

00570
2ej.
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESIS

4-ARILCOUMARINAS DE LA *Exostema caribaeum* Jacq.

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

FARMACIA: QUIMICA FARMACEUTICA

P R E S E N T A

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

MARIA DEL ROSARIO GARCIA MATEOS

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.

RESUMEN

Del extracto metanólico de la corteza de la *E. caribaeum* luego de un fraccionamiento preliminar vía una partición acetato de etilo-MeOH-agua y posteriores cromatografías en columna o en capa delgada, se obtuvieron diez metabolitos secundarios: un compuesto de naturaleza esteroidal (β -sitosterol, 56), una sustancia aromática simple de tipo C_6-C_1 (anisaldehído, 53) y ocho 4-fenilcoumarinas. Las coumarinas fueron caracterizadas como: 5-O-[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 57; 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 59; 5-O- β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina, 60; 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 52; 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 58; 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 55; 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina, 54 y 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, 40. Los compuestos 57, 59, 60, 58, 55 y 54 representan nuevos productos naturales.

El proceso de aislamiento y caracterización de los productos antes mencionados se realizó siguiendo las técnicas fitoquímicas, químicas y espectroscópicas convencionales.

Los compuestos 7,3',4'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 58 y 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 55 fueron evaluados biológicamente encontrándose no tóxicos para *Artemia*

salina [DL >1000 ppm]. Los compuestos pueden ser agentes antimicrobianos potenciales.

El estudio fitoquímico de la *E. caribaeum* representa un aporte adicional al conocimiento de la flora medicinal mexicana.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS -----	i
LISTA DE FIGURAS -----	v
LISTA DE ESQUEMAS -----	vii
LISTA DE ESPECTROS -----	viii
LISTA DE ABREVIATURAS -----	xiv
1. INTRODUCCION -----	1
1.1 Malaria y medicina tradicional -----	1
1.2 Generalidades acerca de la <i>Exostema caribaeum</i> --	7
1.3 Generalidades sobre los neoflavonoides del tipo 4-arilcoumarinas -----	9
1.3.1 Variación Estructural -----	11
1.3.2 Elucidación Estructural -----	50
1.3.3 Síntesis -----	52
1.3.4 Biogénesis -----	54
1.3.5 Actividad biológica -----	56
2. JUSTIFICACION y OBJETIVOS -----	57
3. MATERIALES Y METODOS -----	59
3.1 Material vegetal -----	59

	Página
3.2 Métodos de extracción y fraccionamiento -----	59
3.3 Análisis cromatográficos -----	62
3.4 Aislamiento y purificación de los compuestos ---	62
3.4.1 Obtención de anisaldehído <u>53</u> -----	62
3.4.2 Obtención de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenil- coumarina <u>40</u> -----	66
3.4.3 Obtención de la 3',5'-dihidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenilcoumarinas <u>54</u> -----	66
3.4.4 Obtención de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> -----	66
3.4.5 Obtención de β -sitosterol <u>56</u> y de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'- oxidocoumarina <u>52</u> -----	67
3.4.6 Obtención de la 5-O-6''-acetil- β -D- galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4- fenilcoumarina <u>57</u> -----	67
3.4.7 Obtención de la 7,4',5'-trihidroxi-4- fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>58</u> -----	67
3.4.8 Obtención de la 5-O- β -glucosil-3',4'- dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> --	68
3.4.9 Obtención de la 5-O- β -galactosil,4',7- dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	68

	Página
3.5 Caracterización de los compuestos aislados -----	68
3.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	68
3.5.2 Prueba de Molisch para carbohidratos ----	69
3.5.3 Hidrólisis ácida del compuesto <u>57</u> -----	70
3.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto <u>59</u> -----	70
3.5.5 Hidrólisis enzimática del compuesto <u>60</u> con celulasa -----	71
3.5.6 Hidrólisis enzimática de los compuestos <u>57</u> , <u>59</u> y <u>60</u> -----	72
3.5.7 Obtención de los derivados metilados ----	72
3.5.8 Obtención de los derivados acetilados ---	73
3.5.9 Obtención de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> a partir de la 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4- fenilcoumarina <u>54</u> -----	74
3.5.10 Transformación del compuesto <u>57A</u> en <u>52</u> --	75
4. RESULTADOS Y DISCUSION -----	76
4.1 Identificación de la 5-O-[6"-acetoxi-β- D- galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil- coumarina <u>57</u> -----	78

	Página
4.2 Identificación de la 5- <u>0</u> - β -D-glucosil-3',4'- dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	107
4.3 Caracterización de la 5- <u>0</u> - β -D-galactosil-4',7'- dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	118
4.4 Caracterización de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52</u> -----	126
4.5 Identificación de la 7,4',5'-trihidroxi-4- fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>58</u> -----	136
4.6 Identificación de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> -----	141
4.7 Caracterización de la 3',5'-dihidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	161
4.8 Identificación de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenil- coumarina <u>40</u> -----	176
4.9 Identificación del anisaldehído <u>53</u> -----	179
4.10 Identificación del β -sitosterol <u>56</u> -----	182
5. RESUMEN y CONCLUSIONES -----	183
6. RECOMENDACIONES -----	187
7. BIBLIOGRAFIA -----	188

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies mexicanas del género <i>Exostema</i> -----	8
Tabla 2. 4-fenilcoumarinas naturales -----	12
Tabla 3. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	63
Tabla 4. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto acetato de etilo de la <i>E. caribaeum</i> -----	64
Tabla 5. Hidrólisis de los compuestos <u>57</u> , <u>59</u> y <u>60</u> -----	71
Tabla 6. Obtención de los derivados metilados de los compuestos -----	73
Tabla 7. Preparación de derivados acetilados de los compuestos -----	74
Tabla 8. Rendimiento de los compuestos aislados -----	77
Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>0</u> -[6"-acetoxi- β -D-galactosil]-3',4'- dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	79
Tabla 10. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>0</u> - β -D-hexacetilgalactosil-3',4-diacetoxi- 7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57C</u> -----	86

	Página
Tabla 11. Resonancia de C^{13} de la porción azucarada de algunos flavonoides o glicósidos -----	92
Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> -----	94
Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57D</u> -----	103
Tabla 14. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	108
Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O- β -D-hexacetoxi-glucosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59B</u> -----	115
Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O- β -D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	119
Tabla 17. Comparación de los desplazamientos químicos calculados para los carbonos aromáticos del anillo C de una 4-fenilcoumarina "para sustituido con un metoxilo con las observadas para el compuesto <u>60</u> -----	125

	Página
Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina <u>52</u> -----	127
Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la 4',5'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina <u>52A</u> -----	132
Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>58</u> -----	137
Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-4,2'-oxido-coumarina <u>55</u> -----	142
Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55A</u> -----	150
Tabla 23. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5'-acetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina <u>55B</u> -----	154
Tabla 24. Comparación de los desplazamientos Químicos de los protones aromáticos del compuesto <u>55</u> y de aquellos de su derivado acetilado <u>55B</u> -----	149
Tabla 25. Desplazamientos Químicos indicados para la piridina en los protones aromáticos del compuesto <u>55</u> -----	158

	Página
Tabla 26. Desplazamientos Químicos en RMNP de los compuestos <u>52</u> , <u>52A</u> , <u>58</u> , <u>55</u> , <u>55A</u> y <u>55B</u> -----	159
Tabla 27. Constantes físicas y espectroscópicas de la 3',5-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	162
Tabla 28. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina <u>54A</u> ---	168
Tabla 29. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3'-diacetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54B</u> -----	171
Tabla 30. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina <u>40</u> -----	177
Tabla 31. Constantes físicas y espectroscópicas del anisaldehído <u>53</u> -----	180

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de la Mefloquina -----	4
Figura 2. Estructura del Quinghaosu -----	5
Figura 3. Estructuras del manitol <u>1</u> exostemina <u>2</u> y 5- O- β -galactosil-7-metoxi-3,4-dihidroxi-4- fenilcoumarina -----	9
Figura 4. Estructuras generales de los diferentes tipos de neoflavonoides -----	10
Figura 5. Hidrólisis de calophyllolida con KOH -----	51
Figura 6. Condensación: a) de Perkin y b) de Pechmann -	53
Figura 7. Hipótesis sobre la biogénesis de neoflavonoi- des -----	55
Figura 8. Región aromática del compuesto <u>57</u> -----	82
Figura 9. Patrón de fragmentación de una 4-fenilcouma- rina -----	95
Figura 10. Región aromática del compuesto <u>57A</u> -----	101
Figura 11. Efecto protector de 4-arilo sobre sustituyen- tes en la posición C-5 de la arilcoumarina --	106

	Página
Figura 12. Región aromática del compuesto <u>59</u> -----	112
Figura 13. Región aromática de la fenilcoumarina <u>60</u> ----	122
Figura 14. Alternativas en relación a la ubicación de los grupos hidroxilo "orto" para el compuesto <u>52</u> -----	135
Figura 15. Región aromática del compuesto <u>55</u> -----	147
Figura 16. Estructura parcial del compuesto <u>54</u> -----	173
Figura 17. Posibles estructuras del anillo C del compuesto <u>54</u> -----	174
Figura 18. Zonas aromáticas del compuesto <u>54</u> en piridina y de su derivado acetilado en $CDCl_3$ -----	175
Figura 19. Conversión en medio básico de 4-fenilcoumarinas en 5,2'-oxidocoumarinas -----	185

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Extracción de la corteza de <i>E. caribaeum</i> Jacq. -----	60
Esquema 2. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de <i>E. caribaeum</i> Jacq. -----	61

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro UV de la 5- <u>0</u> -[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	80
Espectro 2. Espectro IR de la 5- <u>0</u> -[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	81
Espectro 3. Espectro RMN-P (DMSO-d ₆) de la 5- <u>0</u> -[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	83
Espectro 4. Espectro RMN-P (Piridina-d ₅) de la 5- <u>0</u> -[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	84
Espectro 5. Espectro RMN-C ¹³ (DMSO-d ₆) de la 5- <u>0</u> -[6"-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57</u> -----	91
Espectro 6. Espectro IR de la 5- <u>0</u> - β -D-hexaacetoxi-galactosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57C</u> -----	87
Espectro 7. Espectro RMN-P (Piridina d ₅) de la 5, <u>0</u> - β -D-hexaacetoxi galactosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57C</u> -----	88

	Página
Espectro 8. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5- <u>0</u> - β -D-hexa-acetoxi galactosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57C</u> -----	89
Espectro 9. Espectro UV de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> -----	96
Espectro 10. Espectro IR de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> -----	97
Espectro 11. Espectro RMNP (DMSO-d_6 - CDCl_3) de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> --	98
Espectro 12. Espectro RMNP (Piridina- d_5) de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> --	99
Espectro 13. Espectro RMNC ¹³ (DMSO-d_6) de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57A</u> --	100
Espectro 14. Espectro IR de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57D</u> -----	104
Espectro 15. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>57D</u> --	105
Espectro 16. Espectro UV de la 5- <u>0</u> - β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	109
Espectro 17. Espectro IR de la 5- <u>0</u> - β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	110

	Página
Espectro 18. Espectro RMNP (DMSO-d ₆ -CDCl ₃) de la 5- <u>0</u> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	111
Espectro 19. Espectro RMN-C ¹³ de la 5- <u>0</u> -β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59</u> -----	114
Espectro 20. Espectro IR de la 5- <u>0</u> -β-D-hexaacetoxi-glucosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59B</u> -----	116
Espectro 21. Espectro RMNP (CDCl ₃) de la 5- <u>0</u> -β-D-hexaacetoxi-glucosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina <u>59B</u> -----	117
Espectro 22. Espectro IR de la 5- <u>0</u> -β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	120
Espectro 23. Espectro RMNP (DMSO-d ₆ -CDCl ₃) de la 5- <u>0</u> -β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	121
Espectro 24. Espectro RMN-C ¹³ de la 5- <u>0</u> -β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>60</u> -----	124
Espectro 25. Espectro UV de la 4'5-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52</u> -----	128

	Página
Espectro 26. Espectro IR de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52</u> -----	129
Espectro 27. Espectro RMNP (DMSO-d ₆ -CDCl ₃) de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52</u> -----	130
Espectro 28. Espectro IR de la 4',5'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52A</u> -----	133
Espectro 29. Espectro RMNP (DMSO-d ₆ -CDCl ₃) de la 4',5'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>52A</u> -----	134
Espectro 30. Espectro UV de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>58</u> -----	138
Espectro 31. Espectro RMNP (DMSO-d ₆ -CDCl ₃) de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>58</u> -	139
Espectro 32. Espectro UV de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> -----	143
Espectro 33. Espectro IR de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> -----	144
Espectro 34. Espectro RMNP (Piridina-d ₅) de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> -----	145

	Página
Espectro 35. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5'-hidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> ---	146
Espectro 36. Espectro RMNC ¹³ de la 5'-hidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55</u> ---	148
Espectro 37. Espectro IR de la 7,4',5'-trimetoxi-4- fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55A</u> -----	151
Espectro 38. Espectro RMNP (DMSO-d_6 - CDCl_3) de la 7,4',5'- trimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55A</u> -	152
Espectro 39. Espectro RMNP (DMSO-d_6) de la 7,4',5'- trimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55A</u> -	153
Espectro 40. Espectro IR de la 5'-acetoxi-7,4'-dimetoxi- 4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55B</u> -----	155
Espectro 41. Espectro RMNP (Piridina- d_5) de la 5'- acetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxido- coumarina <u>55B</u> -----	156
Espectro 42. Espectro RMNP (DMSO-d_6) de la 5'-acetoxi- 7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina <u>55B</u> -----	157
Espectro 43. Espectro UV de la 5,3'-dihidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	163
Espectro 44. Espectro IR de la 5,3'-dihidroxi-7,4'- dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	164

	Página
Espectro 45. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	165
Espectro 46. Espectro RMNP (Piridina- d_5) de la 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54</u> -----	166
Espectro 47. Espectro IR de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina <u>54A</u> -----	169
Espectro 48. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenilcoumarina <u>54A</u> -----	170
Espectro 49. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5,3'-diacetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina <u>54B</u> -----	172
Espectro 50. Espectro RMNP (CDCl_3) de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina <u>40</u> -----	178
Espectro 51. Espectro RMNP (CDCl_3) del anisaldehído <u>53</u> -	181

LISTA DE ABREVIACIONES

- A: Apéndice
c: cuartero
CDCl₃: cloroformo deuterado
d: doblete
dd: doble de dobles
D₂O: agua deuterada
DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EMIE: 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
δ ppm: partes por millón
RMNP: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMNC¹³: Resonancia magnética nuclear de carbono-13
s: singulete
t: triplete
TMS: Tetrametilsilano
UV: Ultravioleta
A.E.: Análisis Elemental
F.N.: Fuente Natural.

ABSTRACT

From the methanolic extract of the stem bark of *Exostema caribaeum* (Jacq) Roem et schult (Rubiaceae) ten secondary metabolites were isolated and characterized: a steroid compound (β -sitosterol, 56) an aromatic substance (anisaldehyde, 53) and eight 4-phenylcoumarins. The coumarins were determined as: 5-O-[6"-acetyl- β -D-galactopyranosyl]-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcoumarin, 57; 5-O-(β -D-glucopyranosyl)-3',4'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenylcoumarin, 59; 5-O- β -D-galactopyranosyl-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin, 60; 4',5'-dihydroxy-7-methoxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin, 52; 7,4',5'-trihydroxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin, 55; 5,3'-dihydroxy-7,4'-dimethoxy-4-phenylcoumarin, 40. Compounds 57, 59, 60, 58, 55 and 54 are new natural products and their structures were determined by physical and chemical methods.

Compounds 7,4',4'-trihydroxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin, 58 and 5'-hydroxy-7,4'-dimethoxy-4-phenyl-5,2'-oxidocoumarin, 55; were not toxic for *Artemia salina* [LD >1000 ppm].

The 4-phenylcoumarins could represent new potential antimalarial agents and they will be biologically evaluated by the IOCD.

Finally, this study is an additional contribution to the knowledge of mexican plants used in Traditional Medicine.

1. INTRODUCCION

1.1 Malaria y Medicina Tradicional.

En general, las condiciones sanitarias de muchos países en desarrollo se encuentran deterioradas a consecuencia de numerosos factores y entre ellos podemos citar la desnutrición, las precarias condiciones socio-económicas y la deficiente higiene ambiental, por tan solo mencionar algunas.

En las regiones de clima cálido, en donde las denominadas convencionalmente enfermedades tropicales son las que prevalecen esta situación es aún más grave.

A consecuencia de estas enfermedades se registra un alto índice de mortalidad en países asiáticos, africanos y latinoamericanos, siendo quizás, una de las más extendidas la malaria, considerada por algunos autores como un flagelo de la humanidad.

La malaria es un enfermedad infecciosa producida por varios protozoarios del género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. malarie*) y adquirida por el hombre mediante la picadura de mosquitos anofelinos hembras. Los *Plasmodium falciparum* y *vivax*, son los causantes de las fiebres palúdicas tercianas y el *P. malarie* causa la malaria cuartana (fiebre con ciclos de tres y cuatro días respectivamente).

Posiblemente, el paludismo ha sido objeto del programa de erradicación más ambicioso, costoso y extenso de que se tenga memoria

en la salud pública internacional.

Los grandes descubrimientos en los albores del presente siglo sobre la identidad del agente causal y los mecanismos de transmisión de la malaria, encontraron cabal aplicación práctica en la prevención de esta enfermedad. Así tenemos que Sir Ronald Ross, el Nobel laureado por su descubrimiento de los mecanismos de transmisión de la malaria, fué el primero en aplicar medidas para controlar mosquitos en zonas endémicas de Africa, con la pretolización de criadores o su drenaje con obras de ingeniería sanitaria (Malagón, 1986). Posteriormente, el período de la Segunda Guerra Mundial fué pródigo en hallazgos. Se sintetizaron múltiples anti-maláricos, de los cuales surgieron las 4 y 8-aminoquinolinas, más efectivas que la quinolina. Se resintetizó el D.D.T. en los laboratorios Geigy en Suiza y se le encontró poderosísimo efecto insecticida, siendo utilizado con gran éxito para el control de todas las enfermedades transmitidas por insectos, la malaria entre otras. Terminada la guerra, en USA se estableció en 1946 un programa de erradicación nacional de la malaria que termina con este padecimiento en 1951. Con base en esta experiencia, en 1965 la OMS oficializó un programa mundial para la erradicación de la malaria. El comienzo de la campaña internacional trajo consigo consecuencias funestas, ya que la investigación en malaria fué sustituida por programas operativos, y cuando se percataron que la malaria no era tan erradicable como se suponía, ya se habían perdido más de diez años de experiencia en investigación. Entre algunos de los

resultados de dicha campaña vale la pena mencionar que la sola aplicación de insecticidas no tuvo el efecto esperado, ya que alguno de ellos causaron resistencia en los mosquitos. *P falciparum* aprendió a resistir la acción del medicamento más valioso la cloroquina y las cepas resistentes están en plena expansión desde 1962. Esta situación se ha agravado aún más en los últimos años.

A fin de cuentas la erradicación se consiguió solo en algunas Islas del Caribe, en la región oriental de los E.U. y en Europa. En los territorios continentales con malaria arraigado, los cuales forman la vasta mayoría de las regiones tradicionalmente maláricas de los trópicos, no hay un solo ejemplo de erradicación. Por el contrario, los avances inicialmente logrados, se han revertido. Desde 1976 oficialmente se aceptó que la malaria no era erradicable. A pesar de este convencimiento a nivel de organismos internacionales las campañas antimaláricas nacionales continúan haciendo lo mismo que hace 30 años. Mientras tanto, la malaria se sigue dispersando amenazadoramente en el mundo tropical y haciendo presión sobre las zonas templadas (Malagón, 1986).

En el caso particular de México la malaria había sido erradicada desde 1964, no por la campaña; sino por informe presidencial, con tal efecto, que nadie más creyó en la existencia de la malaria en México. Sin embargo, en 1973 se hizo un reporte de numerosos pacientes con paludismo, en el cual se notaba un aumento de diagnósticos de dicha enfermedad (Rodríguez y Alvarez, 1973).

Considerando lo antes expuesto, y hasta tanto el sueño de la

vacuna antimalárica se haya hecho realidad, es obvio que se requieren urgentemente nuevas drogas antimaláricas sintéticas y naturales, como la Mefloquina y el Quinghaosu respectivamente.

La Mefloquina, un análogo de la quinina, cuya estructura se indica en la Figura 1, fué recientemente descubierto y desarrollado por el U.S. Army Antimalarial Drug Research Programme. Es activa contra la malaria producida por el *P. falciparum* resistente a la cloroquina y además en contra de la malaria producida por el *P. vivax*.

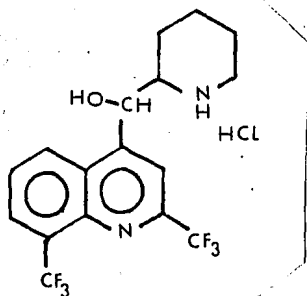


Figura 1. Estructura de la Mefloquina.

El Quinghaosu o artemisina, es una lactona sesquiterpénica con un grupo peróxido, aislada de la hierba china Quinghao (*Artemisia annua* L., compositae). El Quinghao es una planta que ha sido usada en la medicina tradicional china por más de 1000 años para el tratamiento de la malaria. Sin embargo, no fué sino hasta

1972 (WHO, 1981) que el principio activo fué aislado de las partes aéreas de la planta en un rendimiento de 0.01-0.5% y su estructura (Figura 2) fué descrita por vez primera en 1979 (Liu, *et al*, 1979).

El quinghaosu y sus derivados representan una serie novedosa de compuestos antimaláricos. Presentan actividad esquizonticida en pacientes afectados por la malaria producida por plasmodium resistentes a la cloroquina.

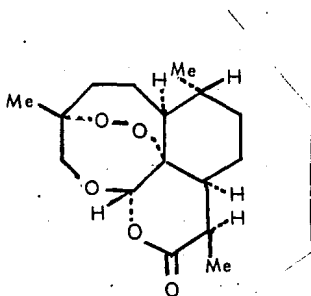


Figura 2. Estructura del Quinghaosu.

Una revisión detallada de este principio activo incluyendo su obtención, estudios químicos, síntesis, metabolismo, estudios farmacocinéticos, toxicidad, farmacología y estudios clínicos fué publicada por la WHO en 1981.

El Quinghaosu (artemisina) es en cierto modo la quinina de las décadas de los 70 y 80s. La quinina se extrae de la corteza de varias especies de *Cinchona* (Rubiaceae) y constituye todavía un

medicamento útil para el tratamiento de la malaria, especialmente en aquellos casos de resistencia a la cloroquina. Ambos compuestos tienen en común, el haber sido obtenidos de plantas utilizadas en la Medicina Tradicional.

La búsqueda de nuevos principios activos naturales basados en el uso popular de determinadas plantas, es un hecho bien documentado (Farnsworth y Bingel, 1977). En este sentido la OMS, en 1976 creó un comité de Medicina Tradicional con el propósito de promover y desarrollar la enseñanza y la investigación sobre plantas medicinales, y uno de los aspectos más importantes que enfatizaba este comité era el hallazgo de nuevos fármacos, aislando principios activos contenidos en dichas plantas.

En el caso particular de México la información acerca de anti-maláricos populares es más o menos abundante y plantea interesantes investigaciones. Más aún, si se considera que la Medicina Tradicional en México constituye una parte primordial de su cultura y ha jugado un papel importante en salvaguardar la salud de la nación.

Entre numerosas plantas mexicanas usadas en Medicina Tradicional para el tratamiento de la malaria, y que potencialmente podrían ser fuente de nuevos principios activos se encuentran numerosas Rubiáceas. Son de particular interés las que forman parte del denominado complejo Copalchi entre las cuales se encuentran la *Hintonia latiflora* y la *Exostema caribaeum*, ésta última objetivo fundamental del presente trabajo.

1.2 Generalidades acerca de la *Exostema caribaeum*.

La *Exostema caribaeum* Jacq., R. et S. es una planta de la familia Rubiaceae (subfamilia Cinchonoideae) que se encuentra ampliamente distribuida en algunos estados de la República Mexicana.

Comunmente se le conoce con los nombres de Copalchi de Jojutla, planta de la Quina, Falsa quina, Quina de Michoacán, jocotillo de cerro, Zalacche y Chactselis. En la medicina popular de México se emplea como sucedáneo de la quina y tiene la particularidad de poseer la corteza y las hojas extremadamente amargas (Aiello, 1979; Martínez del Campo, 1906; Standley, 1975).

Además de la *E. caribaeum*, el género *Exostema* Richard incluye otras 25 especies. El mayor número de ellas se encuentra distribuido en las Indias Occidentales, Sur América y México (Standley, 1975).

En la Tabla 1 se especifican las especies mexicanas, incluyendo su distribución local, sinonimias, uso popular medicinal y nombre común (Calzada, 1987).

Desde el punto de vista fitoquímico son realmente pocos los estudios realizados sobre especies del género *Exostema*, quizás la más investigada ha sido la *E. caribaeum*. El primer trabajo químico realizado sobre esta especie fue el de Krebs y Griesinger, quienes reportaron el aislamiento e identificación del polialcohol, manitol 1 (Figura 3) (Krebs y Griesinger, 1960). Posteriormente, Sánchez-Viesca describió la obtención y caracterización de la

Tabla 1. Especies mexicanas del género *Exostema*

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	NOMBRE COMUN	DISTRIBUCION	USO POPULAR
<i>Exostema coulteri</i> Hook	-	-	Zimapan Hidalgo	-
<i>Exostema caribaeum</i> Jacq	<i>Cinchona caribaea</i> Jacq <i>Cinchona jamaicensis</i> Wright <i>Cinchona myrtifolia</i> Stokes <i>Cinchona racemosa</i> Schrank <i>Exostema longicuspe</i> Oerst.	Zabacche, chactsiis Copalche de Jojutla Jocotillo de Cerro Quina de Michoacán Planta de la Quina Falta quina	San Luis Potosí Colima, Guerrero Yucatán	Sustituto de la quina Hipoglucemiante
<i>Exostema mexicanum</i> A-Gray		Quina, melena de león, Sabac-ché	Veracruz San Luis Potosí	Antipalúdico
<i>Exostema indutum</i> Standley			Oaxaca	

Exostemina 2 (Sánchez-Viesca, 1969).

Más recientemente se describió el aislamiento y caracterización del primer glicósido de una 4-fenilcoumarina (Mata, *et al*, 1987; Calzada, 1987).

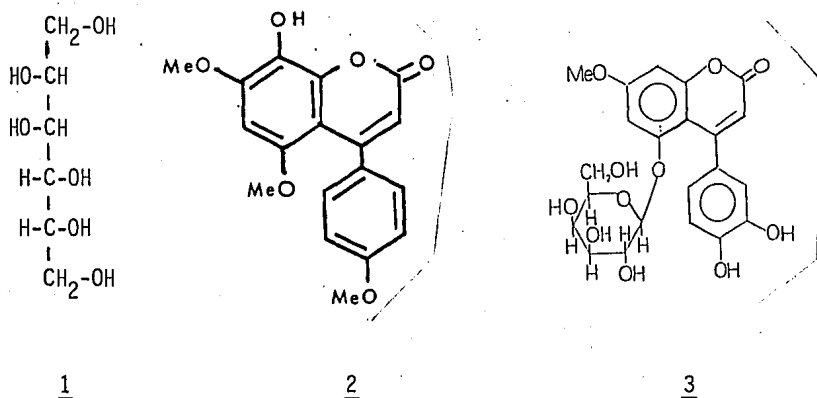


Figura 3. Estructuras del manitol 1, exostemina 2 y 5-O-β-galactosil-7-metoxi-3,4-dihidroxi-4-fenilcoumarina. 3.

1.3 Generalidades sobre los Neoflavonoides del tipo 4-aryl-coumarinas.

El término neoflavonoide propuesto por Swain, y usado por primera vez por Ollis (Donnelly, 1975) describe a un grupo de productos naturales aromáticos, C₁₅, que poseen generalmente un esqueleto básico de un 4-aryl-cromano. Estos compuestos guardan estrecha relación estructural con los flavonoides e isoflavonoides.

Los neoflavonoides se subdividen de acuerdo a su estructura en los siguientes tipos, 4-fenilcoumarinas, 4; Dalberginas, 5; Neofla-

flavenos, 6; Dalbergiquinoles, 7; 4-arilcromanos, 8 y ácidos cumarínicos, 9 (Donnelly, 1975). En la Figura 4 se ilustran las estructuras generales de cada grupo

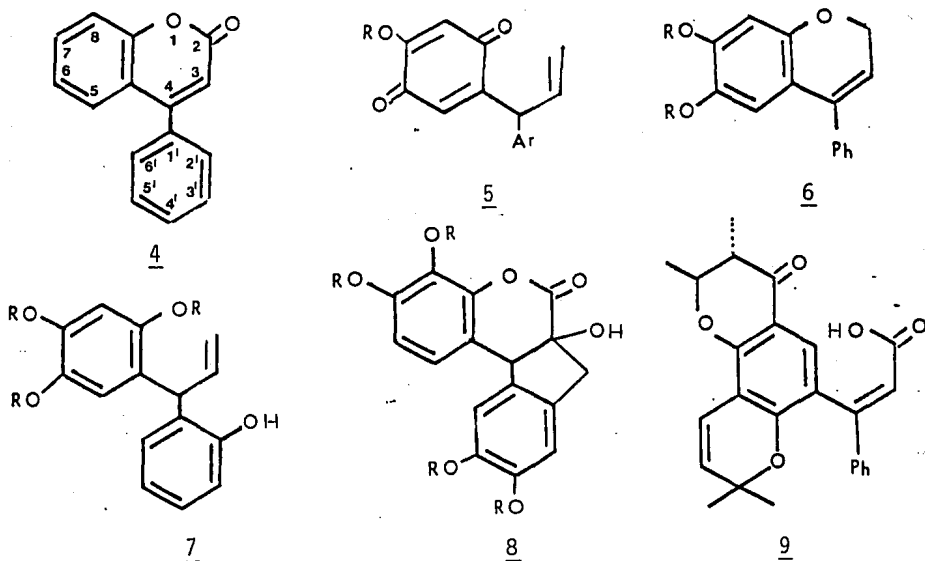


Figura 4. Estructuras generales de los diferentes tipos de Neoflavonoides.

El grupo más numerosos y variado esta representado por las 4-arilcoumarinas. Las 4-arilcoumarinas son compuestos aromáticos del tipo $C_6-C_3-C_6$, cuya estructura general se especifica en la Figura 4.

Su distribución en la naturaleza es bastante restringida, encontrándose solamente en algunos géneros de las familias Guttiferae, Leguminosae y Rubiaceae.

De la familia Guttiferae se han aislado veinticuatro, 4-fenil-

coumarinas de especies de los géneros *Callophyllum*, *Mesua* y *Mammea*.

Por otra parte de la vasta familia Leguminosae se han aislado solo nueve 4-arilcoumarinas de especies de los géneros *Dalbergia* y *Macherium*.

Finalmente, de la familia Rubiaceae se han aislado aproximadamente nueve 4-arilcoumarinas y éstas están restringidas a los géneros *Coutarea*, *Exostema* y *Hintonia*.

En la Tabla 2 se resumen las 4-arilcoumarinas naturales reportadas hasta la fecha.

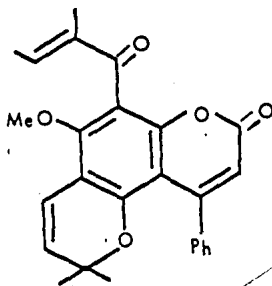
1.3.1 Variación Estructural.

Como se puede observar en la Tabla 2 las 4-fenilcoumarinas de las familias presentan algunas diferencias estructurales. Las de la familia Guttiferae son 5,7-oxigenadas y a diferencia de las Leguminosae y Rubiaceae, presentan unidades estructurales de origen mevalónico, incorporando una o dos moléculas de dimetilalilpirofosfato.

La porción mevalónica es generalmente un anillo piránico insaturado o hidroxilado, fusionado entre 5-6 y/o 7-8. Es de hacer notar que en ocasiones el anillo piránico forma una γ -pirona, donde la fusión del anillo es entre 6-7 como en los casos del compuesto 2',3'-trans calaustralina, 19 y del compuesto 18. (Murray, *et al*, 1982; Breck y Stout, 1969).

Menos frecuentemente, la porción mevalónica es un anillo furánico como en el caso de los compuestos *Mammea* A/AB, 26, A/AA, 27, 28 y 29 (Crombi, *et al*, 1970; 1972), o una cadena abierta de 5 áto-

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales.



CALOPHYLLOLIDA 10

C₂₆H₂₄O₅

P.F. 158-160°C

Opticamente inactiva

UV (alcohol) 235 (4.47), 270 (4.27), 295 (4.22), 325 inf1

RMNP (δ CDC1₃) 0.94 (s 3H), 1.92 (d 3H J=7), 1.95 (s 3H),

5.38 (d 1H J=10), 5.89 (s 1H), 6.42 (d 1H J=10), 6.5 (m 1H)

A.E.

Exp. C_{74.63%} H_{5.55%} OCH₃_{7.82%}

Calc. C_{74.6%} H_{5.51%} OCH₃_{7.71%}

F.N.: *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Calophyllum bracteatum (Guttiferae)

Ormancey-Poitier, *et al.*, 1951;

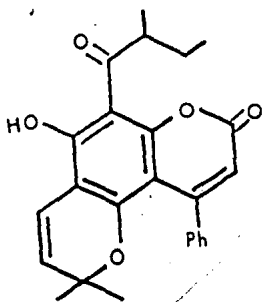
Polonsky, 1957

Nigam, *et al.*, 1967

Ormancey-Poitier, *et al.*, 1951;

Polonsky, 1957

Somanathan, y Sultanbawa, 1972



PONRALIDA 13

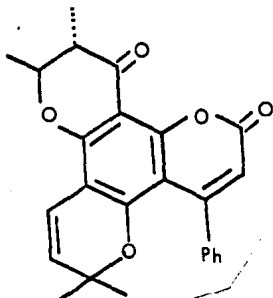
C₂₅H₂₄O₅ PM 404

P.F. 159-160°C

F.N. *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Murray, *et al.*, 1982

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



(+) 12a y (+)-TRANS-INOPHYLLOLIDE 12b

$C_{25}H_{22}O_5$ PM 402

P.F. 188-191°C 12b

P.F. 186-188°C 12a + 12b

$[\alpha]_D^{20} + 13^\circ$ (CHCl₃)

U.V. (EtOH) 240sh (4.32), 257sh (4.46), 266 (4.49), 302 (4.39)

IR 1740, 1690, 753, 699

RMNP (60MHz) (δ , CDCl₃) 0.90 (s 3H), 0.96 (s 3H), 1.21 (d 3H J=6)

1.58 (d 3H J=6), 2.46 (m 1H), 4.59 (m 1H), 5.32 (d 1H J=10),

5.78 (s 1H), 6.5 (d 1H J=10)

RMNP (60MHz) (δ , CDCl₃) 0.95, 0.98 (s 6H), 1.24 (d 3H J=7.2)

1.56 (d 3H J=6.6), 2.59 (m 1H J=7.2), 4.32 (m 1H J=6.6, 11.5),

5.42 (m 1H J=10), 6.04 (s 1H), 6.56 (d 1H J=10), 7.03 (m 5H)

RMNP 0.90, 0.96, 1.24 (J=7.2), 1.56 (J=6.6), 2.59 (J=7.8, 11.5),

4.32 (J=6.6, 11.5), 5.42 (d J=10), 5.78, 6.56 (d J=10)

EM m/z (rel int) 402 (M⁺), 3 87 (M-15), 331 (M-15-56), 303

(M-15-56-28)

FN *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Donnelly D., 1975

Kawazu, *et al*, 1968, Polonsky, 1957

Murray, *et al*, 1982

Kawazu, *et al*, 1968

Kawazu, *et al*, 1968

Nigam, *et al*, 1967

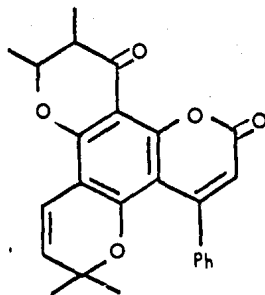
Kawazu, *et al*, 1968; Sarath, *et al*,
1977

Donnelly D., 1975

Kawazu, *et al*, 1968

Polonsky, 1957; Kawazu, *et al*, 1958

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



(+)-CIS-INOPHYLLOLIDE 12c

$C_{25}H_{22}O_5$

P.F. 149-151°C

$[\alpha]_D^{20} + 70^\circ$ (CHCl₃)

UV (EtOH) 240sh (4.32), 257sh (4.46), 266 (4.49), 302 (4.39)

IR 1740, 1690, 753, 699

RMNP (60MHz) (δ , CDCl₃) 0.97 (s 6H), 1.18 (d 3H J=7.2)

1.44 (d 3H J=6.8), 2.67 (m 1H J=7.2, 3.2), 4.73 (m 1H J=6.8,

3.7), 5.42 (d 1H J=10), 6.05 (s 1H), 6.56 (d 1H J=10), 7.3 (5H)

EM m/z (rel int) 402 (M⁺), 387 (M-15), 331 (H-15-56), 303

(M-15,56,28)

F.N. *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Polonsky, 1957

Kawazu, et al, 1968

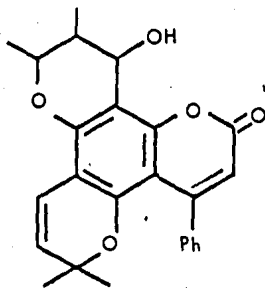
Kawazu, et al, 1968;

Donnelly D., 1975

Kawazu, et al, 1968

Polonsky, 1957; Kawazu, et al, 1968

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



CROMANOL 14a

$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

P.F. 200-202°C

$[\alpha]_D^{20} + 43^\circ$ (acetona)

UV (EtOH) 235 (4.18), 280 (4.15), 286 (4.18), 3.37 (3.95),

IR 3430, 1717, 767, 703

RMNP (δ) 0.94, 1.17 (J=7.2), 1.43 (d J=7), 2.27 (m)

5.17 (d J=5.4), 5.36 (d J=10), 5.57 (m J=7, 3.3), 5.96,

6.55 (d J=10), 7.27

RMNP (60MHz) (δ , $CDCl_3$) 0.94 (s 6H), 1.17 (d 3H J=7.2), 1.43

(d 3H J=7), 2.27 (m 1H), 4.43 (m 1H J=7, 3.3), 5.17 (d 1H J=5.4),

5.37 (d 1H J=10), 5.96 (s 1H), 5.55 (d 1H J=10), 7.3 (m 5H)

EM m/z (rel int) 386 (M-H₂O), 371 (M-CH₃-H₂O)

F.N. *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Donnelly D., 1975

Kawazu, et al., 1968

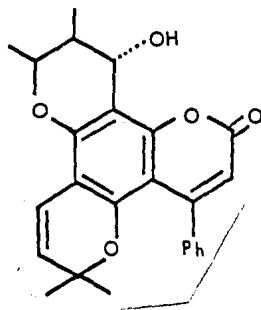
Kawazu, et al., 1968

Donnelly D., 1975

Kawazu, et al., 1968; Warath, et al.,

1977

Kawazu, et al., 1968



CROMANOL 14b

$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

P.F. 200-202°C

$[\alpha]_D^{20} + 35^\circ$ (CHCl₃)

UV (EtOH) 232 (4.23), 277sh (4.15), 286 (4.2), 334 (3.98)

IR 3430, 1717, 767, 703

RMNP (δ) 0.91 (0.97), 1.17 (d J=7), 1.47 (d J=6.8), 2.03

(m J=7.0, 8.9, 7.4), 3.97 (J=6.8, 8.9), 4.79 (d J=7.4), 5.37

(d J=10), 5.96, 6.53 (d J=10), 7.3

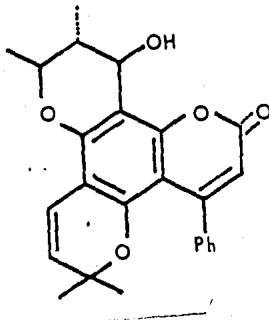
Donnelly D., 1975

Kawazu, et al., 1968

Donnelly D., 1975

Donnelly D., 1975

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



EM m/z (rel int) 386 (M-H₂O), 371 (M-CH₃-H₂O)
F.N. *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Kawazu, *et al.*, 1968
Donnelly D., 1975

CROMANOL 14c

C₂₅H₂₄O₅ PM 404

P.F. 200-202°C

[α]_D²⁰ + 36° (CHCl₃)

UV (EtOH) 233 (4.25), 277sh (4.18), 2 87 (4.23), 335 (4.0)

IR 3430, 1717, 767, 703

RMNP (60MHz) (δ, CDCl₃) 0.83 (d J=7.2), 0.95, 1.43 (J=6.7),
1.99 (m J=7.2, 2.0, 2.0), 4.59 (J=6.7, 2.0), 4.95 (d J=2),
5.36 (d J=10.2), 5.98, 6.59 (d J=10.2), 7.3

RMNP (60MHz) (δ, CDCl₃) 0.91, 0.93 (s 6H), 1.17 (d 3H J=7),
1.43 (d 3H J=6.8), 2.03 (m 1H J=7.0, 8.9, 7.4), 3.97 (m 1H,
J=6.8, 8.9), 5.37 (d 1H J=10), 5.96 (s 1H), 6.53 (d 1H J=10),
7.3 (m 5H),

EM m/z (rel int) 386 (M-H₂O), 371 (M-CH₃-H₂O)
F.N. *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae)

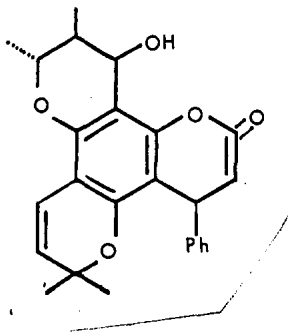
Donnelly D., 1975
Kawazu, *et al.*, 1968

Kawazu, *et al.*, 1968
Donnelly, *et al.*, 1975

Sarath, *et al.*, 1977

Kawazu, *et al.*, 1982
Donnelly D., 1975

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



SOULATTROLIDA 15

$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

P.F. 201-202°C

$[\alpha]_D^{20}$ - 29.6 (CHCl₃)

IR (nujol) 3479, 2936, 2860, 1705, 1640, 1590, 1565, 1470, 1415, Sarath, et al., 1977

1372, 1349, 1310, 1255, 1230, 1200, 1180, 1150, 1140, 1130, 1115,

1062, 1022, 995, 965, 930, 880, 850, 795, 772, 760, 710, 700

RMNP (60MHz) (δ, CDCl₃) 0.93 (s 6H), 1.16 (d 3H J=7.2), 1.44

(d 3H J=7), 1.78 (m 1H J=3.2, 10), 4.31 (m 1H J=7,10), 5.04

(d 1H J=3.2), 5.35 (d 1H J=10), 5.94 (s 1H), 6.53 (d 1H J=10)

7.3 (m 5H).

EM m/z (rel int) 404 (20), 389 (62), 386 (46), 371 (100), 333

Sarath, et al., 1977

(46), 317 (3), 305 (3), 202 (3), 193 (4), 178 (16), 164 (5),

115 (5), 105 (5), 78 (6), 42 (6)

A.E.

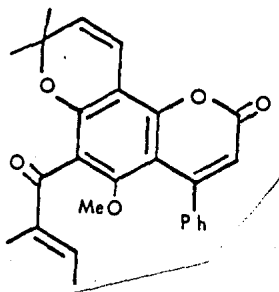
Exp. C 74.3% H 6.15%

Calc. C 74.25% H 6.0%

F.N. *Calophyllum soulattri* (Guttiferae)

Sarath, et al., 1977

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



APETATOLIDA 16

$C_{26}H_{24}O_5$ PM 416

P.F. 203-205°C

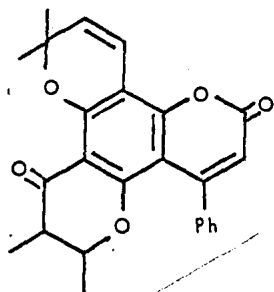
UV 236 (4.53), 275 (4.40)

RMNP (60MHz) (δ , $CDCl_3$), 1.38 (s 1H), 1.92 (d 3H J=7), 1.95 (s 3H), 5.67 (d 1H J=10), 6.05 (s 1H), 6.5 (d 1H J=10), 6.60 (m 1H)

EM m/z (rel int) 405 (M-15), 361 (M-55)

F.N. *Calophyllum apelatatum* (Guttiferae)

Nigam, *et al.*, 1967



TOMENTOLIDA 17

$C_{25}H_{22}O_5$ PM 402

P.F. 201-205°C

UV 237 (4.63), 275-280 (4.5), 350 (3.9)

IR 1740, 1690, 753, 699

RMNP (60MHz) (δ , $CDCl_3$), 0.71 (d 3H J=6), 1.0 (d 3H J=6), 1.49 (s 3H), 1.52 (s 3H), 2.18 (m 1H), 3.78 (m 1H), 5.58 (d 1H J=10), 5.85 (s 1H), 6.78 (d 1H J=10)

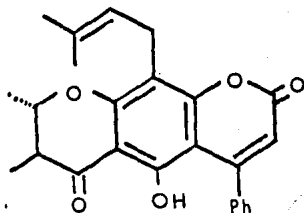
EM m/z (rel int) 387 (M-15), 331 (M-56), 303 (M-15-56-28), 387

F.N. *Calophyllum tomentosum* (Guttiferae)

Nigam, *et al.*, 1967

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

18



$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

P.F. 192-193.5°C

UV (EtOH-OH) 286 (4.2), 337 (3.95)

IR 1718, 1645, 1613

RMNP (s , $CDCl_3$), 1.2 (d 3H J=6), 1.55 (d 3H J=6), 1.68 (br s 3H), 1.85 (br s 3H), 2.6 (m 1H), 3.36 (d 2H J=7), 4.25 (m 1H J=6, 11), 5.25 (t J=7), 5.97 (s 1H), 7.33 (br s 5H), 12.8 (s 1H)

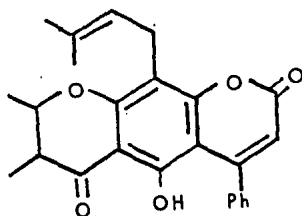
A.E.

Exp. C 74.53% H 6.14%

Calc. C 74.24% H 5.98%

F.N. *Calophyllum australianum* (Guttiferae)

Breck y Stout, 1969



2',3'-TRANS-CALAUSTRALINA 19

$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

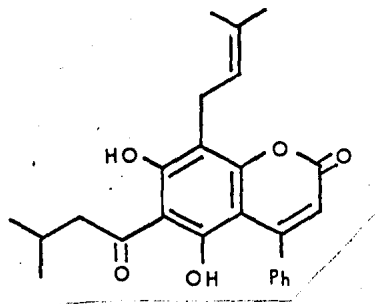
P.F. 197-198°C (190-192°C)

F.H. *Callophyllum inophyllum* (Guttiferae)

Breck y Stout, 1969

Murray, et al, 1982

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



MAMMEISINA (MAMMEA A/AA) 20

$C_{25}H_{26}O_5$ PM 40E

P.F. 98-109°C

P.F. 83-84°C

UV_{max} (EtOH-HCl) 281 (4.41), 338 (4.0)

UV_{min} (EtOH-HCl) 249 (3.96), 317 (4.94)

UV_{max} (EtOH-NaOH) 243 (4.1), 301 (4.15), 427 (4.1)

UV_{min} (EtOH-NaOH) 256 (4.04), 343 (3.43)

UV (MeOH-HCl) 232 inf1 (4.2), 282 (4.47), 336 (4.03)

UV (MeOH-NaOH) 327 inf1 (4.35), 303 (4.26), 390 (3.99)

420 (4.09)

UV (EtOH-HCl) 234 (4.2), 283 (4.39), 330 (3.95)

UV (EtOH-NaOH) 238 (4.27), 302 (4.21), 394 (3.94), 428 (4.07)

UV (CHCl₃) 235 inf1 (4.24), 282.5 (4.34), 330 (3.74)

IR 3460, 1725, 1620, 1585

IR (mul1) 3400, 3360, 1710, 1625, 1580, 1560

IR (CS₂) 3436, 3289, 1730, 1621, 1587

Finnegan, *et al.*, 1961

Crombi, *et al.*, 1967; Carpenter, *et al.*, 1971

Finnegan, *et al.*, 1961

Carpenter, *et al.*, 1971

Crombi, *et al.*, 1967

Donnelly D., *et al.*, 1975

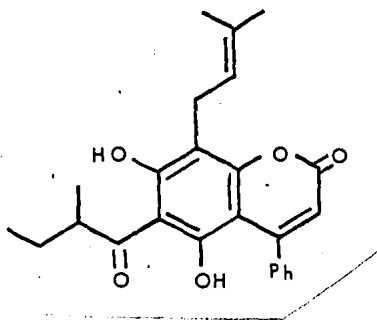
Crombi, *et al.*, 1967

Finnegan, *et al.*, 1961

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

IR (KBr) 1745, 1620, 1597, 766, 698	
IR (CDCl ₃) 3480, 1725, 1620, 1590	Carpenter, <i>et al</i> , 1971
RMNP (δ) 0.9 (d 6H J=7), 1.7 (3H), 1.85 (3H), 2.2 (m 1H), 2.02 (d 2H J=7), 3.44 (d 2H J=7), 5.2 (m 1H), 5.79 (1H), 7.4 (m 5H), 9.8 (1H), 11.07 (1H)	
RMNP (δ, CDCl ₃) 0.9 (J=6.4), 1.69, 1.82, 2.81, 3.42 (J=8) 5.7, 7.29, 9.79, 10.79	Finnegan y Mueller, 1965
RMNP (100MHz) (δ) 0.86 (d 6H J=7), 1.64 (3H), 1.78 (3H), 2.06 (m 1H), 2.73 (d 2H J=6), 3.36 (d 2H J=7), 5.08 (m 1H) 5.68 (1H), 7.3 (5H), 10.87 (OH), 11.02 (1H)	Carpenter, <i>et al</i> , 1971
EM m/z (rel int) 406 (M ⁺ , 85.1), 363 (26.2), 351 (100), 349 (58), 293 (89.3), 265 (4.9)	Crombi, <i>et al</i> , 1967
A.E.	
Exp. C _{74.42%} H _{6.47%}	
Calc. C _{73.86%} H _{6.45%}	
F.N. <i>Mammea africana</i> (Guttiferae)	Carpenter, <i>et al</i> , 1970; 1971
<i>Mammea americana</i> (Guttiferae)	Finnegan, <i>et al</i> , 1961
SIHTESIS	Bala y Seshadri, 1971; Crombi, 1961

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



MAMMEA A/AB. MAB1 21

$C_{25}H_{26}O_5$ PM 406

P.F. 107-108°C

P.F. 106-106°C

UV 233 (4.14), 283 (4.34), 340 (3.77)

UV (EtOH-HCl) 233 (4.14), 283 (4.47), 333 (4.01)

UV (EtOH-KOH) 238 (4.35), 293 (4.31), 394 (3.96), 429 (4.11)

UV (MeOH-HCl) 232 (4.24), 282 (4.47), 336 (4.01)

UV (MeOH-KOH) 237 (4.35), 300 (4.27), 390 (3.97), 422 (4.03)

IR 3450, 1725, 1620, 1585

IR (nu11) 3320, 1705, 1610, 1570

IR 3400, 1720, 1615

RMNP (δ) 0.82 (t 3H J=7), 1.6 (m 2H), 1.7 (d 3H J=7)

1.72 (3H), 1.88 (3H), 3.49 (d 2H J=7), 3.65 (m 1H), 5.22 (m 1H),

5.82 (s 1H), 7.45 (5H), 9.90 (1H), 10.93 (1H)

RMNP (60MHz) (δ , CCl_4) 0.94 (t 3H J=7), 1.07 (d 3H J=7) -1.6

(m 2H), 1.73 (s 3H), 1.89 (s 3H), 3.48 (d 2H J=7), 3.76 (m 1H),

5.29 (t 1H J=7), 5.92 (s 1H), 7.47 (5H), 9.33 (br), 9.33 (s 1H)

A.E.

Exp C 73.85% H 6.45%

Calc C 73.8% H 6.3%

F.N. *Mammea americana* (Guttiferae)

Mammea africana (Guttiferae)

Crombi, *et al.*, 1967; 1966

Carpenter, *et al.*, 1971

Crombi, *et al.*, 1967

Carpenter, *et al.*, 1970; 1971

Crombi, *et al.*, 1967

Carpenter, *et al.*, 1970

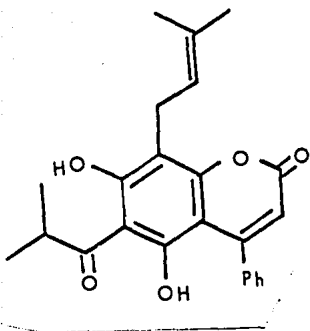
Crombi, *et al.*, 1966; 1967

Carpenter, *et al.*, 1970; 1971

Crombi, *et al.*, 1966; 1967

Carpenter, *et al.*, 1970; 1971

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



MESUOL 22

$C_{24}H_{25}O_5$

P.F. 154°C

UV (EtOH-HCl) 234 (4.17), 2.84 (4.37), 337 (3.97)

UV (EtOH-KOH) 234 (4.33), 303 (4.21), 394 (3.84), 426 (4.03)

RMNP (s) 1.1 (d 6H J=7), 1.75 (s 3H), 1.88 (s 3H), 3.55 (d 2 H J=7), 3.75 (m 1H), 5.28 (m 1H), 5.92 (s 1H), 7.48 (5H), 9.64 (s 1H), 10.94 (s 1H)

EM m/z (rel int) 392 (37.2), 349 (63.4), 337 (12.5), 293 (100), 265 (19)

F.N. *Mesua ferrea* (Guttiferae)

Mammea americana (Guttiferae)

Mammea africana (Guttiferae)

Donnelly D., 1975

Chakraborty y Das, 1966

Crombi, et al, 1967

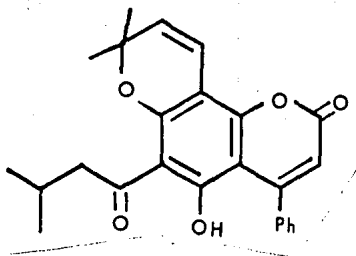
Chakraborty, et al, 1960

Chakraborty y Das, 1966

Baia y Seshadri, 1971

Games et al, 1972

Games, et al, 1972



MANMEIGEN (MAMMEA A/A CICLO D) 23

$C_{25}H_{24}O_5$

P.F. 145-146°C

P.F. 144-146°C (hexano)

P.F. 149-150°C

P.F. 150-151°C

U.V. (EtOH) 234 (4.45), 286 (4.52), 365 (4.11)

Carpenter, et al, 1971

Finnegan y Mueller, 1964

Chakraborty y Chatterji, 1969

Games y Haskins, 1971

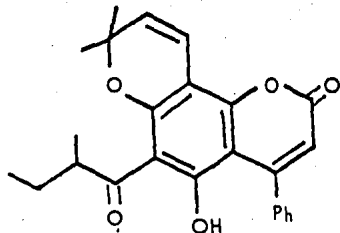
Finnegan y Mueller, 1964

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

UV (EtOH-NaOH) 251 (4.38), 312 (4.41), 438 (3.84)	
UV (EtOH-HCl) 231 (4.56), 285 (4.56), 361 (3.83)	Crombi, <i>et al</i> , 1967
UV (EtOH-KOH) 225 (4.45), 252 (4.4), 312 (4.36), 417 (3.76)	
UV 233 (4.47), 286 (4.52), 345 (3.86)	
IR (KBr) 3440, 1746, 1644, 1613, 1126, 773, 708	Finnegan y Mueller, 1964
IR (KBr) 3400, 1740, 1639, 1613, 1380, 706	Chakraborty y Chatterji, 1969
IR (mu11) 1740, 1640, 1605, 1585	Crombi, <i>et al</i> , 1967
IR 1725, 1640, 1615, 1580	
RMNP (δ , CDCl ₃) 0.94 (d 6H J=6.4), 1.52 (s 6H), 1.67-2.28 (m 1H), 2.86 (d 2H J=6.9), 5.41 (d 1H J=10), 5.66 (s 1H) 6.67 (d 1H J=10), 7.06 (s 5H), 14.17 (s 1H)	Finnegan y Mueller, 1964
RMNP (δ) 0.93 (d 6H J=7), 1.54 (6H), 2.0 (m 1H), 2.93 (d 2H J=7), 5.59 (d 1H J=12), 5.98 (1H), 6.6 (d 1H J=12), 7.36 (m 5H), 14.75 (1H)	Crombi, <i>et al</i> , 1967
A.E.	
Exp C _{74.34,74.04%} H _{6.15,6.34%}	Finnegan y Mueller, 1964
Calc C _{74.24%} H _{5.98%}	
F.N. <i>Mammea americana</i> (Guttiferae)	Finnegan y Mueller, 1964, 1965
	Crombi, <i>et al</i> , 1972
<i>Mammea africana</i> (Guttiferae)	Games, 1972
<i>Mesua ferrea</i> (Guttiferae)	Chakraborty y Chatterji, 1969

Tabla 2 4 Fenil-coumarinas. (Continuación).

SINTESIS



MAB 5 24

$C_{25}H_{24}O_5$ PM 404

P.F. 78-80°C

P.F. 89.4-92°C

UV (MeOH-HCl) 233 (4.36), 286 (4.46), 335 (3.76)

UV (MeOH-KOH) 250 (4.3), 310 (4.3), 430 (3.69)

IR 3400, 1720, 1615

RMNP (60MHz) (δ , $CDCl_3$) 0.91 (t 3H J=7), 1.18 (d 3H J=7)

-1.6 (m 2H), 1.52 (s 6H), 3.69 (m 1H), 5.64 (d 1H J=10)

6.0 (s 1H), 6.92 (d 1H J=10), 7.4 (s 1H), 14.72 (s 1H), 14.83 (s 1H)

F.N. *Mammea africana* (Guttiferae)

Chakraborty y Chatterji, 1969

Finnegan y Merkel, 1972

Bala y Seshadri, 1971

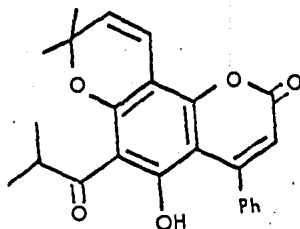
Carpenter, *et al.*, 1971

Games y Haskins, 1971

Carpenter, *et al.*, 1971

Games y Haskins, 1971

Carpenter, *et al.*, 1970, 1971



MESUAGIN 25

$C_{24}H_{22}O_5$ PM 390

P.F. 152-153°C (Hexano)

UV 235 (4.31), 285-286 (4.40), 362 (3.79)

UV 233 (4.44), 286 (4.53), 348-350 (3.82)

IR (KBr) 3400, 1739, 1653, 1613, 1378, 709

Carpenter, *et al.*, 1970, 1971

Games, 1972

Chakraborty y Chatterji, 1969;

Bala y Seshadri, 1971

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación)

RMNP (δ , CDCl_3) 1.25 (d 6H J=10), 1.58 (s 6H), 3.73 (m 1H)
5.62, 5.97 (s 1H), 6.28 (d 1H J=10), 7.33 (m 5H), 14.63 (s 1H)
A.E.

Exp C 73.83% H 5.68%
Calc C 73.68% H 5.84%
F.N. *Mammea americana*
Mesua ferrea

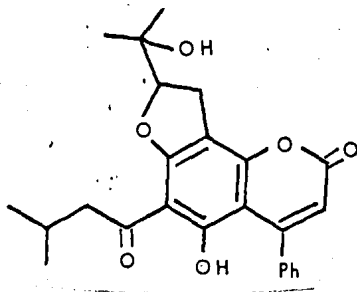
SINTESIS

Chakraborty y Chatterji, 1969

Games, 1972

Chakraborty y Chatterji, 1969

Bala y Seshadri, 1971



MAMMEA A/AA CICLO C. CICLOMAMEISIN 26

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$ PM 422

P.F. 115-117°C

P.F. 148-150°C

UV (EtOH-HCl) 232 (4.11), 282 (4.39), 348 (4.01)

UV (EtOH-KOH) 249 (4.21), 280 (4.05), 316 (4.05), 428 (3.95)

UV (EtOH-HCl) 232 (4.14), 282 (4.04), 351 (4.03)

UV (EtOH-NaOH) 242 (4.30), 282 (4.14), 318 (4.13), 432 (4.01)

IR (nu11) 3460, 3420, 1715, 1610

IR (CCl_4) 1725, 1615

IR (KBr) 3509, 3003, 1727, 1639, 1595, 1443, 1395, 1232, 1149
1111, 768

RMNP (100MHz) (δ) 0.96 (d 6H J=8), 1.31 (s 3H), 1.43 (s 3H)

1.8 (s 1H), 2.2 (m 1H), 2.9 (m 2H), 3.31 (d 2H J=9), 4.91

(t 1H J=9), 5.91 (s 1H), 7.36 (m 5H), 14.46 (s 1H)

Crombi, et al, 1970

Crombi, et al, 1972

Finnegan y Merkel, 1972

Donnelly D., 1975

Finnegan y Merkel, 1972

Crombi, et al, 1970

Crombi, et al, 1972

Finnegan y Merkel, 1972

Crombi, et al, 1970

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

RMNP (δ , CDCl_3) 0.98 (s 6H J=6.5), 1.32 (s 3H), 1.49 (s 3H),
1.8-2.5 (m 1H J=6.5), 2.93 (m 2H), 3.11 (s 1H), 3.32 (d, 2H
J=9), 4.93 (t 1H J=9), 5.72 (s 1H), 7.31 (m 5H), 1492 (s 1H)
EM m/z (rel int) 422 (M^+ , 100), 365 (76), 363 (44), 293 (89),
307 (53), 347 (14)

A.E.

Exp C 71.12% H 6.3%

Calc C 71.05% H 6.2%

F.N. *Mammea americana* (Guttiferae)

SINTESIS

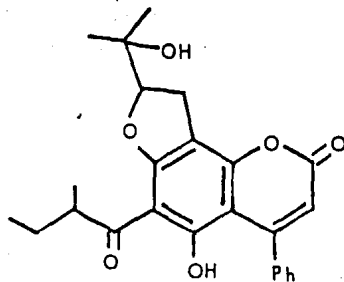
Finnegan y Merkel, 1972

Crombi, et al, 1972

Crombi, et al, 1970

Finnegan y Merkel, 1972

Crombi, et al, 1970



MAMMEA A/AB CICLO C. TAB 3 27

$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$ PM 422

P.F. 115-117°C

P.F. 134°C (desc.)

UV (MeOH-HCl) 229 (4.25), 281 (4.48), 345 (4.03)

UV (MeOH-KOH) 240 (4.23), 282 (4.14), 320 (4.33), 424 (3.92)

UV (EtOH-HCl) 228 (4.20), 280 (4.38), 347 (3.97)

UV (EtOH-KOH) 247 (4.20), 312 (4.05), 425 (3.96)

IR (nu_{11}) 3400, 1735, 1715, 1620

IR 1725, 1615, 1520

Crombi, et al, 1970, 1972

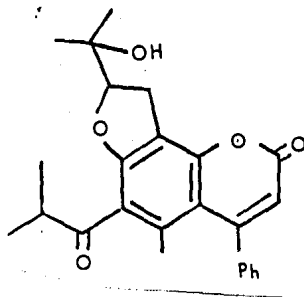
Carpenter, et al, 1970

Carpenter, et al, 1971

Crombi, et al, 1972

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

<p>RNMP (100MHz) (δ) 0.89 (t 3H J=7), 1.15 (dd 3H J=7,2), 1.31 (s 3H), 1.43 (s 3H), 1.6-1.8 (m 2H), 1.8 (s 1H), 3.31 (d 2H J=9), 3.65 (m 1H), 4.91 (t 1H J=9), 5.91 (s 1H), 7.36 (m 5H), 14.46 (s 1H)</p> <p>RNMP (100MHz) (δ, CDCl_3) 0.86 (t 3H J=7), 1.1 (d 3H J=7), 1.26 (s 3H), 1.38 (s 3H), -1.5 (m 2H), 3.3 (d 2H J=10), 3.54 (m 1H), 4.8 (t 1H J=10), 5.67 (s 1H), 7.16 (5H), 14.42 (s 1H), 14.55 (s 1H)</p> <p>EM m/z (rel int) 422 (M^+, 70), 365 (90), 363 (40), 347 (34) 293 (100)</p> <p>A.E.</p> <p>Exp C 70.5% H 6.3%</p> <p>Calc C 75.05% H 6.2%</p> <p>F.N. <i>Mammea americana</i> (Guttiferae) <i>Mammea africana</i> (Guttiferae)</p> <p>SINTESIS</p>	<p>Crombi, <i>et al</i>, 1970; 1972</p> <p>Carpenter, <i>et al</i>, 1970; 1971</p> <p>Carpenter, <i>et al</i>, 1971</p> <p>Crombi, <i>et al</i>, 1970; 1972</p> <p>Carpenter, <i>et al</i>, 1970; 1971</p> <p>Crombi, <i>et al</i>, 1972</p>
---	--



28
 $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{O}_6$ PM 409
 F.N. *Mammea americana* (Guttiferae)

Crombi, *et al*, 1972

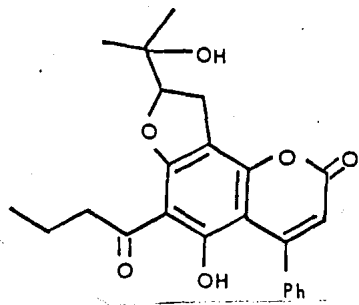
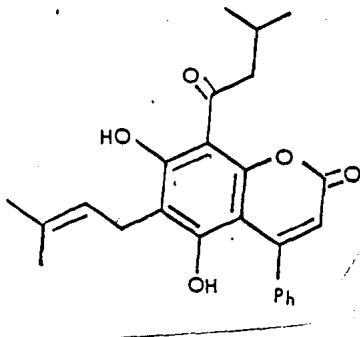


Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

$C_{24}H_{25}O_6$ PM 409
F.N. *Mammea americana*

Crombi, *et al*, 1972



MAMMEA A/BA, 30

$C_{25}H_{26}O_5$ PM 406

P.F. 125-126°C (hexano)

UV (EtOH-HCl) 225 (4.46), 294 (4.36), 332 (4.25)

UV (EtOH-KOH) 233 (4.40), 261 (4.19), 337 (4.1)

UV 227 (4.43), 234 (4.43), 270 (4.17)

UV 297 (4.24), 335 (4.37)

IR 3480, 1723, 1610, 1595

IR (mull) 3470, 1735, 1615, 1590

RHNP (δ) 1.04 (d 6H J=7), 1.63 (s 3H), 1.68 (s 3H), 2.2 (m 1H)

3.19 (d 2H J=7), 3.8 (d 2H J=7), 5.03 (m 1H), 5.79 (s 1H),

5.9 (s 1H), 7.43 (s 5H), 14.53 (s 1H)

A.E.

Exp $C_{73.55\%}$ $H_{6.4\%}$

Calc $C_{73.85\%}$ $H_{6.45\%}$

Crombi y Games, 1966; Crombi, *et al*, 1967

Crombi y Games, 1966

Crombi, *et al*, 1967

Crombi, *et al*, 1967

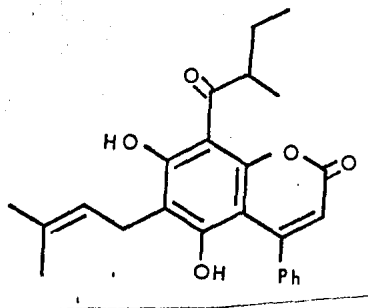
Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

F.N. *Mammea americana* (Guttiferae)

Crombi y Games, 1966

Mammea africana (Guttiferae)

Crombi, et al, 1967



MAMMEA A/BB 31

$C_{25}H_{26}O_5$ PM 406

P.F. 124-125°C (hexano)

UV 235 (4.43), 295 (4.28), 335 (4.31)

Crombi, et al, 1967

UV (EtOH-HCl) 227 (4.45), 294 (4.38), 333 (4.24)

Crombi, et al, 1966

UV (EtOH-KOH) 234 (4.39), 263 (4.19), 337 (4.58)

IR 3485, 1725, 1615, 1600, 1555

Crombi, et al, 1967

IR (mull) 3440, 1725, 1615, 1595

RMNP 1.02 (t 3H J=7), 1.26 (d 3H J=7), 1.6 (m 2H)

Crombi, et al, 1966; 1957

1.64 (3H), 1.7 (3H), 3.2 (d 2H J=7), 3.87 (m 1H),

5.1 (m 1H), 5.82 (1H), 7.56 (5H), 14.51 (1H)

A.E.

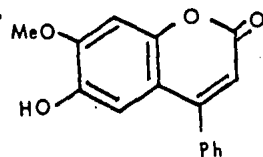
Exp $C_{73.85\%}$ $H_{6.45\%}$

Calc $C_{73.3\%}$ $H_{6.45\%}$

F.N. *Mammea americana* (Guttiferae)

Crombi, et al, 1966; 1967

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



DALBERGINA 11

$C_{16}H_{12}O_4$

P.F. 214-216°C

P.F. 212-214°C

P.F. 209-210°C

UV (MeOH) 237 (4.23), 260 (4.05), 301 (3.85), 355 (4.0)

IR (KBr) 1660, 1728

IR (CHCl₃) 3236, 1695, 1631, 1710

IR 3200, 1680, 1610, 1540, 1505, 1450

RMNP (DMSO-d₆) 3.92 (s 3H), 6.2 (s 1H), 6.88 (s).

7.13 (s 1H), 7.56 (s anillo B), 9.5 (s 1H)

F.N. *Dalbergia sissoo* (Leguminosae)

Dalbergia latifolia (Leguminosae)

Dalbergia melanoxylon (Leguminosae)

Dalbergia nigra (Leguminosae)

Dalbergia miscolobium (Leguminosae)

Dalbergia spruceana (Leguminosae)

Dalbergia violaceae (Leguminosae)

Dalbergia cearensis (Leguminosae)

Dalbergia boroni (Leguminosae)

Dalbergia cultrata (Leguminosae)

Donnelly, et al, 1973

Donnelly, et al, 1968

Ahluwalia y Seshadri, 1957; Ollis,
et al, 1978; Eyton, et al, 1965

Donnelly, et al, 1973

Ahluwalia y Seshadri, 1957

Donnelly, et al, 1973

Ahluwalia y Seshadri, 1957

Dhingra, et al, 1971

Donnelly, et al, 1966

Greyson, et al, 1978

Ollis, 1966

Ollis, 1966; Greyson, et al, 1968

Ollis, 1966

Donnelly, et al, 1968

Donnelly, et al, 1972

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

Macherium scleroxylon (Leguminosae)

Macherium pedicellatum (Leguminosae)

SINTESIS

METILDALBERGINA 32

$C_{17}H_{14}O_4$ PM 282

P.F. 142-143°C

P.F. 145-146°C

A.E.

Exp C 72.9% H 5.1%

Calc C 72.4% H 5.0%

F.N. *Dalbergia sissoo* (Leguminosae)

Dalbergia latifolia (Leguminosae)

Macherium scleroxylon (Leguminosae)

Macherium pedicellatum (Leguminosae)

Eyton, et al, 1965

Ogiyama y Yasue, 1973

Ahluwalia y Seshadri, 1957;

Donnelly, et al, 1975

Donnelly, et al, 1968

Ahluwalia y Seshadri, 1957; Eyton,
et al, 1965

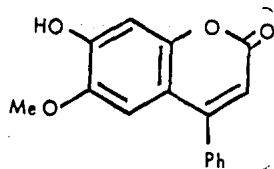
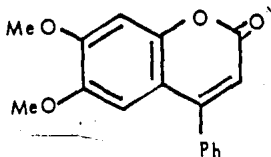
Mukerjee, et al, 1971

Dhingra, et al, 1971

Eyton, et al, 1965

Ogiyama y Yasue, 1973

Ahluwalia y Seshadri, 1957



ISODALBERGINA 33

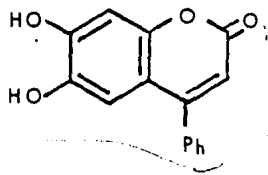
$C_{16}H_{12}O_4$

PF. 195-196°C

F.N. *Dalbergia sissoo* (Leguminosae)

Mukerjee, et al, 1971

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



NORDALBERGINA 34

$C_{15}O_{10}O_4$ PM 254

P.F. 268-269°C

P.F. 267-268°C

A.E.

Exp C 70.5% H 3.7%

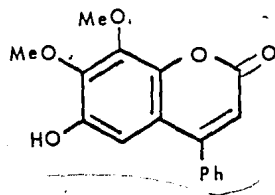
Calc C 70.9% H 3.9%

F.N. *Dalbergia sissoo* (Leguminosae)

SINTESIS

Mukerjee, *et al.*, 1971

Ahluwalia y Seshadri, 1957



KUHLMANNINA 35

$C_{17}H_{14}O_5$ PM 298

P.F. 211°C (metanol)

UV (EtOH) 214 (4.39), 300 (3.81)

IR (CHCl₃) 3500, 1710, 1555, 1395

RMNP (60MHz) (δ, CDCl₃) 4.08 (s 3H), 4.11 (s 3H), 4.27

(s 1H), 6.3 (s 1H), 6.77 (s 1H), 7.49 (s 5H)

A.E.

Exp C 68.61% H 4.64%

Calc C 68.45% H 4.73%

F.N. *Machaerium kuhlmannii* (Leguminosae)

Machaerium nictitans (Leguminosae)

Machaerium pedicellatum (Leguminosae)

SINTESIS

Ollis, *et al.*, 1968

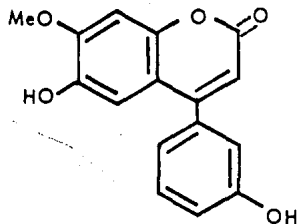
Ollis, *et al.*, 1978

Ollis, *et al.*, 1968; 1978

Ogiyama y Yasue, 1973

Ollis, *et al.*, 1978; Donnelly, *et al.*, 1975

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación)



STEVENINA 36

C₁₆H₁₂O₅ PM 284

P.F. 250-254°C

Donnelly, et al, 1973

UV (MeOH) 222 inf1 (4.74), 284 (4.14), 340 (4.05)

UV (MeONa) 252 (4.49), 312 (3.97), 397 (4.08)

UV (AcONa) 301 (4.09), 356 (3.98)

IR (KBr) 3289, 1669, 1621, 1728

IR (CHCl₃) 1707, 1711

RMNP (δ, (CD₃)₂SO) 3.92 (s 3H), 6.5 (s 1H), 6.9-7.53 (m aromático)
9.52 (s 1H)

EM m/z (rel int) 284 (M⁺, 100)

A.E.

Exp C 67.6% H 4.3%

Calc C 67.4% H 4.4%

F.N. *Dalbergia stevensonii* (Leguminosae)

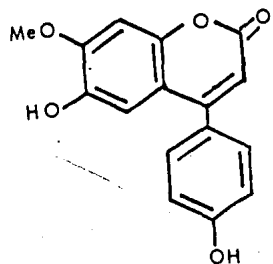
Dalbergia cultrata (Leguminosae)

Donnelly, et al, 1972

SINTESIS

Donnelly, et al, 1973

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



MELANNINA 37

Melanettina

C₁₆H₁₂O₅ PM 284

P.F. 233-234°C (acetona)

UV (MeOH) 230 (4.5), 263 (4.09), 312 (4.27), 350 (4.21)

IR (KBr) 3430, 1660

F.N. *Dalbergia melanoxylon* (Leguminosae)

SINTESIS

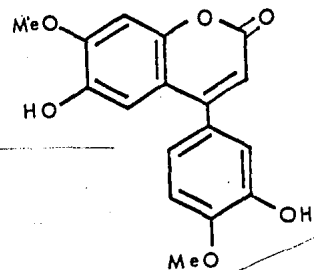
Donnelly, 1975

Murray, *et al*, 1982

Donnelly, *et al*, 1975a

Donnelly, 1971

Donnelly, *et al*, 1975a



MELANNEINA 38

C₁₇H₁₄O₆ PM 314

P.F. 221-223°C (etanol)

P.F. 220.5-222°C

UV (EtOH) 234 (4.38)sh, 256 (4.17)sh, 308 (4.0)sh, 344 (4.09)

IR (KBr) 3280, 2950, 1664, 1616, 1536, 1504, 1495, 1374, 1244,

1174, 1138, 1026, 817

RMNP (δ, DMSO-d₆) 2.5-3.8 (m 2H), 3.5 (s 3H), 3.8 (s, 3H);

6.1 (s 1H), 6.9-7.18 (m 5H)

EM m/z (rel int) 299, 286, 271, 243

A.E.

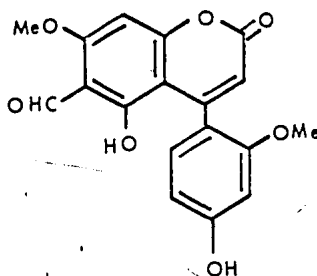
Exp C_{65.1%} H_{4.4%} OMe_{19.8%}

Donnelly, *et al*, 1966

Donnelly, *et al*, 1969

Donnelly, *et al*, 1968

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



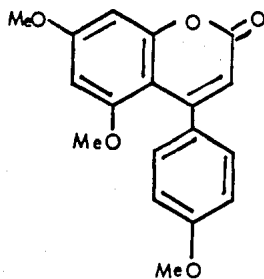
Calc C 65.0% H 4.5% OMe 19.8%
 F.N. *Dalbergia melanoxylon* (Leguminosae)
Dalbergia baroni (Leguminosae)

Donnelly, *et al.*, 1975a
 Donnelly, *et al.*, 1966
 Donnelly, *et al.*, 1968; 1966; 1973

SINTESIS

SISAFOLINA 39
 $C_{18}H_{14}O_7$ PM 342
 P.F. 259-260°C
 F.N. *Dalbergia latifolia* (Leguminosae)

Donnelly D., 1975



5,7,4'-TRIMETOXY-4-FENILCOUMARINA 40

$C_{18}H_{16}O_5$ PM 312
 P.F. 150-152°C (EtOH)
 P.F. 151-152°C (EtOH)
 UV (MeOH) 250 (4.07), 325 (4.29)
 IR (CHCl₃) 1710, 1610, 1595, 1510, 1158, 1111, 1052, 952,
 872, 860, 830
 RMNP (50MHz) (δ , CDCl₃) 3.46 (s 3H), 3.83 (s 6H), 5.96 (s 1H),
 6.22 (d 1H J=2.5), 6.5 (d 1H J=2.5), 6.87 (d 2H J=8.5), 7.20
 (d 2H J=8.5)

Monache, *et al.*, 1983

Monache, *et al.*, 1985

Monache, *et al.*, 1983

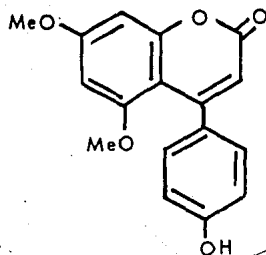
Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

EM m/z (rel int) 312 ($[M]^+$, 80), 284 ($[M-CO]^+$, 100^a), 269
 ($[M-MeCO]^+$, 37), 241 ($[M-43-CO]^+$, 2)

F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

SINTESIS

Mohache, *et al.*, 1985



4'-HIDROXI-5,7-DIMETOXI-4-FENILCOUMARINA, 41

C₁₇H₁₄O₅

P.F. 214-215°C (metanol)

UV (MeOH) 256 (4.04), 324 (4.22)

UV (MeONa) 250, 368

IR (CHCl₃) 1708, 1612, 1598, 1512, 1159, 1112, 1054, 952, 870,
 960, 832

RMNP (60MHz) (δ, (CD₃)₂CO) 3.53 (s 3H), 3.91 (s 3H), 5.80

(s 1H), 6.37 (d 1H J=2.5), 6.51 (d 1H J=2.5), 6.82 (d 2H J=8.5),
 7.14 (d 2H J=8.5), 8.5 (s 1H)

Δδ = δ C₅D₅N - δ (CD₃)₂CO = H₂, + H₆, (+0.19), H₃, H₅, (+0.32),
 H₈ (+0.11), H₆ (+0.01), H₃ (+0.38), OMe₇ (-0.16), OMe₅ (-0.23)

EM m/z (rel int) 298 ($[M]^+$, 100), 270 ($[M-CO]^+$, 82), 255
 ($[M-MeCO]^+$, 29), 227 ($[M-43-CO]^+$, 15)

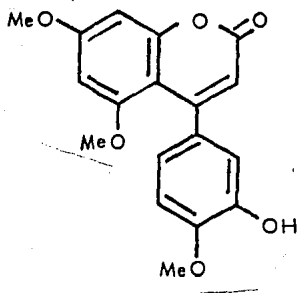
F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

SINTESIS

Monache, *et al.*, 1983

Monache, *et al.*, 1985

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



3'-HIDROXI-5,7,4-TRIMETOXI-4-FENILCOUMARINA 42

Monache, et al., 1983

$C_{18}H_{16}O_5$ PM 328

P.F. 153-154°C (EtOH)

UV (MeOH) 252 (4.13), 329 (4.32)

UV (MeONa) 250, 288sh, 329, 400sh

IR (CHCl₃) 3525, 1710, 1615, 1597, 1510, 1158, 1111, 1052, 945, 909, 859, 828

RMNP (δ, C₅D₅N) 7.21 (d 1H J=2), 6.84 (dd 1H J=2, 9), 7.03 (d 1H J=9)

RMNP (δ, CDCl₃) 3.43 (s 3H), 3.78 (s 3H), 3.86 (s 3H), 5.87 (s 1H), 5.92 (s 1H), 6.9-6.60 (compleja)

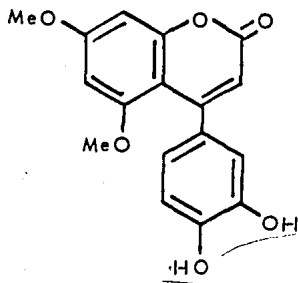
EM m/z (rel int) 328 ([M]⁺, 100), 300 ([M-CO]⁺, 51), 285 ([M-MeCO]⁺, 31), 257 ([M-43-CO]⁺, 17)

F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

SINTESIS

Monache, et al., 1985

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



3',4'-DIHIDROXI-5,7-DIMETOXI-4-FENILCOUMARINA 43

$C_{17}H_{14}O_6$

P.F. 211-212°C (MeOH)

P.F. 210-212°C (MeOH)

UV (MeOH) 253, 285sh, 326, 438

IR (CHCl₃) 3600, 3540, 3260, 1707, 1611, 1595, 1513, 1158, 1111, 1052, 945, 910, 872, 858, 828

RMNP (δ , (CD₃)₂CO) 3.55 (s 3H), 3.92 (s 3H), 5.85 (s 1H), 6.38 (d 1H J=2.5), 6.53 (d 1H J=2.5), 6.98-6.68 (compleja)

RMNP (δ , C₅D₅N) 6.96 (d 1H J=6.96), 7.23 (dd 1H J=2,9), 7.28 (d 1H J=9)

EM m/z (rel int) 314 ([M]⁺, 100), 286 ([M-CO]⁺, 98), 271

([M-MeCO]⁺, 20), 243 ([M-43-CO]⁺, 4)

F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

SINTESIS

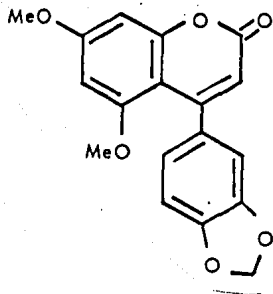
Monache, *et al*, 1983

Monache, *et al*, 1985

Monache, *et al*, 1983

Monache, *et al*, 1985

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



5,7-DIMETOXI-3',4'-METILENDIOXI-4-FENILCOUMARINA 44

C₁₈H₁₄O₆ PM 326

P.F. 194-195°C (EtOH) (sub)

P.F. 194-195° (EtOH)

UV (MeOH) 248 (4.07), 328 (4.42)

IR (CHCl₃) 1710, 1613, 1595, 1505, 1157, 1110, 1052, 1039,

938, 904, 858, 810

RMNP (60MHz) (δ, CDCl₃) 3.47 (s 3H), 3.83 (s 3H), 5.93 (s 1H),

5.95 (s 3H), 6.19 (d 1H J=2.5), 6.46 (d 1H J=2.5), 6.85-6.75
(m 3H)

EM m/z (rel int) 326 ([M]⁺, 81), 298 ([M-CO]⁺, 100), 284

([M-Me-CO]⁺, 13), 255 ([M-43-CO]⁺, 4)

F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

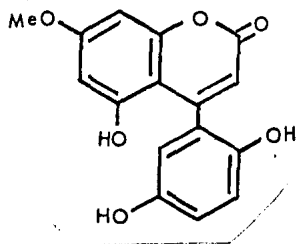
SINTESIS PARCIAL

Monache, et al, 1984

Monache, et al, 1985

Monache, et al, 1984; 1985

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



2',5',5'-TRIHIDROXI-7-METOXI-4-FENILCOUMARINA 45

Reher, *et al.*, 1983

$C_{16}H_{12}O_6$ PM 300

P.F. 208-210°C (Incorr.)

UV (MeOH) 260, 328

IR (KBr) 3350, 1675, 1630, 1175, 1165, 1085

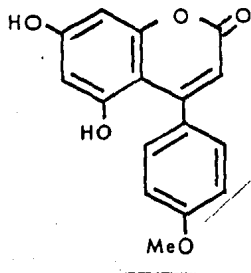
RMNP (400MHz) (δ , $(CD_3)_2CO$), 5.83 (1H), 6.32 (1H), 6.48 (1H),
6.78 (1H), 6.87 (1H), 6.90 (1H)

RMNC¹³ (100.6MHz) (δ , $DMSO-d_6$ - $CDCl_3$, 7:3) 55.5, 92.9, 98.2,
102.1, 110.6, 114.6, 115.5, 118.8, 130.4, 144.1, 145.6, 156.1,
156.8, 157, 159.8, 162.6

EM m/z (rel int) 300 ($[M]^+$, 87), 299 (11), 273 (16), 272
($[M-CO]^+$, 100, H.R.), 257 ($[M-(CO+Me)]^+$, 25 H.R.), 243 (9),
137 (9)

F.N. *Coutarea hexandra* (Rubiaceae)

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



5,7-DIHIIDROXI-4'-METOXI-4-FENILCOUMARINA 46

Monache, *et al.*, 1985

$C_{16}H_{12}O_5$ PM 284

P.F. 263-265°C (MeOH)

UV (MeOH) 262 (4.0), 320 (4.03)

UV (MeONa) 276, 312, 381

IR (KBr) 3320, 3190, 1688, 1678, 1630, 1595, 1548, 1510

RMNP (δ , $(CD_3)_2CO$) 3.82 (s 3H), 5.76 (s 1H), 6.28 (d 1H J=2.5),

6.35 (d 1H J=2.5), 6.93 (d 2H J=8.5), 7.32 (d 2H J=8.5)

EM m/z (rel int) 284 ($[M]^+$, 100), 283 (22), 256 (95), 255 (11),

241 (39), 227 (9), 142 (13), 128 (23)

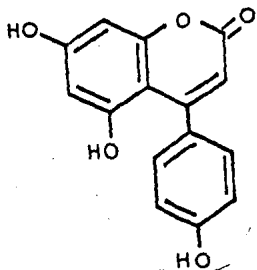
A.E.

Exp $C_{67.69\%}$ $H_{4.22\%}$

Calc $C_{67.6\%}$ $H_{4.26\%}$

SINTESIS

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



5,7,4'-TRIHIIDROXI-4-FENILCOUMARINA 47

Monache, *et al*, 1985

$C_{15}H_{10}O_5$ PM 270

P.F. 294-295°C (dec, $CHCl_3$ -MeOH)

UV (MeOH) 262 (4.0), 324 (4.18)

UV (MeONa) 275, 305, 373

IR (KBr) 3510, 3235, 1662, 1590, 1550, 1510

RMNP (δ , $(CD_3)_2CO$) 5.74 (s 1H), 6.35 (s 2H), 6.83 (d 2H J=8.5),
7.22 (d 2H J=8.5)

EM m/z (rel int) 270 (M^+ , 100), 269 (22), 242 (88), 24 (9),
226 (8), 213 (32), 197 (11), 135 (6), 121 (5), 106.5 (4)

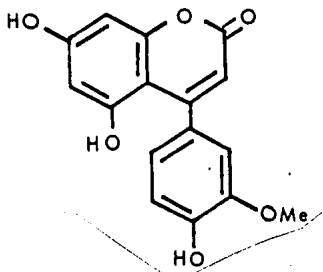
A.E.

Exp C 66.82% H 3.66%

Calc C 66.67% H 3.73%

SINTESIS

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



5,7,4'-TRIHIDROXI-3'-METOXI-4-FENILCOUMARINA 48

Monache, *et al.*, 1985

$C_{16}H_{12}O_6$ PM 300

P.F. 297-298°C (MeOH)

UV (MeOH) 260 (4.17), 330 (4.32)

UV (MeONa) 250, 275, 388

IR (KBr) 3410, 3290, 1688, 1595, 1560, 1508

RMNP (δ , C_5D_5N) 3.81 (s 3H), 6.22 (s 1H), 6.80 + 6.72

(d+d 1H+1H J=2.5), 7.40-7.20 (m 3H), 10.40 (br 3H 30H)

EM m/z (rel int) 300 ($[M]^+$, 100), 299 (8), 285 (4), 272

(91), 257 (12), 239 (7), 229 (14), 211 (7), 150 (2), 136 (4),

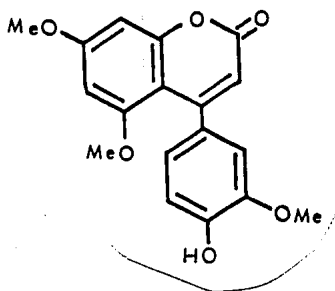
128.5 (3), 114.5 (7)

A.E.

Exp $C_{64.12\%}$ $H_{3.96\%}$

Calc $C_{64.00\%}$ $H_{4.03\%}$

SINTESIS



4'-HIDROXI-5,7,3'-TRIMETOXI-4-FENILCOUMARINA 49

Monache, *et al.*, 1985

$C_{18}H_{16}O_6$ PM 328

P.F. 174-175°C (Et₂O)

SINTESIS

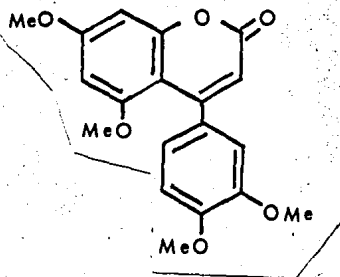


Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).

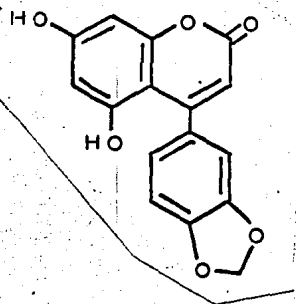
5,7,3',4'-TETRAMETOXI-4-FENILCOUMARINA 50

$C_{19}H_{18}O_6$ PM 342

P.F. 170-171°C.

SINTESIS

Monache, *et al.*, 1985



5,7-DIHIROXI-3',4'-METILENDIOXI-4-FENILCOUMARINA 51

$C_{16}H_{10}O_6$ PM 298

P.F. 268-269°C (dec Et_2O -MeOH)

UV (MeOH) 254 (4.09), 329 (4.22)

IR (KBr) 3490, 3240, 1672, 1625, 1610, 1570, 1500

RMNP (δ , $(CD_3)_2CO$) 5.76 (s 1H), 5.94 (s 2H), 6.23 (d 1H J=2),

6.32 (d 1H J=2), 6.90 (br s 3H)

EM m/z (rel int) 298 ($[M]^+$, 88), 270 (100), 241 (13),

240 (6), 212 (14), 211 (8), 184 (15), 155 (10), 149 (5), 135 (5),

134.5 (10), 134 (5), 120 (9)

A.E.

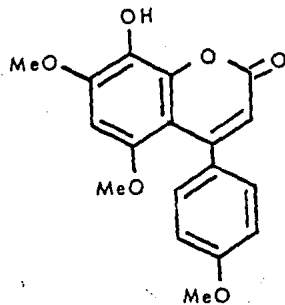
Exp C 64.64% H 3.34%

Calc C 64.43% H 3.38%

SINTESIS

Monache, *et al.*, 1985

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



EXOSTEMINA 2

$C_{18}H_{16}O_6$ PM 328

P.F. 173-174°C

P.F. 195-196°C

UV (MeOH) 271, 319

IR (nujol) 3450, 1730

IR (CHCl₃) 3650, 1720, 1460, 1320, 1250, 1175, 1115, 1021

RMNP (δ) 3.43 (3H), 3.85 (3H), 3.97 (3H), 5.51 (s 1H), 6.00 (s 1H), 6.35 (s 1H), 7.06 (4H)

RMNP (60MHz) (δ , CDCl₃) 3.43 (3H), 3.85 (3H), 3.97 (3H), 5.98 (1H), 6.35 (1H), 7.06 (1H)

A.E.

Exp C_{66%} H_{5.1%} O_{29.2%}

Calc. C_{65.9%} H_{4.9%} O_{29.2%}

F.N. *Exostema caribaeum* (Rubiaceae)

SINTESIS

Sánchez-Viesca, 1969

Sánchez-Viesca, *et al.*, 1967

Mukerjee, *et al.*, 1968

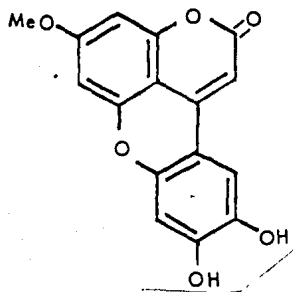
Sánchez-Viesca, *et al.*, 1967; 1969

Sánchez-Viesca, 1969

Sánchez-Viesca, *et al.*, 1967

Mukerjee, *et al.*, 1968

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación)



7-METOXI-4',5'-DIHIDROXI-4-FENIL-5,2'-OXIDOCUMARINA 52

Reher y Krauss, 1984

$C_{16}H_{10}O_6$ PM 298

P.F. 335-342°C (descomp.)

UV (MeOH) 260, 310, 371sh, 389; + $AlCl_3$ 389sh, 403; + $AlCl_3/HCl$
260sh, 310, 370, 389sh

IR (KBr) 3480, 3300, 1710, 1615

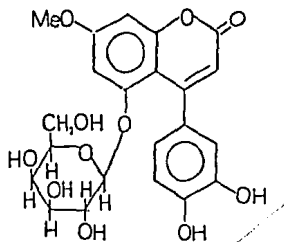
RMNP (400MHz) (δ , DMSO- d_6) 386 (s 3H), 6.07 (s 1H), 6.71 (d 1H
J=2.2), 6.74 (d 1H J=2.2), 6.76 (s 1H), 7.32 (s 1H)

RMNC¹³ (62.89MHz) (δ , DMSO- d_6) 56.02, 92.37, 95.97, 96.41, 99.72,
103.22, 106.13, 109.03, 141.17, 143.69, 146.44, 150.59, 152.25,
154.46, 160.91, 162.99

EM m/z (rel int) 298 ($[M]^+$, 100), 270 ($[M-CO]^+$, 49, H.R.)
242 (70)

F.N. *Coutarea latiflora* (Rubiaceae)

Tabla 2. 4 Fenil-coumarinas naturales. (Continuación).



5-O- β -D-GALATOSIL-7-METOXI-3',4'-DIHIDROXI-4-FENILCOUMARINA 3

Mata, et al, 1987

$C_{22}H_{22}O_{11}$ PM 462

P.F. 228-231°C

UV (MeOH) 208, 225, 330

IR (KBr) 3650, 3334, 3403, 1719.06, 1613.99, 1422.8, 1365.75,
1160, 1049.49, 846.90

RMNP (80MHz) (δ , DMSO- d_6) 3.5 (m 4H OH), 2.9-3.6 (m 6H),
3.85 (s 3H), 4.75 (d 1H J=7), 5.82 (s 1H), 6.6-6.85 (m 5H),
9.25 (s 3H OH)

RMNP (80MHz) (δ , C_5H_5N) 3.67 (s 3H), 4-4.5 (m 6H), 5.26
(d 1H J=7), 6.20 (s 1H), 6.57 (d 1H J=2.5), 6.92 (dd 1H
J=8,2.5), 7.08 (d 1H J=2.5), 7.20 (d 1H J=8), 7.38 (d 1H
J=2.5), 8.65 (s 3H OH)

RMNC¹³ (100MHz) (δ , DMSO- d_6) 55.90 (c), 60.43 (t), 68.10 (d),
70.13 (d), 73 (d), 75.9 (d), 95.22 (d), 98.5 (d), 101.12 (d),
103.30 (s), 112.20 (d), 114.70 (d), 115.51 (d), 119.30 (d),
130.44 (s), 144.1 (s), 145.71 (s), 155.44 (s), 156 (s),
156.30 (s), 159.52 (s), 162 (s)

EM m/z (rel int) 300 ($[M]^+$, 100), 272 (98), 257 (22.9), 127
(5), 69 (10)

F.N. *Exostema caribaeum* (Rubiaceae)

mos de carbono insaturada o hidroxilada unidas a las porciones 6 y 8 de la estructura base.

Todas las fenilcoumarinas de la familia Leguminosae presentan sustituyentes oxigenados (MeO-, -OH) en las posiciones 6,7 del anillo A, siendo una excepción la sisafolina, 39 que contiene un grupo formilo en la posición 6 (Donnelly, D., 1975). También, aunque menos frecuentemente se encuentran sustituyentes oxigenados en las posiciones 5 y 8 como en los casos de la sisafolina, 39 (Donnelly, D., 1975) y la Kuhlmannina, 35 respectivamente (Ollis, *et al*, 1968, 1978). En relación al anillo C se puede observar que los sustituyentes oxigenados son de la misma naturaleza. En algunos casos el anillo C es monosustituído, encontrándose el sustituyente en la posición 3' ó 4'. En otros el anillo es disustituído siendo la disposición relativa de los mismos en 3', 4' ó 2', 4' como sucede en la melanneina, 38 (Donnelly, *et al*, 1966) y la sisafolina 39 respectivamente (Donnelly, D., 1975).

Los compuestos aislados de la familia de las Rubiaceas tienen los mismos sustituyentes oxigenados que los de las leguminosas siendo común su presencia en los anillos A y C. Generalmente el anillo A es disustituído en las posiciones 5,7 con la excepción de la Exostemina, 2 que presenta un sustituyente adicional en la posición 8 (Sánchez-Viesca, 1967). Sin embargo, cabe hacer notar que la estructura de este compuesto ha sido cuestionada (Mukerjee, *et al*, 1968).

El anillo C puede ser monosustituído o disustituído. En el primer caso el sustituyente se encuentra siempre en 4' como se puede observar en los compuestos 40, 41 y 52 de la Tabla 2. En el segundo caso, los sustituyentes, en forma general, están ubicados en 3',4' como en 42, 43, 44, 52 y 3. Se ha reportado un caso, compuesto 45 Tabla 2, en el cual la disustitución es en 2'5', sin embargo, en el presente estudio se encontraron evidencias que permiten cuestionar la estructura del compuesto 45 (Reher, *et al*, 1983).

También, como se puede observar en la Tabla 2 la única 5,2'-oxidocumarina natural 52 se encuentra en la familia Rubiaceae. Este óxido presenta el mismo patrón de substitución que muchas de los 4-arilcumarinas descritas en la familia (Reher y Krauss, 1984).

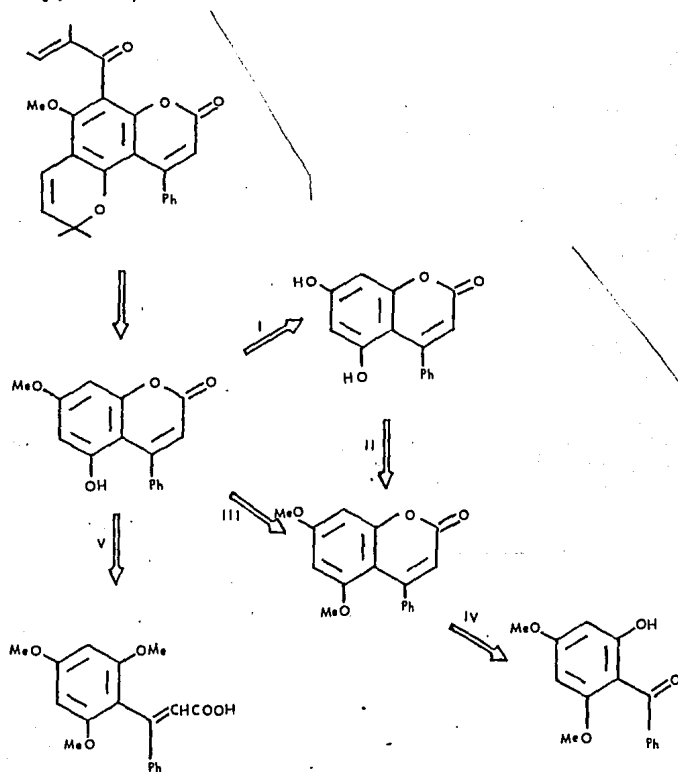
Finalmente, el único glicósido de una 4-fenilcumarina 3, reportado en la naturaleza también esta presente en un miembro de la familia Rubiaceae (Calzada, 1987).

1.3.2 Elucidación Estructural.

Para la elucidación estructural de las 4-fenilcumarinas se han utilizado métodos químicos y/o físicos (espectroscópicos y espectrométricos).

Los métodos químicos se utilizaron básicamente en la década de los 50 y 60s., consistiendo fundamentalmente en reacciones de degradación; correlación química con compuestos de estructura conocida y hasta en algunos casos, dada la simplicidad del nucleo base, síntesis total.

La elucidación estructural de la Calophyllolida, 10 (Ormancey-Potier, 1951; Polonsky, *et al*, 1955, 1956; 1957) ilustra un ejemplo clásico de la determinación estructural de una 4-fenilcoumarina utilizando métodos químicos. Es de hacer notar que este compuesto representó el primer neoflavonoide natural aislado y caracterizado. En la Figura 3 se muestra un resumen de las reacciones de degradación empleadas para la elucidación estructural de este compuesto (Polonsky, 1955).



I (HI); II/III (CH_2N_2); IV (O_3) KMNO_4 ; ($\text{Me}_2\text{SO}_4/\text{OH}$)

Figura 5. Hidrólisis de Calophyllolida con KOH.

Más recientemente la elucidación estructural se ha hecho fundamentalmente mediante el empleo de métodos físicos, aunque en la mayoría de los casos es necesario recurrir a la correlación química y síntesis (Finnegan, *et al*, 1961; Carpenter, *et al*, 1971; Crombi, *et al*, 1967; 1972; Finnegan y Mueller, 1965; Bala y Sashadri, 1971; Finnegan, y Markel, 1972).

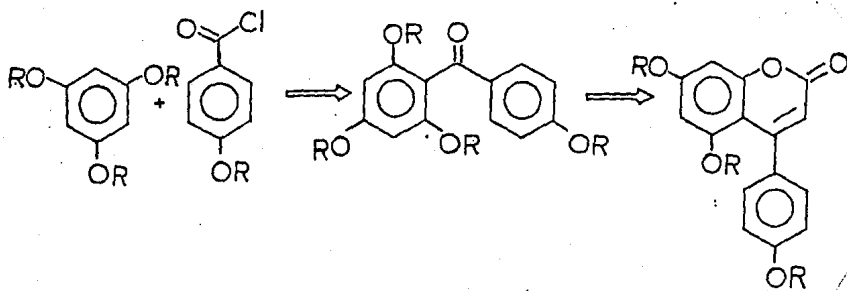
Entre los métodos físicos más utilizados se encuentran la espectroscopía Ultravioleta, Infrarrojo, RMN-P y RMN-C¹³; no existiendo hasta la fecha ningún estudio sistemático acerca de las características espectroscópicas y espectrométricas de estos compuestos.

En la Tabla 2 se especifican las constantes espectroscópicas y espectrométricas para todas las 4-fenilcoumarinas reportadas hasta la fecha. Cabe hacer destacar que se ha reportado solo un estudio de Difracción de Rayos X para 4-fenilcoumarinas (Donnelly, 1987)

1.3.3 Síntesis.

Para la síntesis de 4-fenilcoumarinas se han utilizado fundamentalmente las condensaciones de Perkin y de Pechmann. el esquema general de ambas reacciones se ilustra en la Figura 6.

A)

R=H; CH₃

B)

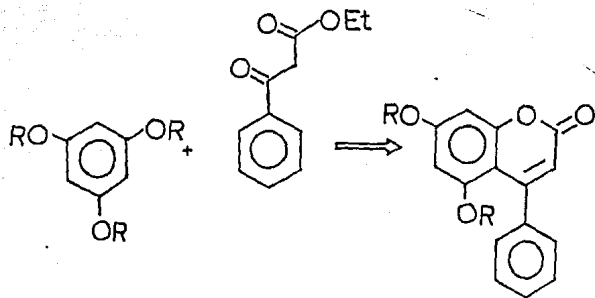
(i) H₂SO₄;(ii) AC₂O/ACOKR=H; CH₃

Figura 6. Condensación a) de Perkin y b) de Pechmann.

Es de hacer notar que son pocas las 4-fenilcoumarinas naturales que han sido sintetizadas hasta la fecha. Así encontramos que en la familia Guttiferae solo se han sintetizado la mammeisina, 20 y la mammeigina, 23 (Bala y Seshadri, 1971). De la familia Leguminosae se han sintetizado la metildalbergina, 32 y nordalbergina, 34 (Ahluwalia y Seshadri, 1957); melanneina, 38 (Donnelly, *et al.*, 1968) y Stevenina, 36 (Donnelly, *et al.*, 1973) y de las Rubiaceas se han sintetizado la exostemina 2' (Mukerjee, *et al.*, 1968) y los compuestos 40, 41, 42, 43 y 44 (Monache, *et al.*, 1985).

1.3.4 Biogénesis.

Para la formación de las 4-arilcoumarinas naturales se han postulado las tres hipótesis biogenéticas (Ollis, 1966; 1968; Kunesch y Polonsky, 1967) que se ilustran en la Figura 6. Las tres coinciden en que el origen del anillo A es a partir de tres unidades de acetato (Ruta acetato-malonato), mientras que la fracción C_6-C_3 se origina a partir del ácido cinámico (Ruta del ácido sikímico).

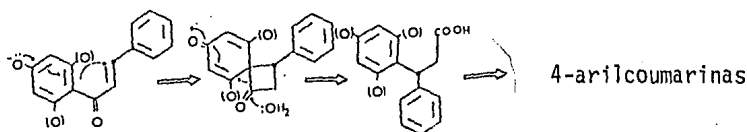
Estas hipótesis están en concordancia con las escasas evidencias experimentales obtenidas al realizar estudios sobre la biosíntesis de dos 4-fenilcoumarinas de *Calophyllum inophyllum* (Guttiferae) administrando precursores potenciales isotópicamente marcados con ^{14}C . Así tenemos que Kunesch y Polonsky demostraron que el ácido cinámico era el precursor de la porción C_6-C_3 que incluye el anillo C y los tres átomos de carbono del anillo α -pirona, ya que al administrar fenilalanina marcada con ^{14}C en el carbono-3 a las raíces

de plantas jóvenes de *Calophyllum inophyllum*, se obtuvo una buena incorporación del precursor y se logro aislar Calophyllolida marcada en el carbono-4 (Kunesch y Polonsky, 1967).

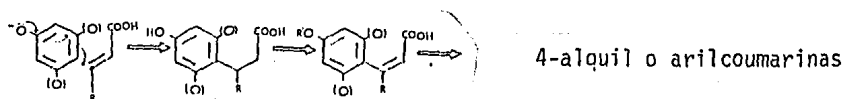
Posteriormente, el mismo grupo también demostró que el anillo A se originaba por la ruta de acetato-malonato ya que al administrar a la misma planta acetato marcado en la posición 1 se obtuvo el marcaje en las posiciones 5, 7 y 8a (Kunesch y Polonsky, 1969).

Cabe destacar que el patrón de oxigenación observado para el anillo A en las 4-fenilcoumarinas de Guttiferae y Rubiaceae es consistente con el origen biogenético de las mismas. En el caso de aquellas de las leguminosas, a pesar de que el patrón de oxigenación es diferente no se puede plantear *a priori*, sin evidencias experimentales, un origen biosintético diferente para dicho anillo.

A) Hipótesis de Benn



B) Hipótesis de Seshadri



C) Hipótesis de Ollis y Gottlieb

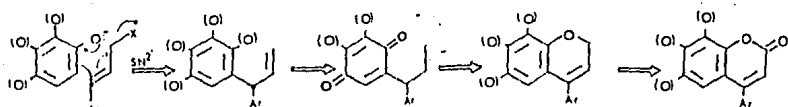


Figura 7. Hipótesis sobre la Biogénesis de neoflavonoides.

1.3.5 Actividad Biológica.

Desde el punto de vista biológico pocas 4-arilcoumarinas han sido evaluadas. Se han descrito evidencias de que la mammeisina, presente en *Mammea americana*, tiene actividad insecticida (Finnegan, *et al*, 1960; Finnegan y Mueller, 1964).

Kawazu ha descrito que algunos constituyentes de la *Calophyllum inophyllum* poseen actividad piscicida (Kawazu, *et al*, 1968).

Chakraborty, *et al* describieron la actividad antibacteriana del Mesuol y de la Mesuagina (Chakraborty y Chatterjee, 1969) contra *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium phlei*. La actividad del Mesuol fué comparable a la de la penicilina contra el *Staphylococcus aureus* (Chakraborty, *et al*, 1968).

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

La finalidad del presente estudio fué la de continuar con la investigación fitoquímica de la *Exostema caribaeum*, Jacq, R. et S. como parte integral de un estudio sistemático de algunas Rubiáceas mexicanas usadas en Medicina Tradicional.

Los puntos que se consideraron para plantear la investigación antes mencionada fueron las siguientes:

1) Numerosas Rubiáceas mexicanas, entre ellas la *Exostema caribaeum* son ampliamente usadas como agentes antimaláricos en Medicina Tradicional, la cual "indudablemente", representa una alternativa muy importante para resolver algunos de los problemas de salud en numerosos países en desarrollo (Tempesta, E., 1980).

2) Los estudios químicos de las plantas usadas en Medicina Tradicional pueden conducir al hallazgo de nuevos y/o conocidos principios activos. En este caso concreto, por las razones especificadas en los antecedentes de este trabajo, cualquier proyecto que se avoque a la búsqueda de sustancias antimaláricas esta ampliamente justificado. Por otra parte, los resultados que deriven de los mismos constituyen un aporte adicional al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado se consideran pertinentes los siguientes objetivos específicos:

- 2.1 Recopilar la información bibliográfica, botánica, etnobotánica, química y farmacológica de la *E. caribaeum*.
- 2.2 Preparar el extracto de la corteza siguiendo las técnicas fitoquímicas convencionales.
- 2.3 Fraccionar el extracto obtenido en el punto 2.2.
- 2.4 Separar y purificar el mayor número de constituyentes de las diferentes fracciones resultantes.
- 2.5 Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
- 2.6 Correlacionar, en lo posible, los resultados químicos obtenidos con la actividad biológica que se le atribuye a esta especie.
- 2.7 Facilitar a la IOCD para su evaluación biológica como agentes antimálaricos los productos caracterizados.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Materia] Vegetal.

La corteza de *E. caribaeum* fué recolectada en Coyuca de Catalán a 30 min. de Zihuatanejo, Guerrero, y fué identificada por el Dr. David Lorence del Instituto de Biología, UNAM.

Una muestra de referencia se depositó en el Herbario del Instituto de Biología, UNAM (25.V.1976 Col: F. Calzada, E. Castro I).

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

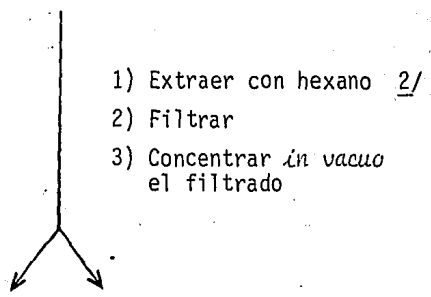
3.2 Métodos de extracción y fraccionamiento.

El material vegetal se extrajo según el procedimiento señalado en el Esquema 1.

Una parte del extracto metanólico total fué fraccionado siguiendo el procedimiento descrito en el Esquema 2.

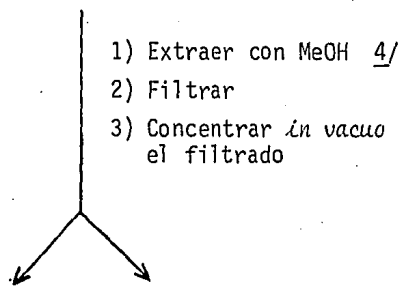
El total del extracto acetato de etilo (104.5 g) se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente sílica gel (1 Kg, sílica gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con cloroformo, cloroformo-etanol en diferentes proporciones. Se recojieron un total de 801 fracciones de 500 ml cada una; cada fracción fué analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. En la Tabla 3 se resumen los sistemas eluyentes empleados, el

Material Vegetal (Trozos) 1/



Extracto hexánico

Residuo Vegetal

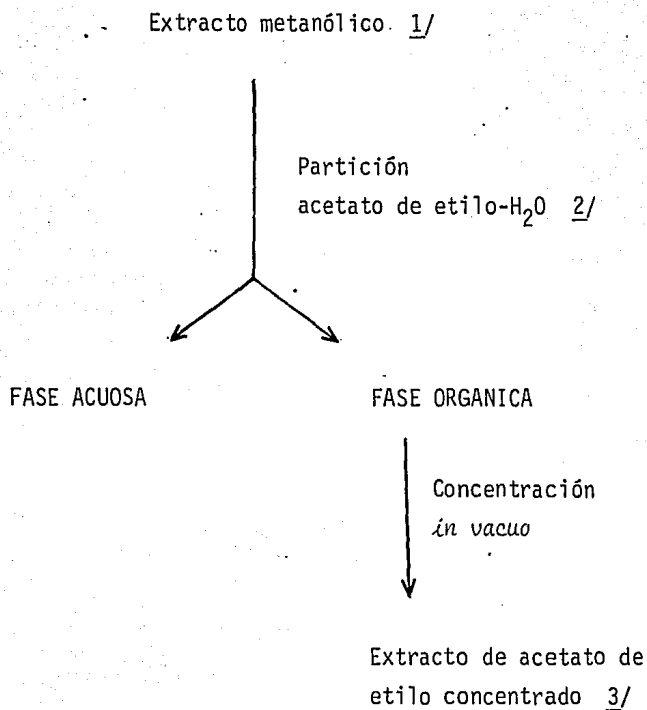


Residuo Vegetal

Extracto metanólico concentrado 5/

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

Esquema 1. 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 MeOH.
- 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 2. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de *E. caribaeum* Jacq.

número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Del extracto metanólico de la corteza desengrasada precipitó un polvo cristalino de color amarillo que después de los análisis pertinentes se identificó como manitol (Calzada, 1987).

De la fase orgánica procedente del proceso de partición acetato de etilo-agua, cristalizó un sólido, que fué filtrado y purificado. Para su identificación se recurrió a la determinación de datos físicos y espectroscópicos, así como reacciones químicas. El compuesto fué caracterizado como 5-O- β , D-galactosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcoumarina (Calzada, 1987).

3.3 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 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 3.

3.4 Aislamiento y purificación de los compuestos.

3.4.1 Obtención del anisaldehído, 53.

De las fracciones 11-13 de la columna de la Tabla 4, se obtuvo un líquido amarillo, el cual fué purificado mediante una cromatogra-

Tabla 3. Sistema de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES			
SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION	REFERENCIA
I	Isopropanol AcDEt-H ₂ O	83:11:6	Stahl, 1969
II	MeOH-CHCl ₃ -acetona-NH ₄ OH _(c)	42:16.5:25:16.6	"
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	-

AGENTES CROMOGENICOS*		
REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
Acido sulfúrico (A)	Acido sulfúrico 0.4N	Sánchez-Viesca, 1967
Sulfato cérico (B)	12 g de sulfato cérico 22.2 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 350 g de hielo	Stahl, 1969
Anisaldehído (C)	0.5 ml de anisaldehído 9 ml de etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 1.0 ml de ácido acético	Stahl, 1969

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

Tabla 4. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto acetato de etilo de la *Exostema caribaeum*.

Eluyente	Proporción	No. de Fracciones	1a. Combinación de Fracciones	2a. Combinación de Fracciones
CHCl ₃	100	1- 14	1- 8 9- 10 11- 13	11- 13
CHCl ₃ -EtOH	99.5:0.5	15- 45	14- 17 18- 29 30- 32 33- 34 35- 38 39- 43	30- 32 33- 38 39- 56
CHCl ₃ -EtOH	99:1	46- 68	44- 46 47- 50 51- 56 57- 64	57- 64
CHCl ₃ -EtOH	98:2	69- 90	65- 75 76- 84 85- 90	65-149
CHCl ₃ -EtOH	97:3	91-116	91-108	
CHCl ₃ -EtOH	95:5	117-296	109-133 134-149 150-180 181-182 183-207 208 209-235 236-246 247-264 265-274 275-282 283-291 292-295	150-207 208-304

Tabla 4. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto acetato de etilo de la *Exostema caribaeum*. (Continuación).

Eluyente	Proporción	No de Fracciones	1a. Combinación de Fracciones	2a. Combinación de Fracciones		
CHCl ₃ -EtOH	90:10	297-625	296-304	305-462		
			305-316			
			317-327			
			328-355			
			356-364			
			365-373			
			374-383			
			384-407			
			408			
			409-462			
			463-470		463-614	
			471-488			
			489-497			
CHCl ₃ -EtOH	85:15	626-753	498-535	615-645		
			536-542		646-664	
			543-545			665-703
			546-614			
			615-645			
			646-664			
			665-673			
			674-689			
			690-694			
			695-703			
			704-745			
			746-748			
			749-761			
762-801	762-801					
CHCl ₃ -EtOH		75:25	754-762			
CHCl ₃ -EtOH	65:35	763-766				
CHCl ₃ -EtOH	50:50	767-801				

fa preparativa en capa fina sobre silica gel, utilizando como fase móvil hexano: metanol 9:1. Al cabo del proceso se obtuvieron 48.0 mg(0.0038%) de 53.

3.4.2 Obtención de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina 40.

Las fracciones 14-17 (90 mg) (0.007%) de la Tabla 4, se recromatografiaron en una columna empacada con 6.94 g de silica gel, la elución se inició con hexano, posteriormente con hexano-cloroformo (70:30) y finalmente con acetato de etilo. Se recolectaron 10 fracciones de 5 ml cada una. De las fracciones 10-13 se obtuvieron 27.5 mg de un compuesto cristalino de color blanco de p.f. 150-152°C, fluorescente al U.V.

3.4.3 Obtención de la 3'5-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina 54.

De las fracciones 38-50 de la columna de la Tabla 4, se obtuvo un polvo fino de color amarillo de p.f. 225-226°C. La cantidad total del producto fué de 155 mg (0.012%).

3.4.4 Obtención de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina 55.

De las fracciones 59-73 (ver Tabla 4) se obtuvo un polvo cristalino amarillo-verdoso de p.f. 273-274°C (etanol). La cantidad total fué de 542 mg (0.043%).

3.4.5 Obtención de β -sitosterol 56 y de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 52.

De las fracciones 150-304 (381 mg) de la columna de la Tabla 4 se recromatografiaron en una columna empacada con 46 g de gel de sílice; la elución se inició con CHCl_3 , posteriormente con CHCl_3 -MeOH (99:1), cloroformo con cantidades crecientes de metanol (98:2; 95:5; 90:10; 10). Se colectaron 106 fracciones de 50 ml cada una.

De las fracciones 62-65, eluidas con CHCl_3 -MeOH 95:5 se obtuvo un polvo blanco 56 que fué recristalizado de MeOH hasta punto de fusión constante (PF: 140°C). El rendimiento total de 56 fué de 10 mg (0.00079%).

De las fracciones 71-77 y 83-91 eluidas con CHCl_3 -MeOH 95:5, de esta misma columna se obtuvo un polvo amarillo cristalino que luego de varias recristalizaciones de MeOH originó unas agujas cristalinas de $\text{pf} > 300^\circ\text{C}$. La cantidad total obtenida del compuesto 52 fué de 18.9 mg (0.0015%).

3.4.6 Obtención de la 5-O-6"-acetil- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina 57.

De las fracciones 296-316 Tabla 4 se obtuvo un polvo cristalino blanco en forma de agujas pequeñas de p.f. 215-22°C. La cantidad total de producto fué de 545.9 mg (0.043%).

3.4.7 Obtención de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 58.

De las fracciones 328-346 de la columna original se obtuvo un

compuesto, 48.9 mg (0.0038%) de color amarillo oro de p.f. >300°C.

3.4.8 Obtención de la 5-0- β -glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina 59.

De las fracciones 400-442 de la columna original se obtuvieron 903.6 mg (0.071%) de un polvo cristalino de color amarillo claro de p.f. 237-238 (MeOH).

3.4.9 Obtención de la 5-0- β -galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenil-coumarina 60.

De las fracciones 305-462 de la columna de la Tabla 4 se obtuvo un polvo amarillo-verdoso, el cual se recrystalizó sucesivamente con metanol, obteniéndose finalmente unos cristales de color amarillo 50.0 mg (0.0039%) de p.f. 217-221°C.

3.5. Caracterización de los compuestos aislados.

3.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

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 en pastilla

de KBr por el Sr. Alejandro Correa de la Compañía Negromex, S.A. Los espectros de U.V. se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Hitachi 220-5. Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi-Perkin Elmer RMU-6D en el Instituto de Química de la UNAM. Los espectros de RMNP se determinaron en un espectrofotómetro FT-80 Varian utilizando como disolventes: CDCl_3 , DMSO-d_6 y piridina- d_5 y como referencia interna TMS.

Los espectros de RMNC^{13} se determinaron en un espectrómetro Jeol FX90Q, utilizando como disolvente DMSO-d_6 y como referencia TMS y los espectros de RMN-P de los compuestos 54, 55 y 61 se determinaron en un espectrometro Jeol FX-90Q, utilizando como disolvente CDCl_3 , DMSO-d_6 y piridina- d_5 respectivamente y como referencia interna TMS, por el Ing. Guillermo Uribe del Departamento de Química del CINVESTAV del IPN.

El espectro de RMNC^{13} del compuesto 55 fué realizado en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Purdue, Indiana, U.S.A.

Los análisis elementales se realizaron en Galbraith Laboratories Inc., Knoxville, Tenn, U.S.A.

3.5.2 Prueba de Molisch para carbohidratos.

A una pequeña cantidad de cada uno de los compuestos siguientes: 57, 59 y 60 se disolvieron en 3 ml de agua destilada, separadamente se les adicionó 1 ml de solución reactivo de α -naftol (10% en etanol) y seguidamente se agregaron por las paredes de cada uno de los tubos

2 gotas 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 en los tres casos.

3.5.3 Hidrólisis ácida del compuesto 57.

Para efectuar la hidrólisis ácida del compuesto 57 se disolvieron 100 mg del compuesto en 200 ml de ácido clorhídrico 2N y la mezcla de reacción se reflujo durante 3 horas. Al cabo de la reacción se separó por filtración, un producto amarillo que se lavó sucesivamente con varias fracciones de agua destilada. La cantidad obtenida del producto amarillo fue de 50.4 mg. El término de la hidrólisis fue verificado cromatográficamente utilizando los sistemas I, III, VII, VIII, XII y XIV y los agentes cromogénicos B y C de la Tabla 3.

3.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto 59.

Para efectuar la hidrólisis ácida del compuesto 58 se disolvieron 56.2 mg del compuesto en 2 ml de ácido sulfúrico 2N y la mezcla de reacción se reflujo durante 3 horas. Al cabo de la reacción se separó por filtración un producto amarillo que se lavó sucesivamente con varias fracciones de agua destilada. La cantidad obtenida del producto amarillo fue de 13.3 mg. El término de la hidrólisis fue verificado como se describió en el punto anterior 3.4.3.

3.5.5 Hidrólisis enzimática del compuesto 60 con celulasa.

A 4 mg del compuesto 60 se agregó 1 ml de agua destilada con 40 ml de celulasa (Sigma, tipo I), se incubó a 36°C durante 72 horas. El término de la hidrólisis fué verificado cromatográficamente utilizando el sistema XIV y el agente cromogénico B de la Tabla 3. Al cabo de ese tiempo la mezcla fué sujeta a extracción convencional. Finalmente la aglicona 60A fué separada del extracto clorofórmico anterior vía una cromatografía preparativa en capa fina en sílica gel, utilizando dos placas de 20 X 20 y como eluyente CHCl_3 :MeOH 8:2.

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

Tabla 5. Hidrólisis de los compuestos 57, 59 y 60.

Compuesto	Cantidad de compuesto	Producto	Cantidad del producto hidrolizado	Punto de fusión del producto de hidrólisis
<u>57</u> *	100 mg	57A	50.4 mg	133-135°C
<u>59</u> *	56.2 mg	57A	13.3 mg	128-130°C
<u>60</u> **	4 mg	60A	—	—

*Acida

**Enzimática.

La presencia de galactosa o glucosa fué identificada por medio de cromatografía en capa fina utilizando los sistemas I, VIII, XII y los agentes cromogénicos B, C de la Tabla 3.

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

3.5.6 Hidrólisis enzimática de los compuestos 57, 59 y 60.

A 1 mg de cada uno de los compuestos 57, 59 y 60 se agregaron 0.5 ml de agua destilada y 1 ml de β -glucosidasa (Sigma, tipo II), se incubaron a 36°C durante 72 horas. El término de la hidrólisis se verificó como en el punto 3.5.5. Al cabo de ese tiempo cada una de las mezclas fué sujeta a extracción convencional con cloroformo, para obtener las agliconas correspondientes. En este caso los azúcares se determinaron en la fase acuosa correspondiente como se indicó en el punto 3.5.5.

3.5.7 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.

En la Tabla 6 se indican los compuestos sometidos a metilación, los rendimientos de los productos obtenidos y sus puntos de fusión.

Tabla 6. Obtención de los derivados metilados de los compuestos.

Compuesto	Cantidad del compuesto	Producto	Cantidad del producto obtenido	Punto de fusión
<u>55</u>	100 mg	<u>55A</u>	47.1 mg	265°C
<u>54</u>	20 mg	<u>54A</u>	12.1 mg	153-155°C
<u>57</u>	45 mg	<u>57B</u>	29.3 mg	105-110°C
<u>58</u>	5 mg	<u>55A</u>	3 mg	265°C
<u>59</u>	30 mg	<u>59A</u>	19.5 mg	105-110°C

3.5.8 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 indican los compuestos que se metilaron, el rendimiento de los compuestos obtenidos y sus puntos de fusión.

Tabla 7. Preparación de derivados acetilados de los compuestos.

Compuesto	Cantidad del compuesto	Producto	Cantidad del producto obtenido	Punto de fusión
<u>55</u>	50 mg	<u>55B</u>	33.7 mg	265-268°C
<u>57</u>	50 mg	<u>57C</u>	61.7 mg	80-95°C
<u>59</u>	30 mg	<u>59B</u>	24.4 mg	90-95°C
<u>52</u>	6.8 mg	<u>52A</u>	5 mg	223-227°C
<u>57A</u>	10 mg	<u>57D</u>	8 mg	155-159°C
<u>58</u>	10 mg	<u>58A</u>	13 mg	223-227°C
<u>54</u>	16.3 mg	<u>54B</u>	23.5 mg	

3.5.9. Obtención de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxido-coumarina 55 a partir de la 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina 54.

10 mg del compuesto 54 se disolvieron en 5 ml de una solución metanólica de hidróxido de potasio al 10%. Posteriormente, a la mezcla de reacción se le adicionó 1 ml de solución $K_4[Fe(CN)_6]$ 0.08M y se dejó en reposo durante 3 horas a temperatura ambiente. Al término del período anterior el producto se neutralizó con HCl 0.1N, la solución neutra se extrajo con 2 porciones de 50 ml de acetato de etilo; la fase orgánica resultante se lavó con 2 porciones de agua destilada (10 ml cada una) y finalmente luego de secar sobre sulfato de sodio anhidro se concentró *in vacuo*. Al tratar el residuo concentrado anterior con metanol cristalizaron

5 mg de un producto cristalino, idéntico en todos sus aspectos al producto natural 55.

3.5.10 Transformación del compuesto 57A en 52.

25 mg del compuesto, 57A se disolvieron en una solución de metóxido de sodio (15 mg de Na en 3 ml de MeOH anhidro) la mezcla estuvo en agitación por una hora a temperatura ambiente. Al evaporarse el disolvente, el residuo fué recristalizado de EtOH para obtener 14.7 mg del compuesto 52. El compuesto resultante era insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos (hexano, acetona, acetato de etilo, cloroformo, etanol, metanol); soluble en piridina y presentó un p.f. >300°C. Este producto resulto ser idéntico (IR, RMNP, EM) al producto natural 52.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

Del extracto metanólico de la corteza de la *E. caribaeum* luego de un fraccionamiento preliminar vía una partición acetato de etilo-MeOH-agua (12:1:3) y posteriores cromatografías sobre sílica gel, en columna o en capa delgada, se obtuvieron diez metabolitos secundarios: un compuesto de naturaleza esteroidal (β -sitosterol, 56), una sustancia aromática simple de tipo C_6-C_1 (anisaldehído, 53) y ocho 4-fenilcoumarinas. Las coumarinas fueron caracterizadas como: 5-O-[6''-acetil- β -D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 57; 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 59; 5-O- β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina, 60; 3,4-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 52; 7,3',4'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina, 58; 3'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 55; 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina, 54 y 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, 40. Los compuestos 57, 59, 60, 58, 55 y 54 representan nuevos productos naturales.

En la Tabla 8 se resumen los compuestos aislados y sus respectivos rendimientos.

Tabla 8. Rendimiento de los compuestos aislados.

Compuesto Nombre Químico	Rendimiento
57*	545.9 mg (0.043%)
59*	903.6 mg (0.071%)
60*	50.0 mg (0.0039%)
52*	18.9 mg (0.0015%)
58*	48.9 mg (0.0038%)
55*	542.0 mg (0.043%)
54*	155.0 mg (0.012%)
40	90.0 mg (0.007%)
53	48.0 mg (0.0038%)
56	10.0 mg (0.00079%)

*Nuevos productos naturales.

En general, la caracterización de los productos obtenidos se realizó mediante la combinación de métodos químicos y espectroscópicos y su discusión será el objetivo fundamental de la presente sección.

Es de hacer notar que la secuencia en que se realizará la misma no es indicativo del orden en que fueron obtenidos en los procesos cromatográficos, sino más bien de acuerdo a la complejidad y similitud estructural de los metabolitos.

4.1 Identificación de la 5-O-[6''-acetil-β-D-galactosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 57.

De las fracciones 296-316 de la columna cromatográfica de la Tabla 4 (ver sección experimental) cristalizaron 545.9 mg de un sólido de color amarillo, soluble en metanol, etanol y parcialmente soluble en acetato de etilo. Las constantes físicas y espectroscópicas de esta sustancia, así como su estructura, se resumen en la Tabla 9.

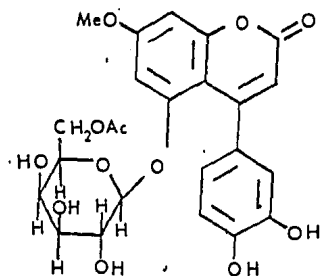
Las características de solubilidad del compuesto 57 así como su comportamiento frente al reactivo de Molisch sugirieron su naturaleza glicosídica.

El análisis cromatográfico de los productos obtenidos al tratar una pequeña cantidad del producto natural 57 con HCl 2N confirmaron su carácter glicosídico. Dicho análisis se realizó en placas de sílica gel y mediante los sistemas I, VIII y XII de la Tabla 3. En todos los casos se detectó a la galactosa como único carbohidrato presente y a otra sustancia de menor polaridad que el producto original 57.

Ante la demostración que el compuesto 57 era un glicósido, su fórmula molecular se determinó mediante un análisis elemental como $C_{24}H_{24}O_{11}$, lo cual permite un índice de insaturación de 13.

El espectro IR (Espectro 2) presentó bandas características para hidroxilos libres y combinados ($3467, 3409, 3395\text{ cm}^{-1}$), carbonilo de acetato (1730 cm^{-1}), carbonilo de α-pirona (1695 cm^{-1}), y aroma-

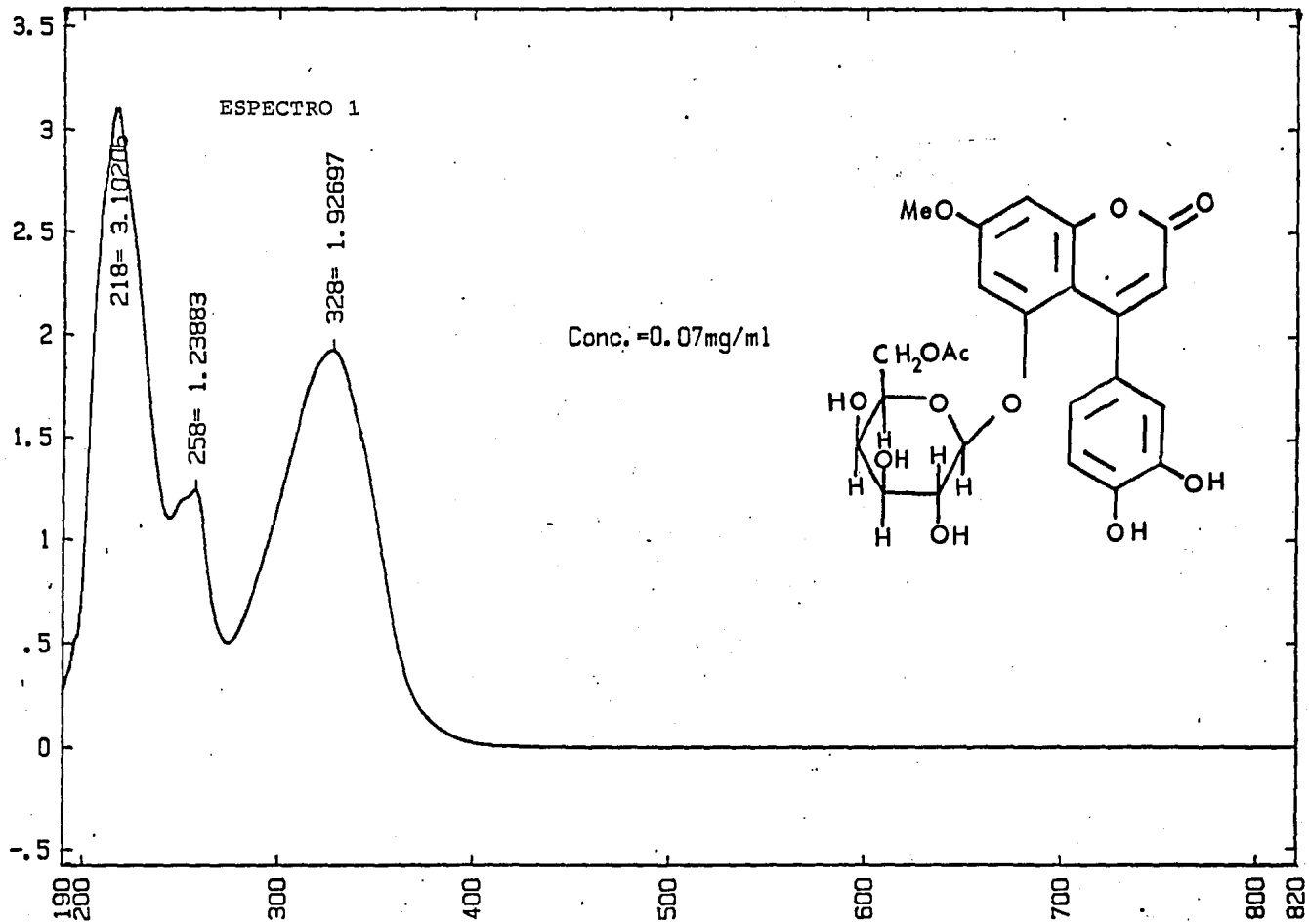
Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-[6''-acetil-β-D-galactosil-]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 57.



P.M.	504	
P.F.	215-220°C	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ)	218 (4.14), 258 (3.95), 328 (4.34)	Espectro 1
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3467, 3409, 3395, 2918, 1730, 1695, 1536, 1614, 1442, 1355, 1258, 1072, 1047	Espectro 2
RMNP (DMSO- d_6 , δ)	6.5-6.8 (m 5H H-6, H-8, H-2', H-5', H-6'), 5.76 (s 1H H-3), 4.63 (d J=8 Hz 1H H-1''), 3.95 (m 2H H-6''), 3.75 (s 3H -OCH ₃), 2.8-3.6 (m H-2''-H-5''), 1.96 (s 3H CH ₃ -CO-)	Espectro 3
RMNP (Piridina- d_5 , δ)	7.33 (d J=3 Hz 1H H-2'), 7.10 (d J=8 Hz 1H H-5'), 6.98 (d J=3 Hz 1H H-6), 6.87 (dd J=8.3 Hz 1H H-6'), 6.61 (d J=3 Hz 1H H-8), 6.17 (s 1H H-3), 4.5-5.25 (m), 4.05-4.25 (m), 3.77 (s 3H -OCH ₃), 2.09 (s 3H CH ₃ -CO-)	Espectro 4
RMNC ¹³ (DMSO- d_6 , δ)	170.12 (s CH ₃ -CO-), 162.66 (s C-7), 159.46 (s C-2), 156.37 (s C-4), 155.67 (s C-8a), 155.36 (s C-5), 145.75 (s C-4'), 144.13 (s C-3'), 130.44 (s C-1'), 119.17 (d, C-6'), 115.54 (d C-5'), 114.76 (d C-2'), 112.28 (d C-3), 103.50 (s C-4a), 100.8 (d C-1''), 98.94 (d C-6), 95.05 (d C-8), 72.81 (d C-5''), 72.66 (d C-3''), 70.06 (d C-2''), 68.22 (d, C-4''), 63.52 (t, C-6''), 55.88 (c 7 MeO), 20.35 (C CH ₃ -CO-)	Espectro 5
A.E. Calc.	C 57.14% H 4.76%	
Enc.	C 56.99% H 4.73%	

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

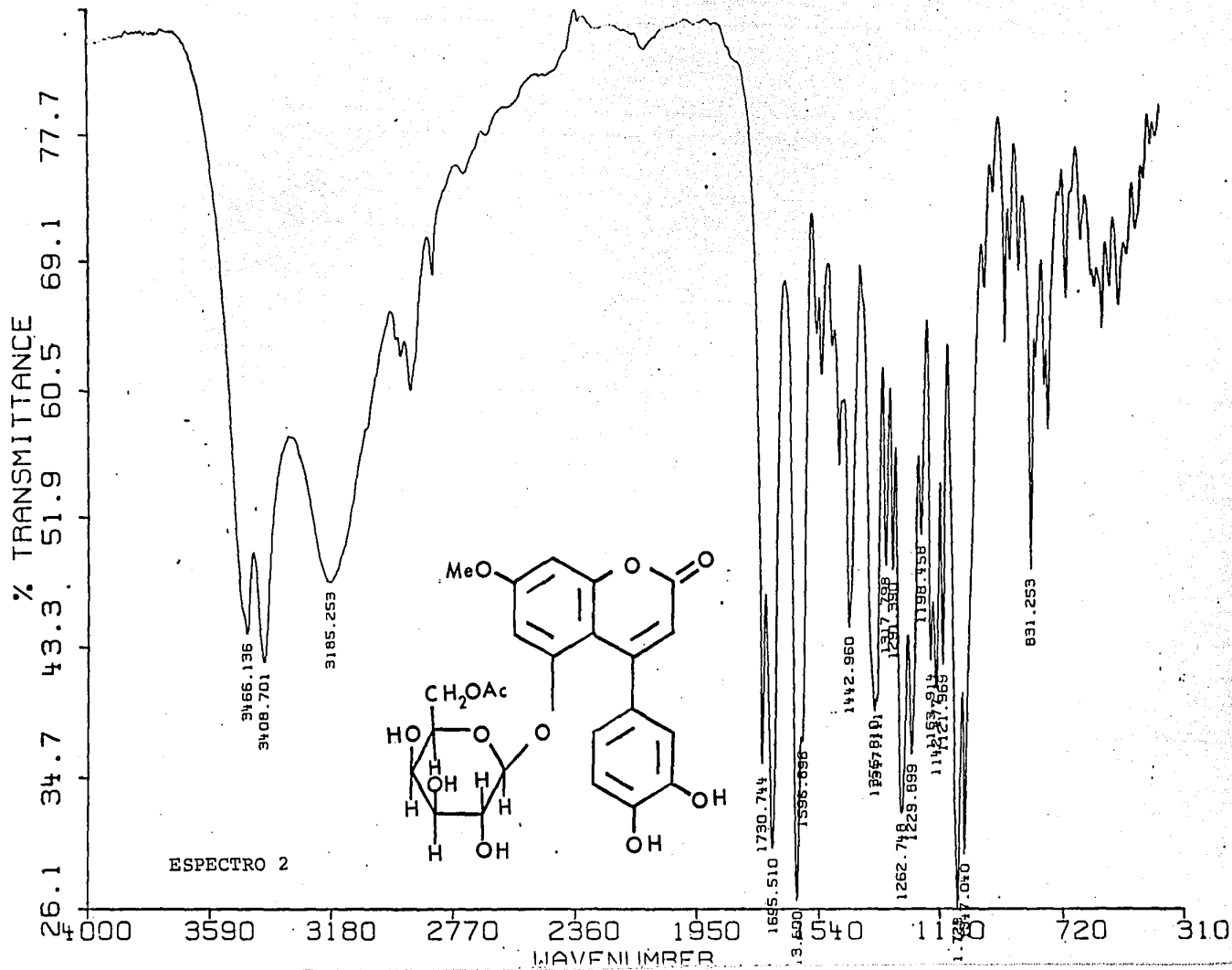
ABSORBANCE



WAVELENGTH (nm)

EN KBR

071086



tividad ($1536, 1442 \text{ cm}^{-1}$).

Los espectros de RMNP en piridina- d_5 y DMSO- D_6 (Espectros 3 y 4 respectivamente) indicaron:

a) La naturaleza glicosídica del compuesto ya que a δ 4.63, en el caso del espectro en DMSO d_6 , se observó un doblete ($J=8\text{Hz}$) característico para el carbón anomérico del azúcar.

b) Su carácter aromático debido a la presencia de señales por debajo de δ 6.5. En el caso del espectro en piridina- d_5 , como se puede apreciar en la Figura 8, se observó claramente un sistema ABC para un anillo aromático trisustituído [δ 7.33 (d, $J=3\text{Hz}$), δ 7.10 (d $J=8\text{Hz}$), δ 6.87 (dd $J=8.3\text{Hz}$)] y dos señales dobles para dos protones meta relacionados a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento [δ 6.98 (d, $J=3\text{Hz}$) y δ 6.61 (d, $J=3\text{Hz}$)].

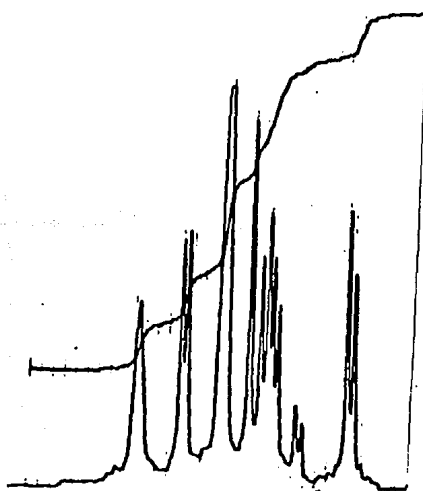
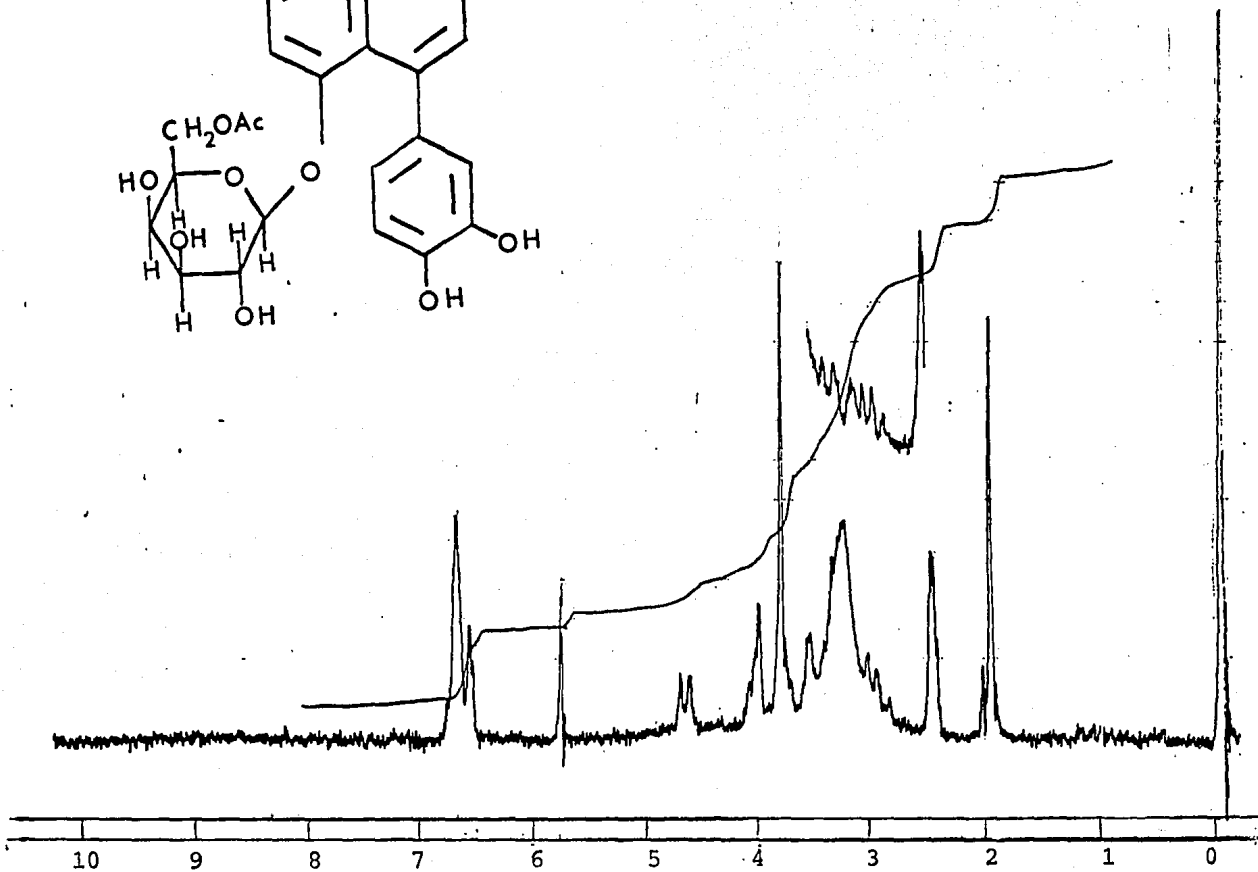
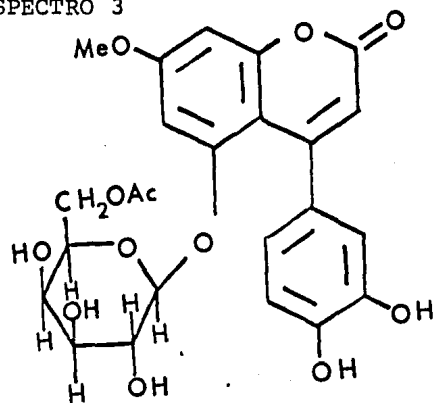
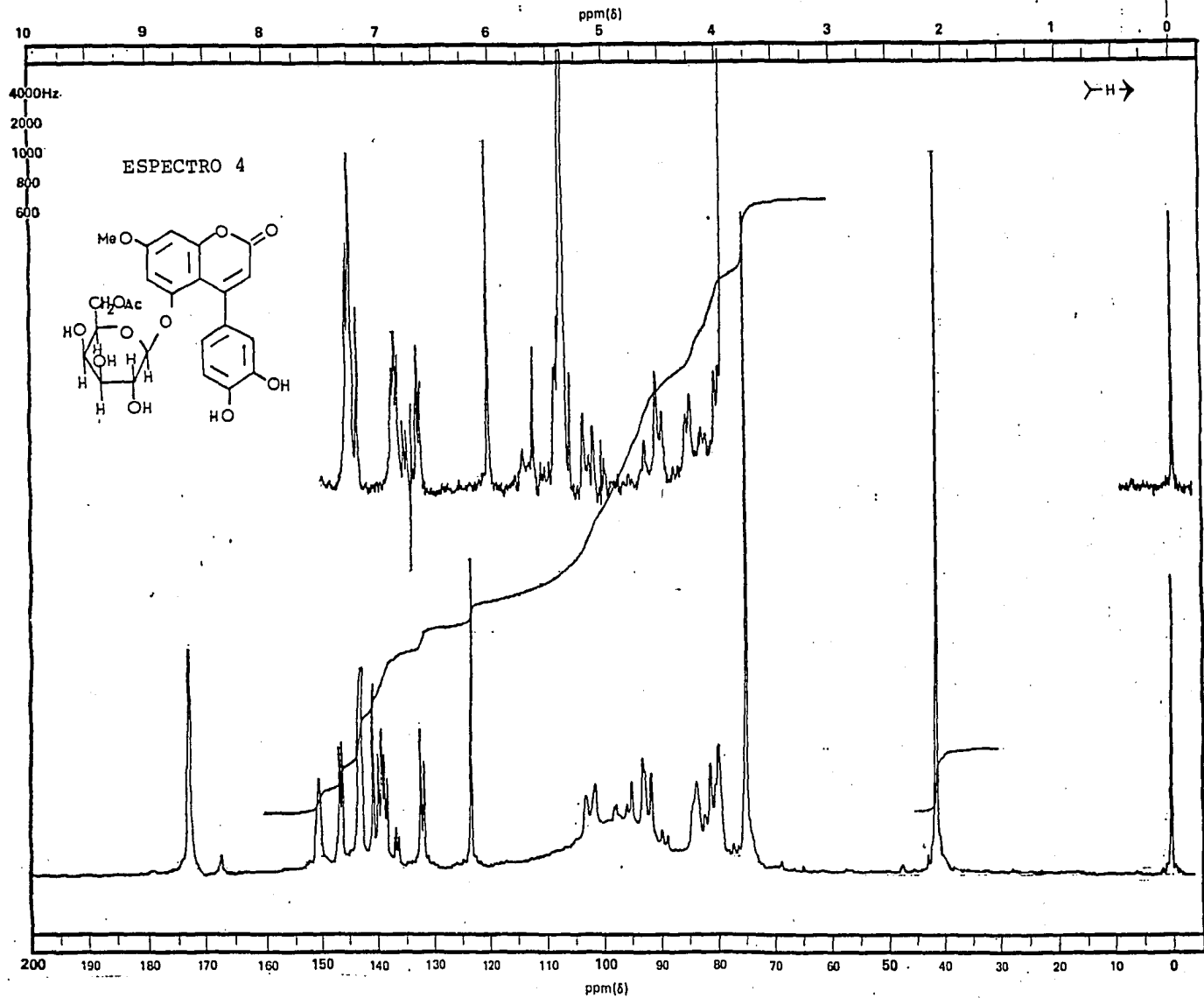


Figura 8. Región aromática del compuesto 57.

ESPECTRO 3





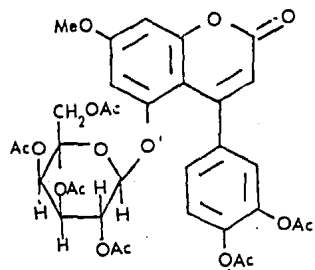
Así mismo, ambos espectros de RMNP mostraron las señales restantes para la porción azucarada, un singulete característico para un metoxilo unido a un anillo aromático (δ 3.75, Espectro 3 y δ 3.77, Espectro 4), un singulete que integraba para un protón asignable a un hidrógeno vinílico, α al grupo carbonilo en un sistema conjugado [δ 5.7 (Espectro 3) y δ 6.17 (Espectro 4)] y por último un singulete típico del metilo de un grupo acetoxi [δ 1.96 en el Espectro 3 y δ 2.09 en el Espectro 4].

El tratamiento del glicósido con anhídrido acético y piridina permitió obtener el derivado hexaacetilado 57c, cuyas características físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 10. La obtención de este producto no solo confirmó la presencia de una sola unidad de hexosa en la molécula, sino también permitió establecer el carácter difenólico del glicósido ya que en el espectro en CDCl_3 (Espectro 7) se observaron señales para dos acetatos fenólicos a δ 2.28.

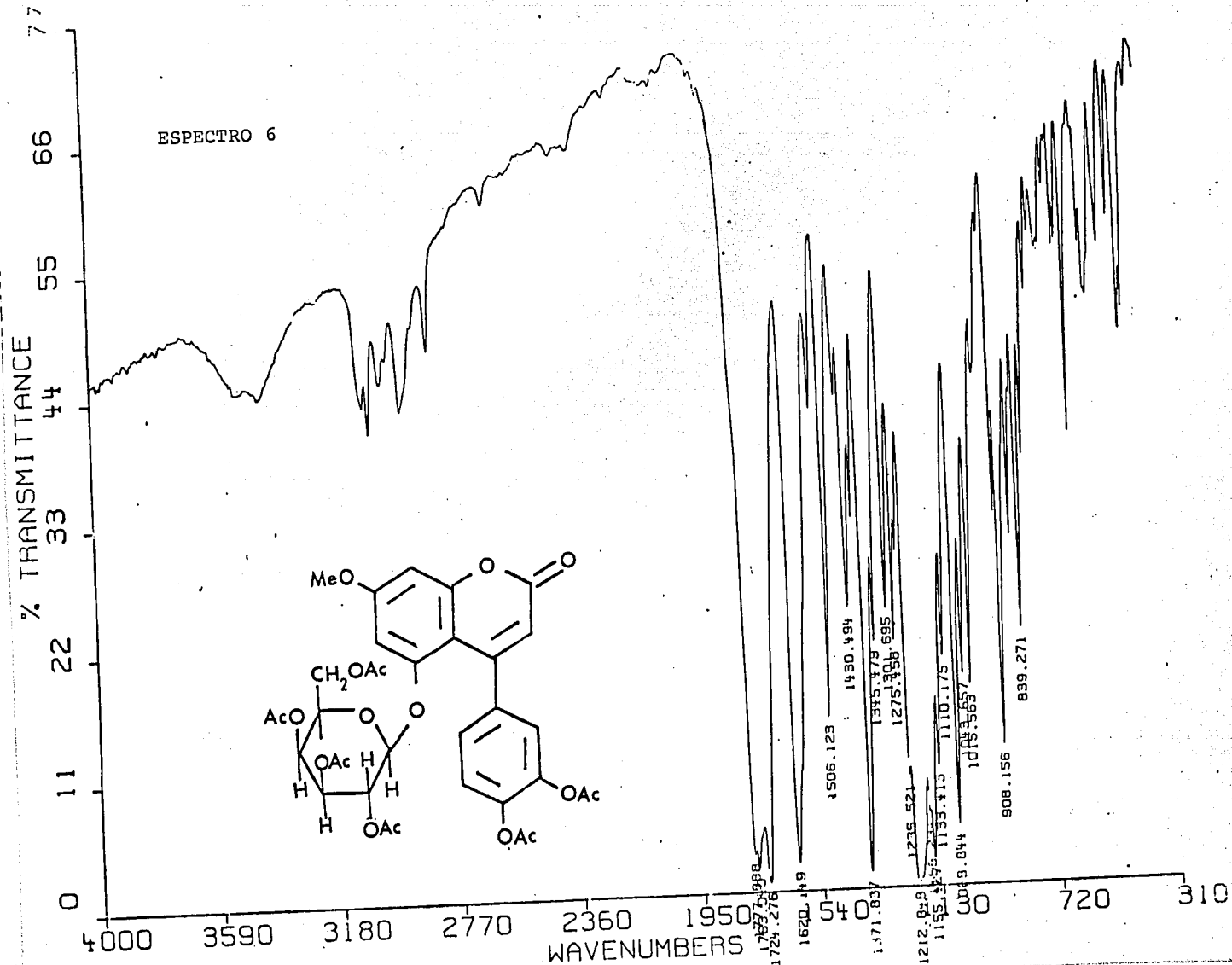
La información anterior, en conjunto con los máximos de absorción registrados en el espectro U.V. (Espectro 1) (Reher y Krauss, 1984) y la fluorescencia azul observada al visualizar las cromatoplasmas bajo luz U.V., onda larga, permitieron sugerir que el compuesto era el galactósido de una metoxi-4-fenilcoumarina difenólica, y que poseía además un grupo acetato, unido posiblemente a la porción azucarada en virtud al desplazamiento químico, observado para el metilo del acetato en el compuesto original (δ 1.96).

El espectro de RMN C^{13} (Espectro 5), el cual presentó señales

Tabla 10. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-8-D-hexacetoxi-galactosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 57C.

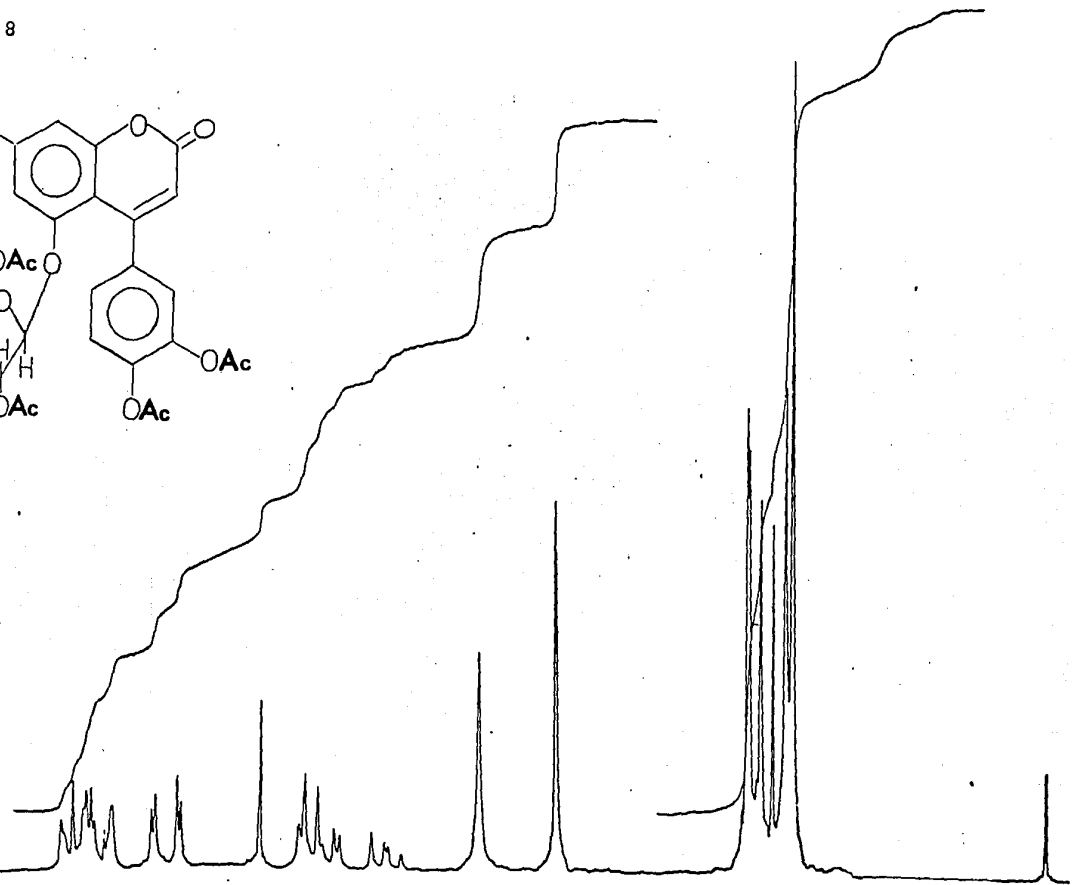
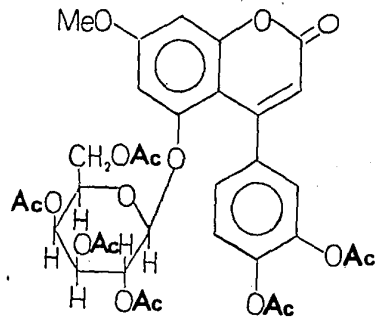


P.M.	714	
P.F.	80-95°C	
IR $\sqrt{\text{KBr}}_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$	3121, 2828, 1753, 1616, 1566, 1433, 1417, 1370, 1363, 1017, 903	Espectro 6
RMNP (CCl_3 , δ)	7.15-7.20 (m 3H H-2', H-5', H-6'), 6.65 (d J=3 Hz 1H H-6), 6.53 (d J=3 Hz 1H H-8), 6.15 (s 1H H-3), 4.5-5.30 (m), 3.29-4.25 (m), 3.85 (s 3H OCH_3), 2.28 (s 6H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.28 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.99 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.92 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.85 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$)	Espectro 7
RMNP (Piridina- d_5 , δ)	7.15-7.55 (m 3H H-2', H-5', H-6'), 6.84 (d J=3 Hz 1H H-6) 6.68 (d J=3 Hz 1H H-8), 6.05 (s 1H H-3), 5.16 (d J=8 Hz 1H H-1''), 5.9-5.75 (m), 4.35 (s 3H H-6''), 3.76 (s 3H OCH_3), 2.30 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.28 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.20 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.10 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 2.0 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$), 1.95 (s 3H $\text{CH}_3\text{-CO-}$)	Espectro 8



9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

ESPECTRO 8



9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

para veinticuatro carbonos, en concordancia con la fórmula molecular, confirmó aún más la hipótesis anterior: de las 24 señales observadas las resonancias a δ 100.8, 70.06, 72.66, 68.22, 72.81, 63.52, 20.35 y 170.12 demostraron inequívocamente que la porción azucarada presente en el compuesto era la 6"-acetilgalactosa.

La asignación de las resonancias anteriores se hizo en base a los siguientes criterios:

a) Comparación de los desplazamientos químicos previamente observados con aquellos descritos en la literatura para la porción azucarada de otros O-glicósidos de compuestos aromáticos (Chopin, 1977; Markham, 1982; Mata, *et al*, 1987), algunos de los cuales se resumen en la Tabla 11.

b) Considerando que la señal de los carbonos acilados en un azúcar se encuentran desplazados a campos ligeramente más bajos (aproximadamente 2-3 ppm) que los normales, y que las señales de los carbonos adyacentes al acetilado resuenan a frecuencias más altas (a 1 a 3 ppm) (Markham, 1982).

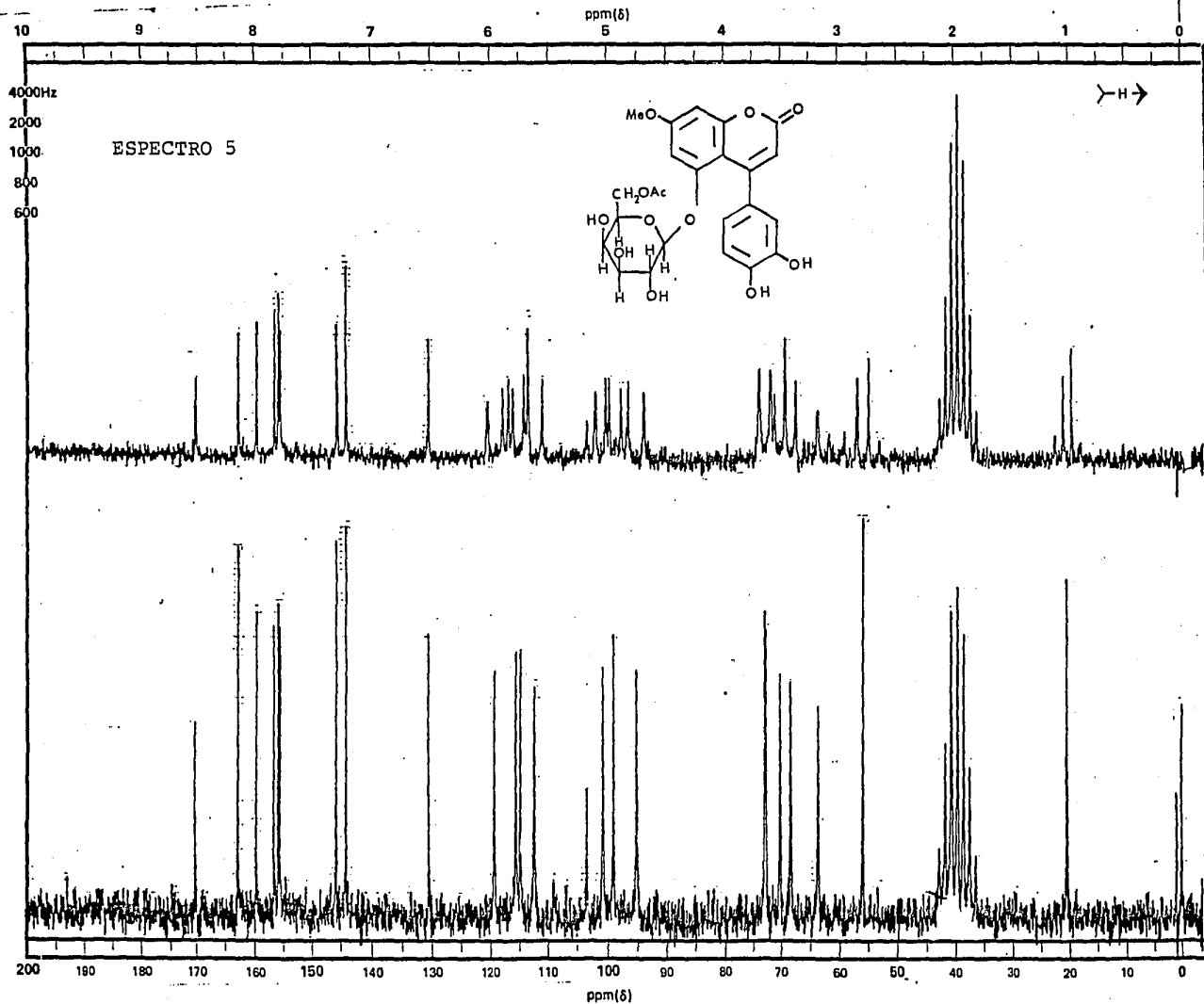


Tabla 11. Resonancias de C^{13} de la porción azucarada de algunos flavonoides 0 glicosidos (Markham, 1978) y del compuesto 3* (Calzada, 1987).

Tipo de azúcar	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Glucosa (A)	100.0	73.3	76.6	69.8	77.4	60.9
Glucosa (B)	100.4	73.3	76.6	70.0	77.3	61.0
Galactosa (C)	101.6	71.3	73.4	68.0	75.8	61.0
Galactosa (D)	102.5	71.4	73.4	68.1	75.9	60.1
Rammosa (E)	101.9	70.4	70.6	71.5	70.1	17.3
Rammosa (F)	100.8	70.4	70.8	72.0	68.2	17.6
Acido glucurónico (G)	101.1	73.7	75.9	71.3	75.9	169.7
*Galactosa (H)	101.1	70.13	73.0	68.10	75.9	60.4

Si a la señal correspondiente al C-6 de cualquiera de los tres modelos C, D y H de la Tabla 11 se la adiciona 3 ppm por efecto de acilación se obtienen resonancias de δ 63.8, 63.1 y 63.4 respectivamente. Por otra parte, la sustracción de 3 ppm de la señal correspondiente al C-5 (carbono α) daría resonancias del orden de 72 ppm. Estos valores calculados para C-6" y C-5" están en concordancia con los valores observados en el espectro de RMNC¹³ del compuesto 57 y permitieron concluir inequívocamente que el hidroxilo en C-6 de la galactosa se encuentra formando un acetato.

Las absorciones a δ 159.46, 156.37 y 112.28 confirmaron los

carbonos C-2, C-4 y C-3 respectivamente de la porción α -pirona de una fenilcoumarina (Pelter, 1976). Finalmente de las trece señales restantes, el cuarteto a δ 55.88 correspondía al grupo metoxilo y las otras doce a los carbonos aromáticos de esqueleto básico. La multiplicidad observada para estas últimas indicó que uno de los anillos bencénicos debía ser trisustituído y el otro tetrasustituído. Finalmente, los desplazamientos químicos de los singuletes a δ 162.66, 155.67, 155.36, 145.75 y 144.13 correspondían a carbonos cuaternarios unidos a oxígenos; uno de estos debía corresponder a C-8a, el otro al carbono base del metoxilo, un tercero al carbono unido a la acetil-galactosa a través de un enlace O-glicosídico y las dos restantes a los carbonos base de los hidroxilos fenólicos.

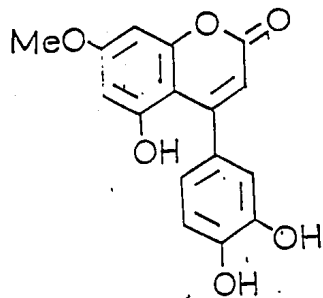
Al efectuar la hidrólisis ácida utilizando mayor cantidad del glicósido fué posible aislar la aglicona correspondiente 57A. Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo de p.f. = 138-140°C y sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 12.

El análisis de los datos resumidos en la Tabla 12 permitieron concluir que esta aglicona era idéntica a la descrita para el compuesto 3 (Calzada, 1987; Mata, *et al*, 1987). La estructura de la misma se indica en la Tabla 12.

Las características espectroscópicas más importantes observadas para la aglicona 57A fueron las siguientes:

a) El espectro de masas presentó los fragmentos característicos de una 4-fenilcoumarina, observándose iones importantes a m/z 300

Tabla 12. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 57A.



P.M.	300	
P.F.	138-140°C	
EMIE m/z (%)	300 (M ⁺ , 100), 272 (98), 257 (22.9), 127 (5), 69 (10)	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	218, 260, 330	Espectro 9
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	3186-3400, 1665, 1626, 1589, 1434, 1379, 1345, 1294, 1202, 1155, 1087	Espectro 10
RMNP (60MHz, CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)	6.79 (d J=8 Hz 1H H-5'), 6.77 (d J=3 Hz 1H H-2'), 6.62 (dd J=8,3 Hz H-6'), 6.37 (d J=3 Hz 1H H-8), 6.24 (d J=3 Hz H-6), 5.78 (s 1H H-3), 3.04 (s 3H OCH ₃).	Espectro 11
RMNP (80 MHz, Piridina-d ₅ , δ)	7.24 (d 1H J=2.5 Hz), 7.06 (d 1H J=8 Hz), 6.90 (dd, 1H J=8.3 Hz), 6.58 (d 1H J=2.5 Hz), 6.48 (d 1H J=2.5 Hz), 6.60 (s 1H H-3), 3.70 (s 3H -OMe)	Espectro 12
RMNC ¹³ (100 MHz, DMSO-d ₆ , δ)	162.7 (s C-7), 160.0 (s C-2), 156.81 (c C-4), 156.20 (s C-5), 157.03 (s C-8a), 145.70 (s C-4'), 144.20 (s C-3'), 130.44 (s C-1'), 118.94 (d C-6'), 115.60 (d C-5'), 114.72 (d C-2'), 110.64 (d C-3), 102.02 (s C-4a), 98.30 (d C-6), 92.90 (d C-8), 55.60 (c 7-MeO)	Espectro 13

(M^+ , pico base); a m/z 272 ($M^+ - CO$) y a m/z 257 ($M^+ - CO - 15$); el fragmento a 272 resultado de la pérdida de una molécula neutra de monóxido de carbono para originar un catión benzofurano, tal como se indica en la Figura 9. (Donnelly, 1968).

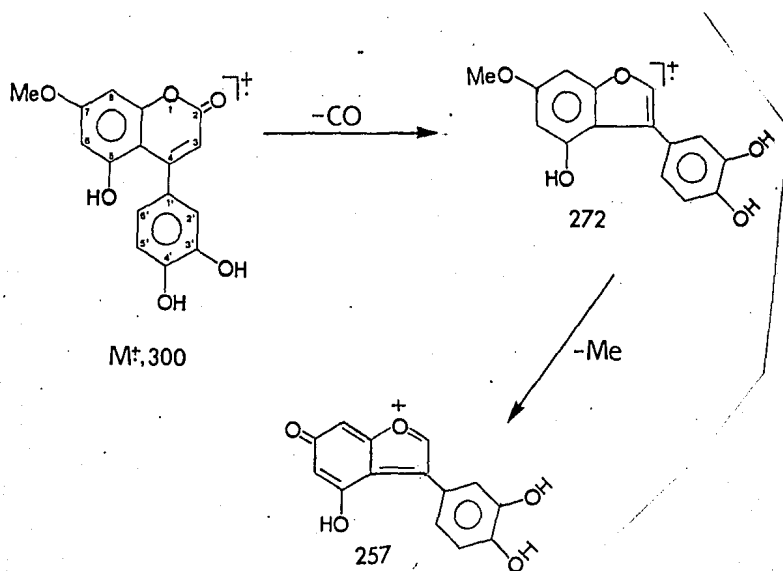
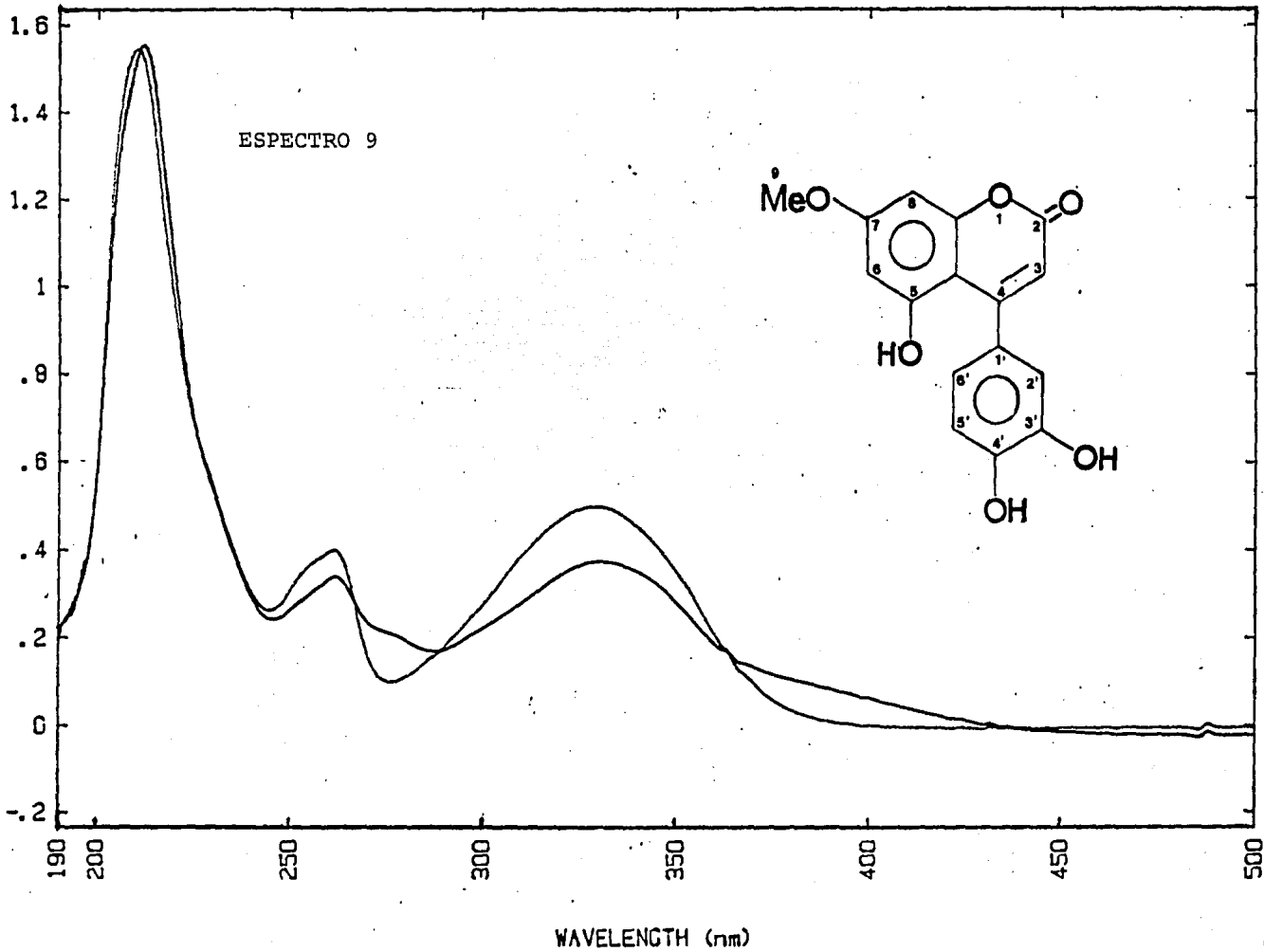


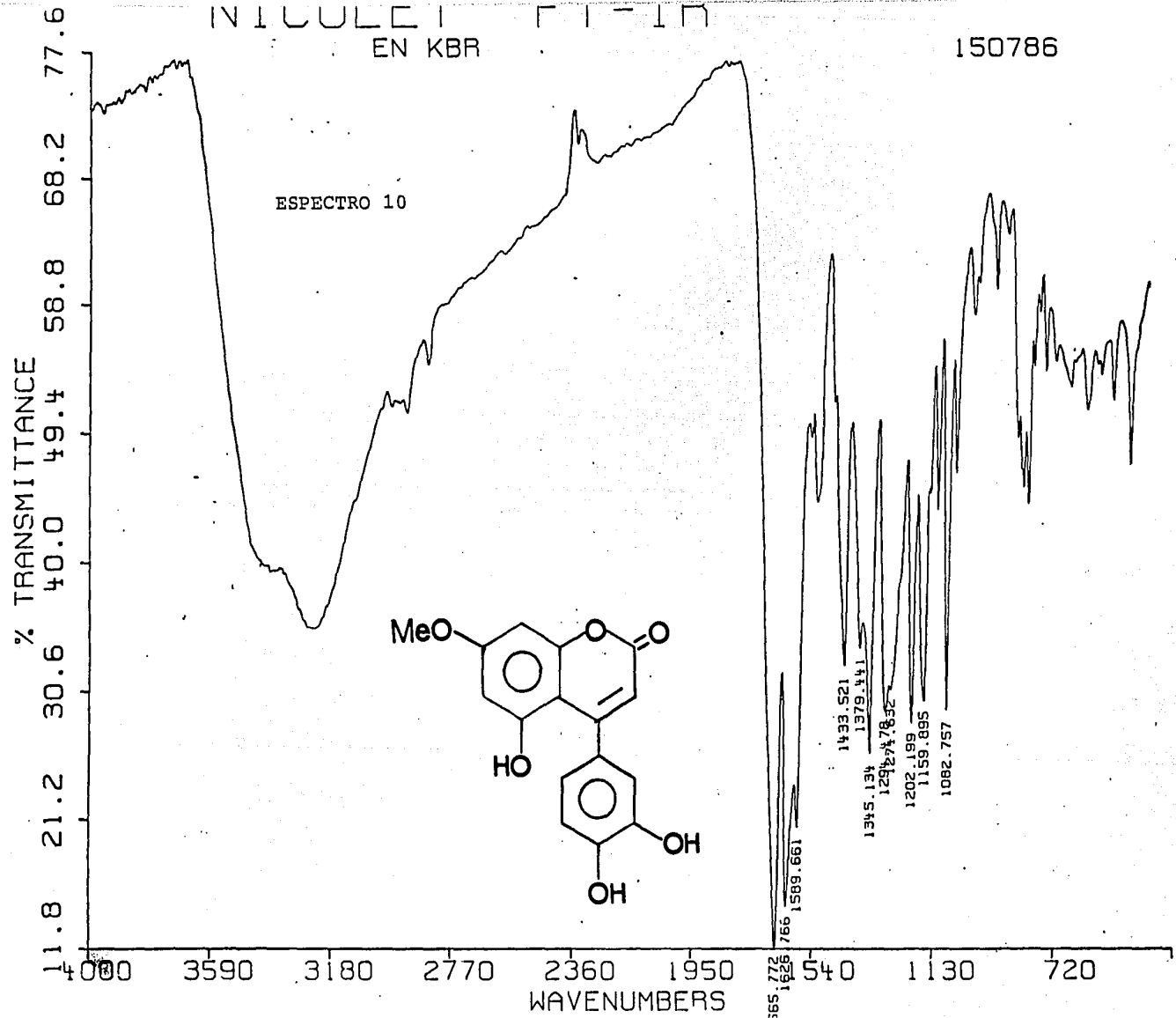
Figura 9. Patrón de fragmentación de una 4-fenilcoumarina.

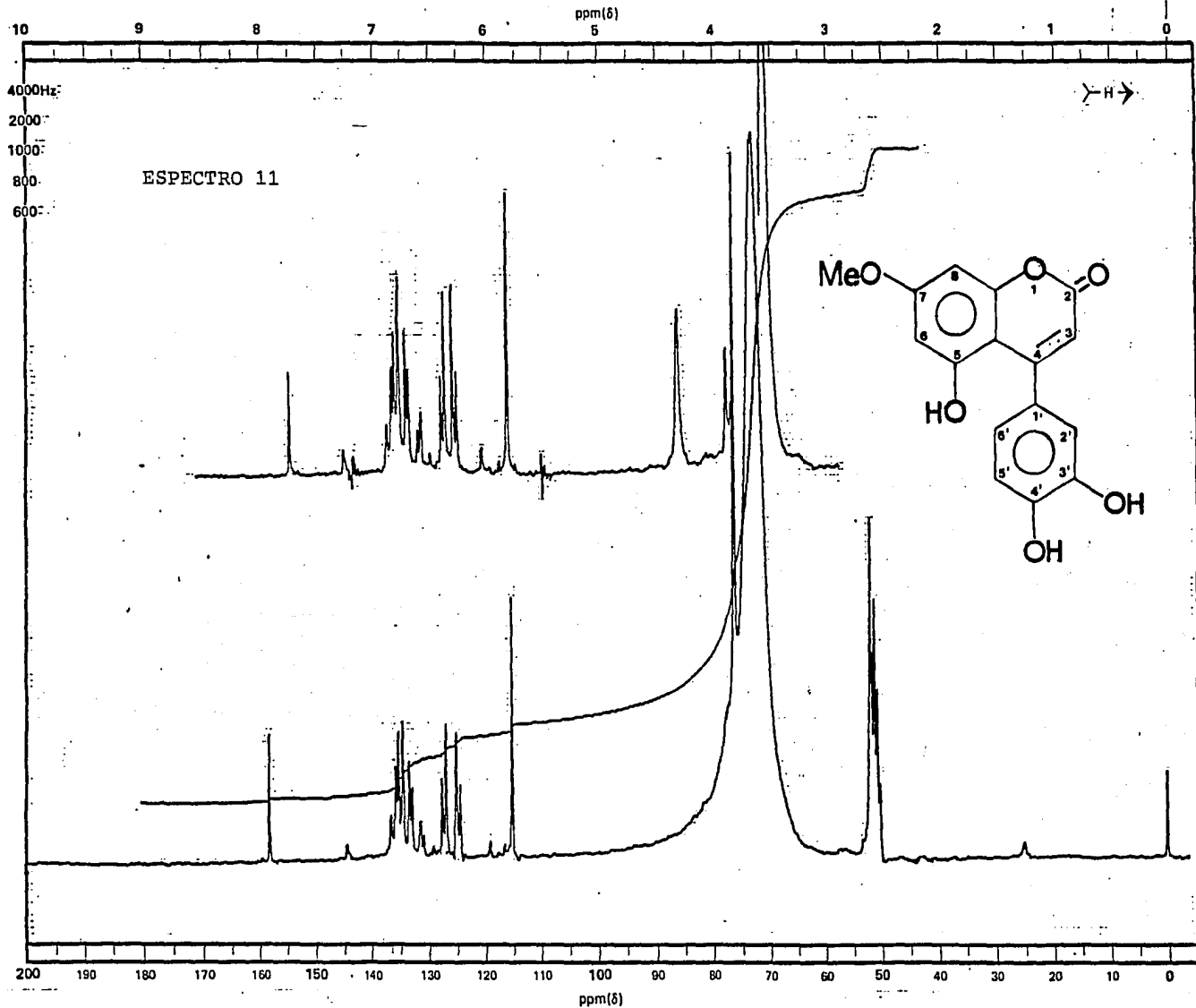
b) El espectro de RMNC¹³ (Espectro 13) mostró señales para 16 átomos de carbono y difería fundamentalmente del espectro del glicósido en la ausencia de las señales características de la acetil galactosa.

ABSORBANCE



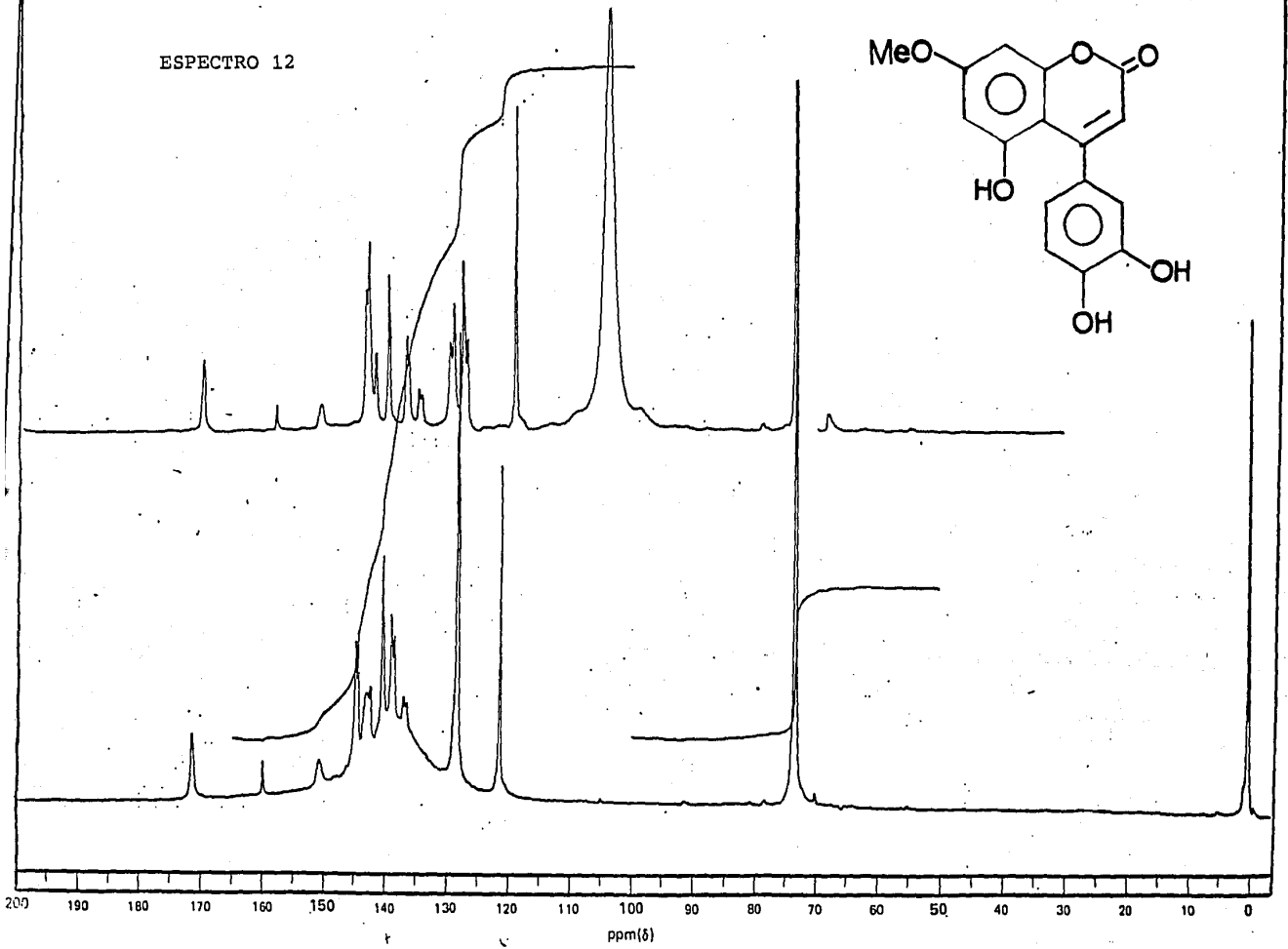
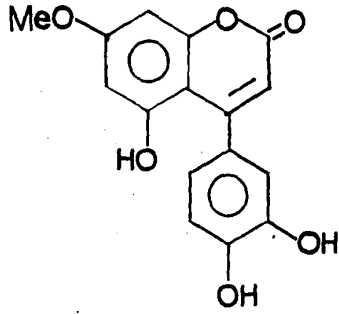
ESPECTRO 10



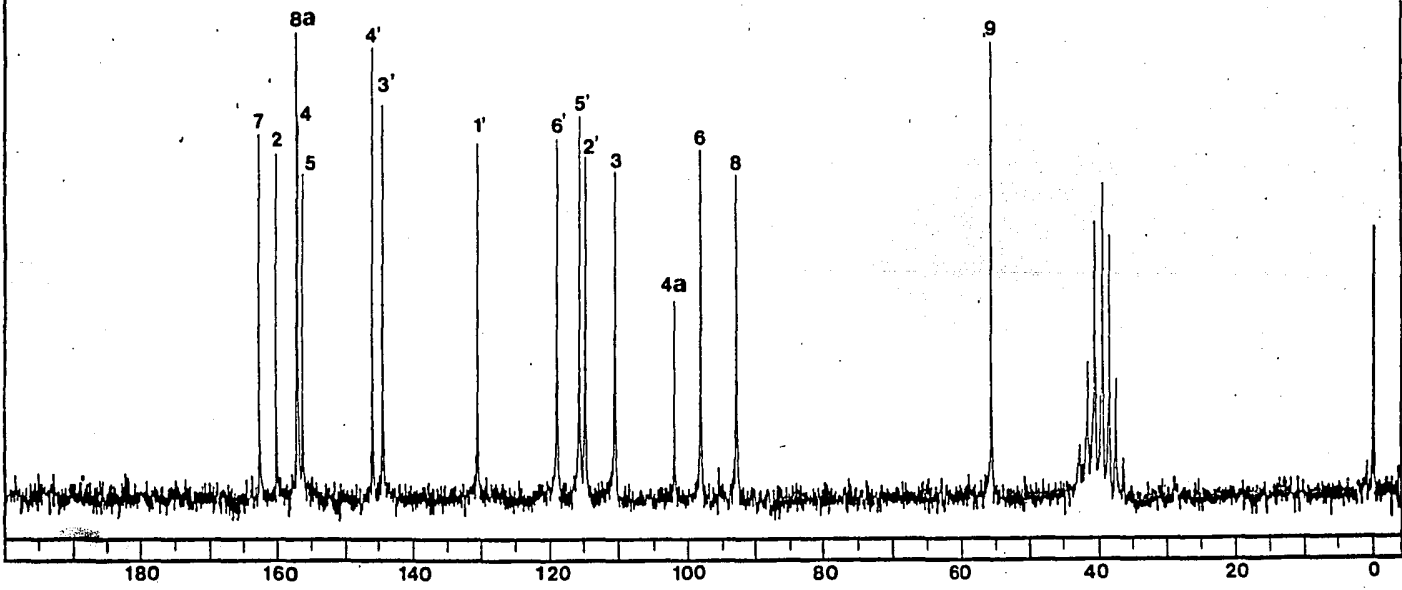
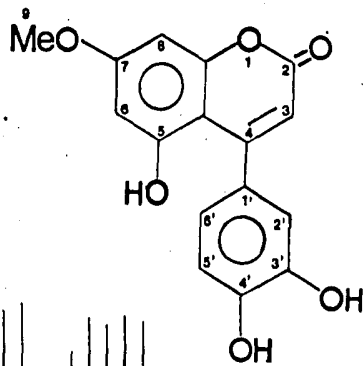


→ F1

ESPECTRO 12



ESPECTRO 13



c) El espectro de U.V. (Espectro 9) mostró esencialmente los mismos máximos de absorción que el glicósido.

d) Los espectros de RMNP en piridina- d_5 y $CDCl_3$ -DMSO- d_6 (Espectros 12 y 11) presentaron al igual que los correspondientes del glicósido.

d.1) El singulete de metoxilo [δ 3.70 en el espectro de piridina- d_5 y δ 3.84 en el espectro en $CDCl_3$ -DMSO- d_6].

d.2) El singulete correspondiente al H-3 (δ 6.06 y δ 5.78 respectivamente) de la estructura tipo.

d.3) El sistema ABC de un anillo aromático trisustituido (δ 6.9, dd, $J=8.2$ 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) como se puede apreciar en la Figura 10.

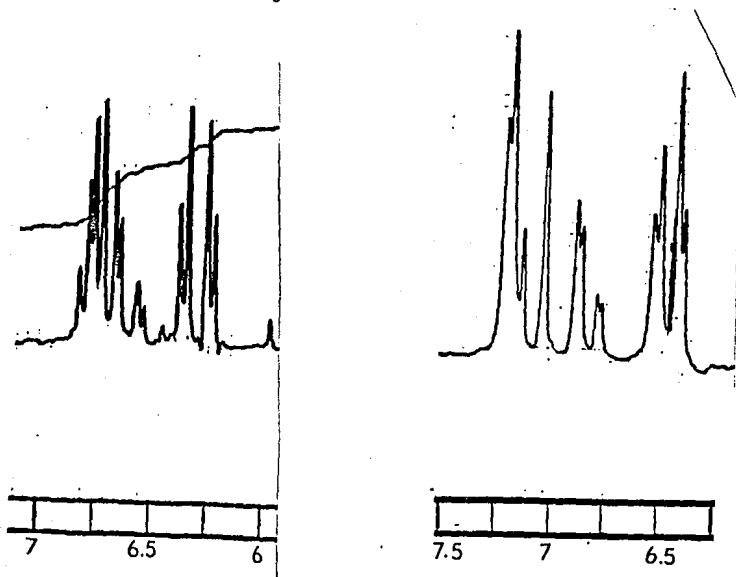


Figura 10. Región aromática del compuesto 57A en piridina y en $CDCl_3$ -DMSO- d_6 .

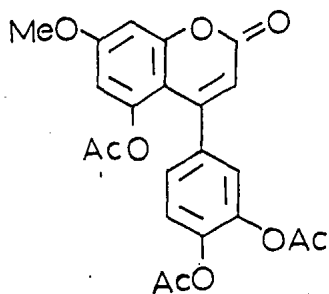
d.4) Un sistema AB formado por los dos protones meta relacionados del anillo A (δ 6.48 y 6.58, d, $J=2.5\text{Hz}$ en el espectro en piridina- d_5 y δ 6.24 y 6.37, d, $J=30\text{Hz}$ en el espectro en CDCl_3 -DMSO- d_6).

La acetilación de la aglicona con anhídrido acético y piridina originó el derivado triacetilado 57D cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 13.

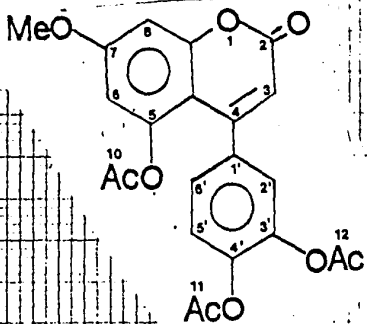
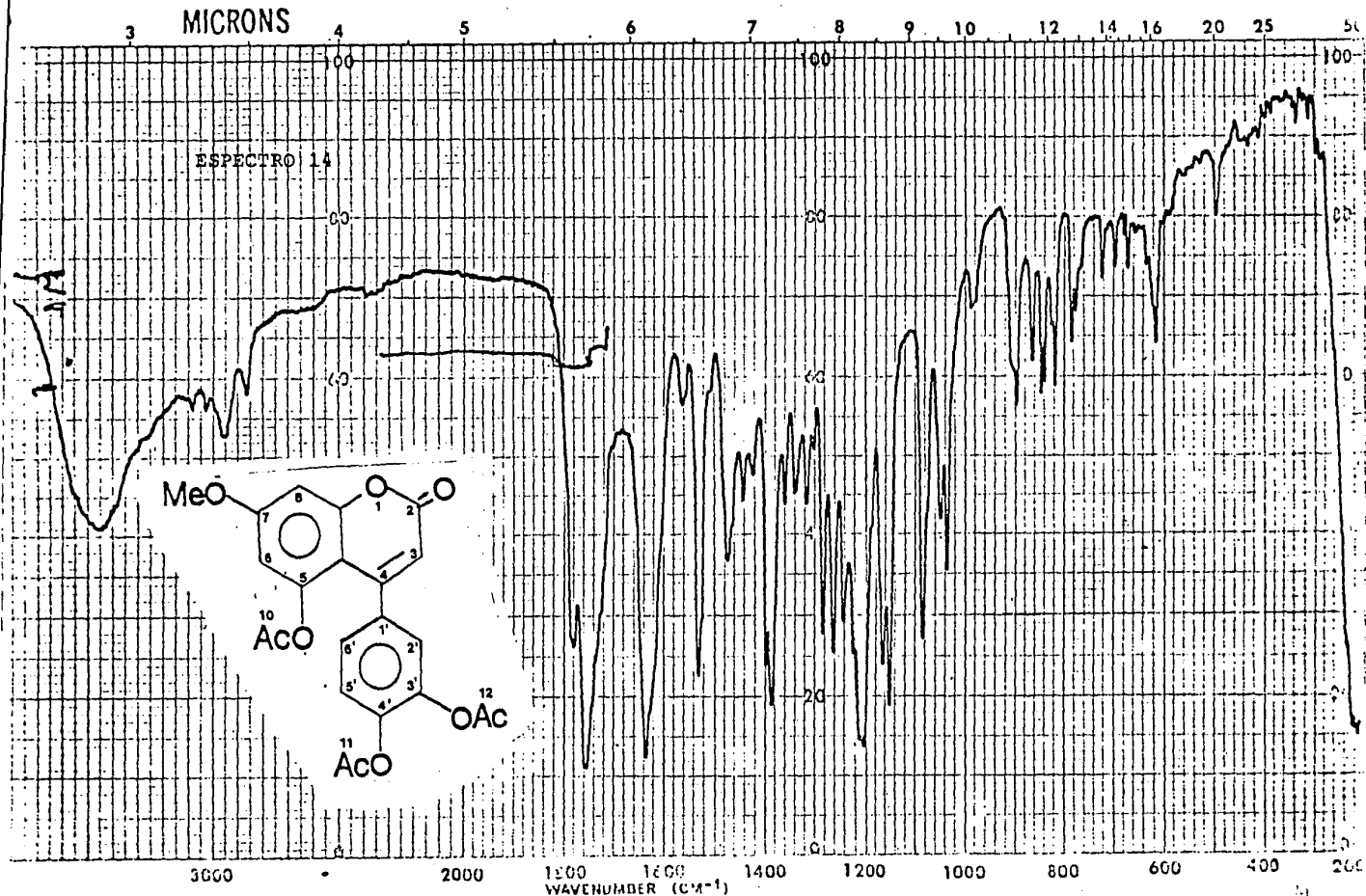
El desplazamiento a campo más alto para la absorción de uno de los metilos de acetato (δ 1.59) del derivado triacetilado 57D y la ausencia de este efecto diamagnético en las señales correspondientes a los metilos de los grupos acetoxi del derivado hexacetilado 57C del glicósido, permitieron concluir que el enlace O-glicosídico se formaba entre el hidroxilo del carbono anomérico del azúcar y el hidroxilo fenólico ubicado en el carbono 5 de la aglicona.

La absorción a campo más altos de los usuales para uno de los acetoxilos del derivado 57D, se debe a que cualquier substituyente en la posición C-5 de una 4-fenilcoumarina 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 substituyente en C-5 estará siempre sobre la nube electrónica del mismo. Este efecto se ilustra en la Figura 11.

Tabla 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 57D.



P.M.	426	
P.F.	155-159°C	
IR ν_{max} KBr cm^{-1}	1777, 1763, 1724, 1620, 1506, 1430, 1371, 1345, 1212, 1155, 1068, 908	Espectro 14
RMNP (CDCl_3 , δ)	7.10-7.30 (m 3H H-3', H-5', H-6'), 6.82 (d J=3 Hz 1H H-6), 6.48 (d J=3 Hz 1H H-8), 6.07 (s 1H H-3), 3.83 (s 3H OMe), 2.30 (s 3H C-3' $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.30 (s 3H C-4' $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.59 (s 3H C-5 $\text{CH}_3\text{CO-}$)	Espectro 15



FC-1-34C

Rachd Mata

SOLVENT KBr

CONC

CELL PATH

REFERENCE pure

PERKIN ELMER

SCAN 12

SLIT N

OPERATOR Silvia

DATE 2/11/80

No. 5102-1000

SINGLE B.

T.D. SPEED.

ORD. EXP.

T.CONST

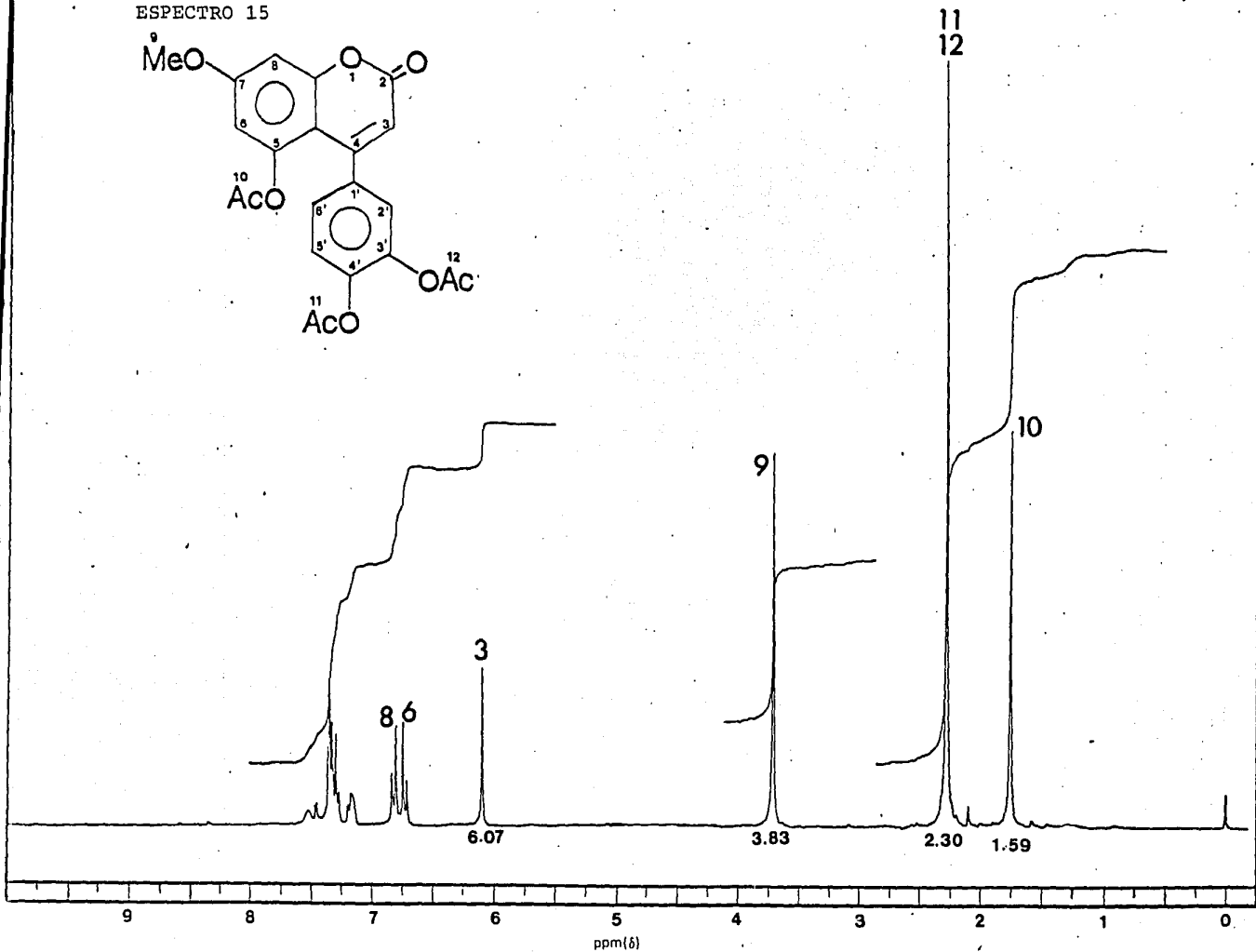
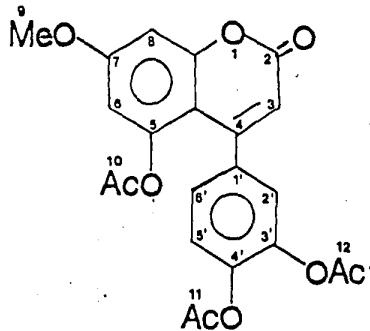
REF. No. 16956

REMARKS.

pastilla

ESPECTRO 15

→ H



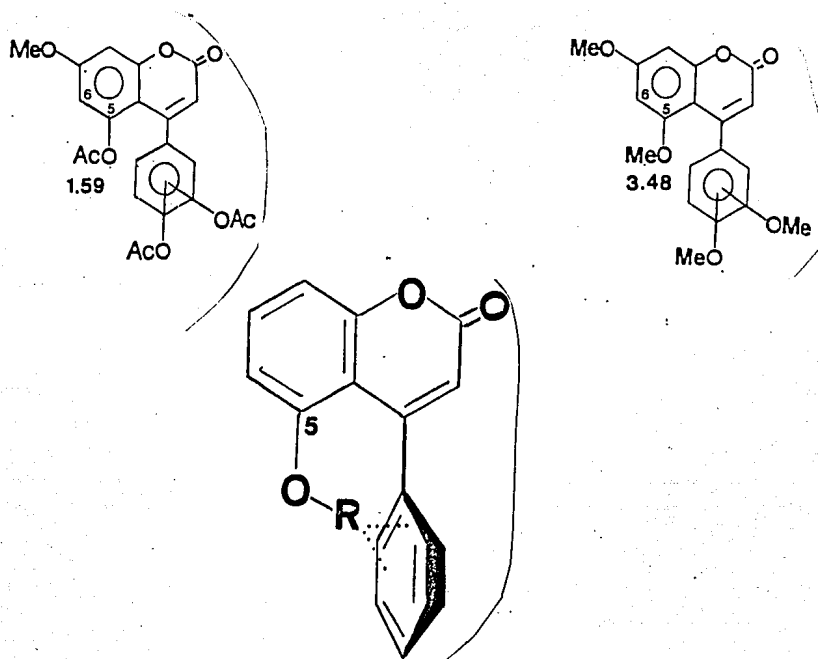


Figura 11. Efecto protector del 4-arilo sobre sustituyentes en la posición C-5 de la arilcoumarina.

Una vez establecido el punto de unión del azúcar a la fenilcoumarina, solo restaba establecer la naturaleza del enlace. En este sentido la magnitud de la constante de acoplamiento ($J=8\text{Hz}$) observado para el protón anomérico permitió concluir que el enlace era de naturaleza β -glicosídico. Esta observación fué congruente con los resultados observados al hidrolizar el glicósido deacetilado con

una β -glucosidasa (ver sección experimental).

En conclusión la información presentada permitió establecer que la estructura del compuesto 57 era el 5-O-[6''-acetil- β -D-galactosil-]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina el cual representa un nuevo producto natural.

4.2 Identificación de la 5-O- β -D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, 59.

De las fracciones 400-442 de la columna de la Tabla 4 (ver sección experimental) cristalizó en forma espontánea un compuesto de color crema. Su fórmula molecular se estableció como $C_{22}H_{22}O_{11}$ mediante un análisis elemental. Las constantes físicas y espectroscópicas del mismo y su estructura se muestran en la Tabla 14.

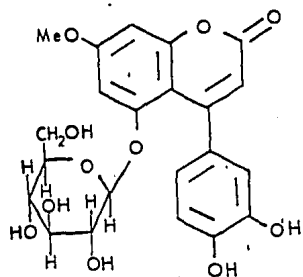
Al igual que el compuesto 57, este sólido era altamente soluble en disolventes polares, reaccionó positivamente con el reactivo de Molisch y por hidrólisis ácida con H_2SO_4 2N o enzimática con una β -glucosidasa originaba glucosa y una aglicona cromatográficamente idéntica a la del 57.

El espectro de RMNP en $CDCl_3$ -DMSO- d_6 (Espectro 18) era similar al del compuesto 57 y confirmó:

a) La naturaleza glucosídica del compuesto ya que a la δ 4.70 se observó un doblete ($J=8Hz$) característico para el carbono anomérico del azúcar.

b) La presencia, en la molécula de un anillo aromático trisustituido [sistema ABC, δ 6.83 (d $J=8Hz$); δ 6.82 (d $J=3Hz$); (dd

Tabla 14. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 59.



P.M.	462	
P.F.	237-238°C	
UV λ_{max}	MeOH nm	218, 259, 329
IR ν_{max}	KBr cm^{-1}	3500, 2900, 1700, 1618, 1430, 1360, 1340, 1310, 1230, 1160, 1090, 1080, 1040
RMN ¹	(CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)	6.82 (d J=8 1H H-5'), 6.82 (d J=3 1H H-2'), 6.65 (dd J=8,3 Hz H-6'), 6.61 (d J=3 H-8), 6.56 (d J=3 1H H-6), 5.87 (s 1H H-3), 4.70 (d J=8 1H H-1''), 4.60-3.10 (m), 3.85 (s 3H OCH ₃)
RMN ¹³	(DMSO-d ₆ , δ)	162.80 (s C-7), 159.65 (s C-2), 156.35 (s C-4), 155.86 (s C-8a), 155.54 (s C-5), 145.73 (s C-4'), 144.05 (s C-3'), 130.35 (s C-1'), 119.24 (d C-6'), 115.72 (d C-5'), 114.69 (d C-2'), 112.14 (d C-3), 103.48 (s C-4a), 100.01 (d C-1''), 98.27 (d C-6), 95.29 (d C-8), 77.15 (d C-5''), 76.33 (d C-3''), 73.03 (d C-2''), 69.56 (d C-4''), 60.73 (d C-6''), 55.96 (C, OCH ₃)
A.E. Calc.	C 57.14%	H 4.76%
Enc.	C 56.98%	H 4.89%

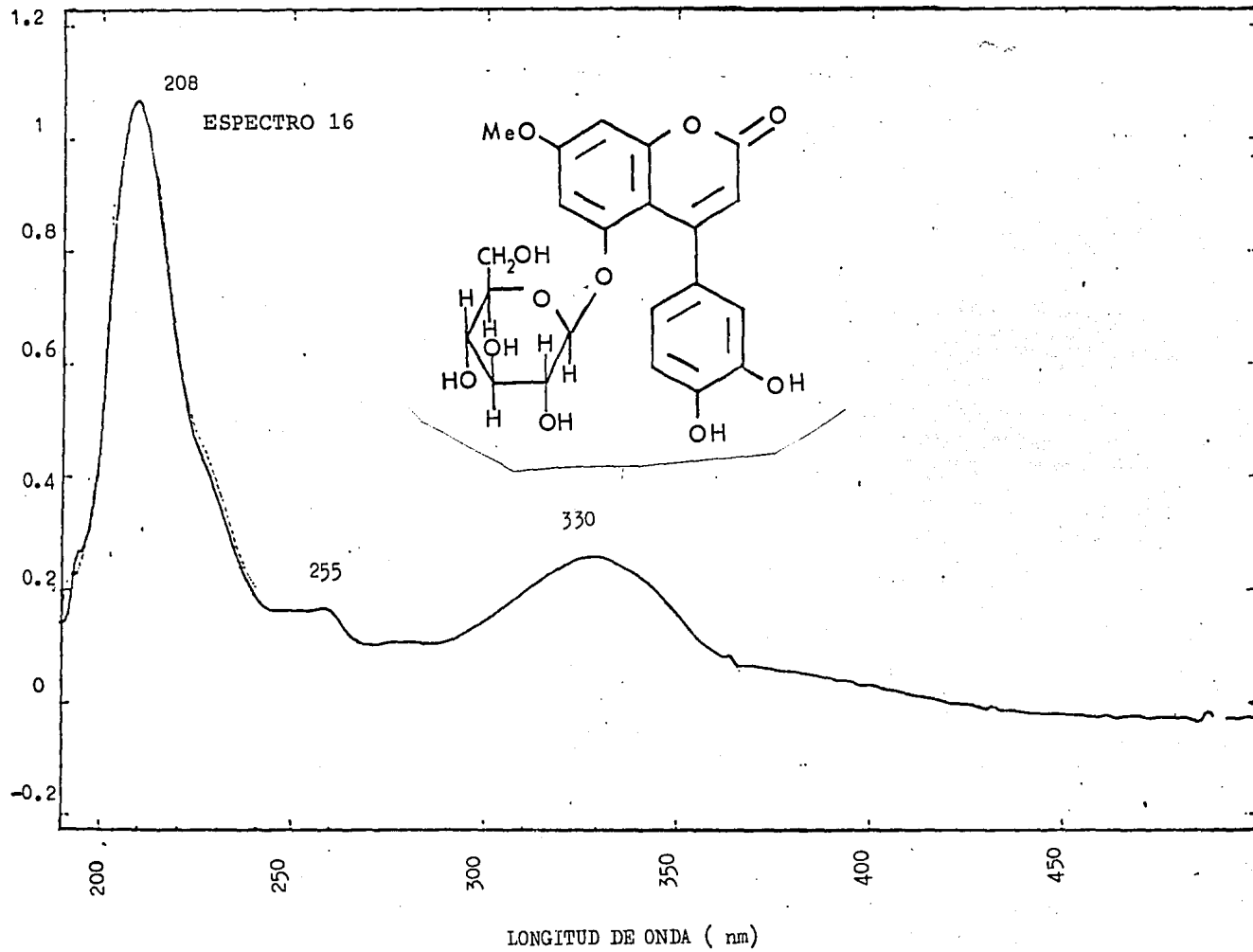
Espectro 16

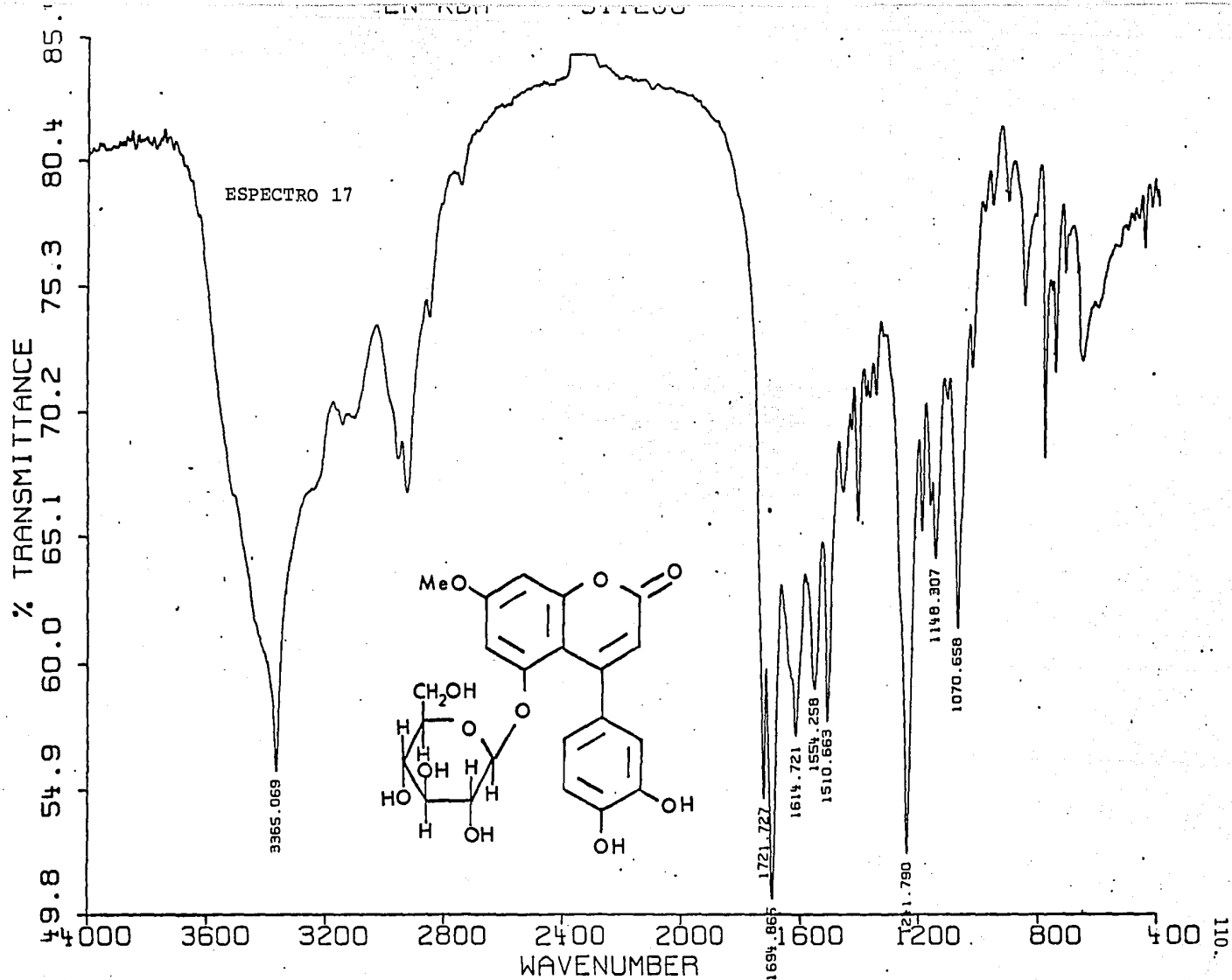
Espectro 17

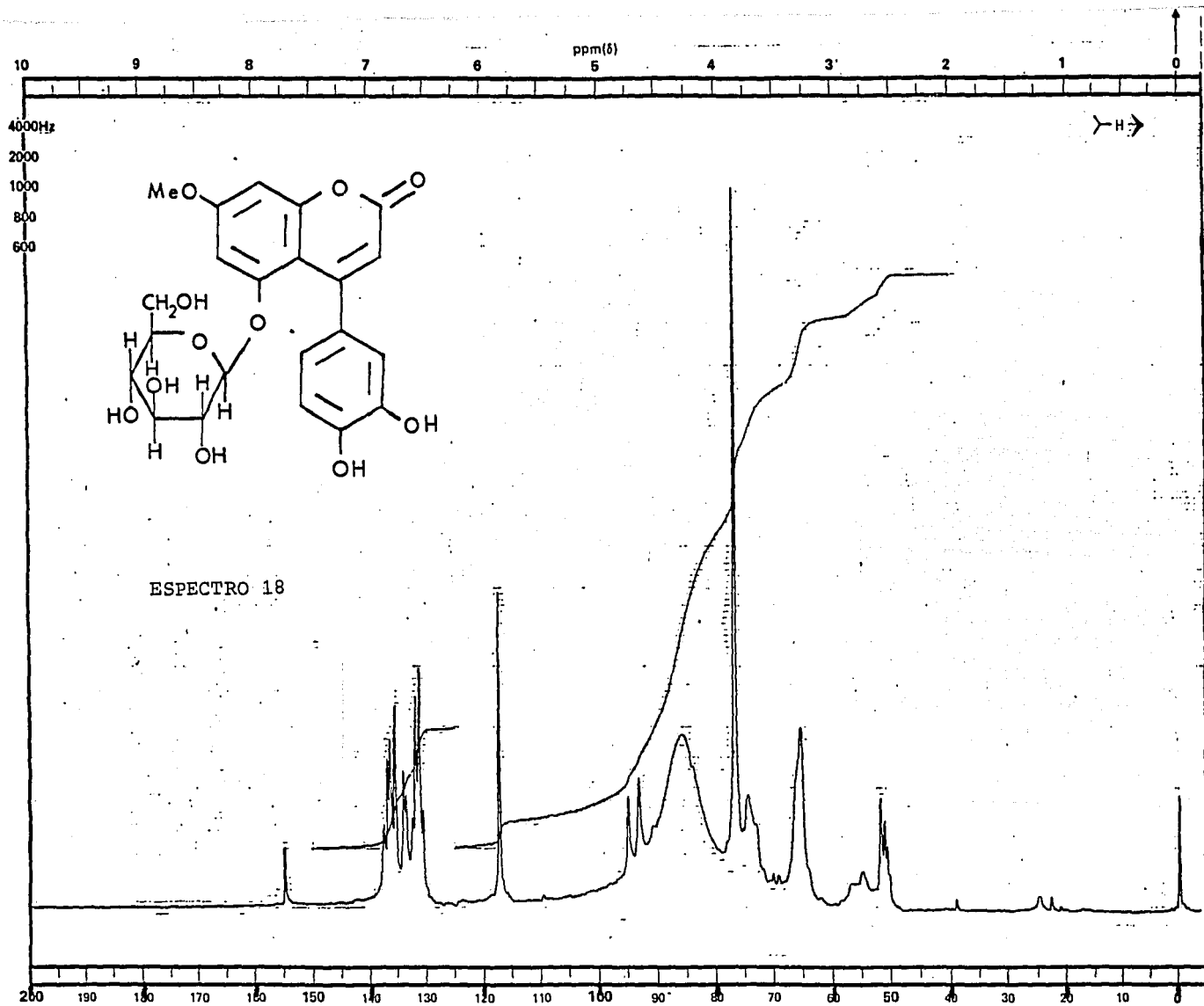
Espectro 18

Espectro 19

ABSORBANCIA







ESPECTRO 18

$J=8.3\text{Hz}$] y de un anillo aromático tetrasustituído con dos protones meta relacionados a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento ($J=3\text{Hz}$) observado para los dos dobletes a δ 6.61 y δ 6.56. La porción aromática de este compuesto se ilustra en la Figura 12.



Figura 12. Región aromática del compuesto 59.

El espectro en $\text{CDCl}_3\text{-DMSO-}d_6$ mostraba también un singlete característico para un metoxilo unido a un anillo aromático (δ 3.85, Espectro 18) y un singlete que integraba para un protón asignable

al hidrógeno vinílico de una 4-fenilcoumarina. Finalmente, se observaban las señales para la porción azucarada.

El tratamiento del glicósido con anhídrido acético y piridina permitió obtener el derivado acetilado 59B, cuyas características físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 15. Este derivado hexacetilado al igual que en el caso anterior, confirmó la presencia en la molécula de un solo monosacárido y de dos hidroxilos fenólicos.

El espectro de RMNC¹³ (Espectro 19) difería de aquel del compuesto 57, básicamente en las señales correspondientes al azúcar. La comparación de los desplazamientos químicos descritos en la literatura (Tabla 11) con los observados en el espectro permitió identificar inequívocamente a la glucosa como la porción glicona del compuesto 59. Las restantes señales del espectro como se puede apreciar en la Tabla 14 fueron idénticas a las del compuesto 57.

Al hidrolizar en condiciones ácidas, 56 mg del glicósido, fue posible aislar la aglicona correspondiente. Esta aglicona mostró las mismas características físicas y espectroscópicas (Ver Tabla 12) de la aglicona de glicósido 57.

El punto de unión de la glucosa a la fenilcoumarina así como la naturaleza del enlace glucosídico se establecieron siguiendo el mismo razonamiento que para el compuesto 57.

Las evidencias analizadas previamente permitieron identificar al compuesto 59 como la 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dehidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina, también un nuevo producto natural.

ESPECTRO 19

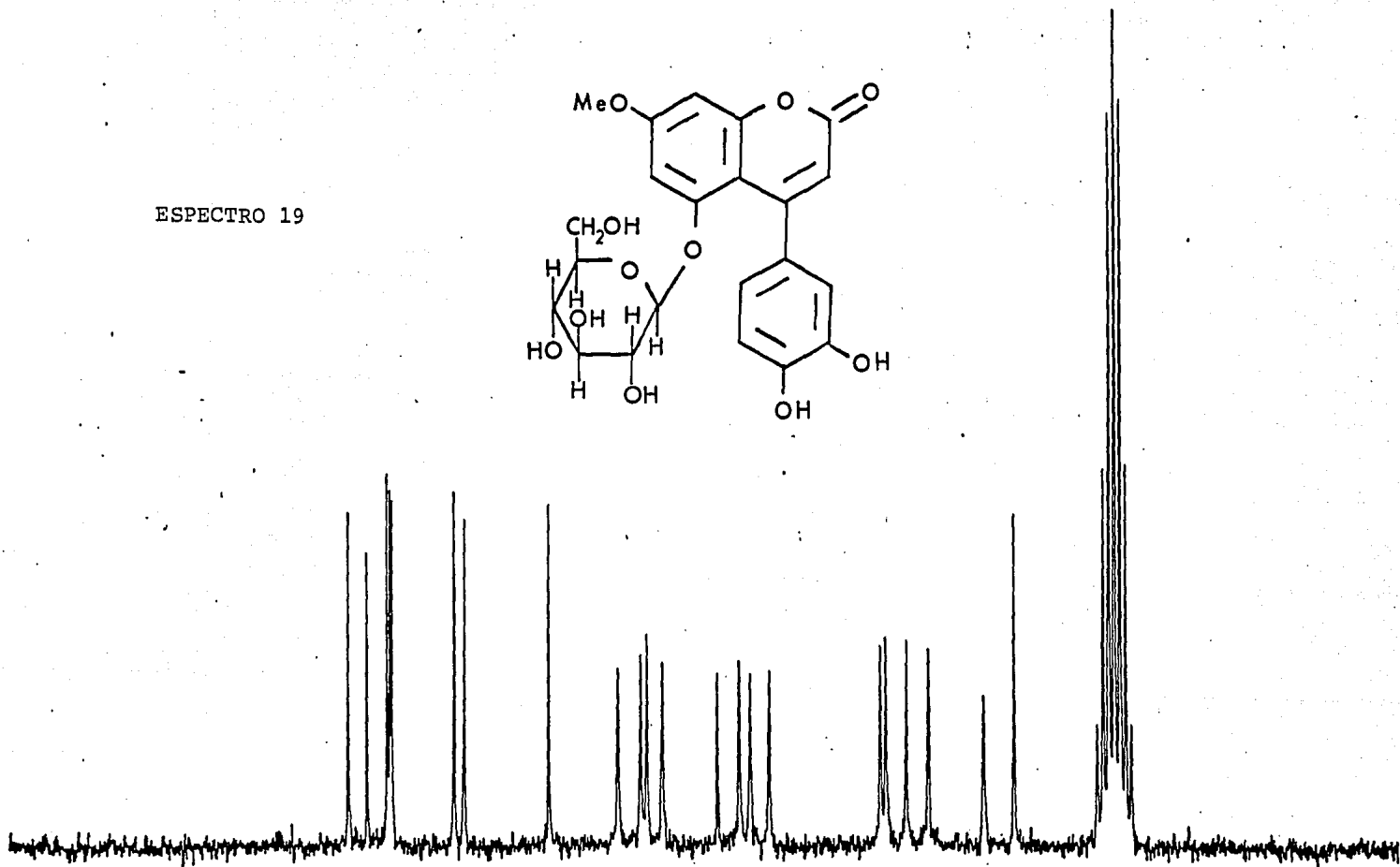
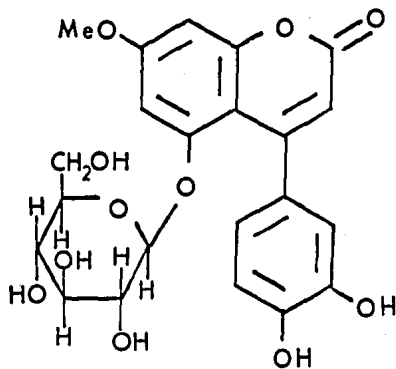
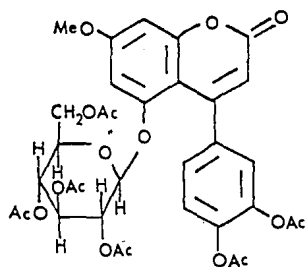
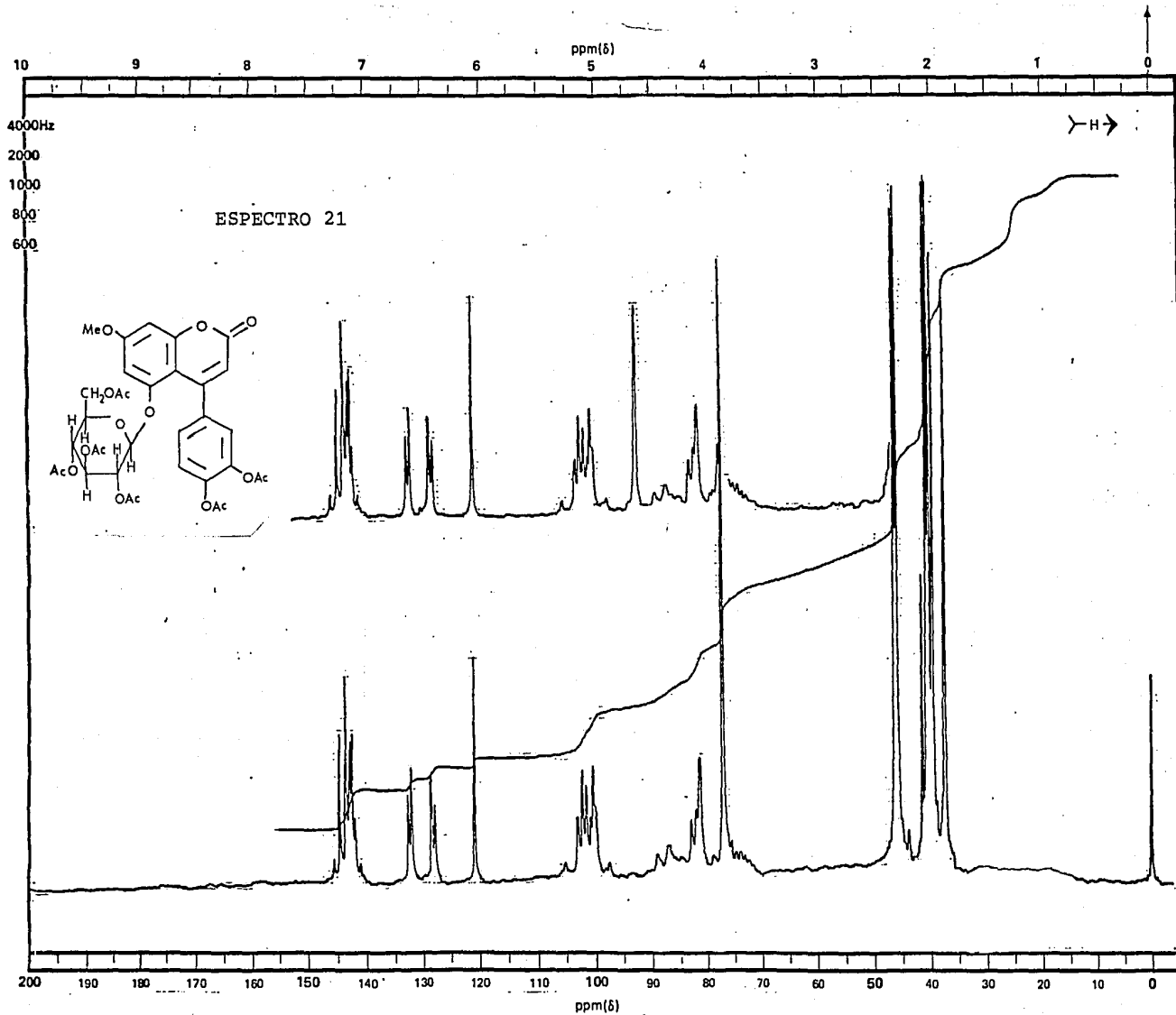


Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-hexacetoxi-glucosil-3',4'-diacetoxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina. 59B.



P.M.	714	
P.F.	90-95°C	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3440, 2930, 1755, 1620, 1370, 1225, 1170, 1110, 1070, 910	Espectro 20
RMNP (CDCl_3 , δ)	7.28-7.05 (m 3H H-2', H-3', H-5'), 6.62 (d J=3 1H H-6), 6.42 (d J=3 1H H-8), 6.06 (s 1H H-3), 4.0-5.26 (m), 3.89 (s 3H OCH_3), 2.35 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.33 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.06 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.04 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.00 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.90 (s 3H $\text{CH}_3\text{CO-}$)	Espectro 21



4.3 Caracterización de la 5-O-β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenil-coumarina 60.

De las fracciones 305-462 de la columna original (Tabla 4) se aislaron 50 mg de una sustancia de naturaleza glicosídica. Este producto se obtuvo como un polvo cristalino de color amarillo, $pf = 217-221^{\circ}C$. Su fórmula molecular se estableció mediante análisis elemental como $C_{23}H_{24}O_{10}$. Su estructura, y los parámetros físicos y espectroscópicos se resumen en la Tabla 16.

El análisis cromatográfico de los productos de la hidrólisis enzimática con celulasa ó β-glucosidasa permitió detectar a la galactosa como carbohidrato y a una aglicona altamente fluorescente, diferente a la de los compuesto 57 y 59.

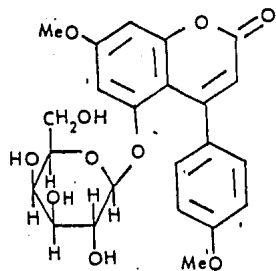
Sus espectros IR (Espectro 22) y U.V., así como la fluorescencia observada al analizar las cromatoplaques indicaron la naturaleza fenilcoumarina del glicósido.

En el espectro de RMNP en $CDCl_3$ -DMSO- d_6 (Espectro 23) se observó lo siguiente:

a) Un sistema AA'BB' (ver Figura 13) característico de un anillo aromático orto o para disustituído [$\delta 7.20$ (d J=8Hz), $\delta 6.87$ (d J=8Hz)].

b) Un sistema AB (ver Figura 13) de un anillo aromático tetrasustituído con dos protones meta relacionados [$\delta 6.62$ (d J=3Hz), $\delta 6.53$ (d J=3Hz)] y que al igual que en los compuesto 57 y 59 eran asignables a los protones H-6 y H-8 de una fenilcoumarina con sus-

Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcoumarina. 60.



P.M.	460		
P.F.	217-221°C		
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	nm	208, 251, 326	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	cm ⁻¹	3500, 3200, 1690, 1671, 1614, 1593, 1512, 1444, 1367, 1262, 1241, 1205, 1171, 1120, 1068, 831	Espectro 22
RMNP (δ , CDCl ₃ -DMSO-d ₆)		7.20 (d 2H J=8 Hz H-2' y H-6'), 6.87 (d 2H J=8 Hz H-3' y H-5'), 6.62 (d 1H J=3.0 Hz H-8), 6.53 (d 1H J=3 Hz H-6), 5.92 (s 1H H-3), 4.54 (d 1H J=8 Hz H-1''), 3.84 (s 6H OCH ₃) 4-3 (m H-2''-H-6'')	Espectro 23
RMNC ¹³ (δ , DMSO-d ₆)		162.69 (s C-7), 160.00 (s C-2), 157.60 (s C-4'), 156.35 (s C-4), 155.97 (s C-8a), 155.54 (s C-5), 129.80 (s C-1'), 129.37 (d C-2', C-6'), 114.20 (d C-3', C-5'), 112.31 (d C-3), 103.26 (s C-4a), 100.90 (d C-1''), 98.33 (d C-6), 95.14 (d C-8), 75.85 (d C-5''), 73.30 (d C-3''), 69.78 (d C-2''), 68.05 (d C-4''), 60.46 (t C-5''), 55.91 (C, OMe)	Espectro 24

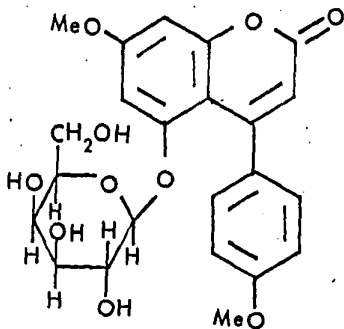
EN KBR

081087

ESPECTRO 22

% TRANSMITTANCE

76.2
68.1
60.0
51.9
43.8
35.7
27.6
19.5

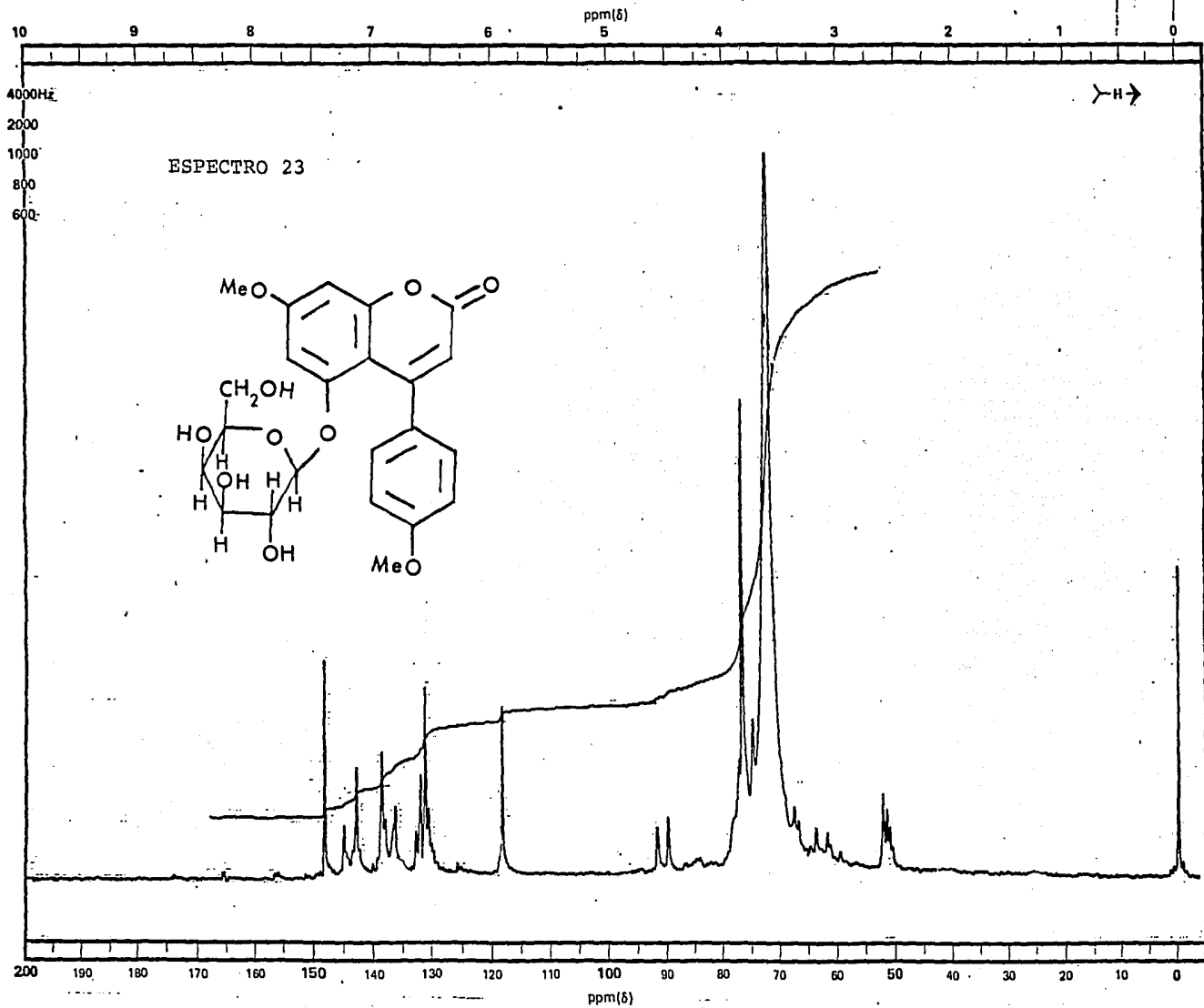


4000 3600 3200 2800 2400 2000 1600 1500 1400 1300 1200 1100 1000 800 400

WAVENUMBER

1671.580
1595.743
1512.574
1444.315
1398.679
1309.196
1241.266
1205.588
1171.151
1120.680
1021.021
1000.000
980.000
831.891

120



tituyentes oxigenados en 5 y 7.

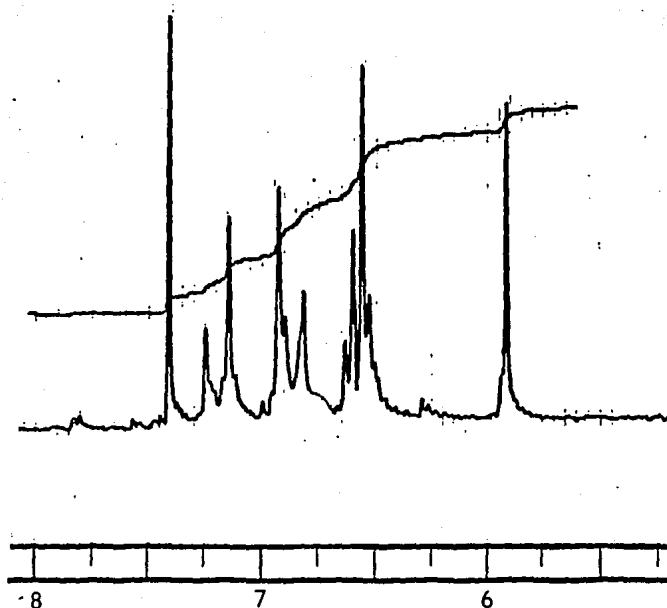


Figura 13. Región aromática de la fenilcoumarina 60.

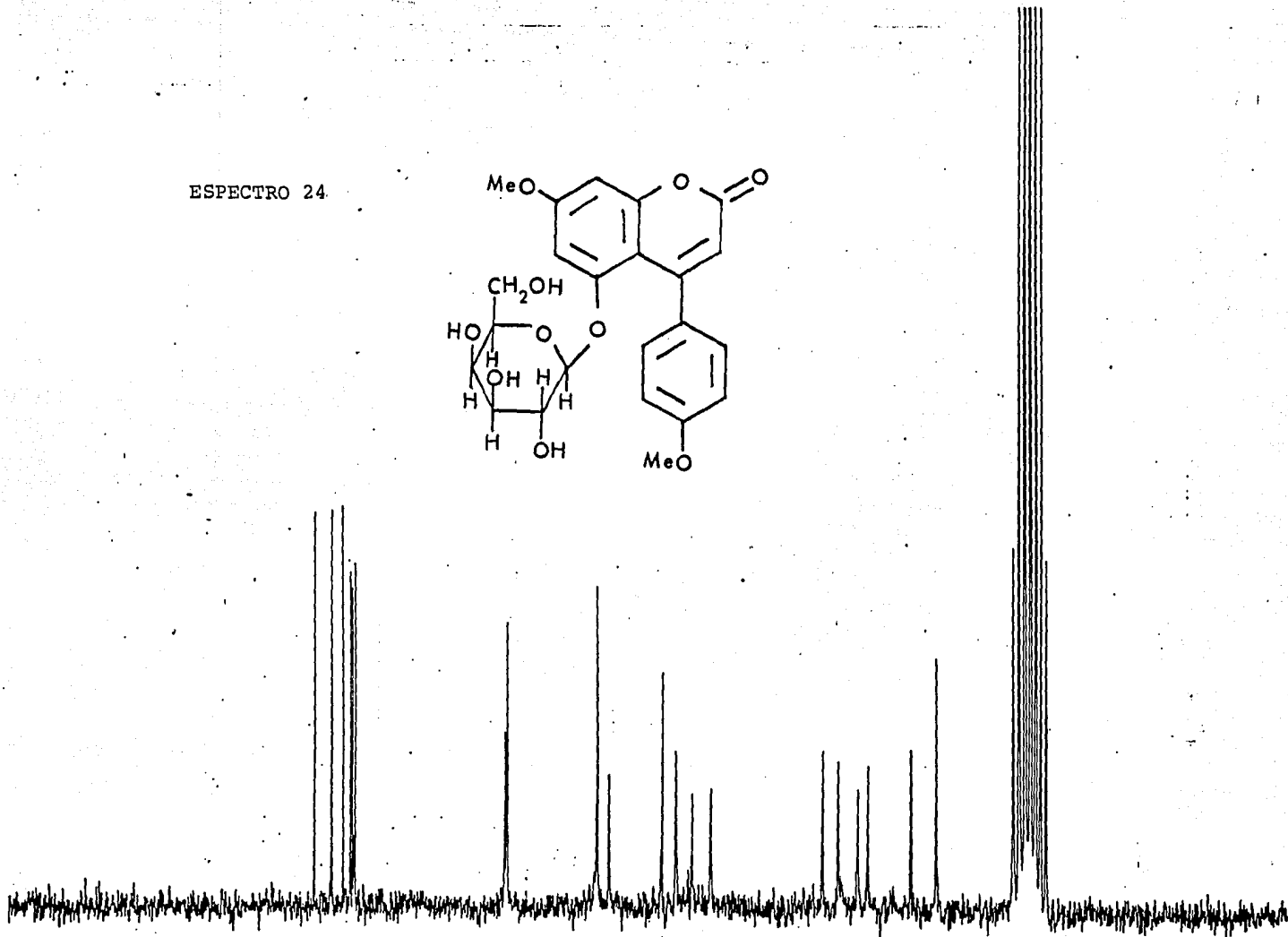
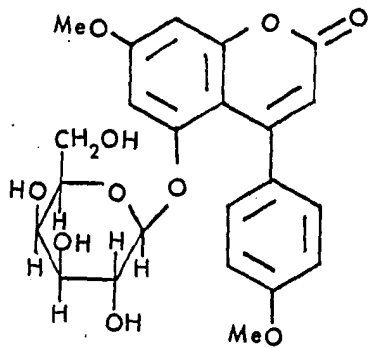
- c) El singulete correspondiente a H-3.
- d) El doblete característico del carbono anomérico del azúcar.
- e) Un singulete a δ 3.84, el cual integraba para dos grupos metoxilos.
- f) Finalmente, un múltiplete entre δ 4-3 correspondiente a los protones del azúcar.

El espectro de RMNC¹³ (Espectro 24) presentó solo 20 señales de las cuales seis (δ 100.9, 69.78, 73.30, 68.05, 75.85, 60.46) eran asignables a la galactosa, de acuerdo a los modelos de la Tabla 11 y en concordancia con los resultados del análisis cromatográfico de los productos de hidrólisis enzimática. El singulete a δ 55.91 debía corresponder a los dos metoxilos observados en el espectro de RMNP y las señales a δ 160.00, 112.31, 156.35 a los carbonos del anillo α -pirona. Finalmente, las 10 señales restantes, eran asignables a los carbonos aromáticos del núcleo base. De ellas, los singuletes a δ 155.54, 162.69, 155.97 y 157.60, de acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, debían corresponder a los cuatro carbonos unidos a oxígeno, es decir, a los carbonos aromáticos base de los dos metoxilos, al C-8a y al carbono unido a la galactosa a través del enlace O-glicosídico; en tanto que, las seis faltantes a los otros carbonos aromáticos.

A fin de satisfacer los elementos requeridos por la fórmula molecular en cuanto al número de carbonos se refiere, era obvio que existían dos pares de carbonos equivalentes o isocronos.

Como se puede observar en la Tabla 17, los resultados de los cálculos teóricos, siguiendo el principio de actividad (Levy, 1976), para determinar los desplazamientos químicos de los carbonos de un anillo C para sustituido con un grupo metoxilo de una fenilcoumarina, eran congruentes con una equivalencia de los carbonos 2'6' y 3'5'. Las resonancias a δ 129.37 y a δ 114.20 observadas en el espectro de RMNC¹⁴ del compuesto 60 podrían entonces ser asignadas

ESPECTRO 24



a los carbonos 2'6 y 2'5' respectivamente.

Tabla 17. Comparación de los desplazamientos químicos calculados para los carbonos aromáticos del anillo C de una 4-fenilcoumarina "para" sustituido con un metoxilo, con los observados para el compuesto 60.

Carbono/No.	<u>60</u>	Valor calculado	Modelo*
2'-6'	129.37	129.20	128.20
3'-5'	112.31	114.24	128.64
4'	157.60	160.80	129.40

*-7-metoxi-4-fenilcoumarina (Pelter, 1976).

Cabe hacer notar que la equivalencia antes señalada era consistente con el sistema AA'BB' observado en el espectro de RMNP del glicósido.

Como los desplazamientos químicos de los dos dobletes a δ 98.33 y δ 95.14 coincidían con los desplazamientos observados para los carbonos 5 y 7 de los glicósidos anteriores se podía inferir que el anillo A era igualmente 5,7 disustituido y que la galactosa estaba unido mediante un enlace O-glicosídico al carbono 5 y el OMe estaba ubicado en C-7. En el caso contrario se hubiese observado un metoxilo desplazado a campos sensiblemente más altos debido al efecto protector que se ilustra en la Figura 11.

4.4 Caracterización de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 52.

Al recromatografiar las fracciones 150-304 de la columna de la Tabla 4 (Ver parte experimental) se obtuvo un sólido amarillo oro pf >300°C, cuya fórmula se estableció como C₁₆H₁₀O₆ (Espectrometría de masas). En la Tabla 18 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas y se indica su estructura molecular.

Su espectro de masas presentó un ión molecular a m/z 298. Otros fragmentos importantes se observan a m/z 270 (M-28), 242 (270-28) y 69. Las dos pérdidas consecutivas de 28 unidades de masa; así como las bandas de absorción observadas al U.V. (Espectro 25), sugirieron que el compuesto era una óxidocoumarina (Reher y Krauss, 1984).

Su espectro de RMNP en CDCl₃-DMSO-d₆ (Espectro 27), bastante sencillo, presentó las siguientes características.

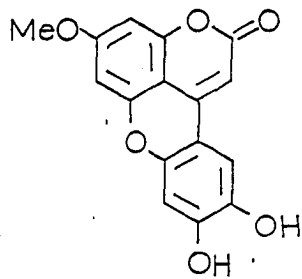
a) A δ 7.20 y δ 6.77 se observaron dos singuletes (cada uno integraba para un protón) que sugerían *a priori* protones para relacionados.

b) A δ 6.55 se observó un singulete ancho para dos protones equivalentes. En principio, el H-6 y el H-8 de una oxidocoumarina podían cumplir este requerimiento.

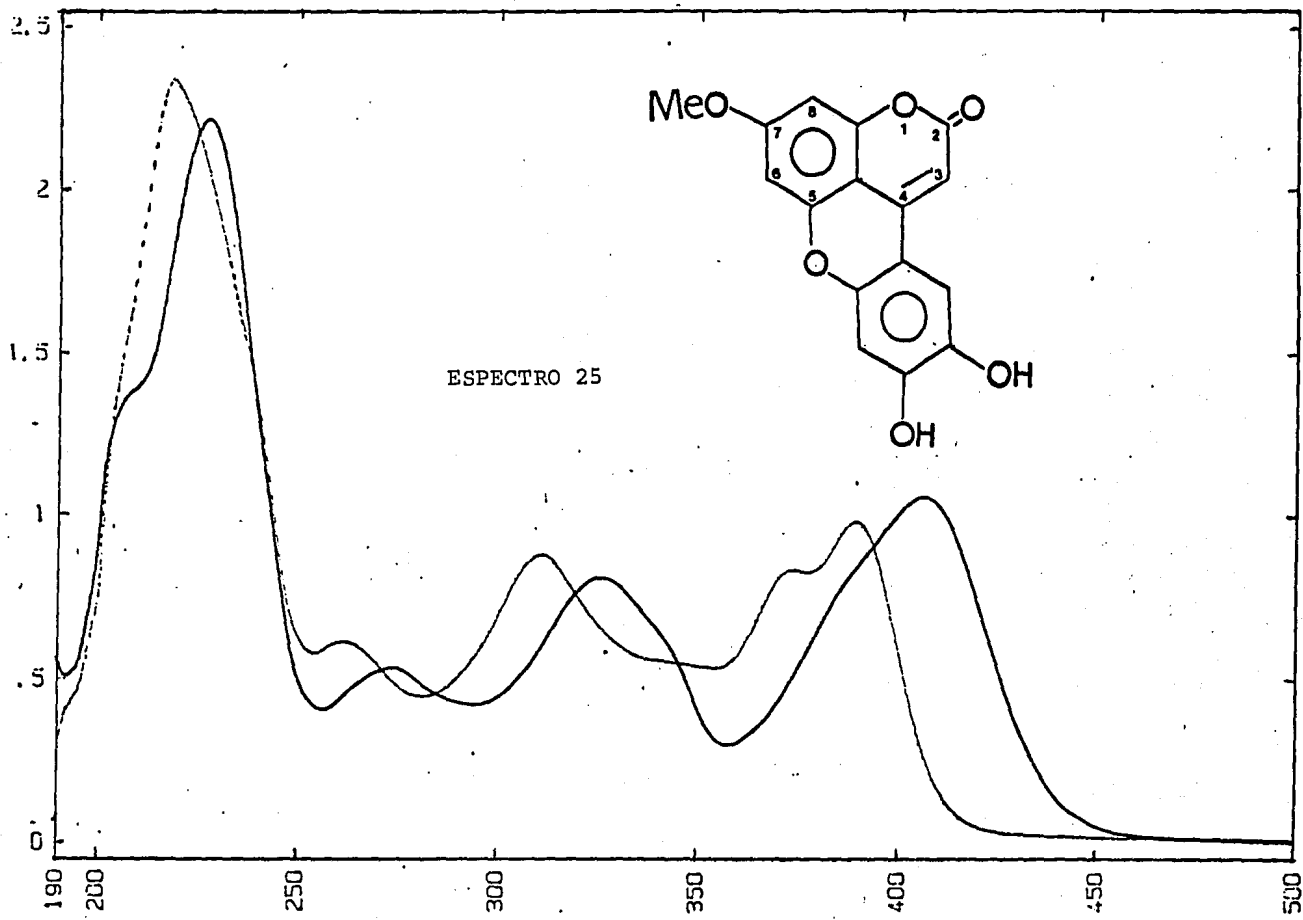
c) A δ 5.95 el singulete característico del protón vinílico de una oxidocoumarina.

d) Finalmente a δ 3.85 una señal simple correspondiente a un grupo metoxilo.

Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina. 52.



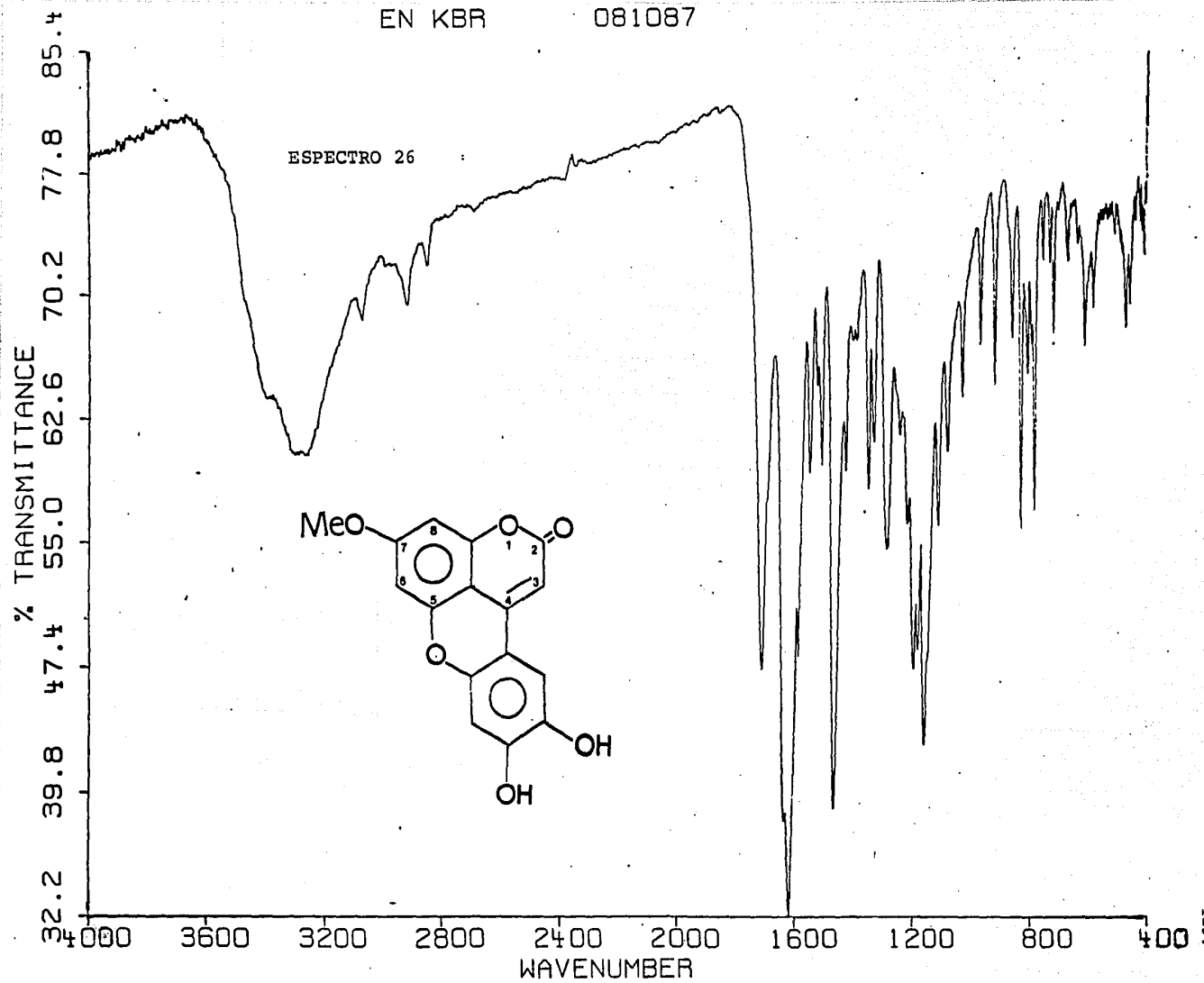
P.M.	298	
P.F.	>300°C	
EMIE m/z (%)	298 (M ⁺ , 100), 270 (30.6), 242 (57.2), 69 (31.8)	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	260, 310, 375, 390; (+AlCl ₃): 275, 325, 406; (+AlCl ₃ /HCl): 260, 310, 375, 390	Espectro 25
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm ⁻¹	1715, 1637, 1471, 1290, 1201, 1180	Espectro 26
RMNP (CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)	7.20 (s 1H H-6'), 6.77 (s 1H H-3'), 6.55 (s 2H H-8, H-6) 5.95 (s 1H H-3), 3.85 (s 3H OCH ₃)	Espectro 27

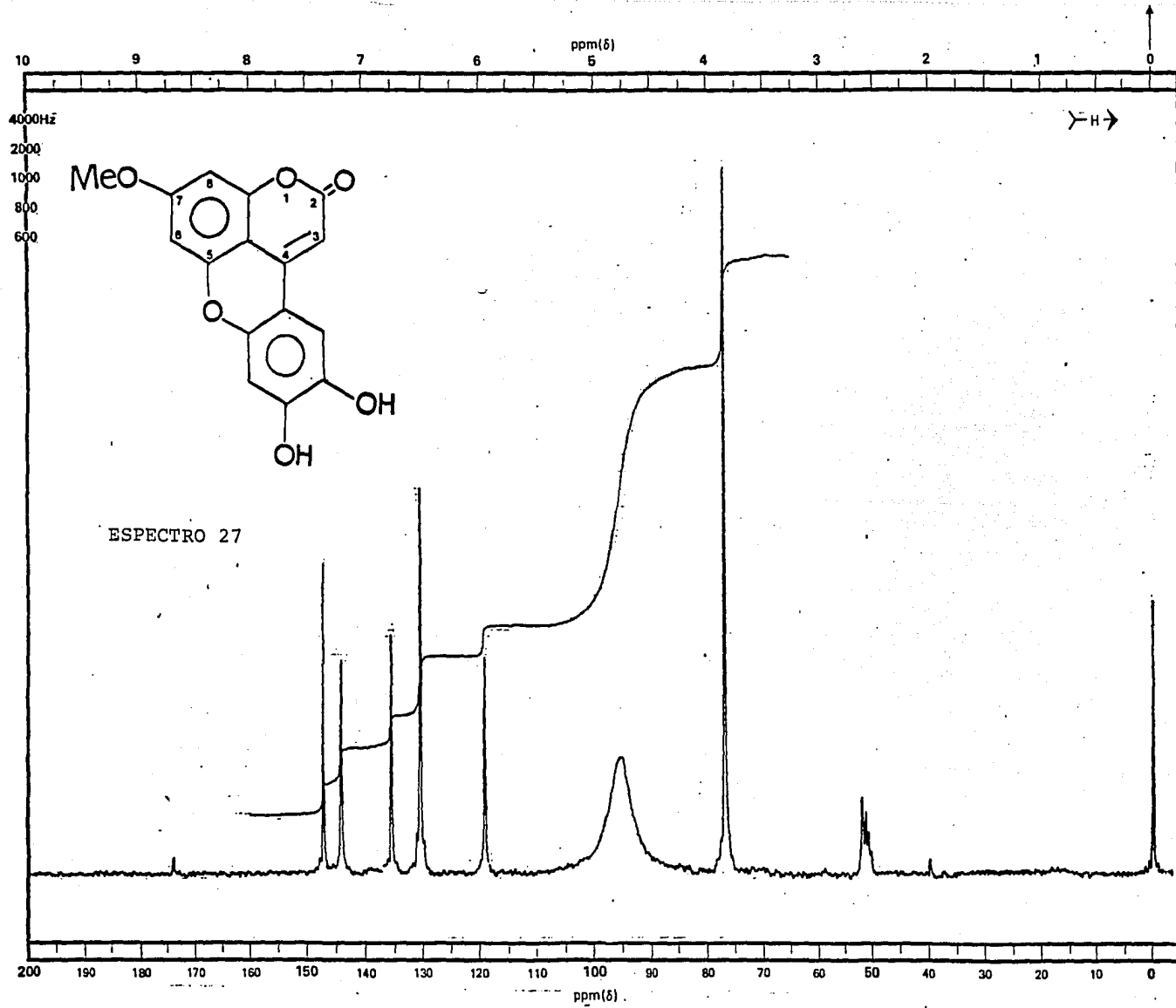


EN KBR

081087

ESPECTRO 26





El tratamiento del compuesto 52 con anhídrido acético y piridina en las condiciones habituales origina el derivado diacetilado 52A, confirmando químicamente la naturaleza difenólica, del producto natural.

Las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 52A se resumen en la Tabla 19.

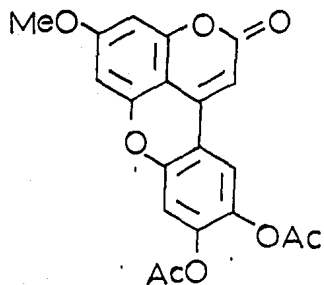
Como se puede apreciar en el espectro de RMNP de este derivado (Espectro 29) las señales a δ 7.20 y δ 6.77 del compuesto original desplazaron a δ 7.70 y δ 7.22 respectivamente.

Los desplazamientos a campos más bajos de los singuletes a δ 7.70 y δ 7.22 sugirieron que los hidroxilos fenólicos debían estar en el anillo C y el metoxilo en el anillo A.

La disposición orto de los grupos fenólicos se evidenció mediante espectroscopía U.V. (Espectro 25), ya que al correr el espectro en MeOH en presencia de $AlCl_3$ se observó un desplazamiento batocrómico de las bandas a 260, 310 y 390 nm a 275, 325 y 406 nm respectivamente. Dicho desplazamiento resultó reversible al adicionar HCl.

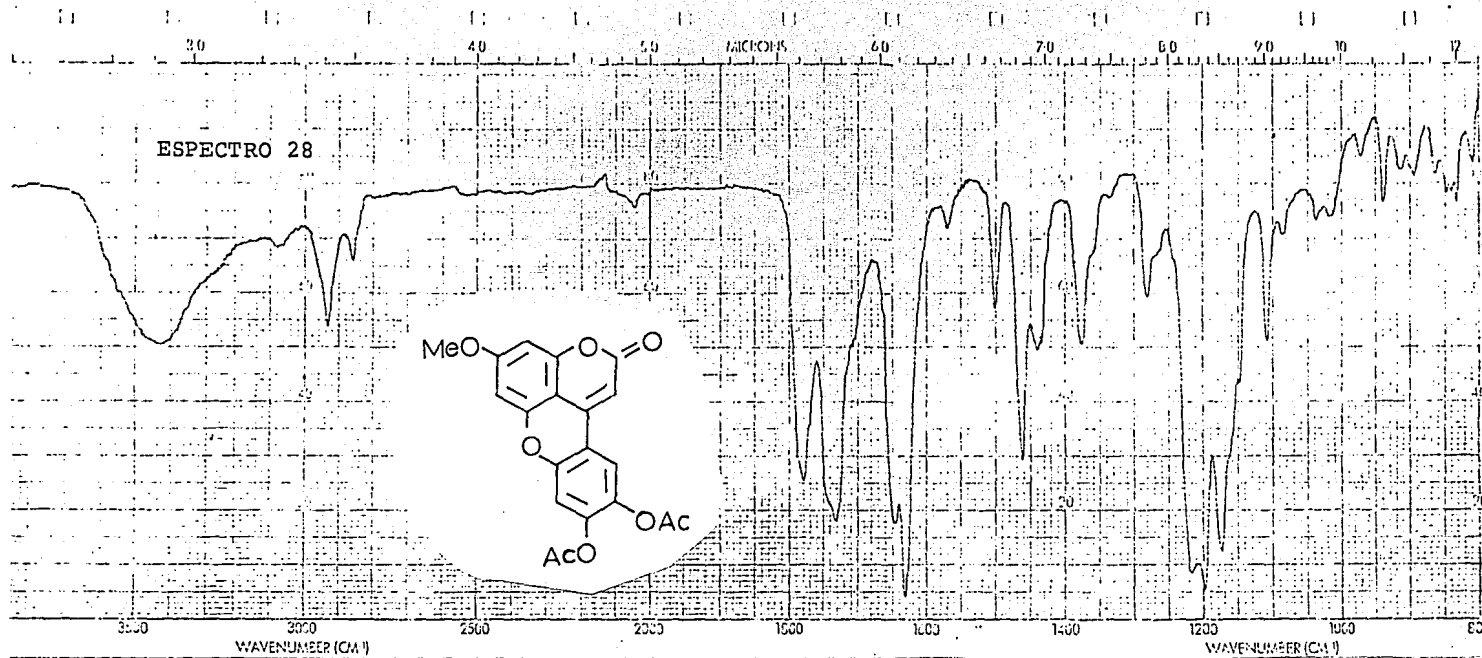
Como se ilustra en la Figura 14 tres isómeros podrían satisfacer el requerimiento anterior y las posibilidades B y C de la Figura 14, se descartaron en base a la ausencia de acoplamiento orto en los espectros de RMN tanto del producto natural como del derivado acetilado.

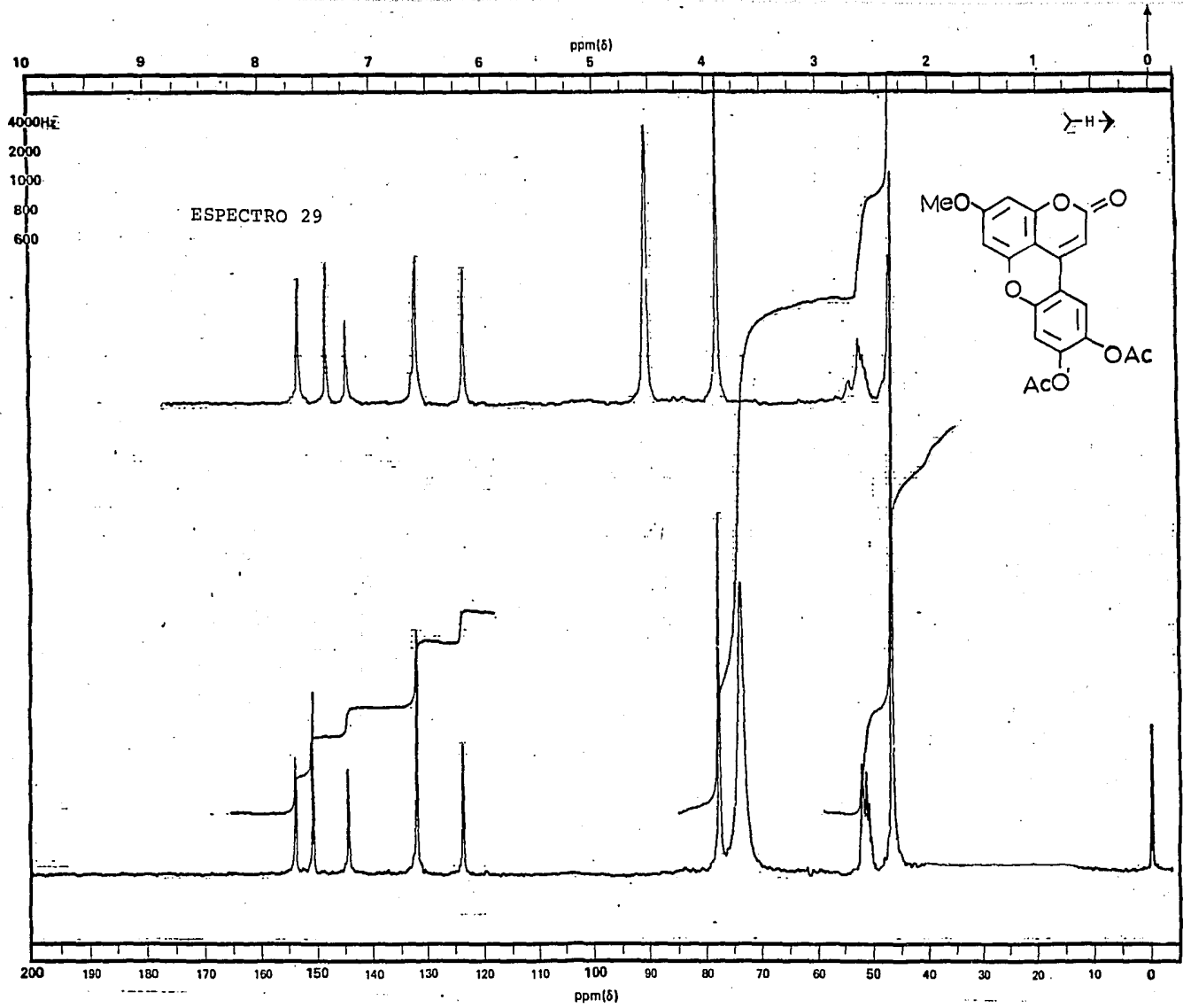
Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la 4',5'-diacetoxi-7-metil-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina. 52A.



P.M.	382	
P.F.	223-227°C	
IR ν_{max} KBr cm^{-1}	2930, 2860, 1780, 1733, 1645, 1632, 1500, 1462, 1375, 1215, 1200, 1175, 1110	Espectro 28
RMNP (CDCl_3 - DMSO-d_6 , δ)	7.70 (s 1H H-6'), 7.22 (s 1H H-3'), 6.60 (s 3H H-6, H-8), 6.20 (s 1H H-3), 3.90 (s 3H OMe), 2.35 (s 6H CH_3 -CO)	Espectro 29

ESPECTRO 28





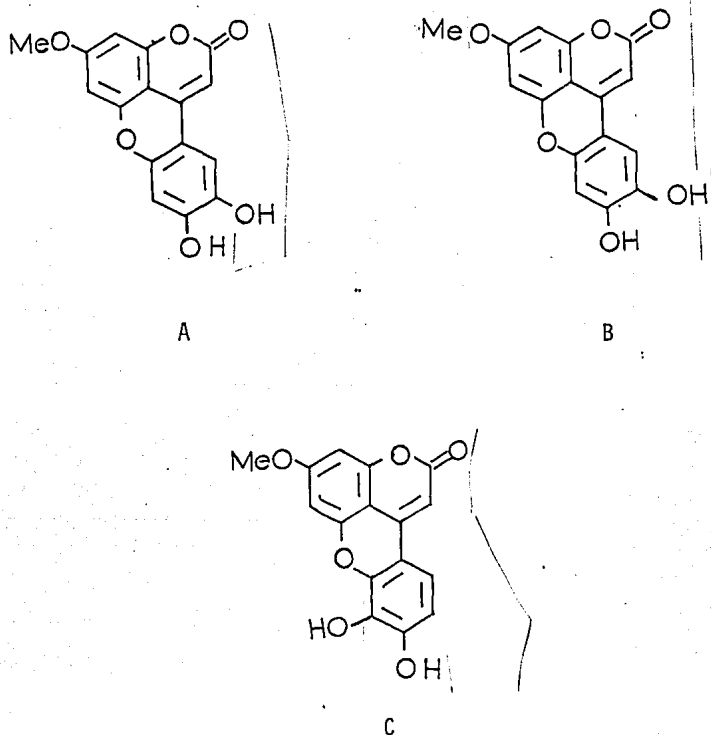


Figura 14. Alternativas en relación a la ubicación de los dos grupos hidroxilo "orto" para el compuesto 52.

En base a la discusión previa se propuso la estructura A para el producto natural.

La confirmación de la estructura propuesta se logró mediante métodos químicos ya que al tratar la aglicona 57A con una solución de MeONa tal como se indicó en la sección experimental se obtuvo una óxidocoumarina idéntica al producto natural.

Es necesario mencionar que este tipo de ciclización se había

efectuado por vez primera en solución metanólica de KOH (Calzada, 1987; Mata, *et al.*, 1987) ahora se reprodujo usando como base MeONa.

Finalmente, es de hacer notar que este compuesto es la segunda vez que se reporta en la naturaleza, ya que previamente había sido aislado por Reher y colaboradores (Reher, *et al.*, 1984) de la *Coutarea latiflora* como se indico en la Tabla 2. Obviamente las constantes físicas y espectroscópicas resultaron ser idénticas a las descritas anteriormente por los autores mencionados.

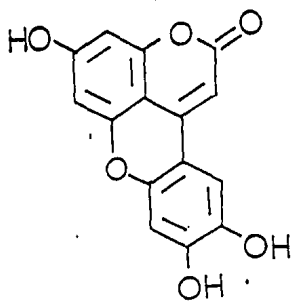
4.5 Identificación de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-óxido-coumarina 58.

De las fracciones 328-346 (Tabla 4, sección experimental) de la columna original se obtuvo un polvo amarillo de $mp > 300^{\circ}C$, cuya fórmula molecular fué $C_{15}H_8O_6$ dada por Espectrometría de Masas.

Su espectro de masas mostró el ión molecular a m/z 284 (pico base) y los fragmentos M-CO a m/z 256 y M-CO-CO a m/z 228. Al igual que en el caso del compuesto 52 las sucesivas pérdidas de 28 unidades de masa del ión molecular así como el singulete observado a δ 5.91 en el espectro de RMNP en $CDCl_3$ -DMSO-d, (Espectro 31) y la información vertida por los espectros de UV (Espectro 30) y de infrarrojo sugirieron como esqueleto tipo, el de una 5,2'-óxido-coumarina. En la Tabla 20 resumen las constantes físicas y espectroscópicas, así como su estructura.

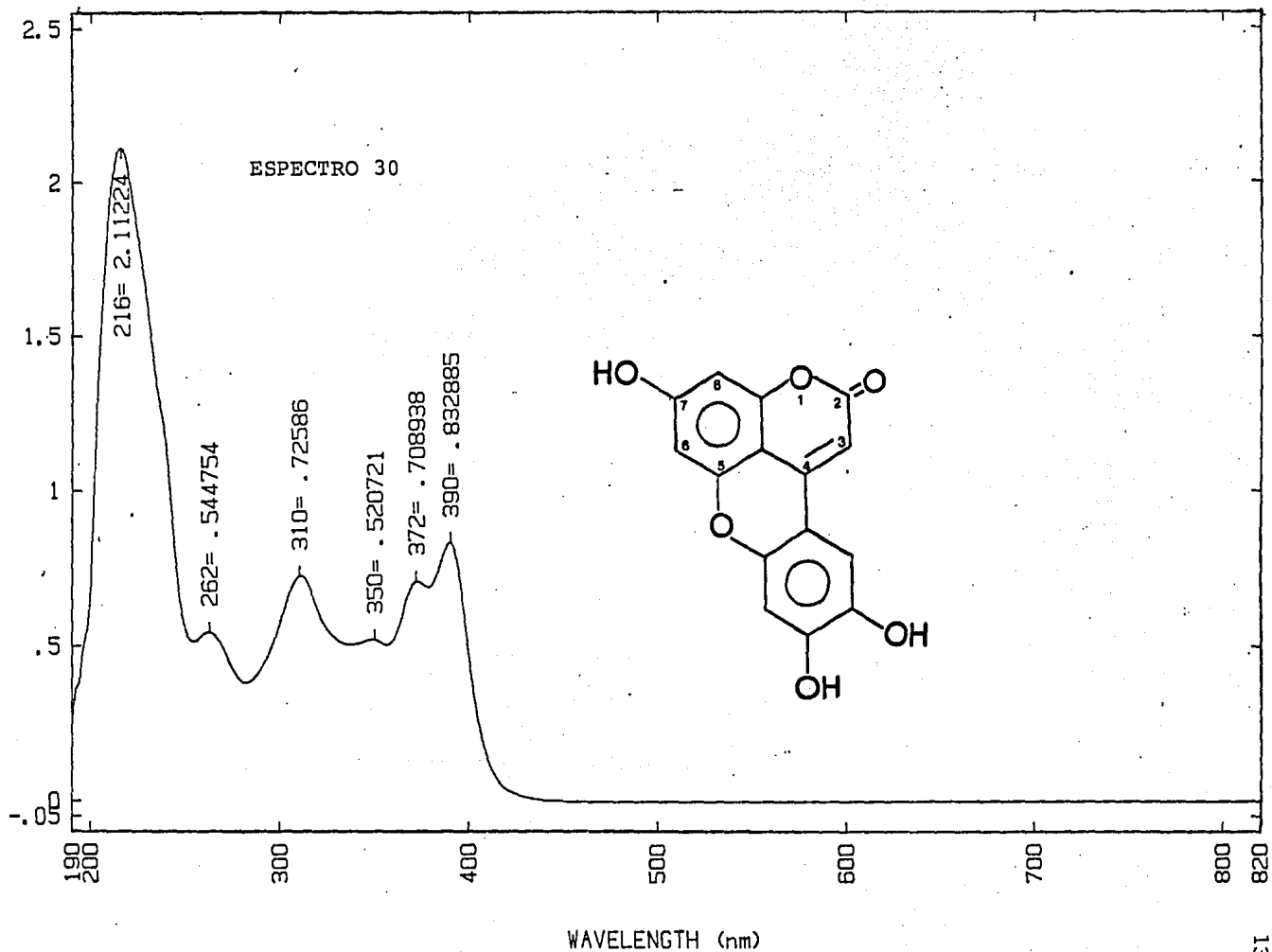
El trimetileter del compuesto 58 obtenido por metilación con diazometano demostró la presencia de tres grupos hidroxilos fenó-

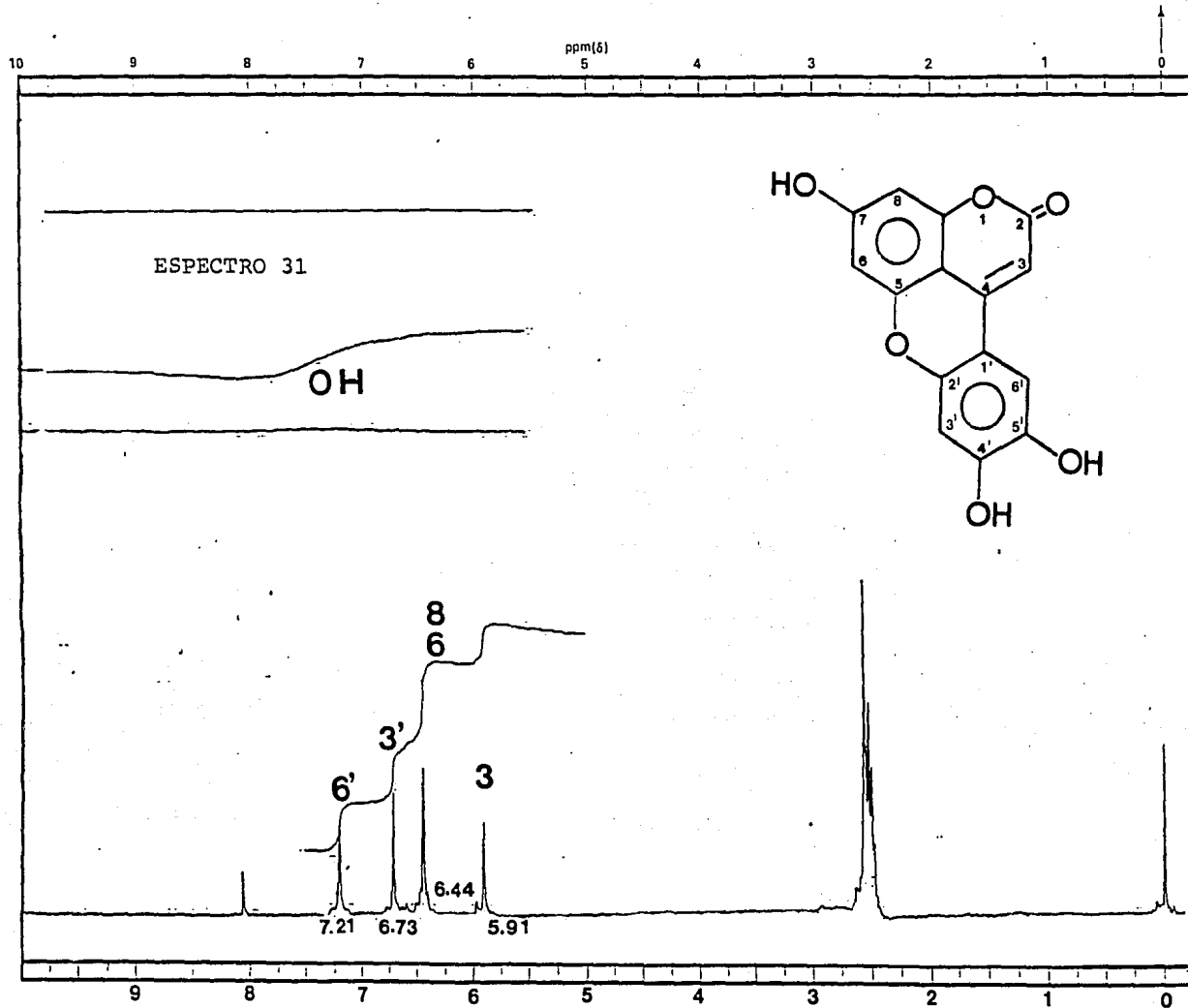
Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina. 5B.



P.M.	284	
P.F.	>300°C	
EMIE m/z (%)	284 (M ⁺ , 100), 256 (35), 241 (10), 228 (50)	
U.V. $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm	262, 310, 350, 372, 390	Espectro 30
IR ν_{\max}^{KBr} cm ⁻¹	1698, 1625, 1560, 1520, 1465, 1300, 1175	
RMNP (CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)	7.20 (s 1H H-6'), 6.72 (s 1H H-3'), 6.45 (s, 2H H-6, H-8), 5.91 (s 1H H-3), 10.30 (s 3H OH)	Espectro 31

ABSORBANCE





licos (compuesto 55A).

El desplazamiento batocrómico observado en el espectro de UV por adición de $AlCl_3$, reversible con HCl, indicó que dos de estos grupos hidroxilos estaban en posición orto.

El desplazamiento químico observado para el singulete que integraba para dos protones a δ 6.45, y que por analogía con el compuesto anterior era asignable a los protones H-6 y H-8 de la estructura base. En el caso del compuesto 52 este singulete se encontraba desplazado a δ 6.45, es decir, a campos ligeramente más bajos, consistente con el menor efecto desprotector de un grupo metoxilo en comparación con aquel de un grupo hidroxilo.

Es de hacer notar que los desplazamientos químicos de los otros protones aromáticos eran esencialmente idénticos.

El análisis preliminar permitió identificar al compuesto 58 como 7,5,4'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-óxidocoumarina; el cual también represento un nuevo metabolito secundario.

La demostración inequívoca de que la estructura era la propuesta se logró al correlacionar químicamente los compuestos 52 y el 58 ya que los productos de metilación con diazometano de ambas sustancias resultaron ser idénticas. Para las constantes físicas y espectroscópicas de este derivado totalmente metilado referirse al compuesto 55A que se discutirá posteriormente.

4.6 Identificación de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'- óxicoumarina 55.

De la columna original (Fracciones 59-73, Tabla 4) se obtuvo un polvo cristalino amarillo-verdoso de pf. 273-274°C (etanol), insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes.

Su estructura así como sus constantes físicas y espectroscópicas se muestran en la Tabla 21.

Al igual que en el caso de los compuestos anteriores los espectros de UV, RMNP, EM e IR sugirieron que el compuesto era una 5,2'-óxicoumarina.

El espectro de masas de este compuesto presento 28 unidades de masa más que el producto 52 y 14 unidades más que la sustancia 58, observándose también las pérdidas consecutivas de 28 unidades de masa a partir del ión molecular (M^+ 312, pico base) a m/z 284 y a m/z 256.

Las características más importantes de los espectros de RMNP en DMSO- d_6 y piridina d_5 (Espectros 35 y 34 respectivamente) fueron los siguientes:

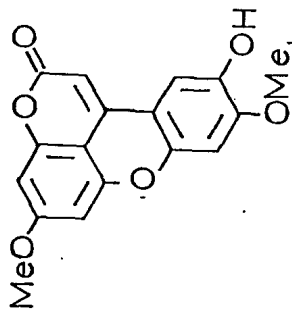
a) A δ 3.90 y δ 3.92 en el caso del primero y a δ 3.91 y δ 3.83 en el caso del segundo se observaron señales para dos grupos metilos.

b) En la zona aromática del espectro en DMSO- d_6 se observaron dos señales simples a δ 7.34 y a δ 6.95, integrando cada una para un patrón y un sistema AB para dos protones meta relacionados.

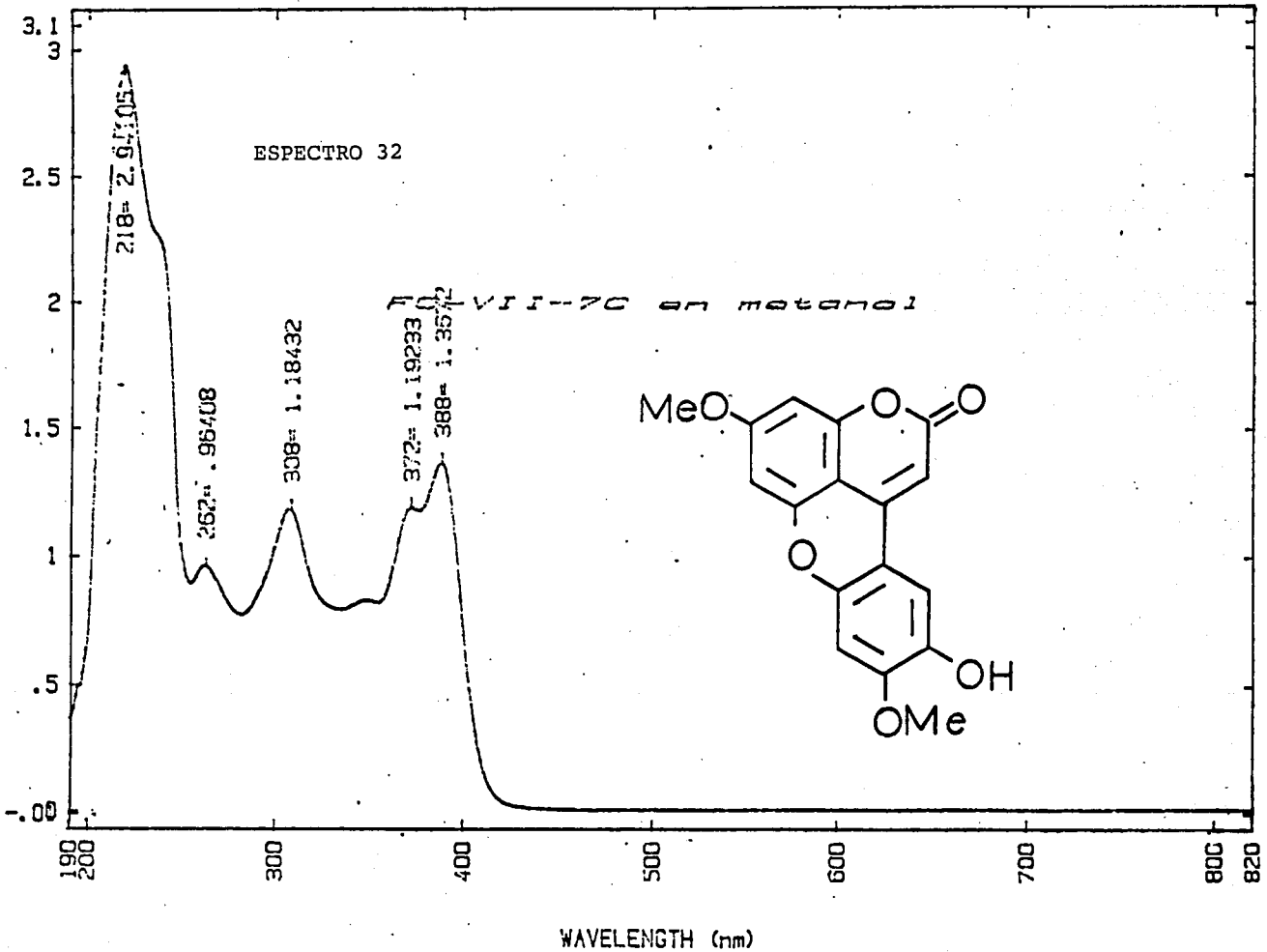
Este sistema se ilustra en la Figura 15.

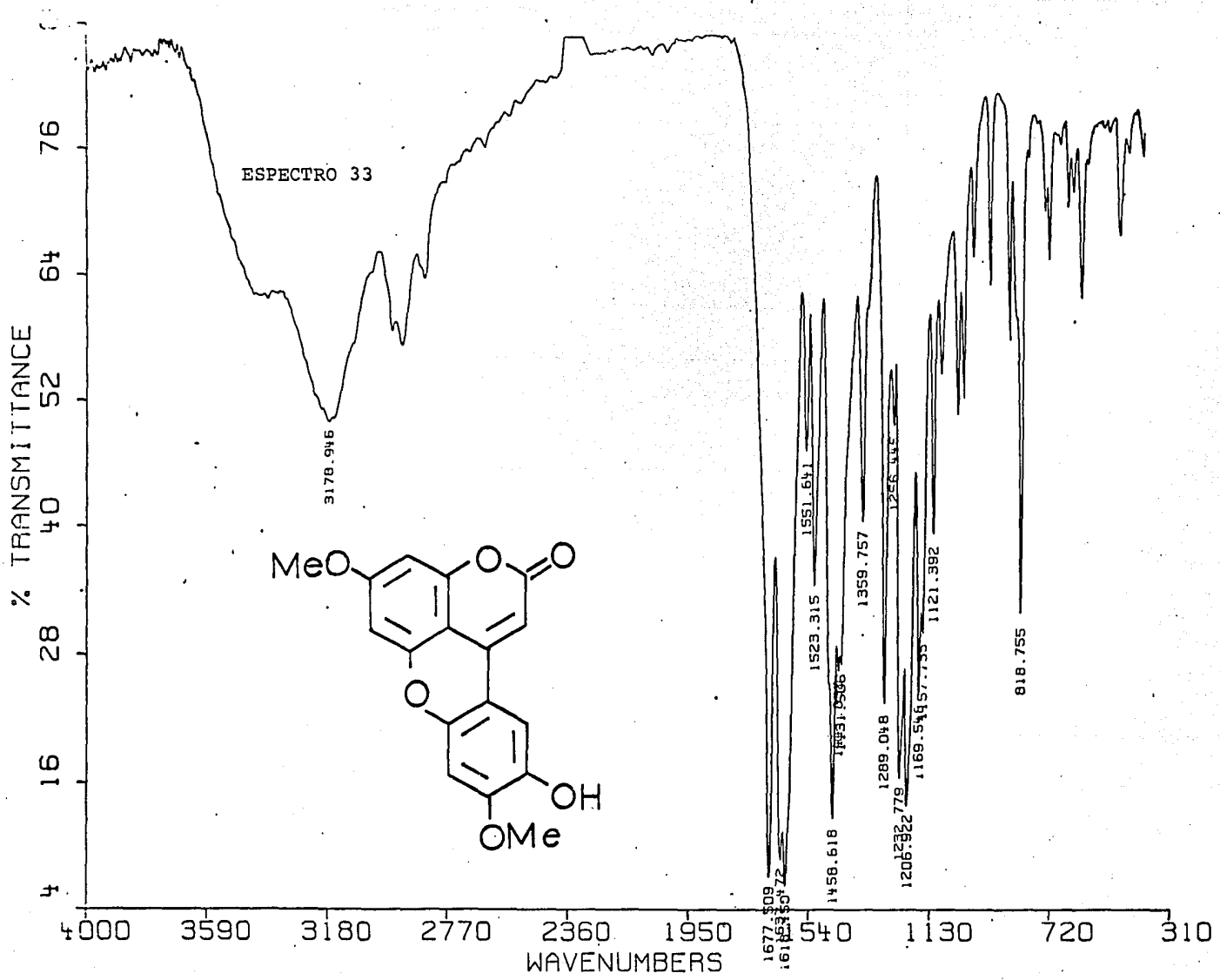
Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina. 55.

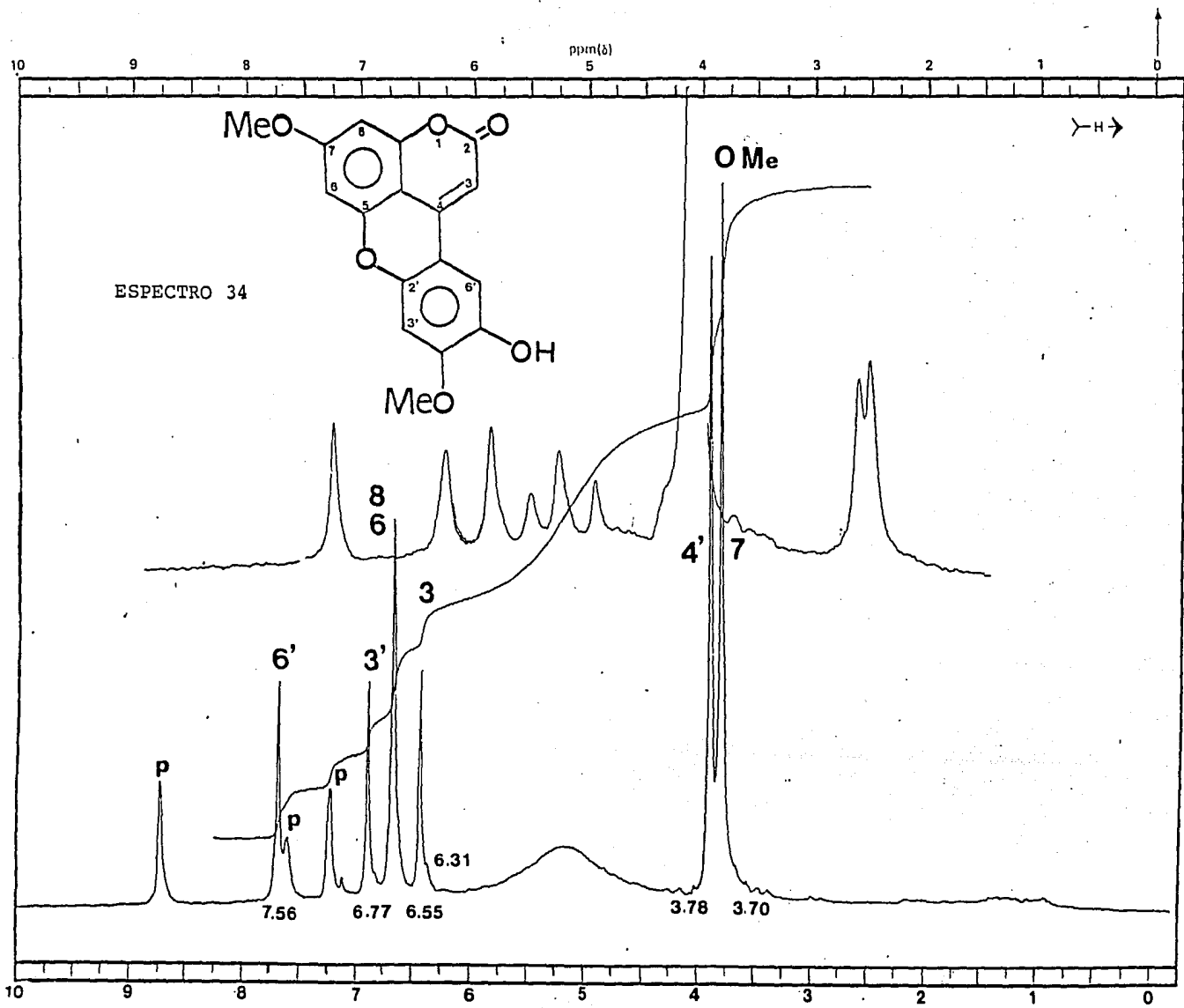
P.M.	312					
P.F.	273-274°C					
EMIE m/z (%)	312 (100), 284 (30.1), 269 (10), 256 (51.1)					Espectro 32
U.V. λ_{\max} MeOH nm	262 (0.96), 308 (1.18), 372 (1.19), 388 (1.35)					
I.R. ν_{\max} KBr cm^{-1}	3330, 3400, 3175, 3160, 1677, 1618, 1523, 1458, 1289, 1205, 1169, 1120, 817					Espectro 33
RMNP (Piridina- d_5 , δ)	7.70 (s 1H H-6'), 6.90 (s 1H H-3'), 6.69 (s 3H H-6, H-8), 6.45 (s 1H H-3), 3.90 (s 3H OMe _{4'}), 3.82 (s 3H OMe ₇)					Espectro 34
RMNP (DMSO- d_6 , δ)	7.34 (s 1H H-6'), 6.95 (s 1H H-3'), 6.72 (d 1H J=3 Hz H-6), 6.66 (d 1H J=3 Hz H-8), 6.13 (s 1H H-3), 3.83 (s 3H OMe ₇), 3.91 (s 3H OMe _{4'})					Espectro 35
RMNC ¹³ (DMSO- d_6 , δ)	163.02 (s C-7), 160.90 (s C-2), 154.50 (s 8a), 153.70 (s C-4), 150.49 (s C-5), 146.32 (s C-2'), 144.31 (s C-4') 141.00 (s C-5'), 108.70 (d C-6'), 107.14 (s C-1'), 100.51 (d C-3), 99.80 (s C-4a), 96.41 (d C-6), 96.00 (d C-3'), 93.12 (d C-8), 56.14 (c MeO _{7,4'})					Espectro 36

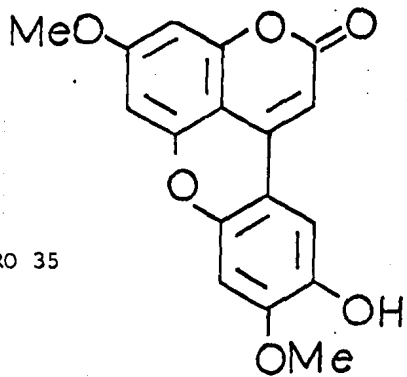


ABSORBANCE

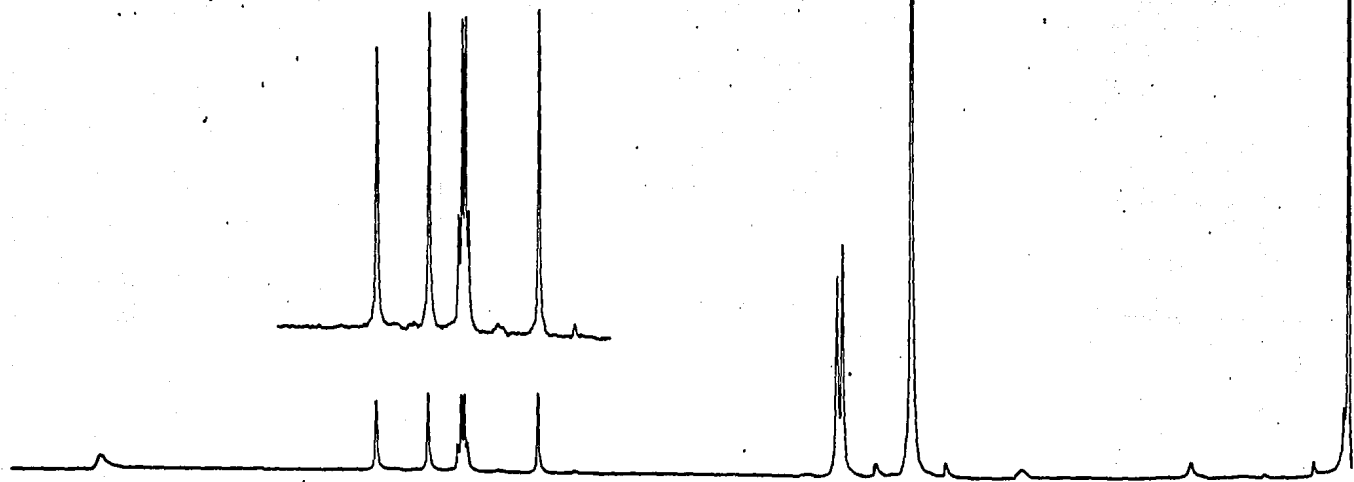








ESPECTRO 35



En el caso del espectro en piridina- d_5 el perfil de la zona aromática resultó idéntico al de los compuestos 52 y 58, observándose un singlete a δ 7.70 (1H), otro a δ 6.90 (1H) y un tercero que integraba para dos protones a δ 6.69.

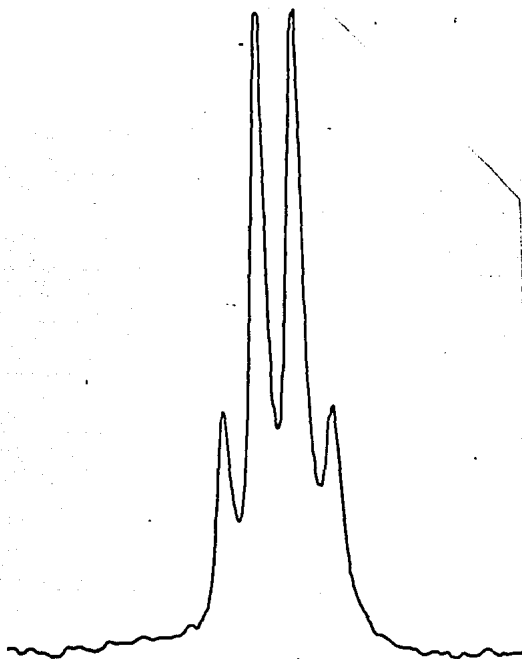
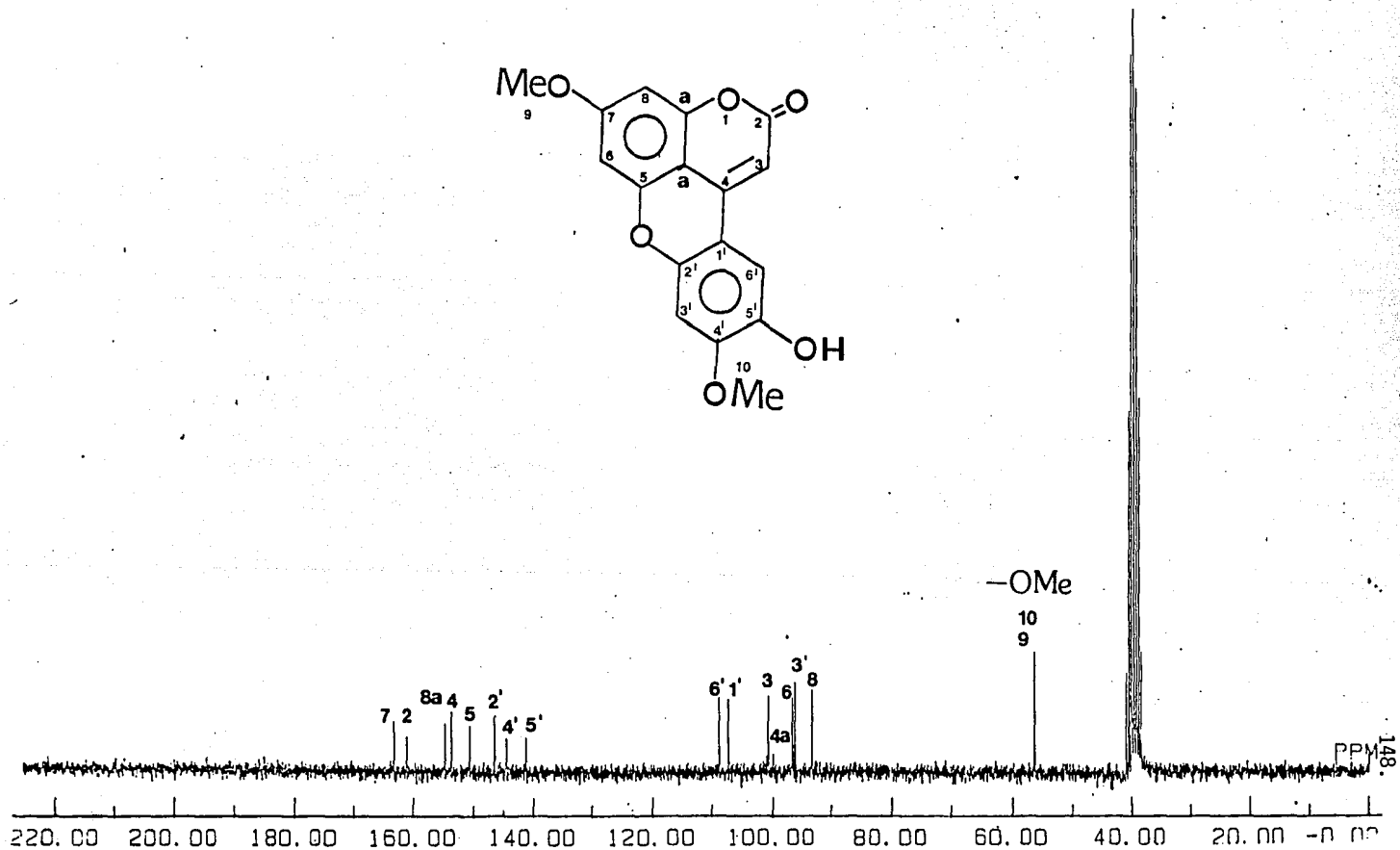
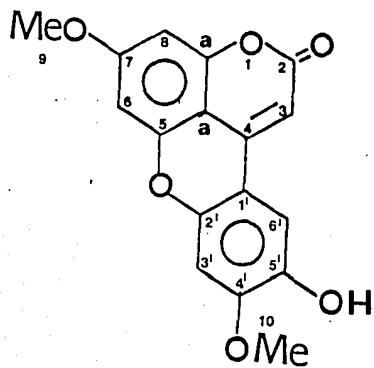


Figura 15. Región aromática del compuesto 55.

c) Finalmente, la señal diagnóstica para el H-3 de la fenil-coumarina se observó a δ 6.45 en el espectro en Piridina- d_5 y a δ 5.13 en el espectro en DMSO- d_6 .

La obtención de un derivado monoacetilado por tratamiento con

ESPECTRO 36



piridina y anhídrido acético demostró la naturaleza monofenólica de este compuesto. Las características físicas de este derivado, compuesto 55B se resumen en la Tabla 23.

Por otra parte, el tratamiento con diazometano permitió obtener un derivado trimetilado que resultó ser idéntico a los derivados totalmente metilados de los compuestos 52 y 58. La obtención de este derivado trimetilado permitió establecer en forma inequívoca el patrón de sustitución de la 5,2'-óxicoumarina 55. (Ver Tabla 22). Para determinar la disposición relativa de los dos grupos metoxilos y del hidroxilo fenólico, el análisis de la diferencia de los desplazamientos químicos de los protones aromáticos registrados en el espectro en DMSO-d₆ del producto original, con respecto a aquellos correspondientes del derivado acetilado 55 y registrados en DCDI₃-DMSO-d₆, fué de gran utilidad. En la Tabla 24 se ilustran estas diferencias.

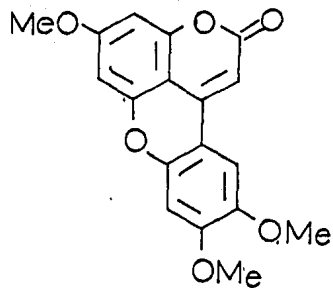
Tabla 24. Comparación de los desplazamientos químicos de los protones aromáticos del compuesto 55 y de aquellos de su derivado acetilado 55B.

Compuesto	H-6'	H-3'	H-6	H-8
<u>55</u> ¹	7.34	6.95	6.66	6.72
<u>55B</u> ²	7.76	7.01	6.64	6.64
Δ	+0.42	+0.06	-0.02	-0.08

¹Disolvente DMSO-d₆;

²CDCl₃-DMSO-d₆ (1:1)

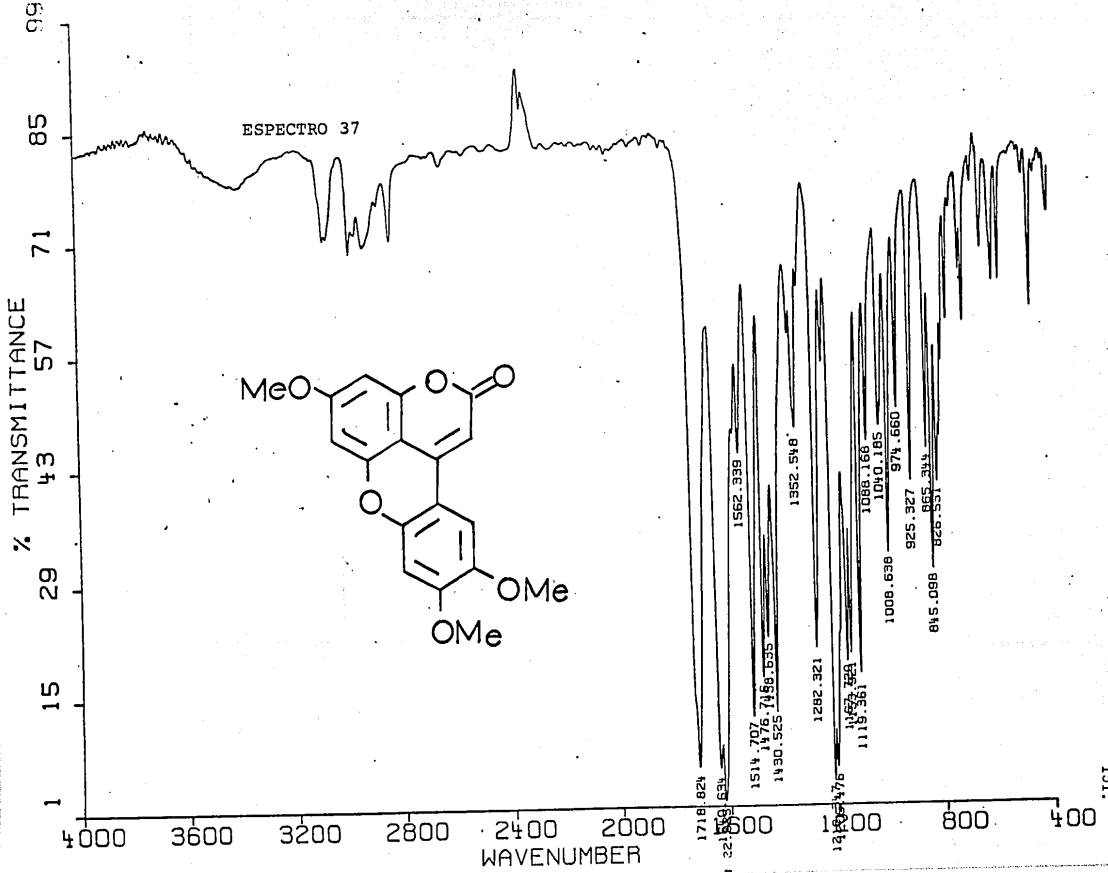
Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina. 55A.

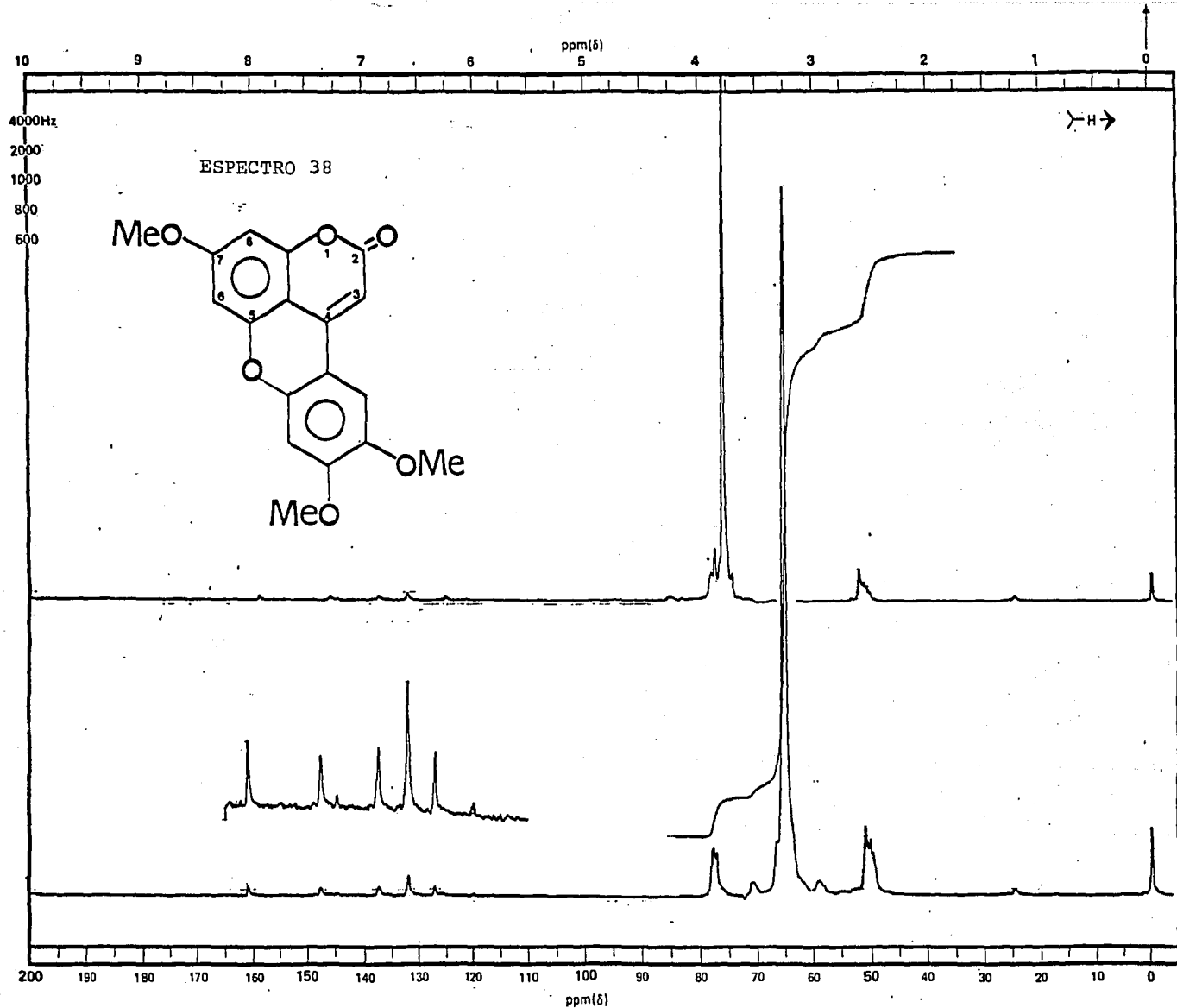


P.M.	326	
P.F.	265°C	
EMIE m/z (%)	326 (100), 313 (2.7), 298 (35.3), 270 (43.3), 69 (53.3)	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	1718, 1622, 1514, 1430, 1218, 1205, 1167, 1119, 1008, 845	Espectro 37
RMNP (CDCl_3 - DMSO-d_6 , δ)	7.40 (s 1H H-6'), 6.86 (s 1H H-3'), 6.60 (s 2H H-6, H-8) 6.35 (s 1H H-3), 3.86 (s 6H, OCH_3), 3.88 (s 3H, OCH_3)	Espectro 38
RMNP (DMSO-d_6 , δ)	7.47 (s 1H H-6'), 6.94 (s 1H H-3'), 6.65 (s 3H H-6, H-8) 6.37 (s 1H H-3), 3.88 (s 3H OMe) 3.86 (s 6H OMe)	Espectro 39

EN KBR 31.1286

ESPECTRO 37





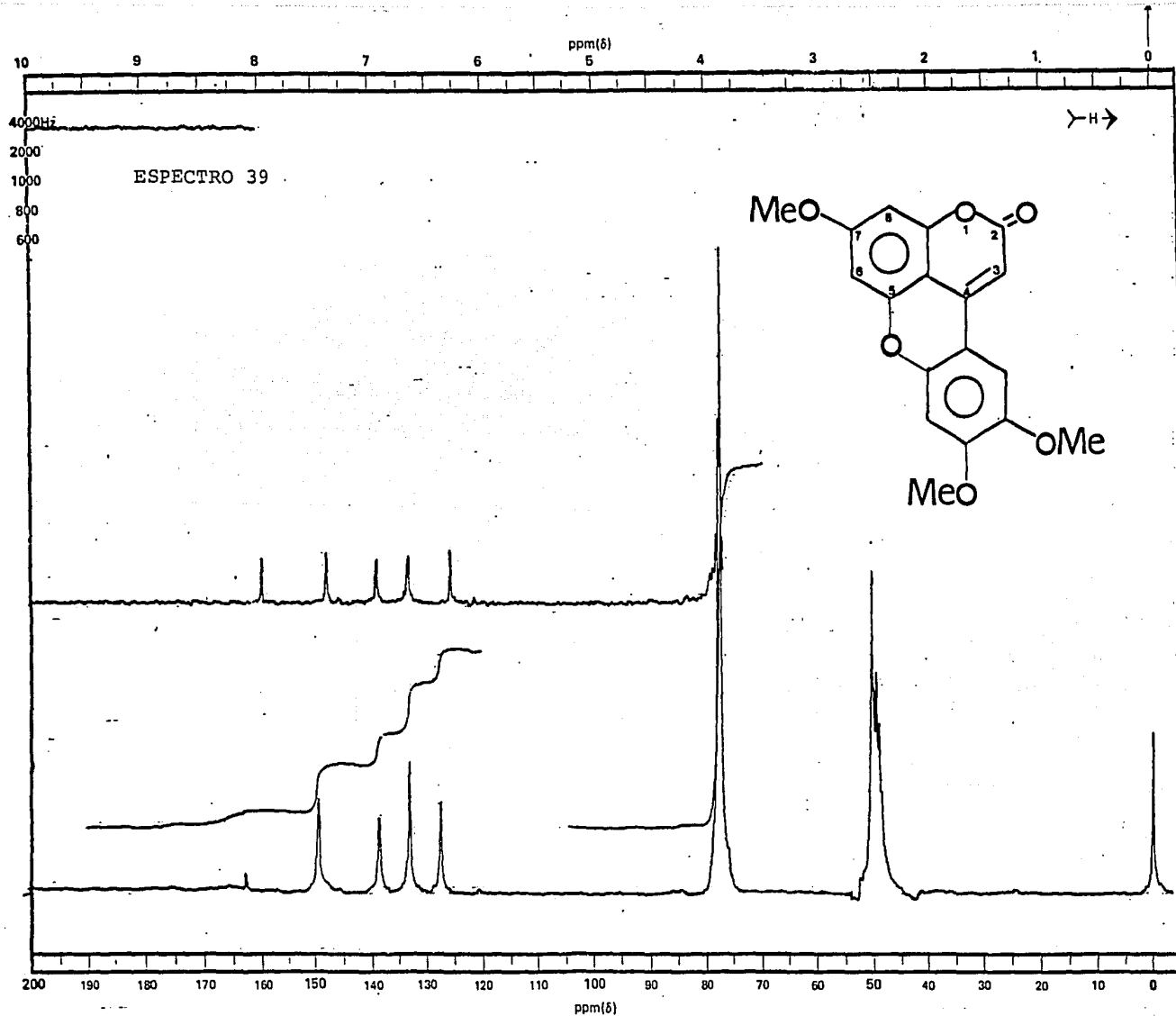
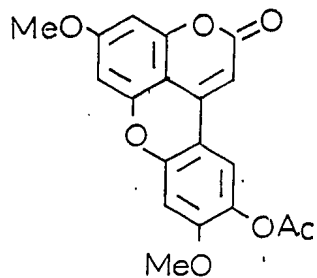
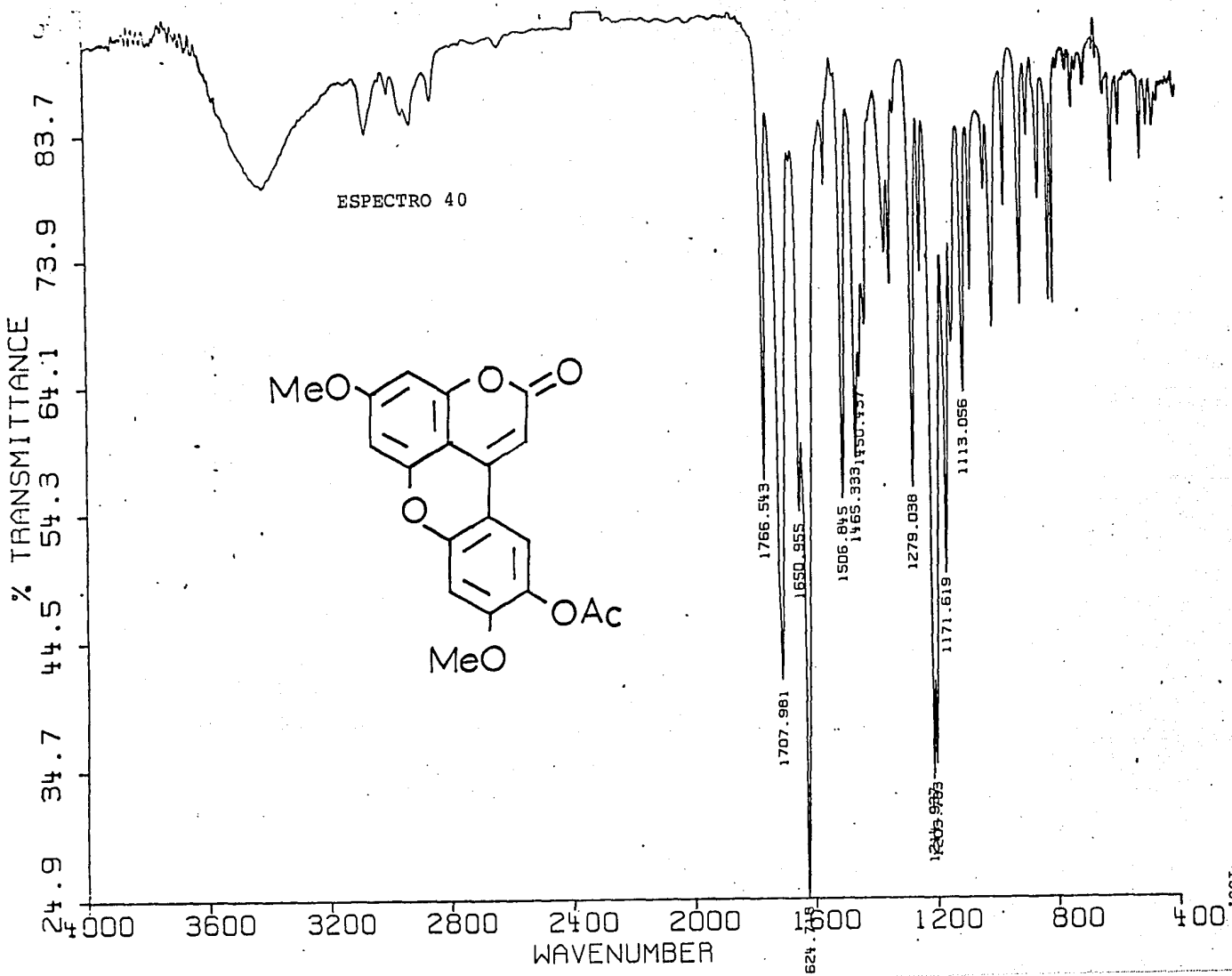
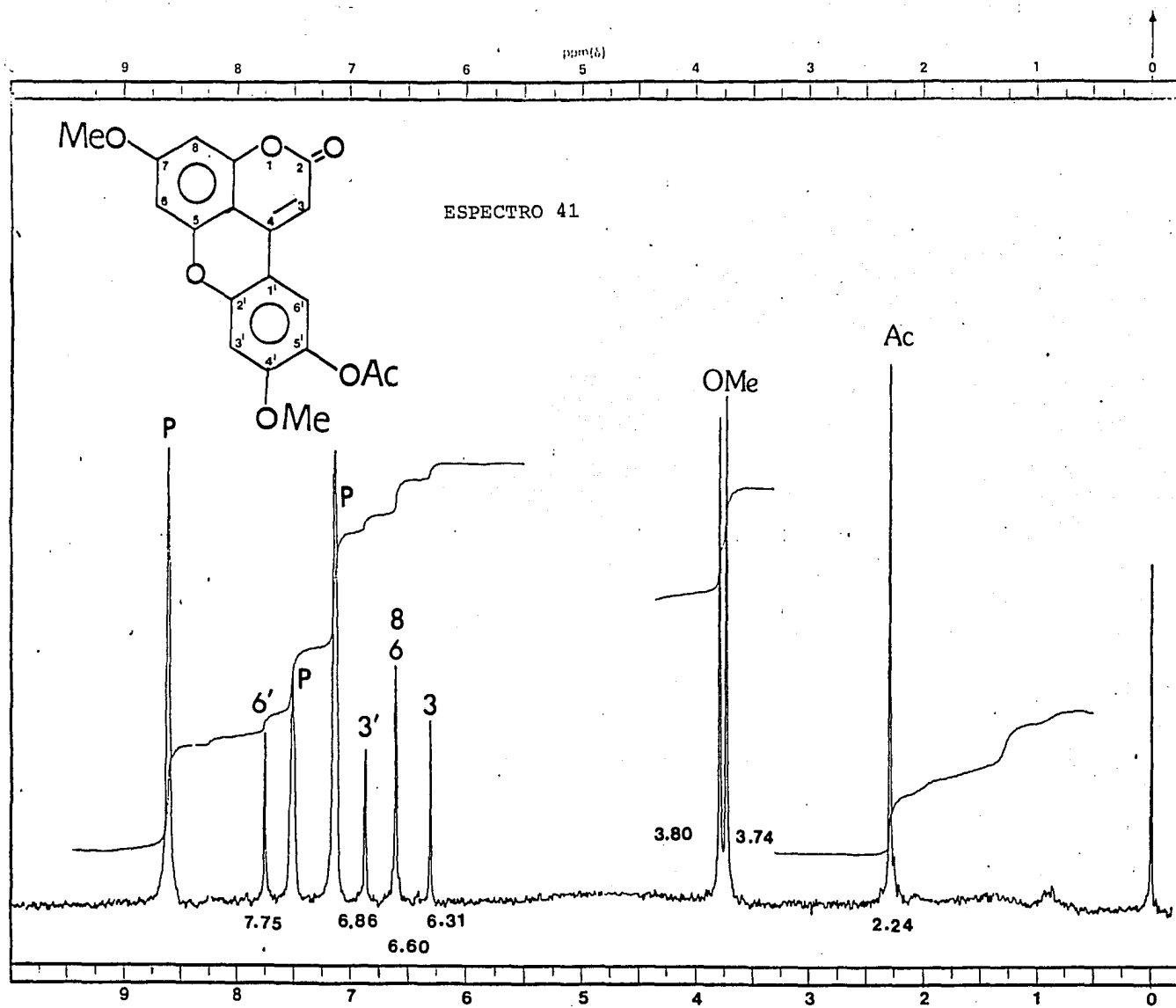


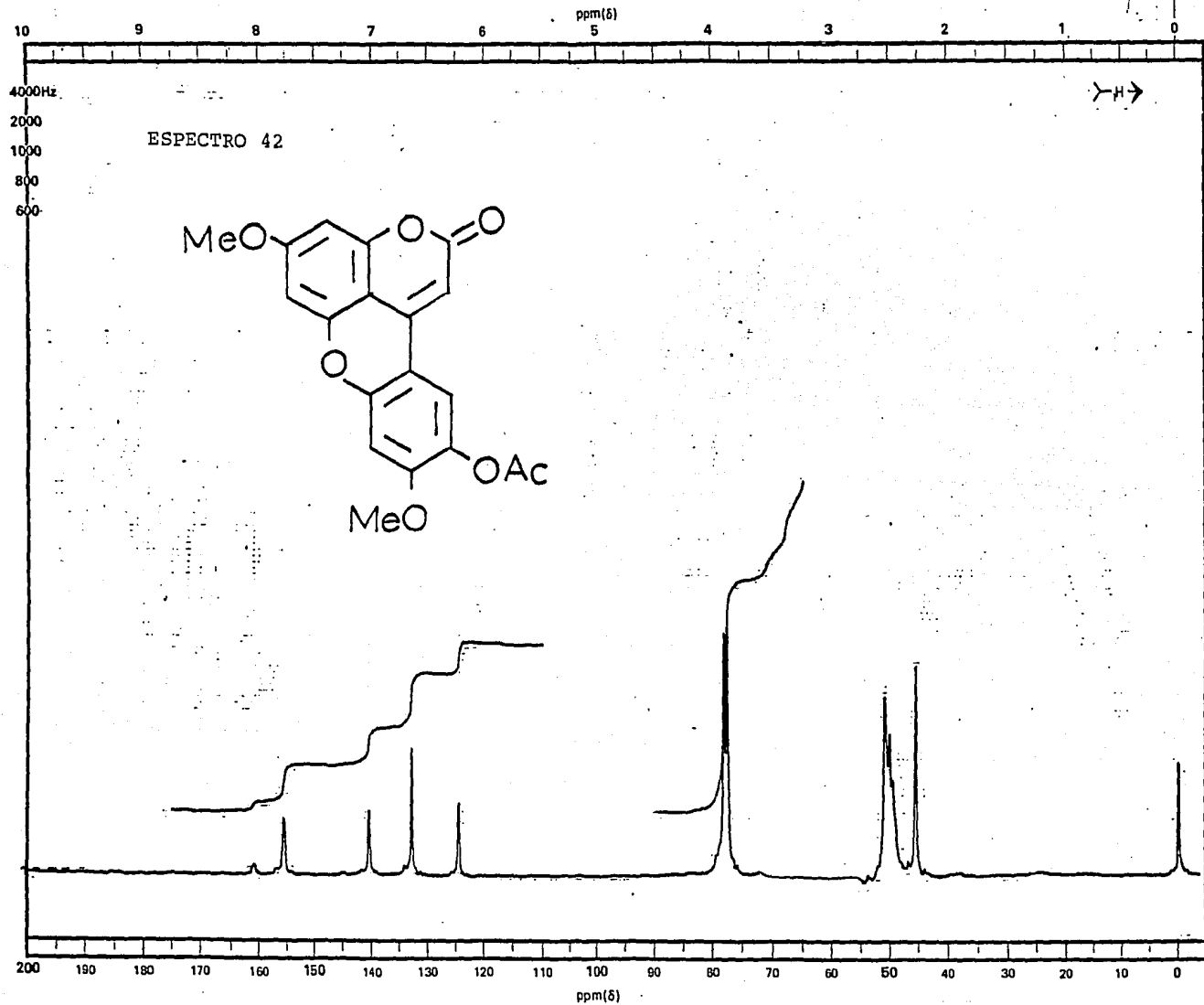
Tabla 23. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5'-acetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina. 55B.



P.M.	354	
P.F.	265-268°C	
EMIE m/z (%)	354 (28.5), 312 (100), 256 (30.4), 43 (33.5)	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr cm}^{-1}}$	1766, 1706, 1650, 1624, 1506, 1279, 1214, 1203, 1171	Espectro 40
RMNP (Piridina-d ₅ , δ)	7.75 (s 1H H-6'), 6.86 (s 1H H-3'), 6.60 (s 3H H-6, H-8), 6.31 (s 1H H-3), 3.78 (s 3H OMe ₄), 3.73 (s 3H OMe ₇), 2.28 (s 3H CH ₃ CO)	Espectro 41
RMNP (CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)	7.76 (s 1H H-6'), 7.01 (s 1H H-3'), 6.64 (s 2H H-6, H-8) 6.23 (s 1H H-3), 3.89 (s 3H OMe ₄), 3.86 (s 3H OMe ₇), 2.22 (s 3H CH ₃ CO)	Espectro 42







Como se puede observar en la Tabla 24 la señal a δ 6.95, que de acuerdo con los modelos proporcionados por los compuestos 52 y 58 debía corresponder al H-3' se desplaza solo 0.06 ppm a campos más bajos; en tanto que para la señal a δ 7.34 se observó un $\Delta = +0.42$. Este último valor indicó que solo H-6' se desprotegea al acetilar y que por lo tanto en C-5' debía estar ubicado el grupo hidroxilo.

Es de hacer notar que estos resultados fueron congruentes con los cambios de desplazamientos químicos inducidos por la piridina- d_5 . En la Tabla 25 se resumen estos resultados.

Tabla 25. Desplazamientos Químicos inducidos para la piridina- d_5 en los protones aromáticos del compuesto 55.

<u>55</u> /H	δ DMSO- d_6	δ piridina- d_5	Δ
H-6'	7.34	7.70	+0.36
H-3'	6.95	6.90	-0.05
H-6	6.66	6.69	+0.03
H-8	6.72	6.69	-0.03

Como se puede apreciar en la Tabla 25 nuevamente solo la señal a δ 7.34 se desplaza a campos más bajos por efecto de la piridina.

A riesgo de ser repetitivo, pero con el fin de que la evidencia anterior sea más clara en la Tabla 26 se comparan los despla-

Tabla 26. Desplazamientos químicos en RMHP de los compuestos 52, 52A, 58, 55, 55A y 55B.

	Ole										OAc		
	H-6'	H-3'	H-6	H-8	H-3	C-7	C-4'	C-3'	C-7	C-4'	C-5'		
51 ¹	7.20	6.77	6.55	6.55	5.95	3.85	—	—	—	—	—		
52A ¹	7.70	7.22	6.60	6.60	6.20	3.90	—	—	—	2.35	2.35		
58 ¹	7.20	6.72	6.45	6.45	5.91	—	—	—	—	—	—		
55 ²	7.34	6.95	6.66	6.72	6.13	3.83	3.91	—	—	—	—		
55 ³	7.70	6.90	6.69	6.69	6.45	3.82	3.91	—	—	—	—		
55A ¹	7.40	6.86	6.60	6.60	6.35	3.85	3.85*	3.88*	—	—	—		
55A ²	7.47	6.94	6.65	6.65	6.37	3.86	3.86*	3.88*	—	—	—		
55B ²	7.76	7.01	6.64	6.64	6.23	3.86	3.89	—	—	—	2.22		
55B ³	7.75	6.86	6.60	6.60	6.31	3.73	3.78	—	—	—	2.28		

¹Solvente (CDCl₃-DMSO-d₆); ²Solvente (DMSO-d₆); ³Solvente (Piridina-d₅).

mientos químicos de los protones del compuesto 55 y sus derivados con aquellos de los compuestos 52 y 58 y sus correspondientes derivados.

El espectro de RMN C^{13} (Espectro 36) mostró 16 señales, las cuales se asignaron de la siguiente forma:

a) Los singuletes a δ 160.9 y δ 153.70 y el doblete a δ 100.51 eran fácilmente asignables a la porción α -pirona de la óxidocoumarina.

b) Las resonancias a δ 163.02, 154.50, 150.49, 146.32, 144.31 y 141.00 correspondían a los seis carbonos unidos a oxígenos. De éstas, las resonancias a δ 154.5 y 163.02 debían corresponder a los carbonos C-8a y C-7 respectivamente por analogía a los compuestos 57 y 59, en tanto que, los restantes correspondían a los dos carbonos base de la óxidocoumarina, otra al carbón base de la óxidocoumarina, otra al carbón base de un metilo y la última al protón base del hidroxilo.

c) Los dobletes a δ 96.41, 93.12 y 96.00, de acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, correspondían a carbonos orto a dos funciones oxigenadas y eran fácilmente asignables a los carbonos H-6, H-8, H-3' respectivamente. En tanto que el doblete restante a δ 108.70 debía corresponder al carbono C-6' que era el único carbono orto a una función oxigenada.

d) Los dos singuletes a δ 99.80 y δ 107.14 se asignaron a los carbonos C-4a y C-1' respectivamente.

e) Finalmente, el cuarteto a 56.14 correspondían a los metoxilos.

Cabe hacer notar que en la óxidocoumarina las señales correspondientes al carbón vinílico (C-3) y al carbono (C-1') se protegen apreciablemente en comparación con una 4-fenilcoumarina simple.

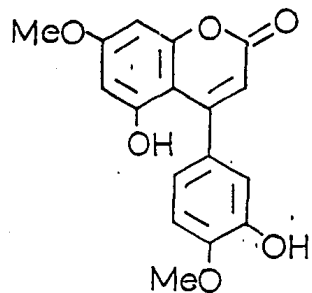
En base a la información anterior el compuesto 55 pudo ser caracterizado como 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-óxidocoumarina, el cual es también un nuevo producto natural.

4.7 Caracterización de la 3',5-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina 54.

De las fracciones 38-50 de la columna original de la Tabla 4 se obtuvo un polvo fino (155 mg) de color amarillo crema de pf. 225-226°C. Este compuesto resultó homogéneo en los diversos sistemas de cromatografía de la Tabla 3 y al igual que todos los compuestos anteriores era altamente fluorescente al visualizar los cromatoplasmas al UV onda larga. Las constantes físicas y espectroscópicas, así como la estructura del compuesto 54 se indican en la Tabla 27.

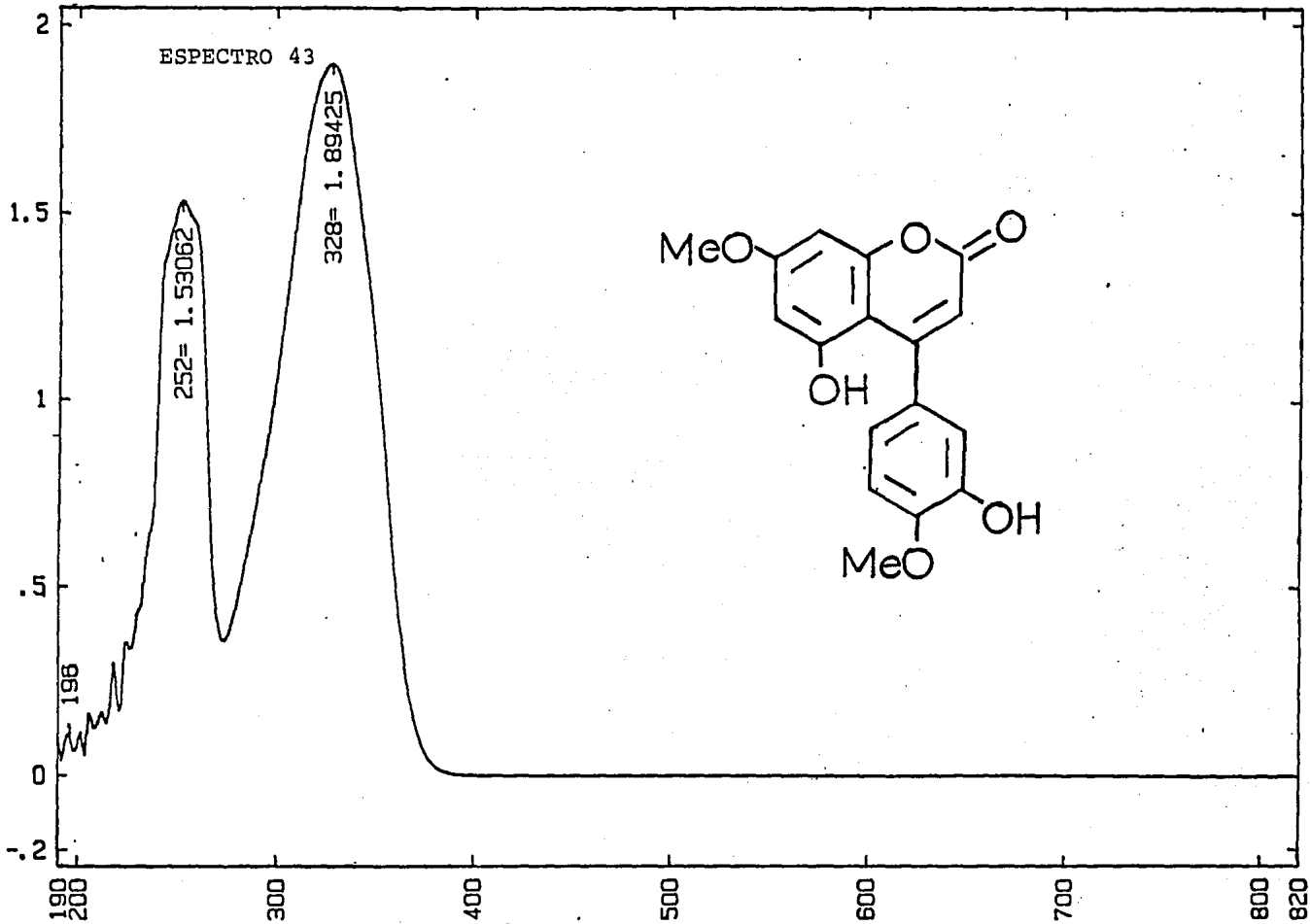
El carácter 4-fenilcoumarínico de este compuesto se dedujo fácilmente de los espectros de UV, IR y del RMNP. El primero (Espectro 43) mostró máximos de absorción a 196, 252 y 328 nm y el segundo (Espectro 44) presentó además bandas de absorción asociadas con la presencia de hidroxilo fenólico (3460 y 3300 cm^{-1}) y aromaticidad (1515 , 1440 cm^{-1}), aquellas características del sistema α -pirona de una 4-fenilcoumarina (1690 y 1620 cm^{-1}).

Tabla 27. Constantes físicas y espectroscópicas de la 3'-5-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-coumarina 54.



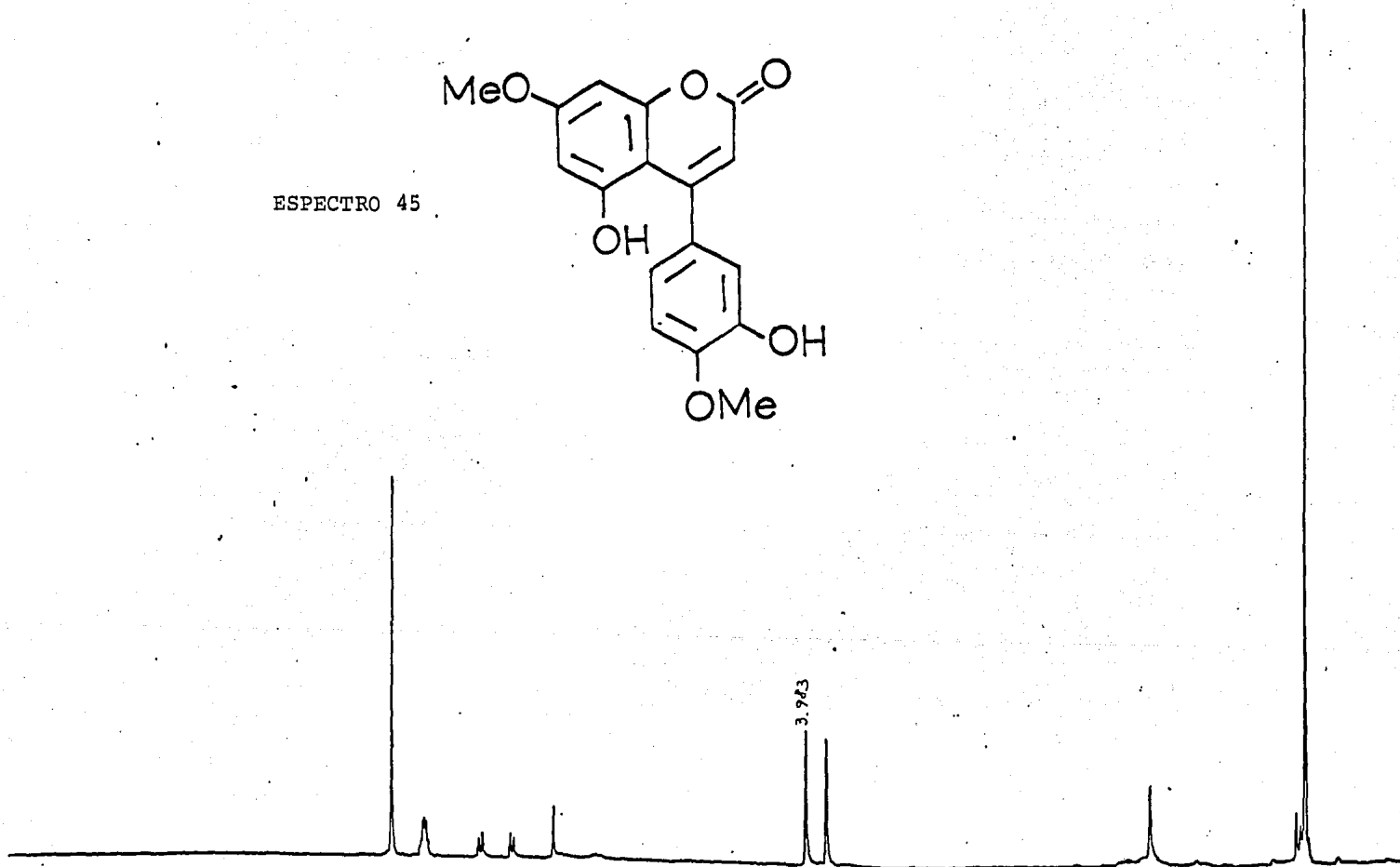
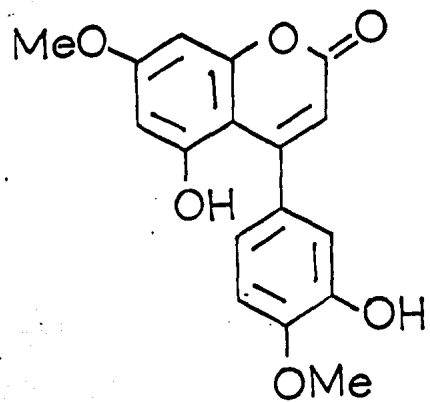
P.M.	314	
P.F.	225-226°C	
EM m/z %	314 (100), 286 (64.8), 271 (37.7)	
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	196, 252, 328	Espectro 43
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3460, 1690, 3500, 1620, 1515, 1440, 1370, 1350, 1335, 1285, 1240, 1200, 1155, 1090, 1050, 1025, 835, 810	Espectro 44
RMNP (CDCl_3 , δ)	6.97-6.99 (m 3H H-2', H-5', H-6'), 6.51 (d 1H J=3Hz H-8), 6.28 (d 1H J=3Hz H-6), 5.95 (s 1H H-3), 3.98 (s 3H OCH_3), 3.83 (s 3H OCH_3)	Espectro 45
RMNP (Piridina- d_5 , δ)	7.49 (d 1H J=3Hz, H-2'), 7.08-7.03 (m 2H H-5' H-6'), 6.62 (s 3H H-6 H-8), 6.26 (s 1H H-3), 3.72 (s 3H OCH_3), 3.70 (s 3H OCH_3)	Espectro 46

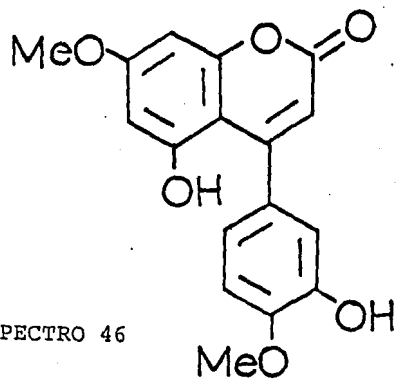
ABSORBANCE



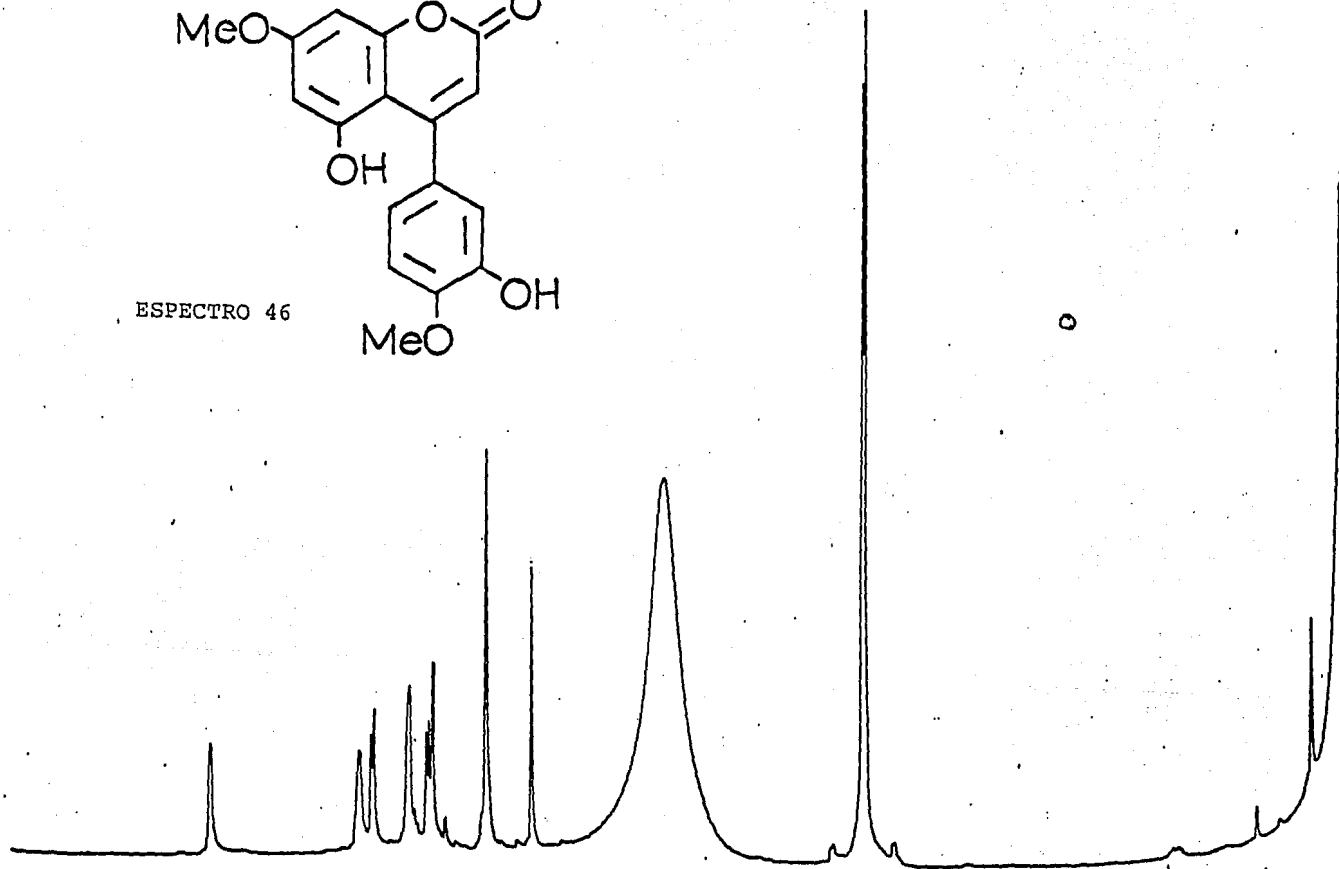
WAVELENGTH (nm)

ESPECTRO 45





ESPECTRO 46



En los espectros de RMNP en piridina- d_5 (Espectro 46) y en $CDCl_3$ (Espectro 45), se observaron el singlete característico para el H-3 de la estructura tipo (δ 5.95 y δ 6.26 respectivamente) y señales para dos metoxilos (δ 3.72 y δ 3.70 en el espectro en $CDCl_3$ y δ 3.98 y δ 3.83 en el espectro en piridina- d_5).

En el espectro en $CDCl_3$ se observó un sistema AB para dos protones meta relacionados similar al de la aglicona de los compuestos 57 y 59 (δ 6.51 y δ 6.28).

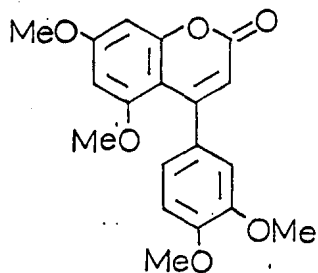
Por analogía con el compuesto 57A posiblemente estas señales correspondían a los protones H-6 y H-8 del anillo A.

Finalmente se observó en el espectro en $CDCl_3$, un multiplete que integraba para tres protones aromáticos (δ 6.97-6.99).

La obtención de un derivado de acetilado 54B y de un derivado tetrametilado 54A indicó la naturaleza difenólica del compuesto 54. Las características físicas y espectroscópicas de ambos se resumen en las Tablas 28 y 29 respectivamente.

En los espectros de RMNP de los derivados acetilado y metilado se apreció una señal para metilo de acetato a δ 1.5 y una señal para metilo de metoxilo a δ 3.48, respectivamente. Al igual que en el caso de la aglicona acetilada 54B, estas señales a campos más altos de los habituales, atribuibles al acetato en C-5 del derivado acetilado y al -OMe en C-5 en el caso del metilado, eran indicativos de un grupo fenólico libre en C-5 en el producto natural. Esta observación era consonante con el desplazamiento a campo más bajo (δ 6.81) de solo una de las señales dobles del sistema AB en el derivado ace-

Tabla 28. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-tetrametoxi-4-fenil-coumarina 54A.



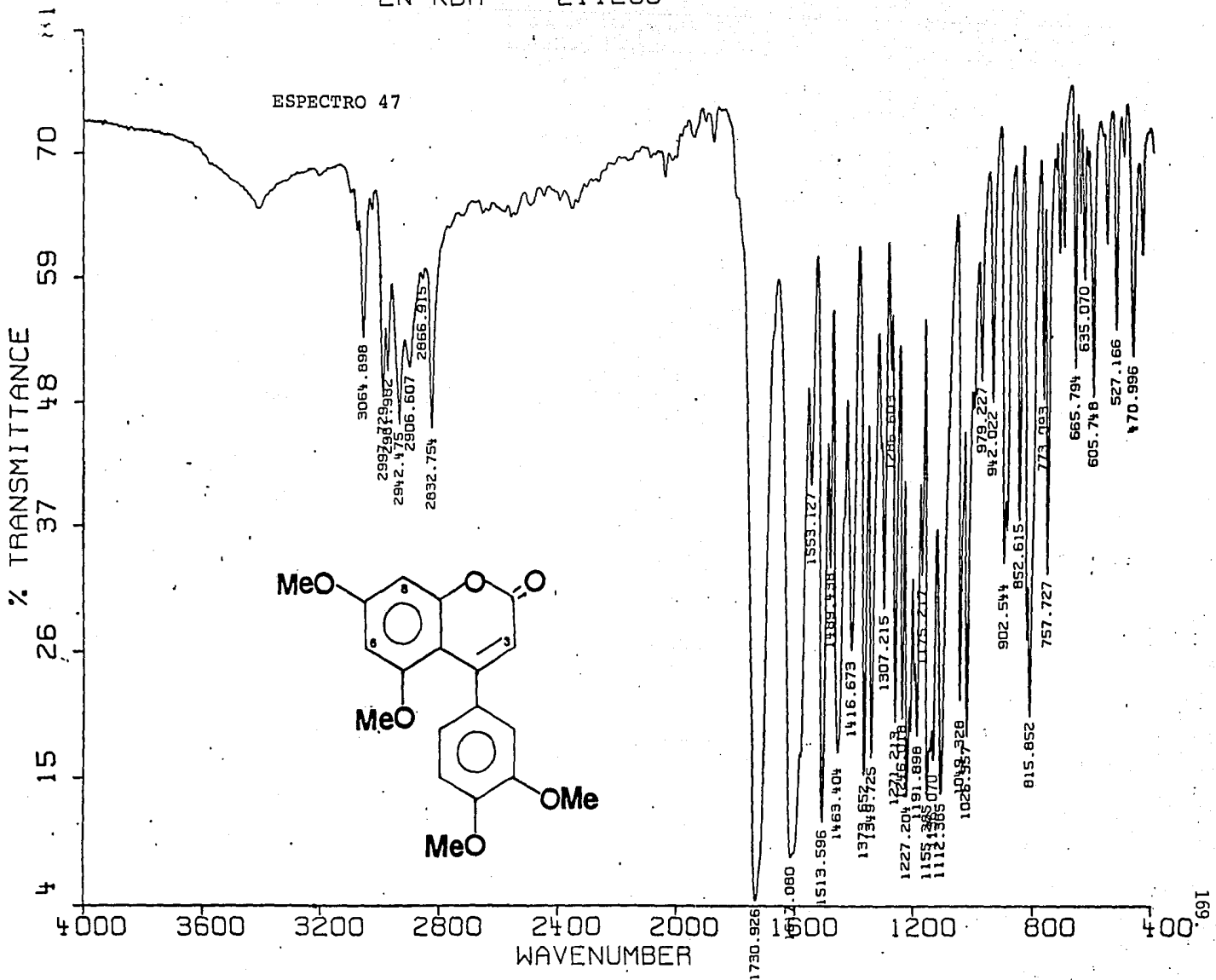
P.M.		342°C
P.F.		166-168°C
UV	$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	252, 328
IR	$\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3064, 1730, 1517, 1513, 1463, 1372, 1349, 1227, 1155, 1112, 902, 815
RMNP	(CDCl_3 , δ)	6.79-6.91 (m 3H H-2' H-5 H-6'), 6.51 (d 1H J=2.5Hz H-8), 6.23 (d 1H J=2.5Hz H-6), 6.0 (s 1H H-3), 3.92 (s 3H OMe), 3.86 (s 6H CH_3O), 3.48 (s 3H OMe)

Espectro 47

Espectro 48

IN KBr PILE

ESPECTRO 47



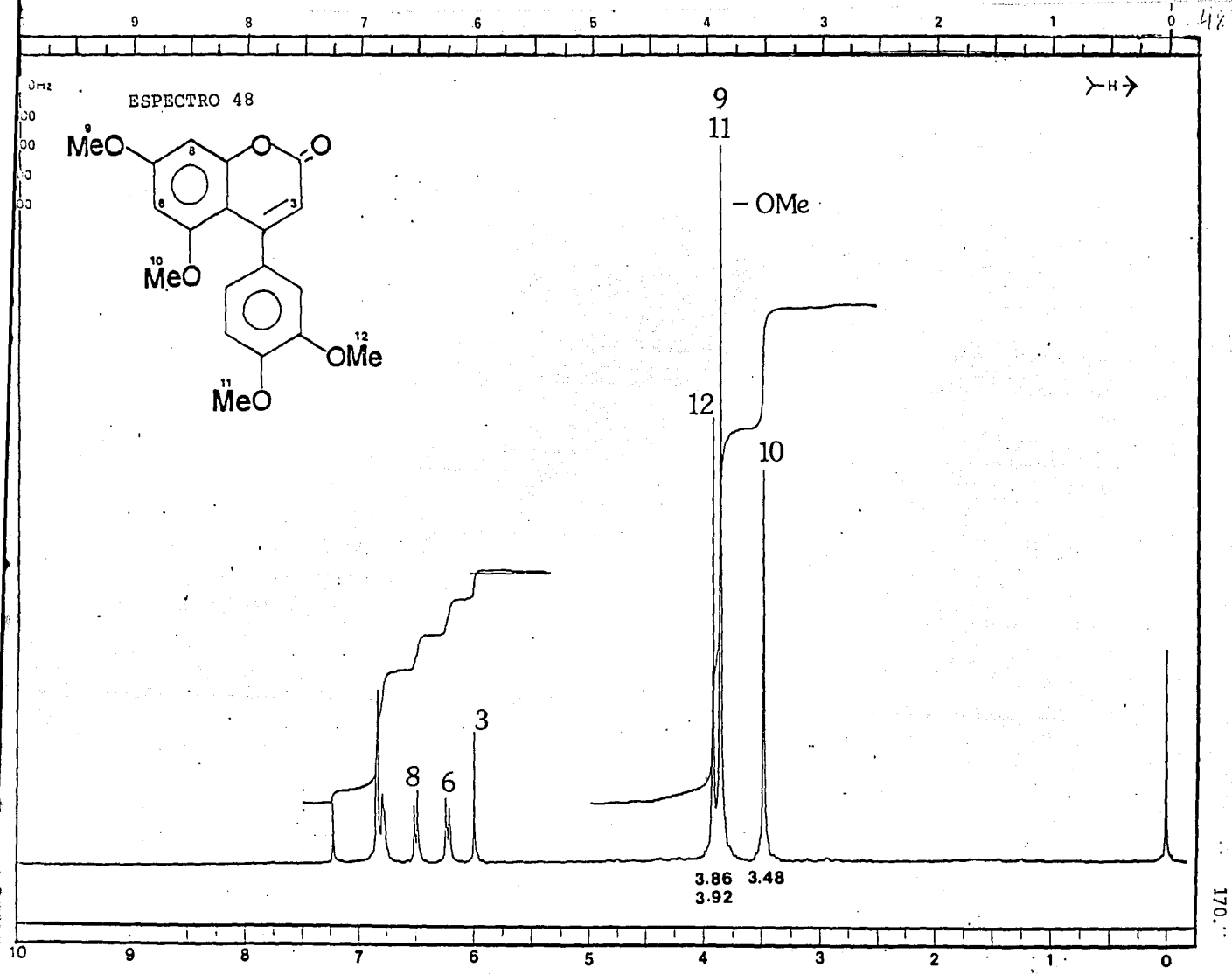
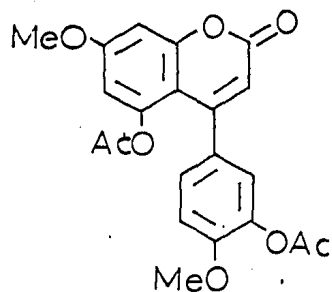


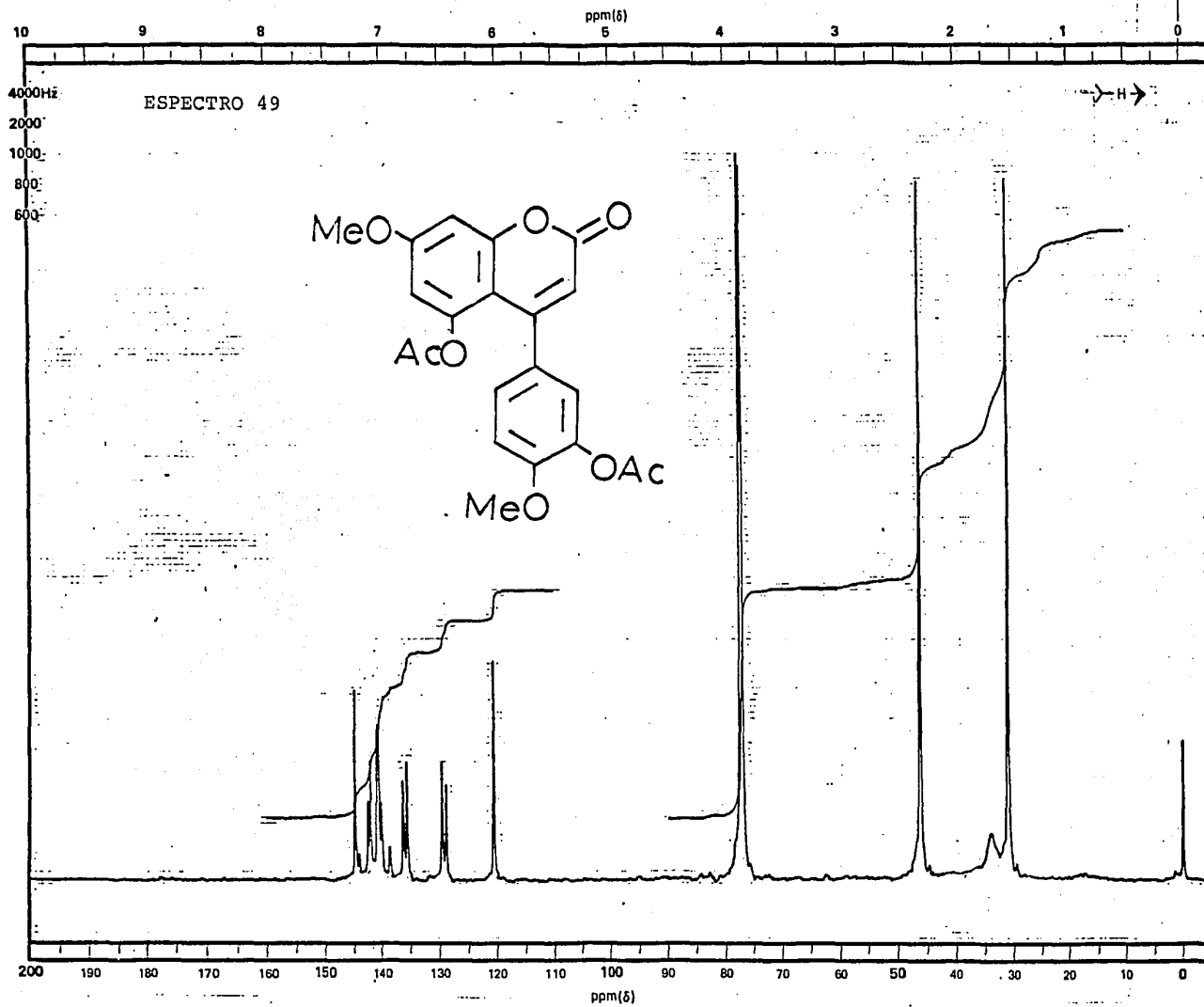
Tabla 29. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3'-diacetoxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-coumarina 54B.



P.M.	398
P.F.	162-163°C
EM m/z (%)	398 (14.9), 356 (39.8), 314 (100), 286 (38.1) 43 (39.0)
RMNP (CDCl ₃ , δ)	7.12 (d 1H J=3Hz H-2'), 7.04-6.94 (m 2H H-5', H-6'), 6.81 (d 1H J=3Hz H-6), 6.42 (d 1H J=3Hz H-8), 6.04 (s 1H H-3), 3.86 (s 3H OCH ₃), 3.88 (s 3H OCH ₃), 2.32 (s 3H CH ₃ CO-3'), 1.55 (s 3H CH ₃ CO-5)

Espectro 49

49



172

tilado.

En consecuencia, y por analogía con la aglicona 57A uno de los grupos metoxilos originalmente detectados en el espectro de RMNP de 54, se debía encontrar en C-7. En base a la discusión previa se podía proponer para el compuesto 54 la estructura parcial que se indica en la Figura 16.

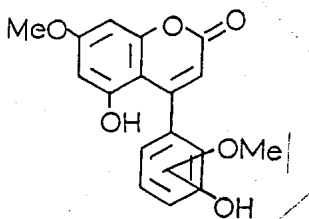


Figura 16. Estructura parcial del compuesto 54.

A este punto solo restaba asignar la disposición relativa de los dos sustituyentes en el anillo C. En este sentido se podían visualizar *a priori* seis posibilidades diferentes; sin embargo, el hallazgo de que el derivado totalmente metilado de 54 y la aglicona 57A eran idénticas en todos sus aspectos, limitó este número a dos posibilidades las cuales se ilustran en la Figura 17.

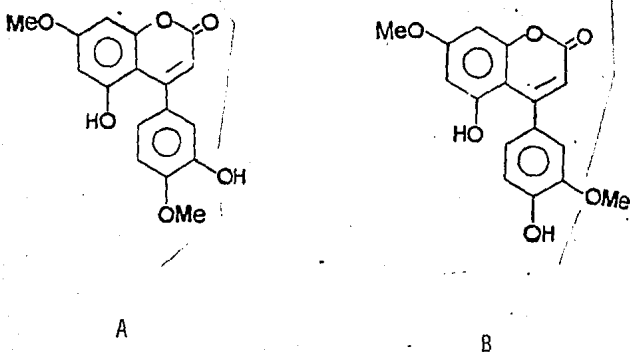


Figura 17. Posibles estructuras del anillo C del compuesto 54.

El análisis de primer orden de la región aromática de los espectros de RMNP no fué de gran utilidad para discernir entre estas dos posibilidades ya que en ninguno de los casos se observó resolución total de la zona aromática. Sin embargo, como se puede apreciar en la Figura 18, en el espectro de RMNP en piridina- d_5 del producto original así como en el espectro del derivado acetilado en $CDCl_3$ se pudo apreciar un doblete en cada caso ($J=3\text{Hz}$) a campo más bajo (δ 7.49 en el caso del primero y δ 7.12 en el caso del segundo) que integraba para un protón y que podía ser asignado al H-2' del anillo C. Este desplazamiento paramagnético era consistente con la ubicación del hidroxilo en C-3'.

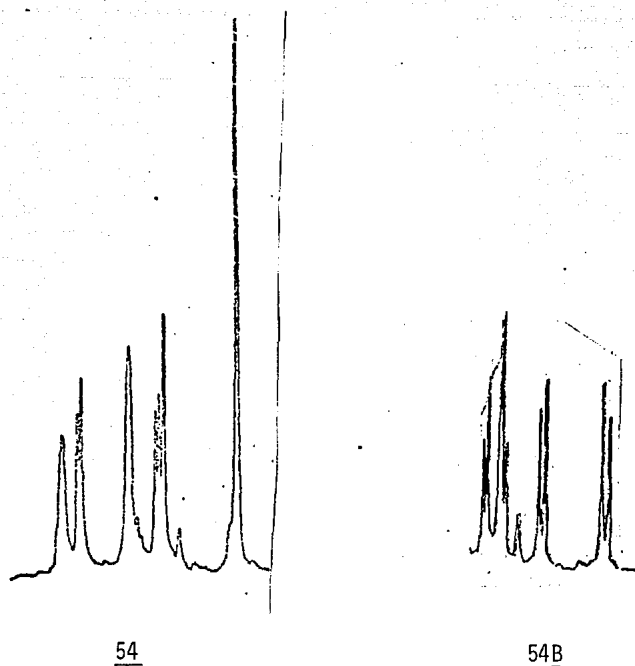


Figura 18. Zonas aromáticas del compuesto 54 en piridina y de su derivado acetilado en CDCl_3 .

Es de hacer notar que aunque la evidencia anterior no era muy clara debido a la falta de resolución de la zona aromática, permitía inferir *a priori* esta posibilidad.

La evidencia definitiva de que ciertamente el hidroxilo estaba ubicado en C-3' (Estructura A de la Figura 17) se obtuvo mediante la transformación de 54 en el compuesto 55 por tratamiento con KOH-MeOH en presencia de ferrocianuro de potasio, como se indicó en la sección experimental. El producto de transformación resultó idéntico al producto 55 también aislado en el presente estudio.

Es de hacer notar que cuando esta transformación se trató de realizar en las condiciones descritas para la transformación de

57A en 52, no se obtuvo éxito alguno; sin embargo, al añadir ferrocianuro de potasio la reacción procedió rápidamente.

Las evidencias antes mencionadas permitieron finalmente establecer la estructura del compuesto como la de la 5,3'-dihidroxi-7-4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina, otro nuevo producto natural.

4.8 Identificación de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina 40.

Al recromatografiar las fracciones de menor polaridad de la columna fué posible separar otra 4-fenilcoumarina. Esta se obtuvo como un polvo blanco cristalino de $pf = 150-152^\circ$.

Las características físicas y espectroscópicas de este compuesto se resumen en la Tabla 30.

Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{18}H_{16}O_5$. Su espectro de masas presentó el ión molecular a m/z 312 [M^+ , 90] y otros picos importantes se observaron a m/z 284 [$M-CO$, pico base] y a m/z 269 (35).

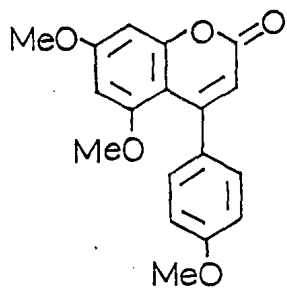
En su espectro de RMNP (Espectro 50) se observaron bandas fácilmente asignables como se indica a continuación:

a) A δ 7.18 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H) y a δ 6.85 (d, $J=8.5\text{Hz}$, 2H) en sistema $AA'BB'$ típico de un anillo aromático para-sustituído como en el caso del glicósido 60.

b) A δ 6.46 (d $J=3\text{Hz}$, 1H) y a δ 6.23 (d, $J=3\text{Hz}$, 1H) el sistema AB de dos protones meta relacionados.

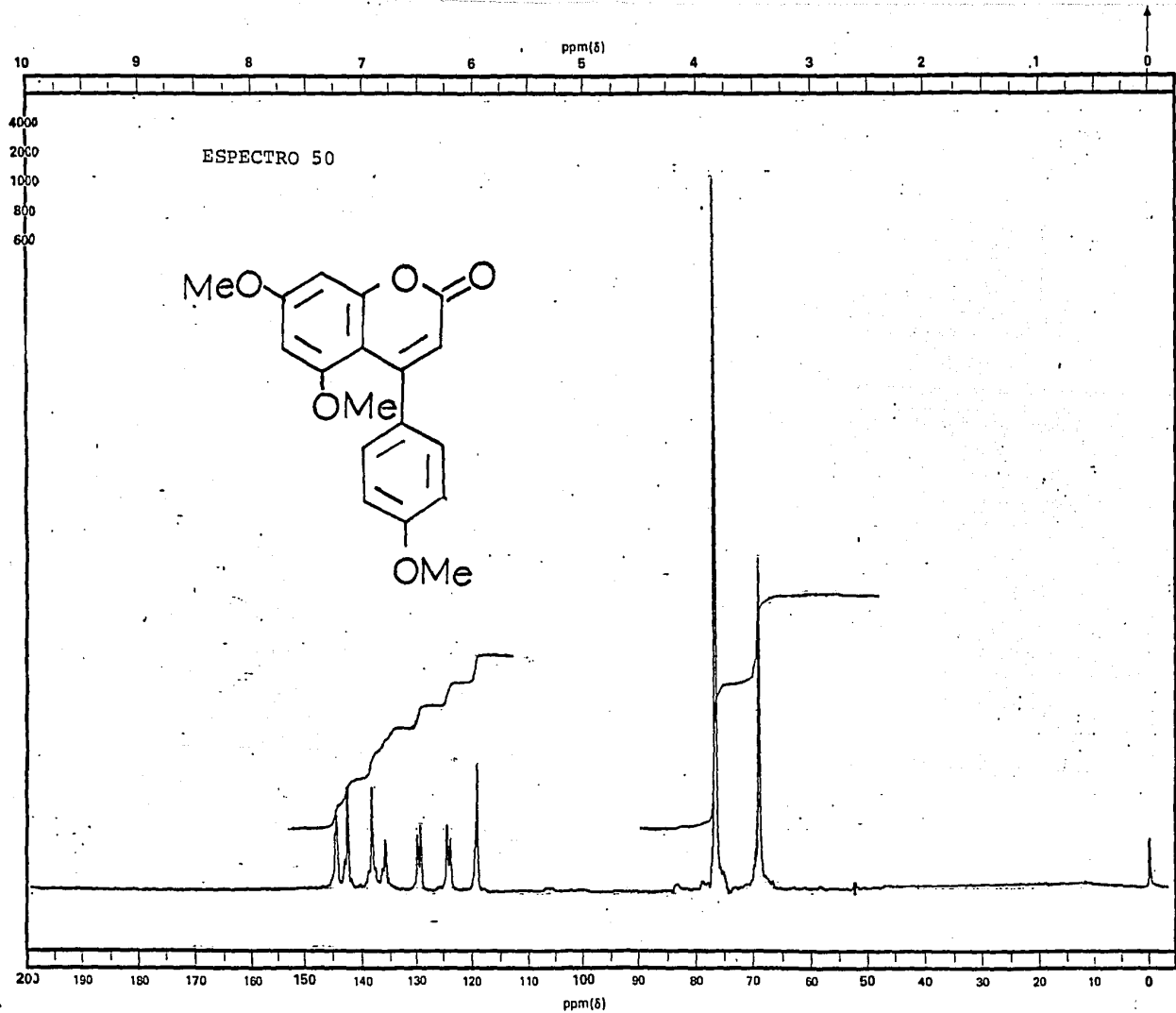
d) A δ 5.95 el singulete característico de H-3.

Tabla 30. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina 40.



P.M.	312
P.F.	150-152°C
EMIE m/z (%)	312 (M ⁺ , 80), 284 (100), 269 (37), 241 (2)
IR ν_{max} cm ⁻¹	2960, 1730, 1640, 1610, 1525, 1480, 1360, 1380 1240, 1260, 1275, 1120
RMNP (CDCl ₃ , δ)	7.18 (d J=8.5Hz 2H H-2', H-6'), 6.85 (d J=8.5Hz 2H H-3', H-5'), 6.46 (d J=3Hz H-8), 6.23 (d J=3Hz H-6), 5.95 (s 1H H-3), 3.84 (s 6H OMe), 3.45 (s 3H OMe ₅)

Espectro 50



d) Finalmente, a δ 3.84 un singulete que integraba para seis protones y otro a δ 3.45 que integraba para tres protones, atribuible éste último a un metoxilo ubicado en C-5 por las razones antes mencionadas.

Si un metoxilo estaba en C-5, otro debía estar en C-7, en concordancia con el sistema AB y el otro en C-4' a fin de explicar el sistema AA'BB'.

En base a los datos anteriores este compuesto debía ser la 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina, metabolito previamente aislado de la *Coutarea hexandra* (Monache, *et al.*, 1983). Las constantes físicas y espectroscópicas descritas por Monache, *et al.* concuerdan con los encontrados para el compuesto 40.

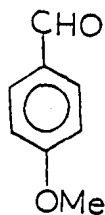
4.9 Identificación del Anisaldehído 53.

También de las fracciones de menor polaridad fué posible aislar, luego de una cromatografía preparativa en capa delgada un líquido amarillo claro de olor agradable. Su estructura así como sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 31.

Este compuesto aromático fué caracterizado como anisaldehído en base al análisis espectroscópico. Su espectro de RMNP, bastante sencillo, se ilustra en el Espectro 51 y se pueden apreciar las siguientes características:

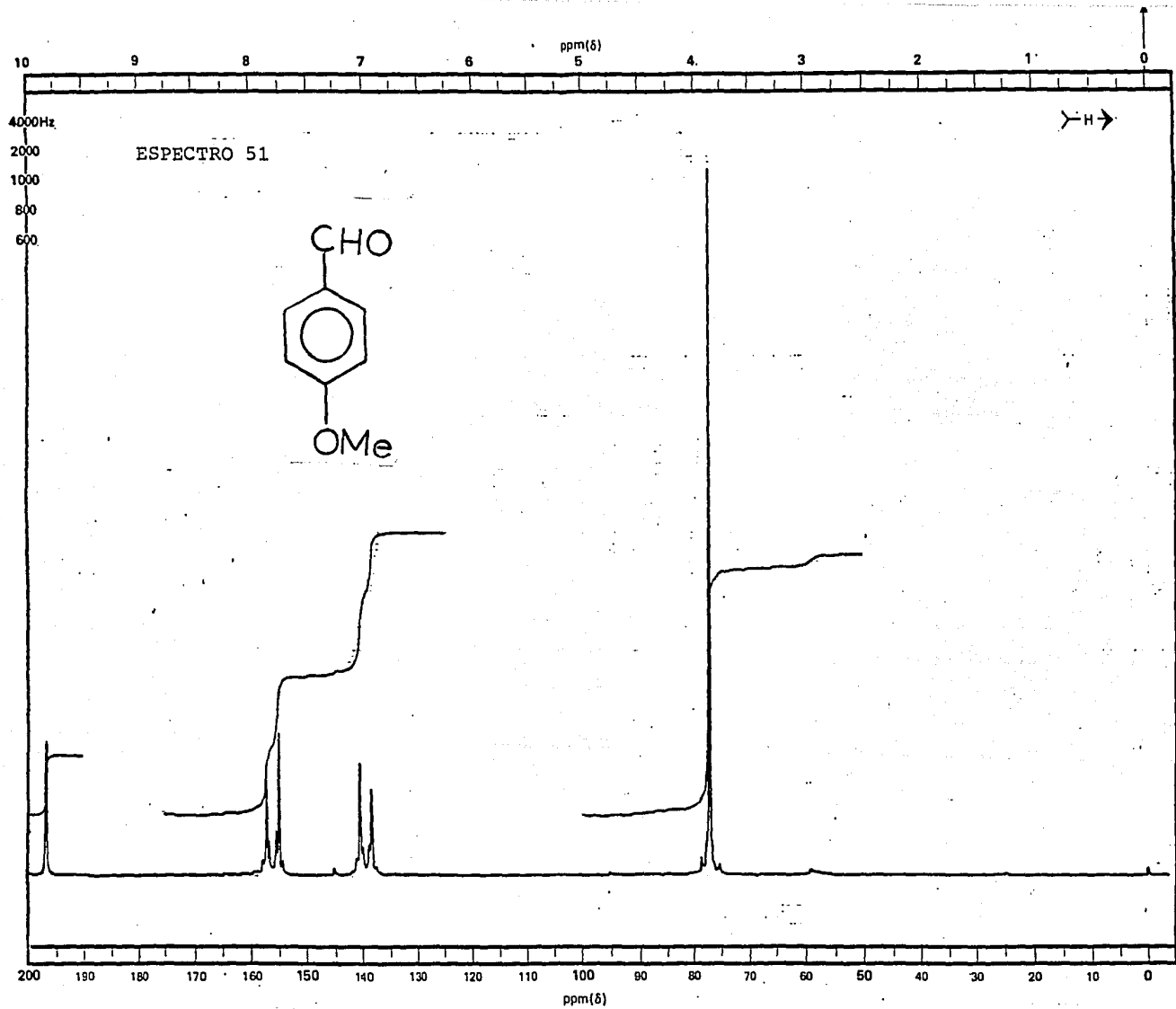
- a) La resonancia a δ 9.85 del protón aldehídico.
- b) Un sistema AA'BB' para los protones aromáticos a δ 7.80 (d J=8Hz) y a δ 6.98 (d J=8Hz).

Tabla 31. Constantes físicas y espectroscópicas del anisaldehído 53.



P.M.	136
EM m/z (%)	136 (100), 76 (3), 77 (33), 92 (20), 39 (20), 29 (16), 63 (16)
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm	253
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1}	3070, 3010, 2930, 2840, 1690, 1680, 1570, 1450, 1420, 1390, 1320, 1250, 1210, 1180, 1160, 1100, 1020, 1000, 850, 830, 770, 760, 710, 640, 630
RMNP (CDCl_3 , δ)	9.85 (s 1H CHO), 7.80 (d 2H J=8Hz), 6.98 (d 2H J=8Hz), 3.83 (s 3H OMe)

Espectro 51



c) Finalmente la resonancia para un metoxilo aromático a δ 3.83.

La comparación con una muestra auténtica amablemente proporcionada por el Dr. Rafael Castillo, no dejó lugar a dudas acerca de la identidad de este compuesto.

4.10 Identificación del β -sitosterol 56.

De las mismas fracciones de donde se separó el compuesto 52 se logró aislar el β -sitosterol, el cual fué caracterizado por comparación con una muestra auténtica siguiendo la metodología convencional.

5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1. Se revisó la literatura existente acerca de las 4-arilcoumarinas, encontrándose que estos metabolitos se encuentran distribuidos en tres familias de plantas: Rubiaceae (géneros *Coutarea* y *Exostema*), Guttiferae (géneros *Calophyllum*, *Mesua* y *Mammea*) y Leguminosae (géneros *Dalbergia* y *Macherium*). Es de hacer notar que desde el punto de vista filogenético las tres familias no se encuentran relacionadas. Como se explicó un detalle en la sección 1.3.1 desde el punto de vista químico estructural existen diferencias entre las 4-fenilcoumarinas de las tres familias.
2. El estudio fitoquímico convencional de la *E. caribaeum* permitió el aislamiento y caracterización de ocho fenilcoumarinas, un esteroide y un compuesto aromático simple. Las fenilcoumarinas fueron caracterizadas por medio de métodos químicos y espectroscópicos como: 5,7,4'-trimetoxi-4-fenilcoumarina 40; 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 52; 3',5'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina 54; 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 55; 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocoumarina 58; 5-0-6"-acetil- β -D-galactosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina 57; 5-0- β -glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcoumarina 59; 5-0- β -galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcoumarina 60. Los seis últimos productos resultaron

ser nuevos productos naturales.

Con estas ocho coumarinas el número de fenilcoumarinas aisladas de *E. caribaeum* alcanza a 10. Al igual que otras fenilcoumarinas aisladas de Rubiáceas, éstas presentaron un patrón similar de sustitución.

3. La Exostemina previamente aislada por Sánchez Viesca, *et al*, 1967 no fue obtenida en el presente estudio, posiblemente debido a variaciones ontogénicas.
4. Desde el punto de vista biológico se evaluaron los compuestos 55 y 58, encontrándose no tóxicos para *Artemia salina* [DL >1000 ppm] (Meyer, *et al*, 1982). La evaluación como antimaláricos de 59, 55, 57 y 52 se encuentra actualmente en proceso por parte de la IOCD.
5. No existe correlación estructural entre el tipo de sustancias aisladas y las sustancias utilizadas actualmente como antimaláricas o con sustancias de reconocida actividad antimalárica. En todo caso en tanto no sean evaluadas como antimaláricas no se puede descartar su actividad potencial.
6. La transformación de 54 en 55 constituye una contribución adicional a la transformación de 4-fenilcoumarinas en 5,2'-oxido-coumarinas en medio básico y que se efectuará por vez primera

recientemente (Mata, *et al.*, 1987). El hecho de que la reacción se facilitará al añadir ferrocianuro de potasio proporciona una evidencia de que la reacción procede vía un acoplamiento fenólico. El estudio detallado del mecanismo por el cual se lleva a cabo esta ciclización (posiblemente biomimética) se encuentra en proceso. Estas reacciones se ilustran en la Figura 19.

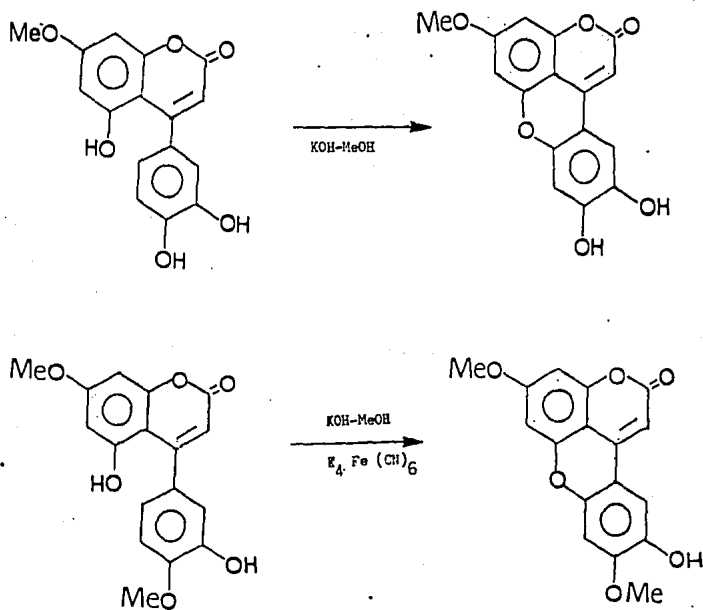


Figura 19. Conversión en medio básico de 4-fenilcoumarinas en 5,2'-oxidocoumarinas.

7. La coexistencia de 4-fenilcoumarinas y las 5,2'-oxidocoumarinas resulta sin precedente en la naturaleza y podría ser de importancia biogenética. Se podría especular de que las 4-fenilcoumarinas se puedan ciclizar en la naturaleza vía un acoplamiento fenólico para originar las 5,2'-oxidocoumarinas. En el caso de las sustancias glicosídicas esta ciclización tendría lugar luego de la hidrólisis con la enzima apropiada.

6. RECOMENDACIONES.

1. Examinar otras colecciones de *E. caribaeum* a fin de estudiar variaciones ontogénicas.
2. Hacer un estudio comparativo de RMNP para estudiar la influencia del hidroxilo libre sobre los desplazamientos químicos de los protones del anillo C, ya que se pudo observar en este estudio que dicho hidroxilo, en comparación con otros sustituyentes, afecta considerablemente los desplazamientos químicos del anillo C.

Así mismo resultaría interesante estudiar mediante espectroscopia RMNC¹³ otras oxidocoumarinas para establecer la variación del desplazamiento químico de los carbonos C-1' y C-3 que aparentemente se afectan notablemente en comparación con aquellos de las 4-fenilcoumarinas abiertas.

3. Completar el estudio del mecanismo de la ciclización de las 4-fenilcoumarinas a 5,2'-oxidocoumarinas.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Ahluwalia, V.K. and Seshadri, T.R.; J. Chem. Soc., 970 (1957).
- Aiello, A.A.; Journal of the Arnold Arboretum, 60, 38 (1979).
- Bala, K.R. and Seshadri T.R.; Phytochemistry, 10, 1311 (1971).
- Benn, M.H.; Experientia, 24, 9 (1968).
- Bhanu, S.; Saroja, T.; Seshadri, T.R.; Mukerjee, S.K., Indian Journal of Chemistry, 10, 577 (1972).
- Breck, G.D.; Stout, G.H.; Journal of Organic Chemistry, 34, 4203 (1969).
- Carpenter, I.; Mc Garry, E.J.; Scheinmann, F.; Tetrahedron Letters, 3983 (1970).
- Carpenter, I.; Mc Garry, E.J.; Scheinmann, F.; Journal Chem. Soc. C, 3783 (1971).
- Calzada, B.F. Tesis Profesional, UNAM (1987).
- Chakraborty, D.P.; Bose, P.K.; Proc. Natl. Inst. Sci. India, 26A, 1 (1960).
- Chakraborty, D.P. and Chatterji, D.; Journal Organic Chemistry, 3784 (1969).
- Chakraborty, D.P. and Das, B.C.; Tetrahedron Letters, 5727 (1966).

- Chopin, J.; Dellamonica, G.; Besson, E.; Phytochemistry, 16, 1999 (1977).
- Crombi, L.; Games, D.E.; Harkins, N.J.; Reed G.F.; J.C.S. Perkin I, 2248 (1972).
- Crombi, L.; Games, D.E.; Mc Cormick, A.; J. Chem. Soc. C., 2553 (1967).
- Crombi, L.; Games, D.E.; Haskins, N.J.; Reed, G.F.; Tetrahedron Letters, 3979 (1970).
- Crombi, L.; Games, D.E.; Mc Cormick, A. Tetrahedron Letters, 145 (1966).
- Crombi, L.; Games, D.E., Haskins, N.J.; Reed, G.F.; J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2255 (1972).
- Dhingra, V.K.; Mukerjee, S.K.; Saroja, T. and Seshadri, T.R.; Phytochemistry, 10, 2551 (1971).
- Djerassi, C.; Eisenbraun, E.J.; Finnegan, R.A.; Gilbert, B.; Journal Organic Chemistry, 25, 2164 (1960).
- Donnelly, B.J.; Donnelly, D.M.X.; O'Sullivan, M.; Tetrahedron, 24, 2617 (1968).
- Donnelly, B.J.; Donnelly, D.M.X., O'Sullivan, M.; Prendergast, S.P.; Tetrahedron, 25, 4409 (1969).
- Donnelly, D.M.X.; Kavanagh, P.J.; Kunesch, G.; Polonsky, J.; J.C.S. Perkin Trans. I, 965, (1973).

- Donnelly, D.M.X.; Thompson, J.C.; Whalley, W.B. and Ahmad, S.; J.C.S. Perkin I, 1737 (1973).
- Donnelly, D.M.X.; O'Reilly, J.; Thompson, J.; Phytochemistry, 11, 823 (1972).
- Donnelly, B.J.; Donnelly, D.M.X.; O'Sullivan, A.M.; Chem. and Ind., 1498 (1966).
- Donnelly, D.M.X.; O'Reilly, J.; Phytochemistry, 14, 2287 (1975a).
- Donnelly, D.M.X. Cap. 15 Neoflavonoids; Harborne, J.B., Mabry, T.J. y Mabry, H.; The Flavonoids; 801-805, Chapman and Hall, London (1975).
- Donnelly, D.M.X.; Fukuda, N.; Wollenweber, E.; Polonsky, J. and Prangé, T.; Phytochemistry, 26, 1143 (1987).
- Eyton, W.B.; Ollis, W.D.; Sutherland, I.O.; Proc. Chem. Soc. London, 301 (1962).
- Farnsworth, N.S. and Bingel, A.S. Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening. En Wagner, H. y Wolff, P. (Ed. New Natural Products and Plants drugs with Pharmacological, biological on the therapeutical activity. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York p. 1-23 (1977).
- Finnegan, R.A. and Merkel, K.E.; J. Pharm. Sci., 61, 1603 (1972).
- Finnegan, R.A.; Mueller, W.H.; Chem. and Ind., 1065 (1964).
- Finnegan, R.A., Morris, M.P.; Djerassi, C.; Journal Organic Chemistry, 26, 1180 (1961).
- Finnegan, R.A.; Mueller, W.H.; Journal Organic Chemistry, 30, 2342 (1965).

- Games, D.E.; Haskins, N.J.; Chem. Comm., 1005, (1971).
- Games, D.E.; Tetrahedron Letters, 3187 (1972).
- Gautier, J.; Cave, A.; Kunesch, G.; Polonsky, J.; Experientia, 28, 759 (1972).
- Gregson, H.; Ollis, W.D.; Sutherland, I.O.; Gottlieb, O.R. y Mayalhaes, M.T., Phytochemistry, 17, 1375 (1978).
- Kawazu, K.; Ohigashi, H.; Takahashi, N.; Mitsui, T.; Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ., 50 (3); 160 (1972).
- Kawazu, K.; Ohigashi, H.; Mitsui, T.; Tetrahedron Letters, 2383 (1968).
- Krebs, Griensinger; Arzneimittelforsch., 10, 31 (1960).
- Kunesch, G.; Hildesheim, R.; Polonsky, J.; Janot, M.M.; C.R. Acad. Sc. Paris t 268, serie D, 2143 (1969).
- Kunesch, G.; Polonsky, J.; Chem. Comm., 317, (1967).
- Kunesch, G.; Polonsky, J.; Phytochemistry, 8, 1221 (1969).
- Levy, G.C.; Nelson, G.L.; Organic Chem. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists; Wiley New York (1972).
- Liu, J., Ni, M.; Faw, J.; Tu, Y.; Wu, Z.; Qu, Y. y Chow, W.; Acta Chim. Sinica, 37, 129 (1979).
- Malagón, F.; Elementos. Revista de Ciencias Exactas, Naturales y Aplicadas, 2 (8), 3, México (1986).

- Markham, K.R.; Techniques of Flavonoid Identification; Academic Press, London y New York (1982), p. 81.
- Marckham, K.R.; Zinsmeister, H.D. y Mues, R.; Phytochemistry, 17, 160 (1978).
- Martínez del Campo; J. An. Inst. Med. Nac. México, 8, 332 (1906).
- Mata, R.S.; Calzada, F.C.; García, R.M.; Reguero, M.T.R.; Journal of Natural Products, 50, en prensa (1987).
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobser, L.B.; Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L.; Planta Médica, 45, 31 (1982).
- Monache, G.D., Botta, B., Monache, F.D.; Botta, M.; Phytochemistry, 24, 1355 (1985).
- Monache, G.D.; Botta, B.; Alves de Lima, R.; Phytochemistry, 23, 1813 (1984).
- Monache, G.D.; Botta, B.; Neto, A.S.; Alves de Lima, R.; Phytochemistry, 22, 1657 (1983).
- Mukerjee, S.K.; Saroja, T.; Seshadri, R.T.; Tetrahedron, 27, 799 (1971).
- Mukerjee, S.K.; Saroja, T.; Seshadri, T.R., Tetrahedron, 24, 6527 (1968).
- Murray, R.D.H.; Méndez, J. y Brown, S.; The Natural Coumarins: Occurrence Chemistry and Biochemistry, John Willey y Sons LTD (1982).

- Nigam, S.K., Metra, C.R.; Tetrahedron Letters, 2633 (1967).
- Ogiyama, K. y Yasue, M., Phytochemistry, 12, 2544 (1973).
- Ollis, W.D.; Chem. Comm., 1396 (1968).
- Ollis, W.D.; Experientia, XXII: 777 (1966).
- Ollis, W.D. Isoflavonoid y Neoflavonoid Variants. Cap. 10, Mabry, T.J.; Alston, R.E.; Runeckles, V.C. Recent Advances in Phytochemistry, 1, 361 Appleton-Century-Crafts, New York (1968).
- Ollis, W.D.; Redman, B.T.; Roberts, R.J.; Sutherland, I.O.; Chem. Comm., 1392 (1968).
- Ollis, W.D.; Redman, B.T.; Roberts, R.J.; Sutherland, I.O.; Gottlieb, O.R. y Magalhaes, M.T., Phytochemistry, 17: 1383 (1978).
- Ormancey-Potier, A.; Buzas, A.; Lederer, E.; Bull. Soc. Chim. France: 597 (1951).
- Pelter, A.; Ward, R.S.; Gray, T.; J.C.S. Perkin I, 2475 (1976).
- Polonsky, J.; Bull. Soc. Chim. France, 914 (1956).
- Polonsky, J.; Bull. Soc. Chim. France, 541 (1955).
- Polonsky, J.; Bull. Soc. Chim. France, 1079 (1957).
- Rao, M.M.; Seshadri, T.R.; Tetrahedron Letters, 211 (1963).
- Reher, G.; Kraus, L.J.; Sinwell, V.; Koning, W.A.; Phytochemistry, 22, 1524 (1983).

- Reher, G.; Kraus, L.J.; Journal of Natural Products, 47, 172 (1984).
- Reher, G.; Kraus, L.J.; Planta Médica, 45, 145 (1982).
- Rodríguez, L.E.; Alvarez, S.R.CH.; Revista Mexicana de Pediatría, 42 (1973).
- Shriner-Fuson-Curtin. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Limusa, México (1980).
- Sánchez-Viesca, F., Phytochemistry, 8: 1821 (1969).
- Sánchez-Viesca, F., Ciencia, XXVII: 33 (1969).
- Sánchez-Viesca, F.; Díaz, E.; Chávez, G.; Ciencia, XXV, 135 (1967).
- Sarath, G.P.; Jayalilake, G.S.; Selliah, S.S.; Sultanbawa, M.U.S.; J.C.S. Perkin I, 1505 (1977).
- Somanathan, R.; Sultanbawa, M.U.S., J. Chem. Soc. Perkin I, 1935 (1972).
- Standley, W. Flora de Guatemala, Field Museum of Natural History, 24: 69-70 (1975).
- Tempesta, E.; Evaluation of local resources in traditional medicine; Journal of Ethnopharmacology, 2, 163 (1980).
- WHO, 1981; Fourth meeting of the scientific working group on the Chemotherapy of malaria. Beijing. People's Republic of China, WHO Report TDR/Chemal-sw God/QHS; 81, 3 p 5.