

22  
29

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA  
MOLECULAR DE LOS CONSTITUYENTES QUIMICOS  
MAYORITARIOS DE *Casearia corymbosa* (Flacourtiaceae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
Q U I M I C O  
P R E S E N T A  
ROBERTO ANTONIO LINDIG CISNEROS

MEXICO, D. F. TESIS CON 1994  
FALLA DE ORIGEN



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.

## JURADO ASIGNADO

Presidente M. en C. María Isabel Aguilar Laurents  
Vocal Quim. Ernestina Cervera Flores  
Secretario Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas  
1er Suplente Quim. Patricia Elizalde Galván  
2do Suplente M. en C. José Gustavo Avila Zárraga

## LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Instituto de Química

Asesor: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

Supervisora técnica: M. en C. María Yolanda Ríos Gómez

Sustentante: Roberto Antonio Lindig Cisneros

Handwritten signatures of the jury members, including the Asesor, Supervisora técnica, and Sustentante, written in black ink.

A mis padres.

A mi familia.

De manera muy especial  
a mi madre, a Grandma  
y a mi tío José Antonio  
por su invaluable ayuda  
y comprensión  
todos estos años.

A Yolanda

por todo lo que me ha enseñado,  
por su ejemplo de verdadera maestra  
por su amistad y paciencia.

A Isabel y los compañeros del laboratorio 2-7  
por su amistad incondicional.

A Georgina y Eduardo, quienes alimentaron  
en años difíciles mi amor a la naturaleza.

A Sabina por compartir su vida conmigo.

**Agradezco al Dr. Guillermo Delgado el haberme permitido realizar esta tesis bajo su dirección, y el compartir conmigo su experiencia y conocimientos.**

## CONTENIDO

Pag.	
1.	Introducción.
4.	Antecedentes.
13.	Resultados.
35.	Desarrollo Experimental.
51.	Resumen y Conclusiones.
53.	Bibliografía.
56.	Apéndice: "Espectros de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas."
57.	Espectro 1. RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de poliisoprenalcanos (1).
58.	Espectro 2. RMN- <sup>13</sup> C de la mezcla de poliisopren alcanos (1).
59.	Espectro 3. DEPT de la mezcla de poliisoprenalcanos (1).
60.	Espectro 4. RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de poliisoprenalcanos acetilada (1a).
61.	Espectro 5. RMN- <sup>13</sup> C de la mezcla de poliisoprenalcanos acetilada (1a).
62.	Espectro 6. RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla de poliisoprenalcanos hidrogenada (1b).
63.	Espectro 7. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2,4-dihiroxi-3-metoxi-cinámico (2).
64.	Espectro 8. RMN- <sup>1</sup> H del ester metílico del ácido 2,4-dihiroxi-3-metoxi-cinámico (2b)
65.	Espectro 9. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico (3).
66.	Espectro 10. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2,3,4-trihidroxi-cinámico (4).
67.	Espectro 11. RMN- <sup>1</sup> H del ácido 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico (5).
68.	Espectro 12. RMN- <sup>1</sup> H de la catequina (6)
69.	Espectro 13. RMN- <sup>13</sup> C de la catequina (6).
70.	Espectro 14. RMN- <sup>1</sup> H de la catequina peracetilada (7).
71.	Espectro 15. RMN- <sup>1</sup> H del ester metílico del ácido linolénico (8).
72.	Espectro 16. RMN- <sup>13</sup> C del ester metílico del ácido linolénico (8).
73.	Espectro 17. COSY del ester metílico del ácido linolénico (8).
74.	Espectro 18. EM del decenoato de metilo (9).

**Pag.**

- 75. Espectro 19. EM del palmitato de metilo (10).
- 76. Espectro 20. EM del heptadecanoato de metilo (11).
- 77. Espectro 21. EM del oleato de metilo (12).
- 78. Espectro 22. EM del estearato de metilo (13).

## INTRODUCCION.

La cada vez mayor acumulación de conocimientos por el ser humano ha dado origen a dos tendencias dentro de la misma; una de ellas es el aumento en la especialización del conocimiento y de las habilidades adquiridas por los individuos a lo largo de sus estudios y carreras profesionales; la otra, originada por la necesidad de conjuntar diferentes ramas del conocimiento para enfrentar los problemas que plantea el estudio de la naturaleza, consiste en un enfoque holístico de los problemas.

Como resultado de la segunda, surge un enfoque integrador que da lugar a nuevas disciplinas dentro de las ciencias. Una de estas nuevas disciplinas se conoce como Ecología Química. La ecología química estudia la bioquímica de las interacciones entre diferentes especies, o entre diferentes organismos de la misma especie. Nació gracias a la conjunción de varios procesos; por un lado el avance logrado en el campo de la química en cuanto al aislamiento y determinación de la estructura molecular de compuestos orgánicos, y por el otro, el que los ecólogos se percataron del hecho de que las interacciones entre diferentes organismos debían estar mediadas, al menos en parte, por la existencia de compuestos químicos específicos (Harborne, 1982).

Dentro de estos compuestos químicos se encuentra un grupo conocido como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios son aquellos que no intervienen en el conjunto de reacciones catabólicas y anabólicas que le permiten a los organismos, como individuos, llevar a cabo las funciones del desarrollo normal, tal como el crecimiento o el reemplazo de componentes celulares.

A lo largo del tiempo y gracias a los mecanismos de la evolución, las plantas desarrollaron una serie de defensas en contra de la herbivoría. Dentro de estos mecanismos de defensa se encuentran los que son de naturaleza mecánica, como la



presencia de espinas, y los que son de naturaleza química, en este caso los metabolitos secundarios.

A su vez los herbívoros han desarrollado mecanismos que les permiten contrarrestar estas defensas e incluso integrar algunos metabolitos secundarios a su organismo, para de esta manera utilizarlos para su beneficio.

El estudio de los metabolitos secundarios de las plantas es importante no sólo para la comprensión de las interacciones entre éstas y sus herbívoros u otras plantas, sino también por el hecho de que muchos de estos compuestos, o sus derivados, han sido utilizados a lo largo de la historia de la humanidad como fármacos o como fuente de materias primas para diferentes procesos industriales.

Esta tesis es parte de un proyecto de investigación en ecología química titulado "Variabilidad de los Compuestos Secundarios en *Casearia corymbosa* y sus Efectos en Dos de sus Herbívoros Naturales", que es llevado a cabo por investigadores del Centro de Ecología y del Instituto de Química, ambas dependencias pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo desarrollado comprende la parte del estudio que es propiamente químico, es decir, el aislamiento y determinación de la estructura molecular de los componentes químicos mayoritarios presentes en las hojas de *Casearia corymbosa* (Flacourtiaceae). Esta especie es un árbol que rara vez alcanza más de 20 metros de altura y que se encuentra ampliamente distribuido desde México hasta Colombia y Venezuela (Sleumer, 1980). La hojas se obtuvieron de una muestra representativa de individuos de la Estación de Biología Chamela, en el estado de Jalisco, México.

Para llevar a buen término la separación de los componentes mayoritarios se utilizaron los procesos de extracción y técnicas cromatográficas comunes en la química de productos naturales. Dentro de estas últimas cabe mencionar, por el amplio uso del que fueron objeto, las técnicas de cromatografía en columna y en capa fina. También se

utilizaron la cromatografía de gases, así como un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectroscopía de masas.

Para la elucidación estructural de los compuestos químicos aislados se utilizó principalmente la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, tanto de hidrógeno como de carbono (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C respectivamente), y los diferentes experimentos de correlación que permite esta técnica. También se utilizaron, en los casos en que fue necesario, las técnicas de espectroscopía de ultravioleta e infrarrojo. Como ya se mencionó se usó un sistema acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas como apoyo para la elucidación estructural de mezclas. Finalmente, se recurrió a la espectrometría de masas para la caracterización de los compuestos puros.

Una vez realizadas las dos partes que conforman este trabajo de tesis, el aislamiento y la elucidación estructural, se pretende utilizar los compuestos obtenidos como patrones para evaluar la variabilidad de los mismos en diferentes individuos de *C. corymbosa*, y determinar el efecto de esta variabilidad en el desarrollo de dos herbívoros naturales de esta especie en la Estación de Biología Chamela. Se evaluarán dos especies de mariposas que son: *Mysoria affinis* (Hesperiidae) e *Hylesia lineata* (Saturniidae). La primera es un especialista, es decir, un herbívoro que se alimenta exclusivamente de una especie de planta a lo largo de su desarrollo, y la segunda es un generalista extremo, es decir que se alimenta de diversas especies vegetales a lo largo de su desarrollo.

## ANTECEDENTES

### I. Origen del Material de Estudio.

Las hojas estudiadas de *C. corymbosa* fueron colectadas en la Estación de Biología Chamela. La estación se encuentra en la costa del Estado de Jalisco, en el Municipio de la Huerta. Fue fundada en 1971 y cuenta con un área aproximada de 1600 hectáreas (Lott, 1985). Lo más impresionante cuando uno se aproxima a ella por carretera, es el impacto de las poblaciones humanas en las cercanías de la estación, los bosques originales han sido reemplazados por monocultivos o por potreros, en los cuales la vegetación original ha desaparecido casi por completo, sin embargo, cuando se entra a la estación la vegetación se muestra con toda la belleza propia de las zonas tropicales.

La vegetación de la zona es básicamente del tipo de bosque tropical caducifolio, según la clasificación de Rzedowski. La característica más notable de este tipo de asociación vegetal es la pérdida de hojas que dura de 5 a 8 meses del año (Rzedowski, 1986), lo que es una consecuencia del clima de las zonas en que se desarrollan este tipo de bosques. En la región de Chamela el clima se clasifica como Aw en el sistema de Koeppen, la precipitación anual promedio entre 1977 y 1983 fue de 733 mm, de la cual un 80.9% se recibió entre los meses de julio y noviembre (Lott, 1985), lo que causa el comportamiento estacional de la vegetación. Esta se encuentra dominada por árboles de baja altura entre los que encontramos a individuos de la especie objeto de este estudio.

## II. Descripción Botánica de *Casearia corymbosa*.

La presente descripción fue extraída de la monografía número 22 de la Flora Neotrópica, dedicada a la familia Flacourtiaceae (Sleumer, 1980).

Arbusto o árbol pequeño, rara vez de más de 20 m de altura y con el tronco de hasta 30 cm. de diámetro; la corteza blancuzca, grisácea o café opaco, lisa, que se desprende en pequeños pedazos rectangulares. Las ramas jóvenes glabras o pubescentes, rara vez tomentosas. Las hojas son descíduas o subpersistentes, variables en forma, tamaño e indumento, comunmente elíptico-oblongas a obovadas, con el ápice corto, rara vez caudadas, u obtusas a redondeadas, la base más o menos distintivamente oblicua, ampliamente atenuada a obtusa-truncada, apenas cordiforme, membranosa a papiraceo, rara vez subcoriáceo, densamente pelúcido-punteado y lineado, glabra o pubescente sobre todo al envés y en varios grados, glabrescentes, algunas veces persistentemente pubescentes o incluso suaves-tumentulosas o velutinosas ausentes, serradas a serradas-crenadas, o subenteras, 4.0-10.0(-18.0) cm de largo, (2.0-)3.0-5.0(-7.0) cm de ancho, las nervaduras laterales mas bien irregulares, en 8-10(-12) pares, en relieve en ambas caras aunque mayormente en la cara inferior, venas y venillas reticuladas más bien oscuras; peciolo de 4.0-6.0 mm de longitud, glabro o pubescente, estípulas deltoideas, pequeñas, caducas. Inflorescencia axilar, corimbosa-corimbiforme, con (3-)6-12 flores, de 1.5-2.5 cm de largo incluyendo el pedúnculo de hasta 6.0 mm de largo; pedicelos de 2.0-4.0 mm de largo en floración, acrescentes en fructificación, bracteolos deltoideos, pequeños. Flores blancas a amarillentas o verdosas. 5 sépalos, elípticos a redondeados, permaneciendo erectos en la floración, algo puberulosos en ambas caras en general, 3.0-4.0 mm de largo; anteras oblongas, 0.7 mm de largo. Estambre usualmente 8, subiguales; filamentos glabros de 2-3 mm de largo; anteras oblongoides. Lóbulos del disco lineales-espátulados, peludos, 1.0-1.5 mm de largo. Ovario ovoide, escasamente peludo sobre todo en la parte superior, atenuado hacia un estilo corto; estigma capitado. Cápsula globosa a

elipsoide, subtriqueto, usualmente con tres crestas prominentes bajas , o si hay varias semillas triquetros (cuando se secan) con tres crestas más prominentes o alas cuando el fruto tiene 1 o 2 semillas de 1.0-1.5 cm de largo y 1-1.2 cm de diámetro; pericarpio anaranjado-amarillento o rojizo cuando fresco, rojo oscuro o negruzco cuando se encuentra seco, las tres valvas recurvadas en dehiscencia, exponiendo un arilo escarlata alrededor de la semilla o semillas, estas últimas ovoides-angulosas alrededor de 0.7 cm de largo; la testa recubierta con glándulas resinosas.

### III. Estudios Fitoquímicos Previos.

La información existente hasta ahora sobre especies de la familia Flacourtiaceae se debe sobre todo a estudios realizados en géneros del Viejo Mundo. En representantes neotropicales de esta familia, se han aislado principalmente alcaloides. Se sabe que algunos géneros como *Abatia*, *Banara*, *Carpotroche*, *Casearia* y *Xylosma*, son evitados por el ganado. La familia Flacourtiaceae es la única en la que se han encontrado ácidos grasos ciclopentenílicos (Sleumer, 1980). Dentro de los ácidos aislados encontramos al ácido hydnocárpico (fig. 1) obtenido de *Hydnocarpus kurzii* (Rosenthal y Janzen, 1979)

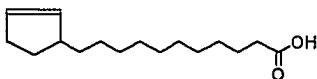


fig 1.- Acido hydnocárpico, un ácido graso ciclopentenílico.

Las tribus de las que se han aislado este tipo de compuestos son las siguientes: Pangieae, Oncobeae, Flacourtieae e Idesiinae (Rehfeldt, Schulte y Spener, 1980). De hojas de

*Caloncoba echinata* (tribu Oncobeeae), y de semillas de *Hydnocarpus anthelminthica* (tribu Pangieae) se aisló el aminoácido no proteico ciclopentenilglicina (fig. 2)

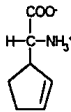
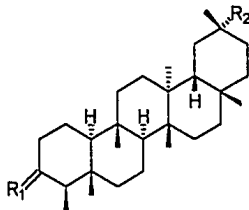


Fig. 2.- Estructura de la Ciclopentenilglicina

Este compuesto es un precursor en la biosíntesis de los ácidos grasos ciclopentenílicos (Cramer, Rehfeldt y Spener, 1980).

Esta reportado el aislamiento de los triterpenos pentacíclicos derivados del friedelano que se ilustran en la figura 3, de *Hydnocarpus octandra*, esta especie es endémica de Sri Lanka (Gunasekera y Sultanbawa, 1977).



$R_1 = H_2, O, \alpha-OH$  y  $\beta-H, \alpha-OAc$  y  $\beta-H, \alpha-H$  y  $\beta-OH$

$R_2 = H, OH$  ó  $CO_2H$

fig 3.- Triterpenos aislados de *Hydnocarpus octandra*.

Existen pocos informes en la literatura sobre el género al que pertenece el árbol estudiado con respecto al aislamiento y determinación de las estructuras moleculares de constituyentes químicos. Con inclusión de *C. corymbosa*, existen estudios publicados sobre cuatro especies del género, siendo las tres restantes, *C. sylvestris*, *C. graveolens* y *C. pitumba*.

De *Casearia sylvestris* se ha informado sobre el aislamiento de seis diterpenos de tipo clerodano con actividad antitumoral. La figura 4 ilustra el esqueleto base de esos compuestos. El más interesante, por presentar la mayor actividad biológica, es el que está sustituido de la siguiente forma:  $R_1=CH_3$ ,  $R_2=R_3=R_4=CH_3CO$  y  $R_5=CH_3(CH_2)_8CO$ . (Itokawa, *et. al*, 1989). La tabla 1 muestra los patrones de sustitución de los seis compuestos aislados de esta planta.

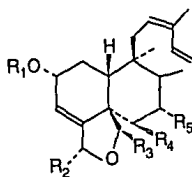


Fig 4.- Esqueleto de los diterpenos aislados de *Casearia sylvestris*.

**Tabla 1**

Patrones de Sustitución de los Diterpenos Asilados de *Casearia sylvestris*.

	R1	R2	R3	R4	R5
I	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> C=O	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO
II	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO
III	H	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CO
IV	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO	CH <sub>3</sub> C=O	H	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO
V	H	H	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> CO
VI	H	H	CH <sub>3</sub> C=O	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CO

De semillas de la especie *Casearia pitumba* se reporta el aislamiento de un diterpeno del tipo kovaleno al cual los autores han llamado pitumbina (fig. 5) (Guillet, Stoven y Lallemand, 1988). Es interesante notar que la estructura de este compuesto es parecida a la de los compuestos aislados de *C. sylvestris*.

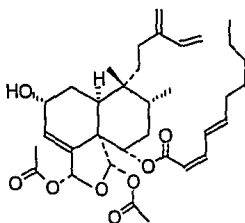


Fig. 5.- Estructura del diterpeno Pitumbina.

De la corteza de *Casearea graveolens* se aisló un cumarindiol, cuya estructura no se encontraba descrita en la literatura y que corresponde al casegravol (fig. 6) (Talapatra, *et. al.*, 1980a). En un artículo posterior (Talapatra, *et. al.*, 1980b), los mismos autores reportan el aislamiento y caracterización de todos los constituyentes del material vegetal



que estudiaron. De estos constituyentes la micromelina (fig. 6) fue la más abundante. También aislaron  $\beta$ -sitosterol y otras dos cumarinas conocidas como componentes minoritarios.

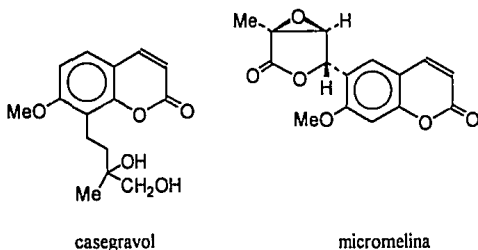


Fig 6.- Cumarinas presentes en *Casearia graveolens*.

Sobre *Casearia corymbosa*, existe un artículo que informa sobre el aislamiento de 15 diterpenos del tipo clerodano de la corteza del tallo. Nueve de estos compuestos fueron reportados por primera vez y el resto son conocidos. La corteza fue colectada en El Parque Nacional de Santa Rosa, en la Provincia de Guanacaste en Costa Rica (Khan, *et. al.*, 1990). Uno de los diterpenos aislados de esta planta es la pitumbina (fig. 5), diterpeno presente en *C. pitumba*. También informan estos autores el aislamiento y elucidación estructural del diterpeno 6 $\beta$ -cinamato de 2 $\beta$ -acetoxiisozuelanina (fig. 7), que fue obtenido de esta planta, pero que fue aislado por primera vez en la especie *Zuelenia guidonia* (Flacourtiaceae). De los diterpenos aislados siete son enantiómeros del esqueleto de la isozuelanina y dos pueden ser considerados como precursores de los anteriores.

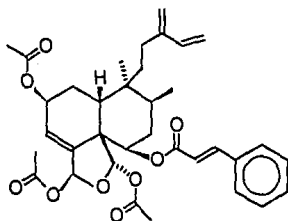
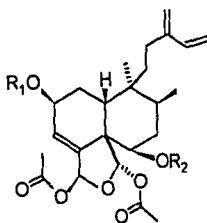


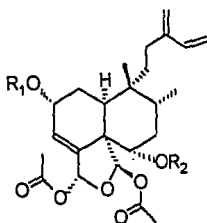
fig 7.- 6 $\beta$ -cinamato de 2 $\beta$ -acetoxiisozuelanina aislado de *Casearia corymbosa*

Los patrones de sustitución para los diterpenos aislados de la corteza de *Casearia corymbosa* son los siguientes:



I.  $R_1 = \text{Ac}$ ,  $R_2 = \text{Cin}$

II.  $R_1 = \text{Fen}$ ,  $R_2 = \text{H}$

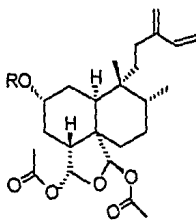


III.  $R_1 = \text{COCH}(\text{Me})\text{Et}$ ,  $R_2 = \text{H}$

IV.  $R_1 = \text{COCH}(\text{Me})_2$ ,  $R_2 = \text{H}$

V.  $\text{COCH}(\text{Me})\text{Et}$ ,  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$

VI.  $\text{R}_1 = \text{COCH}(\text{Me})_2$ ,  $\text{R}_2 = \text{CH}_3$



VII.  $\text{R} = \text{H}$

VIII.  $\text{R} = \text{Ac}$

IX.  $\text{R} = \text{COCH}(\text{Me})\text{Et}$

De esta revisión se puede concluir que en la familia Flacuortiaceae, pero en particular en el género *Casearea*, los metabolitos secundarios más abundantes en los tejidos vegetales estudiados son terpenos, específicamente diterpenos bicíclicos y triterpenos pentacíclicos, así como cumarinas.

## RESULTADOS

A partir del material vegetal, las hojas frescas de *Casearia corymbosa*, se obtuvo un extracto crudo al macerarlo con metanol. Este extracto se extrajo con acetato de etilo y diclorometano, constituyéndose de esta manera los tres extractos que se trabajaron: el acuoso-metanólico, el de acetato de etilo y finalmente, el de diclorometano.

De las fracciones 29 a la 34 de la columna cromatográfica a presión reducida (CCPR) del extracto de diclorometano se aisló un aceite de color marrón que el análisis por cromatografía en capa fina mostró como un producto puro. Con una muestra de este aceite se obtuvieron espectros de UV e IR. Del primer espectro no fue posible realizar asignaciones importantes, y para el espectro de IR se observaron bandas de asignación para C-H alifáticos, vinílicos y la banda del oxhidrilo, también se obtuvieron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz), utilizando benceno deuterado como disolvente y tetrametil silano (TMS) como referencia interna. En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (espectro 1) se distinguen 6 tipos de señales, en 5.34 ppm se tiene una señal que integra para un protón y que por su desplazamiento químico corresponde a un hidrógeno vinílico. De acuerdo a la multiplicidad y a la constante de acoplamiento mostrada por la señal de este protón, el mismo se encuentra vecino a un par de protones a través de una ligadura sencilla, lo que causa que la señal se divida en tres ( $J=6.8$  Hz), y a tres protones que se encuentran acoplados a través de una insaturación, de acuerdo al valor de la constante de acoplamiento ( $J=1.3$  Hz) observada para otras señales. Esta vecindad causa que cada una de las señales se divida nuevamente en cuatro picos. Las constantes de acoplamiento observadas son: para el triplete 6.8 Hz, y para el cuarteto 1.3 Hz. Estas constantes de acoplamiento son las mismas observadas para dos señales adicionales, un doblete-dobleteado que se encuentra en 3.98 ppm ( $J=6.8$  Hz), que integra para dos protones y que por lo tanto corresponde a los hidrógenos del metileno ( $\text{H}_c$  en la figura 8) base de una función oxigenada, y un doblete en 1.52 ppm ( $J= 1.2$  Hz) que integra para tres protones

que corresponde a un metilo sobre un carbono cuaternario ( $H_a$  en la figura 8). De los valores de las constantes de acoplamiento y por la multiplicidad observada para las señales descritas se puede concluir que la doble ligadura presenta una configuración *E*. De esta información se desprende que se tiene como fragmento estructural una unidad de isopreno con configuración *E* en el doble enlace (fig. 8).

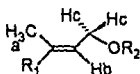


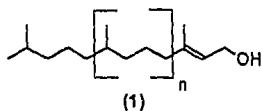
Figura 8

Adicionalmente, en 1.93 ppm se observa un triplete que integra para dos hidrógenos. Esta señal, por su desplazamiento químico corresponde a un metileno alílico vecino a una insaturación, se propone que es el sustituyente en  $R_1$ . Alrededor de 1.28 ppm, aparecen señales que corresponden a metilenos, y en 0.88, 0.90 y 0.91 ppm se localizan tres singuletes que corresponden a metilos, lo que hace suponer que la unidad de isopreno se repite por lo menos tres veces.

En el espectro de RMN- $^{13}C$  (espectro 2), aparecen 18 señales. Por medio de un experimento DEPT es posible saber que 4 corresponden a carbonos de grupo metilo, 9 de metileno, 3 de metino y el que resta es un carbono cuaternario. La señal del metileno unido a oxígeno se encuentra en 59.38 ppm. Existe una diferencia entre el espectro de resonancia magnética protónica (RMN- $^1H$ ) y el de resonancia magnética de carbono (RMN- $^{13}C$ ) en cuanto al número de átomos de carbono, en el primero calculado por el número de protones que se obtiene de la integración y en el segundo por conteo directo de las señales presentes, se debe a que este aceite es una mezcla, lo cual fue comprobado mediante cromatografía de gases.

De esta mezcla aceitosa, se acetilaron 20 mg con anhídrido acético y piridina para comprobar la presencia del grupo hidroxilo, evidenciado en el espectro de IR y para observar el efecto del nuevo sustituyente en los desplazamientos químicos. En el espectro de IR del derivado acetilado se observa, comparativamente con el del producto original, la banda de absorción correspondiente al grupo carbonilo en  $1720\text{ cm}^{-1}$  y la del enlace carbono-oxígeno en  $1115\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de este mismo compuesto se tienen las mismas señales que en el producto natural, más la señal que corresponde al metilo del acetato. La señal del metileno vecino a la doble ligadura se desplazó a campo bajo, presentando un desplazamiento químico de 4.59 ppm ( $\Delta\delta = 0.61\text{ ppm}$ ), lo que demuestra que éste está enlazado al oxígeno, y por lo tanto, es posible asignar a  $\text{R}_2$  como un hidroxilo. Las demás señales conservan su desplazamiento químico en este derivado con respecto al producto natural.

Una muestra de 20 mg de esta mezcla de compuestos fue reducida por medio de una hidrogenación catalítica con Pd/C. En el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de los productos de reacción es notable la ausencia de la señal del protón vinílico del producto natural y la presencia de un multiplete en 3.68 ppm, que integra para dos hidrógenos. Esta señal corresponde al metileno generado de la reducción de la doble ligadura del producto natural. Con esta información es posible proponer la siguiente estructura general para los constituyentes de esta mezcla (1).



La misma mezcla de compuestos se aisló en menor cantidad a partir del extracto de acetato de etilo. De esta mezcla se obtuvieron en total 3.07 g.

Si en la fórmula propuesta para el compuesto anterior,  $n$  es igual a uno, el compuesto corresponde al 3,7,11-trimetil-2*E*-dodecen-1-ol, que puede ser considerado

derivado del farnesol. Este derivado se encuentra reportado como producto de síntesis (Julia y Roy, 1986), y los resultados y asignaciones realizados por estos autores permiten compararlos con los datos obtenidos del espectro de RMN-<sup>13</sup>C (espectro 2) para el producto natural obtenido de *C. corymbosa* (tabla 2).

**Tabla 2**

Datos de RMN-<sup>13</sup>C del Producto Natural (1) (n=1) (espectro 2)

	Desplazamiento Químico (ppm)	
Producto natural	3,7,11-trimetil-2 <i>E</i> -dodecen-1-ol	Asignación
16.18	16.2	CH <sub>3</sub>
19.76	19.8	CH <sub>3</sub>
22.63 y 22.73	22.7	2 CH <sub>3</sub>
24.80	24.9	CH <sub>2</sub>
25.15	25.2	CH <sub>2</sub>
27.98	28.0	CH
32.80	32.8	CH
36.69	37.0	CH <sub>2</sub>
37.30	37.3	CH <sub>2</sub>
39.38	39.4	CH <sub>2</sub>
39.88	39.9	CH <sub>2</sub>
59.38	59.2	CH <sub>2</sub>
123.08	123.0	CH
140.16	139.4	C

Esta comparación permite corroborar la estructura propuesta y concluir que es probable que uno de los componentes mayoritarios de la mezcla sea el 3,7,11-trimetil-2*E*-dodecen-1-ol. Los datos espectroscópicos tanto de RMN-<sup>1</sup>H como de RMN-<sup>13</sup>C del

alcohol y del derivado acetilado de estos autores son congruentes con los obtenidos para la mezcla aislada y el derivado acetilado obtenido. Si no fuera dos, el compuesto con tres unidades saturadas de isopreno sería el *trans*-fitol. Sims y Pettus, informan el aislamiento del *trans*-fitol de *Gracilaria andersoniana* (Sims y Pettus, 1976). La comparación de sus resultados de RMN-<sup>1</sup>H con los obtenidos para la mezcla apoyan la propuesta estructural, por lo que el *trans*-fitol puede considerarse constituyente del material vegetal bajo estudio. Es pertinente señalar que el análisis por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas no proporcionó información interpretable.

De las fracciones 43-57 de la columna original del extracto de acetato de etilo, se aisló por medio de una cromatoplaque preparativa (usando una placa de 20 x 20 cm y 2 mm de espesor), un sólido blanco del cual se obtuvieron los espectros de IR, masas y RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. En el espectro de infrarrojo se observan las bandas propias de grupos metoxilo (2952 y 1378 cm<sup>-1</sup>), la banda de metilenos (829 cm<sup>-1</sup>) y la debida al sobretono de estos últimos (1633 cm<sup>-1</sup>), y se observa además la banda correspondiente a una doble ligadura disustituida (1437 cm<sup>-1</sup>). Las señales de un hidroxilo fenólico (3588 y 1264 cm<sup>-1</sup>) y finalmente las bandas características de carbonilo (1708 cm<sup>-1</sup>) y del enlace C-O (1167 cm<sup>-1</sup>).

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 7) se observan 7 señales, dos de las cuales corresponden, de acuerdo a su desplazamiento químico, a hidrógenos en un sistema bencénico y dos que integran para dos protones en un sistema vinílico. El sistema aromático está formado por dos señales dobleteadas en 6.85 y 7.44 ppm, que integran, cada una de ellas, para un hidrógeno. La constante de acoplamiento es de 8.6 Hz, lo que corresponde a un sistema *orto* (fig. 9).



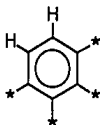


Figura 9

El sistema de protones vinílicos en 7.65 y 6.31 ppm, tiene una constante de acoplamiento para ambas señales de 16 Hz, lo que corresponde a una doble ligadura con configuración *trans* (fig.10).



Figura 10

El valor de esta constante de acoplamiento es igual a la reportada para ácidos cinámicos con diferentes patrones de sustitución en el anillo bencénico (Dupin y Chenault, 1985). Asimismo, se observa un singulete en 3.80 ppm que integra para tres protones, que corresponde a un metilo enlazado a un oxígeno. En 5.40 ppm se observa una señal que integra para dos protones; su desaparición al agregar agua deuterada indica que corresponden a hidrógenos hidroxílicos. El metoxilo, el grupo vinílico y el hidroxilo se encuentran unidos al anillo bencénico.

Por su desplazamiento químico, uno de los protones vinílicos es vecino al carbonilo (6.31 ppm), y el otro al anillo bencénico y conjugado con el grupo carbonilo (7.65 ppm).

De la reacción de metilación de este producto natural se obtuvo el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 8), en el cual aparece una señal adicional de metoxilo, la cual corresponde a la formación del éster de un ácido. Con esta información es posible proponer que el compuesto corresponde a un derivado del ácido cinámico con dos protones *orto* uno con respecto al otro en el anillo bencénico (figura 11).

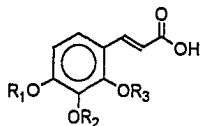
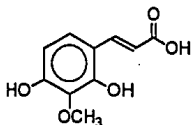


Figura 11

De los sustituyentes en los átomos de oxígeno, dos corresponden a hidrógenos y el tercero a un metilo, evidenciado por la señal en 3.8 ppm en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H. Para determinar el patrón de sustitución del anillo se compararon las señales observadas en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H para los protones aromáticos con aquellas reportadas para un compuesto similar, el ácido 2,4-dimetoxicinámico (Sadler, 2205 M), del espectro de este compuesto se pueden comparar los desplazamientos de los hidrógenos en el anillo aromático. Los dos protones que se encuentran *orto* en este compuesto presentan desplazamientos químicos de 7.57 ppm y 6.57 ppm, los del producto natural aislado son de 7.44 ppm y 6.85 ppm. El desplazamiento químico de 7.44 ppm para un hidrógeno del producto natural sugiere que en este compuesto la posición *orto* se encuentra vecina al residuo vinílico. Se calcularon los desplazamientos de los hidrógenos aromáticos a partir de tablas (Pretsch, *et al*, 1980) para tratar de determinar el patrón de sustitución del anillo bencénico. Aunque la información arrojada de estos cálculos no es concluyente, es posible proponer que el patrón de sustitución más probable para este compuesto es aquel en el cual el metilo se encuentra en R<sub>2</sub> y, por lo tanto, la estructura propuesta para este producto natural corresponde al ácido 2,4-dihidroxi-3-metoxi-cinámico (2).

No se encontró esta estructura en Chemical Abstracts de 1950 a la fecha. Tampoco se encontró registrada en el banco de datos de productos naturales.



(2)

De la reunión de las fracciones 82-106 de la columna original del extracto de acetato de etilo se obtuvo un compuesto sólido blanco que se purificó por medio de una cromatoplaça preparativa. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 9) para este compuesto muestra una señal singlete en 3.78 ppm correspondiente a un metilo unido a oxígeno. Un sistema vinílico con dos señales dobleteadas en 6.23 y 7.57 ppm con una constante de acoplamiento de 15.9 Hz para ambas señales, que corresponden a un doble enlace disustituido *trans*.

Aparecen además las señales para un sistema aromático de tipo ABX. Estas se encuentran en 6.92 ppm ( $J=1.6$  Hz), 6.87 ppm ( $J=9.5$  Hz) y 7.09 ppm ( $J=1.6$  Hz). De tal forma que se tienen dos protones *orto* y un tercero *meta* a uno de los anteriores y *para* al otro (fig. 12).

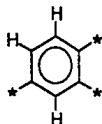
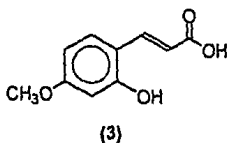


Figura 12

Derivado de esta información y de acuerdo con la similitud con el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto (2), se pueden proponer dos estructuras probables para este producto natural, que corresponderían al ácido 4-hidroxi-2-metoxi-cinámico o al ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico. Por comparación con los datos publicados para el ácido 2,4-dimetoxycinámico (Sadler, 2205 M) se puede concluir que el compuesto aislado

corresponde al ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico (3), la diferencia en los desplazamientos químicos de los hidrógenos en el anillo aromático en ambos compuestos se debe a la sustitución del metoxilo del compuesto reportado por un hidroxilo en el producto natural. Los desplazamientos químicos para los protones aromáticos se calcularon por medio de tablas de desplazamiento químico (Pretsch, *et al*, 1980), los resultados obtenidos apoyan la propuesta estructural. Al igual que en el producto natural precedente, no fue posible encontrar esta estructura en el Chemical Abstracts de 1950 a la fecha, ni en el banco de datos de productos naturales.



De las fracciones reunidas 107-140 del mismo extracto y columna, se aisló un compuesto sólido blanco del cual se obtuvo un espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 10). En el espectro aparecen cuatro señales, de las cuales dos corresponden a un par de protones en un sistema vinílico. Los desplazamientos químicos para estas señales son de 7.61 y 6.25 ppm ( $J=15.8$  Hz). Las otras dos señales que integran para dos protones se encuentran en 6.85 y 7.39 ppm ( $J=8.6$  Hz), estas dos últimas señales corresponden a dos protones en posición *orto*, en un sistema aromático, los desplazamientos químicos de estos hidrógenos sugieren que el sistema *orto* se encuentra vecino al fragmento vinílico. Así, este espectro corresponde a un ácido cinámico trisustituido en el anillo bencénico (fig. 13).

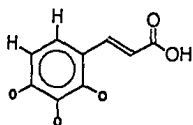
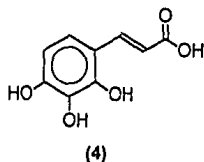


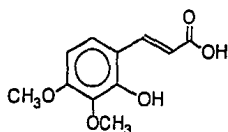
Figura 13

La ausencia de otras señales y los desplazamientos químicos de los protones del anillo bencénico, así como la banda correspondiente a la vibración de hidroxilo fenólico en el espectro de infrarrojo ( $3683\text{ cm}^{-1}$ ), indican que los sustituyentes deben ser hidroxilos, por lo que el compuesto aislado es el ácido 2,3,4-trihidroxi-cinámico (4). Los datos obtenidos son congruentes con los reportados en la literatura para compuestos análogos (Cannon, *et al*, 1973) y con los calculados a partir de tablas.



Un sólido incoloro fue aislado de la reunión de las fracciones 141-172, después de trabajarlas en una columna cromatográfica. Del conjunto de resultados espectroscópicos se pudo obtener su estructura molecular. Así, el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (espectro 11) presenta señales para dos hidrógenos en un sistema aromático, un par de protones vinílicos y dos metilos base de oxígeno. El sistema aromático está formado por dos señales dobleteadas en 6.81 y 7.35 ppm. La constante de acoplamiento es de 8.8 Hz, lo que indica que los protones se encuentran *orto* uno con respecto al otro. Las señales para los protones alílicos también se encuentran dobleteadas en 7.65 ppm y 6.24 ppm, la constante

de acoplamiento para estas señales corresponde a un patrón de sustitución *trans*. Los singuletes para dos metilos unidos a oxígeno se encuentran en 3.89 y 3.93 ppm. De manera análoga a los casos anteriores y por la similitud de las señales del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de este compuesto con los anteriores se propone al ácido 2-hidroxi-3,4-dihidroxi-cinámico (5) como la estructura de este producto natural.

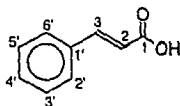


(5)

En la tabla 3 se presentan los desplazamientos químicos de los protones de los cuatro derivados del ácido cinámico aislados, son notorias las similitudes en los desplazamientos químicos de los protones vinílicos en los cuatro compuestos, y en el caso de los protones bencénicos se pueden apreciar las diferencias de desplazamiento causadas por los diferentes patrones de sustitución.

Tabla 3

Desplazamientos Químicos de los Protones de los Derivados del Acido Cinámico  
Aislados de *Casearia corymbosa*.



Estructura	Desplazamiento de los Protones (ppm).						
	2	3	2'	3'	4'	5'	6'
(2)	6.31	7.65	5.40(-OH)	-	5.40(-OH)	6.85	7.44
(3)	6.23	7.57	-	6.87	-	6.92	7.09
(4)	6.25	7.61	-	-	-	6.86	7.39
(5)	6.24	7.65	-	-	-	6.81	7.35

Un compuesto sólido amarillo se obtuvo de las fracciones 234-247 de la columna principal del extracto de acetato de etilo. El análisis elemental indica que la composición del mismo es : C-58.36%, H-5.57% y O-36.22%, lo que establece la fórmula molecular  $C_{15}H_{16}O_7$  la cual posee 9 insaturaciones. Analizando el espectro de RMN- $^1H$  (espectro 12) se concluye que hay dos sistemas aromáticos, uno de ellos que integra para tres protones y presenta las siguientes señales: un doblete en 6.82 ppm con una constante de acoplamiento de 8 Hz (*orto*) asignable al protón Ha de la figura 14, un doblete-dobleteado en 6.74 ppm con dos constantes de acoplamiento de 2.0 Hz (*meta*) y 8 Hz (*orto*) y un doblete en 6.91 ppm con una constante de acoplamiento de 2.0 Hz correspondiente a Hc. Este es un anillo aromático trisustituido como el que se ilustra en la figura 14.

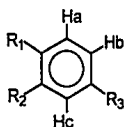


Figura 14

El segundo sistema aromático integra para dos hidrógenos y sus señales se encuentran en 6.03 y 5.91 ppm, las dos señales se encuentran dobleteadas y la constante de acoplamiento es de 2.2 Hz, lo que corresponde a una relación *meta* entre los protones (figura 15).

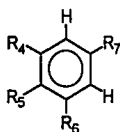


Figura 15

En 4.60 ppm se encuentra la señal dobleteada de un protón con una constante de acoplamiento de 7.6 Hz, la multiplicidad de la señal permite deducir el fragmento estructural A donde este hidrógeno corresponde a H<sub>1</sub>, figura 16.



Figura 16 (fragmento estructural A)

Este protón se encuentra acoplado con un segundo hidrógeno H<sub>2</sub>, pues presenta el mismo valor para la constante de acoplamiento (7.6 Hz) cuya señal aparece para este último como un triplete-dobleteado en 3.99 ppm. El valor de la segunda constante de



acoplamiento y la multiplicidad de la señal indican su vecindad a un grupo metileno ( $H_3$  y  $H_4$ , fragmento estructural B). Finalmente  $H_3$  y  $H_4$  aparecen como dos dobletes-dobleteados con integración para un protón cada uno, en 2.92 ppm ( $J_{vec}= 5.5$  y  $J_{gem}= 16.1$  Hz) y en 2.54 ppm ( $J_{vec}=8.2$  Hz y  $J_{gem}= 16.0$  Hz). Estas cuatro señales permiten construir un sistema como el mostrado en la figura 17.

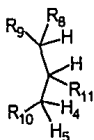


Figura 17 ( Fragmento estructural B)

En el espectro de RMN- $^{13}C$  (espectro 13) destacan las señales de los carbonos correspondientes a los sistemas aromáticos y alifáticos que corroboran los fragmentos estructurales propuestos. Para la porción alifática se observa un metino unido a oxígeno en 65.86 ppm, por lo que  $R_{11}$  podría corresponder a un hidroxilo. En el espectro de RMN- $^{13}C$  se aprecian las señales de un metileno en 29.60 ppm, y en 78.1 ppm se encuentra la señal de un carbono alílico trisustituido base de hidrógeno cuya señal también se encuentra en 4.59 ppm en el espectro de RMN- $^1H$ . El desplazamiento a campo bajo de la señal indica que este hidrógeno está sustituido con grupos desprotectores como fenilos u oxígeno, el grupo con oxígeno debe corresponder a un fenóxido. De esta manera se puede proponer la siguiente sustitución para  $R_{11}$ ,  $R_9$  y  $R_8$  (fig. 18).

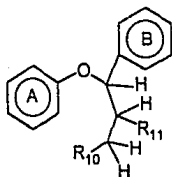


Figura 18

En 155.35, 155.11, 154.34 y 143.71 ppm se encuentran las señales de carbonos aromáticos unidos a oxígeno, lo que permite sustituir los anillos aromáticos con hidroxilos, en las posiciones  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_6$  y  $R_7$  en las figuras 14 y 15. De esta manera se propuso la siguiente estructura para este compuesto (fig. 19), y de acuerdo con el índice de insaturación de 9 es posible deducir la presencia de un tercer ciclo que debe estar formado entre la porción alifática y el anillo aromático A. El análisis elemental corresponde por lo tanto a la fórmula molecular  $C_{15}H_{14}O_6 \cdot H_2O$ .

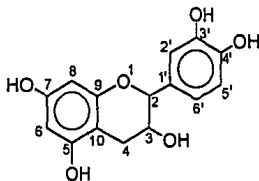
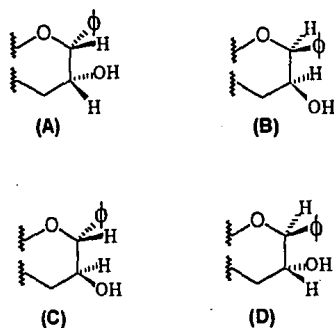


Figura 19

La acetilación de este producto natural permitió obtener el derivado peracetilado. El espectro de RMN- $^1H$  (espectro 14) del mismo presenta las mismas señales para los sistemas aromáticos, pero desplazadas a campo bajo ( $\Delta\delta = 0.38$  ( $H_6$ ),  $0.42$  ( $H_8$ ),  $0.46$  ( $H_2$ ),  $0.62$  ( $H_5$ ),  $0.67$  ( $H_6$ ) ppm), además presenta dos señales adicionales para metilos de acetato, una en 2.29 ppm que integra para 12 protones que corresponden a los acetatos de

los anillos aromáticos, y otra señal en 2.00 ppm que integra para tres protones, que corresponde al sustituyente del carbono 3. De esta manera se comprobó que los sustituyentes de los anillos aromáticos y del carbono alifático (3) son, en el producto natural, hidroxilos. Del compuesto cabría determinar la configuración absoluta de los átomos de carbono 2 y 3, pues permiten la existencia de 4 estereoisómeros como lo muestra la figura 20.



(A).- (-)-*Epi*-catequina. (B).- (+)-*Epi*-catequina  
(C).- (-)-Catequina. (D).- (+)-Catequina

Figura 20

Para ésto se determinó la rotación específica del compuesto, la cual tiene un valor positivo. En la literatura se encuentran reportados dos diastereoisómeros como productos naturales, la (+) catequina, que corresponde al diastereoisómero D y la (-) *epi*-catequina que corresponde al compuesto con la configuración A (Harborne y Mabry, 1982). La constante de acoplamiento para los protones enlazados a estos átomos de carbono (2 y 3) es de 7.6 Hz, valor correspondiente a dos protones que se encuentran pseudoaxiales ( fig. 21).

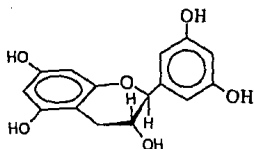
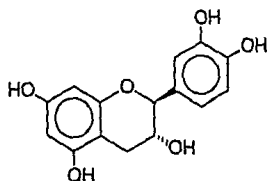
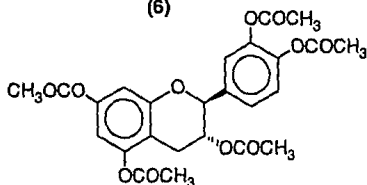


Figura 21

De esta manera se puede concluir que el producto natural aislado es la (+) catequina (6) y el producto de síntesis corresponde al compuesto peracetilado (7).



(6)



(7)

Un aceite amarillo se obtuvo de la fracción 24 de la columna del extracto de acetato de etilo, así como de la reunión de las fracciones 12-19 de la columna del extracto de diclorometano. De este último extracto fue de donde se aisló en mayor cantidad. Su espectro de IR muestra las siguientes bandas, en 2855  $\text{cm}^{-1}$  la que corresponde a la presencia de grupos metoxilo, en 2926  $\text{cm}^{-1}$  la banda correspondiente al alargamiento del enlace C-H, en 1657  $\text{cm}^{-1}$  la señal de alquenos con un patrón de sustitución *cis*, así como en 1437  $\text{cm}^{-1}$ . En 1729  $\text{cm}^{-1}$ , 1365  $\text{cm}^{-1}$  y 1070  $\text{cm}^{-1}$  las señales de carbonilo y en 1175

cm<sup>-1</sup> la banda que indica que este carbonilo es de un ester. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (espectro 15) se encuentran 8 señales, de estas un singulete con un desplazamiento químico de 3.66 ppm, que integra para tres protones corresponde a un metilo unido a oxígeno (metoxilo). Se observa un multiplete de protones vinílicos en 5.36 ppm, esta señal integra para 6 protones, lo que correspondería a tres insaturaciones. Un triplete en 0.97 ppm puede asignarse, de acuerdo a su multiplicidad, a un metilo vecino a metileno siendo la constante de acoplamiento de 7.4 Hz. El espectro COSY (espectro 17) corrobora la vecindad entre este metilo, que está acoplado con un metileno, cuya señal es un cuarteto dobleteado en 2.05 ppm. El hecho de que el cuarteto se encuentre dobleteado indica que este metileno es vecino a un hidrógeno, que por su desplazamiento químico es vinílico, tomando en consideración que se tienen dobles ligaduras disustituidas *cis* como lo indica el espectro de IR, se puede suponer que un extremo de la molécula corresponde al fragmento estructural mostrado en la figura 22.



Figura 22

Un doblete dobleteado que integra para cuatro protones centrado en 2.81 ppm corresponde a metilenos vecinos a dos hidrógenos vinílicos (doblemente alílicos) por lo que R corresponde a estos metilenos, cada uno de ellos entre dos insaturaciones (fig. 23).

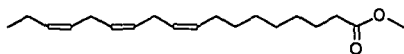


Figura 23

La naturaleza del grupo R' se puede deducir de la señal formada por un triplete dobleteado con un desplazamiento químico de 2.08 ppm correspondiente a un metileno vecino a una insaturación (R').

Un triplete que integra para dos protones corresponde a un metileno vecino a un carbono con dos hidrógenos, de acuerdo a la multiplicidad de la señal que se encuentra en 2.30 ppm, y debe corresponder a un metileno vecino al carbonilo evidenciado en el espectro de IR. Finalmente, se observa una señal multiplete centrada en 1.31 ppm que por su integración corresponde a una cadena de cinco metilenos. En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C (espectro 16) en 174 ppm se presenta una señal para carbono cuaternario que corresponde al grupo carbonilo; entre 131.80 y 127.00 ppm se observa los grupos de señales características de los carbonos de tipo vinílico. Por medio de un COSY se comprobó la vecindad propuesta para los protones en esta molécula.

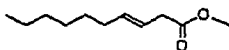
El espectro de RMN-<sup>13</sup>C para este compuesto presenta 14 señales, algunas de las cuales han sido discutidas con anterioridad. Por medio de un DEPT se puede determinar que dos de las 14 señales corresponden a metilos, entre 14.23 ppm y 51.39 ppm, el desplazamiento de esta última señal indica que este metilo es el base de oxígeno. Las señales con desplazamientos químicos entre 34.0 y 20.5 ppm corresponden a los metilenos de este compuesto. En este espectro sólo se aprecian 14 señales, aunque esto se debe a que algunas de ellas están sobrepuestas. El grupo metoxilo evidenciado en los espectros de IR y RMN-<sup>1</sup>H indica que el compuesto es un ester metílico. Los datos antes mencionados permiten proponer al ester metílico del ácido linolénico (8) como este producto natural.



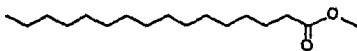
(8)

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H se comparó con el obtenido para un estándar de esta sustancia (Sadler, 16004 M) comprobándose de esta manera que ambos tienen las mismas señales y desplazamientos químicos.

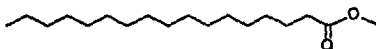
Los compuestos presentes en la fracción 42 del extracto de diclorometano, se aislaron e identificaron por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Los patrones de fragmentación observados en los espectros de esta mezcla son característicos de ácidos grasos, pudiéndose observar en todos los casos los fragmentos consecutivos correspondientes a pérdidas de 14 unidades de masa. Las propuestas estructurales obtenidas al comparar los espectros con los datos de una biblioteca incluida en el equipo se corroboraron por análisis directo de los mismos. Los compuestos de esta manera aislados, según su orden de elución, son los siguientes: decenoato de metilo (9), palmitato de metilo (10), heptadecanoato de metilo (11), oleato de metilo (12), y estearato de metilo (13).



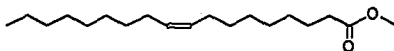
(9)



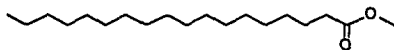
(10)



(11)

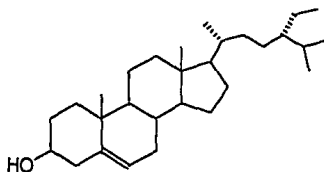


(12)



(13)

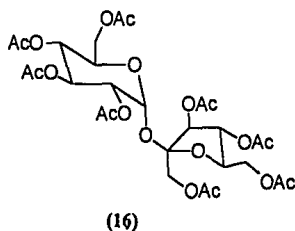
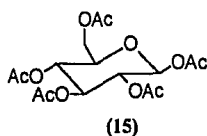
Un sólido cristalino incoloro se aisló de varias fracciones de la 23-76 de la columna del extracto de acetato de etilo, al igual que de las fracciones 44-71 del extracto de diclorometano. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de este compuesto presenta las siguientes señales: un doblete-dobleteado en 5.34 ppm con una constante de acoplamiento de 6.4 Hz que integra para un hidrógeno vinílico. Un multiplete en 3.65 ppm que integra para un protón. Una señal dobleteada en 2.29 ppm con una constante de acoplamiento de 6.2 Hz, así como varias señales para metilos y metilenos. El punto de fusión determinado para este compuesto fue de 139-140 °C, por lo que se decidió compararlo con una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol. Con la muestra auténtica se hizo una cromatoplaque comparativa, para determinar si tenían el mismo R<sub>f</sub> y coloración al revelar con sulfato cérico amónico, y una prueba de fusión con la mezcla del producto natural aislado. El punto de fusión de la mezcla fué de 138-139. Estos resultados permitieron comprobar que la sustancia aislada es  $\beta$ -sitosterol (14).



(14)



De la columna del extracto acuoso-metanólico se aislaron dos productos naturales después de hacer un análisis por CCF y acetilar las fracciones en las que se encontraban estos constituyentes mayoritarios, para de esta manera poder purificarlos. De los dos compuestos aislados se obtuvieron los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, estos espectros muestran las señales características de azúcares por lo que se les comparó con espectros obtenidos para estándares de los mismos. De esta manera se determinó que estos compuestos corresponden a la β-D-glucosa peracetilada (15) (Sadler, 17082M) y a la sacarosa peracetilada (16) (Sadler 12573M).



## DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las hojas de *Casearia corymbosa* colectadas en la Estación de Biología Chamela, fueron transportadas frescas y en hielo seco a las instalaciones del Instituto de Química. Esto se hizo con la finalidad de evitar en la medida de lo posible la pérdida o descomposición de constituyentes de las hojas. Al tejido vegetal se le eliminó el hielo remanente y el exceso de agua, contándose con aproximadamente 6 Kg de material vegetal. Las hojas fueron maceradas en 18 litros de metanol en tres ocasiones a temperatura ambiente, concentrando el extracto en cada una hasta un volumen aproximado de 1 litro. A los tres litros acumulados en el proceso de maceración se les hicieron extracciones sucesivas con acetato de etilo y diclorometano. Al final de este proceso de separación se obtuvieron los tres extractos con los que se trabajó: el extracto acuoso-metanólico, el extracto de acetato de etilo y el de diclorometano. De los tres extractos anteriores se hizo una cromatoplaqueta comparativa para contar con una primera aproximación de la complejidad de la mezcla de cada extracto. Las cromatografías en columna se realizaron con Silica gel 60 Merck (malla 70-230 ASTM) y los análisis por medio de cromatografía en placa fina con placas Merck-F-254. Para revelar estas placas se utilizó un revelador de luz ultravioleta a longitudes de onda de 365 y 254 nm y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Los puntos de fusión no corregidos se determinaron con un aparato Fisher-Johns.

Para determinar la estructura de los productos naturales aislados se aplicaron las técnicas espectroscópicas comunes. Los espectros de IR fueron obtenidos en pastilla de KBr o en solución de cloroformo como lo indica cada espectro. Se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283-B. Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H se obtuvieron a 80, 200 y 300 MHz como indica cada espectro, y para ello se utilizaron los espectrómetros analíticos Varian FT-80 A, Varian XR-300 y Varian-Gemini 200A utilizando diversos disolventes y como referencia interna tetrametil silano (TMS). Los espectros de RMN-<sup>13</sup>C

se obtuvieron con un equipo Varian XR-300 a 75.4 MHz. En algunos casos se utilizaron técnicas especiales como COSY y HETCOR. Los espectros de ultravioleta se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 552 en soluciones metanólicas y la rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 241. Para la mezcla de ácidos grasos se utilizó un espectrómetro de masas Finnigan-Mat, modelo INCOS 50 B, la energía de ionización fue de 70 eV, acoplado a cromatografía de gases.

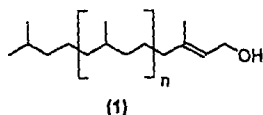
### I. Extracto de Acetato de Etilo.

El primer extracto en trabajarse por presentar el mayor número de constituyentes fue el extracto de acetato de etilo. De éste se obtuvieron 22.2 g en peso seco. Se adsorbió en la misma cantidad de sílica gel 70:230 y se aplicó a una columna empacada con 280 g de sílica gel para placa. La columna se eluyó de la siguiente manera:

Fracciones	Polaridad	Constituyentes Aislados
1-23	Hexano 100%	Ester metílico del Ac. Linolénico
24-76	Hex.-AcOEt. 9:1	$\beta$ -sitosterol, mezcla de polisoprenalcanos, ácido 2,4-dihidroxi-3- metoxi-cinámico
77-185	Hex.-AcOEt. 8:2	ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico, 2,3,4-trihidroxi-cinámico 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico.
186-220	Hex.-AcOEt. 7:3	-----
221-274	Hex.-AcOEt. 6:4	catequina
275-285	Hex.-AcOEt 3:7	-----

Finalmente la columna se lavó sucesivamente con acetato de etilo, acetona y metanol.

Las fracciones 23-76 corresponden a los constituyentes de este extracto que eluyeron con una polaridad de hexano-acetato de etilo 9:1. El  $\beta$ -sitosterol se encontró como componente minoritario en todas estas fracciones. De las fracciones 27-29 se obtuvo la mezcla de poli-isoprenalcanos (1).



Las propiedades físicas y datos espectroscópicos para este compuesto son los siguientes.

Rendimiento: 3.2573 g (  $6.2 \times 10^{-4}$  %)

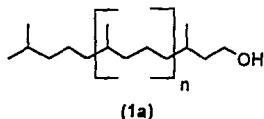
Estado físico: aceite marrón.

UV ( $\lambda_{\max}$ ): 230 nm.

IR ( $\nu_{\max}$ ) 3328, 3117, 2925, 2860, 1711, 1461, 1379, 1238, 1170, 1001  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ): 5.34 (1H, tc,  $J=7.2$  y  $7.4$  Hz,  $\text{H}_b$ ), 3.98 (2H, dd,  $J=6.82$  Hz,  $\text{H}_{1,2}$ ), 1.93 (2H, t,  $J=7.2$ ,  $\text{H}_{4,5}$ ), 1.52 (3H, d,  $J=1.2$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 1.28 (varios H, m,  $\text{H}_7$ ), 0.90 (varios H, s,  $\text{H}_8$ ).

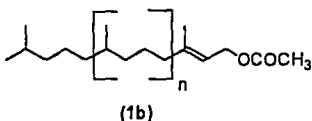
Con esta mezcla de compuestos (1) se llevaron a cabo dos reacciones para determinar la naturaleza química de los constituyentes. Se realizó una hidrogenación catalítica, para lo cual 50 mg de la mezcla se disolvieron en 3.5 ml de acetato de etilo. Una vez disueltos, se agregaron 15 mg de Pd/C (10 %) como catalizador. Se permitió que la mezcla permaneciera 24 h en una atmósfera de hidrógeno. De esta reacción se obtuvo la mezcla reducida de compuestos con la siguiente fórmula (1a).



Los datos espectroscópicos para esta mezcla son los enlistados a continuación.

RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.68 (2H, tdd, J=6.72 y 2.4 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 2.32 (2H, t, J=7.24, CH<sub>2</sub>) 1.26 (varios H, m, CH<sub>2</sub>), 0.86 ( 3H, d, J=2.2 Hz, CH<sub>3</sub>) 0.83 (varios H, s, CH<sub>2</sub>).

La segunda reacción que se llevó a cabo fue la acetilación de 100 mg de la mezcla a los cuales se les agregó 1 ml de anhídrido acético y tres gotas de piridina. De la mezcla de reacción se obtuvieron, por medio de una extracción con acetato de etilo, los productos de reacción, los cuales tienen la siguiente fórmula (1b).



A continuación se presentan los datos espectroscópicos de esta mezcla.

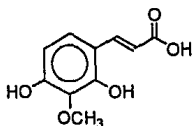
IR (ν<sub>max</sub>): , 3100, 2940, 2780, 1720, 1461, 1379, 1238, 1115, 1001 cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H ( 200MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.34 (1H, tc, J= 7,2 y 1.3 Hz, =CH), 4.59 ( 2H, d, J=7.04 Hz, CH<sub>2</sub>O-), 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.01 (2H, t, J=7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.69 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C=C), 1.26 (varios H, m, CH<sub>2</sub>), 0.86 (varios H, s, CH<sub>3</sub>).

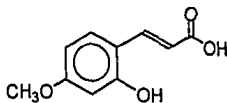
De las fracciones 30-42 no se aisló ningún constituyente, pues no se detectó su presencia en el análisis realizado por cromatografía en placa fina (CCF). El análisis de la reunión de las fracciones 43-57 evidenció la presencia de un componente mayoritario, su

separación se realizó por medio de una placa preparativa de 20 x 20 cm con un sistema de elución de hexano-acetato de etilo 9:1. La placa preparativa se corrió tres veces con la misma mezcla de elución, de la misma se recuperó el ácido 2,4-dihidroxi-3-metoxi-cinámico (2).

De las fracciones 77-185 se aislaron tres derivados del ácido cinámico de polaridad similar, la mezcla de elución para estas fracciones fue de hexano-acetato de etilo 8:2. Con la reunión de las fracciones 82-106 se hizo una cromatoplaqa preparativa de 20 x 20 cm, la cual fue eluida tres veces con una mezcla de hexano-acetato de etilo 8:2. En la placa se separaron dos bandas, una de ellas correspondió al ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico (3).



(2)



(3)

Las propiedades físicas y datos espectroscópicos para el compuesto (2) son los siguientes:

Rendimiento: 17 mg ( $3.0 \times 10^{-6}$  %)

Sólido amorfo.

IR ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ): 3588, 2952, 1708, 1634, 1437, 1378, 1167, 829  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( 200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.65 (1H, d,  $J=16$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 7.44 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H5), 5.40 (1H, s,  $-\text{OH}$ ), 6.85 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H6), 6.31 (1H, d,  $J=16$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 3.80 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

EM: 192 [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ]

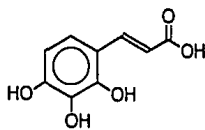
Para el ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico se enlistan las propiedades físicas y datos espectroscópicos.

Rendimiento: 9 mg ( $1.5 \times 10^{-7}$  %)

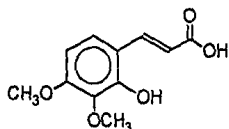
IR ( $\nu_{\text{max}}$ ): 3480, 2910, 1760, 1600, 1540, 1430, 1300, 1270, 1170, 1075, 775, 470  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.57 (1H, d,  $J=15.9$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 7.09 (1H, d,  $J=1.66$  Hz, H6), 6.92 (1H, dd,  $J=1.68$ , H5), 6.87 (1H, d,  $J=9.5$  Hz, H3), 6.23 (1H, d,  $J=15.94$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 3.78 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

De la reunión de las fracciones siguientes, 107-140, se preparó otra cromatoplaaca de 20 x 20 cm, para de esta manera aislar el componente mayoritario evidente en el análisis por medio de CCP. Esta se eluyó con una mezcla hexano-acetato de etilo 7:3, dos veces. Se recuperó al ácido 2,3,4-trihidroxi-cinámico (4) . Finalmente con la reunión de las fracciones 141-172 se montó una columna con silica gel 70-230. De las fracciones 34-43 de esta columna se aisló al ácido 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico (5), pues el análisis de las cromatoplaacas indicó que este producto natural era el componente mayoritario de la columna montada.



(4)



(5)

El ácido 2,3,4-trihidroxi-cinámico tiene las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas.

Rendimiento: 13 mg ( $2.1 \times 10^{-7}$  %)

IR ( $\nu_{\max}$ ): 3683, 3589, 2929, 1722, 1604, 1514, 1438, 1326, 1264, 928, 831  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.61 (1H, d,  $J=15.8$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 7.39 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H6), 6.86 (1H, d,  $J=8.6$  Hz, H5), 6.25 (1H, d,  $J=15.8$ ,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ).

A continuación se presentan las propiedades físicas y datos espectroscópicos del ácido 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico.

Rendimiento: 21 mg ( $3.5 \times 10^{-6}$  %)

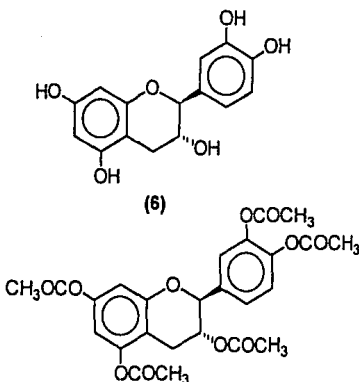
IR ( $\nu_{\max}$ ): 3046, 2934, 2861, 1731, 1701, 1601, 1525, 1462, 1134, 922,  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7.35 (1H, d,  $J=8.8$  Hz, H6), 7.65 (1H, d,  $J=12.6$ ,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 6.81 (1H, d,  $J=8.8$  Hz, H5), 6.24 (1H, d,  $J=12.6$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOR}$ ), 3.94 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.90 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ).

El último compuesto aislado de este extracto fue el flavan-3-ol, (+)-catequina (6), el cual eluyó en las fracciones 234-247 con una polaridad de 6:4 hexano-acetato de etilo. Para corroborar la estructura propuesta para el producto natural, 0.2615 g de este



compuesto se acetilaron con anhídrido acético y piridina como catalizador, obteniéndose el compuesto pentacetilado (7).



Las propiedades físicas y datos espectroscópicos para estos dos compuestos son:

**(6) Catequina.**

Rendimiento: 1.563 g ( $2.6 \times 10^{-4}$  %)

Pf. 170- 173 °C

IR ( $\nu_{\max}$ ): 3320, 1690, 1610, 1510, 1440, 1360, 1275, 1130, 1020, 810, 760, 610,  $\text{cm}^{-1}$ .

$[\alpha]_D = +3^\circ$  (c 0.020, MeOH)

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 6.91 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H<sub>7</sub>), 6.82 (1H, d,  $J=8$  Hz, H<sub>4</sub>), 6.74 (1H, dd,  $J=2$  y 8 Hz, H<sub>5</sub>), 6.03 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H<sub>2</sub>), 5.91 (1H, d,  $J=2.2$  Hz, H<sub>3</sub>), 4.59 (1H, d,  $J=7.6$ , H<sub>4</sub>), 3.99 (1H, td,  $J=7.6$ , H<sub>4</sub>), 2.92 (1H, dd,  $J=5.5$  y 16.1, H<sub>3</sub>), 2.54 (1H, dd,  $J=8.0$  y 8.4,  $J=8.2$  y 16, H<sub>2</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 155.35 ( $\text{C}_5$ ), 155.11 ( $\text{C}_7$ ), 154.34 ( $\text{C}_9$ ), 143.71 ( $\text{C}_{3,4}$ ), 129.59 ( $\text{C}_1$ ), 117.57 ( $\text{C}_2$ ), 114.06 ( $\text{C}_5$ ), 94.37 ( $\text{C}_8$ ), 93.19 ( $\text{C}_6$ ), 77.42 ( $\text{C}_2$ ), 65.86 ( $\text{C}_3$ ), 29.59 ( $\text{C}_4$ ).

(7) Catequina Pentacetilada.

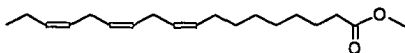
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7.29 (1H, d,  $J=1.58$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 7.24 (1H, d,  $J=10.4$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 7.20 (1H, d,  $J=10.4$  y  $1.58$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 6.66 (1H, d,  $J=2.28$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 6.60 (1H, d,  $J=2.24$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 5.25 (1H, td,  $J=5.7$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 5.15 (1H, d,  $J=6.24$  Hz,  $\text{H}_4$ ), 2.89 (12H, s, H de acetato), 2.88 (1H, dd,  $J=16.1$  y  $5.2$  Hz,  $\text{H}_3$ ), 2.65 (1H, dd,  $J=16.1$  y  $8$  Hz;  $\text{H}_3$ ), 2.01 (3H, s, H de acetato).

## II. Extracto de Diclorometano.

Para iniciar la separación se preparó una columna cromatográfica con silica gel para placa, a la cual se le aplicaron los 93.62 g de este extracto adsorbidos en 126 g de celita. La columna se eluyó de la siguiente manera.

Fracciones	Polaridad	Constituyentes Aislados
1-22	Hexano 100%	Ester metílico del Ac. Linolénico
23-43	Hex-AcOEt 95:5	$\beta$ -sitosterol, mezcla de polisoprenalcanos, mezcla de ácidos grasos.
44-71	Hex-AcOEt 9:1	$\beta$ -sitosterol
72-108	Hex-AcOEt 8:2	-----
109-119	Hex-AcOEt 7:3	-----
120-127	Hex-AcOEt 6:4	-----
128-137	Hex-AcOEt 5:5	-----

La columna se lavó con acetato de etilo a partir de la fracción 138 hasta la fracción 149, y las fracciones finales correspondieron al lavado de la columna con metanol. Los compuestos aislados de este extracto correspondieron a los constituyentes con menor polaridad del extracto anterior, el ester metílico del ácido linolénico (8), la mezcla (1) y  $\beta$ -sitosterol. Cabe destacar que en este extracto las sustancias mencionadas se aislaron en mayor cantidad y pureza que en el anterior.



(8)

Las propiedades físicas y datos espectroscópicos para el éster metílico del ácido linolénico son los siguientes.

Rendimiento: 2.212 g ( $3.7 \times 10^{-4}\%$ )

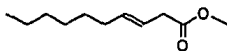
Estado físico: aceite amarillo.

IR ( $\nu_{\max}$ ): 3006, 2926, 2855, 1730, 1653, 1175  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.36 (6H, m,  $\text{H}_{2,12,13}$ ), 3.66 (3H, s,  $\text{H}_{19}$ ), 2.81 (4H, dd,  $J = 5.652$  Hz,  $\text{H}_{11, 14}$ ), 2.30 (2H, t,  $J = 7.44$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 2.08 (2H, td,  $J = 6.249$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 2.05 (2H, cd,  $J = 7.17$  Hz,  $\text{H}_{17}$ ), 1.62 (2H, t,  $J = 7.143$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 1.31 (8H, s,  $\text{H}_{4,7}$ ), 0.97 (3H, t,  $J = 7.43$  Hz,  $\text{H}_{18}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 174.06 ( $\text{C}_1$ ), 51.31 ( $\text{C}_{19}$ ), 34.01 ( $\text{C}_3$ ), 29.52 ( $\text{C}_4$ ), 29.1 ( $\text{C}_5$ ), 29.07 ( $\text{C}_6$ ), 29.04 ( $\text{C}_7$ ), 25.58 ( $\text{C}_{11}$ ), 25.49 ( $\text{C}_{14}$ ), 24.9 ( $\text{C}_2$ ), 20.5 ( $\text{C}_8$ ), 14.22 ( $\text{C}_{18}$ ).

Para determinar la estructura molecular de la mezcla de ésteres de ácidos grasos de la fracción 42 de este extracto se utilizó un sistema de cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas, de este estudio se aislaron los siguientes compuestos. El decenoato de metilo (9).

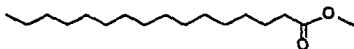


(9)

Tiempo de retención: 343 s.

EM( $m/z$ )(abundancia relativa): 41 (80), 55 (97), 59 (60), 69 (72), 74 (100), 83 (48), 87 (70), 94 (10), 98 (15), 111 (35), 115 (11), 125 (13), 136 (15), 143 (22), 155 (15).

Posteriormente eluyó el palmitato de metilo (10), cuya estructura y datos espectroscópicos de masas son los siguientes:

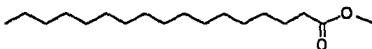


(10)

Tiempo de retención: 481 s.

EM ( $m/z$ ) (abundancia relativa): 43 (92), 55 (78), 69 (77), 74 (100), 87 (98), 97 (53), 115 (22), 129 (50), 135 (8), 143 (80), 157 (25), 171 (48), 185 (55), 199 (45), 213 (20), 219 (73), 227 (40), 239 (35), 270 ( $M^+$ , 43).

El tercer componente de esta mezcla es el heptadecanoato de metilo (11) con la siguientes estructura y datos espectroscópicos de masas.

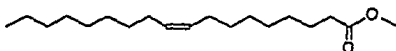


(11)

Tiempo de retención: 504 s.

EM ( $m/z$ ) (abundancia relativa): 43 (35), 55 (28), 69 (18), 74 (100), 83 (12), 87 (73), 97 (9), 111 (5), 129 (8), 135 (6), 143 (21), 149 (2), 185 (5), 199 (5), 241 (8), 253 (3), 284 ( $M^+$ , 3).

El cuarto producto natural de esta mezcla de ésteres de ácidos grasos es el oleato de metilo (12) con la siguiente estructura.



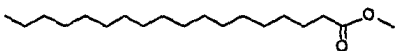
(12)

Sus datos espectroscópicos de masas son los siguientes:

Tiempo de retención: 520 s.

EM( $m/z$ )(abundancia relativa): 41 (90), 55 (100), 69 (70), 74 (65), 83 (55), 97 (50), 111 (27), 123 (29), 137 (13), 152 (10), 166 (8), 180 (17), 193 (4), 207 (6), 222 (20), 235 (5), 246, 296 (M<sup>+</sup>, 5).

El último componente de esta mezcla fue el estereato de metilo (13) con la siguiente estructura y datos espectroscópicos:



(13)

Tiempo de retención: 535 s.

EM( $m/z$ )(abundancia relativa): 43 (90), 55 (88), 69 (73), 74 (100), 87 (98), 97 (55), 111 (20), 129 (50), 143 (90), 157 (23), 171 (12), 179 (5), 185 (39), 193 (4), 199 (79), 207 (19), 213 (30), 227 (10), 241 (22), 255 (76), 267 (27), 298 (M<sup>+</sup>, 53).

Las propiedades físicas y datos espectroscópicos para el  $\beta$ -Sitosterol (14) son los siguientes.

Rendimiento: 3.41 g (0.00057%)

Pf. 139- 140 °C

IR ( $\nu_{max}$ ): 3608, 2950, 2931, 2860, 1450, 1380, 1040 y 950  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 5.34 (1H, dd,  $J=6.4$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 3.65 (1H, dddd,  $J=11.5$  y  
5.8 Hz,  $\text{H}_5$ ), 2.29 (2H, d,  $J=6.2$  Hz,  $\text{H}_2$ ), 1.30 (1H, sa,  $-\text{OH}$ ), 0.88 (3H, s,  $\text{H}_{19}$ ), 0.82 (3H,  
d,  $J=6.7$  Hz,  $\text{H}_{11}$ ), 0.79 (3H, t,  $J=7.3$  Hz,  $\text{H}_{29}$ ), 0.68 (6H, d,  $J=7.3$ ,  $\text{H}_{3,27}$ ).

### III. Extracto Acuoso-Metanólico.

Por la gran cantidad de agua que contenía el tejido vegetal fue necesario utilizar un sistema de condensadores enfriados con hielo seco en serie con el condensador del rotavapor para concentrar el extracto. Una vez secado el mismo, se tomaron 100 g para montar una columna cromatográfica. La columna se preparó con 500 g de sílica gel para placa, y el extracto se agregó adsorbido en 100 g de celita. La columna se eluyó a presión reducida colectando fracciones de 250 ml de la siguiente manera.

Fracciones	Polaridad	Constituyentes Aislados.
1-29	Hexano 100%	-----
30-53	Hex.-AcOEt 9:1	-----
54-70	Hex.-AcOEt 8:2	-----
71-97	Hex.-AcOEt 7:3	-----
98-108	Hex.-AcOEt 6:4	-----
109-135	Hex.-AcOEt 5:5	-----
136-147	Dicloromet-Acetona 9:1	-----
148-160	Dicloromet-Acetona 7:3	-----
161-182	Dicloromet-Acetona 5:5	-----
183-194	Dicloromet-MeOH 9:1	-----
195-211	Dicloromet-MeOH 8:2	-----
212-223	Dicloromet-MeOH 7:3	$\beta$ -D-Glucosa
224-240	Dicloromet-MeOH 6:4	Sacarosa
241-249	Dicloromet-MeOH 5:5	-----

A partir de la fracción 250 y hasta la fracción 265 se lavó la columna con metanol. El análisis por medio de CCF permitió determinar que los componentes mayoritarios de esta mezcla se encontraban en la fracción 222 y en la reunión de las fracciones 233-265.



La fracción 222 se acetiló con anhídrido acético y piridina, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo y de esta manera se aisló  $\beta$ -D-glucosa peracetilada (15). Las fracciones reunidas 233-265 también se acetilaron siguiendo el mismo procedimiento. Con la mezcla de compuestos extraída de la reacción de las fracciones reunidas se hizo una cromatoplaque preparativa de 20 x 20 cm, la que se eluyó con hexano-acetato de etilo 5:5 dos veces, para purificar el compuesto mayoritario evidente por CCF. De esta placa se recuperó sacarosa peracetilada (16).

La identificación de estos constituyentes fue posible por la comparación de los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  para la  $\beta$ -D-glucosa peracetilada y de RMN- $^1\text{H}$  para la sacarosa con los obtenidos para estándares publicados en la colección de espectros Sadtler.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Como resultado del presente estudio químico realizado en la especie vegetal *Casearia corymbosa*, se aislaron 15 productos naturales y se determinó su estructura molecular.

1. Mezcla de Poliisoprenalcanos.
2. Acido 2,4-dihidroxi-3-metil-cinámico .
3. Acido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico.
4. Acido 2,3,4-trihidroxi-cinámico.
5. Acido 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico.
6. Catequina.
7. Ester metílico del ácido linolénico.
8. Decenoato de metilo.
9. Palmitato de metilo.
10. Heptadecanoato de metilo.
11. Oleato de metilo.
12. Estereato de metilo.
13.  $\beta$ -Sitosterol.
14.  $\beta$ -D-Glucosa.
15. Sacarosa.

De éstos, tres corresponden a compuestos muy abundantes en las plantas, el  $\beta$ -sitosterol, la glucosa y la sacarosa. De los compuestos restantes el aislado en mayor abundancia fue el ester metílico del ácido linolénico. También se aisló en gran abundancia la mezcla de poliisoprenalcanos. Junto con los derivados de ácidos grasos aislados, estos compuestos son sustancias con propiedades nutritivas.

De los restantes productos naturales aislados, la catequina y los derivados del ácido cinámico tienen actividad antialimentaria (Rosenthal y Janzen, 1979). En angiospermas los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, presumiblemente en su forma de ésteres, son mortales aún en dosis bajas para organismos como el escarabajo *Callosobruchus maculatus* (Janzen, 1977). Por otro lado, es bien conocida la actividad antiséptica de los compuestos fenólicos, como son los derivados del ácido cinámico, de éstos, los que se encuentran disustituídos con hidroxilos y metoxilos son sintetizados inclusive por hongos unicelulares cuyo efecto antibiótico es utilizado contra organismos competidores (Camm, 1977).

El compuesto fenólico aislado en mayor abundancia fue la catequina, de la cual se aislaron 1.563 g ( $2.6 \times 10^{-4}\%$ ). Los derivados del ácido cinámico, en cambio, se encontraron presentes en la muestra de hojas estudiadas de esta especie en pequeñas cantidades. Estos derivados no se encuentran reportados en la literatura como productos naturales, aunque algunos de ellos si como productos de síntesis.

Los derivados del ácido cinámico, al constituir productos naturales novedosos ameritan un estudio sintético para corroborar las estructuras propuestas, las pequeñas cantidades en las que fueron aislados impidieron que se obtuvieran todas las evidencias espectroscópicas necesarias. La mezcla de poliisoprenalcanos merece un estudio más detallado, pues éstos son compuestos que rara vez se encuentran aislados en las plantas (Sims y Pettus, 1976) y es posible que algunos de los constituyentes de esta mezcla sean productos naturales no descritos en la literatura.

## BIBLIOGRAFIA

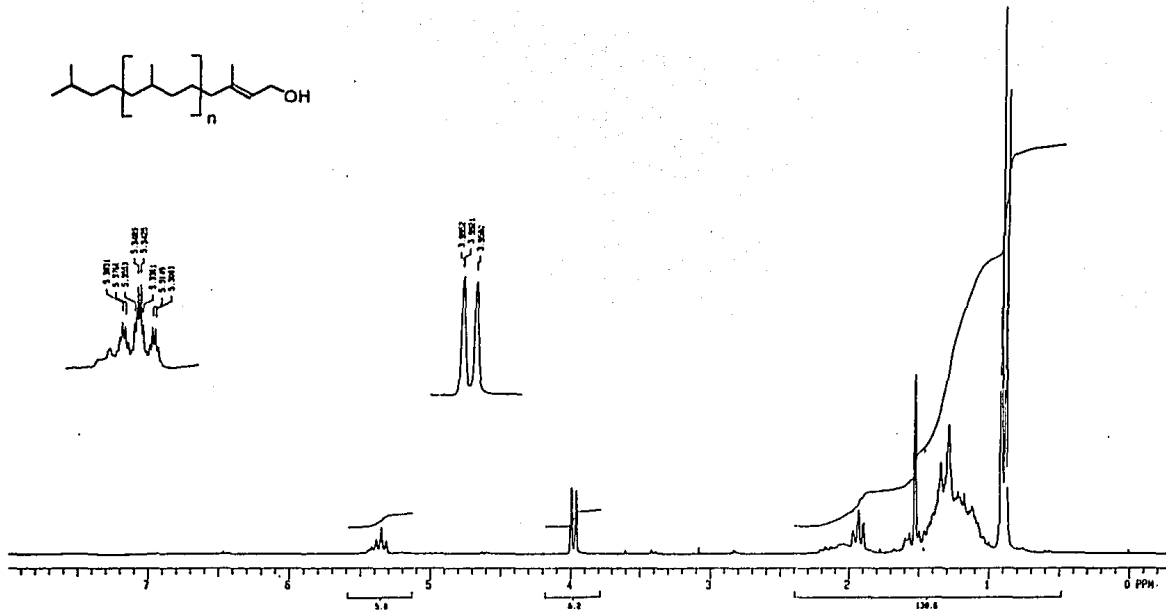
1. Camm, E. y Towers G. H. N. (1977), *Progress in Phytochemistry* **4**, 169-188.
2. Cannon, J., Chow, P., Fuller, M., Hamilton, B., Metcalf, B., Power, J. (1973), "Phenolic Constituents of *Gravillea robusta* (Proteaceae)", *Australian Journal of Chemistry*, **26**, 2257-2275.
3. Cramer, U., Refheldt, G., y Spener, F. (1980), "Isolation and Biosynthesis of Ciclopentenylglycine, a Novel Nonproteinogenic Amino Acid in Flacourtiaceae", *Biochemistry*, **19**, 3074-3080.
4. Dupin, J., y Chenault, J., (1985), "Phase Transfer Catalysed Wittig-Horner Synthesis Preparation of Hydroxycinnamic Esters From Ortho Hydroxy Aromatic Aldehydes Obtention of Hydroxycinnamic Acids", *Synthetic Communications*, **15**, 581-586.
5. Guittet, E., Stoven, V., y Lallemand, J. (1988), "Pitumbin, a Novel Kovalene Acylal from *Casearia pitumba* Pleumer", *Tetrahedron*, **44**, No. 10, 2893-2901.
6. Gunasekera, S. y Sultanbawa, M. (1977), "Chemical Investigation of Ceylonese Plants. Part 23. Extractives of *Hydnocarpus Octandra* Thw. (Flacourtiaceae); Isolation and Characterisation of Six New Triterpenoids", *Journal of the Chemical Society, Perkin I*, 418-423.
7. Harborne, J. B. (1982), "Introduction to Ecological Biochemistry", segunda edición, Academic Press, Londres.
8. Harborne, J. B. y Mabry, T. J. (1982), "The Flavonoids: Advances in Research, Chapman and Hall, London.
9. Itokawa, H., Totsuka, N., Takeya, K. (1988), "Antitumor Principles From *Casearia sylvestris* SW. (Flacourtiaceae), Structure Elucidation of New Clerodane Diterpenes by 2-D NMR Spectroscopy.", **36**, 1583-1588.

10. Janzen, D., Juster, H., y Bell, E. (1977) , "Toxicity of Secondary Compunds to the Seed- Eating Larvae of the Bruchid Beetle *Callosobruchus maculatus*", *Phytochemistry*, **16**, 223-227.
11. Julia, M., y Roy, P. (1986), "Selective Reduction of the Distant Double Bond(s) in Geranyl, Farnesyl and Geranyl Geranyl Derivatives", *Tetrahedron.*, **42**, 4991-5002.
12. Khan, M., Gray, A., Sadler I. y Waterman P. (1990), "Clerodane Diterpenes from *Casearia corymbosa* Stem Bark", *Phytochemistry*, **29**, 3591-3595.
13. Legseir, B., Cherif, A., Richard B., Pusett. J, Labarre S., Massiot G. (1986), *Phytochemistry*, **25**, 1735-1738.
14. Lott, E. J. (1985), "La Estación de Biología Chamela, Jalisco, Listados Florísticos de México", Herbario Nacional, UNAM, México.
15. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., y Simon, W. (1980), "Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos, Alhambra, España.
16. Refheldt, A., Shulte, E., y Spener, F., (1980), "Occurrence and Biosynthesis of Cyclopentenyl Fatty Acids in Leaves and Chloroplasts of Flacourtiaceae", *Phytochemistry*, **19**, 1685-1689.
17. Rosenthal, G. A., y Janzen, D. H. (1979), "Herbivores, Their Interaction with Secondary Plant Metabolites", Academic Press, New York.
18. Rzedowski, J. (1986), "Vegetación de México", tercera reimpresión, Limusa, México.
19. Sims, J., y Pettus, J. (1976), "Isolation of Free Cis and Trans-Phytol from the Red Alga *Gracilaria andersoniana*", *Phytochemistry*, **15**, 1076-1077.
20. Sleumer, H. O. (1980), "Monografía 22 (Flacourtiaceae), Flora Neotrópica", The New York Botanical Garden, New York.
21. Talapatra, K., Goswami, N., Ganguly, S., y Talapatra, B. (1980a), "Structure of casegravol: a New Monomeric Coumarindiol from *Casearia graveolens* Dalz", *Chemistry and Industry*, Febrero 1980.

22. Talapatra, K., Goswami, N., Ganguly, S. y Talapatra, B. (1980b), "Chemical Constituents of *Casearia graveolens*: Some Novel Reactions and the Preferred Molecular Conformation of the Major Coumarin, Micromelin", *Journal of Natural Products*, 46, No. 3, 401- 408.
23. Torsell, K. (1983), "Natural Product Chemistry", John Wiley and Sons, London.

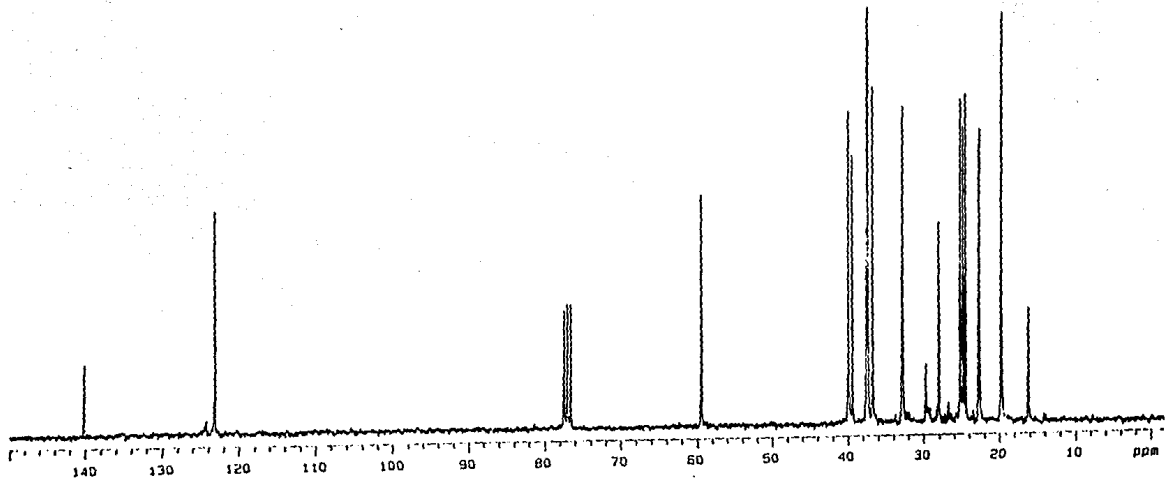
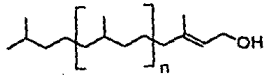
## APENDICE

Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$   
y Espectrometría de Masas

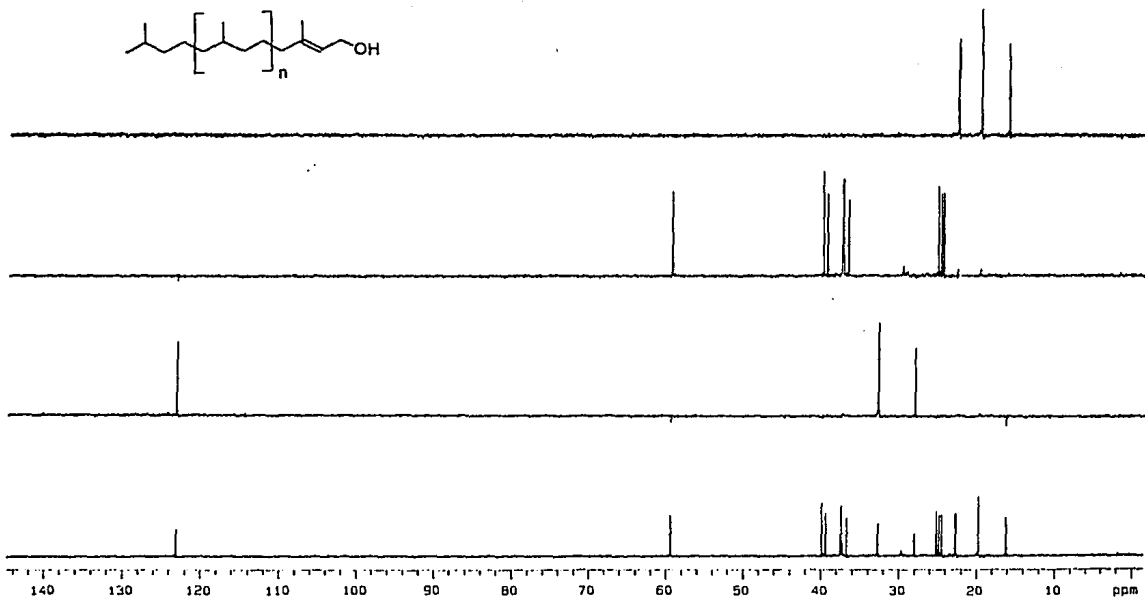
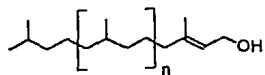


Espectro 1. RMN- $^1\text{H}$  (200 Mhz,  $\text{CDCl}_3 + \text{C}_6\text{D}_6$ ) de la mezcla de poliisoprenalcanos (1).

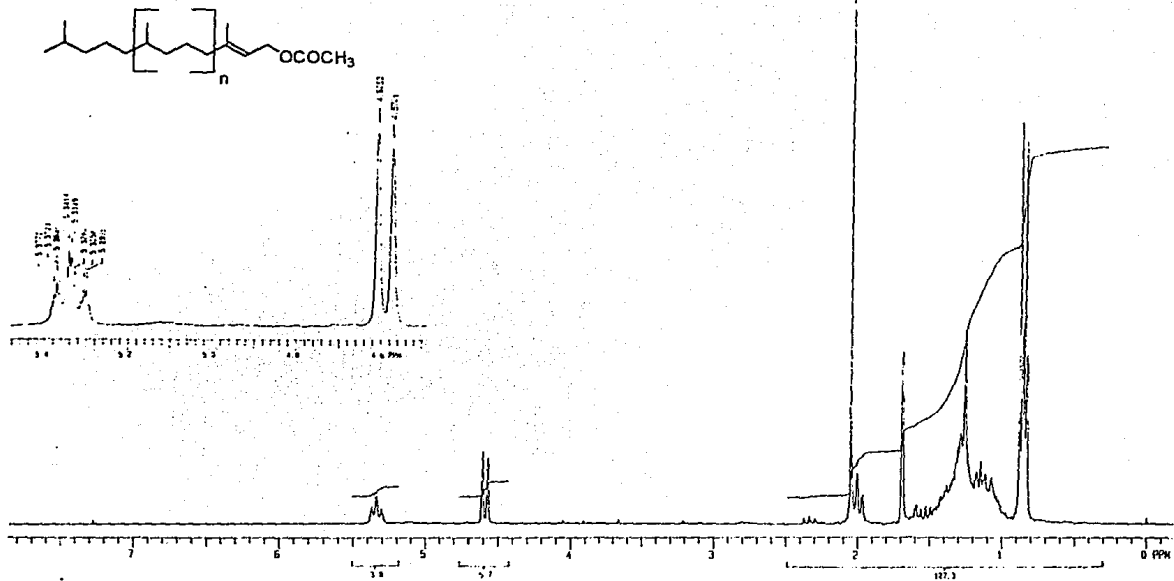




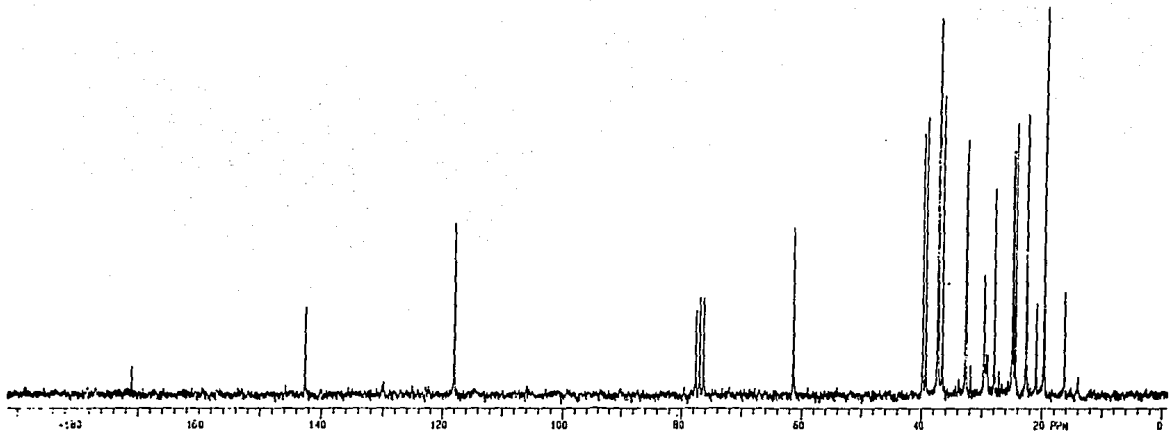
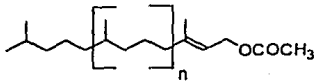
Espectro 2. RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la mezcla de poliisoprenalcanos (1).



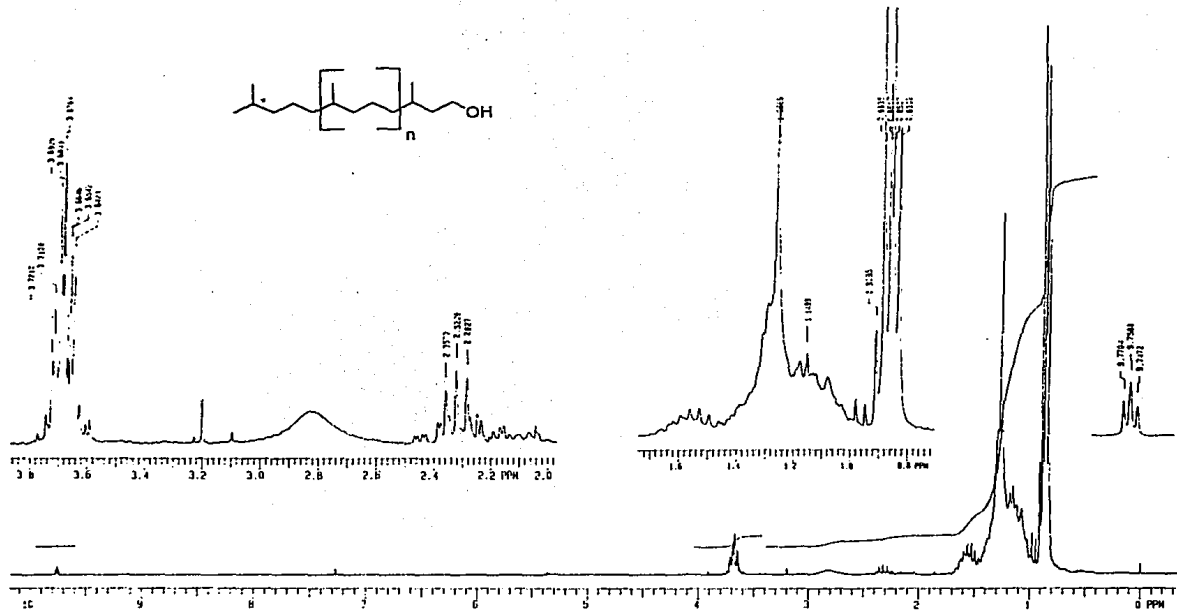
Espectro 3. DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la mezcla de poliisoprenalcanos (1).



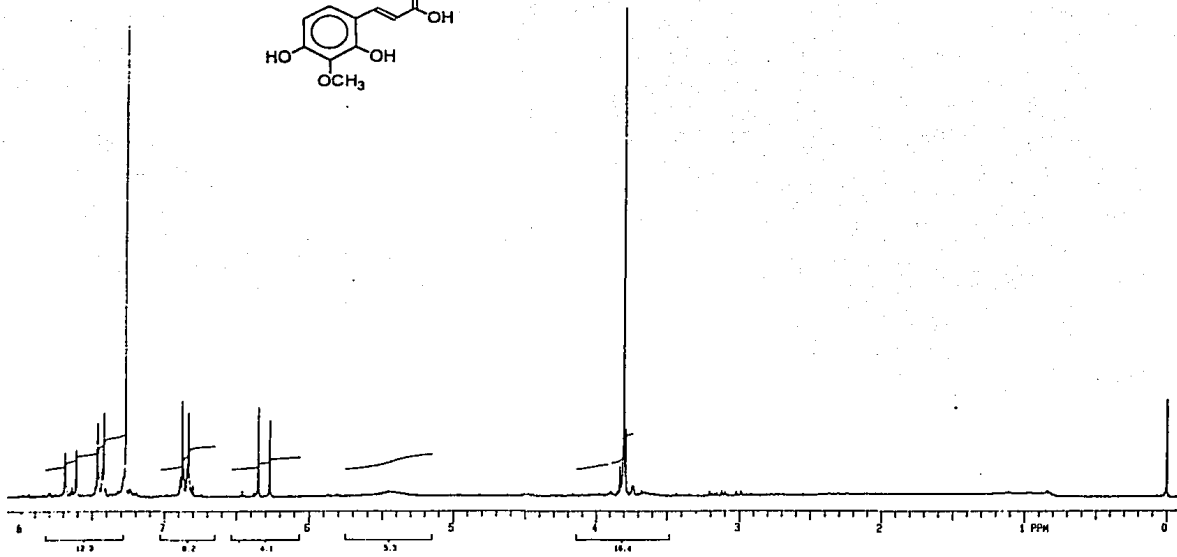
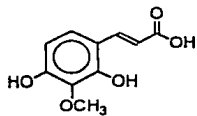
Espectro 4. RMN- $^1\text{H}$  (200MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la mezcla de poliisoprenalcanos acetilada (1a).



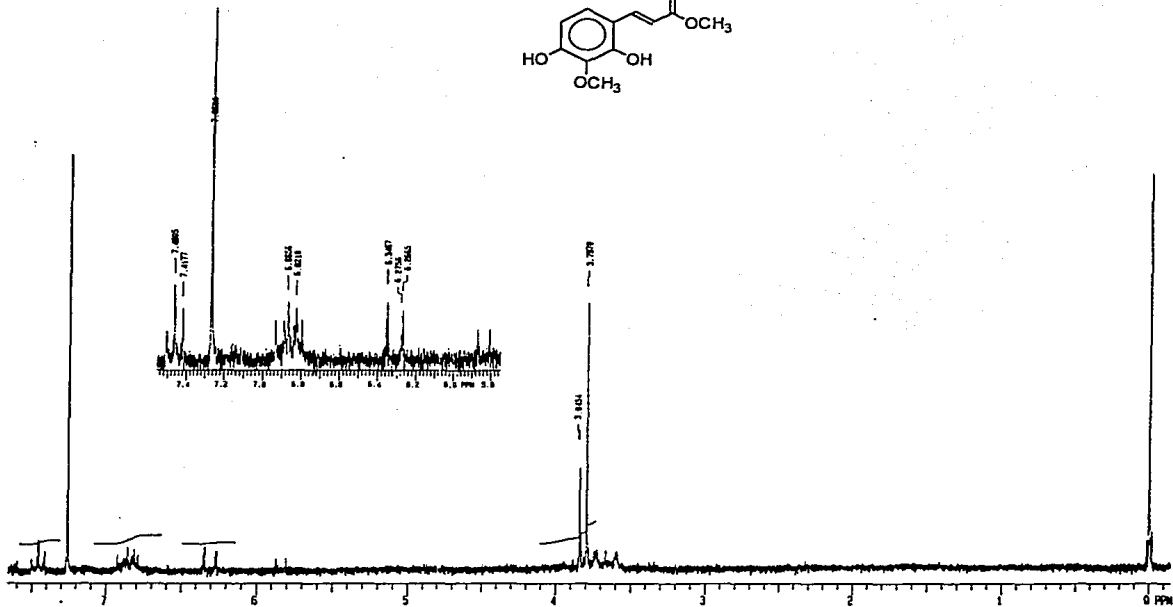
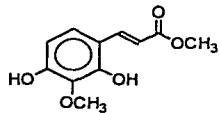
Espectro 5. RMN-<sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la mezcla de poliisoprenalcanos acetilada (Ia).



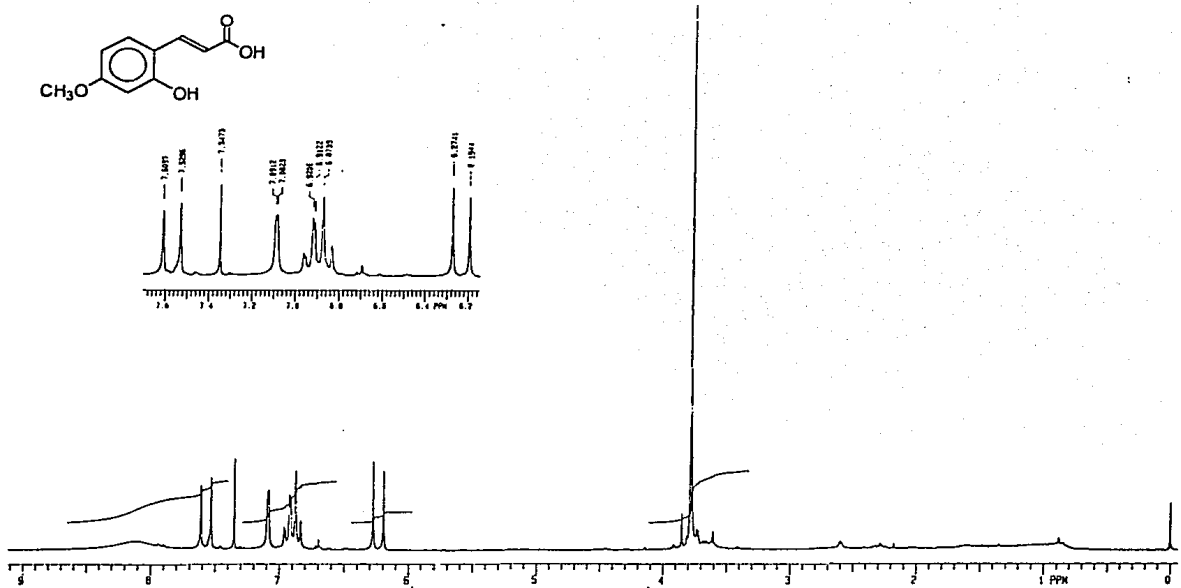
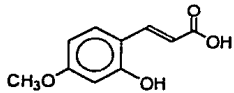
Espectro 6. RMN- $^1\text{H}$  (200MHZ,  $\text{CDCl}_3$ ) de la mezcla de poliisoprenalcanos hidrogenada (1b).



Espectro 7. RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido 2,4-dihiroxi-3-metoxi-cinámico (2).

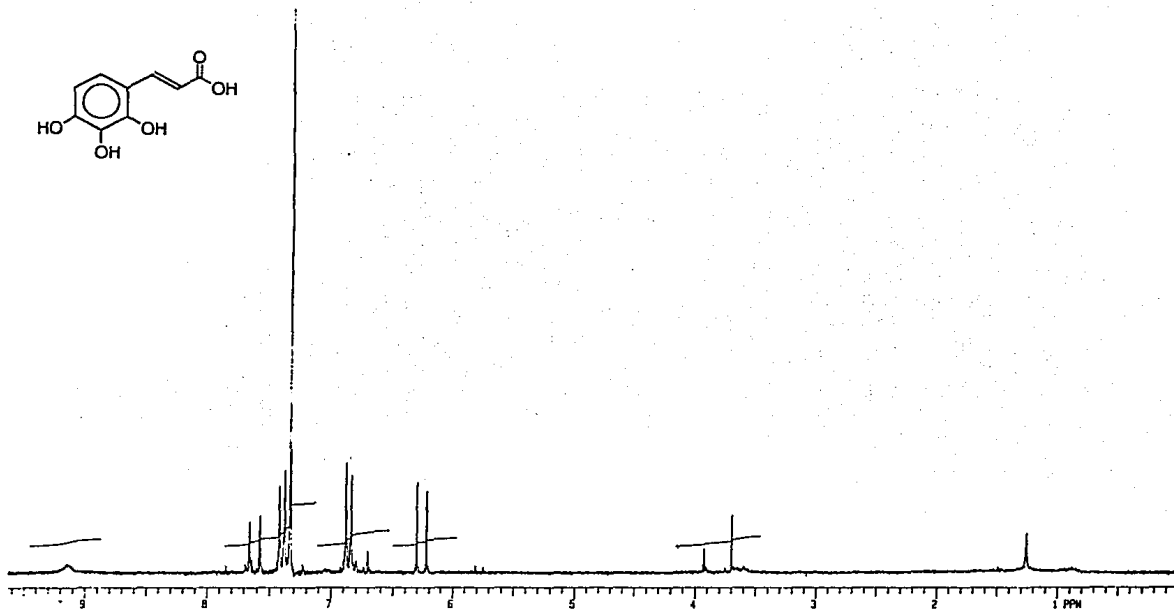
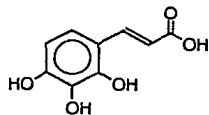


Espectro 8. RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ester metilico del ácido 2,4-dihiroxi-3-metoxi-cinámico (2).

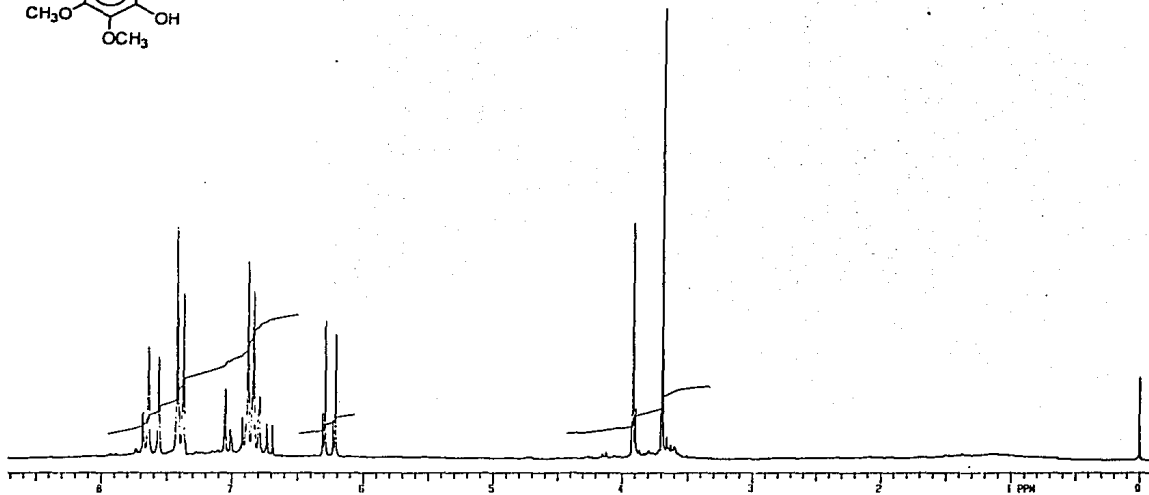
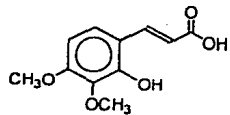


Spectro 9. RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) del ácido 2-hidroxi-4-metoxi-cinámico (3).

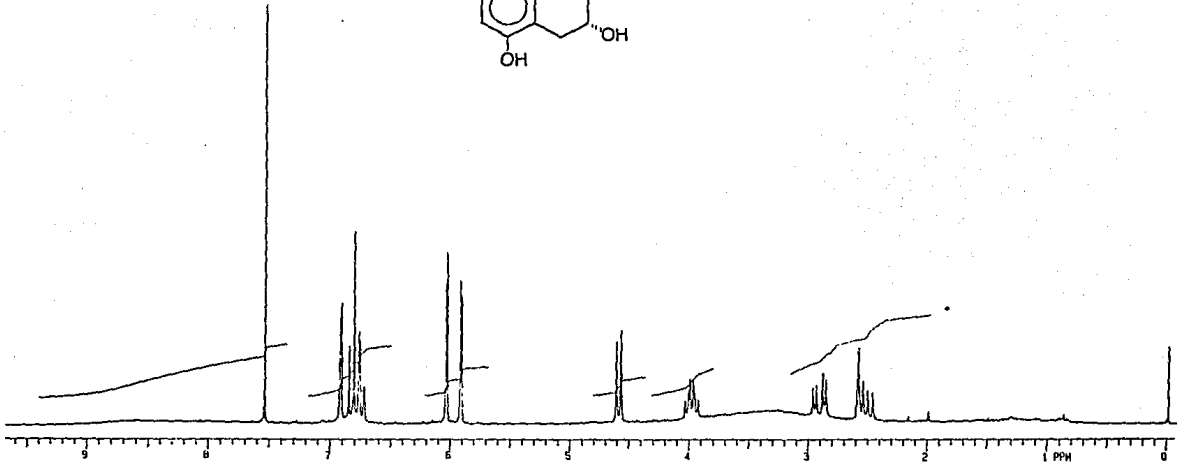
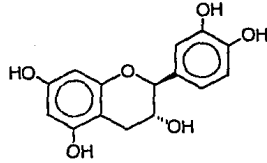




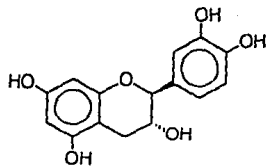
Espectro 10. RMN- $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$ ) del ácido 2,3,4-trihidroxi-cinámico (4).



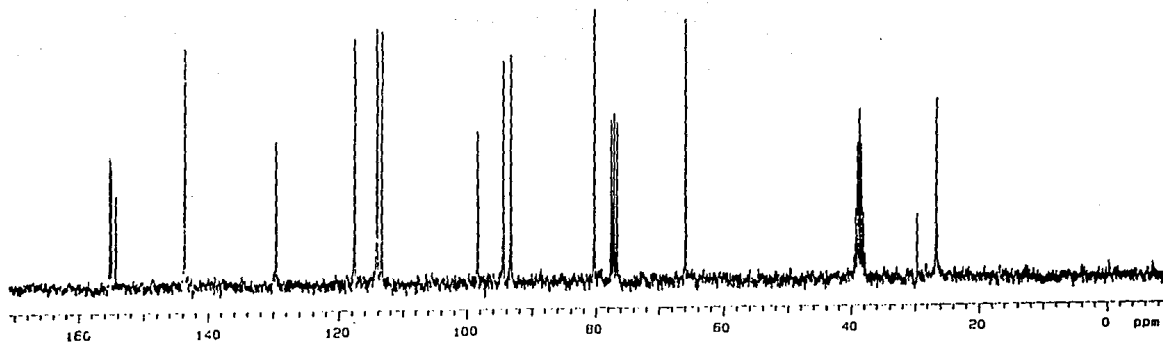
Espectro 11. RMN-1H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub> + DMSO) del ácido 2-hidroxi-3,4-dimetoxi-cinámico (5).



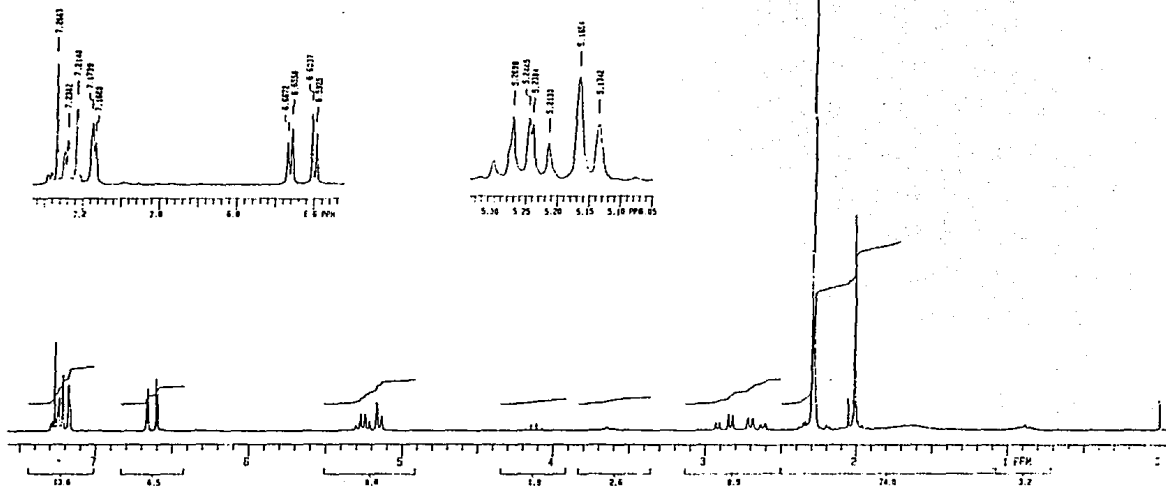
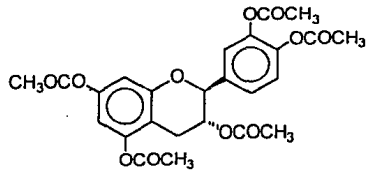
Espectro 12. RMN-<sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub> + DMSO) de la catequina (6)



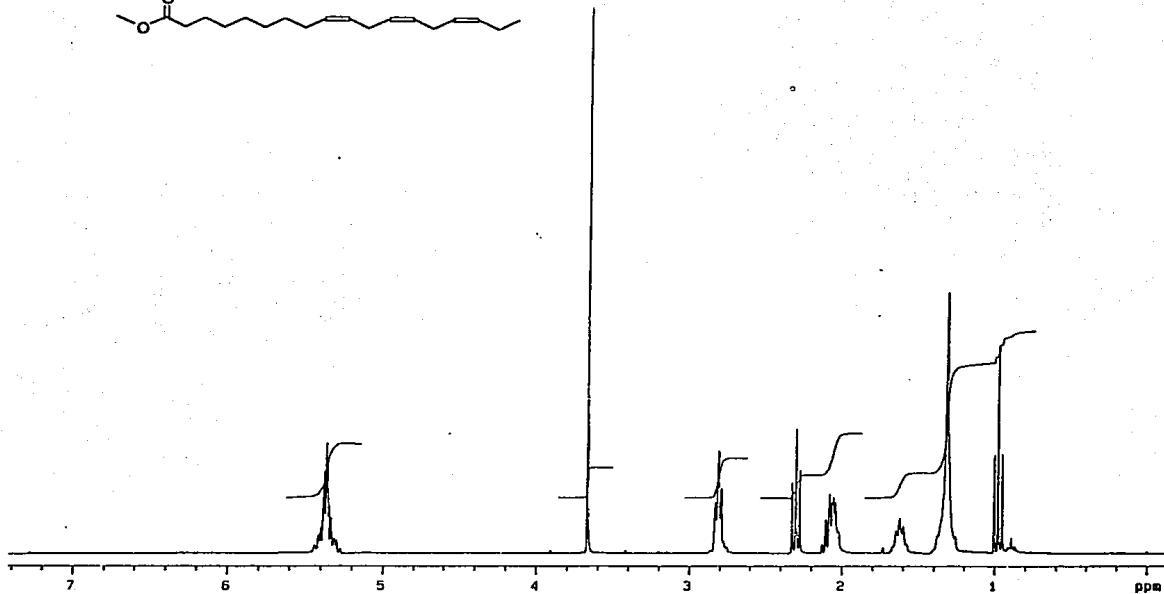
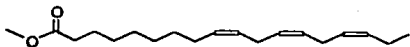
ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA  
BIBLIOTECA



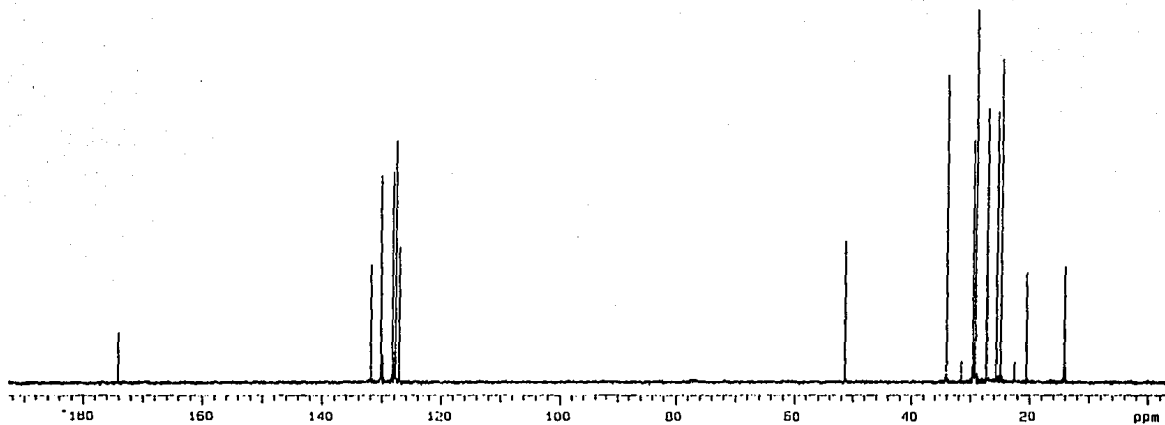
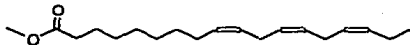
Espectro 13 RMN- $^{13}\text{C}$  ( 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$  + DMSO) de la catequina (6).



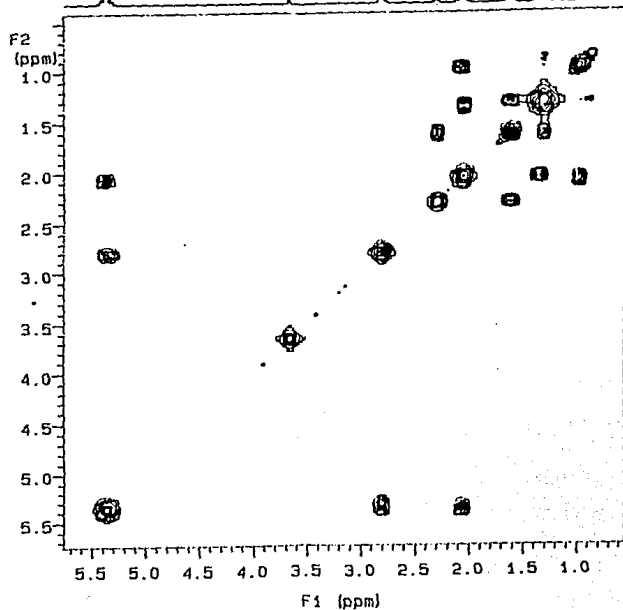
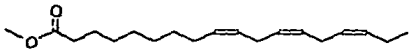
Espectro 14. RMN-<sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la catequina peracetilada (7).



Espectro 15. RMN- $^1\text{H}$  ( 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  ) del ester metilico del ácido linolénico (8).

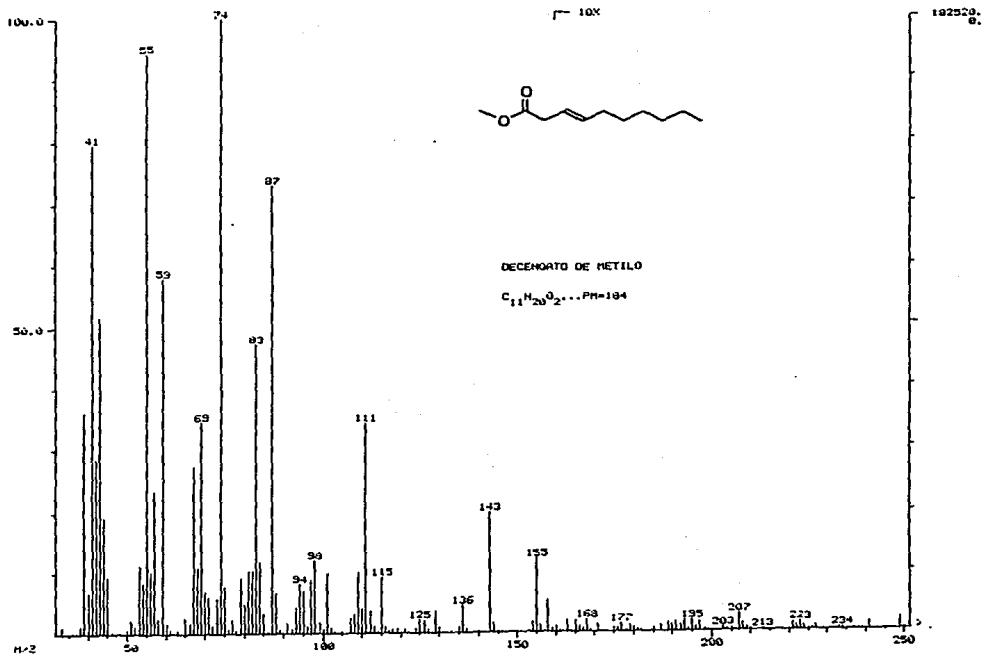


Espectro 16. RMN-<sup>13</sup>C ( 75 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) del ester metilico del ácido linolénico (8).

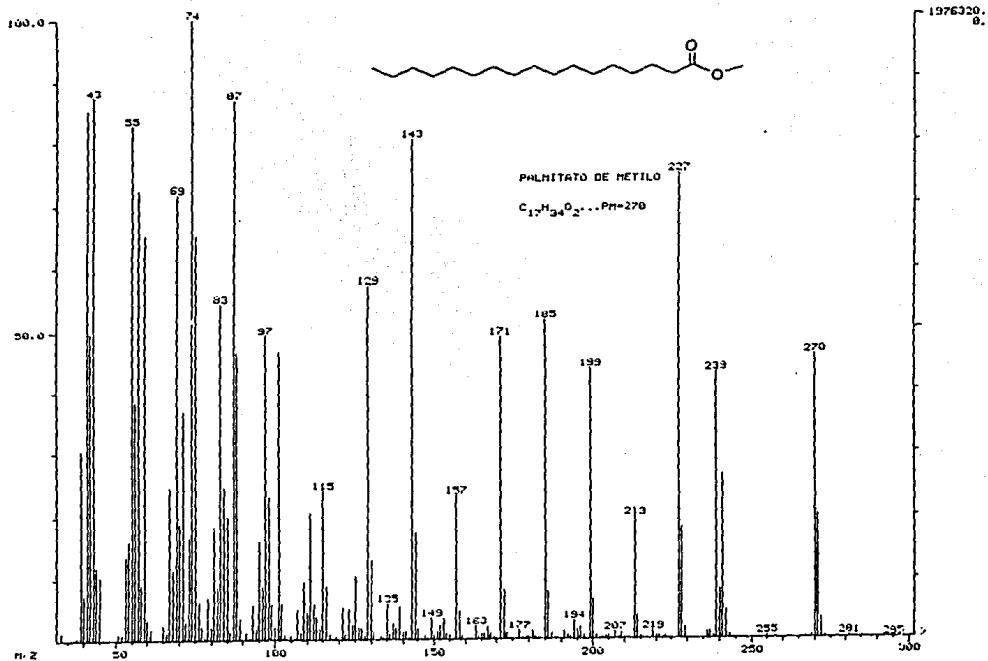


Espectro 17. COSY ( 300 MHz, CDCl<sub>3</sub> ) del ester metilico del ácido linolénico (8).

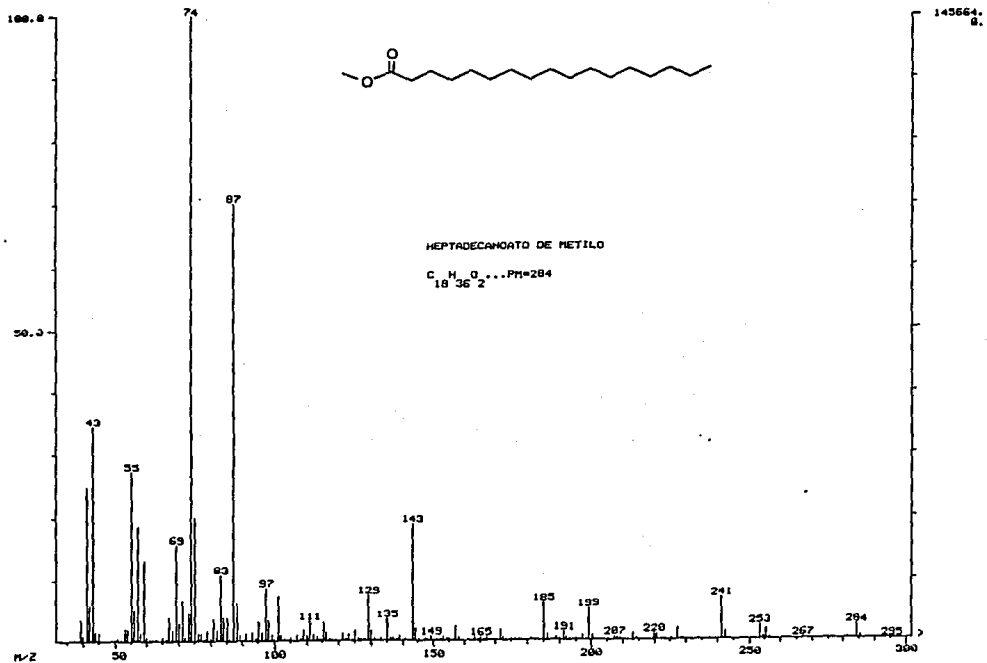




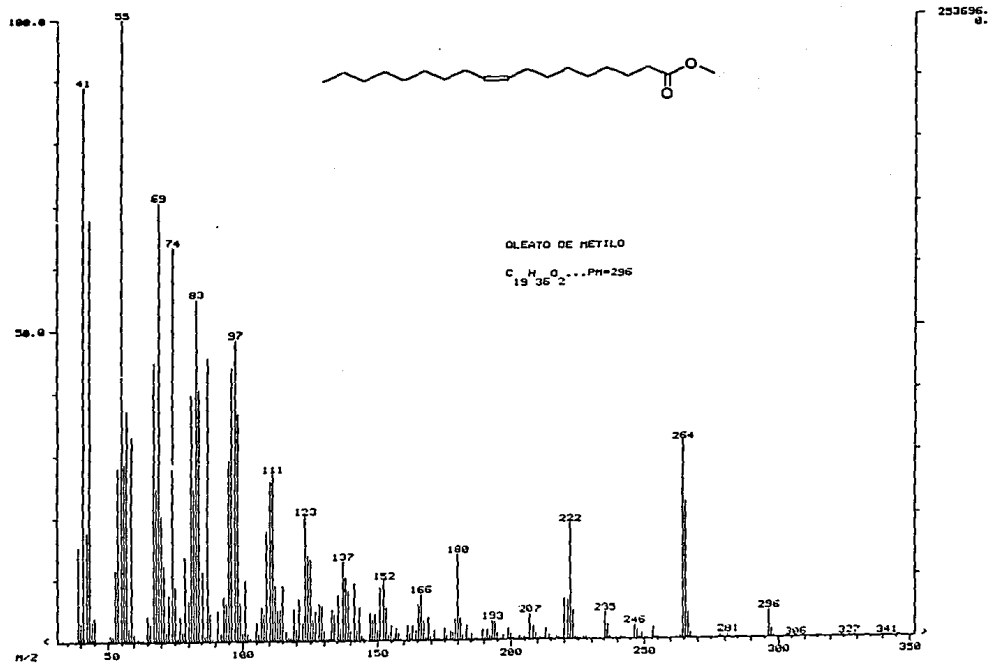
Espectro 18. EM del decenoato de metilo (9).



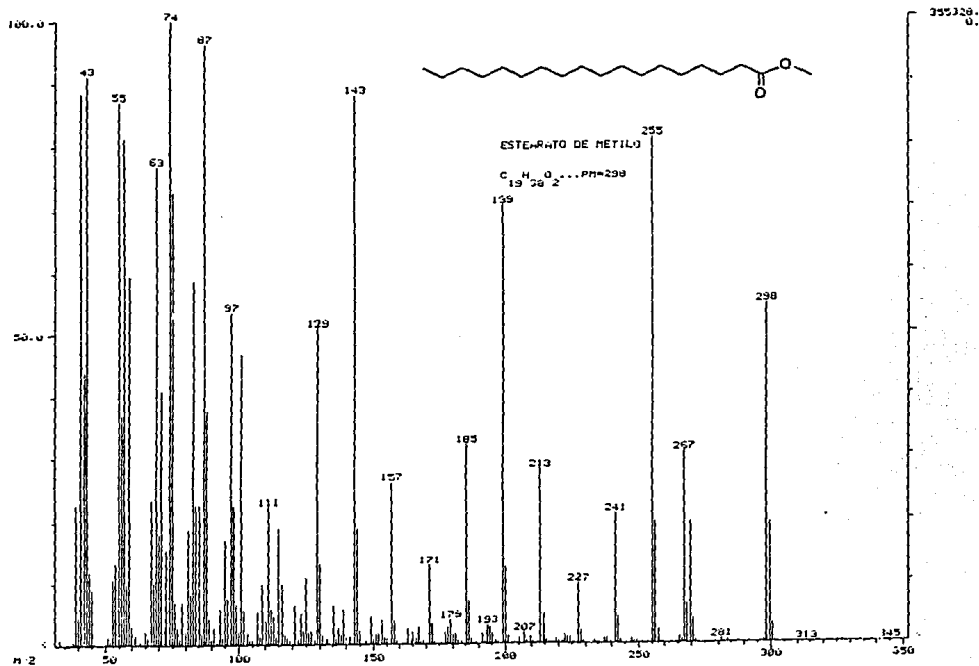
Espectro 19. EM del palmitato de metilo (10).



Espectro 20. EM del heptadecanoato de metilo (11).



Espectro 21. EM del oleato de metilo (12).



Espectro 22. EM del estearato de metilo (13).