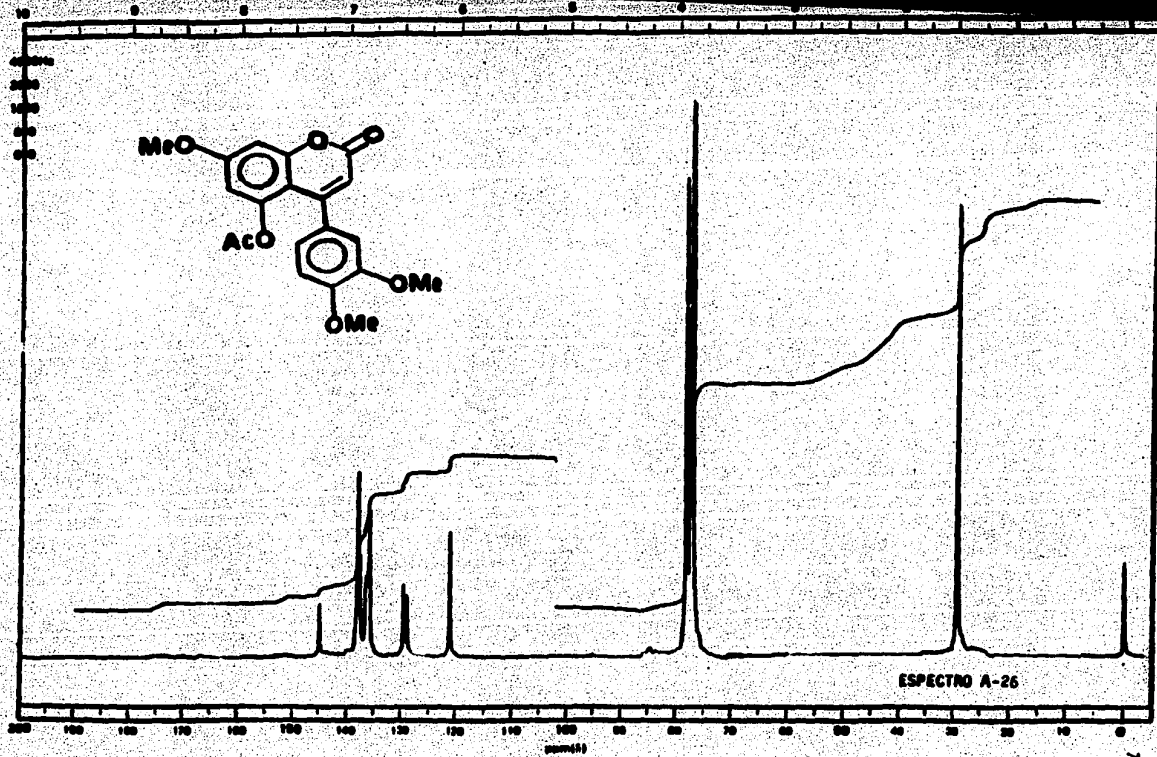






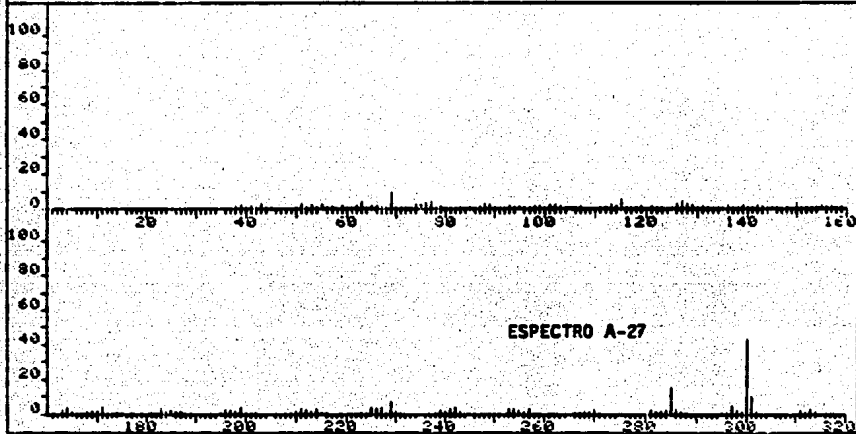


SAMPLE ESPECTRO A-25	SOLVENT <u>CH₂Cl₂</u>	SCAN <u>13</u>	SAMPLE NO. _____	REMARKS <i>positive</i>
	CONC. _____	SPLIT _____	T.D. SPEED _____	
ORIGIN _____	CELL PATH _____	OPERATOR <u>S. J. W.</u>	ORD. EXP. _____	
	REFERENCE <u>CH₂Cl₂</u>	DATE <u>2/11/80</u>	T.CONST _____	
	PERKIN-ELMER _____	No. 8193-1000	REL. No. <u>1675 C</u>	

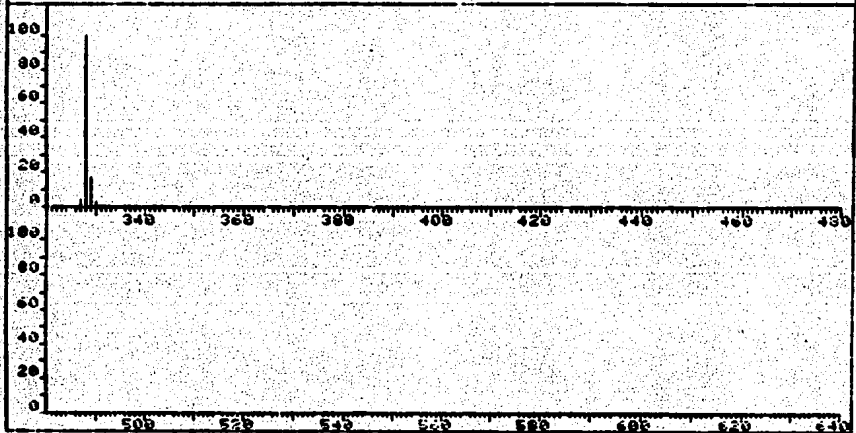


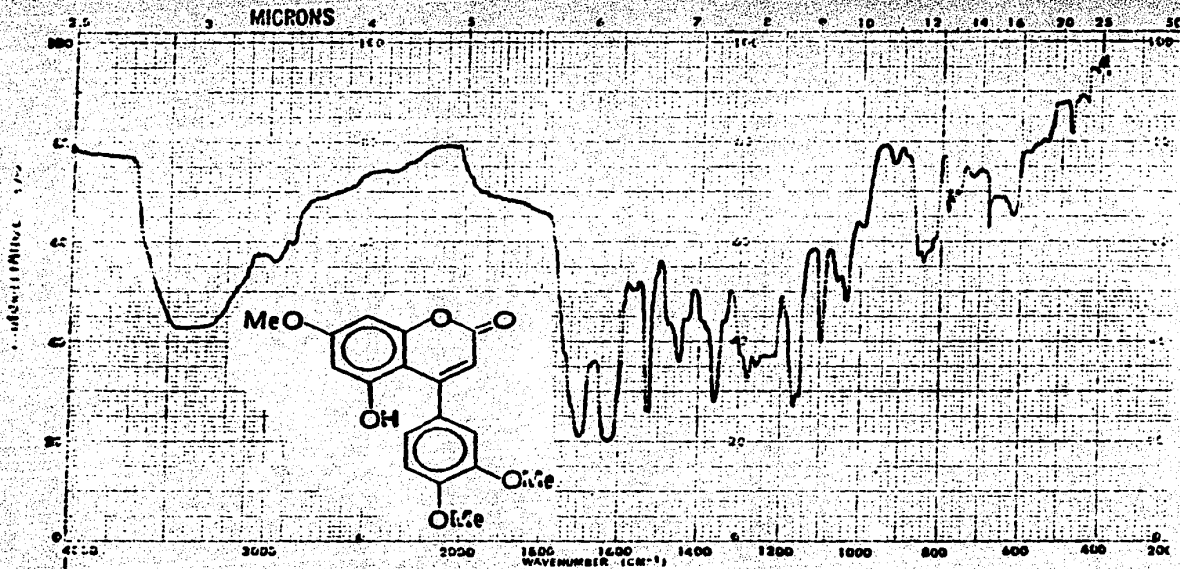
ESPECTRO A-26

FRN 5336	SPECTRUM 56		RETENTION TIME 3.7	
LARGST 4:	327.9, 100.0	299.9, 43.4	328.9, 16.6	284.9, 14.7
LAST 4:	329.9, 3.1	331.0, .3	341.8, 1.2	446.8, .5
PAGE 1 Y = 1.00				

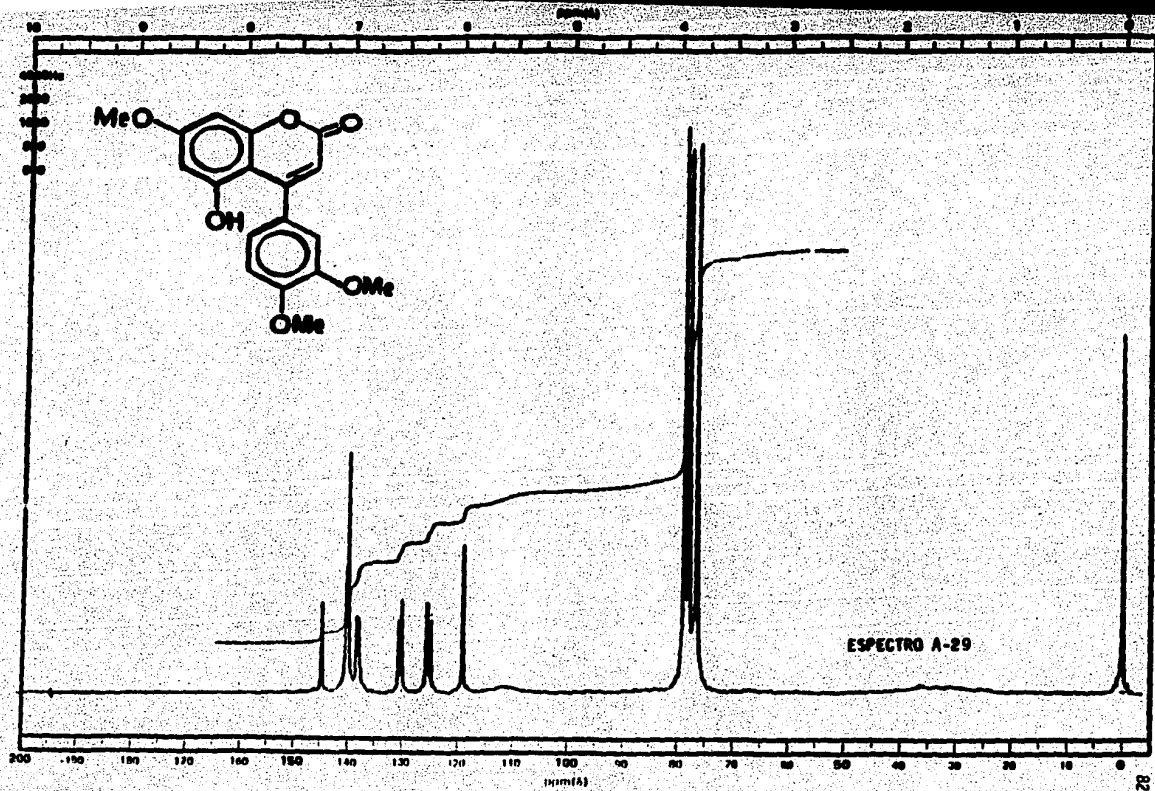


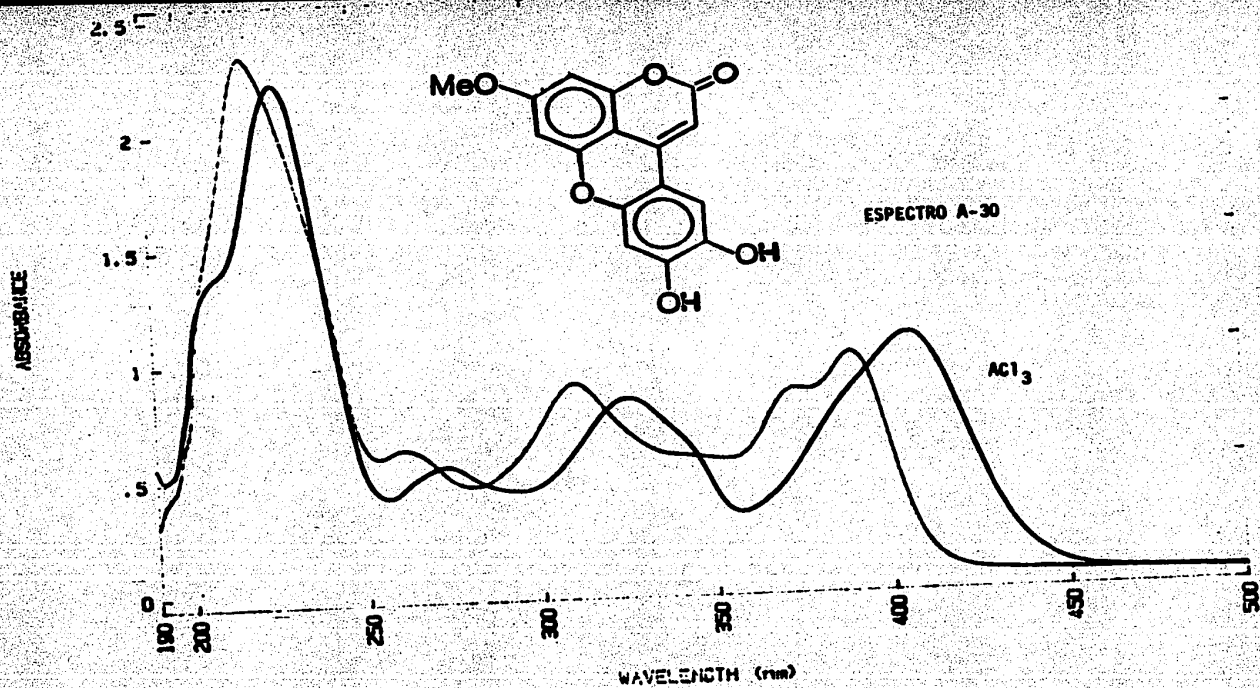
FRN 5336	SPECTRUM 56		RETENTION TIME 3.7	
LARGST 4:	327.9, 100.0	299.9, 43.4	328.9, 16.6	284.9, 14.7
LAST 4:	329.9, 3.1	331.0, .3	341.8, 1.2	446.8, .5
PAGE 2 Y = 1.00				

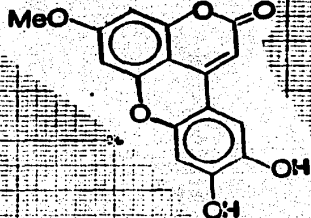
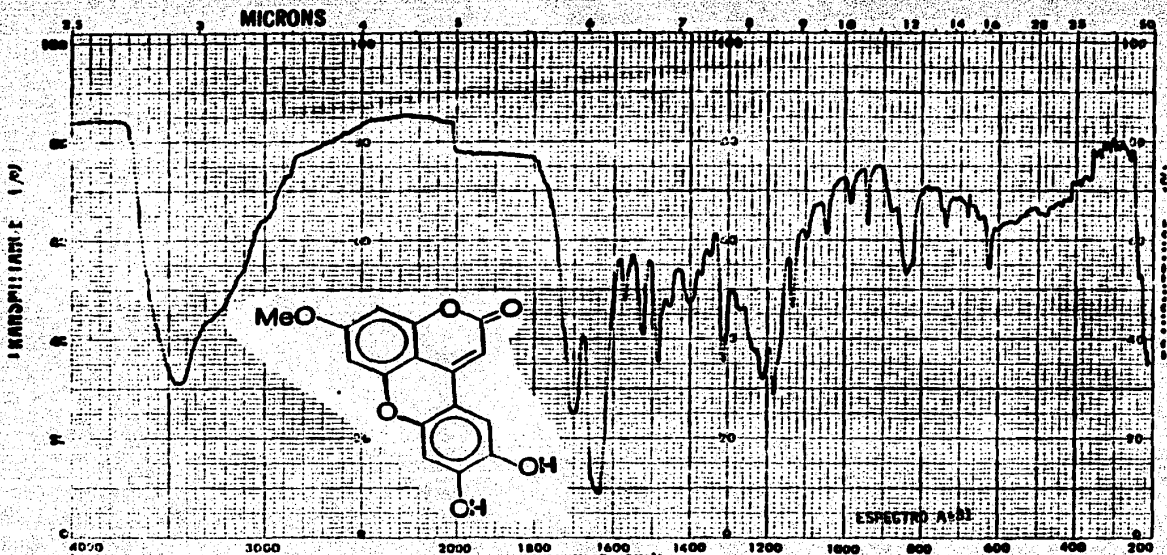




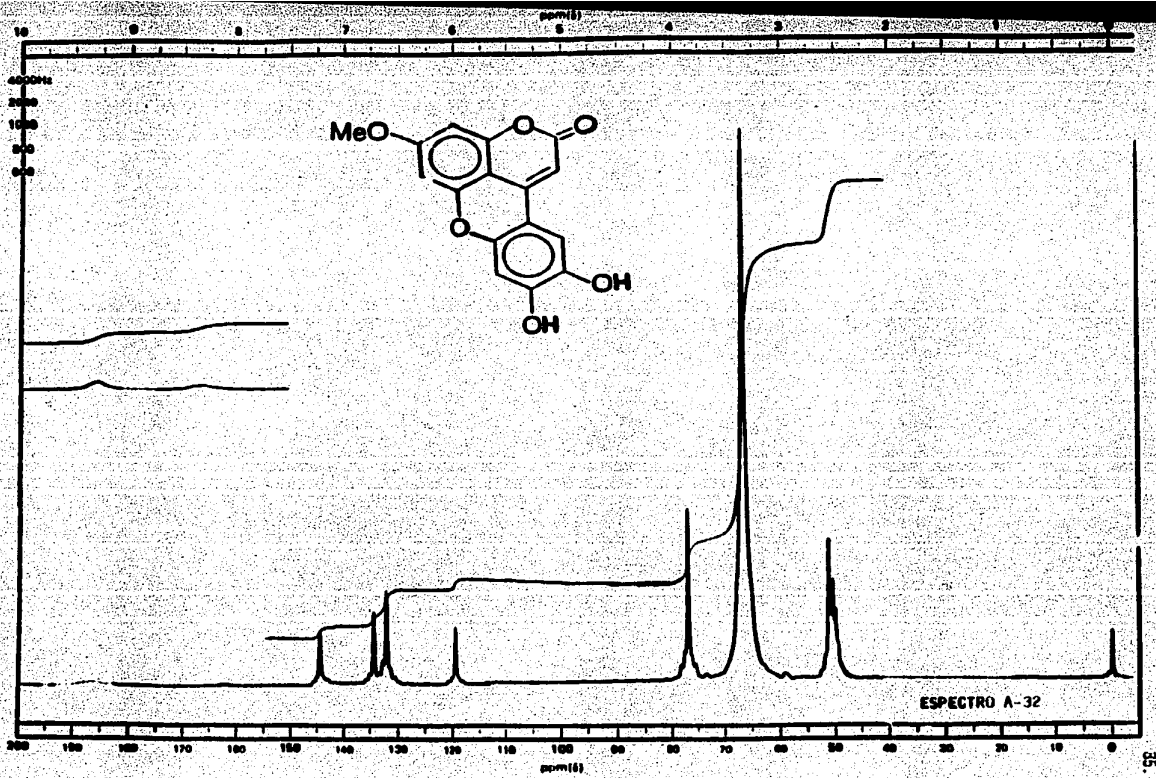
SAMPLE ESPECTRO A-28	SOLVENT <i>CCl₄</i>	SCAN <i>121</i>	SINGLE D.	REMARKS ESPECTRO A-28
	CONC.	SALT <i>NaCl</i>	T.O. SPEED.	
ORIGIN	CELL PATH	OPERATOR <i>Blair</i>	ORD. EXP.	
	REFERENCE <i>none</i>	DATE <i>12/18/64</i>	T. CONTROL	
	PETRYAN ELUMER	NO. <i>5102-1000</i>	REF. NO. <i>75102</i>	







SAMPLE	SOLVENT <i>CH₂Cl₂</i>	SCAN <i>124</i>	SINGLE B.	REMARKS.
ORIGIN	CONC.	SLIT <i>W</i>	T.D. SPEED.	ESPECTRO A-31
	CELL PATH	OPERATOR <i>Chik</i>	ORD. EXP.	
	REFERENCE <i>etc</i>	DATE	T.CONST.	
	PERKIN ELMER	No. 5102-1000	REF. No. <i>10339</i>	



ESPECTRO A-32

