

302827

2

2ej



UNIVERSIDAD MOTOLINIA

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
DEL 1-para-CUMARIL, 5-O-METIL,
6-ACETIL-L-MYO-INOSITOL DE
LA Dodonaea viscosa (L) Jacq"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS CONTRERAS MUCIÑO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Página
CAPITULO I	
INTRODUCCION	
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Hipótesis	3
CAPITULO II	
INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA	
2.1 Generalidades de la <i>Dodonaea viscosa</i> (L) Jacq .	4
2.1.1 Aspectos Botánicos	4
2.1.2 Aspectos Químicos	5
2.1.3 Aspectos Biológicos	5
2.2 Esteres derivados de ácidos cinámicos	13
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Diagrama	17
3.2 Materiales, Reactivos y Aparatos	18
3.2.1 Material Vegetal	18
3.2.2 Material de Laboratorio	18
3.2.3 Reactivos y Sustancias	18
3.2.4 Aparatos	19
3.3 Metodología	20
3.4 Resultados	23
CAPITULO IV	
DISCUSION	47
CAPITULO V	
RESUMEN	54

CAPITULO VI	
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56
APENDICE	60
8.1 Secado y pulverización	60
8.2 Extracción y fraccionamiento preliminar	60
8.3 Análisis cromatográficos	60
8.4 Aislamiento y purificación de los compuestos --- de las fracciones de mayor polaridad	61
8.5 Purificación de los compuestos via cromatogra--- fia preparativa en capa delgada	61
8.6 Caracterización del compuesto deseado	62
8.6.1 Determinación de las constantes físicas ..	62
8.6.2 Determinaciones espectroscópicas	62
8.6.3 Determinaciones químicas	62
8.6.4 Determinaciones químicas específicas para el compuesto obtenido	63
8.6.4.1 Prueba de identificación de fenoles	63
8.6.4.2 Prueba de Molish para carbohidra-- tos	63
8.6.4.3 Reacción de acetilación	63
8.6.4.4 Reacción de hidrólisis básica	64
8.7 Ensayo Biológico	64

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema

De acuerdo a un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1983, más de la mitad de la población mundial utiliza los remedios tradicionales vegetales para procurar el alivio de sus enfermedades (21). La mayoría de esta población pertenece a los sectores más necesitados de los países en vías de desarrollo. Es de hacer notar sin embargo, que el uso de estos fármacos es también significativo en los países desarrollados (8). Son muchos los factores que favorecen el uso de los remedios tradicionales en los países del tercer mundo, uno de los más importantes es el de su inmediata disponibilidad en las regiones rurales, otro es el de la insuficiencia de centros hospitalarios y servicios médicos para la población de escasos recursos económicos; finalmente, por razones de tipo socioculturales, los habitantes de las zonas rurales tienen más fé en el curandero tradicional, que en el médico halópata, ya que generalmente el primero habla su mismo lenguaje, expresándose en términos y conceptos que son familiares para estos habitantes, además, usa drogas crudas que estan disponibles en las zonas inmediatas.

De lo antes mencionado se concluye que la medicina tradicional no debe ser ignorada, sino por el contrario, debe ser objeto de estudios multidisciplinarios que permitan su adaptación sobre bases más científicas y técnicas. En este sentido la OMS ha señalado en repetidas ocasiones que los países en vías de desarrollo deben impulsar la investigación de su medicina tradicional y con ello trazar los lineamientos adecuados para su implementación de manera oficial(8, 29).

El estudio multidisciplinario de la medicina tradicional comprende varios aspectos, entre los que destacan los siguientes: antropológicos, botánicos y/o etnobotánicos, químicos, farmacológicos, clínicos y económicos. De ellos los químicos y farmacológicos constituyen los de mayor interés para el Químico Farmacéutico y Farmacognosta moderno.

El estudio químico es importante debido a que permite conocer los elementos constitutivos de la flora medicinal así como el hallazgo de nuevos y/o conocidos agentes medicinales que podrían justificar el uso vernáculo que se les atribuye a numerosas plantas. Para realizar la investigación química se puede seguir cualquiera de las dos estrategias bien conocidas para el estudio de plantas medicinales, es decir, la fitoquímica convencional o la biodirigida mediante ensayos biológicos específicos o generales.

Mediante la primera estrategia, se aíslan y se caracterizan la mayoría de los metabolitos de las plantas, los cuales se someten posteriormente a ensayos biológicos. Este método tiene la desventaja de que generalmente se aíslan los constituyentes que se encuentran en cantidades relativamente altas y no necesariamente son los responsables de la actividad biológica.

En el caso particular de México, la medicina tradicional que se caracteriza por sus raíces indígenas, es rica en recursos, y cumple con la importante labor de proporcionar la salud a un porcentaje considerable de la población (14, 23). Su recurso más importante son las hierbas vernáculas, entre las que se encuentra la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, objeto del presente estudio. La información existente acerca del uso de esta especie vegetal y de otras es abundante y plantea interesantes investigaciones.

1.2 Hipótesis

Considerando lo antes expuesto este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la medicina tradicional mexicana, mediante el estudio químico de la especie medicinal *Dodonaea viscosa* (L) Jacq. procedente del estado de Oaxaca. En esa región la planta goza de reputación folklórica como agente eficaz contra el tratamiento de inflamaciones, heridas y transtornos febriles. Así mismo, considerando que las plantas de uso popular son fuentes potenciales preciadas de principios activos, se tratará de aislar en lo posible compuestos bioactivos de las fracciones de mayor polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la especie antes mencionada.

Independientemente de que los resultados derivados de la presente investigación conduzcan al aislamiento de principios activos, es indudable que los mismos contribuirán al conocimiento de la composición química de la especie mexicana en estudio.

Cabe hacer notar que el estudio de las fracciones de menor polaridad serán objeto de otra propuesta de Tesis.

CAPITULO II

INFORMACION GENERAL SOBRE EL TEMA

2.1 Generalidades de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq.

2.1.1 Aspectos Botánicos (14, 16, 23)

Familia : Sapindáceae

Nombres Comunes : Chapuliztle, Cuerno de cabra, Granadina, Hierba de la cucaracha, Jarilla, Jirimú, Ocotillo y Varal.

Habitat : Baja California, Chiapas, Chihuahua, Cd. de México, Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca y San Luis Potosí.

Descripción de la planta: Arbusto de 1 a 5 metros de altura; de hojas lineares o bien oblongo-lanceoladas de 4 a 12 cm, atenuadas en el ápice, pubescentes o glabras por debajo ; flores amarillas , unisexuales y dioicas en pequeños corimbos laterales. Fruto capsular rosado, con tres alas.

Usos medicinales tradicionales : Antipirético, antiespasmódico, antimicrobiano , astringente, así como, contra cólicos, gota y males venéreos.

Partes Vegetales Usadas : Hojas, corteza y raíz.

2.1.2 Aspectos Químicos

Una gran variedad de metabolitos secundarios han sido descritos en el género *Dodonaea*, estos incluyen: flavonoides, ácidos diterpénicos (labdanos y clerodanos), saponinas triterpénicas y esteroides (2, 6, 12, 13, 22, 30, 31). En el caso de la *Dodonaea viscosa* las diferentes investigaciones fitoquímicas realizadas en diversas regiones del mundo han permitido el aislamiento y caracterización de los constituyentes que se resumen en el Cuadro 1 (3, 6, 7, 11, 20, 24, 25, 26, 31).

2.1.3 Aspectos Biológicos

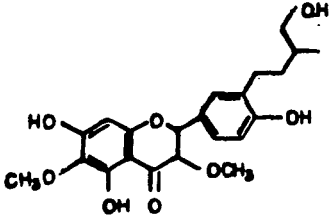
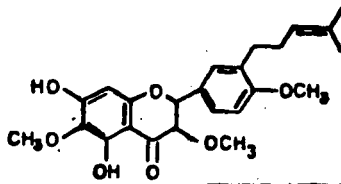
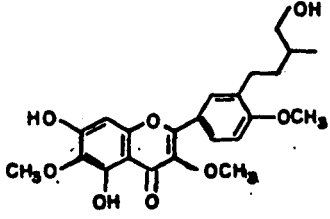
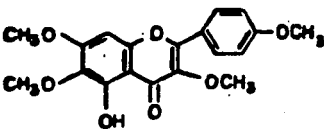
Un estudio reciente demostró la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta, el cual fue evaluado contra organismos grampositivos, gramnegativos y hongos. La mejor actividad fue observada contra *Staphylococcus albus* (28).

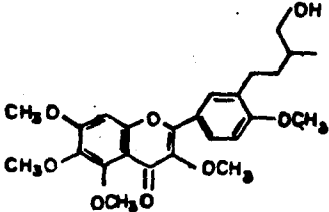
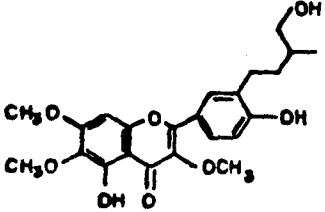
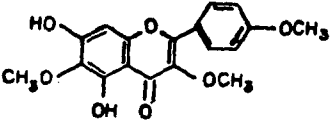
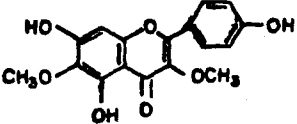
Posteriormente, Wagner y colaboradores comprobaron que las saponinas triterpénicas presentes en la planta tenían actividades antiexudativas (in vivo) y molusquicidas (in vitro). También estos autores comprobaron que dichas saponinas incrementaban la fagocitosis en experimentos realizados in vitro (31).

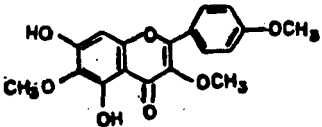
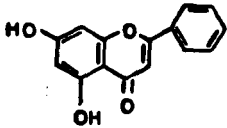
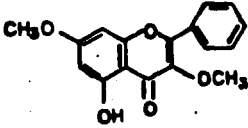
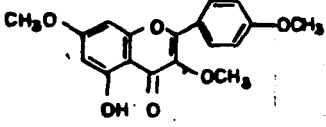
CUADRO 1. METABOLITOS SECUNDARIOS DESCRITOS EN LA

Dodonaea viscosa

F L A V O N O I D E S

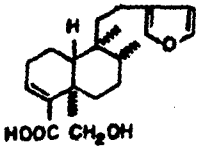
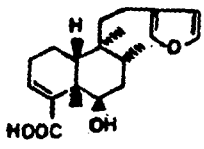
NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
<p>5, 7, 4'-trihidroxi-3'-(3-hidroxi-metil-butil)-3, 6-dimetoxi--- flavona (Aliarina)</p>	
<p>3'-(γ-γ-dimetil)-5, 7-dihidroxi-3, 6, 4'-trimetoxi flavona. (Viscosol)</p>	
<p>5, 7-dihidroxi-3'-(3-hidroxi-metil-butil)-3, 6, 4', trimetoxi-- flavona.</p>	
<p>5-hidroxi, 3, 6, 7, 4' tetra-metoxi-flavona.</p>	

NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
<p>3'-(3-hidroxi-metil-butil)-3, 5, 6, 7, 4'-penta-metoxi-flavona.</p>	
<p>5, 4'-dihidroxi-3'-(3-hidroxi --metil-butil)-3, 6, 7-trimeto--xi-flavona.</p>	
<p>5, 7-dihidroxi-3, 6, 4'-trimeto--xi-flavona. (Santina)</p>	
<p>5, 4'-dihidroxi-3, 6, 7-trimeto--xi-flavona. (Penduletina)</p>	

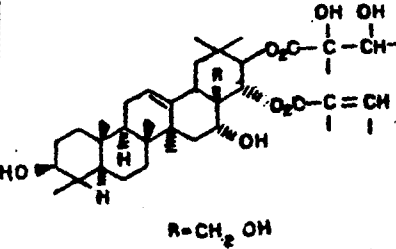
NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
5, 7, 4'-trihidroxi-3, 6-dimetoxi-flavona.	
5, 7-dihidroxi-flavanona. (Pinocembrina)	
5-hidroxi-3, 7-dimetoxi-flavona.	
5-hidroxi-3, 7, 4'-trimetoxi-flavona	

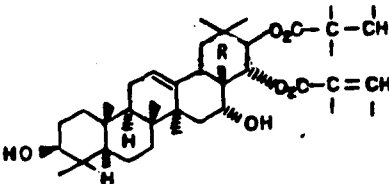
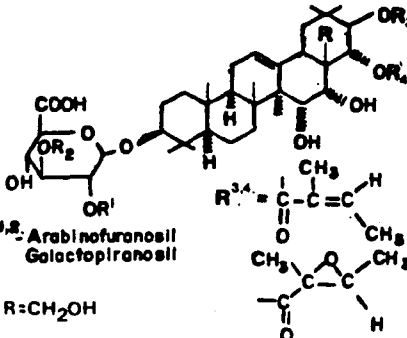
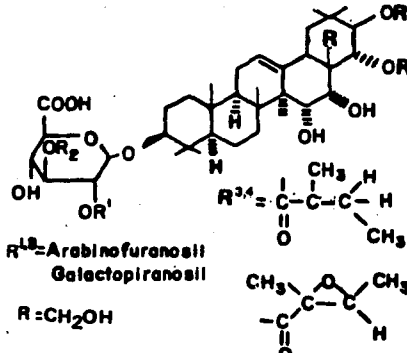
NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
3-O-Rutinosil Isoramnetina	
3-O-β-D-Galactosil Quercetina	
3-O-Rutinosil Quercetina	

D I T E R P E N O S

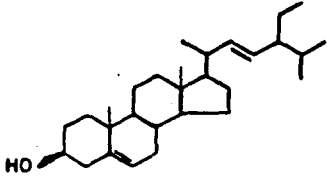
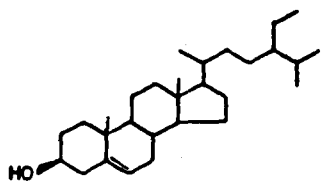
NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
Acido Hautriwaico	
Acido <u>ent</u> -15,16 epoxiciclerodan-3, 13-(18)-14 trien-6-ol.	

T R I T E R P E N O S

NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
21-(2, 3-dihidroxi-2-metil -- butirolilo)-22-angeolato de -- jegosapogenilo	 <p style="text-align: center;">R = CH₂ OH</p>

NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
21, 22-diangelato de ba--- rigenilo.	 <p style="text-align: center;">$R = \text{CH}_2\text{OH}$</p>
Dodonosido A	 <p style="text-align: center;">$R = \text{CH}_2\text{OH}$</p> <p style="text-align: center;">$R^{3,4} =$</p> <p style="text-align: center;">Arabinofuranosil Galactopiranosil</p>
Dodonosido B	 <p style="text-align: center;">$R = \text{CH}_2\text{OH}$</p> <p style="text-align: center;">$R^{3,4} =$</p> <p style="text-align: center;">Arabinofuranosil Galactopiranosil</p>

E S T E R O L E S

NOMBRE DEL CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA
β -sitosterol	 <p>The chemical structure of β-sitosterol is a steroid with a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17 consisting of an ethenyl group and a branched alkyl group.</p>
Estigmasterol	 <p>The chemical structure of Estigmasterol is a steroid with a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17 consisting of a propyl group and a branched alkyl group.</p>

2.2 Esteres derivados de ácidos cinámicos

Debido a que el producto aislado en la presente investigación es un éster del ácido cinámico es conveniente describir brevemente las generalidades acerca de este tipo de compuestos.

Los ésteres del ácido cinámico comprenden un grupo no muy numeroso de productos naturales. Algunos, como el ácido clorogénico se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en tanto que otros, como el para-cumaril-L-myo-inositol presentan una distribución más restringida (9, 17).

Biogenéticamente, el esqueleto carbonado característico del ácido cinámico, se origina por la ruta del ácido siquímico a partir de los aminoácidos L-fenilalanina o tirosina. En la Figura 1 se ilustra la secuencia de reacciones correspondientes a la formación del ácido cinámico y para-hidroxicinámico a partir del ácido siquímico (15, 17).

La porción ácida del éster puede corresponder a cualquiera de los ácidos cinámicos conocidos (ác. para-cumárico, ác. ferúlico, ác. cafeico, etc.), en tanto que la porción alcohólica puede incluir azúcares, alcoholes alifáticos o aromáticos, hidroxiaácidos (de cadena abierta o cíclica) y con menos frecuencia ciclotoles. En la Figura 2 se indican algunos ejemplos de estos derivados en los que se puede apreciar la diversidad de la porción alcohólica (9, 17).

De acuerdo a evidencias experimentales, la biosíntesis de estos ésteres se realiza en dos etapas; la primera comprende la activación del ácido cinámico correspondiente por reacción con la coenzima A (CoA), para originar un cinamil CoA. En la segunda etapa reaccionan el derivado activado y el alcohol correspondiente (9, 15).

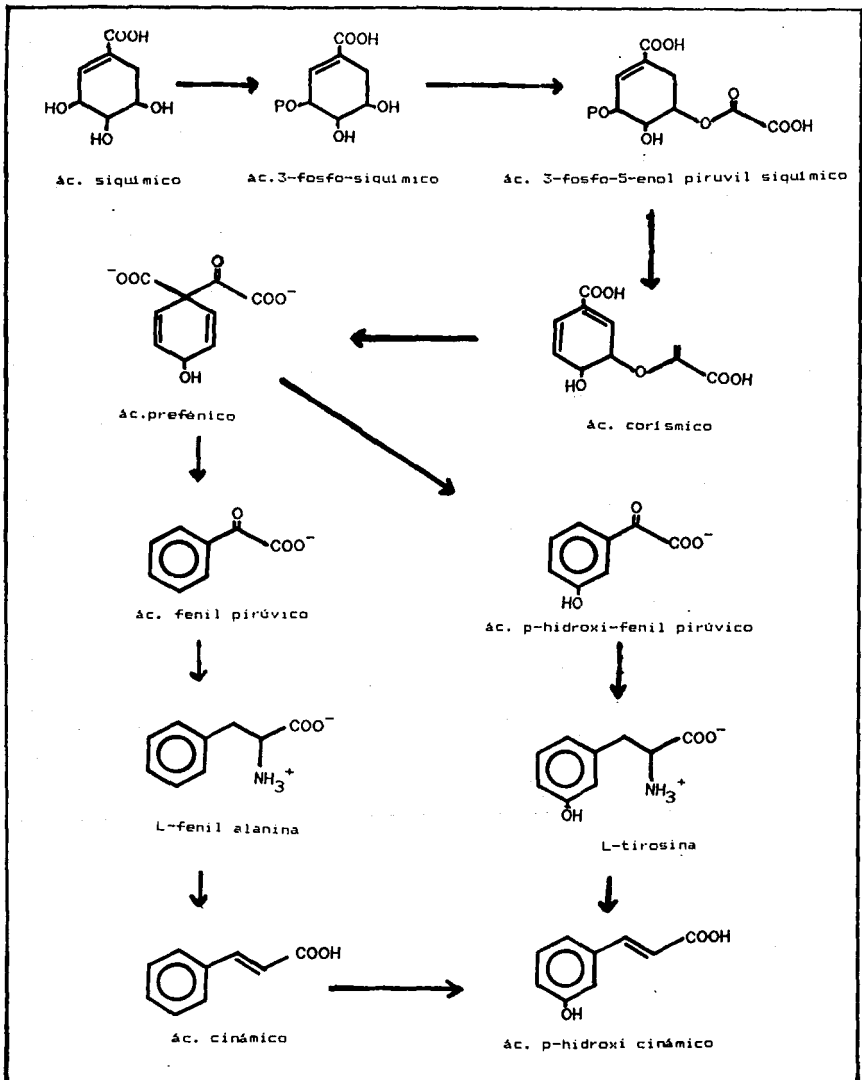
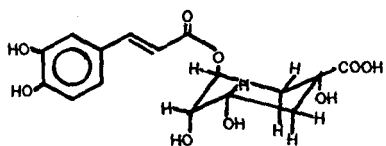
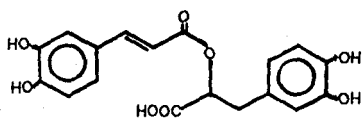


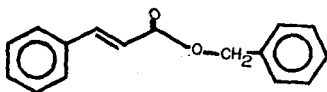
Figura 1. Biosíntesis del ácido cinámico y para-hidroxicinámico a partir del Ácido siquímico



Acido Clorogénico



Acido Rosmarínico



Cinamato de bencilo

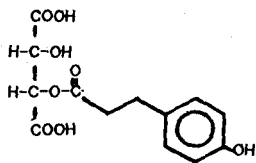
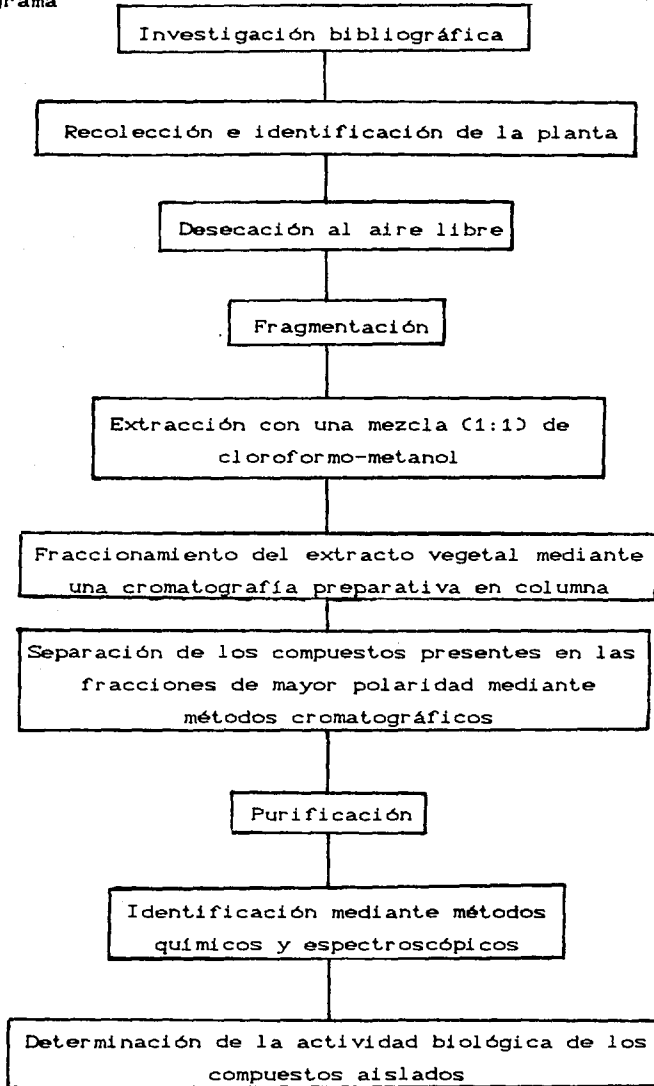
Acido-para-cumaril-m-tartárico

Figura 2. Ejemplos de ésteres de ácidos cinámicos

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama



3.2 Materiales, Reactivos y Aparatos

3.2.1 Material vegetal

La *Dodonaea viscosa* (planta entera) fue recolectada en Oaxaca, en el kilómetro 16.7 de la carretera a Jayacatlán, en Marzo de 1989. Fue identificada por el Biólogo Alejandro Cisneros. Una muestra de herbario correspondiente se encuentra depositada en la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma Benito Juárez, Oaxaca. (Voucher: Cisneros 368).

3.2.2 Material de laboratorio

- * Agitador magnético
- * Columnas de vidrio
- * Cromatoplacas (recubiertas con sílica gel 60 GF, 254 Merck)
- * Embudos de separación (Pyrex)
- * Espátulas
- * Matraces Erlen-Meyer de 5, 25, 50, 250 y 500 ml
- * Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- * Pipetas Pasteur
- * Probetas graduadas de 10, 100, 500 y 1000 ml
- * Refrigerantes
- * Tubos de ensaye
- * Viales de vidrio de 10 ml

3.2.3 Reactivos y Sustancias

- * Todos son de pureza Grado Reactivo
- Acetato de etilo (Merck)
- Acetona (Merck)
- Acido clorhídrico (0.1N) (Técnica Química. S. A.)
- Acido sulfúrico (J. T. Baker)
- Agua destilada (UNAM)
- Alfa-naftol (Merck)
- Anhídrido acético (Productos Químicos Monterrey)
- Bicarbonato de sodio (J. T. Baker)

- Cloroformo (Merck)
- Cloruro férrico (J. T. Baker)
- Etanol (Merck)
- Hexano (Merck)
- Hidróxido de amonio (Merck)
- Medio salino (Instan Ocean)
- Metanol (Merck)
- Piridina (Productos Químicos Monterrey)
- Sílica gel (G, 60 Merck, 70-230 mallas)
- Sulfato cérico (Merck)
- Sulfato de sodio anhidro (Técnica Química S. A.)

3.2.4 Aparatos

- . Aparato de punto de fusión Fisher Johns
- . Aspersor
- . Balanza analítica y granataria (Sarnatorius 1202 MP)
- . Bomba de vacío
- . Espectrofotómetro de rejilla para IR (Perkin-Elmer 599 B)
- . Espectrofotómetro para Espectroscopia de Masas (Hitachi-Perkin-Elmer RMV-GD; Instituto de Química UNAM)
- . Espectrofotómetro para RMN (Varian 390) ó (Varian VXR-303s Instituto de Química; UNAM)
- . Lámpara de luz ultravioleta de onda corta y onda larga
- . Molino de cuchillos T. Willey. No. 4 (Tamiz No.3)
- . Parrilla
- . Rotaevaporadores (Büchi RE 111)

3.3 Metodología

Debido a que el presente trabajo condujo al aislamiento de un nuevo producto natural se optó por describir en ésta sección únicamente el procedimiento general del desarrollo de la metodología empleada sin ultimar detalles sobre técnicas.

La descripción de la metodología experimental, así como, la secuencia de pasos seguidos para el aislamiento del nuevo compuesto se encuentran descritas en el Apéndice.

La *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, analizada fue proporcionada por el Biólogo Alejandro Cisneros de la Universidad Autónoma Benito Juárez, Oaxaca.

La planta fue secada y pulverizada (Apéndice 8.1), posteriormente se realizó la extracción y fraccionamiento preliminar, para lo cual se maceraron 1.860 Kg del material vegetal cuatro veces por periodos de dos días cada ocasión, utilizando siete litros de una mezcla de cloroformo-metanol (1:1); después de concentrar in vacuo se obtuvieron 164 g de extracto cloroformo-metanólico (Apéndice 8.2.1).

El extracto cloroformo-metanólico resultante se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna de vidrio, utilizando 1.64 Kg de gel de sílice. Mediante este proceso se obtuvieron un total de 277 fracciones de un litro cada una. La elución se comenzó con hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-acetona y acetona-metanol. (Apéndice 8.2.2). En el Cuadro 2 se resume el fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico, sistemas eluyentes, número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo la metodología convencional (5, 32) (Apéndice 8.3).

De la fracción 191 de la columna original (Cuadro 2), precipitaron 188.89 mg de un sólido café, el cual se sometió a un análisis cromatográfico en capa fina, observándose que el sólido estaba impuro, por lo que, se procedió a su purificación vía cromatografía preparativa en capa delgada (Apéndice 8.5), utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol (90:10), y un total de cinco placas cromatográficas (20 X 20 cm).

Una vez purificado el compuesto, el cual se presentó como un sólido amarillo, se procedió a caracterizarlo (Apéndice 8.6). Las pruebas efectuadas para su caracterización fueron: punto de fusión, rotación óptica, espectroscopia (IR, UV, RMN, Masas), prueba para fenoles, prueba de Molish para carbohidratos, acetilación e hidrólisis básica (Apéndice 8.6).

Finalmente se procedió a realizar el ensayo biológico del compuesto ya identificado por medio de la determinación de la toxicidad in vitro contra *Artemia salina* Leach. La selección del ensayo se hizo con base a su fácil implementación, disponibilidad y considerando que el mismo es un indicador preliminar de actividades biológicas más complejas (18) (Apéndice 8.7).

CUADRO 2. RESUMEN DEL FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR VIA
CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE LA

Dodonaea viscosa.

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano	100	1-14	1-5,6-10, 11-14
Hexano-Cloroforno	80:20	15-24	15-20, 21-25
Hexano-Cloroforno	70:30	25-29	26-29
Hexano-Cloroforno	60:40	30-48	30-36, 37-44
Hexano-Cloroforno	55:45	49-55	45-52, 53-67
Hexano-Cloroforno	50:50	56-74	68-70
Hexano-Cloroforno	40:60	75-116	71-91, 92-93, 94-97, 98-107, 108-123
Hexano-Cloroforno	20:80	117-125	124-125
Cloroforno	100	126-144	126-127, 128- 132, 133-142, 143-144
Cloroforno-Acetona	90:10	145-151	145, 146-152
Cloroforno-Acetona	80:20	152-171	153-159, 160-- 169, 170-176
Cloroforno-Acetona	70:30	172-181	177-182
Cloroforno-Acetona	60:40	182-187	184-186, 187- 188
Cloroforno-Acetona	50:50	188-200	189-190, 191-199
Cloroforno-Acetona	30:70	201-212	200-203, 204- 208, 209-211
Acetona	100	213-222	213-215, 216, 217-219, 220- 223
Acetona-Metanol	50:50	223-227	

3.4 Resultados

El estudio fitoquímico convencional de las fracciones de mayor polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, permitió el aislamiento de un nuevo producto natural.

Después de la purificación del sólido precipitado de la fracción 191 (Cuadro 2), vía una cromatografía preparativa en capa fina, se obtuvieron 36 mg de un sólido amarillo, soluble en metanol. Su rendimiento en base a la planta seca fue de 2.29 %.

En la Tabla 1 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas.

El producto natural fue sometido a varias reacciones químicas durante su proceso de caracterización y los resultados fueron los siguientes:

*El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina originó el derivado penta-acetilado correspondiente.

*La saponificación con hidróxido de amonio al 33% del compuesto químico natural generó el ácido para-cumárico.

En las Tablas 2 y 3 respectivamente se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de ambos derivados.

*La prueba de Molish para carbohidratos resultó negativa.

*La reacción para la identificación de fenoles fue positiva.

Al compuesto aislado se le determinó su toxicidad contra *Artemia salina* Leach y los resultados se presentan en el Cuadro 3

TABLA I. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL
1-para-cumaril, 5-O-metil, 6-acetil-L-myo-Inositol

F. M. : $C_{19}H_{22}O_6$

P. M. : 382 g/mol

P. F. : 173-176°C

Análisis Elemental : C: 56.5% ; H: 5.7% ; O: 39.6% .

U. V. $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 314.5

ESPECTRO 1

α_{25}^D : + 32.2 (MeOH)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3350-3100, 2925, 1730, 1710, 1610, 1440,
1380-1350, 1260, 1200, 1100, 1030,
1070, 990, 960, 870, 640

ESPECTRO 2

RMN¹H CCl₄-DMSO, δ): 2.10Cs, 3H: Me), 2.92(Csa, 3H: -OH),
3.25(Cdd, J=10, 4Hz, 1H: Hf), 3.44(Cdd,
J=10, 10 Hz, 1H: Hg), 3.75(Cdd, J=10,
10Hz, 1H: Hd), 3.92(Cdd, J=10, 10Hz, 1H:
He), 4.73(Csa, 1H: OH), 4.90(Cdd, J=10,

4Hz, 1H: H α), 5.75(cdd, J=4, 4Hz, 1H: H α),
6.22(c, J=15 Hz, 1H: H: H α), 6.82(c, J=8
Hz, 2H: H-2 y H-6), 7.38(c, J=8 Hz, 2H:
H-3 y H-5), 7.61(c, J=15 Hz, 1H: H β).

ESPECTRO 3

RMN¹³C DMSO-d₆, δ): 20.32(c, H₃C-C(=O)), 57.32(c, OCH₃),
66.65(c, C α), 70.32(c, C β), 71.11(c,
C δ), 71.52(c, C δ), 71.52(c, C ϵ),
74.56(c, C α), 79.12(c, C α), 113.2(c,
C- ω), 115.62(c, C-2 y C-6), 125.09(s,
C-1), 129.59(c, C-3 y C-5), 145.35(c,
C- β), 159.56(s, C-4), 166.37(s,
COOAr), 169.52(s, H₃C-C(=O))

ESPECTRO 6

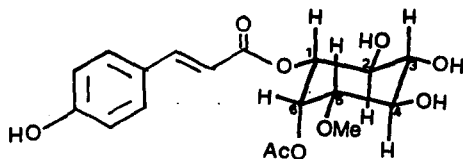


TABLA 2. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL
 Penta-acetil, 1-para-cumaril, 5-O-metil, -L-myo-Inositol

F. M. : $C_{26} H_{30} O_{13}$

P. M. : 550 g/mol

P. F. : 60-62°C

I. R. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$: 2950, 1760, 1640, 1510, 1420, 1370, 1320,
 1240-1200, 1980, 1060, 950, 840, 760.

ESPECTRO 7

RMN¹H C₂DC₂Cl₂ -DMSO, δ): 1.98(s, 3H: $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$), 1.99(s, 3H:
 $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$), 2.03(s, 3H: $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$), 2.18
 (s, 3H: $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$), 2.30(s, 3H:
 $\text{H}_3\text{C}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}$), 3.48(cdd, J=10, 4 Hz, 1H:
 H_F), 5.13(cdd, J= 10, 4 Hz, 1H:
 H_G), 5.20(cdd, J=10, 10 Hz, 1H:
 H_E), 5.39(cdd, J=10, 10 Hz, 1H:
 H_D), 5.60(cdd, J=10, 4 Hz, 1H: H_C),

5.80Cdd, $J=4$, 4 Hz, 1H: HA),
 6.22Cd, $J=15$ Hz, 1H: H α), 7.15Cd,
 $J=8$ Hz, 2H: H-2 y H-6), 7.55Cd,
 $J=8$ Hz, 2H: H-3 y H-5), 7.65Cd,
 $J=15$ Hz, 1H: H β).

ESPECTRO 8

RMN¹³C CDCl₃-DMSO-d₆, δ): 169.52Cs, (-C-CH₃), 165.59Cs,
 COOAr), 157.48Cs, C-4),
 145.58Cd, C- β), 129.11Cd,
 C-3 y C-5), 129.22Cd, C-2 y
 C-6), 116.48Cd, C- α), 77.45Cd,
 CA), 77.30Cd, CB), 77.23Cd,
 CC), 71.11Cd, CD), 69.36Cd,
 CE), 66.21Cd, CF), 58.29Cs,
 O-C-H₃), 20.82Cc, H₃C-C-
 O

ESPECTRO 12

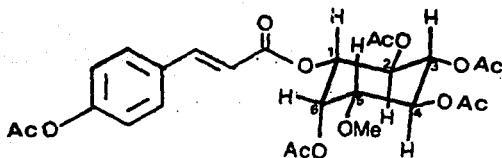


TABLA 3. CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL
ácido para-cumárico

F. M. : $C_9H_8O_3$

P. M. : 164 g/mol

P. F. : 206-208°C

U. V. λ ^{MeOH}_{max} mn : 220; 314

ESPECTRO 14

I. R. ν ^{KBr}_{max} cm^{-1} : 3359, 3141, 2767, 1916, 1746, 1641,
1530, 1481, 1395, 1351, 1295, 1270,
1186, 1124, 996, 960, 850, 808, 708,
673, 537, 469.

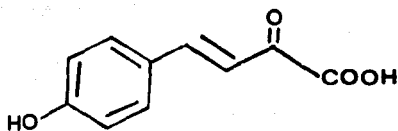
ESPECTRO 13

RMN¹HCCDCI₂ -DMSO, δ : 6.05(d, J=15 Hz, 1H: Ha), 6.62(d,
J=8 Hz, 2H: H-2 y H-6), 7.22(d, J=
8 Hz, 2H: H-3 y H-5), 7.55(d, J=15
Hz, 1H: H β), 8.1(csa, 2H: -OH).

ESPECTRO 15

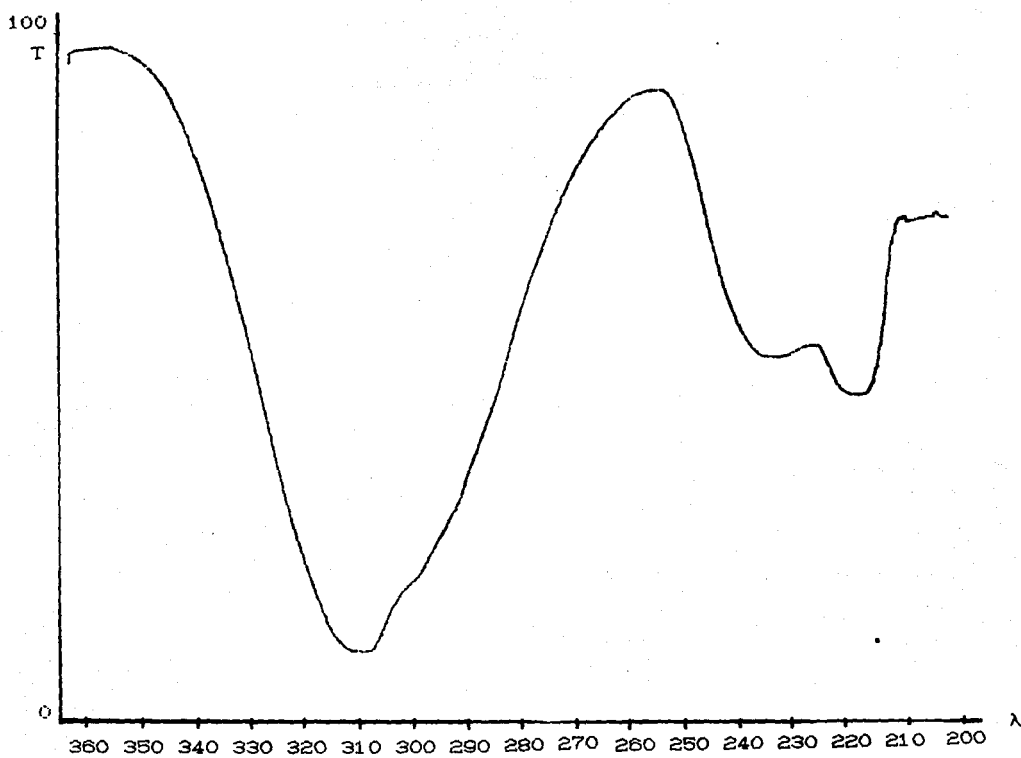
E. M. I. E., $m/z(\%)$: 164 M^+ 100), 163 M -17, 36),
147 M -45+H, 50), 119(42),
118(30), 107(22), 91(53), 89(24),
77(13), 65(52), 63(38).

ESPECTRO 16



CUADRO 3. RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD
IN VITRO CONTRA *Artemia salina* Leach DEL PRODUCTO NATURAL

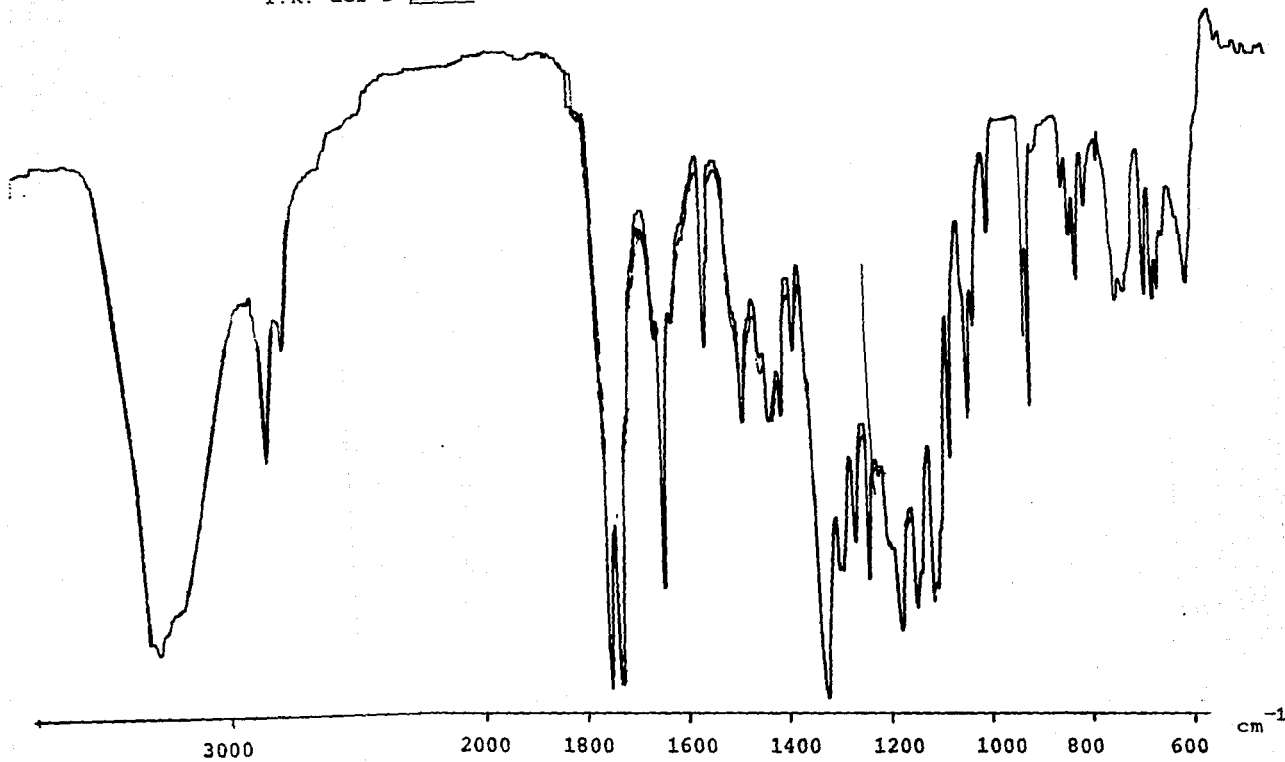
CONCENTRACION C ppm	PORCIENTO DE MORTALIDAD
10	0
100	0
1000	100



U.V. del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil, L-myo-Inositol

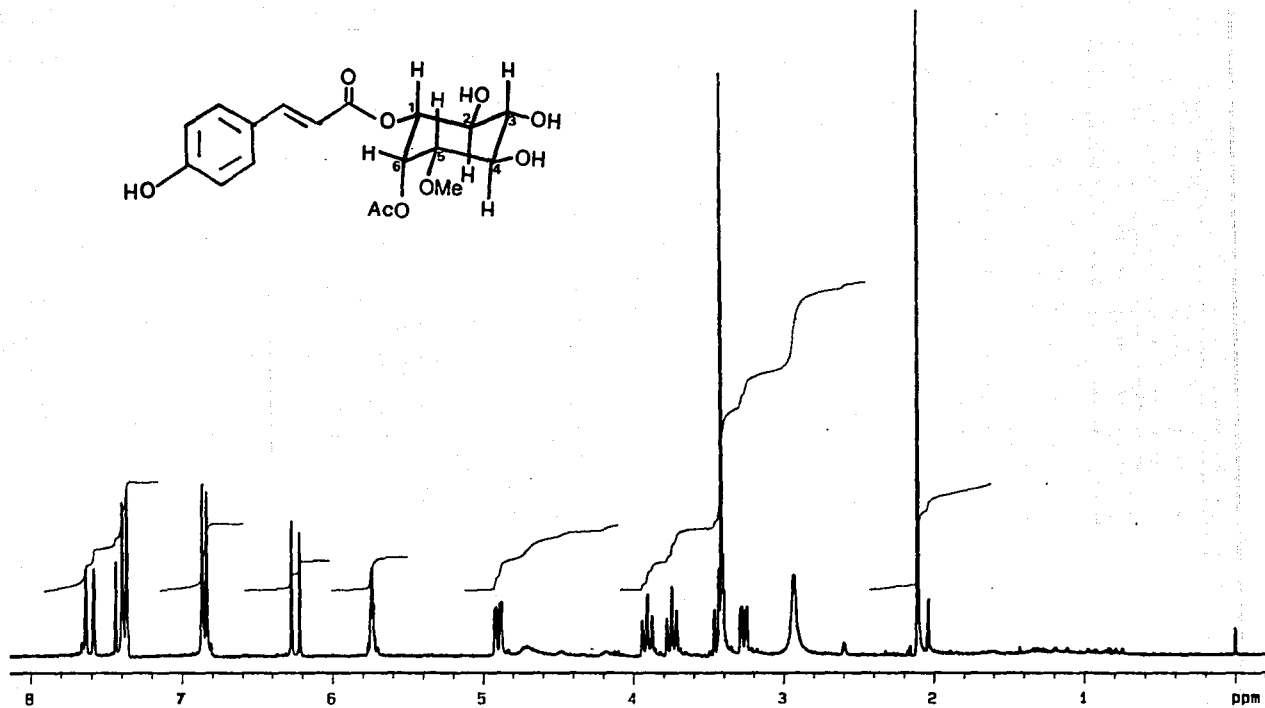
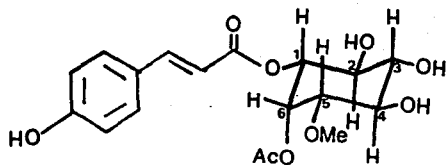
ESPECTRO 1

I.R. del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil. L-myo-Inositol

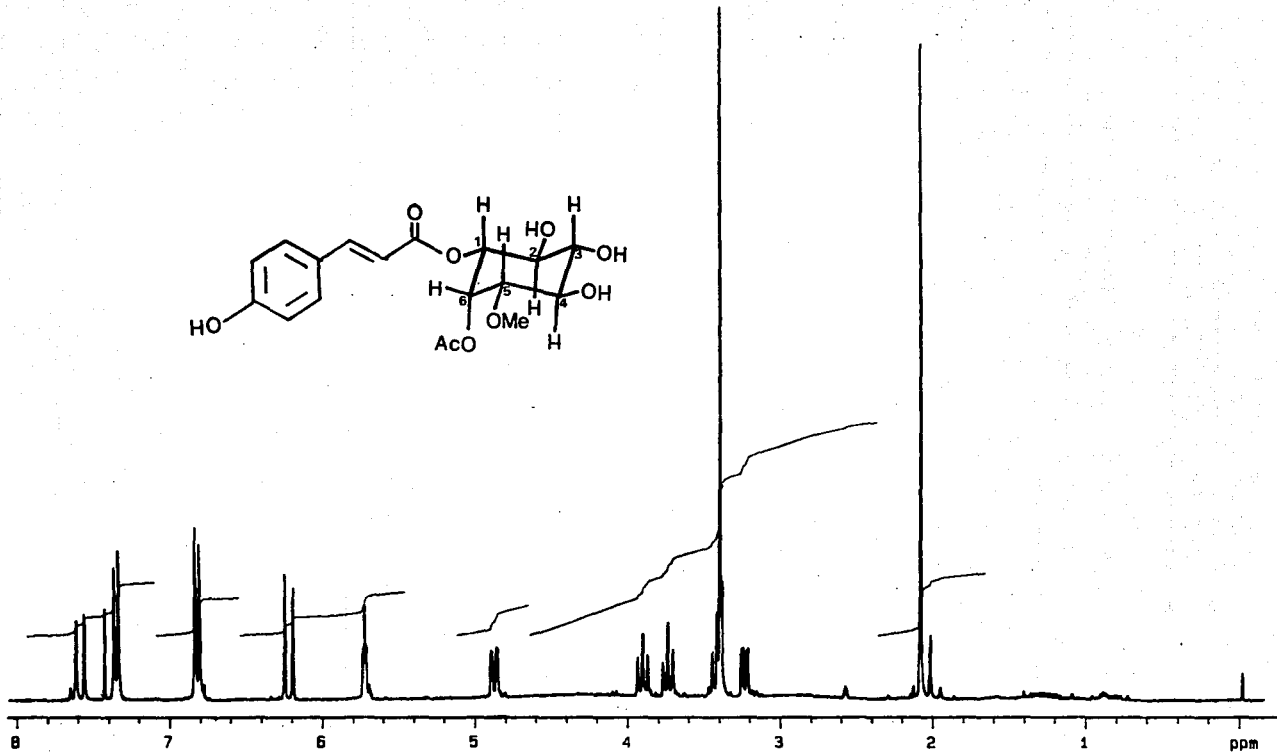
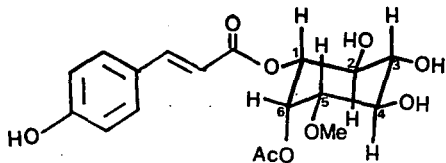


ESPECTRO 2

RMN'H del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil, L-myo-Inositol



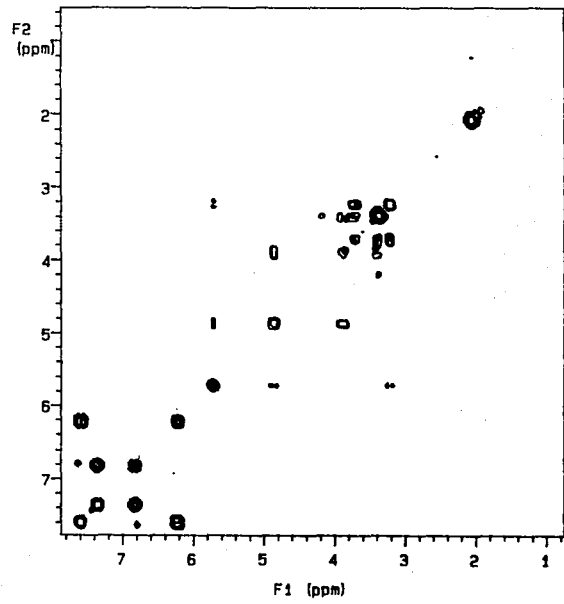
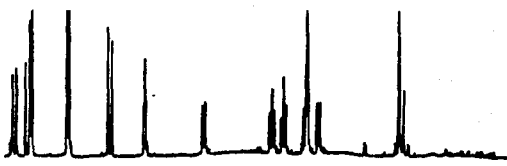
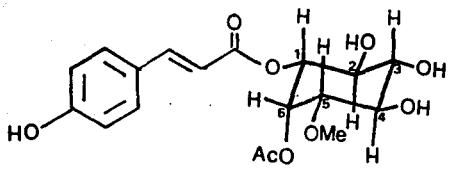
ESPECTRO 3



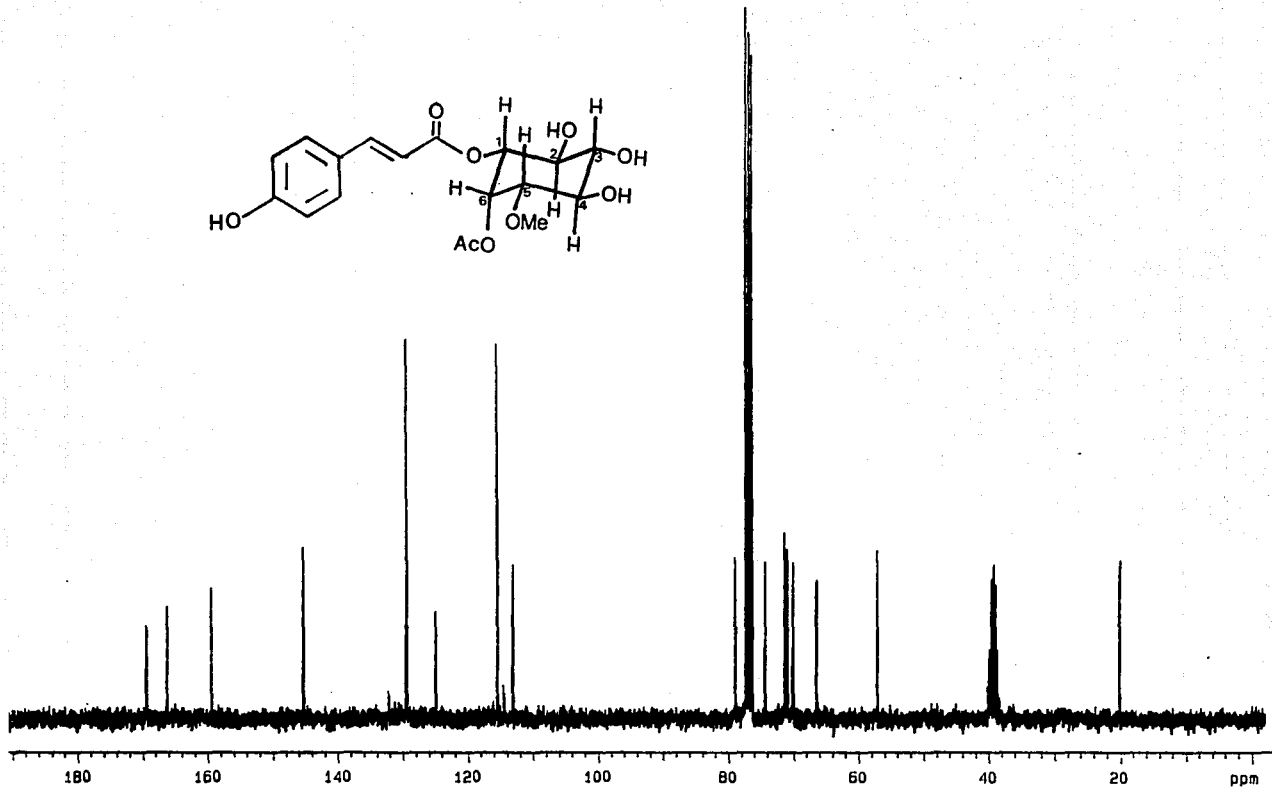
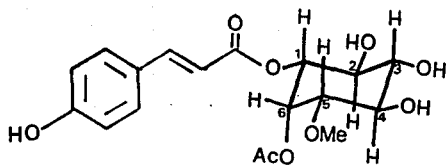
ESPECTRO 4

RMN¹H CD₂O del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil,
L-myo-Inositol

RMN¹H (Cosp) del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil,
L-myo-Inositol

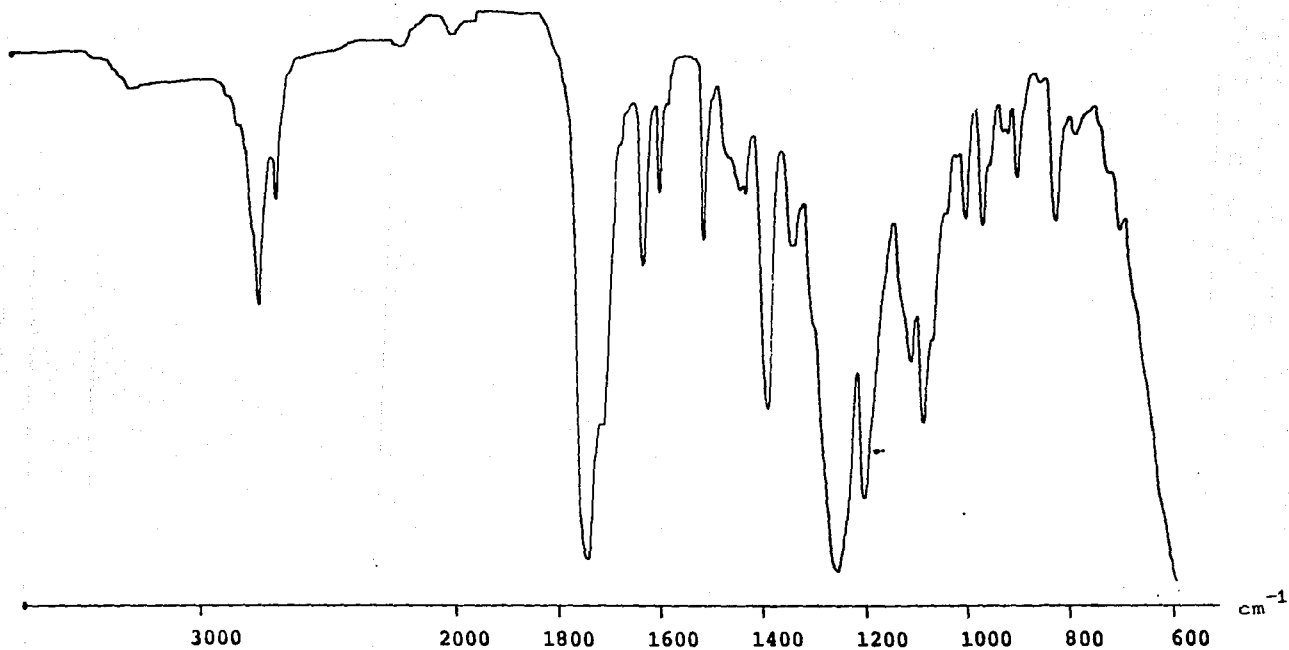


ESPECTRO 5



ESPECTRO 6

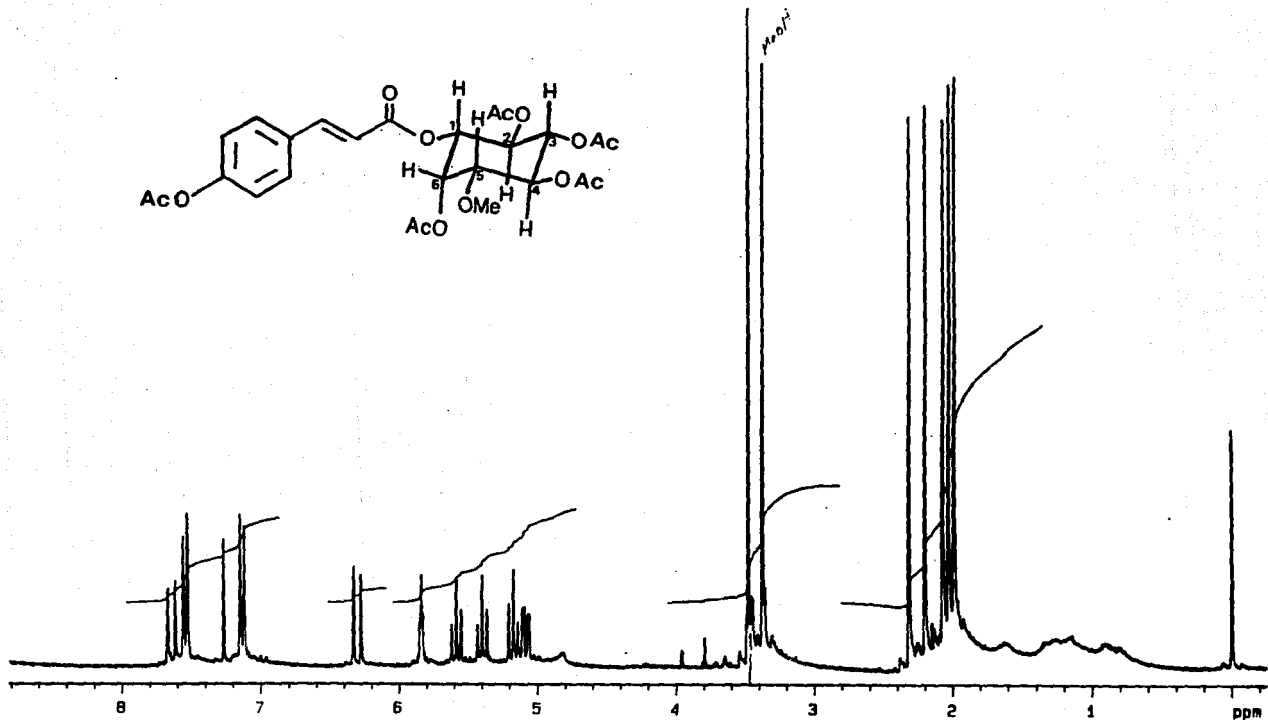
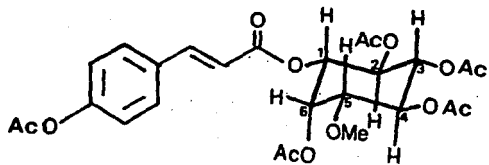
RMN ^{13}C del 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, 6-Acetil, L-myo-Inositol



ESPECTRO 7

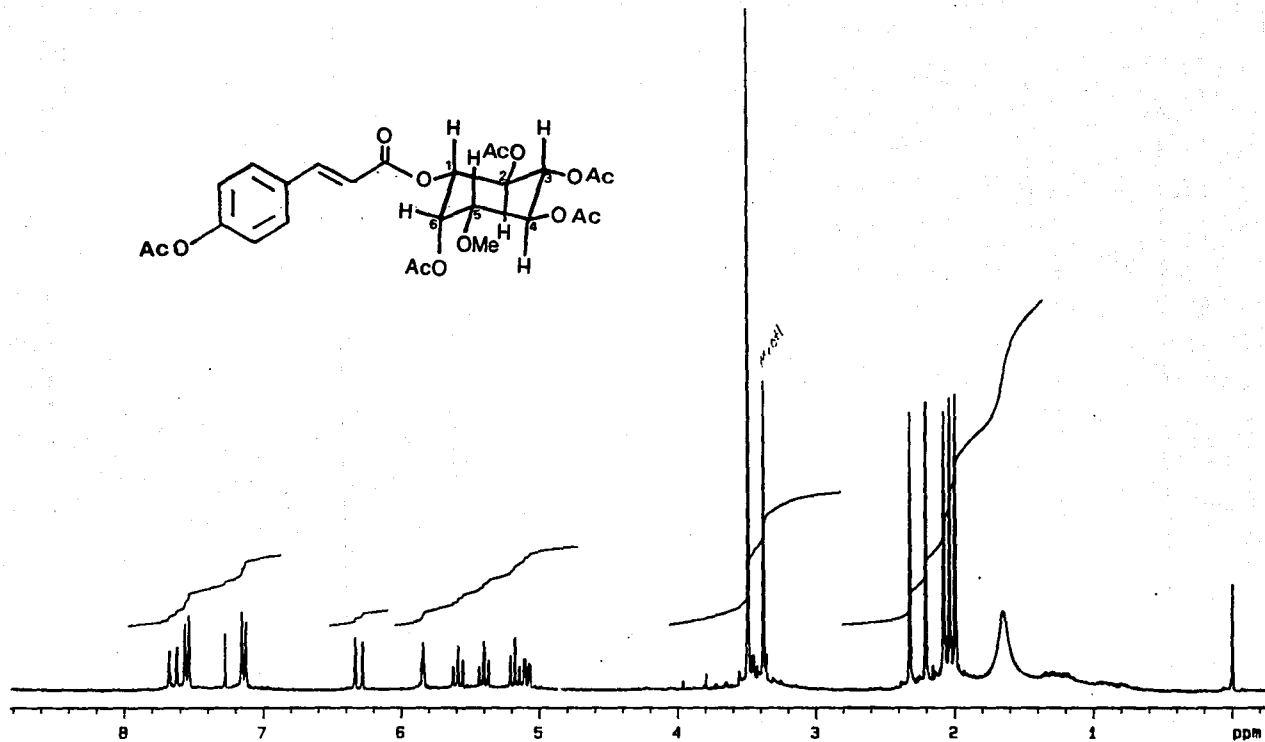
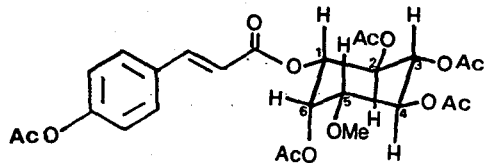
I.R. del Penta-acetil, 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, L-myo-Inositol

RMN'H del Penta-acetil, 1-para-Cumaril, 5-O-Metil, L-myo-Inositol



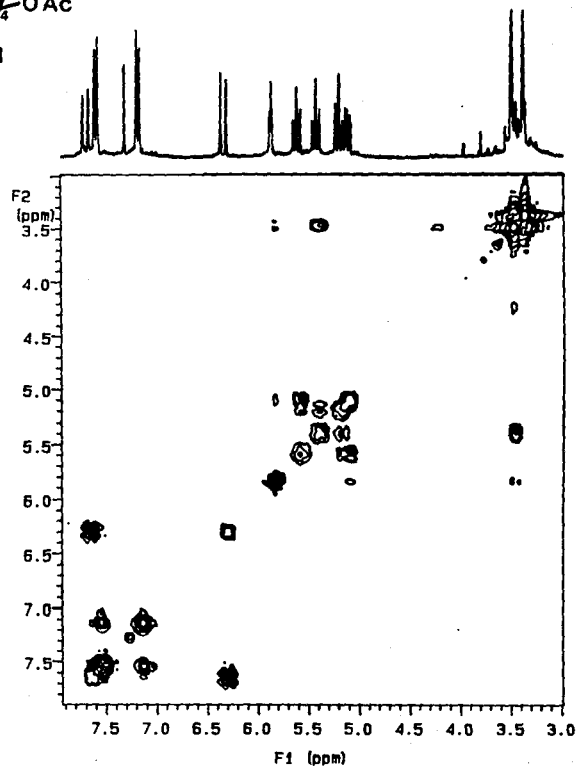
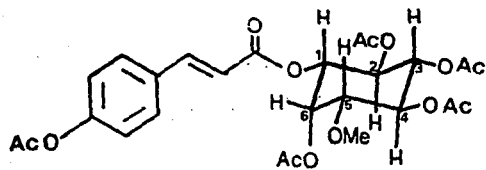
ESPECTRO 8

RMN¹H CD₂O del Penta-acetil, 1-para-Cumaril, 5-O-Metil,
L-myo-Inositol



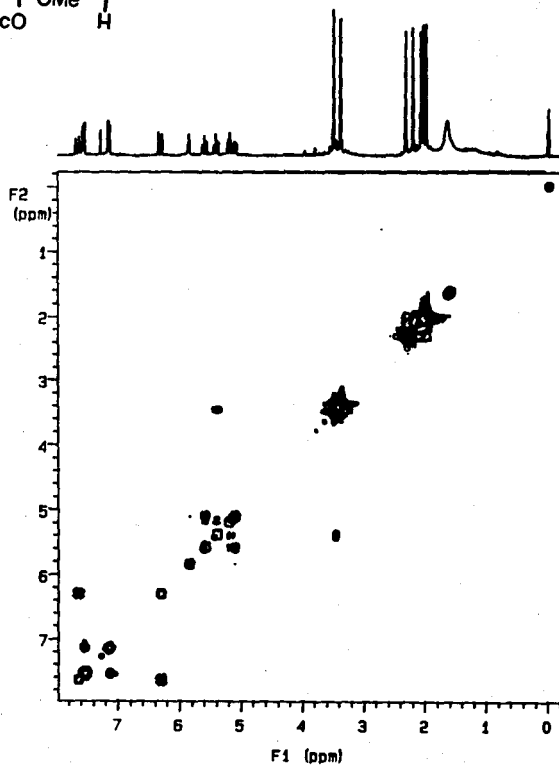
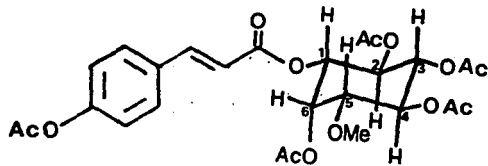
ESPECTRO 9

RMN¹H (Cosy-amplificado) del Penta-acetil, 1-para-Cumaril,
5-O-Metil, L-myo-Inositol



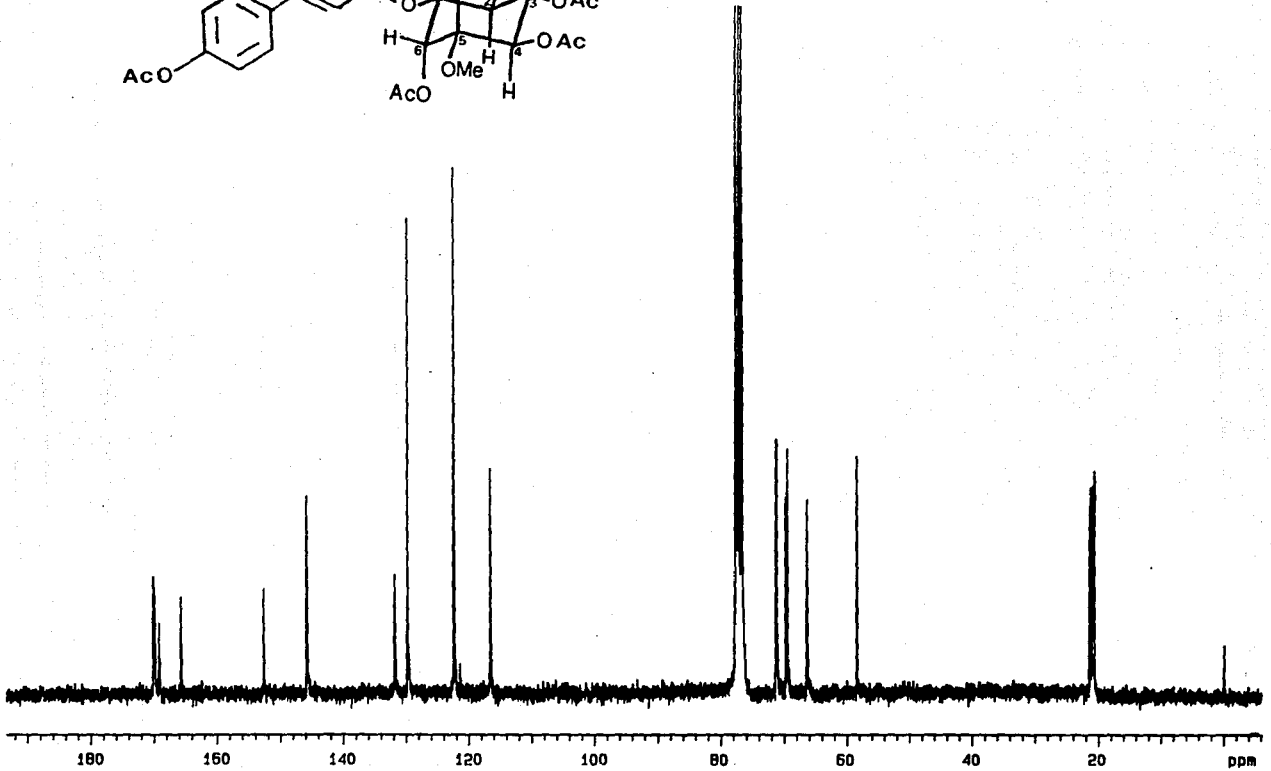
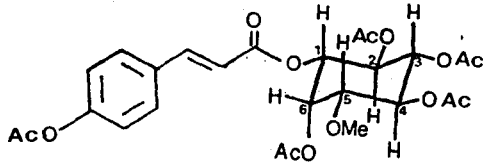
ESPECTRO 10

RMN¹H (Cosy) del Penta-acetil, 1-para-Cumaril, 5-O-Metil,
L-myo-Inositol

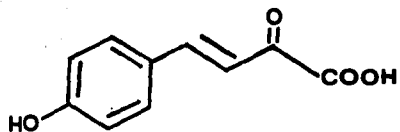


ESPECTRO 11

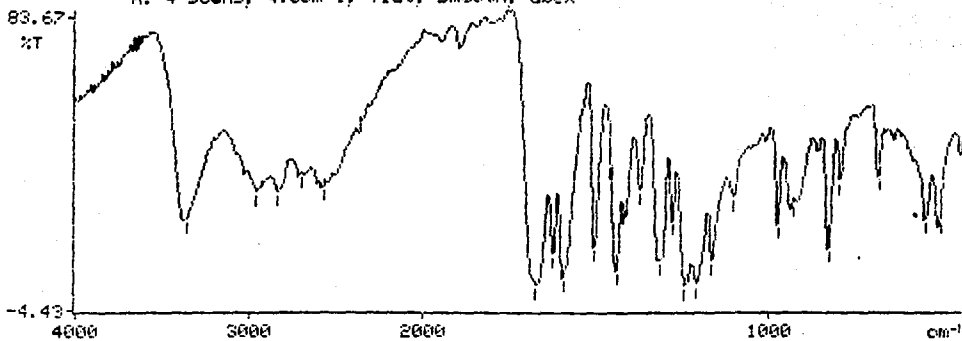
RMN¹³ del Penta-acetil, 1-para-Cumaril, 5-O-Metil,
L-myo-Inositol



ESPECTRO 12

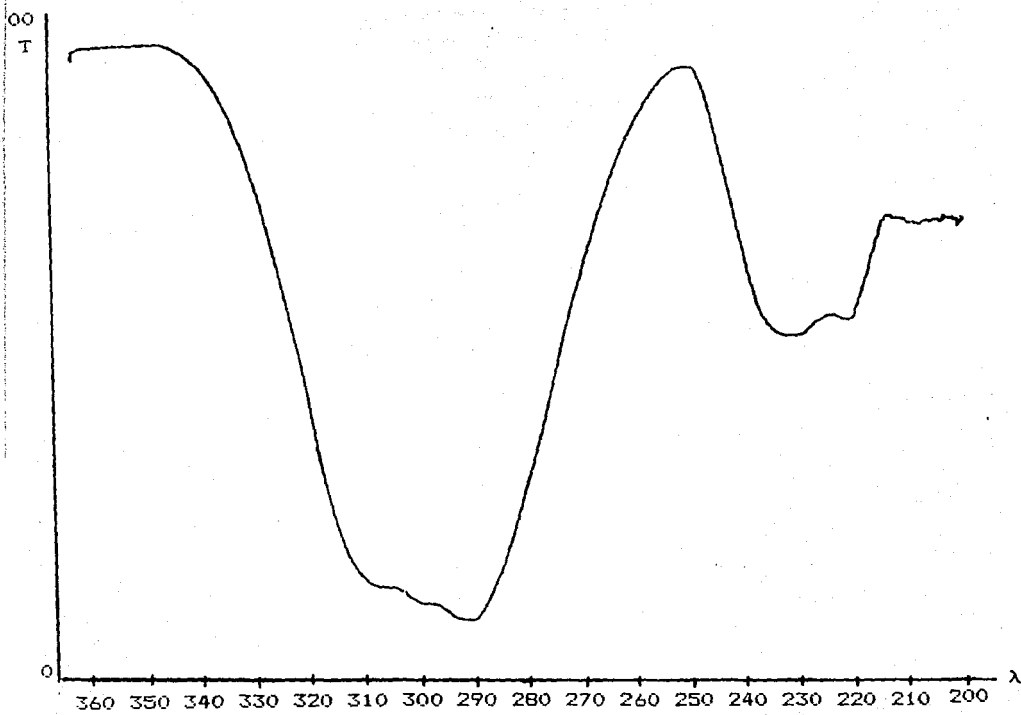


X: 4 scans, 4.0cm⁻¹, flat, smooth, abex



ESPECTRO 13

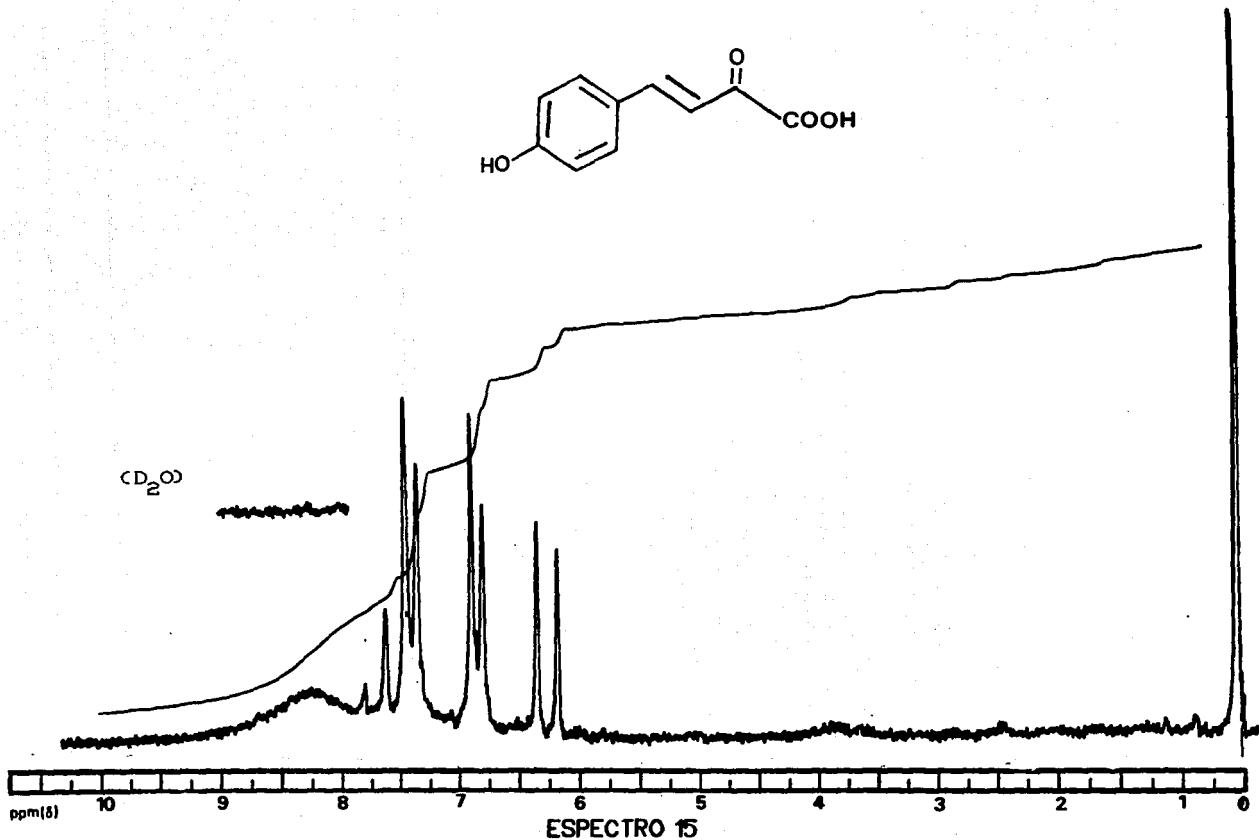
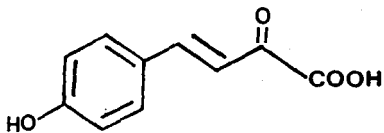
I.R. del Acido para-Cumarico

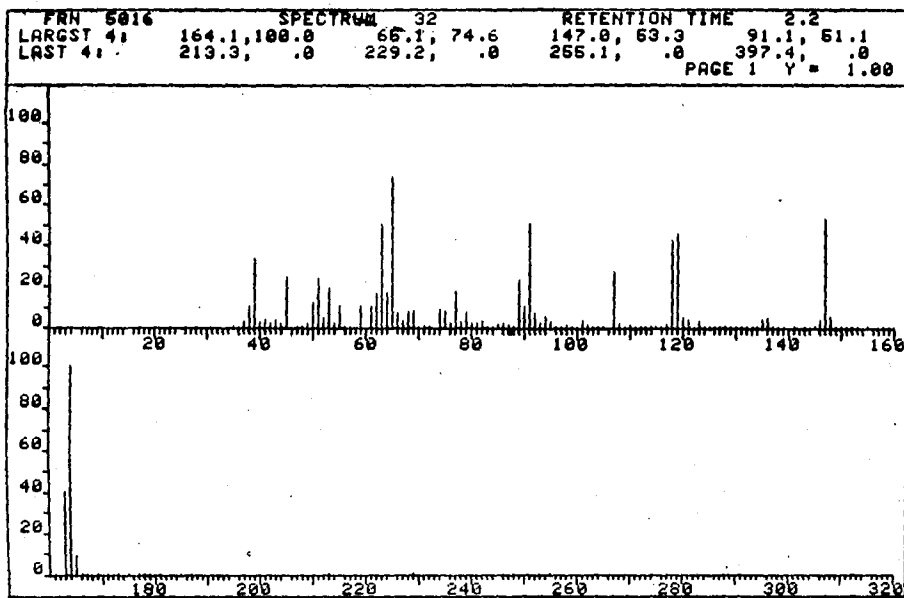


U.V. del Acido para-Cumárico

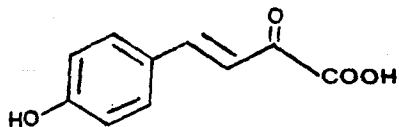
ESPECTRO 14

RMN¹H del Acido para-Cumárico





ESPECTRO 16

E. de Masas del Acido para-Cumárico

CAPITULO IV

DISCUSION

Sucesivas cromatografías en columna y capa delgada de las fracciones de mayor polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, permitieron el aislamiento de un nuevo producto natural, el que fue caracterizado como el 1-para-cumaril, 5-O-metil, 6-acetil L-myo-Inositol. El análisis de las evidencias químicas y espectroscópicas que condujeron a la determinación estructural del compuesto será objeto principal de la siguiente discusión.

El producto natural se aisló como un sólido cristalino de punto de fusión de 173-176°C; la fórmula molecular se estableció como: $C_{18}H_{22}O_9$, por análisis elemental, y permite un índice de insaturación de ocho. Su alta solubilidad en disolventes polares, así como, la coloración azul-violeta observada en el ensayo con solución reactivo de $FeCl_3$, sugirieron respectivamente su naturaleza polihidroxilada y fenólica. Así mismo la respuesta negativa a la prueba de Molish descartó a priori su carácter glicosídico.

La acetilación del compuesto con Ac_2O /piridina generó el derivado penta-acetilado, confirmando químicamente la presencia de varias funciones oxhidrilo en la molécula.

El espectro IR de la sustancia (Espectro 2), mostró absorciones asociadas con la presencia de los grupos hidroxilo (3350, 3100 cm^{-1}), carbonilo de éster (1710 cm^{-1} y 1730 cm^{-1}) y aromaticidad (1600, 1500 y 1450 cm^{-1}). Es de hacer notar

que las bandas para hidroxilo desaparecieron en el espectro del derivado acetilado (Espectro 7), el cual mostró además una absorción intensa para acetato aromático a 1760 cm^{-1} . El espectro UV (Espectro 1) era indicativo de la naturaleza aromática del compuesto ya que se observaron máximos de absorción a 220 nm (ϵ 12, 590) y 314 (ϵ 25, 180).

Los espectros de RMN'H del compuesto y su derivado acetilado (Espectros 3, 4, 8, 9), presentan como características comunes:

A) Un sistema $A_2 B_2$ de un anillo aromático para-sustituido (4) [δ (7.38-d, 8, 2H: H-2 y H-6) y δ (6.82-d, 8, 2H: H-3 y H-5)] en el caso del producto natural y [δ (7.55-d, 8, 2H: H-2 y H-6) y δ (7.15-d, 8, 2H: H-3 y H-5)], en el caso del penta-acetato.

El desplazamiento paramagnético significativo ($\Delta = 0.33$) de la rama inferior del sistema $A_2 B_2$ del derivado acetilado y la señal en δ 2.30 atribuibles al metilo de un acetato aromático eran consistentes con la naturaleza monofenólica del producto natural.

B) Un sistema AB típico de una doble ligadura trans sustituida (27), en [δ 6.22 (d, 1H: H- α) y δ 7.61 (d, 1H: H- β)] para su derivado acetilado.

Además en el espectro de RMN'H del producto natural (Espectro 3), se observaron:

A) Señales para dos hidrógenos geminales de dos funciones ésteres en δ 5.78 y δ 4.90 . De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, los ésteres debían ser de diferente naturaleza. La presencia en δ 2.10 del singulete típico para un metilo de acetato, claramente indicó que uno de los ésteres era un acetato.

B) Resonancias atribuibles a cuatro hidrógenos de hidroxilo en δ 4.73 y δ 2.92. Estas señales desaparecieron al registrar el derivado penta-acetilado (Espectro 4 y 9).

C) Cuatro multipletes, que integraban cada uno para un protón, asignables a los protones geminales de funciones oxigenadas en δ 3.92 (dd, 10, 10, 1H); δ 3.75 (dd, 10, 10 1H); δ 3.44 (dd, 10, 10, 1H) y δ 3.25 (dd, 10, 10, 1H).

Las señales en δ (3.92, 3.75 y 3.44), se encontraban significativamente desplazadas a campos más bajos en el acetato (δ 5.61, 5.39 y 5.18 respectivamente), lo cual era consistente con la presencia de tres funciones carbinólicas secundarias. Es de hacer notar que el espectro del derivado acetilado, mostró a campos más altos además de las señales para los metilos del acetato aromático y del producto original, resonancias para tres metilos del acetato adicionales en δ 1.98, 1.99 y 2.03 (Espectro 8).

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto químico natural (Espectro 6), presentó señales para 16 átomos de carbono; como la fórmula molecular requiere 18 carbonos, era indudable la existencia en la molécula de dos pares de carbonos equivalentes, hecho que es muy frecuente en anillos aromáticos para-sustituídos.

El espectro confirmó la presencia de un acetato (δ 169.52 y δ 20.32) y de un metoxilo no aromático (δ 57.32). Además evidenció claramente la existencia de una unidad para-cumaril en la molécula. Las señales correspondientes al núcleo aromático de esta unidad aparecían en δ (159, s, C-4'), δ (129.39, d, C-2' y C-6'), δ (125.09, s, C-1') y δ (115.62, d, C-3' y C-5'). Por otra parte, los correspondientes a las de la cadena propanoide trans se observaron en δ (145.38, d, C- β), δ (113.21, d, C- α) y δ (166.37, s, $>\text{C}=\text{O}$).

Finalmente, este espectro evidenció seis funciones oxigenadas secundarias, dos de ellas, de acuerdo al desplazamiento químico, debían corresponder a los carbonos geminales de funciones ésteres [δ (79.12, d) y δ (74.56, d)], tres a los carbonos carbinólicos y la sexta al carbono de la función éter.

Por tratamiento del compuesto natural con NH_4OH al 33% fue posible obtener ácido para-cumárico, el cual fue identificado por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las previamente descritas en la literatura (Espectros 13, 14, 15) (14).

El Espectro de RMN'H (Espectro 15), del ácido para-cumárico difería del producto original en la ausencia de las señales por debajo de δ 5.75 y en la presencia de una banda ancha a δ 8.1, atribuible al hidroxilo de la función ácida. El espectro de masas (Espectro 16), presentó un patrón de fragmentación característico de este tipo de compuestos.

Para determinar la naturaleza del ciclitol, así como la disposición relativa de los residuos para-cumaril, acetyl y metil el análisis del espectro Cosy del compuesto químico natural y su derivado acetilado fue de gran utilidad (Espectros 5, 11).

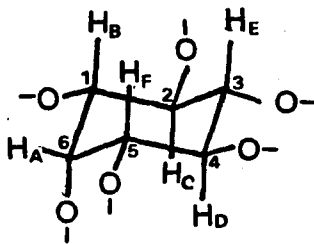
Los aspectos más importantes del análisis se resumen a continuación:

A) La señal en δ 5.75 (HA) en el producto natural correlacionaba por una parte con el doblete de dobletes ($J=10$, 4Hz), en δ 4.90 (HB) y por la otra con el doblete de dobletes ($J=10$, 4Hz) en δ 3.25 (HF).

B) (HB) además de interactuar con (HA) lo hacía también con el doblete de dobletes ($J=10$ Hz) en δ 3.92 (HC). De acuerdo a las magnitudes de las constantes de acoplamiento, la disposición relativa de (HB) y (HC) debían ser trans diaxial y entre (HB) y (HA) cis. (HC) correlacionaba adicionalmente con el doblete de dobletes ($J=10$ Hz) en δ 3.44 (HE), una vez más el valor de la constante de acoplamiento indicó una relación trans diaxial entre (HC) y (HE).

C) (H_E) se acoplaba también con la señal en δ 3.75 (H_D, dd, J=10 Hz) y ésta última con (H_F), que como se indicó en el inciso "A", también interaccionaba con (H_A). Como la disposición entre (H_F) y (H_D) debía ser trans de acuerdo al valor de J observado, la relación entre (H_F) y (H_A) debía ser cis.

Las interacciones descritas en los incisos "A" a "C" permitieron proponer la siguiente estructura parcial "A".



" A "

El arreglo de los hidrógenos y funciones oxigenadas de la estructura parcial " A " corresponden al mismo del myo-Inositol, más específicamente al del L-myo-Inositol en concordancia al valor de rotación óptica observada tanto para el producto natural ($\alpha^D = +32.2$), como para el producto de hidrólisis (4).

La ubicación del cumarilo y del acetato en las posiciones 1 y 6 del L-myo-Inositol respectivamente, se realizó considerando que el hidrógeno geminal de un éster de acetato absorbe a campos más bajos que el de un éster aromático o vinílico. La orientación α ecuatorial del cumarilo y α axial del acetato eran congruentes con las constantes de acoplamiento observadas para los correspondientes hidrógenos geminales.

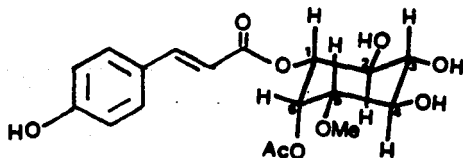
Finalmente, la disposición del metilo en 5 se realizó considerando que el protón (H_F) fue el único de los cuatro restantes hidrógenos geminales a las funciones oxigenadas (H_r, H_c, H_d y H_s), cuyo desplazamiento químico no se afectó considerablemente en el derivado acetilado. Además en el espectro Cosy del derivado acetilado (Espectro 11) claramente se puede apreciar que éste protón (δ 3.43), correlacionaba con el hidrógeno geminal del acetato (H_A) y con (H_d) que sí resultó desplazado paramagnéticamente en forma considerable.

CAPITULO V

R E S U M E N

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional, se realizó el estudio fitoquímico convencional de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq.

El estudio fitoquímico de las fracciones de mayor polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la *Dodonaea viscosa* permitió el aislamiento de un nuevo metabolito secundario, el que ha sido caracterizado con base a sus propiedades químicas y espectroscópicas como: 1-para-cumaril, 5-O-metil, 6-acetil-L-myo-Inositol, el cual representa un nuevo producto natural. Dicho compuesto presentó un porcentaje de letalidad de 100, para el crustáceo *Artemia salina* Leach, a 1000 ppm.



1-para-cumaril, 5-O-metil, 6-acetil-L-myo-Inositol

CAPITULO VI

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Considerando que previamente no se habían aislado ésteres del ácido cinámico de la familia Sapindáceae, el presente trabajo constituye una contribución importante al conocimiento de la química del género *Dodonaea* y de la familia.
- 2.- El moderado efecto larvicida sobre el crustáceo *Artemia salina* y los antecedentes de que algunos derivados del myo-Inositol son inhibidores del crecimiento de las larvas de algunos insectos, hacen necesario realizar estudios detallados de este tipo de compuestos como un agente potencial insecticida.
- 3.- Considerando la naturaleza monofenólica del compuesto aislado, es posible, que por analogía con otros derivados del ácido cinámico (19), el compuesto aislado presente actividad antimicrobiana. Sin embargo la cantidad aislada del compuesto no permitió realizar un ensayo biológico de ésta naturaleza.
- 4.- Con los datos obtenidos en el presente estudio, no es posible justificar el uso popular que se le atribuye a la planta. Posiblemente, los constituyentes responsables de la actividad, se encuentren en las fracciones de menor polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq .

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Dawidar, M. A. ; Winternitz, F. ; Johns, B. ; Structure of Ipomine, a new alkaloid from *Ipomoea muricata* Jacq. Tetrahedron. 33, 1733-34 (1977).
- 2.- Dawson, R. M. , Jawis, M. W. ; Jefferies, P. R. ; Acidic constituents of *Dodonaea lobulata*. Aust. J. Chem. 19, 2133-42 (1966).
- 3.- Dimbi, M. ; Delaude, C. ; Kapundo, M. ; Triterpenoids of *Dodonaea viscosa*. Bull. Soc. Chem. Belg. 44(2), 141-8, (1985).
- 4.- Dittrich, P. ; Danböck, T. ; Isolation and characterization of a novel p-coumaric acid ester of myo-Inositol from needles of *Taxus buccata*. Plan. Physiol. 59, 279-281, (1977).
- 5.- Domínguez, X. A. METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA. Ed. Limusa México (1982).
- 6.- Domínguez, X. A. Franco, R. ; Aislamiento de 3, 6, 4'-trimetoxi, 5, 7-dioxiflavona en el Chapuliztle (*Dodonaea viscosa*). Rev. Latinoam. Quím II. 11(3-4), 150-1 (1980).
- 7.- Dreyer, L. D. ; Kaempferol methyl ethers from leaves of *Dodonaea viscosa*. Rev. Latinoam. Quím. 9(2), 97-8, (1978).
- 8.- Farnsworth, N. S. ; The development of pharmacological and chemical research for application to traditional medicine in development countries. J. of Ethnopharmacology, 2, 173-81, (1980).

- 9.- Gross, G. G. ; Phenolic acids in THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS. Ed. Academic Press Inc. New York, U. S. A. (1981).
- 10.-Harbone, J. B. ; PHYTOCHEMICAL METHODS. Ed. Chapman and Hill. New York U. S. A. (1983).
- 11.-Hsu, K. ; Hong-Yen, M. ; Structure of Hautriwaic acid. Phytochemistry. 10(11), 2813-14, (1971).
- 12.-Jefferies, P. R. ; Knox, J. R. ; The Chemistry of *Dodonaea* spp: Clerodane diterpenes from *Dodonaea boranifolia* and *Cyanostegia angustifolia*. Aust. J. Chem. 26, 2199-211, (1973).
- 13.-Jefferies, P. R. ; Payne. T. G. ; Phillip, R. M. ; Isolation and crystal structure of a diterpene acid from *Dodonaea petiolans*. Aust. J. Chem. 34(5), 1001-7, (1981).
- 14.-Lozoya, X. ; Lozoya, M. ; FLORA MEDICINAL DE MEXICO. PRIMERA PARTE. PLANTAS INDIGENAS. Ed. I. M. S. S. México (1982).
- 15.-Manito, P. ; BIOSYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS. Ed. Chichester, Ellias, Howood. U. S. A. (1981).
- 16.-Martínez, M. P. ; LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO. Ed. Botas. México (1989).
- 17.-Mata, R. E. ; CURSO DE FARMACOGNOSIA (MATERIAL DIDACTICO). Ed. U. N. A. M. México (1989).

- 18.-Meyer, B. N. ; Ferrigni, N. R. ; Putman, J. E. ; A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Medica. 45, 31-39 (1982).
- 19.-Mitscher, L. ; Raghar, G. ; NATURAL PRODUCTS AND DRUG DEVELOPMENT. Ed. Krogsgaard Larsen. S. Brogger Christensen, K. Koford, Munksgaard, Copenhagen. (1984).
- 20.-Nair, A. G. ; Subramanian, S. S. ; Isorhamnetin and Quercetin glycosides from *Dodonaea viscosa* and *Sapindus emarginatus*. Indian. J. Chem. 13(16), 639-40, (1975).
- 21.-Organización Mundial de la Salud (OMS). Programa de promoción y desarrollo de la medicina tradicional. J. of. Ethnopharmacology. 2(10), 71-4, (1983).
- 22.-Payne, T. G. ; Jefferies, P. R. ; The Chemistry of *Dodonaea* spp : Diterpene and flavonoid components of *Dodonaea attenuata*. Tetrahedron. 29, 2575-85, (1973).
- 23.-Rzedowski, M. ; VEGETACION DE MEXICO. I. P. N. Ed. Limusa México (1982).
- 24.-Sachdev, K. ; Kulshershatha, D. ; Aliarin, a new flavonoid from *Dodonaea viscosa*. Indian. J. Chem. 21(B8), 798-9 (1982).
- 25.-Sachdev, K. ; Kulshershatha, D. ; Flavonoids from *Dodonaea viscosa*. Phytochemistry. 22(5), 1253-6, (1983).

- 26.-Sachdev, K. , Kulshersatha, D. ; Viscosol a C-3' prenylated flavonoid from *Dodonaea viscosa*. Phytochemistry. 28(8), 1967-9, (1986).
- 27.-Silverstein, M. R. ; Morrill, T. C. ; IDENTIFICACION ESPECTROMETRICA DE COMPUESTOS ORGANICOS. Ed. Diana México (1981).
- 28.-Subbarao, S. ; Antibacterial activity of some plant essential oils .Indian. Drugs. 23, 140-1, (1983).
- 29.-Tempesta, E. N. ; Evaluation of local resources in traditional medicine. J. of. Ethnopharmacology. 2, 163-66 (1980).
- 30.-Venkateswara, D. R ; Chemical examination of the leaves of *Dodonaea viscosa*. J. Indian. Chem. Soc. 39, 561-2, (1972).
- 31.-Wagner, H. ; Ludwig, C. ; Biologically active saponins from *Dodonaea viscosa*. Phytochemistry. 26(3), 697-701 (1987).
- 32.-Yamada, Y. ; Hagiwara, K. ; Chromatography methods in natural products. Chem. Pharm. Bull. 26, 3107-10, (1978).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A P E N D I C E

8.1 Secado y pulverización

- a) Secar el material vegetal a temperatura ambiente
- b) Cortar en trozos pequeños
- c) Pulverizar en un molino de cuchillos

8.2 Extracción y fraccionamiento preliminar

- a) Macerar el material vegetal pulverizado con una mezcla de disolventes apropiados en proporción adecuada hasta extraer la mayor cantidad posible de extracto.

- b) Fraccionar el extracto vegetal obtenido en el paso anterior mediante una cromatografía preparativa en columna de vidrio, utilizando como adsorbente gel de sílice.

Realizar la elución con los disolventes apropiados en las proporciones adecuadas, iniciando con los de menor polaridad y concluyendo con los de mayor polaridad.

8.3 Análisis Cromatográficos

- a) Analizar las fracciones obtenidas por medio de cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplaques recubiertas con gel de sílice.
- b) Probar diferentes sistemas eluyentes hasta encontrar el más adecuado.

- c) Revelar las cromatoplacas con luz ultravioleta, identificando las manchas localizables
Posteriormente revelar con sulfato cérico (32):
 - Rociar con la solución de sulfato cérico
 - Calentar sobre parrilla a 110°C durante dos minutos o hasta que se visualice color.

- d) Reunir aquellas fracciones que sean semejantes para ese sistema de eluyentes.

8.4 Aislamiento y purificación de los compuestos de las fracciones de mayor polaridad

- a) Recromatografiar las fracciones seleccionadas en el paso anterior, por medio de cromatografía en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice desactivada con agua destilada al 10% y un sistema de eluyentes adecuado para cada caso.

- b) Las fracciones recolectadas de la columna se analizan por medio de una cromatografía en capa fina siguiendo la metodología antes mencionada.

Los pasos anteriormente mencionados se repiten cuantas veces sean necesarios, hasta ir logrando aislar los diferentes compuestos que se vayan encontrando.

8.5 Purificación de los compuestos vía cromatografía preparativa en capa delgada.

Para purificar el compuesto deseado se hace una cromatografía preparativa en capa delgada para lo cual se prosigue de la siguiente manera:

- a) Depositar la muestra disuelta en la placa con ayuda de un capilar.
- b) Saturar la cámara cromatográfica con la mezcla de eluyentes.
- c) Dejar correr la placa cromatográfica el tiempo necesario.
- d) Secar la placa cromatográfica a temperatura ambiente
- e) Revelar con luz ultravioleta marcando la zona en donde se encuentre el compuesto de interés
- f) Raspar la zona con ayuda de una espátula.
- g) Extraer de la gel de sílice el compuesto con ayuda de un disolvente apropiado.

8.6 Caracterización del compuesto deseado

8.6.1 Determinación de las constantes físicas

Se deben realizar todas las pruebas de constantes físicas que sean necesarias como por ejemplo:

- Punto de Fusión
- Rotación óptica

8.6.2 Determinaciones Espectroscópicas

Dentro de éstas se pueden realizar por ejemplo:

- *Espectroscopía IR
- *Espectroscopía UV
- *Espectroscopía de Masas
- *Espectroscopía de RMN utilizando como disolvente CDCl_3 , DMSO, y como referencia interna TMS.

8.6.3 Determinaciones químicas

Realizar todas las pruebas químicas que sean necesarias para identificar y/o confirmar plenamente de que compuesto se trata.

8.6.4. Determinaciones químicas específicas para el compuesto obtenido:

Para el caso del compuesto obtenido en el presente estudio se realizaron las siguientes pruebas:

8.6.4.1 Prueba de identificación de fenoles

-Poner en un tubo de ensaye una pequeña cantidad de la muestra, adicionar tres mililitros de agua destilada, agregar cantidad suficiente de solución reactivo de FeCl_3 hasta la aparición de una coloración violeta si la prueba es positiva. Usar una muestra testigo positiva y una negativa.

8.6.4.2 Prueba de Molish para carbohidratos

-Poner en un tubo de ensaye una pequeña cantidad de la muestra, adicionar tres mililitros de agua destilada y agregar un mililitro de una solución reactivo de α -naftol (10% en etanol), en seguida, escurrir por la pared del tubo dos gotas de H_2SO_4 concentrado. Si la prueba es positiva, se observa una coloración violeta en la interfase.

Utilizar una muestra testigo positiva y una negativa.

8.6.4.3 Reacción de acetilación

A 10 mg del compuesto a ensayar agregar 0.1 ml de piridina y 0.1 ml de anhídrido acético, dejar en reposo por 24 horas a temperatura ambiente, para que se lleve al cabo la reacción. Pasado este tiempo, adicionar una cantidad suficiente de hielo a la mezcla de reacción.

Posteriormente, extraer dos veces con acetato de etilo y lavar la fase orgánica con HCl 0.1N.

A la fase orgánica obtenida después del lavado, lavarla con NaHCO_3 al 10% y finalmente con agua destilada.

Secar la fase orgánica resultante sobre Na_2SO_4 anhidro y filtrarla.

Finalmente, concentrar en un rotaevaporador.

8.6.4.4 Reacción de hidrólisis básica

Disolver cinco miligramos del compuesto a ensayar en tres mililitros de metanol y adicionar 0.5 ml de NH_4OH al 33%.

Poner a reflujo por una hora. Transcurrido el tiempo agregar una cantidad suficiente de HCl 0.1N para neutralizar.

Posteriormente, extraer dos veces con acetato de etilo separando la fase orgánica de la acuosa.

8.7 Ensayos Biológicos

8.7.1 Determinación de la toxicidad in vitro contra *Artemia salina* Leach (18)

Realizar los ensayos biológicos de la siguiente manera:

1.- Disolver 20 mg del compuesto puro o 40 mg de la fracción o extracto objeto de evaluación en dos mililitros de disolvente (seleccionar el disolvente en el cual se presente la mayor solubilidad). De esta solución transferir a tres viales, por separado 5, 50 y 500 μl para obtener una concentración de 10, 100 y 1000 ppm respectivamente.

Realizar esta operación por triplicado; finalmente dejar evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío.

2.- Incubación de los huevos de *Artemia salina*

Incubar los huevos de *Artemia salina*, en un medio salino artificial durante 48 horas. Pasado este tiempo colectar los camarones fototrópicos con ayuda de una pipeta Pasteur.

3. - Bioensayo

Transferir 10 camarones a cada uno de los viales conteniendo la muestra a ensayar y adicionar cinco mililitros del medio salino artificial. Mantener los viales con iluminación durante 48 horas. Al cabo de este tiempo contar los crustáceos sobrevivientes y determinar el porciento en cada una de las dosis por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\text{Número total de crustáceos muertos}}{\text{Número total de crustáceos vivos}} \times 100$$

**SABER ES PODER
AMAR ES CREAR
SER ES IRRADIAR LUZ Y VERDAD**

PITAGORAS