



32
24⁶
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO PRELIMINAR DE GUAZUMA ULMIFOLIA
(STERCULIACEAE) Y CONSTITUYENTES ADICIONALES DE
HINTONIA LATIFLORA (RUBIACEAE)

TESIS
MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A N
MARIA DEL CARMEN CRUZ ROSAS
SANDRA OLIMPIA MENDOZA DIAZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

LISTA DE CUADROS _____	i
LISTA DE FIGURAS _____	ii
LISTA DE ESQUEMA _____	iii
LISTA DE ESPECTROS _____	iv
INTRODUCCION _____	1
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS _____	5
CAPITULO I:	
CONSTITUYENTES ADICIONALES DE LA <u>HINTONIA LATIFLORA</u>	
1. ANTECEDENTES _____	7
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Material Vegetal _____	14
2.2 Métodos de Extracción y Fraccionamiento _____	14
2.3 Análisis Cromatográficos Analíticos y Preparativos en Capa Delgada _____	20
2.4 Aislamiento y Purificación de los Compuestos	
2.4.1 Obtención de la 5-O-(6"-acetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> . _____	21
2.4.2 Obtención del Producto II _____	21
2.5 Caracterización de los Compuestos Aislados	
2.5.1. Determinación de las Constantes Físicas y Espectroscópicas _____	21
2.5.2. Hidrólisis ácida de <u>14</u> para obtener la aglicona <u>14A</u> _____	22
2.5.3. Obtención de los derivados acetilados de <u>14</u> , <u>14A</u> y <u>Producto II</u> . _____	23

2.5.4. Hidrólisis enzimática de 14 y Producto II con β -glucosidasa y celulasa.	23
2.5.5 Prueba de Molisch para carbohidratos	24
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	41
CAPITULO II:	
ESTUDIO QUIMICO PRELIMINAR DE <u>GUAZUMA ULMIFOLIA</u>	
1. ANTECEDENTES	49
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Material Vegetal	57
2.2 Métodos de Extracción y Fraccionamiento	57
2.3 Aislamiento y Purificación de los compuestos.	
2.3.1. Obtención del β -sitosterol	58
2.3.2. Obtención del glucósido del β - sitosterol	58
2.3.3. Obtención de la Mezcla I para la determinación del contenido de ácidos grasos y esteroleos presentes en el extracto de acetato de etilo-cloroformo de los frutos de <u>G. ulmifolia</u>	58
2.4 Caracterización de los Compuestos Aislados	
2.4.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas	61
2.4.2. Acetilación de los compuestos, 12 y 15	61
2.4.3 Determinación del contenido de ácidos grasos y esteroleos de la Mezcla I mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas	61
3. RESULTADOS Y DISCUSION	63
RESUMEN Y CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	75

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. Metabolitos secundarios descritos de Hintonia latiflora 10

CUADRO 2. Resumen del Fraccionamiento Vía Cromatografía en Columna del Extracto de Acetato de etilo de Hintonia latiflora. 18

CUADRO 3. Resumen de la Columna de Separación de las Fracciones 311-324 del Extracto Metabólico de H. latiflora 19

CUADRO 4. Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina 20

CUADRO 5. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-Q-(6"-acetil-β-D-glucopiranosil)-7-3',4'-trihidroxil-4-fenilcumarina, 1A. 27

CUADRO 6. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-tetrahidroxil-4-fenilcumarina, 1AA 32

CUADRO 7. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-Q-(tetracetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-triacetoxil-4-fenilcumarina, 1AE. 35

CUADRO 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-Tetracetoxil-4-fenilcumarina, 1AC. 38

CUADRO 9. Metabolitos aislados de G. ulmifolia. 52

CUADRO 10. Resumen del Fraccionamiento Vía Cromatografía en Columna del Extracto de Acetato de etilo - Cloroformo de G. ulmifolia. 60

CUADRO 11. Acidos Grasos Contenidos en el Fruto de Guazuma ulmifolia 66

CUADRO 12. Esteroles Contenidos en el Fruto de G. ulmifolia. 70

LISTA DE FIGURAS.

- FIGURA 1. Porción sacárida del Compuesto 14. _____ 43
- FIGURA 2. Porción aromática del Compuesto 14. _____ 46
- FIGURA 3. Guazuma. *Guazuma tomentosa*. _____ 51
- FIGURA 4. Formación de los iones M-31, 59, 74 y 87 de los ésteres metílicos de ácidos grasos. _____ 64

LISTA DE ESQUEMAS.

ESQUEMA 1. Extracción de la corteza de H. latiflora. ___ 16

ESQUEMA 2. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de H. latiflora. _____ 17

ESQUEMA 3. Extracción de los frutos de Guazuma ulmifolia 59

LISTA DE ESPECTROS.

ESPECTRO 1.	Espectro UV de la 5-O-(6"-acetil-β-D-gluco- piranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcuma- rina (14)	28
ESPECTRO 2.	Espectro IR del compuesto 14.	29
ESPECTRO 3.	Espectro de RMN'H (DMSO-d ₆) del compuesto 14	30
ESPECTRO 4.	Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) del compuesto 14	31
ESPECTRO 5.	Espectro IR de la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4- fenilcumarina (14A)	33
ESPECTRO 6.	Espectro de RMN'H (DMSO-d ₆) del compuesto 14A	34
ESPECTRO 7.	Espectro IR de la 5-O-(tetracetil-β-D-gluco- piranosil)-7,3',4'-triacetoxi-4-fenilcuma- rina (14B).	36
ESPECTRO 8.	Espectro RMN'H (CDCl ₃) del compuesto 14B.	37
ESPECTRO 9.	Espectro IR de la 5,7,3',4'-tetracetoxi-4- fenilcumarina (14C).	39
ESPECTRO 10.	Espectro de RMN'H (Piridina-d ₅) del com- puesto 14C.	40
ESPECTRO 11.	Espectro de masas del ester metílico del ácido mirístico	67
ESPECTRO 12.	Espectro de masas del ester metílico del ácido palmitoleico.	67
ESPECTRO 13.	Espectro de masas del ester metílico del ácido palmítico.	68
ESPECTRO 14.	Espectro de masas del ester metílico del ácido linoleico.	68
ESPECTRO 15.	Espectro de masas del ester metílico del ácido oleico.	69
ESPECTRO 16.	Espectro de masas del campesterol.	71
ESPECTRO 17.	Espectro de masas del estigmasterol.	71
ESPECTRO 18.	Espectro de masas del sitosterol.	72
ESPECTRO 19.	Espectro de masas del sitostanol.	72

INTRODUCCION

La disponibilidad y el empleo de medicamentos apropiados es uno de los elementos indispensables para el éxito de la atención primaria de la salud. En este sentido las plantas siempre han sido una fuente importante de remedios, tanto en la forma de preparaciones tradicionales como de preparados farmacéuticos acabados. Aunque no se dispone de los datos necesarios para precisar el valor o la difusión del uso de plantas o de principios activos de ellas derivados en los sistemas de salud de los distintos países, la Organización Mundial de la Salud estima que quizá el 75% de los más de 4,000 millones de habitantes de la Tierra confían en medicinas tradicionales para satisfacer sus principales necesidades de salud y se puede afirmar que gran parte de las terapias tradicionales se basan en el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (Akerlele, et al, 1984).

Los fármacos derivados de plantas tienen importancia tanto en los países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Para ilustrar la importancia en el caso de los países desarrollados se puede tomar como ejemplo a los Estados Unidos de América en donde el 25% de todas las prescripciones dispensadas por las farmacias desde 1959 hasta 1980 contenían extractos o principios activos obtenidos de plantas superiores. Dicha cifra no ha variado considerablemente en los 22 años estudiados (Farnsworth, 1976).

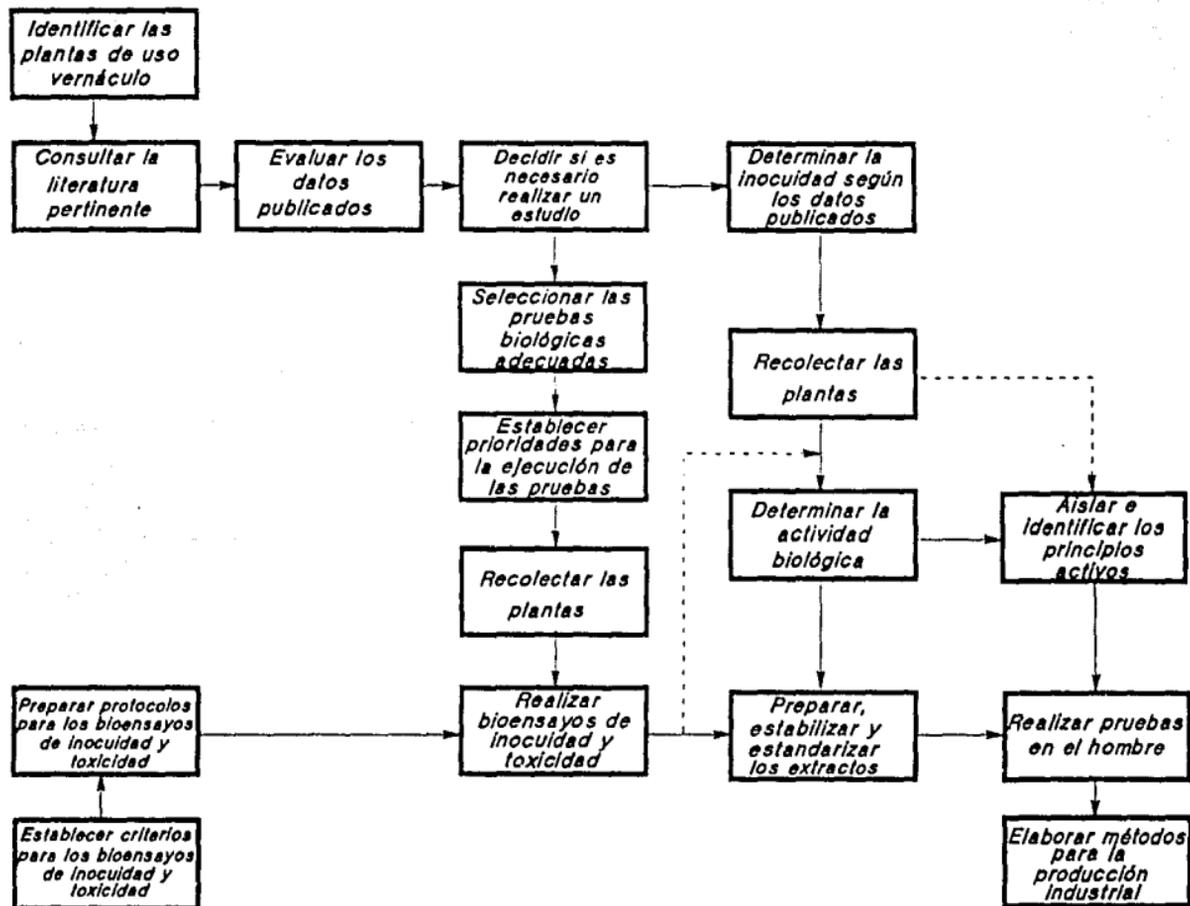
Actualmente hay un camino abierto para que los investigadores de los países desarrollados organicen y realicen programas de investigación interdisciplinarios sobre la utilización de fuentes naturales vegetales de medicamentos. Dichas fuentes suelen ser abundantes y pueden proporcionar productos galénicos seguros, estables estandarizados y eficaces para su uso en la atención primaria de la salud o conducir al descubrimiento de nuevos principios biológicamente activos derivados de plantas, que a veces son apropiados para la elaboración de medicamentos (Akerle, et al, 1984).

Con respecto a los países en desarrollo sería particularmente conveniente identificar las plantas medicinales de diversas localidades y estudiar las mismas con la finalidad de obtener productos que puedan formar parte de las listas nacionales de medicamentos o incluso sustituir algunos de los productos farmacéuticos de importación. En general estos países, entre ellos México, se caracterizan por contar con una vasta flora medicinal, la cual en la mayoría de los casos lamentablemente no ha sido investigada con la debida atención.

El descubrimiento de un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal ha sido el resultado del estudio científico de plantas empleadas en medicina tradicional que constituye entonces un método apropiado para el descubrimiento de otros fármacos útiles (Akerle, et al , 1984). La mayoría de estas investigaciones se ha realizado en países desarrollados; sin

embargo, cada vez se subraya más la necesidad de que los países en vías de desarrollo implementen sus propias investigaciones sobre su medicina tradicional con el objeto de obtener productos medicinales que les permitan resolver sus problemas de salud de manera más efectiva y económica. La estrategia ideal para implementar este tipo de investigación se resume en el diagrama de bloques que se ilustra en la página siguiente.

En el caso particular de México la información existente acerca del uso medicinal vernáculo de cientos de plantas es extensa y plantea un sin número de investigaciones. De manera reciente se ha dado un mayor énfasis en el estudio de las plantas con propiedades curativas, sin embargo, es necesario sistematizar el estudio multidisciplinario de las mismas siguiendo la metodología descrita en el diagrama de bloques antes mencionado.



Estrategia para implementar la investigación en medicina tradicional.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Entre las plantas mexicanas que son utilizadas como agentes terapéuticos en la medicina popular y que potencialmente podrían constituir fuentes de principios activos, se encuentran la Guazuma ulmifolia y la Hintonia latiflora; la primera se utiliza contra el paludismo, afecciones cutáneas y sifilíticas, elefantiasis, enfermedades del pecho, lepra, tos y como agente hipocolesterolemiante en tanto que la segunda se utiliza contra el paludismo, como agente hipoglucemiante y antiséptico.

Tomando en cuenta que uno de los principales criterios para descubrir nuevos productos naturales con actividad biológica, ha sido el estudio de plantas utilizadas en medicina tradicional (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1988; Farnsworth, 1980; Bingel, 1977; Galeffi, 1980; Fairbairn, 1980; Salewink, 1980; inter alia) se consideró pertinente realizar el estudio fitoquímico de las dos especies antes mencionadas.

El estudio fitoquímicos de ambas especies forma parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional que pretende además de obtener principios activos contribuir al conocimiento de la flora medicinal mexicana. Indudablemente en el caso de obtener sustancias activas este proyecto podría constituir una aportación para la resolución de problemas de salud pública nacional.

Para cumplir con los objetivos generales se consideran pertinentes los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Recopilar la información bibliográfica, botánica, etnobotánica, química y farmacológica de Hintonia latiflora (Rubiaceae) y de Guazuma ulmifolia (Sterculiaceae).
- 2.- Efectuar las operaciones preliminares propias a la preparación de los extractos vegetales para cada una de las plantas objeto de estudio.
- 3.- Preparar los extractos vegetales siguiendo las técnicas fitoquímicas convencionales.
- 4.- Efectuar el fraccionamiento de los extractos obtenidos mediante los métodos adecuados.
- 5.- Separar y purificar el mayor número de constituyentes de las diferentes fracciones obtenidas en el punto anterior.
- 6.- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
- 7.- Determinar la toxicidad para Artemia salina de los compuestos puros aislados, considerando que esta evaluación biológica simple ha dado muy buenos resultados como indicador preliminar de actividades biológicas más complejas.

CAPITULO I

CONSTITUYENTES ADICIONALES DE LA HINTONIA LATIFLORA

1.- ANTECEDENTES.

El género Hintonia pertenece a la familia Rubiaceae (Subfamilia: Cinchonoideae; Tribu: Cinchoneae) y comprende cuatro especies, las cuales se encuentran distribuidas en la región mesoamericana. Desde el punto de vista medicinal la especie más importante es la Hintonia latiflora, (Sesse et Mocíño ex DC) Bullock, que se caracteriza por ser un arbusto de siete metros de altura, de hojas opuestas, ovadas u ovals de 4-12 cm; flores acampanadas, blancas aromáticas de 5-7 cm, fruto capsulado oval o abovado, anguloso con semillas pequeñas y aladas (Martínez, 1989).

La H. latiflora está incluida en un conjunto de plantas que constituyen el complejo "Copalchi". Estas plantas pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae ; y sus cortezas se caracterizan por ser extremadamente amargas y por su empleo en el tratamiento del paludismo. La H. latiflora goza además de reputación folclórica como agente hipoglucemiante y antiséptico .

Desde el punto de vista fitoquímico son escasos los estudios que se han descrito sobre el género Hintonia; la H. latiflora ha sido la única especie investigada y los diferentes estudios han permitido el aislamiento e identificación de una oxidocumarina (1) (Reher, et al, 1983), tres triterpenos tetracíclicos del tipo cucurbitano (2,3 y 4) (Reguero, et al, 1987, Camacho, 1990, Mata, et al, 1990), seis

fenilcumarinas (5, 6, 7, 8, 9, y 10) (Soto, *et al.*, 1988; Camacho, 1990; Mata *et al.*, 1990), el manitol (11), el 8-sitosterol (12) y una flavona (13) (Camacho, 1990; Mata, *et al.*, 1990). En el Cuadro 1 se resumen las investigaciones fitoquímicas sobre H. latiflora.

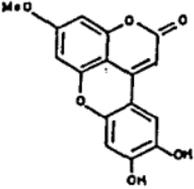
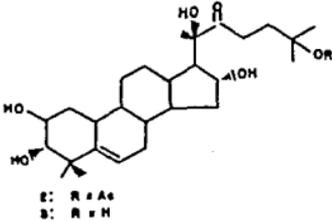
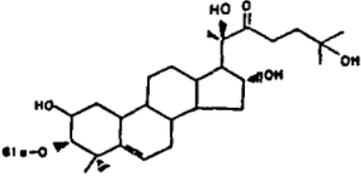
Cabe hacer notar que en el estudio realizado por Camacho (1990) se detectaron compuestos adicionales en las fracciones cromatográficas de mayor polaridad del extracto metanólico de la planta. Entre ellos destacaban un cromóforo rojo y otro amarillo, siendo el primero particularmente inestable. En esa ocasión no fue posible la separación de ambos compuestos.

El extracto metanólico de la corteza así como las fenilcumarinas y la glucocucurbitacina aisladas del extracto fueron evaluadas in vitro como agentes antipalúdicos potenciales. El método de evaluación empleado está basado en la inhibición de la toma de hipoxantina radioactiva por el parásito Plasmodium falciparum y en todos los casos se utilizó difosfato de cloroquina como control positivo; el extracto metanólico de la planta y el glucósido 5 presentaron una concentración inhibitoria (IC₅₀) igual a 12.5 ppm; la glucocucurbitacina 4 fue menos activa encontrándose un valor inhibitorio (IC₅₀) de 31 ppm (Camacho, 1990).

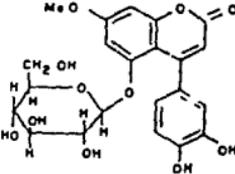
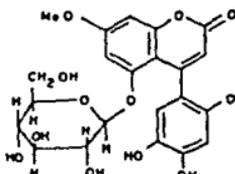
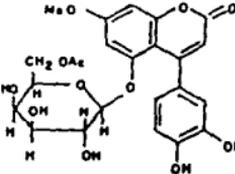
La actividad potencial como agente antimicrobiano de los constituyentes de H. latiflora, ha sido también objeto de estudio. Como resultado de esas investigaciones se encontró que el 5-O- β -galactopiranosil-3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 8 es activa contra C. albicans. (Rojas, 1990).

Finalmente cabe destacar que ninguno de los compuestos obtenidos por Camacho (1990) presentó toxicidad apreciable para A. salina Leach.

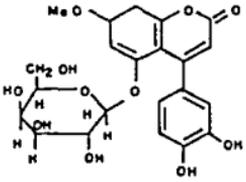
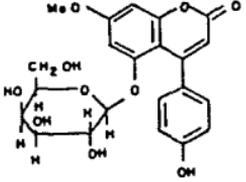
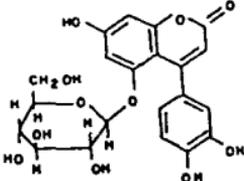
CUADRO 1. Metabolitos secundarios descritos de *H. latiflora*.

Oxidocumarinas	
<p>7-Metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina, <u>1</u></p>	
Cucurbitanos	
<p>25-Acetil-23,24-dihidro cucurbitacina, <u>2</u> 23,24-Dihidrocucurbitacina, <u>3</u></p>	 <p>R: R = Ac B: R = H</p>
<p>3-O-β-D-Glucopiranosil-23,24-dihidro-cucurbitacina, <u>4</u></p>	

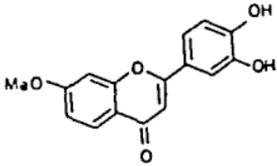
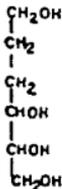
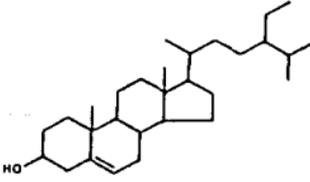
CUADRO 1. *Metabolitos secundarios descritos de H. latiflora*
(Continuación)

Fenilcumarinas	
<p>5-O-β-D-Glucopiranosil-3',4'- dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcu- marina, <u>5</u></p>	
<p>5-O-β-D-Glucopiranosil-2',4', 5'- trihidroxi-7- metoxi- 4 - fenilcumarina, <u>6</u></p>	
<p>5-O-(6"-Acetil-β-D-galactopi- ranosil) -3',4'- dihidroxi-7 - metoxi-4-fenilcumarina, <u>7</u></p>	

CUADRO 1. Metabolitos secundarios descritos de *H. latiflora*
(Continuación)

<p>5-O-β-D-Galactopiranosil-3', 4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil- cumarina, <u>8</u></p>	
<p>5-O-β-D-Galactopiranosil-4'- hidroxi-7-metoxi-4-fenilcu- marina, <u>9</u></p>	
<p>5-O-β-D-Glucopiranosil-7,3', 4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>10</u></p>	

CUADRO 1. Metabolitos secundarios descritos de *H.latiflora*
(Continuación)

Flavona	
7-Metil-luteolina, <u>13</u>	
Otros	
Manitol, <u>11</u>	
β -Sitosterol, <u>12</u>	

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1. Material vegetal.

La corteza de Hintonia latiflora (Sesse et Mociño ex DC) Bullock se colectó en Jolalpan, Puebla en mayo de 1987. Una muestra de referencia (Voucher: Bye y Linares No. 15516) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM.

El material vegetal se secó en una estufa, se cortó en pequeños trozos y posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos Modelo T. Wiley 4.

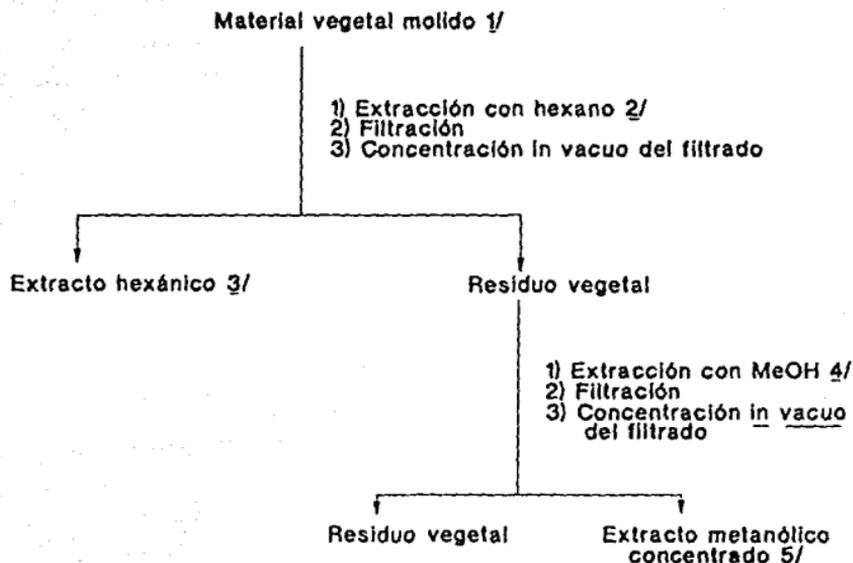
2.2 Métodos de Extracción y Fraccionamiento.

El material vegetal pulverizado se extrajo primero con hexano y posteriormente con metanol siguiendo el procedimiento señalado en el Esquema 1. El extracto metanólico fue fraccionado de manera preliminar mediante un proceso de partición según el procedimiento descrito en el Esquema 2.

El extracto de acetato de etilo resultante (60.1g) del proceso de partición se fraccionó vía una columna preparativa, utilizando como adsorbente gel de sílice (1.20 kg, sílica gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 470 fracciones de 250 ml cada una. Cada fracción

se analizó por cromatografía en capa fina combinándose aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 2 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones obtenidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

Las fracciones de mayor polaridad 311-324 (10.845 g) se recromatografiaron en una columna abierta sobre 13.7 g de gel de sílice impregnada con ácido oxálico al 10%. Se recogieron un total de 335 fracciones de 100 ml cada una utilizando como eluyentes cloroformo y mezclas de cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose como en el caso de la columna original, aquellas que resultaron similares. En el Cuadro 3 se resumen los sistemas de elución empleados, el número de fracciones obtenidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas .



1/ Cantidad de material vegetal 1.5 kg.

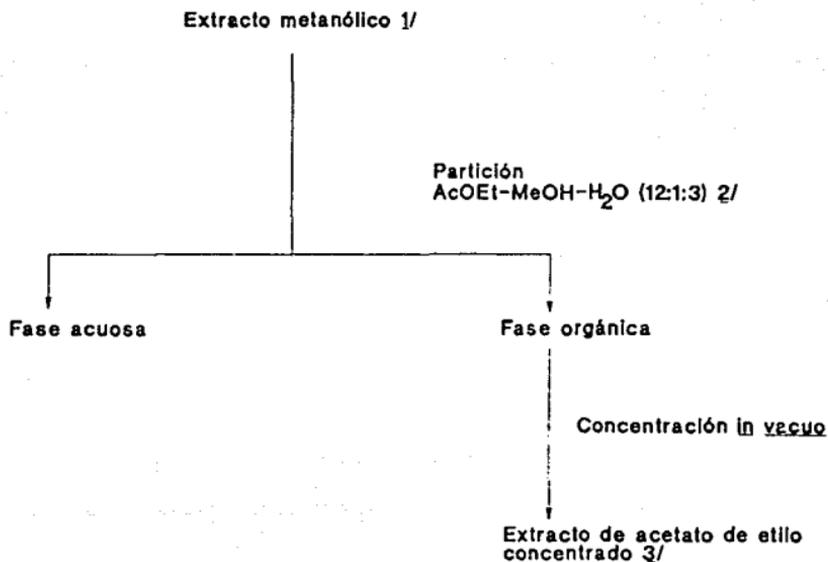
2/ Extracción vía maceración (dos veces por periodos de dos días cada vez, 6.9 l de hexano).

3/ Cantidad total de extracto hexánico 3.5 kg.

4/ Extracción vía maceración (tres veces por periodos de dos días cada vez, 6 l de metanol).

5/ Cantidad total de extracto metanólico 318.5 g.

Esquema 1. *Extracción de la corteza de H. latiflora*



1/ 318.5 g de extracto metanólico se disolvieron en 0.60 l de metanol- 1.0 l de agua.

2/ Se efectuaron cuatro extracciones con AcOEt (de 600 ml cada vez). Se empleó un extractor líquido-líquido, para líquidos menos densos que el agua.

3/ Peso del extracto de acetato de etilo concentrado 60 g.

Esquema 2. *Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de H. latiflora*

CUADRO 2. RESUMEN DEL FRACCIONAMIENTO VIA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE *Hintonia latiflora*.

Eluyente	Proporción	No. fracciones	Fracciones combinadas
Hex-CHCl ₃	50:50	1-18	1-74
Hex-CHCl ₃	30:70	19-14	75-120
CHCl ₃	100	75-108	121-133
CHCl ₃ -MeOH	99:1	109-118	134-158
CHCl ₃ -MeOH	98:2	119-139	159-165
CHCl ₃ -MeOH	97:3	140-153	166-174
CHCl ₃ -MeOH	96:4	154-175	175-185
CHCl ₃ -MeOH	95:5	176-185	186-204
CHCl ₃ -MeOH	94:6	186-208	205-211
CHCl ₃ -MeOH	92:8	209-248	212-220, 221-251, 252-288
CHCl ₃ -MeOH	90:10	249-398	289-293, 294-301, 302-310, 311-324, 325-329, 330-338, 339-364
CHCl ₃ -MeOH	85:15	399-417	365-398
CHCl ₃ -MeOH	80:20	418-431	
CHCl ₃ -MeOH	70:30	432-455	399-470
CHCl ₃ -MeOH	50:50	456	

CUADRO 3. RESUMEN DE LA COLUMNA DE SEPARACION DE LAS FRACCIONES 311-324 DEL EXTRACTO METANOLICO DE H. LATIFLORA.

Eluyente	Proporción	No. Fracciones	Fracciones combinadas
CHCl ₃	100	1-21	1-7,8,9-24
CHCl ₃ -MeOH	99:1	22-34	25-38
CHCl ₃ -MeOH	98:2	35-59	39-44,45,46-54 55,56-58,59
CHCl ₃ -MeOH	97:3	60-90	60-68,69,70-82 83-90
CHCl ₃ -MeOH	96:4	91-118	91-100,101-114, 115
CHCl ₃ -MeOH	95:5	119-146	116-124,125,126, 127-133,134,135, 136,137,138,139, 140-150
CHCl ₃ -MeOH	94:6	147-173	151-163,164-174,
CHCl ₃ -MeOH	93:7	174-194	175-187
CHCl ₃ -MeOH	92:8	195-275 276-300	188-222,223-224, 225-227,228-238, 239-240,241-242, 243,244-247,248, 249-253
CHCl ₃ -MeOH	80:20	301-319	254-255,259-260, 261-262,263,264- 265,266-268
CHCl ₃ -MeOH	70:30	320-355	269-272,273-274, 275-276,277,278, 279-290

2.3. Análisis cromatográficos analíticos y preparativos en capa delgada.

En todos los casos los análisis cromatográficos tanto analíticos como preparativos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de sílice (silica gel GF 254, Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos.

Los sistemas de eluyentes y reactivos reveladores empleados se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. *Sistemas de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.*

Sistemas de eluyentes	Composición	Proporción	Referencia
I	Hexano/ACOET	Diversas proporciones	-
II	CHCl ₃ /MeOH	"	-
III	ACOET/MeOH	"	-
IV	ACOET/CHCl ₃	"	-
V	Hexano/CHCl ₃	"	-
VI	IsopOH/ACOET/H ₂ O	83:11:6	Stahl, 1969

Reactivo	Agentes cromogénicos Composición	Referencia
I Sulfato cérico *	12 g sulfato cérico 22.2 ml H ₂ SO ₄ conc. 350 g hielo picado	Stahl, 1969
II Anisaldehído*	0.5 ml anisaldehído 9 ml etanol 0.5 ml H ₂ SO ₄ conc. 1 ml ácido acético	Stahl, 1969

* Para el desarrollo del color era necesario calentar por dos minutos aproximadamente a 110°C.

2.4. Aislamiento y Purificación de los Compuestos.

2.4.1 Obtención de la 5-O-(6"-acetil-8-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 14.

De las fracciones 228-238 de la columna 2 (Cuadro 3) se obtuvo un polvo amarillo, el cual fue purificado mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada. Se utilizaron un total de 12 placas de gel de sílice y como sistema de elución cloroformo-metanol (75:25). Al cabo del proceso se obtuvieron 31.3 mg de un material cristalino color amarillo con p.f. 205-208°C.

2.4.2. Obtención del Producto II.

De las fracciones 279-290 (0.7511 g) de la columna 2 (Cuadro 3) se obtuvo un polvo rojo que fue purificado mediante 20 placas preparativas. El sistema de elución empleado en este caso consistió de CHCl_3 -MeOH (7:3). Como resultado de este procedimiento se obtuvieron 213.3 mg de un sólido con p.f.151-154 °C.

2.5 Caracterización de los compuestos aislados.

2.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

a).- Los puntos de fusión fueron obtenidos en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

b).- Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer 599B.

c).- Los espectros de ultravioleta se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin -Elmer 202.

d).- Los espectros de RMN se determinaron en un instrumento Varian VXR-300S (Instituto de Química, UNAM).

e).- Los análisis elementales se efectuaron en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química, UNAM.

f).- Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer No. 241.

2.5.2. Hidrólisis ácida de 14 para obtener la aglicona 14A

Por cada 20 mg del compuesto 14 se añadieron 20 ml de HCl 1N. La mezcla anterior se hirvió a reflujo durante una hora. Al cabo de este tiempo se extrajo la aglicona de la fase acuosa con acetato de etilo; la fase orgánica se lavó sucesivamente con una solución reactivo de bicarbonato de sodio y agua. La fase de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío, obteniéndose un sólido cristalino.

El sólido cristalino anterior se purificó vía una cromatografía preparativa en capa delgada, utilizando como sistema de eluyentes cloroformo-metanol (8:2). Después de la purificación cromatográfica se obtuvieron 4.3 mg de la aglicona 14A con p.f. 204-206°C.

2.5.3. Obtención de los derivados acetilados de 14, 14A y Producto II.

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos 14, 14A y Producto II se utilizaron un ml de piridina y un ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas y al término de este tiempo los productos acetilados fueron separados de la manera convencional (Pavia, 1976).

El compuesto acetilado de 14 se purificó mediante 2 placas preparativas utilizando como sistema de elución cloroformo-metanol (95:5). Se obtuvieron 17.1 mg de un sólido amarillo, 14B, con p.f. 71-73°C.

El compuesto acetilado del Producto II se purificó mediante 7 placas preparativas utilizando como sistema de elución hexano-cloroformo (1:1) obteniéndose 81.35 mg de un material cristalino con p.f. 54-57 °C..

2.5.4. Hidrólisis enzimática de 14 y Producto II. con β -glucosidasa y celulasa.

A 5 mg del compuesto objeto de hidrólisis se le adicionaron 0.2 ml de agua destilada y 10 mg de celulasa. La mezcla se incubó a 36°C durante 72 horas.

A 5 mg de muestra se le adicionaron un ml de agua destilada y 5 mg de β -glucosidasa. Al igual que en el caso previo la mezcla se incubó a 36°C durante 72 horas.

Al cabo de la hidrólisis los azúcares se detectaron cromatográficamente mediante el sistema de elución VI y el agente cromogénico II del Cuadro 4. En todos los casos se utilizaron patrones de azúcares adquiridos comercialmente de la casa Merck.

2.5.5. Prueba de Molisch para carbohidratos.

A una pequeña cantidad de cada uno de los compuestos disueltos en 3 ml de agua destilada, se les adicionó un ml de una solución reactivo de α -naftol (10% en etanol); seguidamente se adicionaron por las paredes de los tubos de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos, lo que era indicativo de la presencia de carbohidratos. Se emplearon además controles positivos y negativos.

3.0 RESULTADOS

El extracto metanólico de la corteza de *H. latiflora* fue sometido a un fraccionamiento preliminar vía un proceso de partición entre acetato de etilo y agua. El extracto orgánico resultante fue objeto de un fraccionamiento adicional mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Como resultado del análisis cromatográfico preparativo se obtuvieron tres conjuntos de fracciones, las poco polares, las de mediana polaridad y las de mayor polaridad (Cuadro 2). Las fracciones polares 311-324 (Cuadro 2) contenían los cromóforos rojo y amarillo previamente detectados por Camacho (1990). La recromatografía de estas fracciones en una columna de gel de sílice originaron las fracciones secundarias indicadas en el Cuadro 3. De las fracciones combinadas 228-238 (Cuadro 3) se obtuvo un sólido cristalino amarillo el cual, después de su purificación mediante una cromatografía preparativa en capa delgada generó 31.3 mg del compuesto 14. Su rendimiento en base a la planta seca es de 0.002 %. El compuesto 14 se obtuvo como un sólido amarillo cristalino con p.f. = 205-208 °C, soluble en metanol. En el Cuadro 5 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:

a) El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina originó el derivado heptacetilado correspondiente 14B.

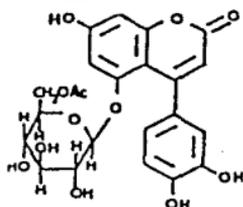
b) La hidrólisis ácida con HCl 1 N del compuesto natural generó la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina 14A y permitió detectar mediante análisis cromatográficos a la β -D-glucosa como único carbohidrato presente. La posterior acetilación de este producto originó el derivado tetracetilado 14C.

En los cuadros 6, 7 y 8 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de 14A, 14B y 14C, respectivamente.

c) La prueba de Molisch para carbohidratos resultó positiva.

De la fracción combinada secundaria 279-290 (Cuadro 3) se obtuvo un polvo rojo, el cual, después de su purificación mediante una cromatografía en capa delgada originó 213.3 mg del Producto II. Su rendimiento en base a la planta seca es de 0.014 %. El Producto II se obtuvo como un sólido con p.f.= 151-154 °C, soluble en metanol. Este producto se encuentra en proceso de caracterización.

CUADRO 5. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-(6"-acetil-β-D-glucopiranosil)-7,3',4'-trihidroxifenilcurmarina. 14.



F.M. : $C_{23}H_{22}O_{12}$

P.M. : 490 g/mol

P.F. : 205-208 °C

Análisis elemental: C 49.24% H 6.11%

MEOH

U.V. λ nm: 258 y 331 (Espectro 1)
máx.

KBr

I.R. ν cm^{-1} : 3440, 1701, 1618, 1602, 1384,
máx.
1368, 12155, 1083

(Espectro 2)

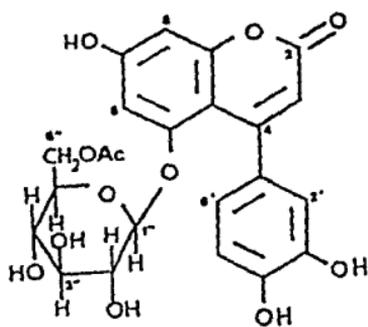
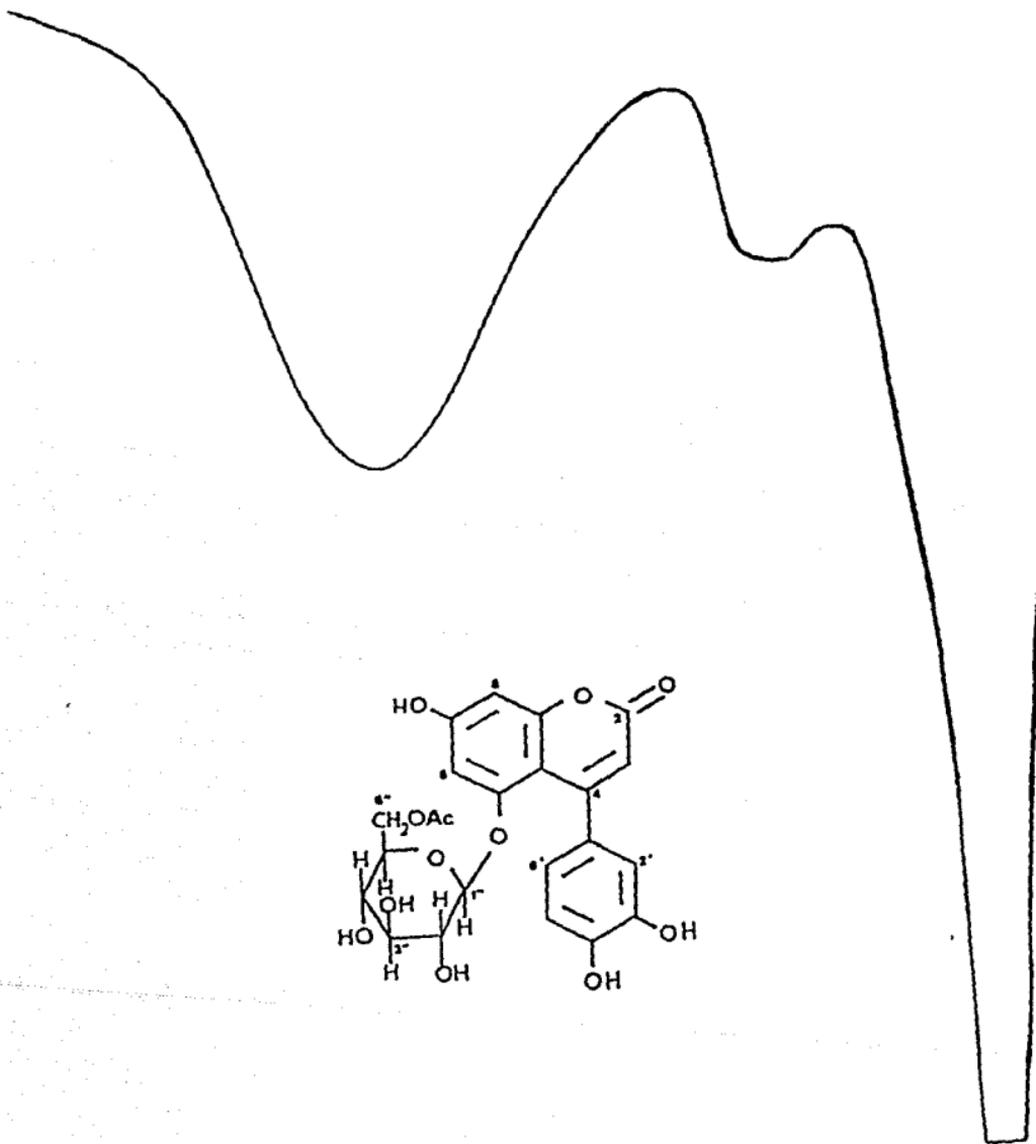
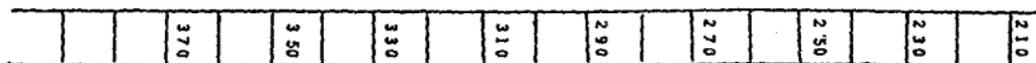
α : -129 (C=1, MeOH)
D

RMN¹H : 2.0 (s, 3H, $\underline{CH_3CO-}$), 2.6 (dd, J=7Hz, 1H, H-2''),
(DMSO- d_6 , δ) 3.02 (dd, 1H, J=7Hz, H-4''), 3.18 (dd, 1H, J=7Hz, H-3''),
3.41 (m, 1H, J=7,3 Hz, H-5''), 4.05 (dd, 1H, J=7Hz, H-6''),
4.68 (d, 1H, j=8Hz, H-1''), 5.58 (s, 1H, H-3)
6.25 (s, 1H, H-8), 6.32 (s, 1H, H-6), 6.58-6.8 (m, 3H
H-2', H-5' y H-6')

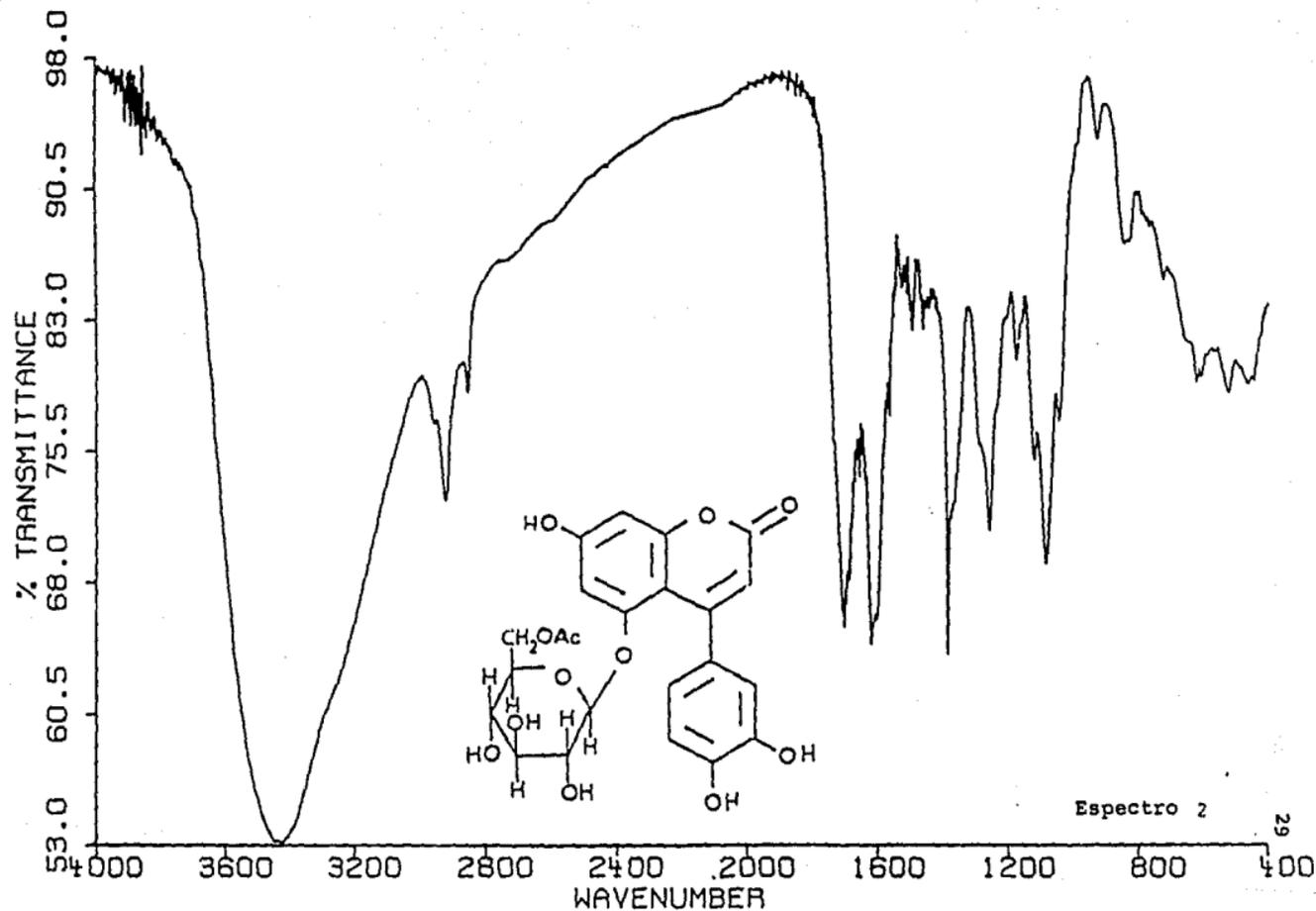
(Espectro 3)

RMN¹³C : 20.64 ($\underline{CH_3CO-}$), 63.24 (C-6''), 69.58 (C-4''), 72.9
(DMSO- d_6 , δ) (C-2''), 73.75 (C-5''), 76.00 (C-3''), 97.47 (C-8),
99.78 (C-6), 100.24 (C-1''), 100.90 (C-4a), 109.28
(C-3), 114.52 (C-5'), 115.57 (C-2'), 119.164 (C-6
(C-4), 130.79 (C-1'), 144.20 (C-3'), 145.67 (C-4'), 155.
(C-4), 156.05 (C-8a), 156.76 (C-5), 160.085 (C-2)
165.33 (C-7), 170.35 ($\underline{CH_3CO-}$)

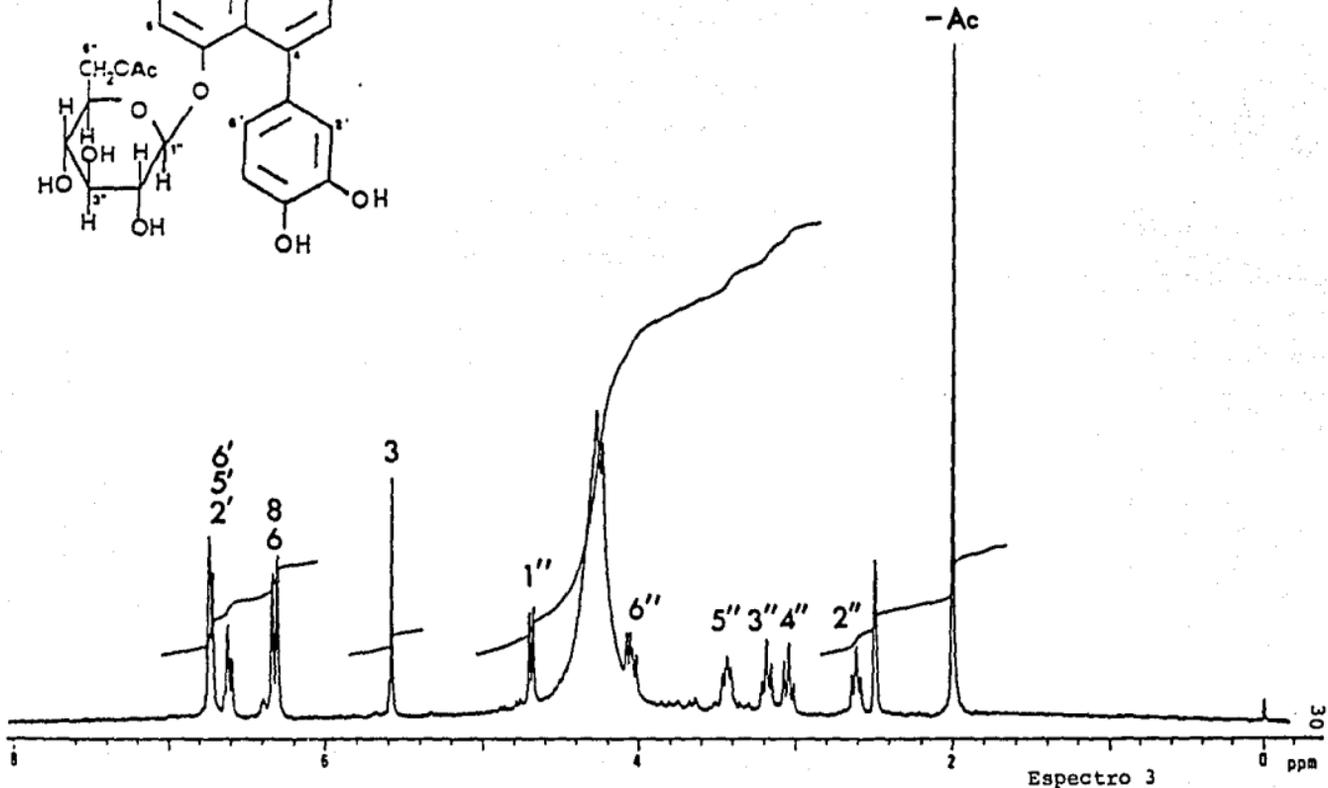
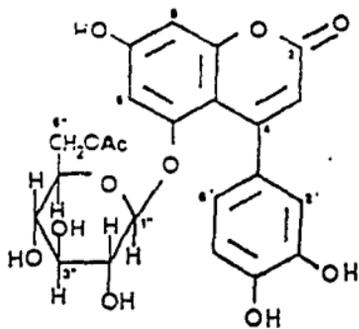
(Espectro 4)

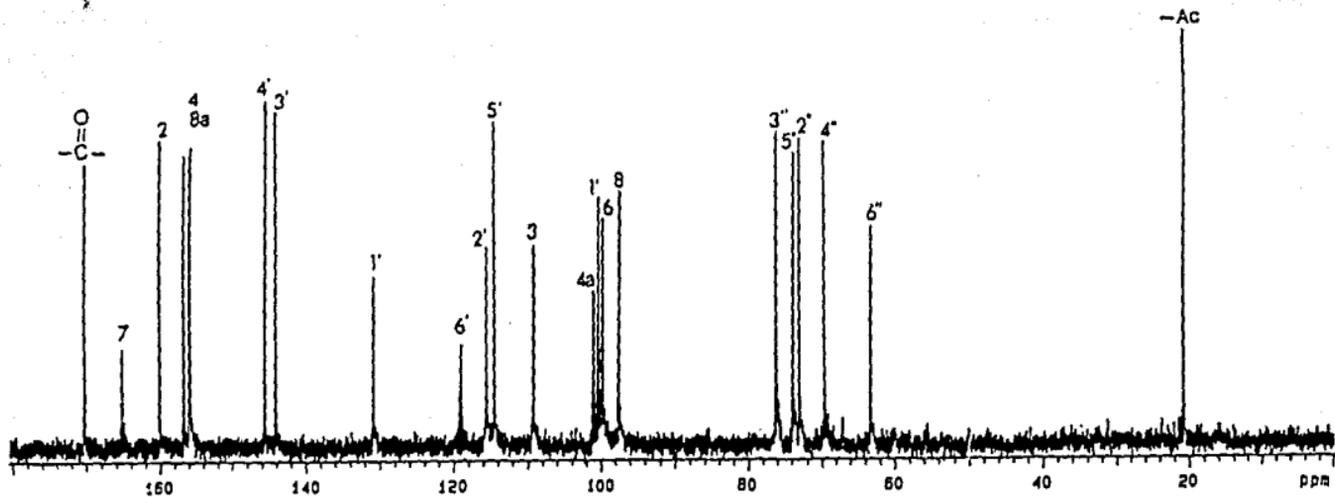
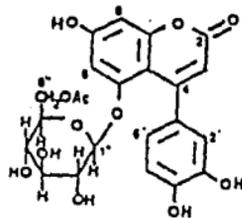


Espectro 1



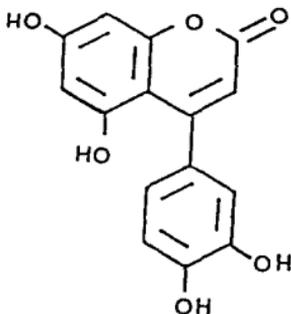
Espectro 2





Espectro 4

CUADRO 6. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, 14A.



F.M. : $C_{15}H_{10}O_6$

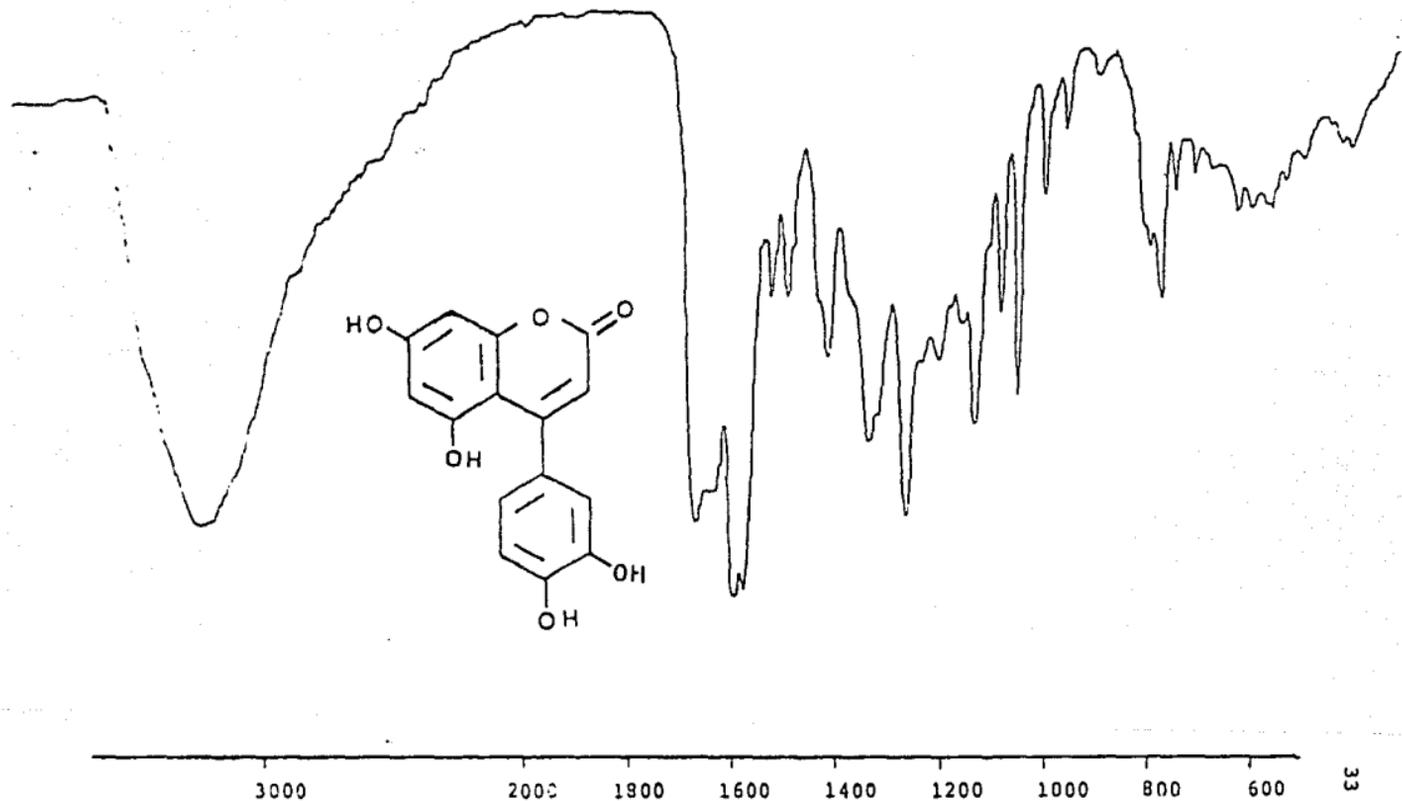
P.M. : 286 g/mol

P.F. : 217-220 °C

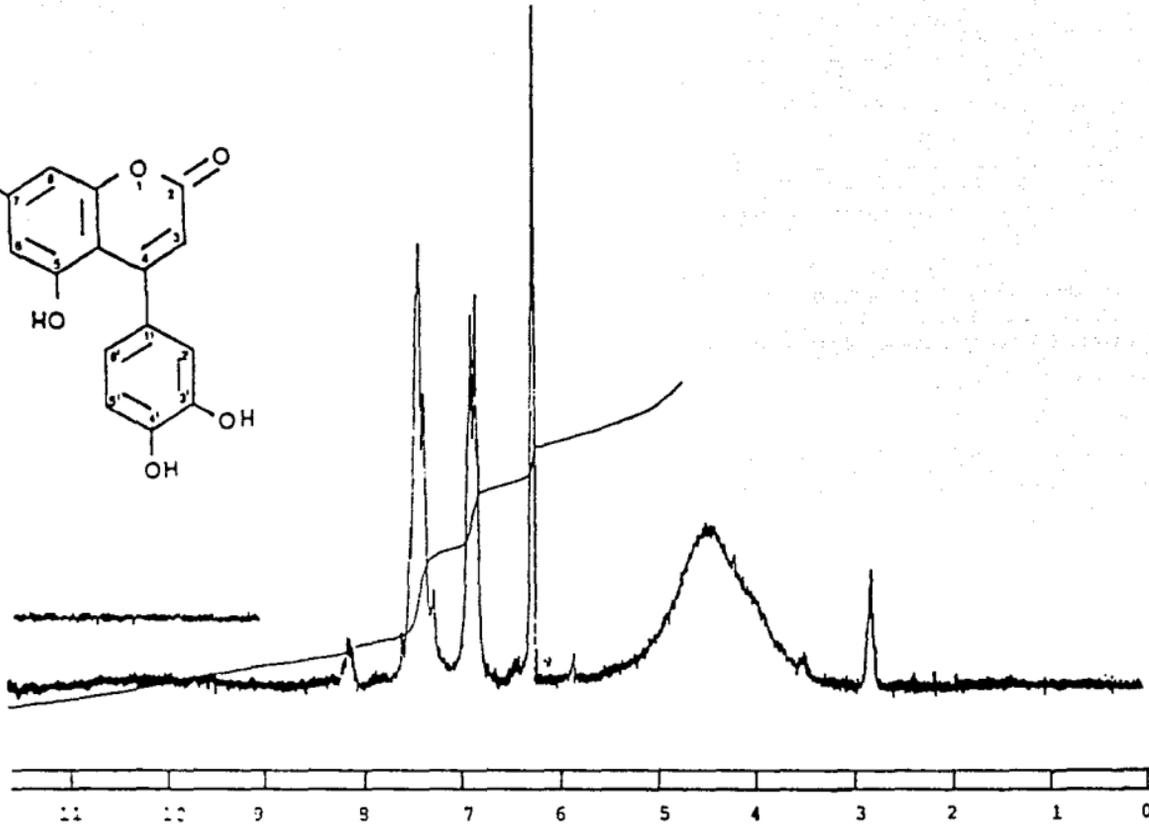
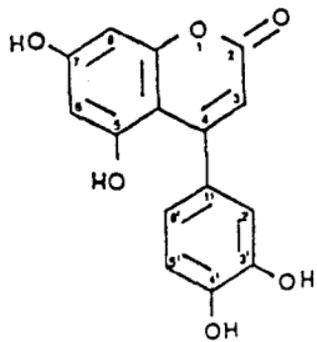
KBr
I.R. ν cm^{-1} : 3300, 1700, 1660, 1620, 1605, 1550,
máx. 1520, 1440, 1370, 1300, 1160, 1120,
1080, 1040, 1000, 810 (Espectro 5)

RMN¹H : 5.59 (s, 1H, H-3), 6.06 (d, 1H, J= 3Hz, H-8)
(DMSO- d_6 , δ) 6.16 (d, 1H, J= 3Hz, H-6), 6.4-6.8 (m, 3H, H-2',
H-6', H-5')

(Espectro 6)

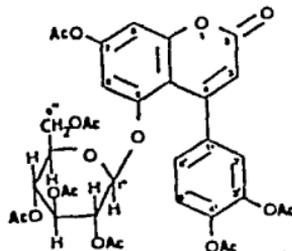


Espectro 5



Espectro 6

CUADRO 7. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-(tetracetil- β -D-glucopiranosil)-7,3',4'-triacetoxi-4-fenilcumarina, 14B



F.M. : $C_{30}H_{34}O_{18}$

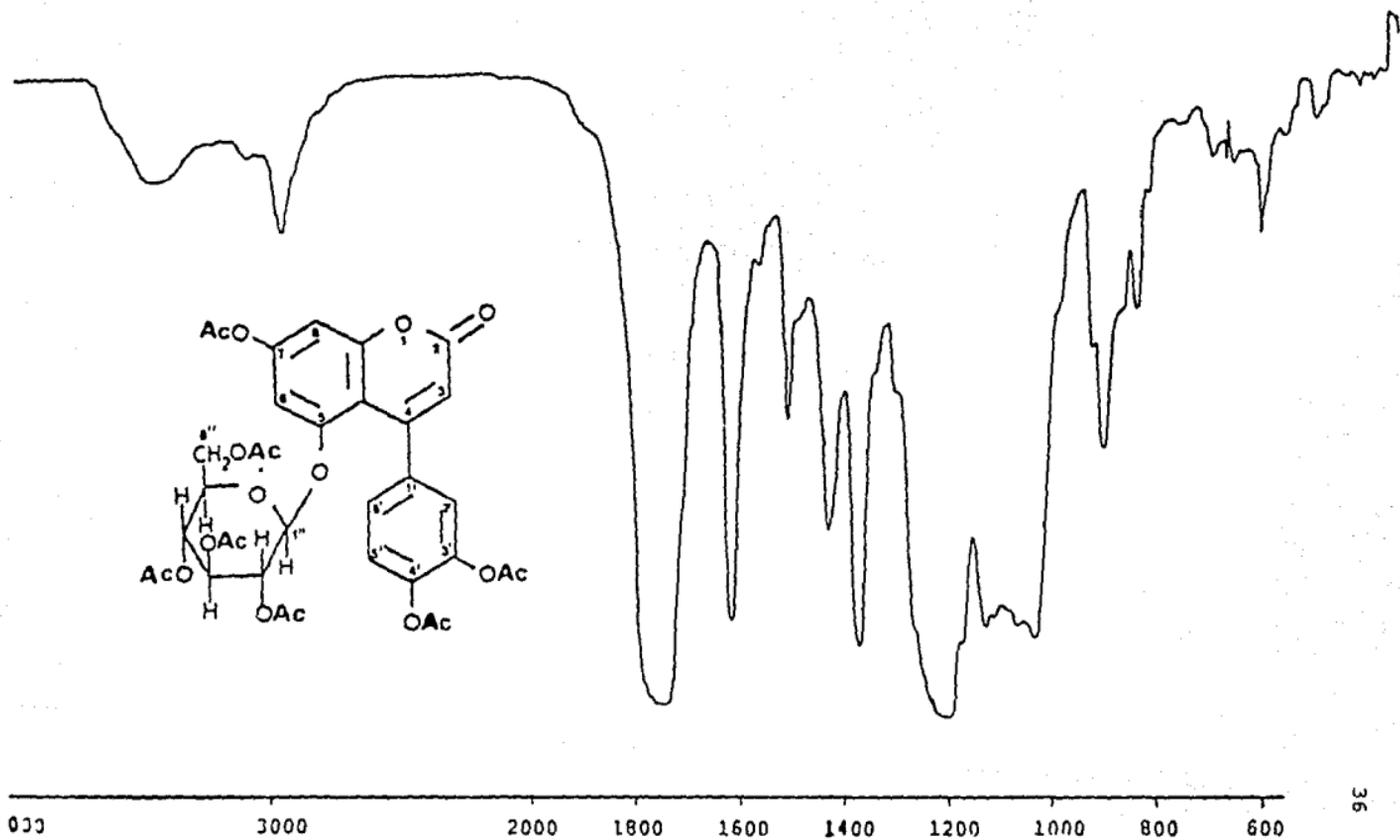
P.M. : 683 g/mol

P.F. : 71-73 °C

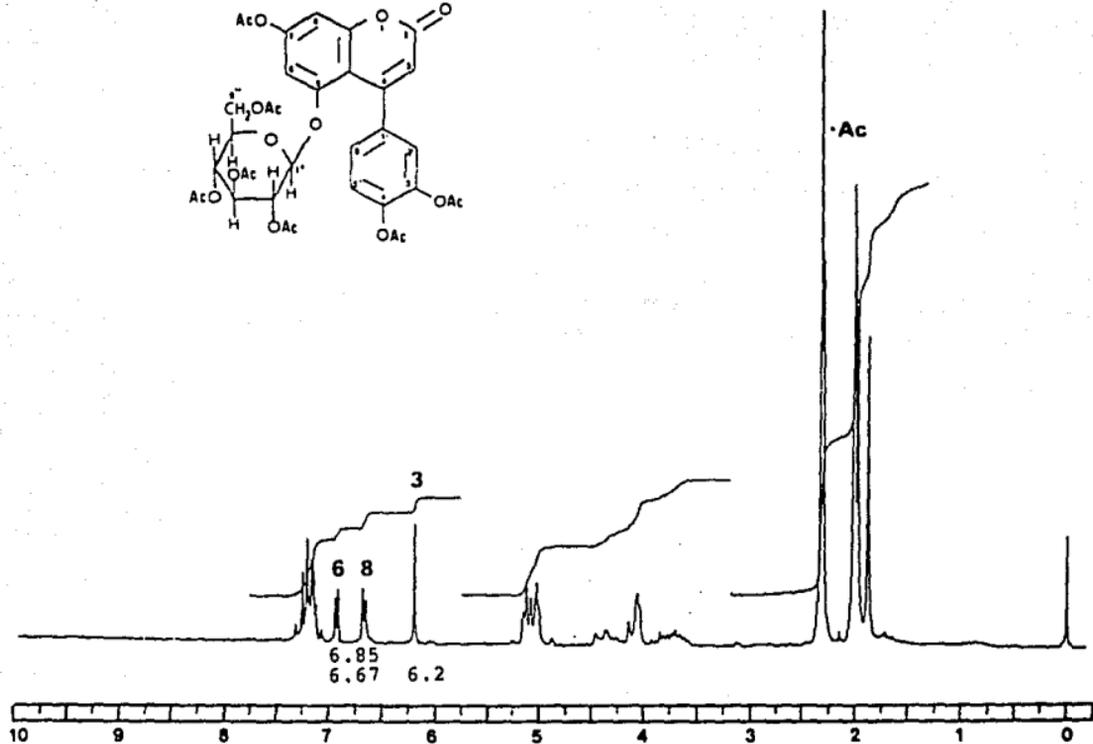
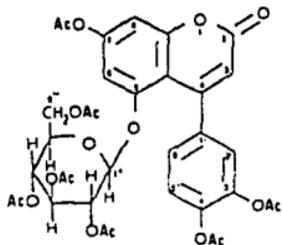
I.R. ν cm^{-1} : 1780, 1720, 1600, 1500, 1420, 1360,
 máx. 1200, 1110, 1020, 900, 830, 600

(Espectro 7)

RMN¹H : 1.89 (s, 3H, CH_3 -CO-), 1.99 (s, 3H, CH_3 -CO-), 2
 (s, 6H, $2CH_3$ -CO-), 2.34 (s, 6H, $2CH_3$ -CO-), 3.5-5.2
 (m, 7H, H1'-H-6"), 6.2 (s, 1H, H-3), 6.67 (d,
 1H, J= 3Hz, H-8), 6.93 (d, 1H, J= 3Hz, H-6),
 7.05-7.35 (m, 3H, H-2', H-6', H-5').
 (Espectro 8)

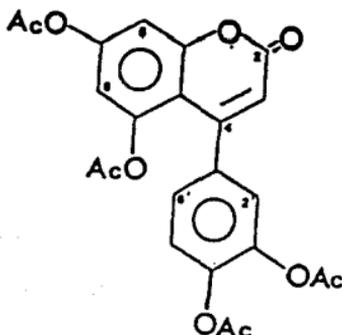


Espectro 7



Espectro 8

CUADRO 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7,3',4'-tetracetoxi-4-fenilcumarina, 14C



F.M. : $C_{23}H_{19}O_{10}$

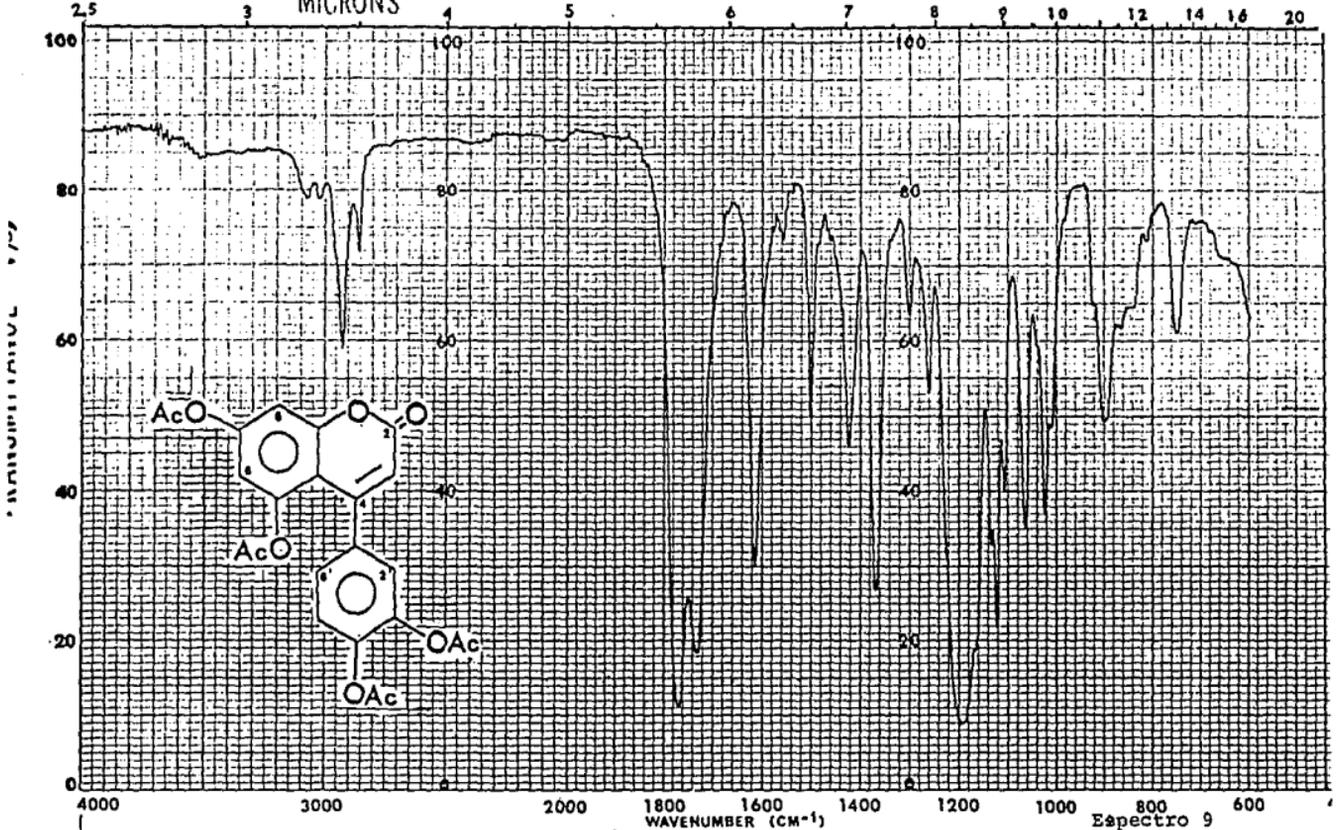
P.M. : 455 g/mol

KBr
I.R. ν cm^{-1} : 3050, 2920, 2850, 1780, 1730, 1610,
máx. 1500, 1420, 1370, 1200, 1120, 1060, 1020,
900, 750

(Espectro 9)

RMN¹H : 1.80 (s, 3H, CH_3 -CO-), 2.25 (s, 3H, CH_3 -CO-), 2.32 (s, 3H, CH_3 -CO-), 2.34 (s, 3H, CH_3 -CO-), 6.29 (s, 1H, H-3), 7.10 (1H, d, J=3Hz, H-6), 7.28 (1H, d, J=3Hz, H-8), 7.34 (1H, dd, J=8, 3Hz, H-6'), 7.43 (1H, d, J=3Hz, H-2'), 7.50 (1H, d, J=8Hz, H-5').

(Espectro 10)



SAMPLE 05-1-97-A

SOLVENT petroleum

SCAN 1224

SINGLE B. _____

REMARKS.

CONC _____

SLIT N

T.D. SPEED. _____

CELL PATH _____

OPERATOR Wick

ORD. EXP. _____

REFERENCE air

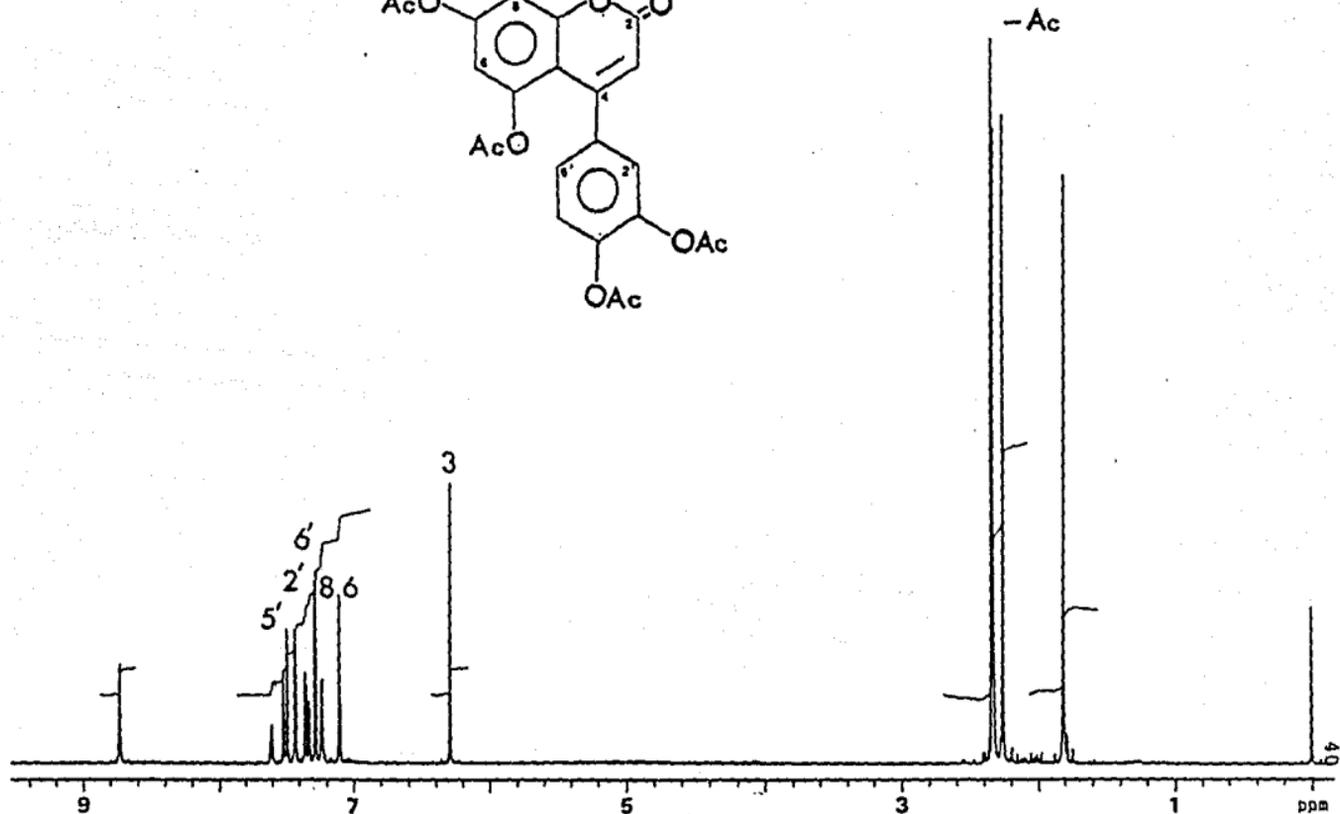
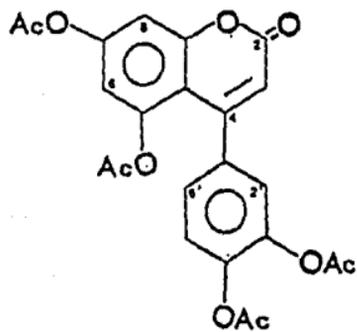
DATE 11-1X-90

T.CONST _____

ORIGIN Dr Rachel Hark

No. 5102-1000

REF. No. 229



Espectro 10

4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Sucesivas cromatografías en columna y capa delgada de un grupo de las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico de *H. latiflora* (Sesse et Mociño ex DC) Bullock, permitieron el aislamiento de un nuevo producto natural, el cual fue caracterizado como la 5-O-(6"-acetil- β -D-glucopiranosil)-7, 3', 4' - trihidroxi-4-fenilcumarina. El análisis de las evidencias químicas y espectroscópicas que permitieron determinar su estructura se discute a continuación.

El producto 14 se aisló como un sólido cristalino de color amarillo soluble en metanol con p.f.=205-208°C . Su fórmula molecular se estableció como $C_{23}H_{22}O_{12}$ por análisis elemental; las características de solubilidad del compuesto, así como su comportamiento frente al reactivo de Molisch sugirieron su naturaleza glicosídica. La hidrólisis ácida (HCl 1N) de una pequeña cantidad del producto natural permitió detectar a la glucosa como único carbohidrato presente en el producto de hidrólisis.

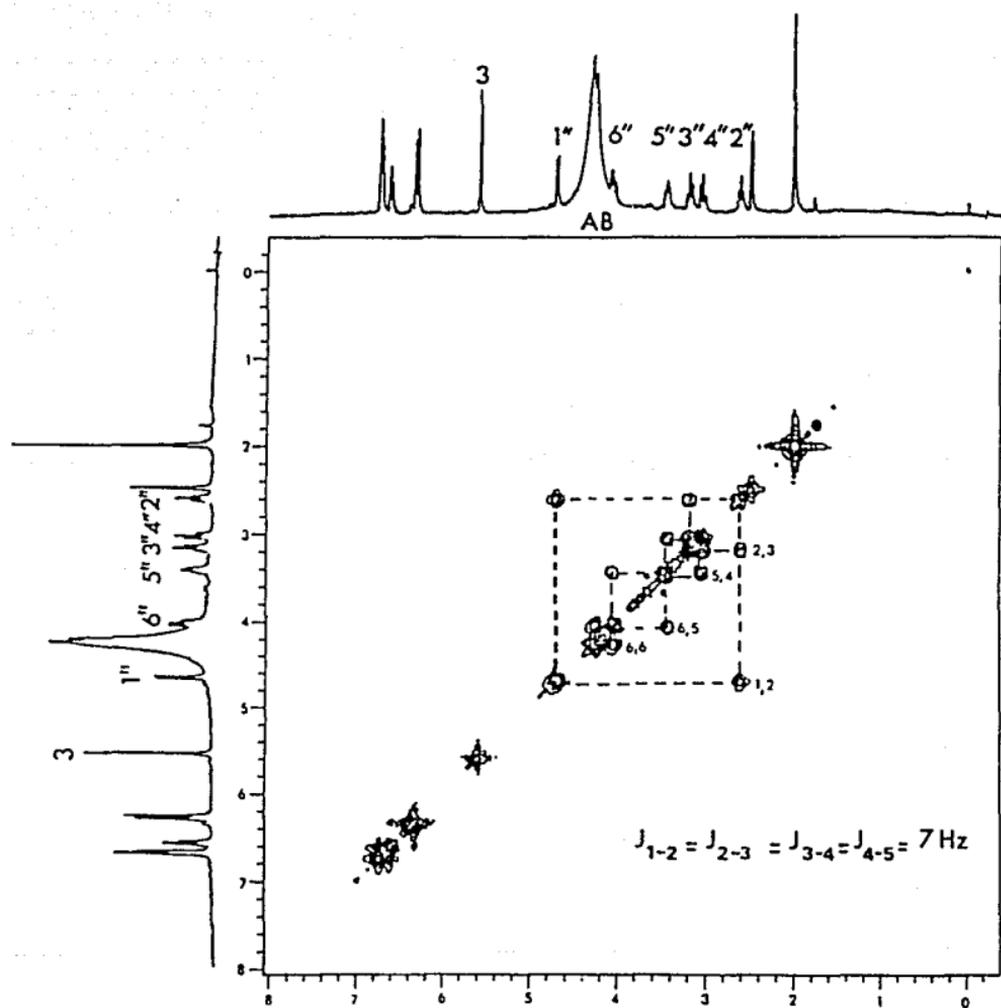
Los máximos de absorción observados al UV (258 y 331 nm) y las bandas a 1701 y 1618 cm^{-1} en el espectro de IR indicaron a priori que el compuesto era una fenilcumarina (Aquino, 1988; Mata et al, 1987, 1988, 1990)

El espectro de RMN'H en DMSO- d_6 (espectro 3) presentó señales para:

- a) Cinco hidrógenos aromáticos entre δ 6.2 y δ 6.8.
- b) El protón vinílico H-3 de una 4-fenilcumarina a δ 5.58.
- c) El protón anomérico α orientado de una hexosa a δ 4.68 (d, J=7 Hz) .
- d) Varios grupos hidroxilo en δ 4.25.
- e) Los hidrógenos geminales de un ester de un alcohol primario en δ 4.05 (m, 2H).
- f) Los hidrógenos geminales de las funciones oxigenadas secundarias de una hexosa (4 multipletes en δ 3.41, δ 3.18, δ 3.02 y δ 2.60) .
- g) El singulete característico del metilo de un grupo acetato alifático en δ 2.0.

El estudio detallado del espectro de RMN'H bidimensional (Figura 1) permitió confirmar que la porción sacárida de la molécula era la 6-acetil- β -D-glucosa. Los aspectos más importantes del análisis fueron los siguientes:

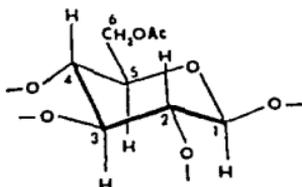
- a) La señal en δ 4.68 (H-1") correlacionaba con el doblete de dobletes (J=7 Hz) en δ 2.60 (H-2").
- b) H-2" además de interaccionar con H-1" lo hacía también con el doblete de dobletes (J=7 Hz) en δ 3.18 (H-3"). De acuerdo a las magnitudes de las constantes de acoplamiento la disposición relativa de H-2" y H-3" debía de ser trans diaxial, al igual que la de H-1" y H-2". H-3" correlacionaba adicionalmente con el doblete de dobletes (J=7 Hz) en δ 3.02 (H-4"); una vez más el valor de la constante de acoplamiento indicó una relación trans diaxial entre H-3" y H-4".


 FIGURA 1. Porción sacárida del compuesto 14

c) H-4" se acoplaba también con la señal en δ 3.41 (H-5", dd, $J=7$, 3 Hz) y esta última con el multiplete centrado en δ 4.05 (H_a-6"). La relación entre H-4" y H-5" debía ser trans de acuerdo al valor de J observado.

d) Finalmente, el multiplete centrado en δ 4.05 correlacionaba también con el multiplete centrado en δ 4.4 (H_b-6"). Es de hacer notar que H_a-6" y H_b-6" conformaban el sistema AB característico de los protones enantiotópicos del metileno de un ester de un alcohol primario. Como ya se especificó previamente, los desplazamientos químicos observados para H_a-6" y H_b-6" eran congruentes con la presencia de un ester de un alcohol primario en la molécula.

Las interacciones descritas en los incisos a al d, permitieron proponer la siguiente estructura parcial:



El arreglo de los hidrógenos y funciones oxigenadas de la estructura parcial anterior corresponden al mismo de la 6-acetil- β -D-glucosa, glicosídicamente enlazada a una aglicona a través del oxígeno hidroxilo β orientado en C-1".

Otra evidencia adicional de que la porción azucarada de la molécula era la 6-acetil- β -D-glucopiranososa fue proporcionada por el espectro de RMN ^{13}C ya que se observaron señales en 63.24 (C-6"), 69.58 (C-4"), 72.93 (C-2"), 73.75 (C-5"), 76.0 (C-3") y 100.24 (C-1") (Markham, 1982). Como se puede apreciar las señales para C-6" y C-5" se encontraban paramagnéticamente ($\Delta\delta=+3$) y diamagnéticamente ($\Delta\delta=-3$) desplazadas respectivamente, con relación a los valores normales, en congruencia con la ubicación del acetato en la posición C-6 (Markham 1982).

El espectro de RMN ^{13}C del glicósido 14 mostró además señales características para una 4-fenilcumarina con sustituyentes oxigenados en las posiciones 5,7,3' y 4' (Ver Cuadro 5 y Espectro 3).

La hidrólisis ácida de una mayor cantidad del glicósido permitió la obtención de la aglicona correspondiente 14A. El espectro de RMN'H de esta aglicona fue muy similar a la del glicósido 14 diferenciándose fundamentalmente en la ausencia de las señales para el azúcar. Las resonancias más importantes fueron las siguientes:

- a) El singulete correspondiente al H-3 (δ 5.58) del núcleo base.
- b) Un sistema AB que por analogía a los compuestos previamente aislados de la planta, era atribuible a los protones meta relacionados H-6 y H-8 del anillo A δ 6.06 (d, J=3 Hz) y δ 6.16 (d, J= 3 Hz) (Camacho, 1990).

c) Resonancias para tres hidrógenos aromáticos adicionales (6.4-6.8, m) y que debían corresponder a los del anillo B.

El tratamiento con anhídrido acético y piridina de la aglicona **14A** originó el derivado tetracetilado **14C**. Su espectro de RMN¹H en piridina permitió determinar claramente el patrón de sustitución del anillo B del núcleo cumarínico ya que, además del sistema AB correspondiente a los hidrógenos del anillo A se observó un sistema ABX.

El sistema ABX (Figura 2) era consistente con la presencia de dos grupos hidroxilos restantes en la posición 3' y 4' del núcleo base.

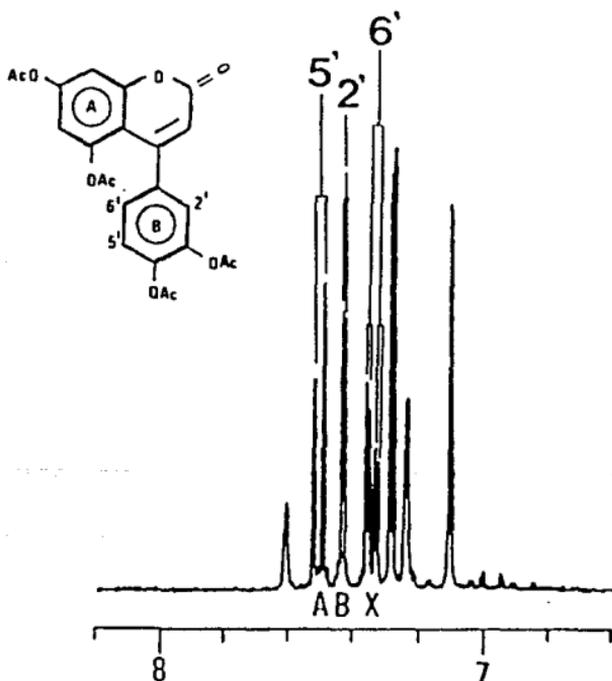


FIGURA 2: Porción aromática del compuesto **14**

La presencia de una de las señales de los grupos acetilo diamagnéticamente desplazada en el espectro de RMN'H del derivado tetracetilado ^{14}C (δ 1.80 en el espectro en piridina y δ 1.59 en el espectro en CDCl_3) y, la ausencia de tal señal en el derivado totalmente acetilado del glucósido confirmaron inequívocamente que el azúcar se encontraba en la posición cinco (Camacho, 1990).

Con base a las evidencias presentadas se identificó al compuesto obtenido como la 5 - O - (6"-acetil- β - D - glucopiranosil) - 7 , 3' , 4' - trihidroxi - 4 - fenilcumarina, el cual constituye un nuevo producto natural. Este compuesto presentó el mismo patrón de oxigenación en el núcleo cumarínico que los previamente obtenidos de la planta.

El compuesto fue evaluado contra bacterias Gram (+), Gram (-) y contra Candida albicans, encontrándose actividad contra bacterias Gram (+) (Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus).

En todos los casos la actividad se determinó a concentraciones de 100 y 50 ppm. En el caso de B. subtilis los halos de inhibición fueron de 20 y 18 mm a las concentraciones de 100 y 50 ppm respectivamente; por otra parte, los halos de inhibición observados con S. aureus fueron de 15 y 14 mm a las concentraciones correspondientes a 100 y 50 ppm.

CAPITULO II

ESTUDIO QUIMICO PRELIMINAR DE GUAZUMA ULMIFOLIA

1. ANTECEDENTES

La Guazuma ulmifolia, Lam. (sinonimias : Theobroma guazuma, Guazuma polybotrya, Cava, Guazuma tomentosa, Guazuma guazuma) conocida vulgarmente con el nombre de guazima, caulote o pixoy es una planta de la familia de las Esterculiáceas. En México se encuentra distribuida en los estados de Veracruz, Morelos, Guerrero, Tabasco, Campeche, Sinaloa, Nayarit, Tamaulipas y en general en todos los climas cálidos del país.

Su corteza es utilizada popularmente contra el paludismo, afecciones cutáneas y sifilíticas, elefantiasis, enfermedades del pecho, lepra y como agente hipocolesterolemiante. La decocción de los frutos se utiliza como remedio contra la tos y como agente hipocolesterolemiante (Martínez, 1989, Bye, 1989 y Navarrete, 1990).

La planta (Figura 3) se caracteriza por ser un arbusto o árbol de hojas cortamente pecioladas, ovadas de 4 a 16 cm de largo, agudas, aserradas, de flores pequeñas, verde amarillentas o blanquizas; frutos ovoides cubiertos de puntas cortas de 4 cms de largo por 2 1/2 cm de ancho (Martínez, 1989).

Desde el punto de vista fitoquímico se han realizado varias investigaciones sobre esta planta. Estos estudios han permitido el aislamiento y caracterización de varios triterpenoides (Anjaneyulu y Suryanarayana, 1977a ,1977b, 1980), algunos flavonoides (Sankara y Narayana, 1963), el lignano sirangaresinol; dos cumarinas y el β -sitosterol (Anjaneyulu y Suryanarayana, 1980). En el Cuadro 9 se resumen estos estudios y como se puede apreciar en el mismo los frutos de la planta no han sido objeto de estudios químicos.

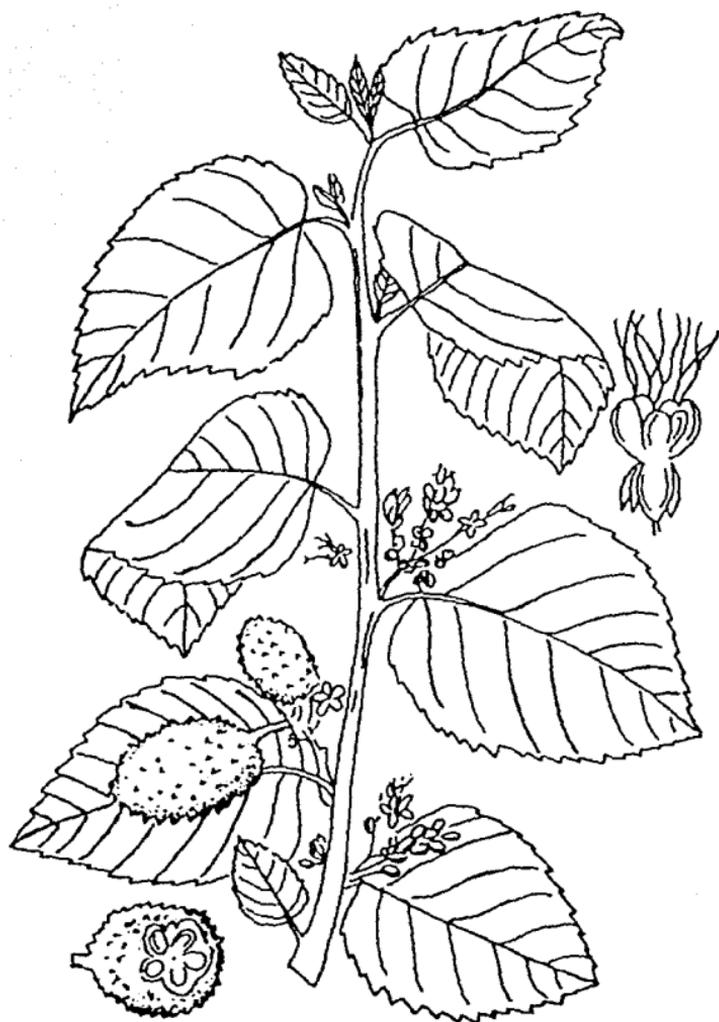
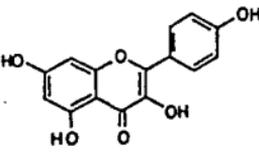
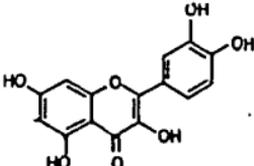
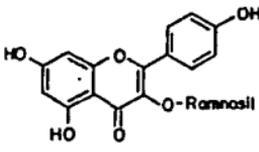
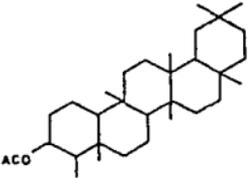
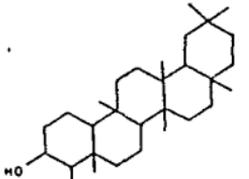
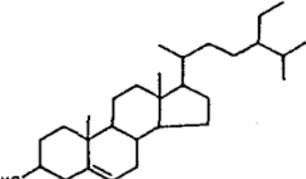


FIGURA 3 **GUAZUMA.** *Guazuma tomentosa.*

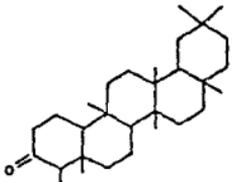
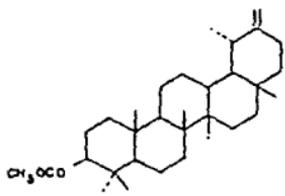
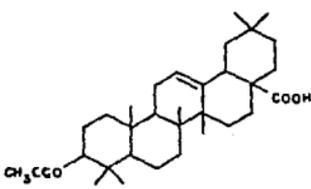
CUADRO 9. Metabolitos aislado de *G. ulmifolia*.

Parte de la Planta: FLOR	
Kaempferol	
Quercitina	
Kaempferitrina	

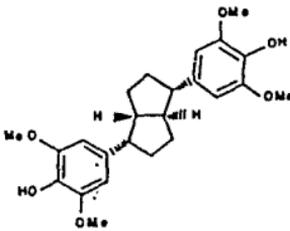
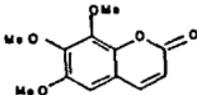
CUADRO 9. Metabolitos aislado de *G. ulmifolia* (Continuación).

Parte de la Planta: HOJAS	
3-Acetilfriedelina	 <chem>CC(=O)C12CCC3[C@@]1(CC[C@H]2[C@@H]3CC)C[C@]4(C)CC5=C(C)CC[C@@]4(C)5</chem>
Friedelin-3 β -ol	 <chem>OC12CCC3[C@@]1(CC[C@H]2[C@@H]3CC)C[C@]4(C)CC5=C(C)CC[C@@]4(C)5</chem>
β -Sitosterol	 <chem>CC(C)C(C)CC[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C</chem>

CUADRO 9. Metabolitos aislado de *G. ulmifolia* (Continuación).

Parte de la Planta : CORTEZA	
Friedelina	
Acetato de taraxerilo	
Acido acetil oleanólico	

CUADRO 9. Metabolitos aislado de *G. ulmifolia* (Continuación).

1-Hexacosanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_2\text{OH}$
Sirangaresinol	
6,7,8-Trimetoxicumarina	

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Vegetal

El fruto seco de G. ulmifolia se obtuvo en el Puesto Ramírez, Mercado de Sonora, México D.F. , en noviembre de 1989. El material fue identificado por el Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM) y una muestra de herbario se depositó en la Colección etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher: Bye y Linares 17702) .

El material vegetal fue molido en un molino de cuchillos tipo Wiley 4.

2.2. Métodos de extracción y fraccionamiento.

El material vegetal molido se extrajo con una mezcla de acetato de etilo y cloroformo (1:1) de acuerdo al procedimiento señalado en el Esquema 3.

El extracto resultante (136.39 g) se fraccionó vía una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (1360 g de sílica gel G Merck 70-230 malla). El proceso de elución se inició con hexano y se prosiguió con mezclas hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol en distintas proporciones. Se recogieron un total de 490 fracciones de 500 ml cada una; cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares.. En el Cuadro 10 se enlistan los sistemas de

eluyentes utilizados, los números de las fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

2.3. Aislamiento y Purificación de los Compuestos.

2.3.1 Obtención del β -sitosterol, 12.

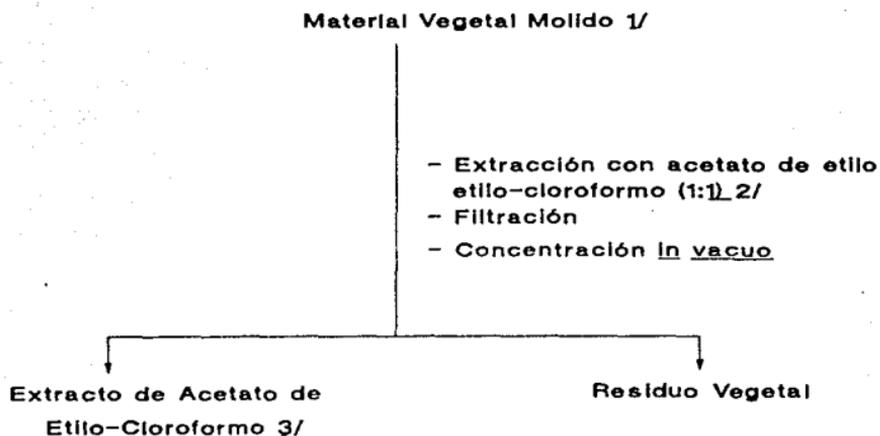
De las fracciones 157-163 de la columna original Cuadro 10 se obtuvo un sólido cristalino blanco, p.f. 140-142 °C. La cantidad total obtenida fue de 150 mg.

2.3.2. Obtención del glucósido del β -sitosterol, 15.

De las fracciones 382-394 de (Cuadro 10) se obtuvieron 140 mg de un polvo blanco de p.f. 243-246 °C

2.3.3. Obtención de la mezcla I metilada para la determinación del contenido de ácidos grasos y esteroides presentes en el extracto de acetato de etilo-cloroformo de los frutos de G. ulmifolia

Las fracciones combinadas 164-176 de la columna original (Cuadro 10) se disolvieron en éter y fueron tratadas con un exceso de una solución etérea de diazometano, preparada de acuerdo a la técnica habitual. Al cabo de 24 horas de reacción, se eliminó el disolvente por concentración al vacío, obteniéndose 5.6 g. de un residuo sólido (Mezcla I metilada).



1/ Cantidad del material vegetal 4.6289 Kg.

2/ Extracción con maceración (3 veces por periodos de 2 días cada vez)

3/ Cantidad total del extracto 136.39 g.

ESQUEMA 3. *Extracción de los frutos de Guazuma ulmifolia*

CUADRO 10. RESUMEN DEL FRACCIONAMIENTO VIA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO-CLOROFORMO DE *G. ULMIFOLIA*

Eluyente	Proporción	No. fracciones	Fracciones combinadas
Hexano	100	1-34	1-4, 5-17, 18-19, 20-31
Hex-CHCl ₃	90:10	35-59	32-37, 38-59
Hex-CHCl ₃	80:20	60-159	60-74, 75-108, 109-131, 132-146
Hex-CHCl ₃	70:30	160-256	147-160, 161-163, 164-176, 177-231, 232-238
Hex-CHCl ₃	60:40	257-301	239-302
Hex-CHCl ₃	50:50	302-315	303-317
Hex-CHCl ₃	40:60	316-333	318-321
Hex-CHCl ₃	30:70	334-342	322-344
Hex-CHCl ₃	20:80	343-353	345-357
CHCl ₃	100	354-358	
CHCl ₃ -MeOH	99:1	359-366	358-381
CHCl ₃ -MeOH	97:3	367-372	
CHCl ₃ -MeOH	95:5	373-425	382-421
CHCl ₃ -MeOH	90:10	426-455	422-436, 437-454
CHCl ₃ -MeOH	80:20	456-474	455-459, 460-463, 464-479
CHCl ₃ -MeOH	70:30	475-490	480-486, 487-488, 489-490
CHCl ₃ -MeOH	50:50	491-504	494-496, 497-499, 500-503
MeOH	100	505-600	504-600

2.4 Caracterización de los compuestos aislados.

2.4.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

Los aparatos para obtener las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados fueron los mismos que se utilizaron en el estudio fitoquímico de H. latiflora (Capítulo I, sección 2.5.1)

2.4.2. Acetilación de los compuestos 12 y 15.

La acetilación del β -sitosterol y del β -D-glucositosterol se realizó utilizando la técnica convencional que se describió en el capítulo I, sección 2.5.3.

2.4.3. Determinación del contenido de ácidos grasos y esteroides de la Mezcla I mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.

El análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas de la Mezcla I metilada se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5988A. La columna utilizada fue del tipo metil silicon MB, con una longitud de 30 m por 0.3 mm de diámetro. El espesor del film fue de 0.52 micrómetros. El gas acarreador empleado

fue Helio con un flujo de 1 ml/min. La temperatura de la columna se programó de 150 °C a 275 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto. La temperatura del inyector y detector fue de 275 °C. El voltaje para el registro de los espectros de masas fue de 70 V. Las masas se registraron en un rango de 33-600 amu. Para la caracterización individual de los componentes de la mezcla se utilizaron los patrones correspondientes de los ácidos grasos y esteroides vegetales más comunes.

3.0 RESULTADOS Y DISCUSION

La cromatografía preparativa en columna del extracto acetato de etilo-cloroformo de los frutos de *G. ulmifolia* permitió el aislamiento de una mezcla de ácidos grasos y esteroides (Mezcla I). El análisis vía cromatografía de gases-espectrometría de masas de la Mezcla I metilada permitió la detección e identificación de 5 ésteres metílicos de ácidos grasos y cuatro esteroides. Los ésteres metílicos identificados corresponden a los ácidos: mirístico (16), palmitoleico (17), palmítico (18), linoleico (19) y oleico (20). Los esteroides fueron caracterizados como el campesterol (21), estigmasterol (22), sitosterol (12) y sitostanol (23). En los Cuadros 11 y 12 se resumen los tiempos de retención, proporción y fragmentos de masa más importantes para cada uno de los compuestos antes mencionados.

Los espectros de masas (Espectros 11, 12, 13, 14 y 15) de los ésteres metílicos de los cinco ácidos fueron muy similares. En todos los casos se detectaron los iones moleculares correspondientes y los fragmentos diagnósticos para los ésteres metílicos de ácidos grasos a m/z M-31, 74, 87 y 59 (Silverstein, Bassler y Morrill, 1981). En la Figura 4 se representa la formación de los iones antes mencionados.

El pico a m/z 74 es el más característico y se debe al rearrreglo de McLafferty.

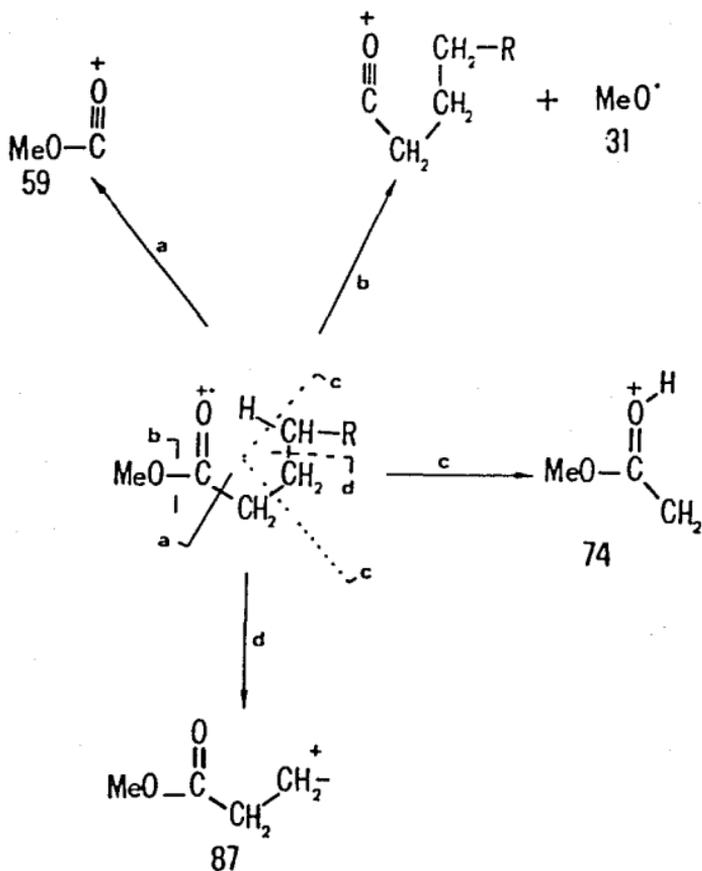


FIGURA 4. Formación de los iones M-31, 59, 74 y 87 de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

El más abundante de los ácidos caracterizados fue el ácido linoleico, que se encontró en un proporción de 38.07%.

En relación a los esteroides el más abundante fue el sitosterol y al igual que en el caso de los ácidos grasos todos los espectros de masas (Espectros 16, 17, 18 y 19) presentaron el perfil típico de fragmentación para este tipo de compuestos. Los fragmentos de masa más importantes, se observaron a M-15, M-18, M-15-18 y M-18-cadena lateral (Duffield, 1969).

Adicionalmente se aislaron de las fracciones 157-163 y 382-394 (Cuadro 10, Sección 2.1) β -sitosterol y β -D-glucositolsterol, los cuales fueron identificados por comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las de muestras auténticas.

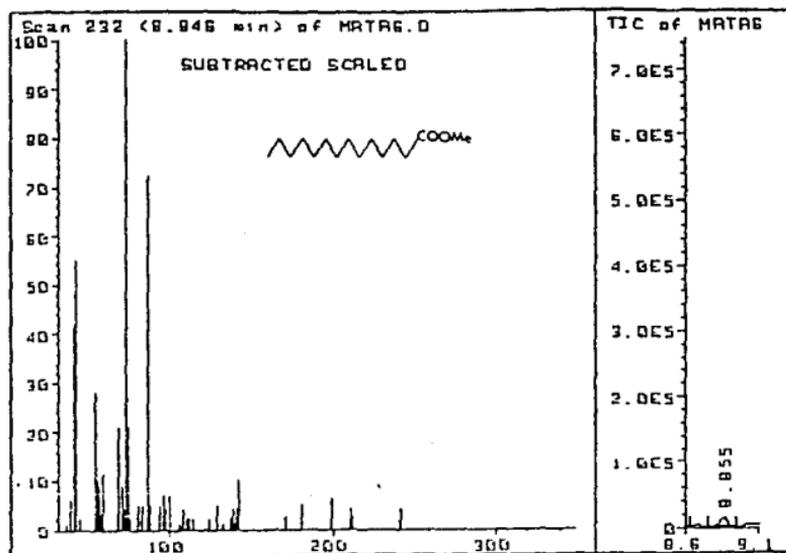
La presencia de fitoesteroides y ácidos grasos insaturados en los frutos de G. ulmifolia podría estar correlacionada con el uso popular del fruto como agente hipocolesterolemiante. El alto contenido de ácidos grasos insaturados explicaría el efecto hipocolesterolemiante de los extractos metanólico y hexánico, evaluados por Navarrete (1990). El conjunto de estas investigaciones validan el uso etnomédico como agente hipocolesterolemiante del fruto de Guazuma ulmifolia.

En este estudio no fue posible aislar ninguna de las sustancias previamente descritas como constituyentes normales de la corteza y de la flor, lo cual puede ser debido a variaciones ontogénicas o a la diferencia de composición de los diferentes órganos.

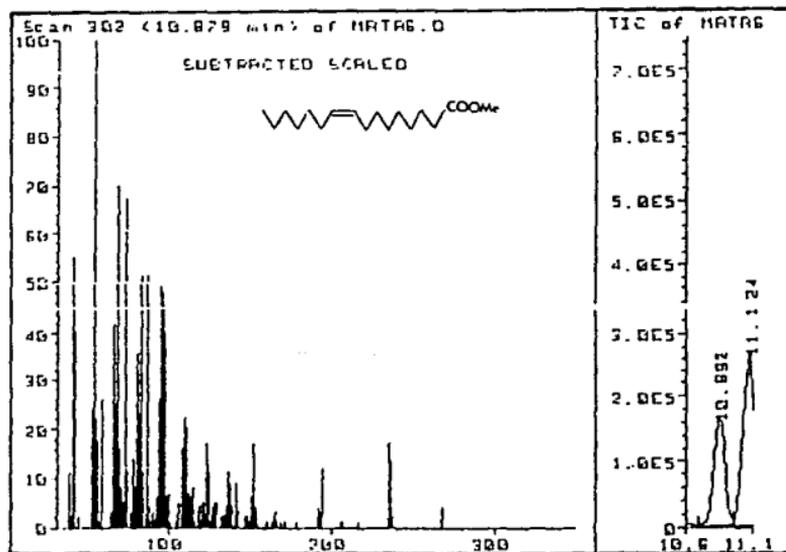
Cuadro 11. Acidos Grasos contenidos en el fruto de *G. yimifolia*

NOMBRE *	TR	***	FORMULA	PM	FRAGMENTOS				OTROS	NO. DE ESPECTRO
					M ⁺	M-31	74	87		
AC. MIRISTICO (16)	8.846	6.67	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242	4	4	100	72	213(M-29,2) 199(M-43,6) 75(21);69(21) 55(28);41(42)	11
AC. PALMITOLEICO (17)	10.87	13.55	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	268	4	13	67	51	98(40);97(48); 84(49);75(11); 69(70);55(100)	12
AC. PALMITICO (18)	11.13	21.51	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	6	4	100	65	75(18);69(12); 55(24);43(26); 41(21)	13
AC. LINOLEICO (19)	12.94	38.07	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	6	6	19	14	265(M-29,1); 75(1);67(100); 43(22);41(50)	14
AC. OLEICO (20)	13.12	13.02	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	296	3	17	89	73	75(9);69(100); 43(64);41(18)	15

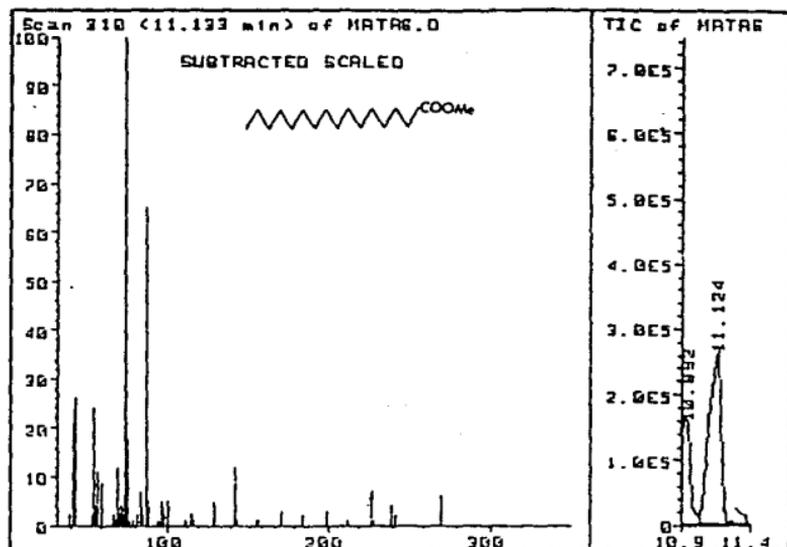
* Identificado como el correspondiente ester metilico
 ** Referido a la mezcla total metilada



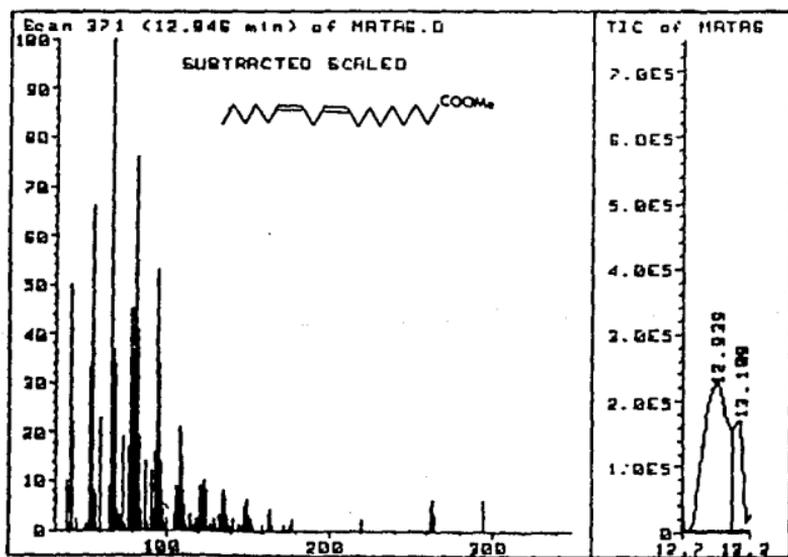
Espectro 11



Espectro 12

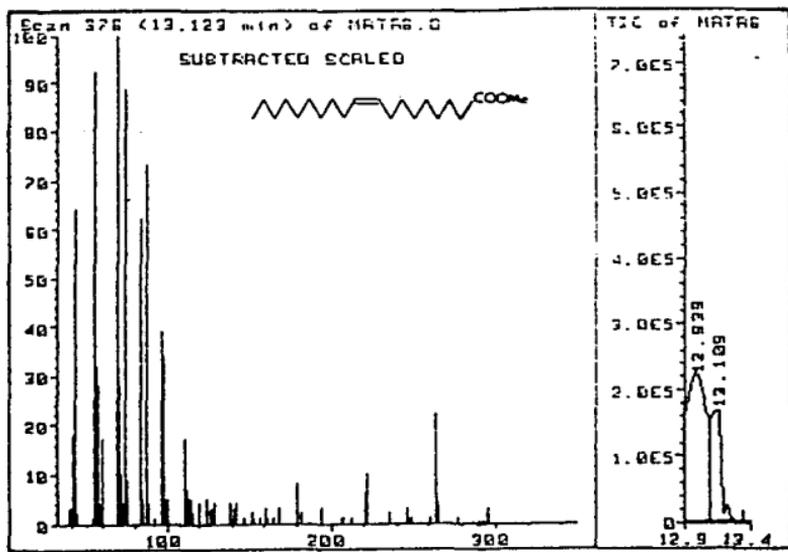


Espectro 13



Espectro 14

ESTA TESIS
SALA DE LA
UNIVERSIDAD
NACIONAL



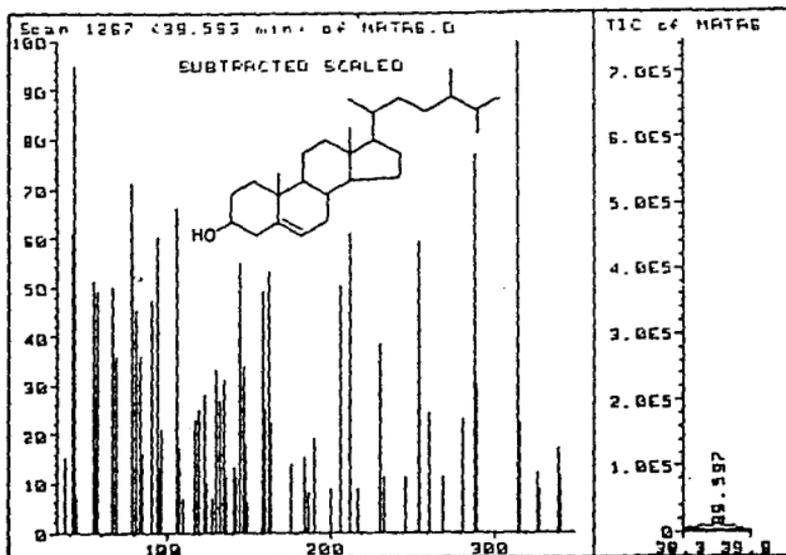
Espectro 15

Cuadro 12. Esteroles contenidos en el fruto de Guazuma ulmifolia

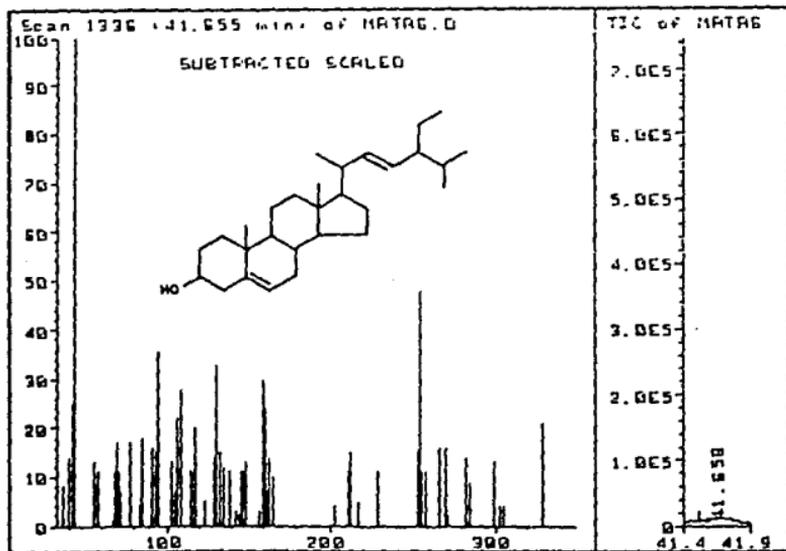
NOMBRE	TR	%	FORMULA	PM	FRAGMENTOS					OTROS	NO. DE ESPECTRO
					M	M-15	M-18	M-15-18	M-18-CL		
CAMPESTEROL (21)	39.59	2.24	C ₂₇ H ₄₈ O	400	88	53	82	71	59	315(M-18-67,100) 289(M-33-18,77) 43(95)	16
ESTIGMASTEROL (22)	41.65	0.13	C ₂₈ H ₄₈ O	412	57	5	40	13	48	351(40);43(100) 131(33)	17
SITOSTEROL (12)	45.68	8.74	C ₂₈ H ₅₀ O	414	67	16	40	30	91	91(79);95(100) 123(43);145(33)	18
SITOSTANOL (23)	46.23	2.04	C ₂₈ H ₅₂ O	416	12	-	4	-	31	371(6); 255 (31) 185(33); 81(100)	19

* Referido a la mezcla total metilada

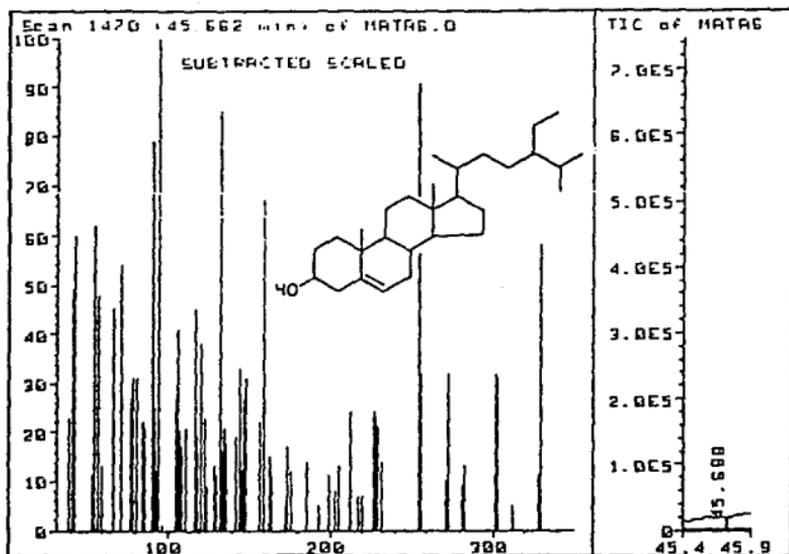
** CL: cadena lateral



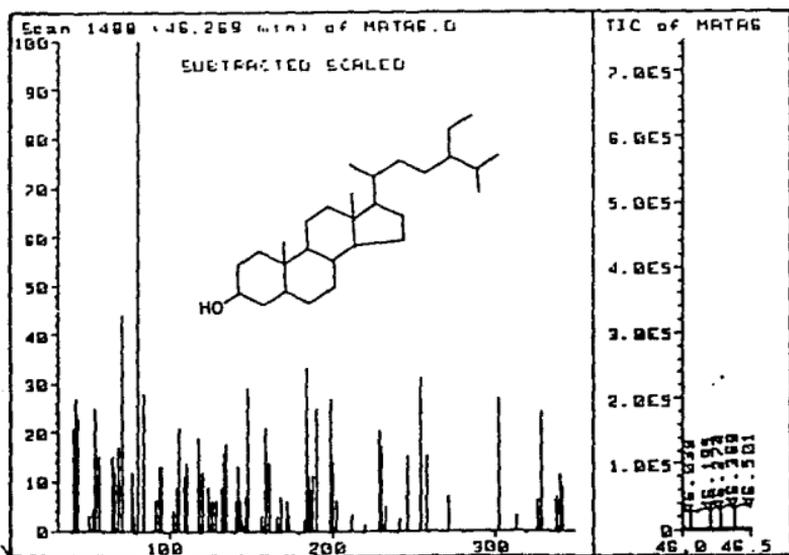
Espectro 16



Espectro 17



Espectro 18



Espectro 19

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan de ambos capítulos son las siguientes:

1. El estudio fitoquímico convencional de las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico de Hintonia latiflora permitió el aislamiento y caracterización de una fenilcumarina, la cual fue identificada como la 5-O-(6"-acetil- β -D-gluopiranosil)-7,3',4'-trihidroxil-4-fenilcumarina, un nuevo producto natural. El compuesto presentó moderada actividad contra bacterias Gram (+) (B. subtilis y S. aureus). Dicho estudio también permitió el aislamiento de otra sustancia que se encuentra en proceso de caracterización.

2. El estudio fitoquímico convencional del extracto de acetato de etilo-cloroformo del fruto de Guazuma ulmifolia permitió la detección e identificación de cinco ácidos grasos y cuatro esteroides. Los ácidos grasos se identificaron como el ácido mirístico, el ácido palmítico, ácido palmítico, ácido linoleico y ácido oleico; mientras que los esteroides se identificaron como el campesterol, estigmasterol, sitosterol y sitostanol. Adicionalmente fue posible el aislamiento del β -sitosterol y su glucósido correspondiente. La presencia de estos constituyentes podrían estar correlacionados con el uso popular del fruto como agente hipocolesterolemiante.

En esta investigación no se encontraron ninguno de los compuestos previamente descritos en la literatura como constituyentes de la corteza y de las hojas de la planta. La ausencia de los mismos puede atribuirse a variaciones ontogénicas y/o a la diferencia de composición de los diferentes órganos de la planta.

BIBLIOGRAFIA

- Akerele, O., WHO Chron., 38, 78-81, (1984)
- Anjaneyulu A.S., Suryanarayana, M.; Curr. Sci., 46, 776 (1977)
- Anjaneyulu, A.S., Suryanarayana M.; Planta Medica, 32, 247 (1977)
- Anjaneyulu, A.S., Suryanarayana M.; Indian J. Chem., 20B, 85-86, (1980)
- Aquino, R.; D'Agostino, M; Simone, F.; Pizza, C.; Phytochemistry, 27, 1827 (1988)
- Bingel, A.S.; New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity, Singer-Verlag, New York, 1 (1977)
- Bye, R.; Comunicación Personal (1990).
- Camacho C. M., Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México (1990)
- Duffield, A.M., Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 2, Cap 4, pp 107-126 (1969)
- Fairbairn, J.W.; J. of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980)
- Farkas, L., J. of Ethnopharmacology, 2, 145 (1988)
- Farnsworth, N. y Bingel S.; New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity, Springer-Verlag, New York, Berlin, 1976, pp 1.

- Farnsworth, N.S.; J. of Ethnopharmacology; 2, 173-81 (1980)

- Graleffi, C.; J. of Ethnopharmacology, 2, 129 (1980)

- Pavia D. L.; Lanpman G.M.; Kriz G.S.; Introduction to Organic Laboratory Techniques,; Ed. Saunders W. B. Saunders Co., Philadelphia 1976, p. 419

- Markham, K.R.; Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press, London y New York (1982) p.8

- Martínez, M.P.; Las plantas medicinales de México, Ed. Botas , México (1989)

- Mata, R.; Calzada, F.; García, M.R.; J. Nat. Prod., 51, 836 (1988)

- Mata, R.; Calzada, F.; García, M.R.; Reguero, T.; J. Nat. Prod., 51, 851 (1988)

- Mata, R.; Camacho, M.R.; Cervera, E.; Bye, R.; Linares, E; Phytochemistry, 29 (6), 2037-2040 (1990).

- Navarrete, A.; Comunicación Personal (1990)

- Reguero, M.T.; Mata, R., Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G.; J. Nat. Prod., 50, 315 (1987)

- Reher, G; Khraus, J.L.; Sinnwell, V.; Konin, W.A.; Phytochemistry, 22, 1524 (1983)

- Rojas, A.; Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México (1990)

- Salemink, C.A.; J. of Ethnopharmacology, 2, 135 (1980)

- Sankara S., Narayana S.M.; Curr. Sci., 32, 308 (1963)

- Silverstein, Bassler y Meroill; Identificación Espectrométrica de Compuestos Orgánicos Ed. Diana, México (1981)

- Soto, R.B.; Díaz, C.F.; Yañez, R.O.; Collera, C.O.; García, F.J.; Spectros Int.J., 6, 123 (1988)

- Stahl, E.; Thin Layer Chromatography. Ed. Bolliger, H.R.; Brenner, M.; Gashirt, H. Berlin (1969)