

RECEIVED
 1984
 FEBRUARY 11 11:30 AM
 QUIMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
 DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE HESPEROZYGIS
 marifolia (Labiatae)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C A

P R E S E N T A :

MARIA MONSERRAT DE LA LUZ GARCIA CURIEL



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1984



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.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

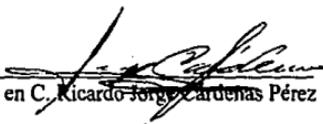
JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Alfonso Romo de Vivar
Vocal: Prof. Raúl Guillermo Enríquez Habib
Secretario: Prof. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez
1er. suplente: Prof. Patricia Elizalde Galván
2do. suplente: Prof. Fernando León Cedeño

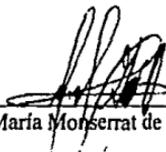
Lugar donde se desarrolló la tesis:

**INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATORIO 2-8
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Asesor de Tesis:


M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez

Sustentante:


María Monserrat de la Luz García Curiel

**Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del M. en C. Jorge
Cárdenas Pérez, en el laboratorio 2-8 del Instituto de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México.**

Dedico esta tesis a:

**Mis padres a quien les debo todo lo que soy, siendo imposible plasmar en un papel todo lo que realmente representan para mí. Gracias por siempre estar a mi lado.
A mis hermanas Soco, Chelo y Celi.**

EPET

RECONOCIMIENTOS:

Esta tesis es el producto sinérgico de mi asesor y yo, con quien hubo una constante comunicación para la conclusión de la misma

A Jorge: su presencia

A Claudia: mi amiga

A Adrián: su apoyo

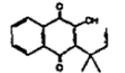
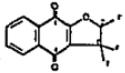
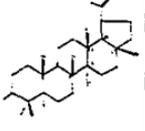
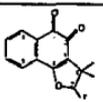
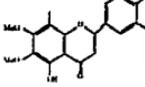
A Bernardo: su amistad

A la Universidad Nacional Autónoma de México

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
1.0 ANTECEDENTES	6
2.0 PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	18
3.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	23
4.0 CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ESPECTROS	49

ÍNDICE DE PRODUCTOS:

Producto	Discusión pág.	Espectros		Estructura
		IR	RMN	
1	23	49	50-52	
2	27	53	54-60	
3	36		63-64	
4	38	65	66-70	
6	44		71	

INTRODUCCIÓN

El conocimiento y utilización del mundo vegetal es una *meta* llena de recompensas intelectuales y materiales. La historia de la química abunda en intentos por separar sustancias puras de las plantas; entre ellos destaca el aislamiento de la sacarosa y la obtención del primer alcaloide: la morfina. Los productos naturales siempre han significado una alternativa muy importante en la búsqueda de sustancias con actividad terapéutica, que presentan un mayor efecto o bien una menor toxicidad que ciertos fármacos ya empleados.

La búsqueda de nuevos antineoplásicos es una idea que subyace actualmente en muchos proyectos de investigación de productos naturales orgánicos. El cáncer es uno de los principales problemas de salud que en este momento tiene planteada la medicina.

La complejidad molecular de los productos naturales de interés farmacológico tales como la quinina, morfina, emetina, digitalina, etc. y los pocos medios de que disponía el investigador antes de utilizar las técnicas espectroscópicas, hacía que el esclarecimiento de la estructura de los metabolitos secundarios implicara muchos años de trabajo, lo cual es una manifestación de ingenio, tesón y laboriosidad de los químicos dedicados a la investigación sobre productos naturales.

El estudio de las toxinas resulta también interesante, y se conocen diversas sustancias tóxicas producidas por animales, plantas o microorganismos, capaces de inhibir selectivamente componentes importantes del sistema nervioso. El esclarecimiento de la estructura molecular de las toxinas, que intervienen en los procesos de inhibición es fundamental para conocer su mecanismo de acción molecular.

La obtención de productos naturales enantioméricamente puros a partir de productos naturales con centros quirales resulta interesante, al igual que llegar al conocimiento de las reacciones regio y estereo-selectivas y al control conformacional de

las mismas, base sobre las que descansan las síntesis biomiméticas de productos naturales.

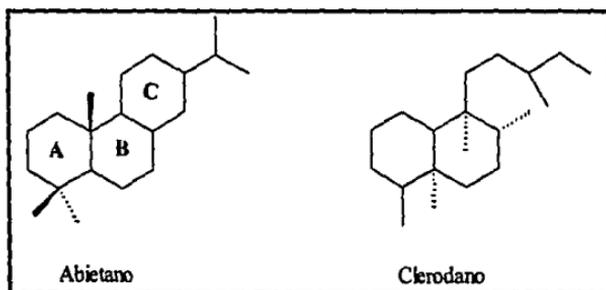
Las reacciones que realizan las enzimas suelen ser regio-selectivas y estereoespecíficas. La biosíntesis de un metabolito complejo se verifica a través de un conjunto de reacciones que conforman su ruta biosintética, es necesaria la intervención de un complejo multienzimático, capaz de biocatalizar las diferentes reacciones implicadas, transformando un precursor en un producto final.¹

Las plantas producen ciertas sustancias tóxicas para los herbívoros; otras sustancias menguan el valor nutritivo de las plantas o impiden el crecimiento de un insecto. No son los metabolitos primarios de una planta (las sustancias que sintetiza y resultan esenciales para su crecimiento y reproducción) los que las convierten en adecuadas o inadecuadas como recurso alimentario, al contrario, la conveniencia de una planta depende en gran medida de sus metabolitos secundarios: compuestos metabólicos no implicados en los procesos ordinarios de la vida, los cuales varían de una mata a otra, contribuyendo a definir las características singulares de cada individuo.²

Numerosos estudios concluyen que la familia *Labiatae*, es una considerable fuente de sustancias farmacológicas, que a nivel experimental han demostrado sus propiedades y su potencial aplicación terapéutica.^{3,4}

El género *Salvia*, de la familia *Labiatae*, es uno de los más abundantes y diversificados de esta familia (comprende a cerca de 900 especies), Bentham dividió este género en cuatro subgéneros (*Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*). Las *Salvias* europeas y asiáticas pertenecen a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. El subgénero *Leonia* se encuentra representado por varias especies de *Salvias* de América del Norte. La mayor parte de las 500 especies de *Salvias* de México, Centro y Sudamérica, pertenecen al subgénero *Calosphace*. El género *Salvia* se caracteriza por ser una importante fuente de

metabolitos, entre los que destacan: monoterpenos, diterpenos con esqueleto de clerodano, abietano y pimarano triterpenos y flavonas. Los compuestos diterpénicos poseen actividad virostática y antibacteriana; compuestos del tipo triterpénico, como el ácido ursólico y su correspondiente acetato, presentan un notable efecto sobre el metabolismo de lípidos en la artereosclerosis inducida. Las principales propiedades que presentan los productos naturales de esta familia son: antibacterianos, antivirales y espasmolíticos.⁵ El estudio fitoquímico de las *Salvias* europeas y asiáticas condujo al aislamiento de diterpenos con esqueleto de abietano. La mayoría de los diterpenos aislados de estas plantas presentan el anillo C oxidado. Por otro lado, se han aislado diterpenos con esqueleto de clerodano de los géneros *Ajuga*, *Teucrium* y *Escutellaria* y de las *Salvias* del género *Calosphaea*.



Muchas de las especies de esta familia presentan una particularidad distintiva. En sus tejidos foliares contienen aceites esenciales, que son los que les confieren sus propiedades aromáticas, y permite su empleo como condimento o saborizante, e.g., el orégano (*Origanum vulgare*), el romero (*Rosmarinus officinalis*), la yerbabuena (*Mentha sp.*), etc.⁶

Lo expuesto anteriormente conduce a destacar la gran importancia que tiene la familia *Labiatae* en el campo científico. A esta familia pertenecen las *Hesperozygis* de las cuales no se tiene conocimiento de descripción química alguna de este tipo de plantas.

OBJETIVOS

- Proporcionar antecedentes del estudio fitoquímico de *H. marifolia*, para contribuir a estudios posteriores del género *Hesperozygis*.
- Aislar los metabolitos secundarios de la planta mediante la utilización de diversos métodos cromatográficos.
- Identificar por métodos espectroscópicos los productos aislados.
- Caracterizar a los metabolitos mediante la preparación de derivados.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DE *Hesperozygis marifolia*.

Morfología del género *Hesperozygis*.

El género *Hesperozygis* es totalmente americano. Existen aproximadamente 12 especies de *Hesperozygis*, de las cuales 4 están localizadas en México (*bella*, *ciliolata*, *marifolia* y *pusilla*) y se encuentran distribuidas en los estados de Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí e Hidalgo, las restantes se ubican en Brasil en un clima tropical (Río Grande del Sur, Santa Catalina y Paraná).

Las características generales del género *Hesperozygis* son las siguientes: Son arbustos frondosos o matorrales herbáceos con hojas más o menos coriáceas y ovaladas o subovaladas, elíptica-lanceolada en *H. ciliolata*; las hojas son sésiles o apenas pecioladas; ramas pubescentes (con "vellos" axiliares en *H. marifolia*); címulas sésiles o apenas pedunculadas, inflorescencias 1-3. dispuestas en las axilas de las hojas superiores casi disminuidas y apenas espigadas; los cáliz son pubescentes o lisos pegados en su base, con 13-15 venas, con dentición similar, deltoide-lanceolada o acuminada, de forma erecta y paralela, sin el orificio cerrado, los dientes superiores conados en la base, el tubo es anulado y muy pubescente hasta la base de los dientes inferiores y un poco constricto, con el anillo (annulus) colocado en la mitad del cáliz; el tubo de la corola algo pubescente, casi de forma anular excepto en la base, el "paladar" es usualmente pubescente en dos líneas descendentes, el "labio" superior es casi erecto, cortado, casi igual o mayor al "labio" inferior; los estambres localizados cerca o un poco arriba de la mitad del tubo, ascendiendo bajo el "labio" superior pero sin sobrepasarlo; las antenas

ampliamente divergentes, con septo (en las antenas) bien desarrollado; estilo liso o pubescente (como en *H. marifolia*). Plantas mexicanas o brasileñas.⁷

Torrey en 1859 dio una descripción informal para *Hedeoma incanum* y propuso que si se encontraban otras especies nuevas, podía entonces tratarse de un nuevo tipo de género. Posteriormente en 1870 Gray propuso el género *Poliomintha* para ubicar a dos especies *P. longiflora* y *P. incana*. En 1897 con el tratamiento de Briquet de la familia *Labiatae*, el género *Poliomintha* emergió con *Hedeoma*, reflejando las dificultades inherentes en la disposición de la Taxa. Con el trabajo de Epling & Stewart (1939), el estatus de género fue dado otra vez a *Poliomintha*.

El número de cromosomas de *Poliomintha* ($2n = 36$) lo separa de varios grupos relacionados. Por ejemplo, la única especie contada para *Hesperozygis*, *H. marifolia* ($2n = 44$) ha sido extremadamente difícil de tratar, ya que muestra afinidades tanto con *Poliomintha* como con *Hedeoma*. El número de cromosomas $2n = 36$ para *Poliomintha* sugiere tentativamente una separación entre *Poliomintha* y *H. marifolia*.

Poliomintha y el género Sudamericano *Hesperozygis* son relativamente distintos, excepto por la especie ambigua *H. marifolia* ($2n = 44$) de México. La última posee el hábito de *Poliomintha*, un cáliz intermedio entre los dos géneros y el cáliz annulus más típico de *Hesperozygis*. Las diferencias entre *Poliomintha* y *Hesperozygis* se muestran en la siguiente tabla:

• <i>Hesperozygis</i> •	• <i>Pollomintia</i> •
• Cáliz ya sea simétrico y campanulado o bilabiado.	• Cáliz simétrico, tubular.
• Dentición del cáliz casi igual, erecta y dispuesta en grupos superiores e inferiores.	• Dentición del cáliz casi igual, curvada opuestamente para cerrar el orificio.
• El anillo del cáliz bien definido y usualmente localizado bajo la base de los dientes.	• El anillo del cáliz ausente o irregular y localizado en la base de los dientes.
• Tubo de la corola pubescente.	• Tubo de la corola anulado (de forma anular).
• Principalmente en Sudamérica,	• Exclusivamente en Norteamérica.
• $2n = 44$	• $2n = 36$

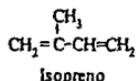
Así pues, la clasificación de Gray como *Pollomintia marifolia* (1872), fue modificada por Epling en 1939 como *Hesperozygis marifolia*.⁸

Anatomía de *Hesperozygis marifolia*.

Es un pequeño arbusto de 20 a 40 cm de altura, sus ramas son pubescentes con apariencia ceniza, las hojas son prominentes dispersas o ascendentes, ovales de 5-15 mm, de largo, ambas superficies son pubescentes; redondeadas en el ápice; inflorescencias 1-6 cimas, usualmente 3; con pedicelos de cerca de 1 mm de largo, que portan un par de brácteas. El tubo del cáliz de 4.5-6 mm de largo, 13-inervado, pubescente; la dentición es subulada-lanceolada, usualmente derecha y erecta; con el anillo denso. colocada hacia la mitad del cáliz, el cual está de alguna manera constriñido.⁷

1.2 ISOPRENO Y REGLA ISOPRÉNICA.

El caucho natural se puede considerar un polímero del dieno conjugado 2-metil-1,3-butadieno, o **isopreno**.⁹



La unidad isoprenica es uno de los bloques constructivos de la naturaleza. No solamente aparece en el caucho, sino también en una amplia variedad de compuestos que se aíslan de fuentes vegetales y animales. Así, prácticamente todos los *terpenos* (que existen en los aceites esenciales de muchas plantas) tienen esqueletos carbonados contruidos con unidades de isopreno unidas entre sí de un modo regular de <cabeza con cola> (Fig. 1). El reconocimiento de este hecho - la llamada regla isoprenica - ha sido de gran ayuda en la elucidación de las estructuras de los terpenos.

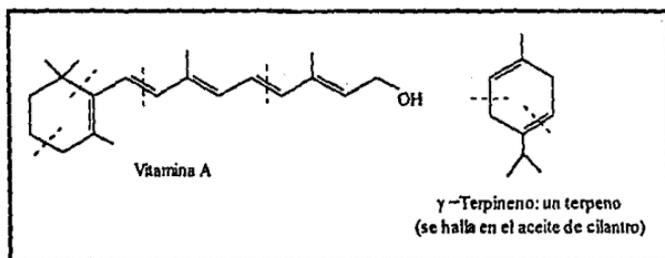


Fig. 1

Un área fascinante de investigación que une la química orgánica con la biología es el estudio de la *biogénesis* de productos naturales: la serie detallada de reacciones por las que se forma un compuesto en los sistemas vivos, ya sean plantas o animales. Aparentemente, todas las unidades isopreno de la naturaleza tiene su origen en una misma substancia, el ácido mevalónico y el pirofosfato de <isopentenilo> (Fig. 2).

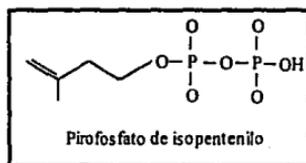


Fig. 2

1.3 BIOGÉNESIS.

Papel central de ácido acético como precursor biosintético.

El ácido acético en forma de acetyl-CoA es el precursor no sólo de ácidos grasos, esteroides y prostaglandinas, sino también de muchos otros productos naturales, particularmente de los terpenos.¹⁰ Un gran avance en los estudios de la biogénesis de los terpenos, empezó con el descubrimiento del ác. mevalónico y el reconocimiento de éste como un precursor del colesterol. El ácido mevalónico se forma a partir del ácido acético de los tejidos. El mecanismo involucra la condensación de la acetyl-CoA y acetoacetyl-CoA a β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA. Una reducción posterior del grupo tioéster produce ácido mevalónico. Solamente el (+)-ác. mevalónico es un precursor del escualeno y por consiguiente sólo este isómero servirá como precursor de otros terpenos¹¹ (Esquema 1).

Quinonas.

Como otros metabolitos secundarios, las quinonas son derivadas de intermediarios clave como; acetato, shikimato y mevalonato principalmente, para una serie de reacciones que dan lugar a la formación de compuestos benzenoides. Se asume que el último paso involucra una oxidación de un fenol, como en varias síntesis efectuadas en el laboratorio. Probablemente la mayoría de las quinonas siguen la ruta metabólica acetato-malonato, particularmente aquellas elaboradas por hongos. Sin embargo, parece ser un intermediario importante en la formación de muchas quinonas en plantas superiores.¹² (Esquema No.2)

1.4 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Resolución de estructuras.

Es importante considerar el proceso de determinación de estructuras en un sentido general. Tres etapas pueden identificarse en el proceso: La primera es la obtención de inferencias iniciales a partir de propiedades químicas y espectroscópicas (tales como el número de cada tipo de carbono en la molécula, presencia o ausencia de cierto tipo de grupo funcional, el grado de insaturación, si están presentes o no grupos cromóforos, etc.). La segunda etapa es la generación de estructuras candidatas para el producto desconocido y la etapa final es probar las estructuras propuestas con los datos disponibles y si es necesario contemplar experimentos entre aquellas que permanecen.

Los méritos de la Resonancia Magnética Nuclear.

La Resonancia magnética Nuclear (RMN) es una técnica que ayuda con éxito en el proceso de elucidación de estructuras. La RMN contiene información directa acerca del ambiente químico del núcleo en virtud del desplazamiento químico que presenta, lo cual, no es la propiedad más importante de la misma. La información obtenida a partir de los desplazamientos químicos puede ser caracterizada como la primera y tercera etapa perteneciente a la elucidación estructural: esto puede indicar la presencia de los fragmentos de la estructura (tales como un grupo metilo, una olefina o un anillo de benceno), y puede ayudar a comprobar las estructuras propuestas al contrastar los datos con los descritos; pero esto no contribuye significativamente al problema más difícil que consiste en el ensamblamiento de los fragmentos que dan lugar a la estructura.

Sin embargo, hay información en el espectro de RMN pertinente para la segunda etapa, y la RMN nos da la información a este respecto. Las interacciones que existen entre los núcleos. Las interacciones de interés son los valores de constantes de acoplamiento-J. El acoplamiento escalar se puede usar directamente. En un espectro de

hidrógeno, las señales de los protones se pueden acoplar, permitiendo i.e. que un metilo se acople con una señal de un protón para dar un doblete. Alternativamente se pueden realizar experimentos que tomen ventaja de la constante de acoplamiento-J tal como la técnica de desacoplamiento homonuclear.

En cuanto a los experimentos de R.M.N. modernos (RMN 2D), éstos no se refieren a mediciones diferentes de los métodos clásicos, sino que comprenden hacer las mediciones de una manera más eficiente, más global e informativa de las que se hayan hecho en el pasado.¹³

1.5 ESTEREOQUÍMICA

Por "estructura" entonces, se entiende un arreglo molecular que incluye constitución, conformación y configuración. El análisis o estudio de las propiedades físicas y químicas de un compuesto en relación a su conformación preferida, se conoce como "análisis conformacional". A veces bastan unas pocas propiedades físicas o químicas para determinar la conformación en un producto dado, y el conocimiento así ganado se usa para predecir otras propiedades físicas o químicas. La capacidad de hacer tales predicciones naturalmente es uno de los principales objetos de los estudios estructurales.

La mayoría de los compuestos no desvían el plano de la luz polarizada, algunas sustancias ópticamente activas se obtienen de fuentes naturales, dado que por lo general los organismos vivos sólo producen un enantiómero del par. Los isómeros que son imágenes especulares mutuas se llaman enantiómeros, los cuales tienen propiedades físicas idénticas, exceptuando la dirección de giro del plano de la luz polarizada, tienen propiedades químicas idénticas, excepto frente a reactivos ópticamente activos y se

comportan por igual frente a un reactivo químico aquiral (simétrico), reaccionando con la misma velocidad. Sin embargo, cada enantiómero reacciona a velocidades muy diferentes frente a los reactivos quirales. Un caso muy marcado de diferenciación de enantiómeros frente a reactivos quirales es el que se presenta en las reacciones bioquímicas entre reactivos quirales (sustrato) y las enzimas; usualmente la diferencia de reactividad de dos enantiómeros frente a una enzima es tan grande que solamente uno de los dos enantiómeros reacciona. Esto nos explica, por ejemplo, la diferencia entre las propiedades antibióticas de dos enantiómeros, o entre sus respectivos sabores.

Los estereoisómeros que no guardan relación de imágenes especulares entre sí se llaman diastereoisómeros. Como ejemplo podemos citar el ácido (+)-tartárico de la figura 3. Ambos compuestos tienen la misma fórmula molecular distinguiéndose sólo en el arreglo espacial, por lo que son estereoisómeros. Al no ser enantiómeros deben ser clasificados como diastereoisómeros.

Generalmente, los diastereoisómeros tienen propiedades físicas muy diferentes porque en cada diastereoisómero los correspondientes átomos y grupos no guardan la misma relación espacial, (en contraste al caso de los enantiómeros), además de que presentan propiedades químicas similares, puesto que son miembros de la misma familia; sin embargo, no son idénticas.¹⁴

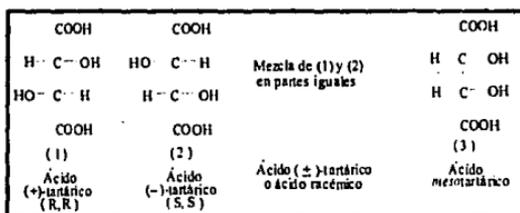
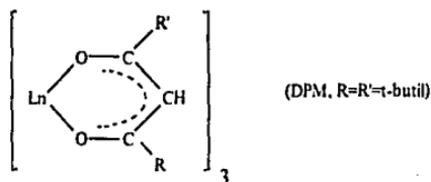


Fig. 3

REACTIVO DE DESPLAZAMIENTO

Los complejos paramagnéticos de β -dicetonatos de lantánidos son útiles en los estudios de RMN de moléculas. En solución, los complejos lantánidos se asocian con un grupo básico del sustrato orgánico. Los complejos de lantánido que se utilizan para la espectroscopia de RMN son llamados "reactivos de desplazamiento". Sus aplicaciones incluyen la simplificación de espectros de RMN en donde se separan las señales encimadas. Los principales complejos utilizados son de europio y praseodimio, quelatos de dipivaloilmetano (dpm, $R=R'=t$ -butil) y 6,6,7,7,8,8,8-heptafluoro-2,2 dimetil-3,5-octanodiona (fod, $R=t$ -butil y $R'=perfluoropropil$), los cuales son aquirales Fig I. Existen también reactivos de desplazamiento quirales, que inducen la quiralidad, como es el caso del tris(trifluoroacetil-d-canforato) de lantanoide.¹⁵



I

Los reactivos de desplazamiento asociados a una amplia variedad de sustratos básicos poseen un número de coordinación más allá de seis. Los complejos de europio generalmente inducen los desplazamientos en la resonancia del sustrato a campos más bajos, mientras que los análogos de praseodimio generalmente lo causan a campos más altos.

Uso del reactivo de desplazamiento en RMN.

La introducción de reactivos de desplazamiento de lantánidos quirales facilita la determinación por RMN de la pureza enantiomérica. El espectro de RMN de enantiómeros son no-equivalentes en un medio ambiente quiral [exhiben enantiomerismo (actividad óptica)]. Como la magnitud del desplazamiento inducido por el reactivo de desplazamiento, δ , provee una prueba sensitiva del medio ambiente estérico. Se espera que el reactivo de desplazamiento quiral C^* ($*$ denota un isómero óptico del quelato), produzca una diferencia de desplazamiento entre las resonancias del núcleo equivalente en un par enantiomérico.



La asociación de C^* con R y S forma dos aductos diastereoisómeros, y en principio, distinguibles por RMN.¹⁵

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

2.1 MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO.

El espécimen de *Hesperozygis marifolia* analizado fue recolectado en noviembre de 1991 en la barranca de Tolantongo, Estado de Hidalgo, por el M. en C. Jorge Cárdenas, e identificado por el M. en C. Oswaldo Téllez.

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

Para las cromatografías relámpago se utilizó Sílica gel de malla 230-400, y para las cromatografías al vacío se utilizó Sílica gel para cromatografía en placa.

La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina en cromatofolios Macherey-Nagel, usando como revelador una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N.

Los espectros de IR se determinaron en cloroformo, utilizando un espectrofotómetro Nicolet FT-5SX o un Perkin-Elmer modelo 283 B.

Los espectros de UV fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552, mientras que las rotaciones específicas en un polarímetro Jasco modelo DIP-360.

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5985-B y JEOL JMS-SX 102-A mediante la técnica de impacto electrónico.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en los espectrómetros Varian: Gemini 200 o VXR-300S. Los desplazamientos químicos de los

espectros de RMN ^1H están dados en ppm con respecto al TMS, y los de RMN ^{13}C con respecto a la línea central del CDCl_3 en 77 ppm. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hz. Las asignaciones de los espectros de RMN ^{13}C se realizaron con ayuda de los espectros APT y DEPT para conocer el número de hidrógenos unidos a cada carbono.

2.2 OBTENCIÓN DE PRODUCTOS.

Producto No. 1

263.5 g de raíces se sometieron durante cuatro días a extracción con acetona (4 litros) a temperatura ambiente. El disolvente fue evaporado a presión reducida. La evaporación total del disolvente dio como resultado 2.40 g de un residuo gomoso.

El residuo se separó por cromatografía al vacío en una columna de vidrio de 5 cm de diámetro interno, empacada con sílice hasta una altura de 5 cm. La columna se eluyó inicialmente con hexano 100%, aumentando la polaridad con mezclas de Hexano - acetato de etilo, hasta acetato de etilo 100% y terminando de eluir con acetato de etilo - metanol al 10%.

De la fracción eluida con 3% de AcOEt en hexano se separaron por una cromatografía relámpago una serie de fracciones, reuniéndose aquellas que mostraron tener una composición similar por cromatografía en capa fina. Posteriormente, la muestra fue purificada por cromatografía en placa preparativa, usando como eluyente hexano - acetona 90-10; así se logró aislar 65 mg de un producto anaranjado el cual es soluble en hexano; cuyas características espectroscópicas son las siguientes:

UV (MeOH), λ_{max} (ϵ): 246 (10890), 271 (8066), 325 (11595).

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 3355, 11731, 1664, 1650, 723.

EM m/z (abundancia relativa) M^+ 242 (70); 227 (100); 199 (31); 115 (31); 105 (32); 104 (31); 77 (48).

RMN ^1H (200 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 1.58 (s, 6H); 4.94 (dd, $J=10.6$, 1 Hz, H-3'e); 4.98 (dd, $J=17.5$, 1 Hz, H-3't); 6.27 (dd, $J=17.5$, 10.6 Hz, H-2'); 7.60 (td, $J=7.5$, 1.5 Hz, H- β); 7.73 (td, $J=7.5$, 1.6 Hz, H- β'); 8.03 (dd, $J=7.5$, 1.6 Hz, H- α); 8.04 (dd, $J=7.5$, 1.5 Hz, H- α'); 7.82 (s, OH).

RMN ^{13}C (200 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 182 (s); 152.86 (s); 128.43 (s); 185 (s); 125.81 (d); 135.23 (d); 132.59 (d); 127.03 (d); 128.29 (d); 134(s); 41.03 (s); 148.09 (d); 109.59(t); 28.15 (c); 28.15 (c).

Producto No. 2.

De la siguiente fracción obtenida a la misma polaridad que la anterior se obtuvo una placa de cromatografía en capa fina que mostró dos manchas en mayor cantidad, la menos polar se purificó por recromatografía en cromatografía relámpago y se logró aislar por recristalizaciones sucesivas de AcOEt en hexano, 11.3 mg de un producto sólido amarillo, con p.f. 108-109°C, cuyas características espectroscópicas son las siguientes:

$$[\alpha]_D = -3.33$$

UV (MeOH), λ_{max} (ϵ): 252 (9077), 286 (39985), 336 (74906).

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 3070, 1679, 1649, 1618, 1380, 1590.

E/M m/z (abundancia relativa) M^+ 242 (22); 227 (100); 214 (5); 199 (12).

RMN ^1H (300 MHz) (CDCl_3) δ (ppm) : 1.32 (s, 3 H, Me-4'), 1.51 (s, 3 H, Me-5'), 1.47 (d, 3H $J=6.6$ Hz, Me-3'), 4.61 (c, 1H 6.6 Hz, H-2'); 7.74 (td, $J=7.5$, 1.7 Hz, H- β), 7.67 (td, $J=7.5$, 1.5 Hz, H- β') 8.09 (dd, $J=7.5$, 1.5 Hz, H- α); 8.07 (dd, $J=7.5$, 1.7 Hz, H- α').

RMN ^{13}C (200 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 178.6 (s); 158.62 (s); 130.92 (s); 182.37 (s); 125.90 (d); 134.17 (d); 132.78 (d); 126.11 (d); 131.39 (s); 133.47 (s); 45.17 (s); 91.60 (d); 14.21 (c); 20.58 (c); 25.77 (c).

Producto No. 3.

De la parte polar observada en ccf de la fracción anterior se logró aislar por cristalización de AcOEt - Hexano un producto sólido blanco, que tiene un p.f. de 263-270°C, el cual posee las siguientes características espectroscópicas:

IR (CHCl₃) ν max cm⁻¹: 2950, 1740, 1370, 1250, 1020.

EM impacto electrónico m/z (abundancia relativa); FAB⁺; FAB⁻: 498(0.5), 43(100); 499(7.63); 497(100), 437(3), 355(1), 153(64).

RMN ¹H (200 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 0.82 (s, 3H, Me-25), 0.84 (2s, 6H, Me-23 y Me-24), 0.93 (s, 3H, Me-26), 0.96 (s, 3H, Me-27), 1.69 (s, 3H, Me-29), 2.03 (s, 3H, Me-COO), 3.0 (m, 1H, H-19), 4.47 (dd, J=10, 5.5 Hz, 1H, H-3), 4.61 (s, 1H, Ha-30), 4.74 (s, 1H, Hb-30).

Producto No. 4.

De las fracciones eluidas con hexano- acetato de etilo (94-6) se reunieron aquellas que mostraron tener un composición similar en cromatografía en capa fina. Se realizó con ellas una cromatografía al vacío y posteriormente una cromatografía relámpago, usando como eluyente 5% de AcOEt en hexano; para finalmente purificar el producto por cromatografía en placas preparativas, usando como eluyente 20% de AcOEt en hexano obteniendo 5 mg de un producto de color rojo-naranja; cuyas características espectroscópicas son:

IR (CHCl₃) ν max cm⁻¹: 1700, 1640, 1614, 1572, 1491, 1451, 1150, 846.

E/M m/z (abundancia relativa) M⁺ 242

RMN ^1H (300 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 1.24 (s, 3H, Me-4'), 1.42 (s, 3H, Me 5'), 1.45 (d J= 6.6 Hz, Me-3'), 4.65 (c, J= 6.6 Hz, 2'), 7.6 (m), 7.62 (m), 7.5 (m, J=7.5, 6 Hz), 8.02 (dt, J=7.5, 1.2 Hz).

RMN ^{13}C (200 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 181.59 (s); 175.51 (s); 123.35 (s); 168.27 (s); 124.47 (d); 131.65 (d); 134.48 (d); 129.26 (s); 130.83 (s); 127.95 (s); 44.07 (s); 92.89 (d); 14.50 (c); 20.30 (c); 25.71 (c).

Producto No. 5.

De las fracciones obtenidas a una polaridad de AcOEt en hexano 20-80% precipitó un sólido de color blanco, insoluble en CHCl_3 que por comparaciones con una muestra original en cromatografía en capa fina se identificó como la mezcla de ácidos ursólico y oleanólico, y se comprobó por la formación del éster metílico en un espectro de RMN ^1H .

De las partes aéreas (tallos) se obtuvieron, mediante un tratamiento similar los productos 1, 2 y en una muy pequeña cantidad el producto 4.

Producto No. 6.

De las partes aéreas se obtuvo por recristalizaciones sucesivas con AcOEt-Hexano, 300 mg de un producto sólido amarillo el cual tiene un p.f. de 146-148 °C.

IR (CHCl_3) ν_{max} cm^{-1} : 2840, 1650, 1270, 1100.

E/M m/z (abundancia relativa) M^+ 388

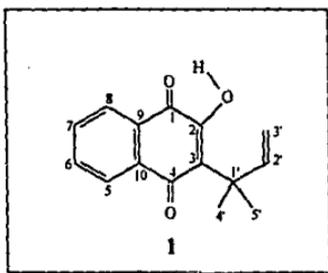
RMN ^1H (200 MHz) (CDCl_3) δ (ppm): 3.93 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.09 (s, 3H), 6.59 (s, 1H, H-3), 6.98 (d, J=8.6 Hz, H-5'), 7.39 (d, J=2.2 Hz, H-2'), 7.57 (dd, J=8.6, 2.2 Hz, H-6'), 12.52 (s, OH).

CAPÍTULO 3

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 PRODUCTO NO. 1.

De las fracciones eluidas a una polaridad de Hexano-AcOEt 97:3 y por recromatografías sucesivas (ver parte experimental), se logró aislar un producto anaranjado al cual se le asignó la estructura 1 en base a sus datos espectroscópicos que se discuten a continuación.



El espectro de UV presenta absorciones máximas en 246, 271 y 325 nm, lo cual corresponde a la absorción característica de una naftoquinona con una sustitución *orto* de un grupo oxhidrilo.¹⁶

El espectro de IR presenta una banda en 3355 cm^{-1} que se asigna a la presencia de un grupo oxhidrilo quelatado, las bandas que se observan en 1005 y 909 cm^{-1} se asignan a la presencia de grupo vinilo terminal. Las bandas en 1664 y 1650 cm^{-1} se asignan a carbonilos de quinona y la banda en 723 cm^{-1} se asigna a una sustitución *orto* de un sistema aromático (Espectro No.1).

El espectro de masas obtenido por impacto electrónico, presenta un M^+ a m/z 242 que corresponde a una fórmula molecular $C_{15}H_{14}O_3$.

En su espectro de RMN 1H (espectro No.2) se observa una señal a δ 1.58 que integra para 6 hidrógenos y se asigna a dos grupos metilo equivalentes sobre carbono cuaternario. Se observa un sistema ABX, en donde la parte AB se encuentra en δ 4.94 (dd) y 4.98 (dd), y la parte X en δ 6.27 (dd). La parte AB del sistema integra para dos protones que se asignan a los hidrógenos de un vinilo terminal; el de campo más alto se encuentra acoplado a un protón en relación *cis*, debido a la magnitud de la constante de acoplamiento ($J=10.6$ Hz) y a un protón en relación *gem* ($J=1$ Hz), el otro hidrógeno que presenta un desplazamiento químico en 4.98 ppm está acoplado a un protón en relación *trans* ($J=17.5$ Hz) y a uno en relación *gem* ($J=1$ Hz). El protón de campo bajo (δ 6.27) muestra acoplamiento con los dos protones en δ 4.94 y 4.98 *cis* y *trans* respectivamente ($J=17.5, 10.6$ Hz).

También se observan a campo bajo las señales que se asignan a protones aromáticos. Se observa a 7.73 ppm una señal triple de doble que integra para un hidrógeno que contiene constantes de acoplamiento de 7.5 y 1.6 Hz, asignados a un protón acoplado con dos hidrógenos en relación *orto* y un protón con el cual muestra acoplamiento en relación *meta*, que se encuentra a un desplazamiento químico de 8.03 ppm. En 7.60 ppm se observa otra señal triple de doble que integra para un protón, el cual presenta constantes de acoplamiento de 7.5 y 1.5 Hz, que se atribuyen a un protón acoplado con dos protones en posición *orto* y con un hidrógeno en relación *meta* que se encuentra en 8.04 ppm.

A 8.03 ppm se observa una señal doble de doble que integra para un hidrógeno con $J=7.5$ y 1.6 Hz, al cual se asigna a un acoplamiento de tipo *orto* con el protón cuyo

desplazamiento químico es de 7.6 ppm ($J=7.5$) y un acoplamiento en relación *meta* con el protón en δ 7.73. La señal en δ 8.04 (dd) indica la presencia de un protón con $J=7.5$ y 1.5 Hz, que se le asigna un acoplamiento de tipo *orto* con el hidrógeno con δ en 7.73 ppm ($J=7.5$), y a uno en relación *meta* con el hidrógeno de campo más alto de este sistema en 7.6 ppm ($J=1.5$ Hz).

El sistema aromático antes descrito corresponde a un sistema ABCD, en el cual no existe equivalencia química entre los hidrógenos. El análisis de las constantes de acoplamiento de las señales de los protones aromáticos con un δ 7.6 y 7.73 indica la ausencia de protón en una segunda posición *meta* para ambos hidrógenos; lo cual permite proponer la presencia de un benceno 1,2 disustituido. Los desplazamientos químicos de los protones en δ 8.04 y 8.03 permiten proponer la presencia de dos grupos desprotectores conjugados con el sistema aromático. De este análisis se desprende que la molécula no es simétrica, ya que de serlo se observarían a campo bajo únicamente 2 tipos de protones aromáticos, formando un sistema AA'BB'. Si la sustitución no fuera de tipo *orto* se observarían 3 tipos de hidrógeno en un sistema AB₂C lo cual es descartado por lo antes discutido.

El singulete en 7.82 ppm desaparece después de equilibrarse con D₂O y se asigna a un grupo fenol quelatado.

El espectro de Resonancia Magnética nuclear de carbono-13 (RMN ¹³C) (espectro No. 3) está de acuerdo con los grupos funcionales descritos en los espectros de IR y RMN ¹H. El espectro de RMN ¹³C se resolvió con la ayuda del espectro APT (espectro No. 4) para conocer el número de hidrógenos unidos a cada carbono. Se observan dos señales en la zona de carbonos sp³, una de las cuales se encuentra a δ 28.15 que se asigna a dos carbonos de metilo equivalentes (C-4' y C-5'); la otra a δ 41.03 asignado a un carbono tetrasustituido C-1'; ambos metilos se encuentran unidos a este

átomo de carbono, lo cual concuerda con el espectro de RMN ^1H que presenta una señal que integra para los 6 protones equivalentes a δ 1.58.

A campo bajo, en la zona de carbonos sp^2 se observan 12 señales, dos de las cuales se asignan dado el desplazamiento químico que presentan (δ 182.0 y 185.0) a los carbonilos de una quinona (C-1, C-4), Espectro No.3. Las señales en 148.09 y 109.59 ubicados dentro de esta zona corresponden a carbonos que soportan a uno y dos hidrógenos respectivamente, asignados a C-2' y C-3', de un grupo vinilo terminal, lo cual, confirma la presencia de un sistema ABX observado en el espectro de RMN ^1H .

Las otras 4 señales del espectro que corresponden a carbonos sp^2 que soportan a un hidrógeno, se asignan al sistema aromático descrito en resonancia protónica, y dos señales de carbonos tetrasustituídos en la zona sp^2 corresponden a la fusión del anillo aromático con la quinona (C-9 y C-10). Los dos carbonos restantes que aparecen como singuletes, se asignan a los de las posiciones C-2 y C-3 de la naftoquinona, los cuales poseen un desplazamiento químico de 152.86 y 128.43 ppm respectivamente, esta diferencia en el desplazamiento químico de C-2 indica la presencia de un oxígeno como sustituyente.

Con lo discutido anteriormente se concluye que se tiene una estructura de naftoquinona 1-4, que posee un grupo oxhidrilo en C-2; y un grupo 1',1' dimetilalilo en C-3.

Este producto, 2-Hidroxi-3-(1',1'-Dimetilalil)-1,4-naftoquinona se ha, obtenido por métodos sintéticos mediante la transposición de Claisen del 2-(γ,γ -dimetilaliloxi)-1,4-naftoquinona¹⁷ (figura 4), describiéndose por primera vez como producto natural en el presente trabajo. La estructura se confirma por comparación de sus datos espectroscópicos con los descritos en la literatura¹⁸ de RMN ^{13}C (Tabla No.3).

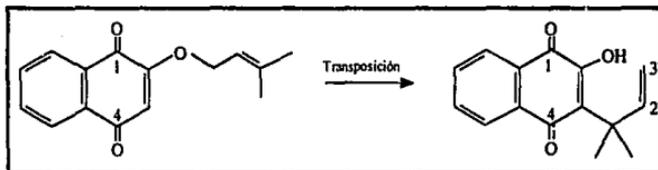


Fig. 4

3.2 PRODUCTO NO. 2.

De las fracciones de la columna original eluidas a la misma polaridad que la anterior y por recromatografías sucesivas, se logró aislar un producto sólido amarillo (ver parte experimental) el cual tiene una rotación específica de -3.3° .

En el espectro de IR se observan en $1573, 1458 \text{ cm}^{-1}$ absorciones correspondientes al sistema aromático, en $1679, 1649, 1618 \text{ cm}^{-1}$ absorciones de carbonilos de quinona y en 1040 cm^{-1} la vibración C-O de un éter alifático (Espectro No. 5).

El espectro de masas obtenido por impacto electrónico presenta un M^+ a m/z 242 que corresponde a una fórmula molecular de $C_{15}H_{14}O_3$.

En el espectro de RMN 1H se observan a campo alto dos singuletes en δ 1.32 y 1.51, los cuales integran para tres hidrógenos cada uno. Se observa un sistema AX_3 , en donde la parte X_3 se encuentra en δ 1.47 como una señal doble que integra para 3 hidrógenos con $J=6.6 \text{ Hz}$ asignado a un metilo, el cual se encuentra acoplado con la parte A del sistema en δ 4.59 ($J=6.6 \text{ Hz}$) que integra para un protón y presenta una señal en forma de cuarteto, el desplazamiento químico indica que se trata de un protón geminal a base oxigenada (espectro No. 6).

En la zona de protones aromáticos se observa una señal triple de doble en δ 7.67, la cual integra para un hidrógeno y cuyas constantes de acoplamiento son 7.5 y 1.5 Hz, éste se asigna a un protón acoplado con dos hidrógenos en relación *orto* que se encuentran en δ 7.74 (td) y 8.07 (dd), y otro protón con el que está acoplado en relación

meta ubicado en un desplazamiento químico de 8.09 ppm ($J=7.5, 1.5$ Hz), el que a su vez se encuentra acoplado con un protón de campo alto en relación *orto* en δ 7.74 (td). La otra señal triple de doble en δ 7.74 integra para un protón, el cual presenta constantes de acoplamiento de 7.5 y 1.7 Hz, éste se asigna a un protón que se encuentra acoplado con dos protones en relación *orto* en δ 7.67 (td) y en 8.09 (dd), y uno que se encuentra en relación *meta* ubicado en un desplazamiento químico de 8.07 ppm que es una señal doble de doble. e integra para un sólo protón con $J=7.5$ y 1.7 Hz que se le asigna a un acoplamiento de tipo *orto* con el hidrógeno en δ 7.67, y un acoplamiento en relación *meta* con el protón en δ 7.74. Las señales que se observan en esta zona de protones aromáticos indican que el sistema es también del tipo ABCD en el que los protones no tienen equivalencia química. Dada la desprotección que presentan los protones α , se deduce que las dos posiciones libres restantes del anillo se encuentran sustituidos por los carbonilos de una quinona observados en su espectro de IR. Sin embargo, se observa una relación no simétrica de la estructura, debido a que tanto los dos protones alfa y los dos beta tienen un desplazamiento químico diferente; por lo que se establece que en los C-2 y C-3 de la quinona se encuentran sustituidos por distintos grupos funcionales. Fig. 5

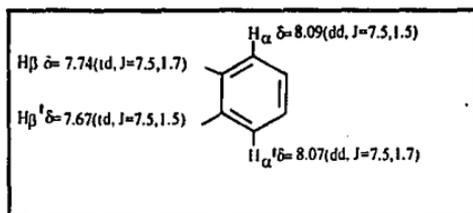


Fig. 5

Cabe hacer notar la ausencia de protón de fenol quelatado como el que presenta en δ 7.82 el producto 1. El espectro de masas, aunado con el IR y el espectro de RMN ^1H conducen a discurrir acerca de un isómero de dicha estructura.

El espectro DEPT y el espectro de correlación heteronuclear a una ligadura ($^1\text{J}_{\text{C-H}}$) (espectros No. 7 y 8), permiten observar a ocho carbonos protonados. Para el sistema AX_3 observado en el espectro de RMN ^1H el protón que se encuentra a δ 4.61 correlaciona con el carbono sp^3 que se encuentra en 91.60 ppm el cual corresponde, por desplazamiento químico, a un carbono que se encuentra unido a un átomo de oxígeno (C-2'). Los hidrógenos que se asignan al metilo doblete (δ 1.47) correlacionan con el carbono que se encuentra en δ 14.21 (C-3'). Los carbonos C-4' y C-5' en δ 20.58 y 25.77 respectivamente correlacionan para las señales simples que integran para tres hidrógenos cada uno en RMN ^1H en δ 1.26 y 1.46 asignados a dos metilos. Los protones alfa de la naftoquinona asignados en δ 8.07 y 8.09 correlacionan con los carbonos en δ 125.90 y 126.11, el espectro no permite hacer una exacta asignación para ambas señales con sus respectivos hidrógenos dada la cercanía de las mismas. Los hidrógenos en δ 7.67 y 7.74 correlacionan con los carbonos en δ 132.78 y 134.17 respectivamente.

Para poder asignar la disposición relativa de los hidrógenos con los carbonos no protonados, se recurrió al espectro de correlación heteronuclear a larga distancia ^2J y ^3J (COLOC) (espectro No. 9), en donde se observan las correlaciones de 7 carbonos no protonados. Se observan 15 señales, dos se encuentran a δ 178.6 y 182.37 (sp^2), que se asignan a carbonos de carbonilo de quinona, la señal en δ 158.62 se asigna a un carbono unido a un oxígeno (C-2).

La asignación del gem dimetilo 4' y 5' se realizó en base al desplazamiento químico presentado, además del análisis del modelo Dreiding del producto 2, en el cual se observa que uno de los metilos geminales sobre C-1' se encuentra en una relación *gauche* con el

metilo 3', de tal forma que, la señal para el metilo que se encuentra a campo alto por compresión estérica se asigna al Me-4'. De esta manera también se asignan los metilos 4' y 5' en el espectro de resonancia de correlación heteronuclear (HETCOR), ya que se observa la correlación por acoplamiento entre los hidrógenos en δ 1.32 y 1.51 (2J) y el hidrógeno en δ 1.47 (3J) respectivamente (espectro No. 10) con el carbono cuaternario en δ 45.17 (C-1') respectivamente y la correlación por acoplamiento a 3J de los H-4' y H-5' soportados sobre el C-1' con el carbono en δ 130.92 (C-3), (ver tabla No. 3). En el espectro No. 11 se observa el sistema aromático de RMN 1H en el que los protones alfa correlacionan con el carbono cuaternario en δ 133.47, lo cual da cabida a dos posibilidades de correlación para ambos: a) H- α en δ 8.07 que correlacione con $^2J_{CCH}$ (C-9) ó $^3J_{CCH}$ (C-10) y b) H- α en δ 8.09 a $^2J_{CCH}$ (C-9) ó $^3J_{CCH}$ (C-10). Fig. 6

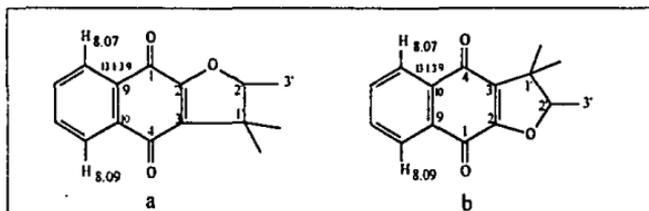


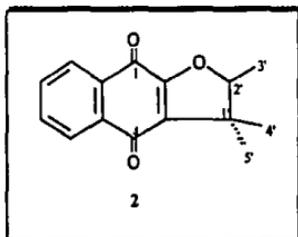
Fig. 6

El protón alfa de campo alto (δ 8.07) correlaciona con el carbonilo en δ 178.60, sin embargo esto no determina que desplazamiento tienen los carbonos de la fusión de los anillos de la naftoquinona (C-9 y C-10). La asignación se logra con el protón beta de campo alto que correlaciona, al igual que el protón alfa de campo alto con el carbono cuaternario en δ 131.39 (C-9); con el otro protón beta de campo bajo (δ 7.74) no se observa correlación alguna con este carbono, lo cual significa que se encuentra a más de

tres ligaduras del carbono para la posible correlación, por lo tanto, el carbono en δ 133.47 se encuentra que correlaciona a $^2J_{CCH}$ con el protón alfa en 8.09.

La asignación del oxígeno del éter se realizó en base a estudios anteriores de RMN ^{13}C de naftoquinonas en los que un sustituyente metilo en C-3 no tiene un efecto notable en el desplazamiento químico de C-1 y C-4. Sin embargo, una sustitución de un grupo OH en el C-2, origina una protección en C-1 de 3-4 ppm, mientras que el C-4 no es influenciado significativamente²⁰ (Tabla No. 3). En el desarrollo experimental de este trabajo, el análisis de los espectros de correlación heteronuclear, indicaron que el H-8 en δ 8.07 correlaciona a $^1J_{CCO}$ al carbono carbonilo No. 1 (δ 178.60) que está a campo más alto que el C-4 (δ 182.37), por lo que se concluye que el oxígeno del éter de enol se encuentra adyacente al carbonilo de campo más alto (C-1).

Por lo antes discutido, en base a sus pruebas espectroscópicas el producto tiene la siguiente estructura:



Este producto ha sido descrito en la literatura como (+) α -Dunione¹⁹, el espectro de RMN ^{13}C en 2D permite reasignar a las señales para C-3', C-4' y C-5'.

La α -Dunione puede ser obtenida mediante el tratamiento básico de una ortoquinona descrita con el nombre de Dunione, ésta se aisló como producto natural de la planta de *Streptocarpus Dunni* y presentó $[\alpha]_D^{20} = +307^\circ$. La dunione ópticamente pura se

trató en medio básico para obtener la α -Duniona, la cual tiene una $[\alpha]_D^{20} +91.7$, la que demostró su pureza óptica por RMN¹H en presencia de reactivo de desplazamiento quiral. Por otro lado, la α -Duniona aislada como producto natural (de la misma planta antes mencionada) tuvo $[\alpha]_D -9.9$ (CHCl₃; c 0.3), de estos valores se estima que la α -Duniona 2 aislada como producto natural es una mezcla de enantiómeros *d* y *l* en una relación de 45:55.²⁰

La rotación específica de la α -Duniona obtenida en el estudio de *H. marifolia* ($[\alpha]_D = -3.3^\circ$) es un valor muy por debajo del ya descrito ($[\alpha]_D = +91.7$), de lo que se deduce que es una mezcla de enantiómeros *d* y *l*, y se comprobó por RMN¹H utilizando reactivo de desplazamiento quiral tris(trifluoroacetil-d-canforato) Eu(III)[Eu(TFC)₃], espectros No.12, 13 y 14; en los cuales se observa a medida que se incrementa la cantidad de reactivo, se resuelve el espectro en dos grupos de señales en una relación $\approx 1:1$.

Los valores de las concentraciones de reactivo utilizados y los desplazamientos obtenidos se encuentran tabulados en la Tabla No. 1.

Tabla No. 1. Efecto en el desplazamiento químico de los hidrógenos 2'-5' de la α -Duniona con reactivo de desplazamiento quiral.[†]

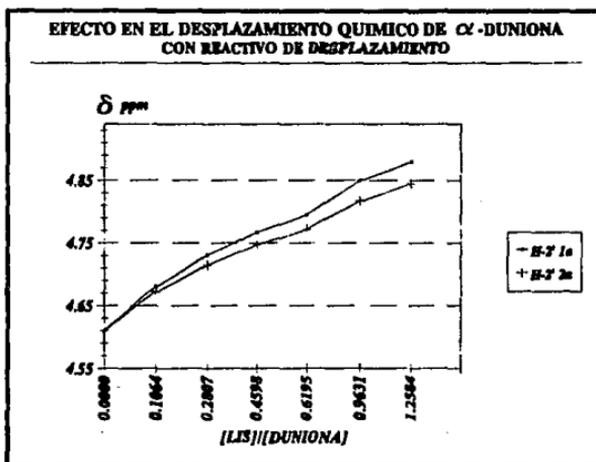
Co/H	2'-1a	2'-2a	3'-1a	3'-2a	4'-1a	4'-2a	5'-1a	5'-2a
0.0000	4.61	4.61	1.47	1.47	1.31	1.31	1.51	1.51
0.1064•	4.68	4.67	1.51	1.50	1.36	1.35	1.55	1.55
0.2807	4.73	4.71	1.53	1.52	1.40	1.38	1.58	1.57
0.4598•	4.76	4.74	1.55	1.53	1.43	1.40	1.60	1.59
0.6195	4.79	4.77	1.56	1.54	1.45	1.42	1.62	1.61
0.9631•	4.83	4.82	1.59	1.57	1.48	1.45	1.65	1.63
1.2584	4.86	4.84	1.60	1.58	1.51	1.47	1.67	1.65

[†] El desplazamiento químico está dado en ppm.

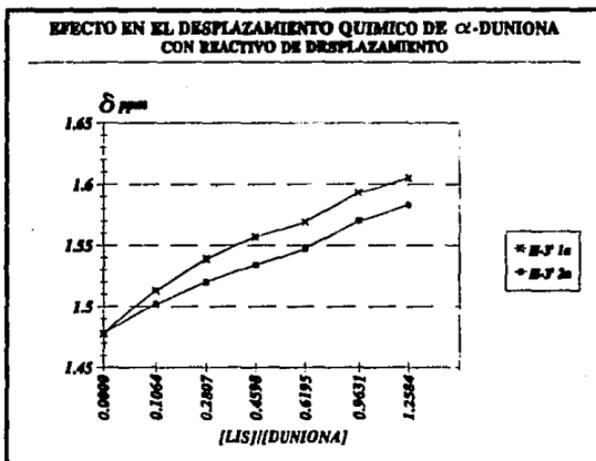
- Los espectros a estas concentraciones no están incluidos.

Por los datos obtenidos que se encuentran en la tabla No. 3, se deduce que el sitio de coordinación primario del reactivo de desplazamiento es hacia el oxígeno del éter, lo cual está sustentado en estudios anteriores efectuados en RMN ¹³C con reactivo de desplazamiento para naftoquinonas del mismo tipo.²⁰

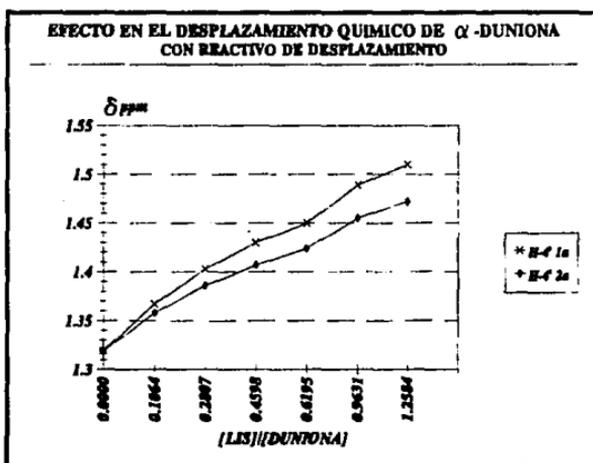
Las gráficas No. 1-4 muestran el comportamiento que sufren a consecuencia del reactivo de desplazamiento los hidrógenos 2', 3', 4' y 5' el cual es lineal. Es apreciable que el protón que sufre un mayor desplazamiento químico es el protón No. 2', lo que indica que la coordinación del europio es hacia el oxígeno del dihidrofurano.



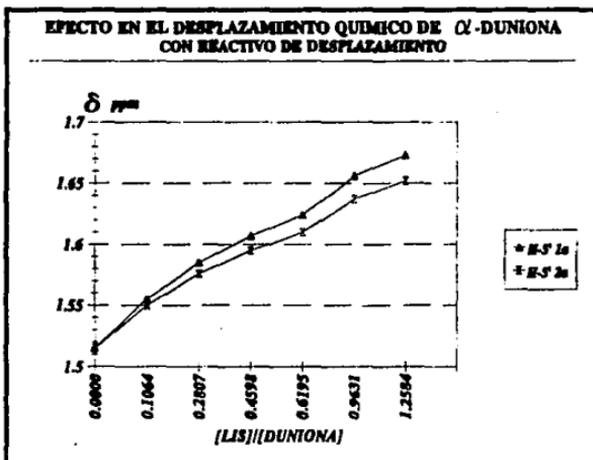
Gráfica No. 1



Gráfica No. 2



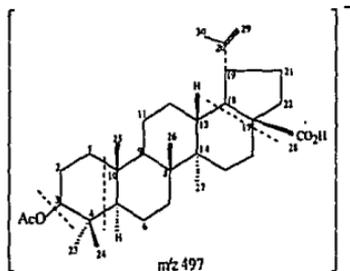
Gráfica No. 3



Gráfica No. 4

3.3 PRODUCTO NO. 3.

En el espectro de masas de este producto, se obtuvo un M^+ a m/z 498, que corresponde a una fórmula condensada de $C_{32}H_{50}O_4$, el pico base, está en una relación m/z 43 que corresponde al desprendimiento de un grupo acetilo [CH_3-CO^+]. Para confirmar el ión molecular M^+ 498, se recurrió a la técnica Fast Atom Bombardment (FAB), el FAB $^+$ mostró un ión molecular de 499, en el FAB $^-$ se observa un ión molecular en 497 y fragmentos a una relación m/z 437, 355 y 151 que corresponden a un patrón de fragmentación de [$C_{30}H_{45}O_2^+$], [$C_{24}H_{35}O_2^+$] y [$C_9H_{11}O_2^+$] respectivamente.²¹



En el espectro de IR se observa una banda ancha en la zona de $3200-2700\text{ cm}^{-1}$, que se asigna a la presencia de un oxhidrilo de un ácido carboxílico, la banda en 1740 cm^{-1} se asigna a la presencia de carbonilo de éster y la banda en 1690 a un carbonilo del ácido. Las absorciones características del grupo acetato están en 1250 cm^{-1} .

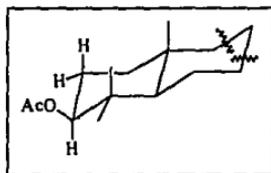
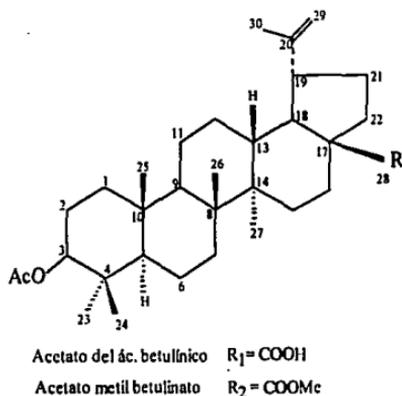


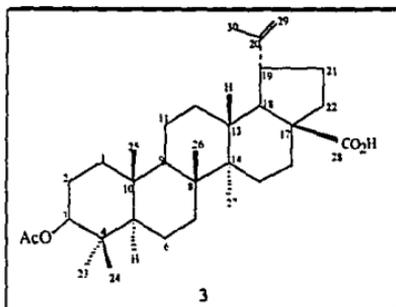
Fig. No.7

Con ayuda del espectro de RMN ^1H (Espectro No. 15) es posible distinguir si el acetato se encuentra en posición axial o ecuatorial (Fig. No.7). En anillos de seis miembros con la conformación de silla, los protones axiales pueden ser distinguidos por sus constantes de acoplamiento, ya que J_{aa} (8~13 Hz) difiere sustancialmente de J_{ae} (2-6 Hz) y J_{ee} (1~5 Hz). En el espectro referido, se observa una señal dd en δ 4.47 con $J=10$, 5.5 Hz, que se asigna al protón en posición axial. De esta manera se concluye que el grupo acetato se encuentra en posición ecuatorial en el anillo A.

Se llevó a cabo una esterificación con diazometano de este producto, con el objeto de reafirmar la presencia de un ácido como sustituyente en el C-28. La primera prueba que demostró la existencia de un grupo carboxilo, fue que se observó efervescencia en el seno de la reacción y esto posteriormente se comprobó por el espectro de RMN ^1H (Espectro No.17), ya que aparece una señal singulete en 3.76 ppm que integra para tres hidrógenos característica de un grupo metilo unido a un oxígeno como heteroátomo.



Este producto se encuentra descrito en la literatura²² con el nombre de acetato del ácido betulínico, lo cual concuerda con sus datos espectroscópicos descritos.



3.4 PRODUCTO No. 4

De las fracciones obtenidas a una mayor polaridad (Hex-AcOEt 94:6) se obtuvo por recromatografías sucesivas un producto color rojo-naranja. Este producto se caracterizó por métodos espectroscópicos, transformación química y consideraciones biogenéticas, ya que se considera que es precursor de la α -Duniona.^{12,23}

En el espectro de IR (espectro No. 17) se observan 3 bandas en 1700, 1640 y 1614 cm^{-1} que corresponden a absorciones de un sistema α -dicetónico, en 1572, 1491 y 1451 cm^{-1} se observan señales que indican la presencia de sustituyentes aromáticos, lo cual se confirma con la banda en 846 cm^{-1} que corresponde a una sustitución *orto* en un anillo aromático. En la zona de 1150 a 1240 cm^{-1} se observa la absorción característica de un oxígeno unido a cadena alifática y de un oxígeno éter de enol.

Con el propósito de obtener mayor cantidad de Duniona, se realizó la transformación descrita en medio básico de la α -Duniona y así poder realizar los espectros de carbono 13 y de correlación homonuclear.^{12,17}

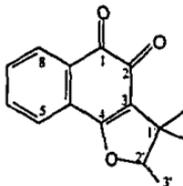
El espectro de RMN¹³C (Espectro No. 18) permite identificar el número de carbonos en la molécula. Se observan por debajo de 100 ppm 5 señales para carbono tipo sp³, a campo más bajo se observan dos señales en δ 181.5 y 175.5 que se asignan a dos carbonos carbonilos lo cual está de acuerdo con el espectro de IR. Las señales de carbonos en δ 124.4, 131.6, 134.4 y 129.2 indican la presencia de carbonos tipo aromáticos. Las dos señales de carbonos no protonados en δ 130.8 y 127.9 son asignadas a una olefina tetrasustituída. La señal ubicada en δ 123.3 es para carbono no protonado, así como la señal en δ 168.2, que por el desplazamiento químico que presenta se asigna a un carbono unido a un oxígeno y se encuentra en la posición β de una enona.

En el espectro de RMN¹H (Espectro No. 19) se observan dos señales simples en δ 1.24 y 1.42 que integran para tres hidrógenos cada una, que se asignan a dos grupos metilo sobre carbono cuaternario.

La señal en forma de cuarteto que se observa en 4.65 ppm ($J=6.6$ Hz), dado el desplazamiento químico que presenta se asigna a un hidrógeno unido a carbono el cual está adjunto a un oxígeno, lo que está de acuerdo con la parte del sistema alifático asignado para el éter cíclico discutido en el espectro de IR. Este protón forma parte de un sistema AX₃ junto con la señal observada en δ 1.45 ($J=6.6$ Hz) que integra para tres hidrógenos. Lo anterior concuerda con el espectro de RMN ¹³C para los cinco carbonos sp³.

En la zona de protones aromáticos se observan tres grupos de señales, dos de ellas integran para un hidrógeno cada una y la señal múltiple intermedia integra para dos protones, este hecho indica la presencia de un anillo aromático disustituído que de acuerdo con su espectro de IR se asigna a una sustitución de tipo *orto* en el anillo aromático, lo cual explica la presencia de seis señales de carbono tipo sp² en el espectro de RMN ¹³C cuatro de ellas C-H (δ 124.4, 131.6, 134.4 y 129.2) y dos señales de

carbono no protonado en 130.8 y 127.9 ppm, sustituido por un lado por el sistema α -dicetónico (Ca y C β) y, en posición *orto* está sustituido por un carbono que soporta a un oxígeno (168.2 ppm). De esta manera, se concluye que el producto es una orto-naftoquinona el cual, tiene fusionado en el C-3 y C-4 a un dihidrofurano, así la estructura elucidada es:



En el espectro de RMN ^1H se observa un sistema ABCD para los protones aromáticos, los cuales carecen de equivalencia química. El hidrógeno de campo más bajo en δ 8.02 (dt) con $J=7.5$ y 1.2 Hz se asigna al H-8, que está acoplado a un hidrógeno en posición *orto* (H-7) y con los hidrógenos en posición *meta* y *para* con el mismo valor de constante de acoplamiento.

A campo más alto, en 7.54 ppm se observa una señal múltiple, la asignación de la multiplicidad no se observa de una manera evidente. La simulación del espectro de RMN con los valores que se muestran en la Tabla No. 2, es parecido al espectro obtenido experimentalmente, la diferencia de desplazamiento químico ($\Delta\nu / J$) entre los protones H-6 y H-7 tiene un valor menor de 7, lo que indica que el espectro de resonancia para la zona de protones aromáticos no es de primer orden. El análisis de las estructuras resonantes de la molécula muestran la desprotección que sufren los hidrógenos 6 y 8. En el espectro de correlación homonuclear COSY (Espectro No. 20 y 21) se observa la correlación del hidrógeno de campo más bajo con el de campo más alto, lo cual está de acuerdo con la técnica de desacoplamiento selectivo (Espectro No. 22) en la que la señal de campo más alto sufre una modificación en su multiplicidad, por otro lado se sabe que

los protones alfa sufren una mayor desprotección que los protones beta por el estudio de la alfa-duniona discutida anteriormente, por lo cual se concluye que el H-8 en δ 8.02 se encuentra acoplado con el H-7 en 7.54 ppm, por lo que en la señal múltiple intermedia se encuentran los protones 5 y 6 intercalados, siendo este un sistema de no primer orden.

La comparación del espectro de RMN ^{13}C de la Duniona con la α -Duniona, permiten reasignar las señales de resonancia para los carbonos C-3', C-4' y C-5'.

Este producto se encuentra descrito en la literatura con el nombre de Duniona (compuesto 4) por comparación de sus datos espectroscópicos obtenidos.^{19,20}

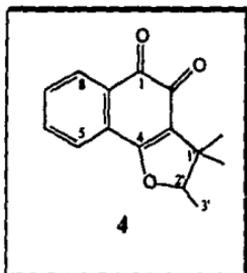


Tabla No.3. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C para los productos 1,2 y 4 en (CDCl_3)

C No.	1	1a*	2	2a*	4	4a*
1	182.00 (s)	182.0 (s)	178.60 (s)	178.1 (s)	181.59 (s)	180.9 (s)
2	152.86 (s)	153.1 (s)	158.62 (s)	158.2 (s)	175.51 (s)	175.0 (s)
3	128.43 (s)	128.6 (s)	130.92 (s)	130.7 (s)	123.35 (s)	123.0 (s)
4	185.00 (s)	184.9 (s)	182.37 (s)	181.8 (s)	168.27 (s)	167.7 (s)
5	125.81 (d)	126.0 (d)	125.90 (d)	125.6 (d)	124.47 (d)	124.2 (d)
6	135.23 (d)	135.3 (d)	134.17 (d)	133.8 (d)	131.65 (d)	131.3 (d)
7	132.59 (d)	132.7 (d)	132.78 (d)	132.4 (d)	134.48 (d)	134.2 (d)
8	127.03 (d)	127.2 (d)	126.11 (d)	125.7 (d)	129.26 (d)	128.7 (d)
9	128.29 (d)	128.6 (d)	131.39 (s)	131.1 (s)	130.83 (s)	130.4 (s)
10	134.00 (s)	134.3 (s)	133.47 (s)	133.2 (s)	127.95 (s)	127.6 (s)
1'	41.03 (s)	41.2 (s)	45.17 (s)	45.1 (s)	44.07 (s)	44.0 (s)
2'	148.09 (d)	48.2 (d)	91.60 (d)	91.4 (d)	92.89 (d)	92.6 (d)
3'	109.59 (f)	109.8 (f)	14.21 (c)	25.8 (c)	14.50 (c)	25.7 (c)
4'	28.15 (c)	28.4 (c)	20.58 (c)	20.6 (c)	20.30 (c)	20.3 (c)
5'	28.15 (c)	28.4 (c)	25.77 (c)	14.2 (c)	25.71 (c)	14.5 (c)

* Desplazamientos químicos tomados de la referencia 18.

* Desplazamientos químicos tomados de la referencia 20.

Producto No. 6.

El estudio de las partes aéreas de la *Hesperozygis marifolia*, además de obtener de la misma manera los productos 1 y 2 se obtuvo en muy poca cantidad el producto 4 y se aisló por recromatografías sucesivas un sólido cristalino amarillo, que tiene un punto de fusión de 146-148°C, cuya estructura es asignada de acuerdo a la espectroscopia presentada.

El espectro de IR muestra una banda en 2840 cm^{-1} que se asigna a la presencia de un grupo O-Me, la banda en 1100 cm^{-1} se asigna a la vibración C-O y se observa una banda en 1650 cm^{-1} asignada a la presencia de un carbonilo conjugado.

En el espectro de masas obtenido por impacto electrónico se observa un M^+ de 388, que corresponde para una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$, lo cual indica la presencia de 11 insaturaciones.

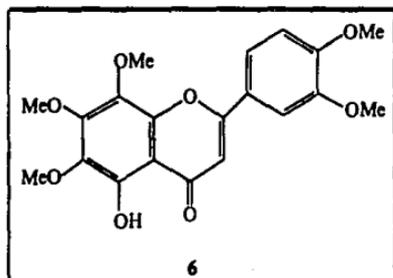
En el espectro de RMN ^1H (Espectro No.23) se observan a campo bajo cinco señales simples, que integran para tres protones cada una en δ 3.93, 3.95, 3.95, 3.96 4.09, asignadas a cinco grupos metoxilo.

En la zona de campo bajo del espectro se observan cuatro protones de tipo aromático. La señal dd ubicada a 7.57 ppm tiene constantes de acoplamiento de 8.6 y 2.2 Hz que se asigna a un acoplamiento tipo *orto* con el hidrógeno en 6.98 ppm (d, $J=8.6$ Hz) y *meta* con el hidrógeno en 7.39 ppm (d, $J=2.2$ Hz). Esto indica la presencia de un sistema ABX.

Se observa en δ 6.59 una señal simple que integra para un hidrógeno, el cual indica la ausencia de hidrógenos adyacentes al mismo, pero es también de naturaleza aromática (H-3).

La señal simple que aparece a campo más bajo del espectro, en δ 12.58 desaparece después de equilibrarse con D_2O , dado el desplazamiento químico que presenta, se asigna a un hidrógeno de un fenol quelatado.

Este producto se encuentra descrito en la literatura con el nombre de 5-O-desmetilnobiletina.^{24,25}



CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Con el estudio fitoquímico elaborado, se tienen antecedentes por primera vez acerca de los metabolitos secundarios que pueden ser obtenidos del género *Hesperozygis*, los cuales están muy relacionados con los metabolitos obtenidos de la *Streptocarpus dunnii*.

Del análisis fitoquímico de *Hesperozygis marifolia* se aislaron e identificaron tres naftoquinonas, dos de las cuales se encuentran descritos, como son la α -Duniona y la Duniona. La quinona 1 aislada, está descrita como producto de síntesis, no como producto natural, por lo que se puede proponer como posible precursor biogenético de Duniona y la α -Duniona, ya que éste se ha demostrado químicamente por otros autores. Se aisló e identificó la mezcla de ácidos triterpénicos ursólico y oleanólico.

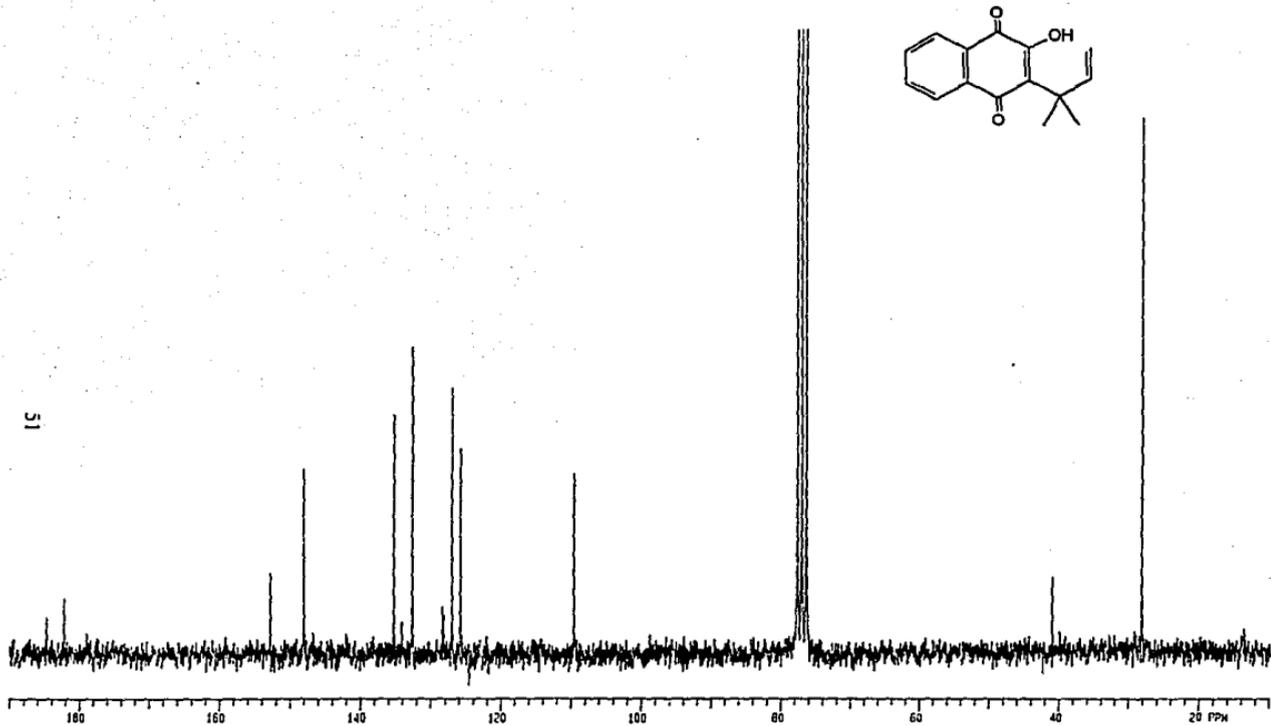
De las partes aéreas de *H. marifolia* se aisló e identificó un producto que corresponde a una flavona la cual se encuentra descrita previamente, con el nombre de 5-O-desmetilnobiletina.^{24,25}

Los estudios de correlación de RMN ¹³C de la α -Duniona y Duniona, permiten corregir las asignaciones descritas para los metilos 3', 4' y 5'.

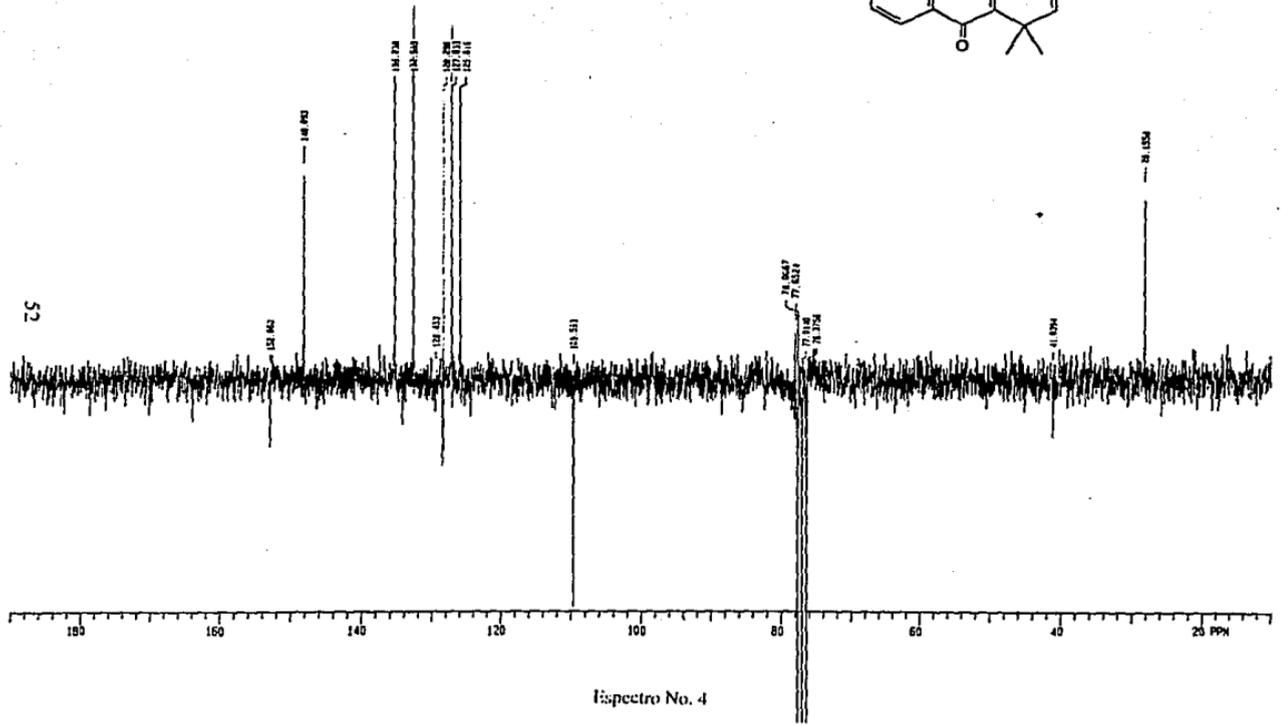
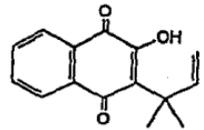
BIBLIOGRAFÍA

1. González, A.G. "Plantas iberoamericanas. fuente de moléculas bioactivas. II lamiaceae". Litografía A. Romero, S.A., (1990).
2. Rosenthal, G.A. "Defensa química de las plantas superiores. Investigación y ciencia" 114 (1986).
3. Martínez, M., "Las plantas medicinales de México", 4a. ed., Ediciones Botas (1959).
4. Korolkovas, A., "Compendio esencial de química farmacéutica", edit. Reverté. España (1979).
5. Goodman, L.S., "The pharmacological bases of therapeutics", 6a ed., MacMillan Publishing Co. (1968).
6. Vidales, P. "Estudio químico-biológico de *Hypoxis urticoides* y *Senecio toluccanus*". Tesis Universidad Nacional Autónoma de México UNAM (1990).
7. Epling, C. Repet. Spec. Nov. Beih. Veg. 115, 13 (1939).
8. Irving, R. "A revision of the genus *Poliomintha* (Labiatae)", *SIDA*, 5 1 (1972).
9. Morrison, R.T. y Boyd, R.N. "Química orgánica", 2a ed. Ed. Addison-Wesley Iberoamer. México (1986).
10. Lehninger, A. "Bioquímica", 2a. edición, Edit Omega, S:A: (1980).
11. Nicholas, H. "Biogénesis of natural compounds" Edit by Bemfeld, P. The MacMillan Co. N.Y. (1963).
12. Thomson, R.H. "Naturally occurring quinones", 2a. ed. Academic Press, Londres (1971).
13. Derome, A.E. The Use of N.M.R. "Spectroscopy in the structure determination of natural products: Two-dimensional methods", *Nat Prod Rep*, 6 pág 113 (1989).

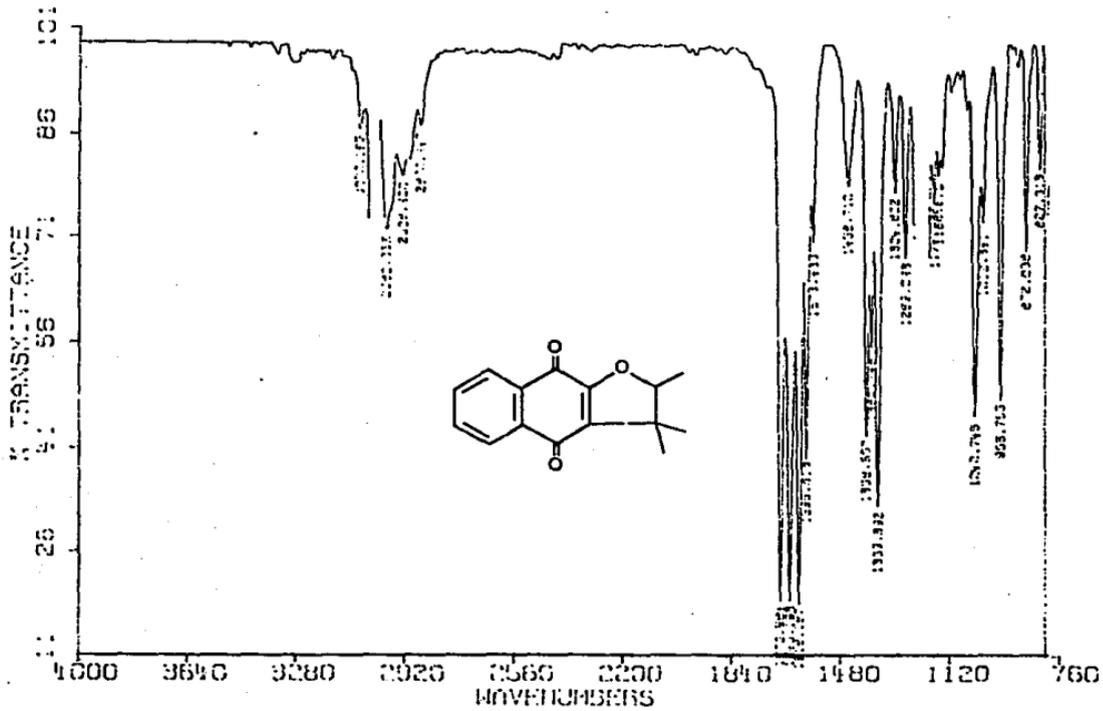
14. Eliel, E. "Elementos de estereoquímica", Edit. Limusa, México (1975).
15. Sievers, R. "Nuclear magnetic resonance shift reagents", Academic Press N.Y. (1973)
16. Scott, A.J., "Interpretation of the ULTRAVIOLET SPECTRA of natural products" The MacMillan Co., N.Y. (1964).
17. Cooke, R.G. "Structure of dunnione", *Nature*, **162** 178 (1948).
- 18 McDonald, I.A. "¹³C N.M.R. spectral studies of some naturally occurring quinones and related compounds", *Aust. J. Chem.*, **30** 1727-34 (1977).
19. Ruedi, P. and Eugster, C. "Isolierung von (-)-Dunnion aus *Calceolaria integrifolia* MURR. (*Scrophulariaceae*)", *Helv. Chim. Acta.* **60**, 945 (1977).
20. Inoue, K et al "Quinones of *Streptocarpus dunnii*", *Phytochemistry* **22**, 3, 737-741 (1983).
21. Budzikiewicz, H., Wilson, J.M., Djerassi, C. "Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes". *JACS*, (1963).
22. Kircher, H. W. "Triterpenes in organ pipecactus". *Phytochemistry*, **19**, 2207-2712, (1980).
23. Price, J.R. y Robinson, R. *J.Chem.Soc.* 1522 (1939),
24. Tatum, J.H. y Berry, R.E. "Six new flavonoids from citrus" *Phytochemistry*, **11**, 2283-2288, (1972).
25. Rodríguez, B. "5,4' - Dihydroxy - 6,7,8,3' - tetramethoxyflavone from *Sideritis Mugronensis*", *Phytochemistry*, **16**, 800-801, (1977).



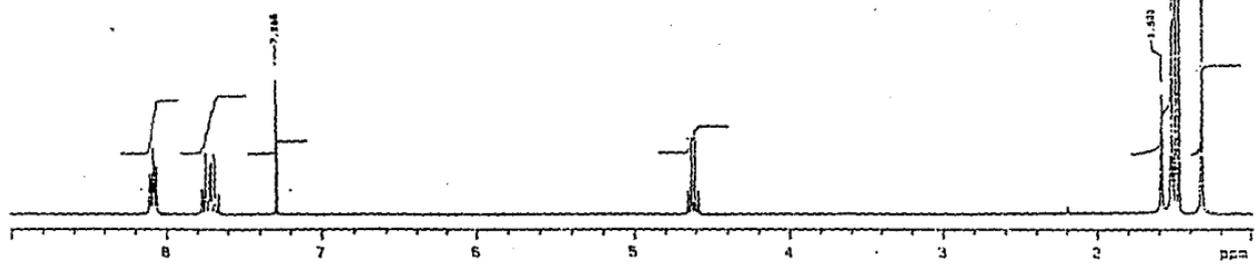
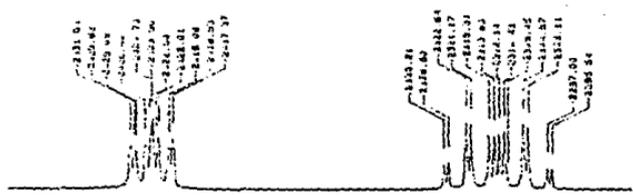
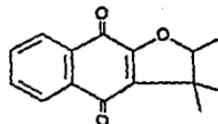
Espectro No. 3



Espectro No. 4

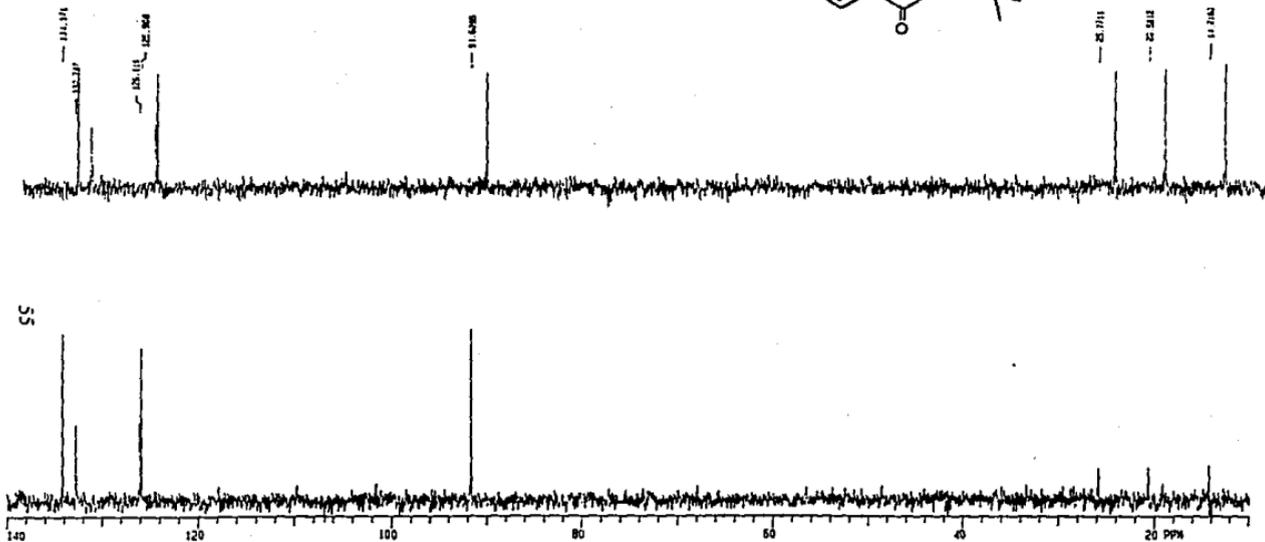
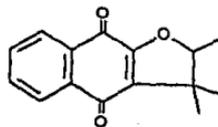


Espectro No. 5



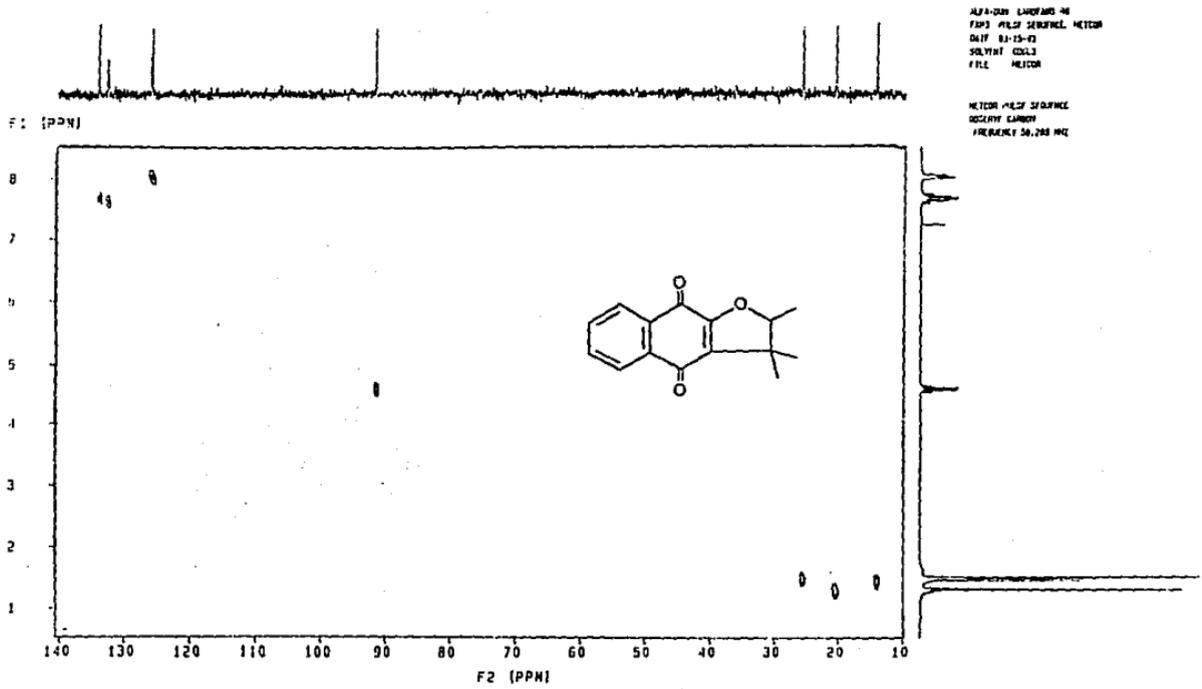
Espectro No. 6

54



Espectro No. 7

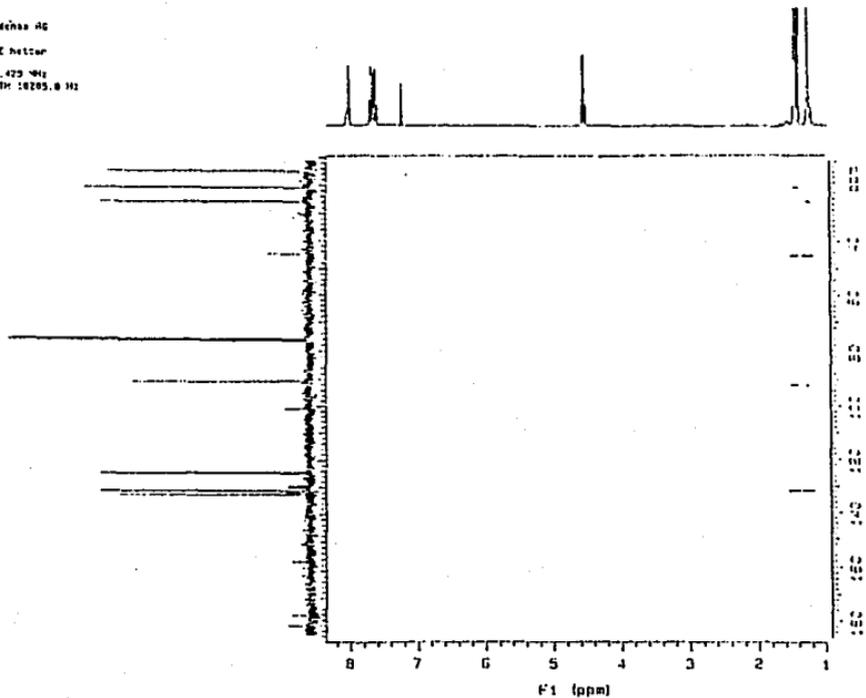
56



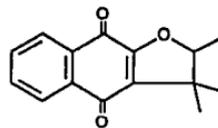
Espectro No. 8

Varian Cardéna AG
PULSE SEQUENCE: hzgpc
GSDPRG: G13
FREQ: 25.425 MHz
SPECTRAL WIDTH: 10205.0 Hz

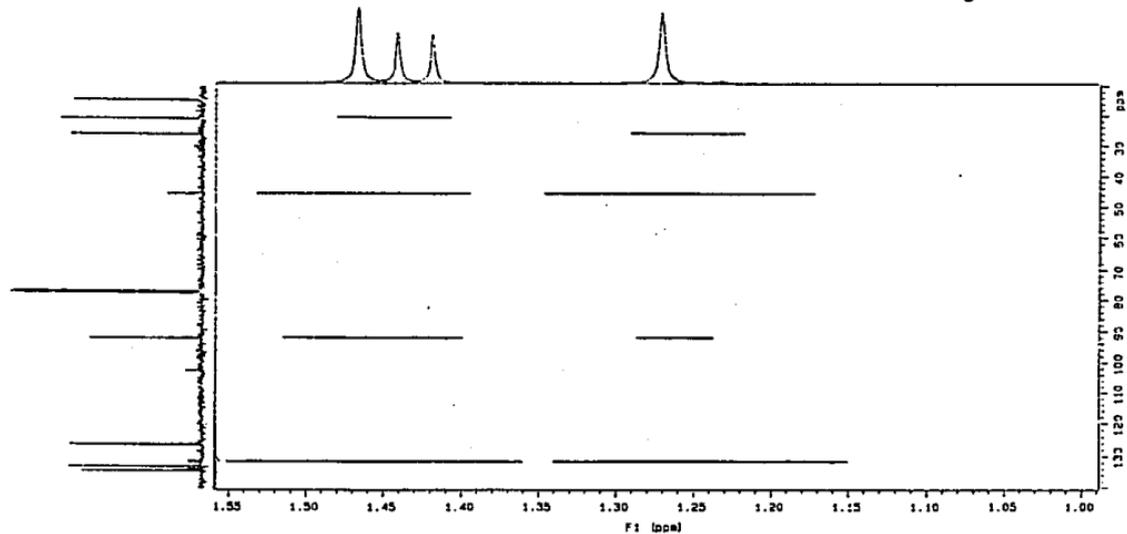
57



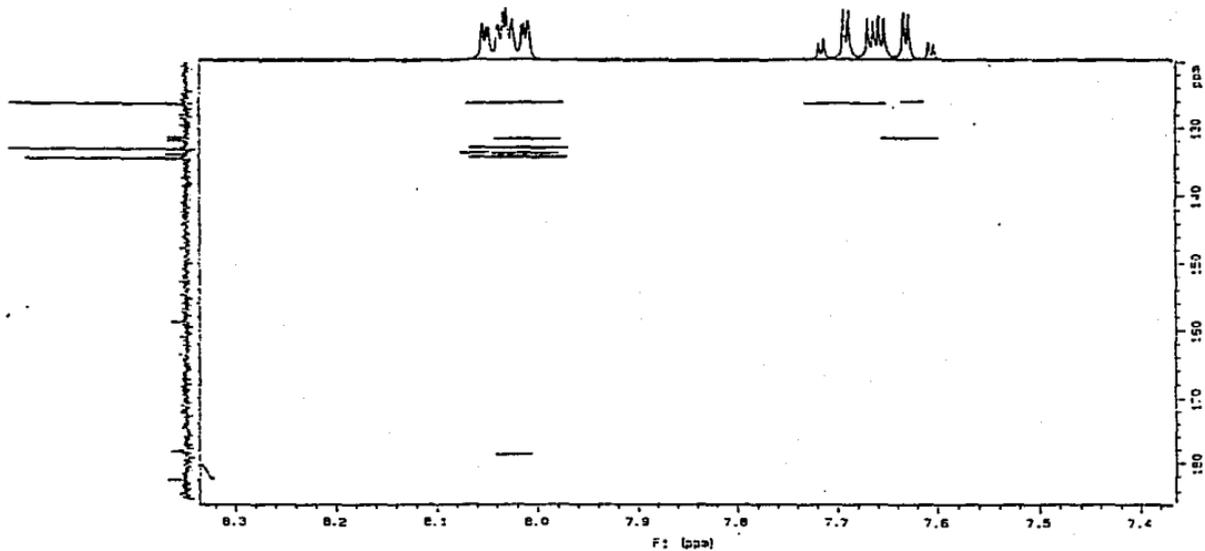
Espectro No. 9



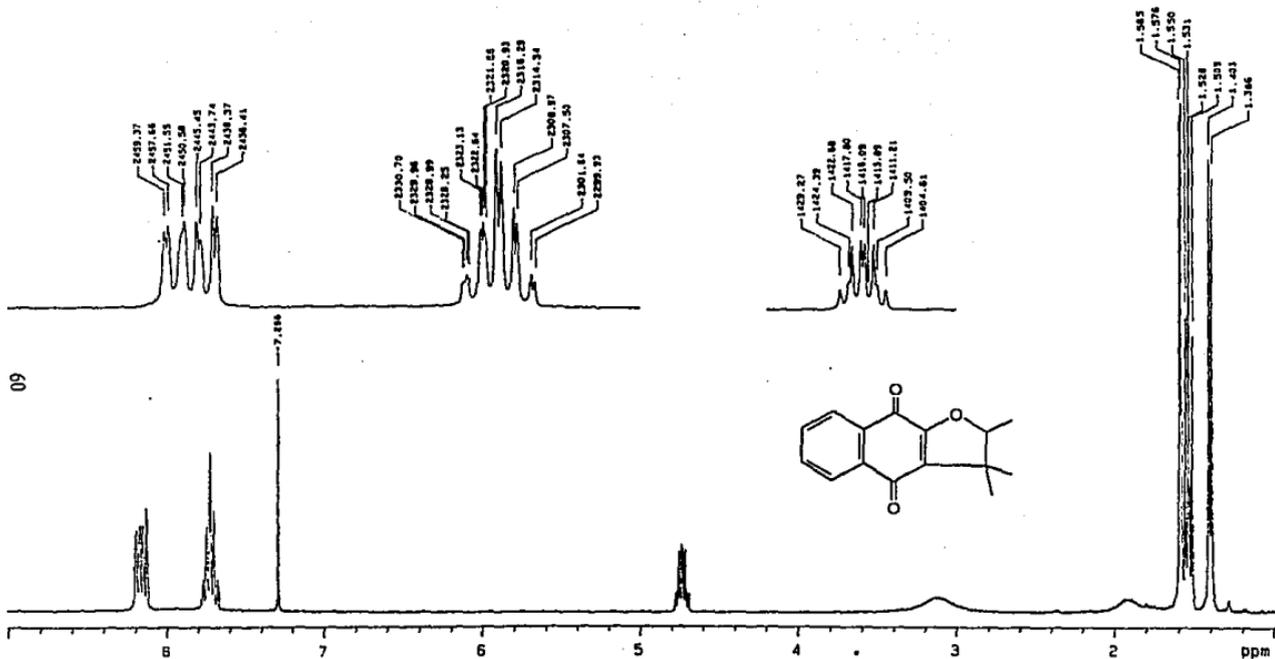
58



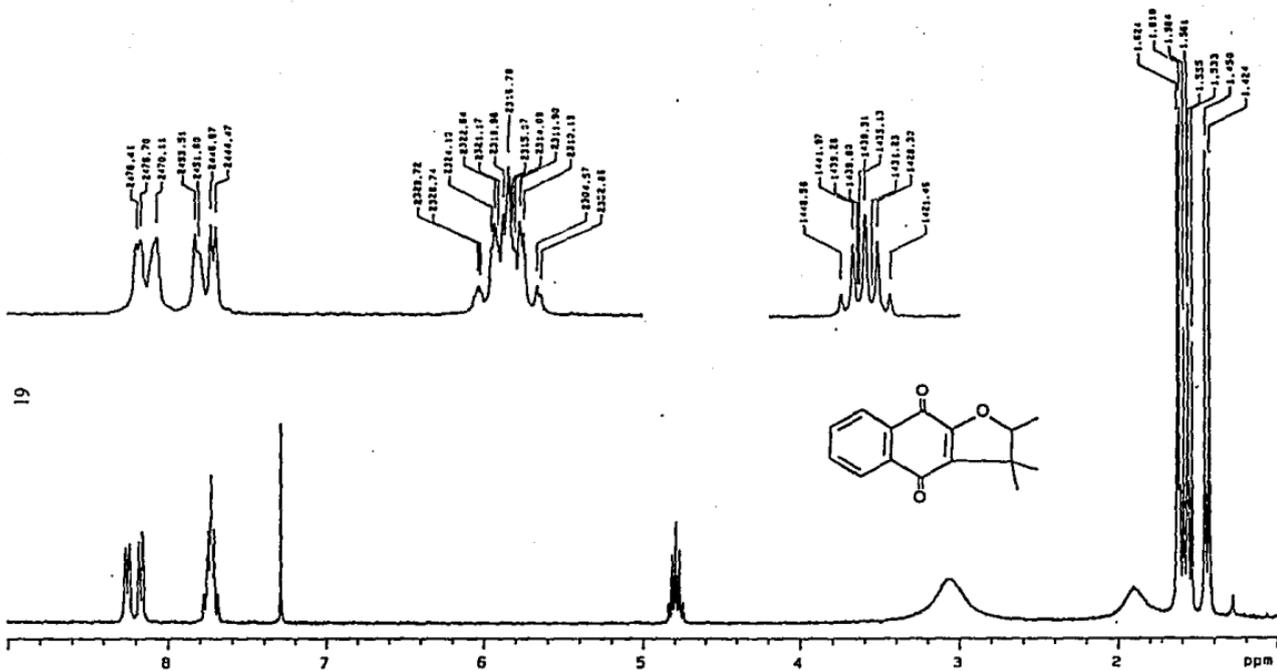
Espectro No. 10



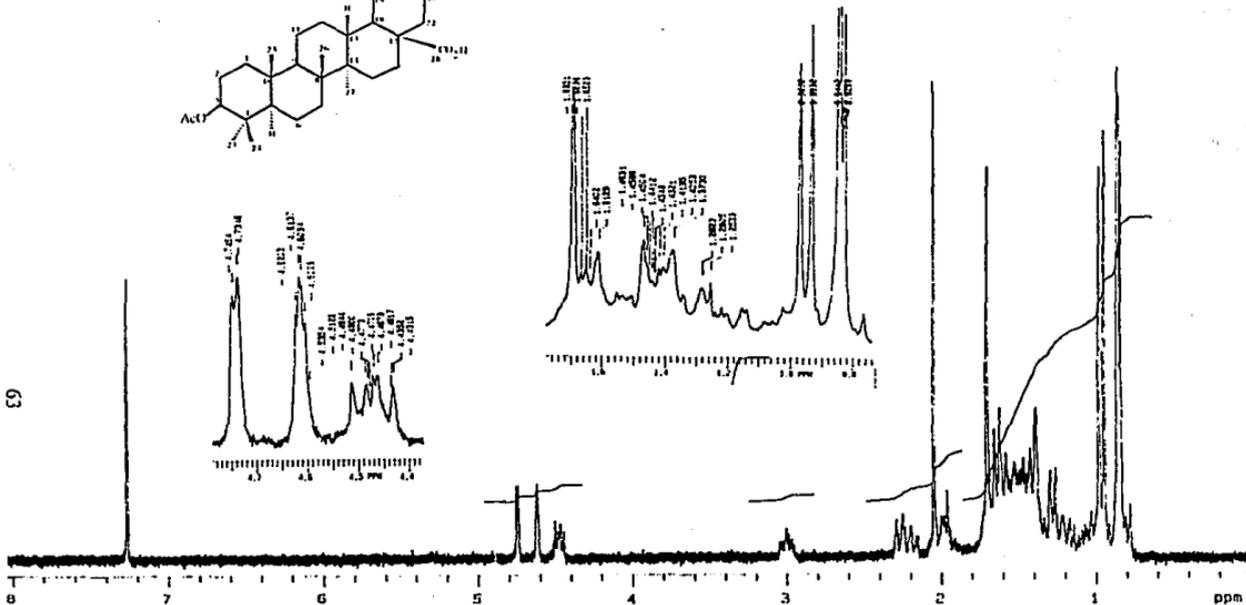
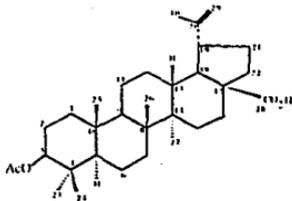
Espectro No. 11



Espectro No. 12

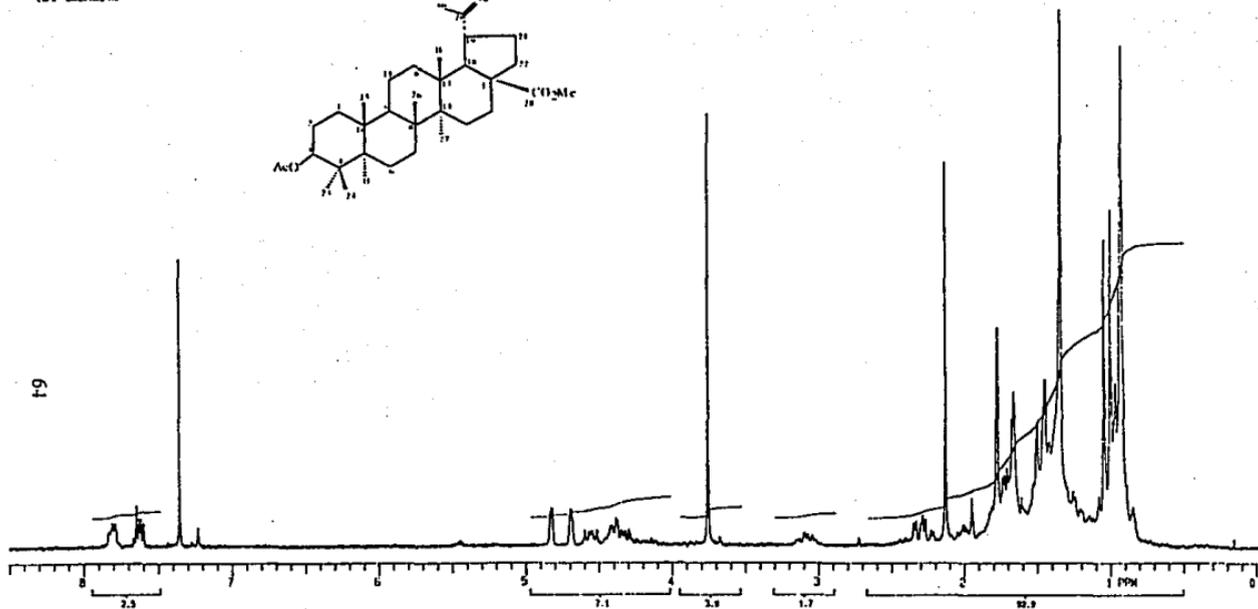
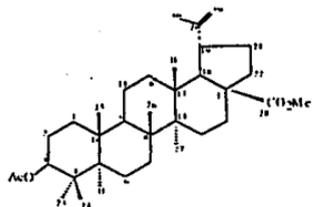


Espectro No.13

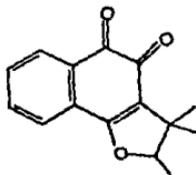
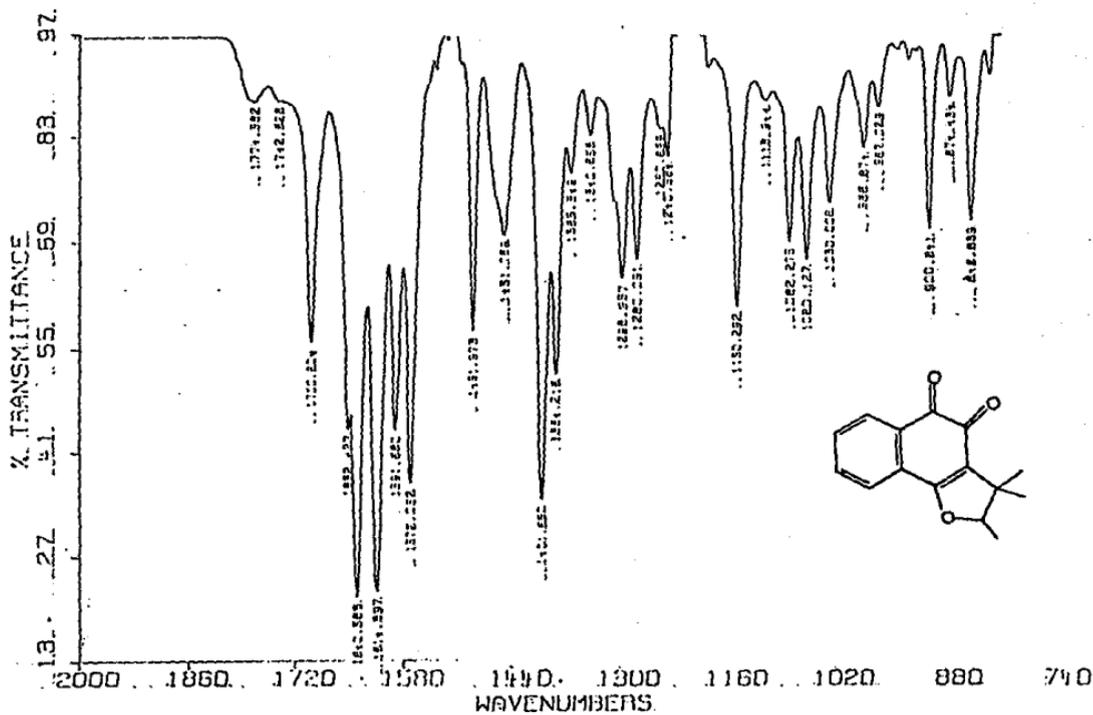


Espectro No.15

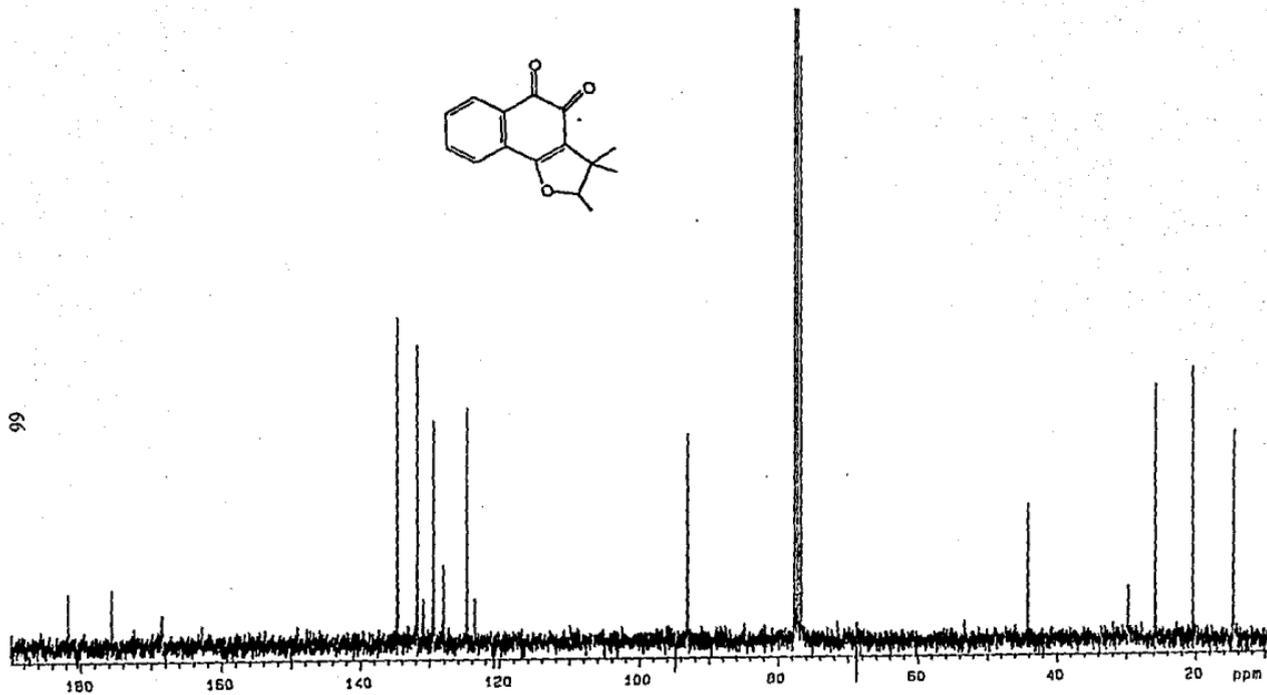
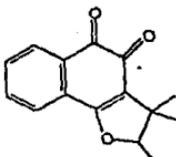
LUPA CARPHALINE



Espectro No.16



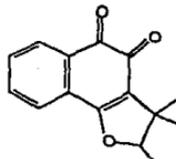
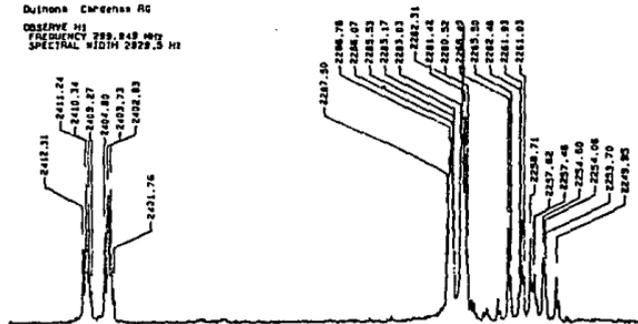
Espectro No.17



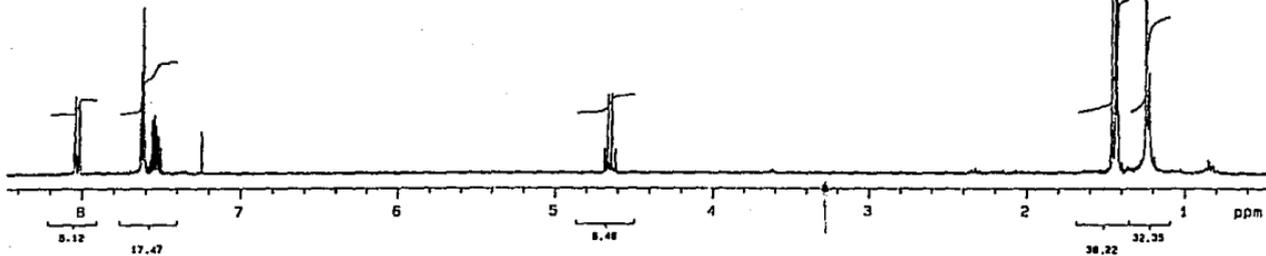
99

Espectro No.18

DuPonta Cerephas RG
OBSERVE H1
FREQUENCY 229.849 MHz
SPECTRAL WIDTH 229.5 Hz



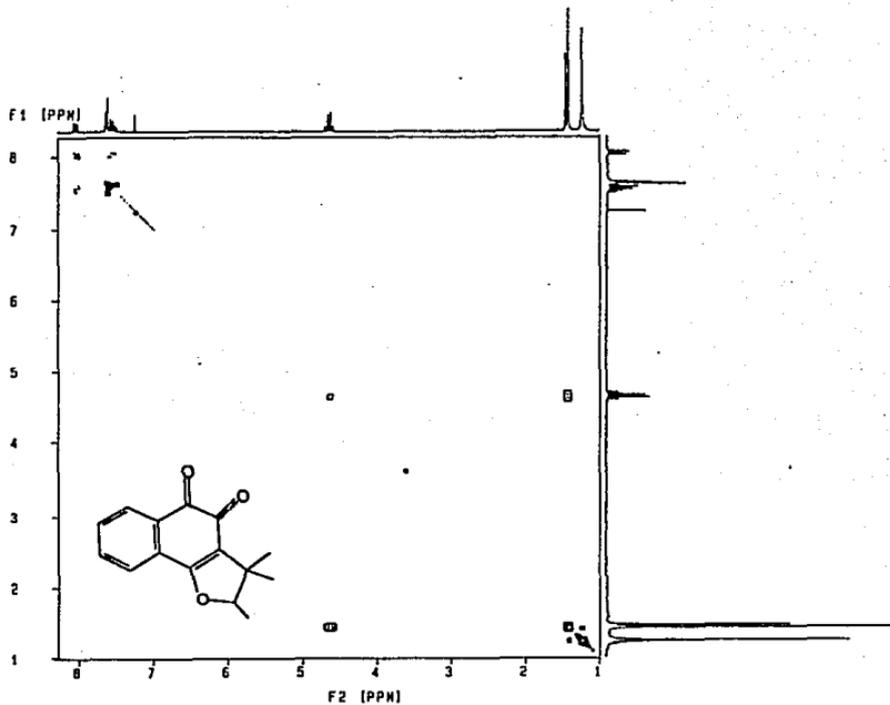
67



Spectro No. 19

DUJHOM CARBONAS DE
ESP: PULSE SEQUENCE: CQF1
DATE: 02-06-83
SOLVENT: CDCl3
FILE: CQF1

CQF1 PULSE SEQUENCE
DELAZY: PNOYH
FREQ: 100.675 MHz
S1 SPECTRAL WIDTH (F2): 1079.0 Hz
S2 SPECTRAL WIDTH (F1): 1079.0 Hz
ACQ. TIME: 0.129 SEC
REGULATION DELAY: 1.0 SEC
PULSE WIDTH: 90 DEGREES
FIRST PULSE: 90 DEGREES

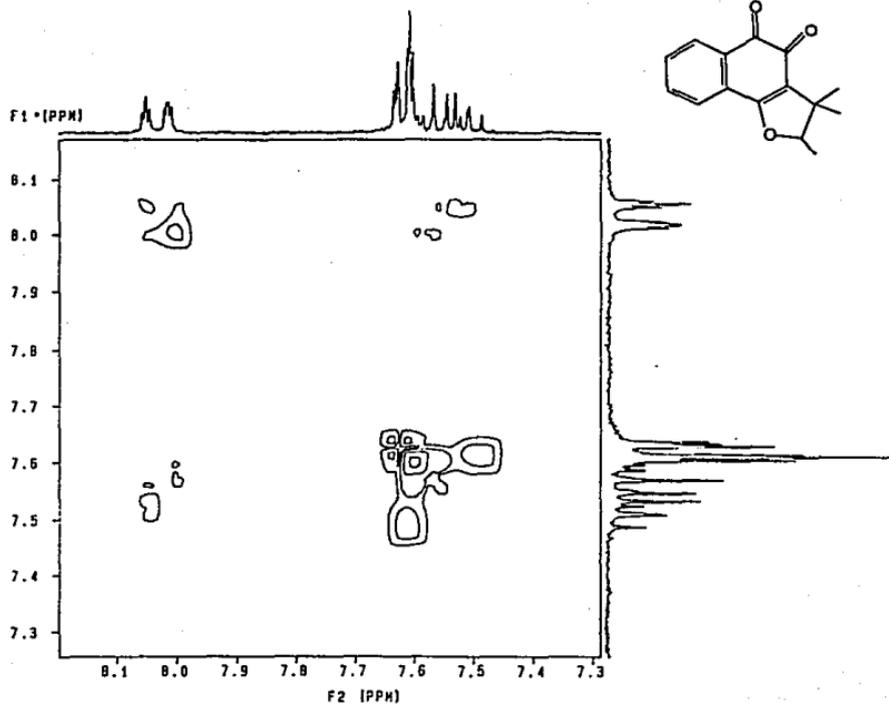


Espectro No. 20

OXINDOL CARBONAS 26

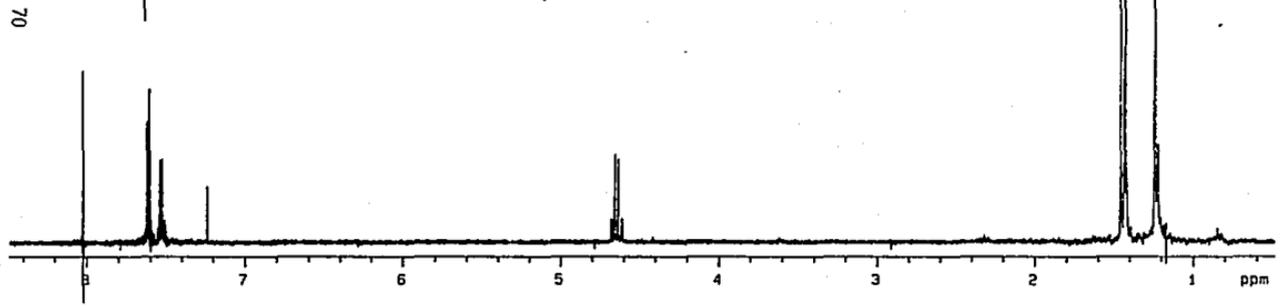
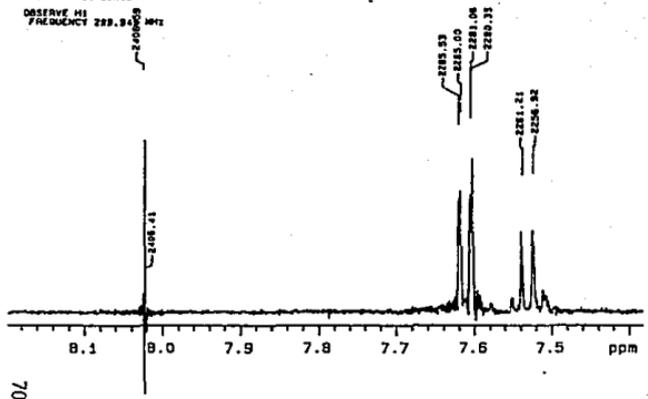
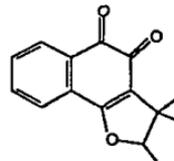
COZY PULSE SEQUENCE
OBSERVE PROTON
FREQUENCY 199.875 MHz

69



Espectro No. 21

Duinao Cardenas RB
OBSERVE H1
FREQUENCY 299.9 MHz



Espectro No. 22

