



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Aislamiento y elucidación estructural de los Productos
Naturales presentes en la especie vegetal *Sebastiania
longicuspis* (Euphorbiaceae)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

NALLELY CASANDRA CRUZ SALAS



México CD. MX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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: Dr. Benito Reyes Trejo
Vocal: Dr. E. Guillermo Delgado Lamas
Secretario: M. en F. Leticia Huerta Flores
1er. Suplente: M. en F. María Martha Ugalde Hernández
2° Suplente: M. en C. Manuel López Ortíz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Química de la UNAM, Laboratorio 1, Edificio C.

Director:

Dr. E. Guillermo Delgado Lamas

Asesor:

M. en F. Leticia Huerta Flores

Sustentante:

Nallely Casandra Cruz Salas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México/ Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la formación académica y las grandes experiencias adquiridas en esta casa de estudios.

Al Instituto de Química de la UNAM por abrirme sus puertas para la culminación de esta etapa en mi vida.

Al Doctor E. Guillermo Delgado Lamas por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su asesoría en la realización de este proyecto, pero sobre todo por el apoyo, consejos e infinita paciencia.

Al proyecto DGAPA-PAPIIT IG200514

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el estímulo como Ayudante de Investigador Nivel III con referencia 11208, para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Fernando Augusto Novillo Logroño por ser mi mentor y gran amigo durante la realización de este proyecto.

Al Dr. José Luis Rodríguez Chávez por su gran cariño, comprensión y guía para la realización del presente escrito.

A los Técnicos académicos del Instituto de Química, en especial a la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y a la Dra. María Isabel Chávez Uribe.

A la M. en F. Leticia Huerta Flores por su apoyo y cariño.

Al Maestro Roberto Morales Ledezma, por su apoyo técnico en la escritura del presente proyecto.

A mi querido amigo M. en C. John A. Corredor Barinas por su inmenso cariño, enseñanzas y apoyo.

A mis grandes amigos del Laboratorio 1-C del Instituto de Química M. en C. José Antonio Rivera, M. en C. Fabiola A. López, Dra. Gabriela Salazar, Dr. Félix Morales, a Johanna y Mario.

DEDICATORIA

A Dios por colocarme en el lugar indicado en el momento perfecto.

A mis padres Beatriz y Felipe, por brindarme infinito amor, por siempre tener las palabras indicadas en los momentos más duros, por darme todo lo que estuvo en sus manos para cumplir mis metas, los amo infinitamente.

A mi hermana Noemi, porque a lo largo de nuestras vidas ha sido una increíble compañera, siempre pusiste mis pies en la tierra y nunca me dejaste sola en los momentos importantes.

A mis hermanos Emmanuel, Carmen y Alan pues a pesar de las diferencias siempre me brindaron su apoyo.

A mis sobrinas Valeria, Rebeca y Johana por darme felicidad cuando las cosas se apreciaban complicadas.

A mi amado Olaf que siempre me brindo su amor y apoyo incondicional, por ser el motor que me impulso a terminar esta etapa.

A Rosalía que ha sido mi mano derecha y apoyo en cada paso de esta etapa.

A Teresa y a la Sra. Gregoria por abrirme las puertas de su hogar, por brindarme su apoyo y amistad.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 Papel de los Productos Naturales en las interacciones ecológicas	2
1.2 Estudios fitoquímicos	3
1.3 Importancia de los Productos Naturales en la taxonomía	4
1.4 Generalidades sobre la familia Euphorbiaceae	5
1.5 Usos de especies de la familia Euphorbiaceae	6
1.6 Generalidades sobre el género <i>Sebastiania</i>	9
1.7 Principales componentes químicos presentes en el género <i>Sebastiania</i>	10
1.7.1 Terpenos	10
1.7.2 Compuestos fenólicos	10
1.7.3 Alcaloides	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVO	15
5. MATERIAL Y MÉTODO	16
5.1 Diseño experimental	16
5.2 Material vegetal	16
5.3 Materiales y reactivos	18
5.4 Metodología general	19
5.5 Obtención del extracto	20
5.6 Fraccionamiento del extracto de CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH	20
5.6.1 Adsorción	20
5.6.2 Cromatografía en columna	21
5.6.1 Cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía en placa preparativa (CPP)	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Fraccionamiento primario de <i>Sebastiania longicuspis</i>	23

6.2	Fracción C (11, 12)	25
6.3	Fracción D (13 – 18)	26
6.4	Proceso cromatográfico secundario de E (19, 20)	27
6.5	Fraccionamiento secundario F (21, 22)	28
6.6	Proceso cromatográfico secundario de G (23 – 30)	30
6.6.1	Cromatografía, proceso terciario de D' (21 – 34) proveniente de G (23 – 30)	32
6.7	Fracción H (31 – 36)	33
6.8	Cromatografía, proceso secundario de I (37 – 99)	34
6.9	Cromatografía, proceso secundario de J (100 – 183)	35
6.10	Cromatografía, proceso secundario de K (184 – 218)	37
6.10.1	Fraccionamiento terciario I' (54 – 71) proveniente de K (184 – 218)	38
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
7.1	Determinación estructural de 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (moretenona) (9), aislada de la fracción C (11, 12)	41
7.2	Determinación estructural del ácido lignocérico (33), aislado de la fracción D (13 – 18)	46
7.3	Determinación estructural del lupeol (3), aislado de G' (44 – 46) y F'' (21 - 22)	47
7.4	Determinación estructural de β -sitosterol (1) y estigmasterol (2) de la fracción H (31 – 36)	48
7.5	Escopoletina (19) aislada de la fracción A'' (21 – 25)	52
8.	CONCLUSIONES	55
9.	RECOMENDACIONES	55
10.	ANEXO. ESPECTROS DE RMN	56
11.	REFERENCIAS	83

Índice de ilustraciones

Figura 1. Triterpenos aislados de diferentes especies del género <i>Sebastiania</i>	11
Figura 2. Flavonoides, cumarina y compuestos de tipo fenólico aislados del género <i>Sebastiania</i>	12
Figura 3. Alcaloides presentes en <i>Sebastiania corniculata</i>	13
Figura 4. Espécimen de <i>Sebastiania longicuspis</i> resguardado en el Herbario Nacional (MEXU)	17
Figura 5. Experimento NOESY de 9	45
Figura 6. Señal del protón enlazado al grupo hidroxilo	49
Figura 7. Señales características de la mezcla de β -sitosterol-estigmasterol	50

Índice de diagramas

Diagrama 1. Metodología general del fraccionamiento de las ramas de <i>Sebastiania longicuspis</i>	19
Diagrama 2. Fraccionamientos sucesivos del extracto CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH de las ramas de <i>Sebastiania longicuspis</i>	24

Índice de tablas

Tabla 1. Especies de la familia Euphorbiaceae empleadas en el tratamiento de ciertas enfermedades	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica del género <i>Sebastiania</i>	9
Tabla 3. Especificaciones de la columna empleada en el fraccionamiento primario	21
Tabla 4. Cambios de polaridad en la elución del fraccionamiento primario	23
Tabla 5. Unión de Eluatos del fraccionamiento primario	23
Tabla 6. Elución de E y los cambios de polaridad de la fase móvil	27
Tabla 7. Unión de eluatos del fraccionamiento de E	28
Tabla 8. Proceso cromatográfico secundario de F	28
Tabla 9. Unión de los Eluatos del fraccionamiento secundario de F	28
Tabla 10. Eluatos del fraccionamiento secundario de G	31
Tabla 11. Agrupamiento de fracciones de G por similitud cromatográfica	31
Tabla 12. Eluatos obtenidos del proceso cromatográfico de D´	32
Tabla 13. Agrupamiento de fracciones de D´	32
Tabla 14. Eluatos del fraccionamiento secundario de I	35
Tabla 15. Agrupamiento de las fracciones obtenidas de I	35
Tabla 16. Eluatos del fraccionamiento de J	36
Tabla 17. Agrupamiento de fracciones del proceso cromatográfico de J	36
Tabla 18. Eluatos del fraccionamiento K	37
Tabla 19. Agrupamiento de fracciones del fraccionamiento de K	38
Tabla 20. Fraccionamiento terciario de I´	39
Tabla 21. Agrupamiento de I´ por similitud en sus perfiles cromatográficos	39
Tabla 22. Datos de difracción de rayos X de 19	40

Tabla 23. Datos de RMN ^{13}C de 9 (75 MHz, δ)	43
Tabla 24. Datos de RMN ^1H de 9 (300 MHz, δ)	45
Tabla 25. Datos de RMN ^{13}C de 3 (75 MHz, δ)	47
Tabla 26. Datos de RMN ^1H de 3 (300 MHz, δ)	48
Tabla 27. Datos de RMN ^{13}C de 1, 2 (75 MHz, δ)	51
Tabla 28. Datos de RMN ^1H de 1, 2 (300 MHz, δ)	52
Tabla 29. Datos de RMN ^{13}C de 19 (125 MHz, δ)	53
Tabla 30. Correlaciones HSQC de 19	54
Tabla 31. Correlaciones NOESY y COSY de 19	54
Tabla 32. Correlaciones HMBC de 19	54
Tabla 33. Datos de RMN ^1H de 19 (500 MHz, δ)	54

Índice de Espectros

Espectro 1. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS) de moretenona 9	57
Espectro 2. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 9	58
Espectro 3. RMN ^{13}C DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) de 9	59
Espectro 4. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 9	60
Espectro 5. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de 9	61
Espectro 6. NOESY (300 MHz, CDCl_3) de 9	62
Espectro 7. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 33	63
Espectro 8. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 33	64
Espectro 9. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 33	65
Espectro 10. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 3	66
Espectro 11. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 3	67

Espectro 12. RMN ^{13}C DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) de 3	68
Espectro 13. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 3	69
Espectro 14. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de 3	70
Espectro 15. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS) de 1,2	71
Espectro 16. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 1,2	72
Espectro 17. RMN ^{13}C DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) de 1,2	73
Espectro 18. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 1,2	74
Espectro 19. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de 1,2	75
Espectro 20. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de 19	76
Espectro 21. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 19	77
Espectro 22. ^{13}C , DEPT 135 apilados (125 MHz, CDCl_3) de 19	78
Espectro 23. HSQC (500 MHz, CDCl_3) de 19	79
Espectro 24. HMBC (500 MHz CDCl_3) de 19	80
Espectro 25. NOESY (500 MHz, CDCl_3) de 19	81
Espectro 26. COSY (500 MHz, CDCl_3) de 19	82

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Acetona- d_6	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grado Celsius
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
COSY	Espectroscopia de Correlación (Correlation Spectroscopy)
CPP	Cromatografía en Placa Preparativa
δ	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Doblete
<i>dd</i>	Doble de dobles
<i>ddd</i>	Doble de doble de dobles
DEPT	Aumento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
g	Gramo
HMBC	Correlación Heteronuclear de Enlaces Múltiples (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica sencilla (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
<i>J</i>	Constante de Acoplamiento
λ	Longitud de onda (cm ⁻¹)
<i>m</i>	Multiplete
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
R _f	Relación de frentes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Singulete
<i>t</i>	Triplete
UV	Ultra Violeta

INTRODUCCIÓN

La evolución de los organismos vivos originó una gran diversidad de especies, las cuales sintetizan, como parte de su metabolismo, una amplia gama de compuestos químicos como mecanismo de defensa y desarrollo; tales compuestos son conocidos como Productos Naturales [1]. Su investigación ha permitido el aislamiento y caracterización de diversas sustancias gracias a que en los últimos dos siglos se desarrollaron métodos experimentales reproducibles que facilitaron la purificación y la determinación estructural de las sustancias [2]. Algunos de estos compuestos tienen potencial aplicación en la terapéutica y a nivel industrial. Es reconocido que los Productos Naturales (PN) desempeñan un papel importante en las interacciones ecológicas, ya que constituyen un medio de comunicación con insectos, microorganismos y otras plantas. Adicionalmente son empleados de manera frecuente como marcadores taxonómicos, ya que permiten obtener perfiles químicos que contribuyen a su caracterización [3].

En México habita una gran diversidad de especies vegetales, entre ellas destacan las incluidas en la familia Euphorbiaceae, entre las que se encuentran la nochebuena, la chaya y el ricino, entre muchas otras. Uno de los géneros de euforbiáceas es *Sebastiania*, a partir del cual se han aislado triterpenos, cumarinas, flavonoides y alcaloides [4–14]. Sin embargo, para la especie *S. longicuspis*, presente en ciertas regiones de México, Belice y Guatemala, no se han realizado estudios previos para determinar su perfil químico.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Papel de los Productos Naturales en las interacciones ecológicas

La evolución de las especies ha propiciado una co-evolución entre muchas de ellas. Ejemplo de esto es la relación que existe entre planta-insecto, planta-planta o planta-microorganismo, la cual ha permitido el desarrollo de estrategias de defensa con la finalidad de reducir la herbivoría, evitar daño físico, atraer insectos polinizadores, establecer relaciones simbióticas, etc [15]. Por otro lado, la interacción con factores abióticos desencadena en las plantas mecanismos de defensa frente a estos elementos [16]. Las relaciones que existen entre diversas especies vegetales y la competitividad por los recursos han llevado al desarrollo de mecanismos de defensa entre los se encuentran la producción de sustancias químicas (fenómeno de alelopatía) [17], que pueden actuar como agentes tóxicos, repelentes, o que retardan el desarrollo de insectos, plantas vecinas u organismos patógenos, o la protección mecánica basada modificaciones en la estructura morfológica de las plantas que incluyen pelos, tricomas, espinas y hojas más gruesas [18, 19].

Los compuestos químicos presentes en los organismos vivos se conocen como Productos Naturales [1]. Uno de los primeros reportes sobre el aislamiento de Productos Naturales fue realizado por Carl W. Scheele el cual entre 1742 y 1786 aisló ácido láctico, málico, cítrico y tartárico (obtenidos de la leche, las manzanas, el limón y las uvas en orden correspondiente) [20]. A la par de estos descubrimientos, Friedrich Sertürner (1783 – 1841), aisló en 1805 la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum*). Posteriormente entre 1817 a 1821, Joseph B.

Pelletier y Pierre J. Caventou aislaron alcaloides provenientes de varias especies vegetales, como la emetina, la estricnina y la quinina [21].

Los importantes descubrimientos de las actividades medicinales de ciertos productos naturales constituyeron los antecedentes que favorecieron que en la década de los 60's del siglo pasado el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos iniciara un programa de investigación en el cual se evaluaron 114,000 extractos de diferentes plantas con la finalidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer. Como algunos resultados de este programa de investigación, se aislaron los compuestos paclitaxel a partir de *Taxus brevifolia* y camptotecina a partir de *Camptotheca acuminata* [22].

1.2 Estudios fitoquímicos

Existe un gran interés en el estudio de los Productos Naturales debido a su importancia en diversos tópicos como la quimiotaxonomía, la fisiología, la ecología, los alimentos, la agronomía, y los estudios etnomédicos. El estudio de los productos Naturales es una actividad interdisciplinaria que involucra a la química y diversas ramas de la biología [19].

Los Productos Naturales son moléculas que se derivan de rutas del metabolismo, tales como la glucólisis y ciclo de Krebs. Estas moléculas poseen una amplia variedad estructural y se biosintetizan de forma constitutiva y específica para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular, existiendo también aquellos que se biosintetizan de forma inducida, de acuerdo al entorno ecológico. La variedad estructural que existe en los Productos Naturales determina diferentes perfiles metabólicos entre especies, entre los miembros de una población y entre los

diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación que han desarrollado las plantas [13].

Uno de los métodos empleados para la clasificación de las plantas se basa en la comparación de las características morfológicas y anatómicas del material vegetal, y se le denomina “sistema natural”. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, la evolución es responsable de una gran diversidad de especies vegetales y de los Productos Naturales que contienen debido a la convergencia y divergencia entre especies lo que provoca dificultades para una clasificación taxonómica. El conocimiento de la estructura molecular de los PN presentes en una especie determinada constituye una herramienta adicional para la caracterización y clasificación taxonómica [23].

1.3 Importancia de los Productos Naturales en la taxonomía

Mediante estudios químicos es posible obtener información de las sustancias químicas presentes en las especies vegetales que puede ser empleada como una herramienta, que en conjunto con la descripción morfológica, citológica, embriológica, anatómica y molecular permiten delimitar los denominados “taxa” los cuales son grupos basados en similitudes principalmente morfológicas y citológicas o cuyos caracteres morfológicos muestran relaciones reticuladas. Estos estudios son una herramienta que ayudan a la resolución de problemas taxonómicos y permiten establecer las relaciones filogenéticas a nivel interespecífico, intergénero y familia, y permite obtener una delimitación más aproximada y robusta de su taxonomía. Estas relaciones se establecen entre especies vegetales que poseen metabolismos similares y se encuentran fuertemente interrelacionadas, por lo cual se plantea que biosintetizan Productos Naturales con similitud estructural [24].

Productos Naturales como el ácido cítrico, la glucosa, aminoácidos, etc. forman parte del metabolismo celular, por lo que se encuentran en todas las plantas, y tienen poco valor taxonómico. Sin embargo, otro tipo de productos Naturales surgen de la adaptación de los organismos como una respuesta de defensa a factores bióticos y abióticos, y su presencia es más restringida, por lo que se utilizan como herramientas taxonómicas. En el caso de las plantas las principales moléculas empleadas para esta delimitación incluyen compuestos de tipo fenólico, alcaloides y terpenoides [24, 25].

El estudio del contenido químico se ha empleado para reforzar investigaciones que sustentan el análisis taxonómico, ejemplo de ello son los estudios taxonómicos del género *Alchornea* (Euphorbiaceae), donde se ha planteado que la presencia de lignanos y taninos tiene valor taxonómico [26]. Por otra parte, en géneros como *Croton* se han identificado moléculas de tipo alcaloide como marcadores taxonómicos [27, 28], mientras que en el género *Euphorbia* los diterpenos son empleados como marcadores [29, 30].

1.4 Generalidades sobre la familia Euphorbiaceae

Entre las angiospermas, la familia Euphorbiaceae es una de las que presentan mayor variedad morfológica. Esta familia se encuentra constituida por 5 subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies distribuidas principalmente en zonas tropicales [31]. Entre los géneros más diversos de esta familia se encuentran: *Euphorbia* con 1000 especies, *Chamaesyce* con 250, *Sebastiania* con 158 y *Sapium*, que cuenta con 100 [10, 31].

América posee la mayor diversidad taxonómica con el 52.17 % de los géneros. En México se han identificado 50 géneros y 826 especies de las cuales el

55.52% son endémicas, ubicándola como la sexta familia con mayor diversidad taxonómica en el país. Las especies pertenecientes a esta familia se localizan principalmente en los estados de Chiapas, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz [31]. Una de las características de esta familia es la producción de látex constituido hasta en un 30% de terpenos (principalmente triterpenos), de los cuales se han identificado más de 50 tipos (tetra y pentacíclicos). Estos compuestos también han sido aislados a partir de otras partes del material vegetal tales como corteza, tronco, flores, hojas, raíces y tallos [32].

1.5 Usos de especies de la familia Euphorbiaceae

Diversas plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae se emplean en ciertas regiones de México y el mundo con fines terapéuticos (Tabla 1) alimenticios, industriales u ornamentales; asignándoles nuevas aplicaciones cada día como resultado de la investigación continua. *Manihot esculenta*, conocida como casava o yuca, es un género nativo de Sudamérica y del sur y occidente de México, que constituye un alimento básico para alrededor de 500 millones de personas a nivel mundial y representa una fuente importante de hidratos de carbono [33]. *Hevea brasiliensis* es la fuente de aproximadamente el 99 % del caucho natural a nivel mundial. Esta planta, originaria de Brasil, Bolivia, Perú, Colombia, Ecuador, Venezuela y la Guyana francesa, actualmente se cultiva en las zonas tropicales de Asia, África y América [34]. *Jatropha curcas* es una especie nativa de América central que ha sido introducida en África y Asia; su aplicación industrial se basa en el empleo del aceite extraído de dicha especie vegetal para la producción de bioenergéticos (biodiésel) [35, 36]. Cabe mencionar que aunado a su uso como

fuelle de bioenergéticos, ciertos estudios han demostrado que esta especie ha sido empleada, como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades como cáncer e infecciones gastrointestinales y respiratorias [37]. Otro uso que se da a algunas plantas de la familia Euphorbiaceae es el ornamental, ejemplo de ello es *Euphorbia pulcherrima* (nochebuena) una de las plantas más importantes a nivel mundial empleada como símbolo navideño, originaria de México y Guatemala. Esta especie tiene gran importancia económica y cultural [38]. Especies como *Croton floribundus*, *Croton nepetifolius*, *Euphorbia comosa*, *Microstachys corniculata* tienen aplicación potencial en pinturas, barnices y lubricantes industriales, y debido a su alto contenido de ácidos grasos saturados *Sapium glandulosum* representan una alternativa para la producción de jabones y detergentes. Otras especies como *Actinostemon concolor*, *Stillingia trapezoidea*, *Sapium glandulosum* representan alternativas viables para la producción de biodiésel [36].

En lo referente a usos terapéuticos, diversas plantas de la familia Euphorbiaceae son empleadas a nivel mundial para aliviar diversas patologías. Una de las plantas más conocidas a nivel mundial es *Ricinus communis* originario de África oriental e India y conocido comúnmente como ricino, esta especie es una fuente de aceite que se emplea con fines industriales y cosméticos [35] pero también es utilizada en el tratamiento de ciertos padecimientos la como indigestión y la fiebre [39]; actualmente el cultivo de esta planta se realiza a nivel mundial.

Tabla 1. Especies de la familia Euphorbiaceae empleadas en el tratamiento de ciertas enfermedades

Género y Especie	Nombre común	Uso terapéutico
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Chaya	Reumatismo, gingivitis y enfermedades venéreas [40]
<i>Jatropha gaumeri</i>	Pamolche, piñón	Gingivitis, enfermedades infecciosas [40]
<i>Acalypha hederacea</i>	Hierba del pastor	Inflamación y heridas [39]
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Chaya	Diabetes, inflamación y obesidad [39]
<i>Jatropha neopauciflora</i>	Sangre de grado	Inflamación, heridas y erupción [39]
<i>Croton draco</i>	Sangre de dragón	
<i>Euphorbia golondrina</i>	Golondrina	
<i>Euphorbia tithymaloides</i>	Ítamo Real	
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Jatrofa	Obesidad [40]
<i>Jatropha urens</i>	Mala mujer	
<i>Hura polyandra</i>	Haba de San Ignacio	

1.6 Generalidades sobre el género *Sebastiania*

El género *Sebastiania* (Tabla 2) posee 158 especies distribuidas en regiones tropicales de África y América, en México se encuentran principalmente al sur de nuestro país. De las especies descritas, solo *S. commersoniana*, *S. corniculata*, *S. brasiliensis*, *S. argutidens*, *S. adenophora*, *S. pavoniana* y *S. schottiana* han sido objeto de investigación química. A partir de estos estudios se han aislado compuestos de tipo triterpeno, cumarina, flavonoide y alcaloide [6, 10, 11], algunos de los cuales han mostrado actividad como agentes antidiarreicos, antibacterianos, antifúngicos, analgésicos y antivirales [6, 11, 31, 42].

Tabla 2. Clasificación taxonómica del género *Sebastiania*

FAMILIA	<i>EUPHORBIACEAE</i>
Tribu	<i>Hippomaneae</i>
Subfamilia	<i>Euphorbioideae</i>
Género	<i>Sebastiania</i>

1.7 Principales componentes químicos presentes en el género *Sebastiania*

1.7.1 Terpenos

Otro grupo de compuestos aislados de plantas pertenecientes al género *Sebastiania* son los triterpenos, moléculas a base de unidades isopreno sintetizadas a través de dos vías: la ruta del mevalonato y la del fosfato de 2-metil-D-eritrol (FME) [43]. Compuestos como estigmasterol **1**, β -sitosterol **2**, lupeol **3**, β -amirina **4**, β -amirona **5**, lupenona **6**, taraxerol **7**, taraxerona **8**, moretenona **9**, glutinol **10**, α -amirina **11**, olean-13(18)-en-3-ol **12**, ergosterol **13** (Figura 1) han sido aislados de diferentes especies de este género.

1.7.2 Compuestos fenólicos

Entre los compuestos aislados a partir de especies de *Sebastiania* se encuentran compuestos fenólicos que incluyen flavonoides y cumarinas entre otros. Del género *Sebastiania* se han aislado los siguientes compuestos de tipo flavonoides: quercetina **14**, kaempferol **15**, isoramnetina **16**, isoquercetina **17**, rutina **18**, con esqueleto de cumarina como la escopoletina **19**, y de tipo fenólico como: ácido protocatecuico **20**, ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi benzoico **21**, siringato de metilo **22**, ácido gálico **23**, ácido cafeico **24**, corilagina **25**, gallicina **26**, ácido elágico **27**, 3,4,8,9,10-pentahidroxi-dibenzo(b,d)piran-6-ona **28** (Figura 2).

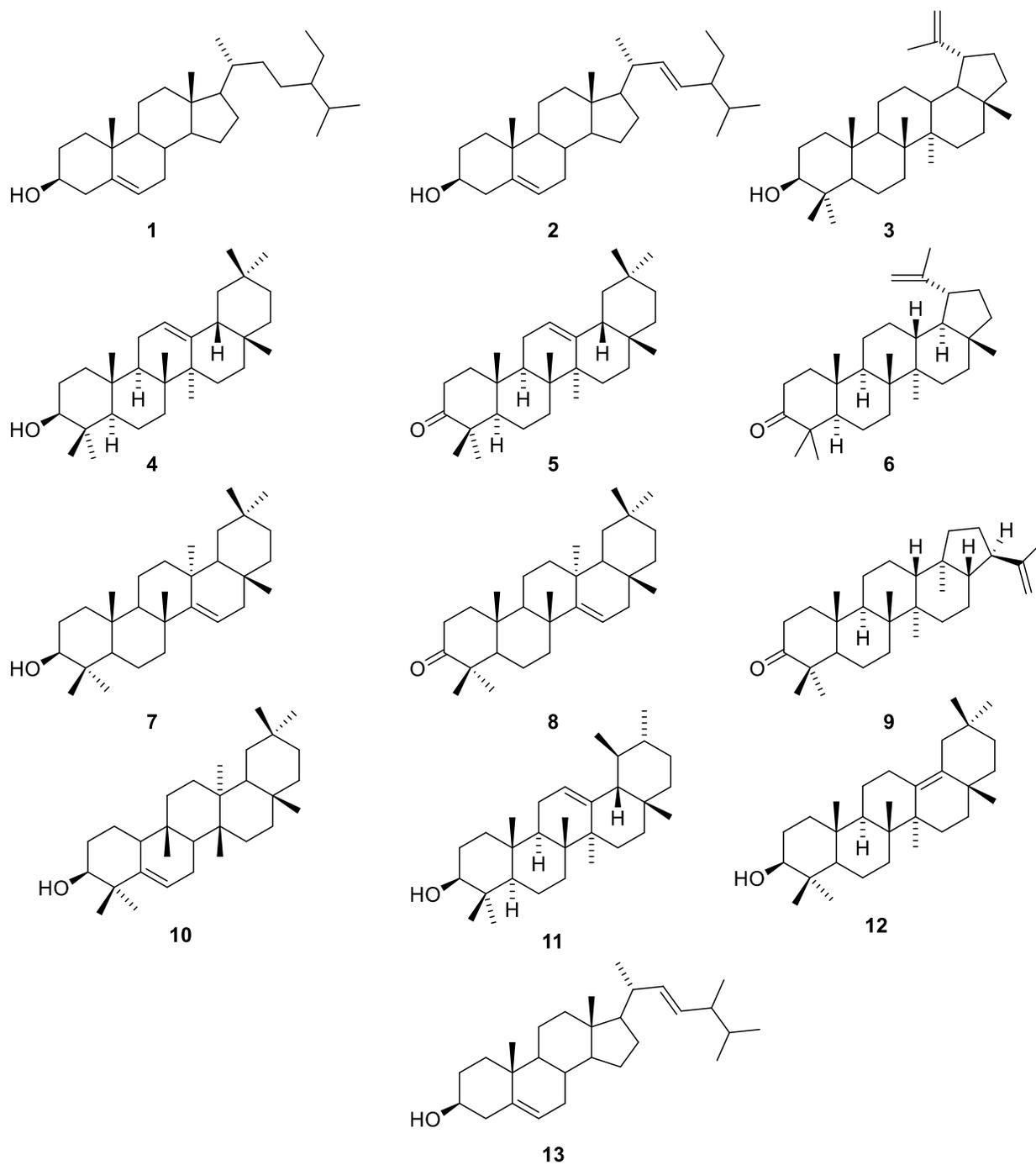


Figura 1. Triterpenos aislados de diferentes especies del género *Sebastiania*

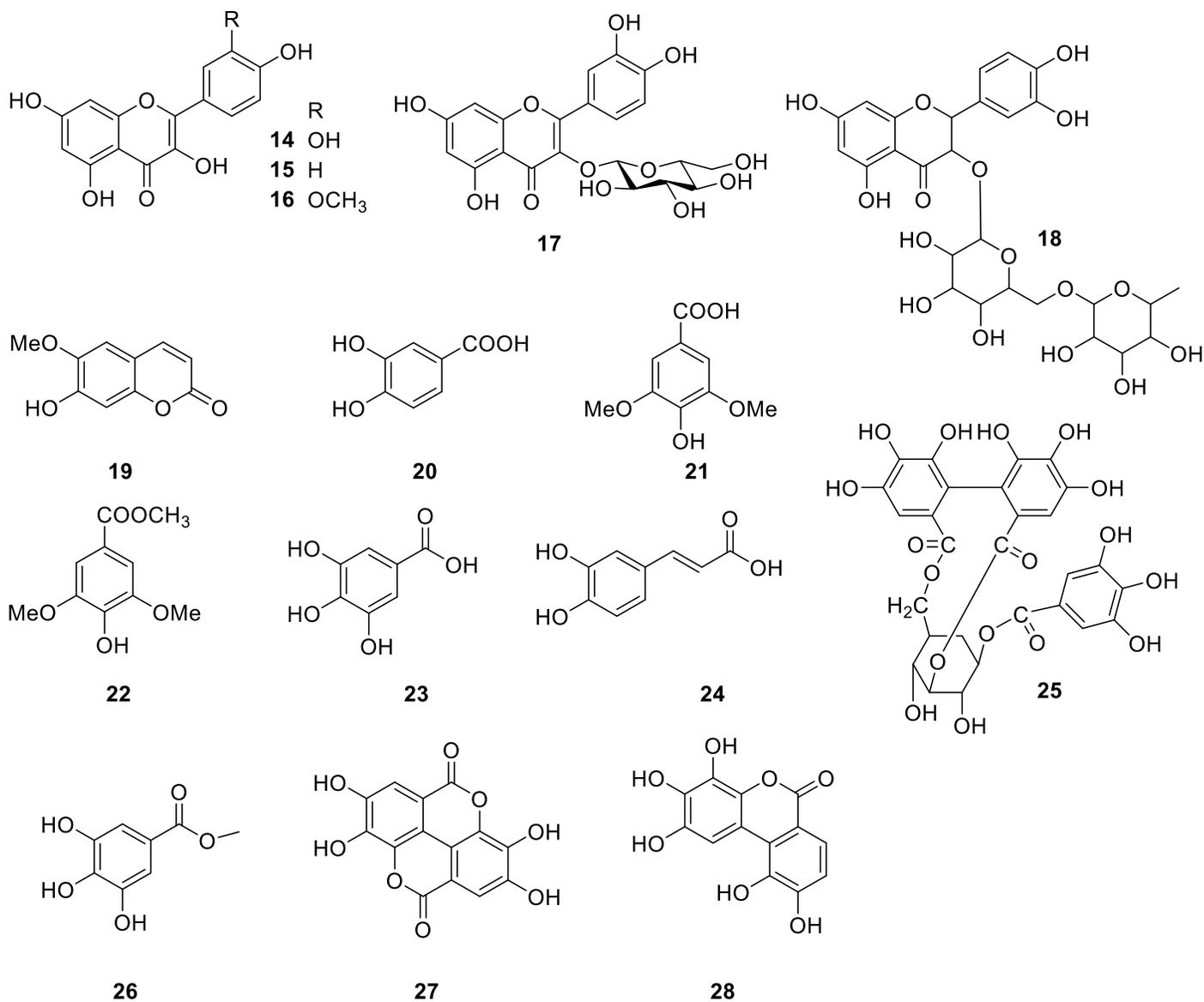


Figura 2. Flavonoides, cumarina y compuestos de tipo fenólico aislados del género *Sebastiania*

1.7.3 Alcaloides

Se ha reportado el aislamiento de diferentes compuestos de tipo alcaloide a partir de plantas del género *Sebastiania*, entre los que se incluyen: 3,4,8-trimetoxi-2-quinolona **30**, 2,3-metilendioxi-4,7,8-trimetoxiquinolona **31**, 2,3-metilendioxi-4,8-dimetoxiquinolona **32** (Figura 3).

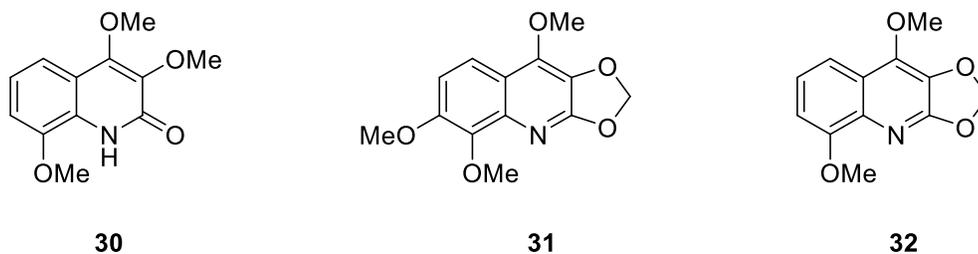


Figura 3. Alcaloides presentes en *Sebastiania corniculata*

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En diversos estudios se han reportado las propiedades terapéuticas de compuestos aislados de plantas de la familia Euphorbiaceae. A partir de la investigación llevada a cabo en ciertas especies del género *Sebastiania*, perteneciente a esta familia, se observó que ciertos extractos y Productos Naturales presentan actividad antidiarreica, antibacteriana, antifúngica, analgésica y antiviral. *Sebastiania longicuspis* es una especie que se distribuye al sur de nuestro país, en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán, la cual no cuenta con estudios químicos previos.

Considerando que el género *Sebastiania* ha sido poco estudiado y en las investigaciones realizadas hasta el momento se han aislado y caracterizado compuestos químicos que han mostrado diversas actividades biológicas, se llevará a cabo una investigación con el fin de generar conocimiento referente a los constituyentes químicos presentes en *Sebastiania longicuspis*.

3. HIPÓTESIS

Considerando que a partir de ciertas especies de *Sebastiania* se han aislado principalmente compuestos de tipo triterpeno, flavonoide, cumarina y alcaloide, es posible aislar compuestos químicos de similitud estructural en la especie *S. longicuspis*.

4. OBJETIVO

Aislar, mediante la aplicación de diversos procedimientos de química orgánica, los Productos Naturales presentes en el extracto de las ramas de *Sebastiania longicuspis* (Euphorbiaceae), y elucidar su estructura molecular mediante el análisis de los datos espectroscópicos y cristalográficos.

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Diseño experimental

El presente trabajo es un estudio de tipo exploratorio por la inexistencia de análisis previos de la especie; en un periodo de tiempo prospectivo, ya que se obtuvieron resultados después de una planeación del proyecto y con criterios específicos; con una evolución del fenómeno longitudinal, ya que a lo largo del proyecto los datos arrojados de diversas variables se miden más de una vez; experimental de tipo descriptivo, ya que se busca la caracterización de las sustancias químicas aislables.

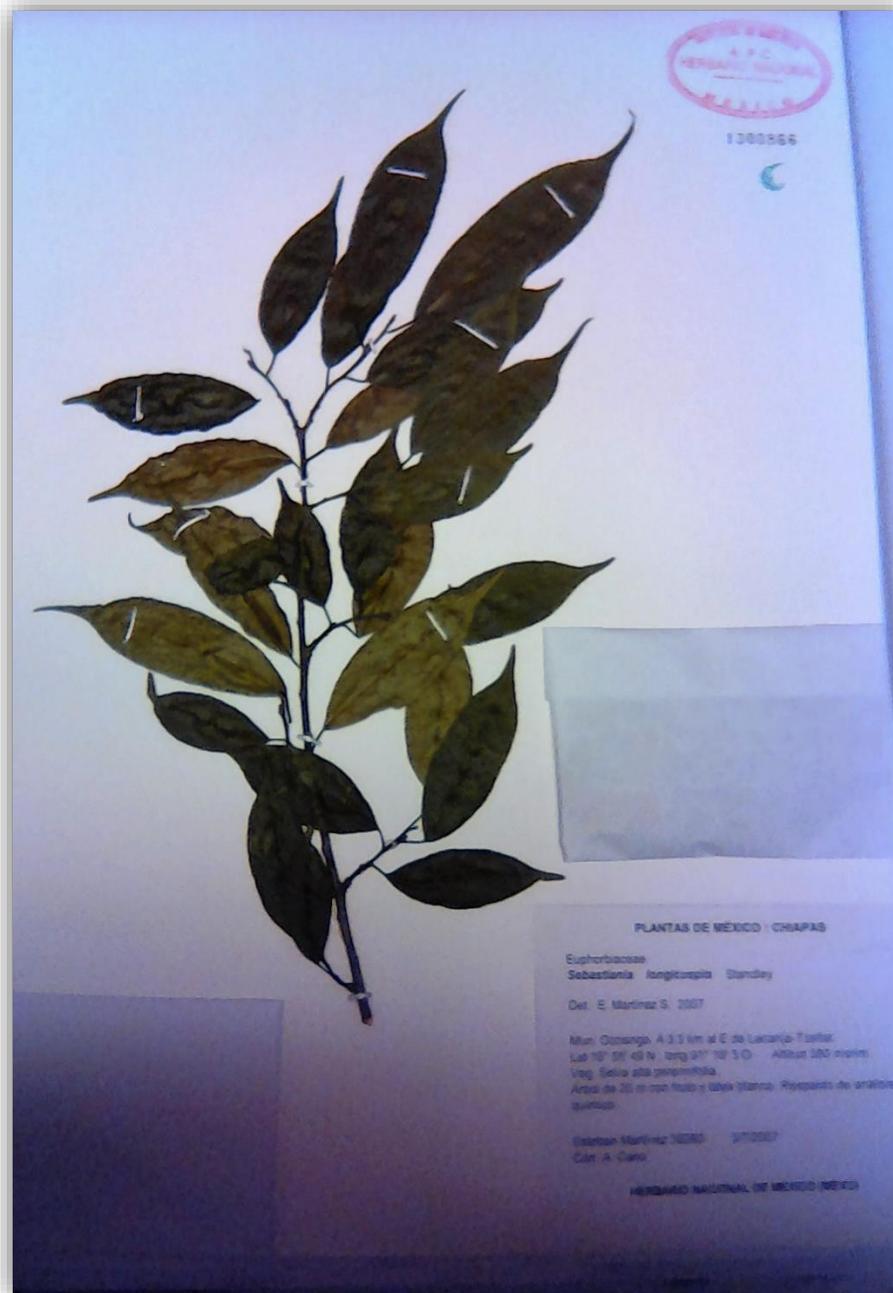
5.2 Material vegetal

El material vegetal fue colectado el 3 de Julio de 2007 a 3.3 km al este de Lacanjá-Tzeltal, municipio de Ocosingo, Chiapas, por el M. en C. Esteban Manuel Martínez Salas del Instituto de Biología de la UNAM (número de colecta 39260). Una muestra del material vegetal fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU) con número de folio 1300866. La descripción del sitio de colecta es la siguiente:

Ubicación: Latitud 16° 55' 49 N, longitud 91° 16' 3 O, altitud 380 msnm.

Vegetación: Selva alta perennifolia.

La planta fue identificada como *Sebastiania longicuspis* Standl., árbol de 20 m con fruto y látex blanco (Figura 4) por el M. en C. Esteban Manuel Martínez Salas.



**PLANTAS DE MÉXICO:
CHIAPAS**

Euphorbiaceae
Sebastiania longicuspis
 Standley
 Det. E. Martínez S. 2007

Mun. Ocosingo. A 3.3 km
 al E de Lacanjá-Tzeltal.
 Lat 16° 55' 49N, long 91 °
 16 '3 O. Altitud 380
 msnm.
 Veg. Selva alta
 perennifolia.
 Árbol de 20 m con fruto y
 látex blanco. Respaldo
 de análisis químico.
 Esteban Martínez 39260
 3/7/2007

Con: A. Cano

**HERBARIO NACIONAL
 DE MEXICO (MEXU)**

Figura 4. Espécimen de *Sebastiania longicuspis* resguardado en el Herbario Nacional (MEXU)

5.3 Materiales y reactivos

La destilación a presión reducida se llevó a cabo empleando un Rotavapor Buchi modelo R-100. Los espectros de RMN fueron adquiridos en un equipo Bruker Avance Modelo Fourier 300 MHz, Bruker Avance III 400 MHz, Varian Inova 500 MHz. La difracción de rayos X, se llevó a cabo en un difractómetro automático Bruker Smart Apex con un detector de área CCD y usando radiación monocromada de grafito Mo K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$).

Para la cromatografía en capa delgada se emplearon cromatofolios de aluminio con sílica gel 60 F₂₅₄, 20 x 20 (Merck, K.GaA., Darmstadt, Alemania). Para la cromatografía en capa delgada preparativa se utilizaron cromatoplasmas PLC Sílica gel 60 F254, 2 mm de 20 x 20 con base de vidrio (Merck, K.GaA., Darmstadt, Alemania). El revelado de las placas cromatográficas se realizó empleando lámpara UV Spectroline modelo ENF-240 (λ 254 y 365 nm) y sulfato cérico de amonio al 1% [(NH₄)₄Ce(SO₄)₄] en ácido sulfúrico. La determinación de los puntos de fusión se empleó un equipo Fisher-Johns (Cole-Parmer).

5.4 Metodología general

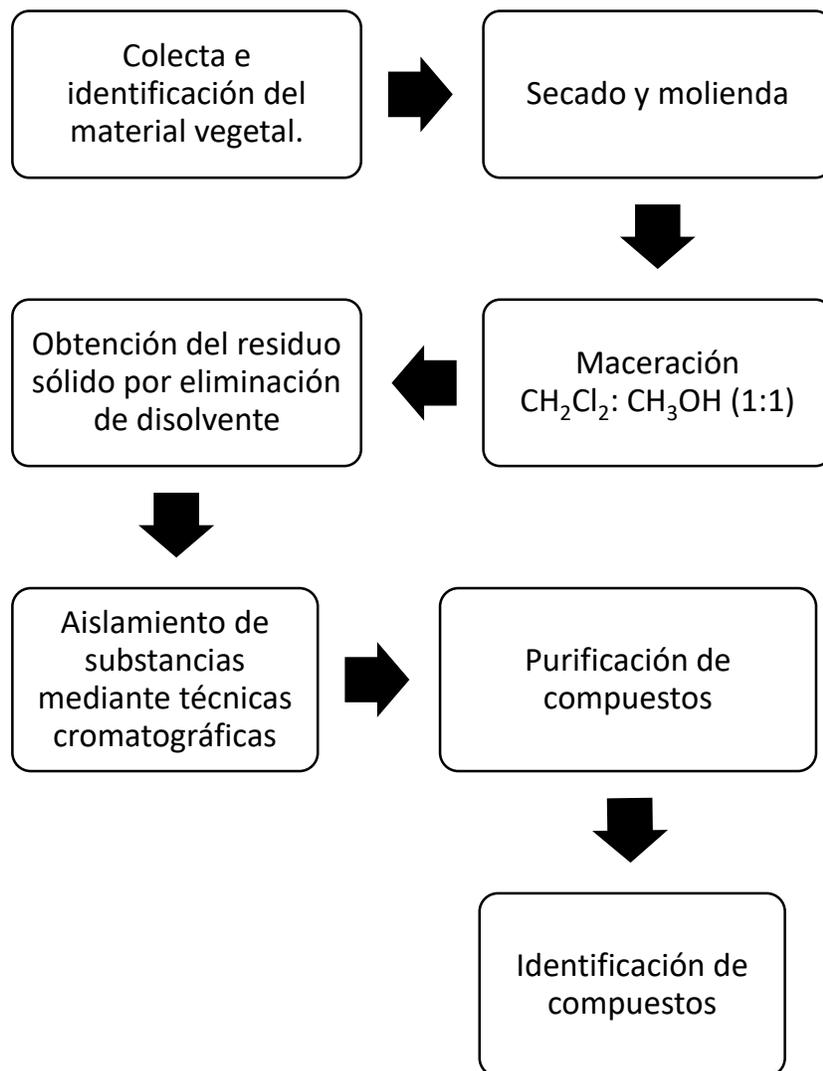


Diagrama 1. Metodología general del fraccionamiento de las ramas de *Sebastiania longicuspis*

5.5 Obtención del extracto

El material vegetal se secó a temperatura ambiente a la sombra, dividiéndose en secciones: hojas (1292.5 g), tronco (2464.6 g) y ramas (2042.5 g). En la presente investigación se realizó el procesamiento de las ramas.

Las ramas se molieron y el material molido se colocó en un garrafón de vidrio de 25 L agregándose una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ en proporción (1:1), aproximadamente 20 L hasta cubrir la totalidad del material. El material se dejó macerar a temperatura ambiente por 24 h. Transcurrido este tiempo se separó el disolvente y se concentró a presión reducida, el residuo obtenido se colocó en un recipiente para permitir la evaporación del disolvente residual; esta operación se realizó por triplicado, se obtuvieron 138.2 g de extracto.

El aislamiento de las sustancias químicas se realizó por medio de la aplicación de técnicas cromatográficas, mediante las cuales la separación los solutos se basaron en su migración diferencial en un sistema de dos fases, una estacionaria y otra móvil. A continuación se indica brevemente el desarrollo experimental.

5.6 Fraccionamiento del extracto de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$

5.6.1 Adsorción

El extracto se colocó en un recipiente de vidrio tipo charola y se adicionó una cantidad igual de sílica gel 230 – 400 (138.2 g) para su adsorción, homogenizando hasta tener un polvo uniforme y seco.

5.6.2 Cromatografía en columna

Para este procedimiento, la cantidad de sílica empleada para empacar la columna fue equivalente a 5 veces el peso del extracto adsorbido (Tabla 3).

Tabla 3. Especificaciones de la columna empleada en el fraccionamiento primario

Diámetro	100 mm
Largo	500 mm
Peso de sílica en la columna	612.8 g
Altura de la sílica en columna	160 mm
Volumen muerto	400 mL

Se empleó una columna de vidrio en la cual se colocó al fondo una capa de algodón desengrasado, a continuación y en el siguiente orden 1) sílica gel, 2) extracto adsorbido, 3) disco de papel filtro, 4) Na_2SO_4 anhidro, 5) algodón desengrasado. Como fase móvil se emplearon mezclas de hexano: AcOEt, con polaridad creciente, finalizando con acetona. Se colectaron fracciones de 400 mL las cuales fueron concentradas en un equipo de destilación a presión reducida. El residuo obtenido se colocó en frascos de 20 mL. Los eluatos obtenidos fueron analizados por cromatografía en capa delgada de acuerdo al siguiente procedimiento: en los cromatofolios se aplicó con un tubo capilar una muestra de cada una de las fracciones a 0.5 cm de distancia una de otra, las placas fueron eluidas en cámaras de vidrio con una fase móvil de polaridad ligeramente mayor a la empleada para eluir las fracciones de la columna. Una vez eluidas, las placas se revelaron con luz UV, se tomó registro de los resultados obtenidos,

posteriormente cada cromatoplaque se ahogó en una solución de sulfato cérico de amonio al 1% $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ en ácido sulfúrico a la cual se aplicó calentamiento, registrándose los resultados. Las fracciones colectadas se agruparon de acuerdo a su similitud cromatográfica. Este procedimiento permite la obtención de mezclas menos complejas, las cuales se someten a procesos cromatográficos adicionales. Al igual que en el fraccionamiento primario, los fraccionamientos posteriores se controlaron mediante el análisis de cromatografía en capa delgada, con el criterio de que una sola mancha homogénea que se desplaza en varios eluyentes, constituye una sustancia pura. De ser necesario las fracciones que muestren elevada complejidad se procesaran nuevamente por cromatografía en columna abierta, estos fraccionamientos secundarios se designarán adicional a una letra del alfabeto con el símbolo´, para fraccionamientos terciarios la letra del alfabeto y el símbolo´´.

5.6.1 Cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía en placa preparativa (CPP)

La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía en capa delgada y cromatografía en placa preparativa. Se colocaron cantidades de 20 mg en placa analítica y entre 50 – 200 mg en placa preparativa en una banda homogénea a 1.5 cm del borde. Las placas fueron eluidas con una fase móvil de polaridad ligeramente mayor a la empleada para eluir la fracción en la cromatografía en columna y fueron reveladas empleado lámpara de UV y sulfato cérico de amonio.

Las sustancias aisladas y purificadas se caracterizaron mediante su punto de fusión y su análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C , DEPT y bidimensionales (HSQC, HMBC, COSY y NOESY) y difracción de rayos x.

6. RESULTADOS

6.1 Fraccionamiento primario de *Sebastiania longicuspis*

Del fraccionamiento primario se obtuvieron 218 fracciones (Tablas 4,5), las fracciones obtenidas se agruparon en 11 fracciones mayores (A-K) de acuerdo a su similitud en CCD. El diagrama 2 muestra la secuencia general del fraccionamiento.

Tabla 4. Cambios de polaridad en la elución del fraccionamiento primario

Mezclas de elución (%)		Eluatos
hexano	100	1 – 6
	95:5	7 – 16
	90:10	17 – 27
	85:15	28 – 37
	80:20	38 – 61
	75:25	62 – 71
	70:30	72 – 77
	65:35	78 – 86
hexano – AcOEt	60:40	87 – 95
	55:45	96 – 105
	50:50	106 – 115
	45:55	116 – 132
	35:65	133 – 141
	30:70	142 – 154
	20:80	155 – 165
	10:90	166 – 175
AcOEt	100	176 – 178
acetona	100	179 – 206
acetona – MeOH	9:1	207 – 218

Tabla 5. Unión de Eluatos del fraccionamiento primario

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	2-10	11-12	13-18	19-20	21-22	23-30	31-36	37-99	100-183	184-218

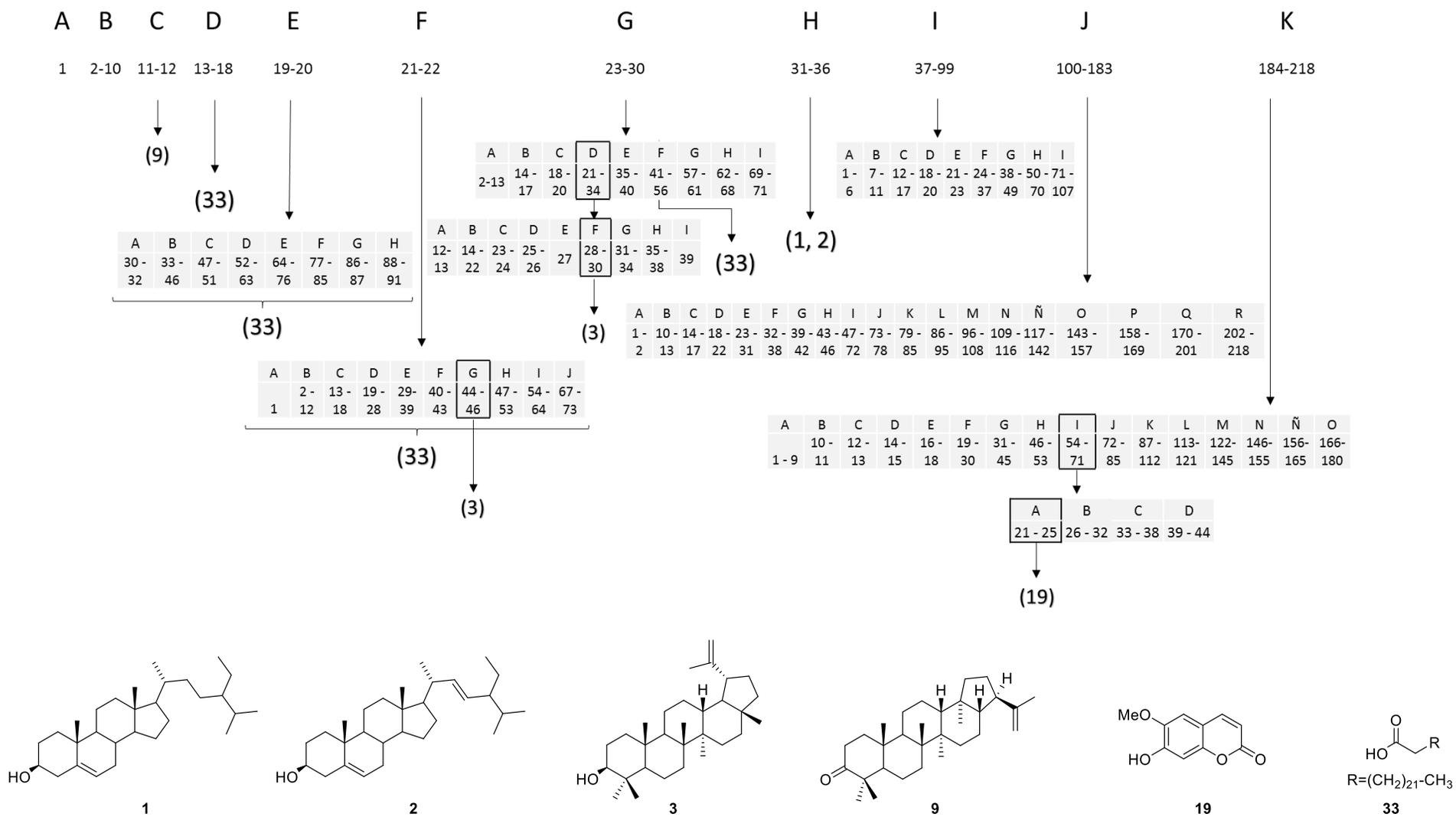


Diagrama 2. Fraccionamientos sucesivos del extracto CH₂Cl₂:CH₃OH de las ramas de *Sebastiania longispis*

6.2 Fracción C (11, 12)

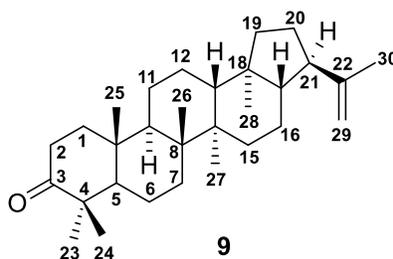
La fracción denominada como C obtenida del fraccionamiento primario (fracciones 11-12) se procesó por CCD con hex:AcOEt (95:5). Se consideró la presencia de un compuesto aislable ya que una mancha definida se separó de la mezcla compleja en la cromatoplaaca analítica, y se procedió a su separación empleando CPP. La aplicación inicial de la muestra es de 178.9 mg, la placa se eluyó empleando la polaridad de la separación por CCD, se obtuvieron dos franjas uniformes que se retiraron de la base de vidrio y fueron colocadas por separado en vasos de precipitados a las cuales se les adicionó disolvente acetona para la recuperación de las sustancias obteniendo en el primero 90.2 mg. Al observar una única mancha en CCD, se sometió a análisis espectroscópico y se concluye que se trata de moretenona **9**. Los resultados de los análisis (incluyendo los datos de RMN ^1H y ^{13}C) se muestran a continuación.

Sólido cristalino blanco con forma de agujas (moretenona)

p.f. 194 - 198 °C

R_f 0.325 (Hexano:AcOEt (95:5))

Cantidad 90.2 mg (0.065%)



RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 218.35 (C-3), 148.28 (C-22), 109.65 (C-29), 54.99 (C-5), 53.98 (C-17), 49.86 (C-9), 48.94 (C-13), 48.01 (C-21), 47.53 (C-4), 44.34 (C-18), 42.46 (C-14), 41.80 (C-8), 40.33 (C-19), 39.73 (C-1), 36.99 (C-10), 34.35 (C-2), 32.80 (C-7,15), 27.48 (C-20), 26.72 (C-23), 24.06 (C-12), 21.73 (C-11), 21.27 (C-24), 20.98 (C-16), 19.91 (C-6), 19.82 (C-30), 16.65 (C-26, 27), 15.93 (C-25), 15.32 (C-28).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4.68 (d, J = 5.9 Hz, 1H, H-29), 2.25 (ddd, J = 11.7, 10.2, 7.2 Hz, 1H, H-21), 0.95 (s, 2H, H-27), 0.93 (s, 2H, H-25), 0.69 (d, J = 1.1 Hz, 2H, H-28).

El segundo recuperado se analizó mediante CCD con diferentes eluyentes observando que se trata de una mezcla compleja.

6.3 Fracción D (13 – 18)

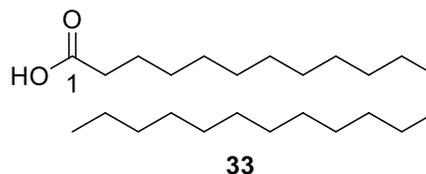
La fracción D (13 – 18) se sometió a una serie de procedimientos sucesivos de recristalización en una mezcla de hexano:acetona (1:9), posteriormente se analizó por CCD, se obtuvo un sólido que presentó una mancha uniforme por lo que se estimó que se encontraba libre de impurezas, se envió una muestra a RMN obteniendo los siguientes resultados.

Sólido blanco de apariencia mate
(Ácido lignocérico)

p.f. 66-70°C

R_f 0.700 (CH₂Cl₂:MeOH (9:1))

Cantidad 1327.5 mg (0.96%)



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 179.34, 34.06, 32.09, 29.86, 29.76, 29.60, 29.52, 29.40, 29.23, 24.86, 22.85, 14.26.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 2.37, 2.35, 2.32, 1.66, 1.64, 1.61, 0.90, 0.88, 0.86.

Cabe destacar que el mismo compuesto sólido se aisló en fracciones posteriores.

6.4 Proceso cromatográfico secundario de E (19, 20)

La fracción E (19 – 20) se analizó por CCD, observando que se trata de una mezcla de varias sustancias, por lo cual se realizó un fraccionamiento secundario en columna abierta empleando una columna de vidrio de 48 mm de diámetro, 390 mm de largo la cual fue empacada con 150 g de sílica gel en la cual se adsorbieron 1.94 g de extracto en 2.52 g de sílica. De este fraccionamiento se obtuvieron 91 eluatos agrupados en 8 bloques (Tablas 6 y 7) y se aisló e identificó a **33**.

Tabla 6. Elución de E y los cambios de polaridad de la fase móvil

Mezcla de elución %		Eluatos
Hexano	100	1 – 9
	99:1	10 – 29
	98:2	30 – 43
hexano:AcOEt	97:3	44 – 49
	96:4	50 – 66
	92:8	67 – 91

Tabla 7. Unión de eluatos del fraccionamiento de E

A	B	C	D	E	F	G	H
30 - 32	33 - 46	47 - 51	52 - 63	64 - 76	77 - 85	86 - 87	88 - 91

6.5 Fraccionamiento secundario F (21, 22)

El análisis por CCD de la fracción F (21 – 22) mostró que la mejor resolución era proporcionada por la mezcla de hexano:AcOEt, por lo que se empleó esta mezcla con gradientes crecientes de polaridad. La cromatografía en columna abierta se realizó en una columna de 50 mm de diámetro, 460 mm de largo la cual fue empacada con sílica gel (151.10 g), se adsorbió el extracto (2.82 g) en sílica gel (3.10 g), obteniendo de este fraccionamiento 73 residuos que a su vez se agruparon, como se muestra en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Proceso cromatográfico secundario de F

Mezcla de elución %		Eluatos
hexano	100	1 - 4
	98:2	5 - 12
	96:4	13 - 27
	94:6	28 - 38
hexano:AcOEt	92:8	39 - 42
	90:10	43 - 56
	88:12	57 - 65
	85:15	66 - 73

Tabla 9. Unión de los Eluatos del fraccionamiento secundario de F

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	2 - 12	13 - 18	19 - 28	29 - 39	40 - 43	44 - 46	47 - 53	54 - 64	67 - 73

Se analizaron por CCD las fracciones reunidas, y se encontró en la fracción G' (44 – 46) la presencia de una mancha definida de la cual es posible el aislamiento de un compuesto, por lo cual se comparó con sustancias de referencia representativas de la familia mediante CCD empleando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂:AcOEt (98:2), las sustancias de referencia son las siguientes: epitaraxerol, mezcla de estigmasterol y β-sitosterol, lupeol, 3β-taraxerol, encontrando similitud en el perfil cromatográfico de lupeol y 3β-taraxerol .

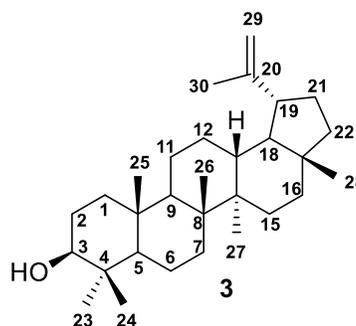
La elución de la fracción mostró en el análisis cromatográfico la presencia del ácido lignocérico, determinado por su comparación con una muestra autentica, por lo que se empleó acetona para separar la fracción más polar de la muestra, puesto que el ácido lignocérico es parcialmente soluble en hexano y no soluble en acetona fría, la separación fue seguida por CCD. Una vez separado el producto de interés se comprobó su ausencia en el sólido inicial y se ensayó con los gradientes hasta identificar la fase móvil de CH₂Cl₂:AcOEt (99:1) como aquella en la que los componentes de la muestra presentaron una mayor separación en la placa cromatográfica. A partir de estos resultados se realizó una CPP de la muestra obteniendo la separación de lupeol **3** como un sólido blanco cristalino con forma de escamas con un p.f de 209 – 214 °C y cuyo R_f es de 0.65 empleando CH₂Cl₂:AcOEt (99.5:0.5). La muestra se analizó RMN ¹H y ¹³C y se obtuvieron los siguientes resultados.

Sólido blanco cristalino (lupeol)

p.f. 209 – 214°C

R_f 0.65 (CH₂Cl₂: AcOEt (99.5:0.5))

Cantidad 38.2 mg (0.027%)



RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 151.12 (C-20), 109.47 (C-29), 79.19 (C-3), 55.49 (C-5), 50.64 (C-9), 48.50 (C-18), 48.16 (C-19), 43.18 (C-17), 43.02 (C-14), 41.03 (C-8), 40.18 (C-22), 39.04 (C-4), 38.90 (C-1), 38.25 (C-13), 37.36 (C-10), 35.77 (C-16), 34.48 (C-7), 30.04 (C-21), 28.16 (C-23), 27.63 (C-2), 27.60 (C-15), 25.35 (C-12), 21.12 (C-11), 19.48 (C-30), 18.50 (C-6), 18.18 (C-28), 16.24 (C-25), 16.16 (C-26), 15.53 (C-24), 14.73 (C-27).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 4.69 (s, 1H, H-29a), 4.57(s,1H, H-29b), δ 3.19 (dd, *J* = 10.8, 5.4 Hz, 1H, H-3), 2.36 (m, 1H, H-19), 1.68 (s, H-30), 1.61 (s, H-2), 1.39 (t, *J* = 8.4 Hz, 8H, H-1), 1.26 (s, H-21), 1.20 (s, 3H, H-22), 1.09 (s, 1H, H-12b), 1.03 (s, 4H, H-26), 0.97 (s, H-23) 0.95 (m, H-15b, s, H-27), 0.83 (s,1H, H-25), 0.79 (s, 1H, H-28), 0.76 (s, 1H, H-24), 0.69 (m, 1H, H-5)

6.6 Proceso cromatográfico secundario de G (23 – 30)

Se procedió con la fracción G (23 – 30), se observan manchas que pueden ser sustancias potencialmente aislables, por lo que se realizó el fraccionamiento secundario con un peso inicial de 3.3197 g de extracto adsorbido en 3.1 g de sílica

gel y fraccionado por cromatografía en columna abierta de 48 mm de diámetro y 390 mm de alto, la columna se empacó con 150.1 g de sílica gel, la fase móvil y los cambios en el gradiente de polaridad se realizaron utilizando una mezcla de hexano:AcOEt (Tabla 10, 11).

Tabla 10. Eluatos del fraccionamiento secundario de G

Mezcla de elución %		Eluatos
hexano	100	1 – 9
	95:5	10 – 19
	90:10	20 – 28
	88:12	29 - 31
	86:14	32 – 40
	84:16	41 – 43
hexano:AcOEt	82:18	44 – 51
	78:22	52 – 54
	70:30	55 – 63
	60:40	64 – 69
	50:50	70 – 73

Tabla 11. Agrupamiento de fracciones de G por similitud cromatográfica

A	B	C	D	E	F	G	H	I
2 - 13	14 – 17	18 – 20	21 – 34	35 – 40	41 – 56	57 – 61	62 – 68	69 - 71

El análisis por CCD de la fracción D' indicó la presencia de manchas homogéneas, por lo cual se decidió el fraccionamiento terciario. De este fraccionamiento secundario, también se trabajó la fracción F' (41 – 56), la cual se purificó obteniendo un sólido que coincide con el ácido lipídico **33**.

6.6.1 Cromatografía, proceso terciario de D' (21 – 34) proveniente de G (23 – 30)

El análisis cromatográfico de la fracción D' (proveniente del fraccionamiento secundario de G) indicó la presencia de una mezcla de sustancias aislables. Se procedió al análisis de esta fracción llevando a cabo una cromatografía en columna abierta (en una columna de vidrio de 48 mm de diámetro, 390 mm de largo), empacada con sílica gel (121.3g) en la cual se colocó el extracto (2.2341 g) adsorbido en sílica gel (2.3 g), y se procedió como se indica en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Eluatos obtenidos del proceso cromatográfico de D'

Disolvente	Concentración %	Eluatos
Hexano	100	1 – 4
	98:2	5 – 9
	96:4	10 – 20
hexano: AcOEt	95:5	21 – 25
	94:6	26 – 34
	80:20	35 – 43

Tabla 13. Agrupamiento de fracciones de D'

A	B	C	D	E	F	G	H	I
12 – 13	14 – 22	23 – 24	25 - 26	27	28 - 30	31 – 34	35 – 38	39

La fracción F'' (28 – 30) obtenida de esta cromatografía fue sometida a análisis por CCD incluyendo las muestras de referencia antes mencionadas, mostrando una sustancia con características similares a lupeol **3**. Se realizó la CPP de la mezcla (909.8 mg) de los cuales se tomó una parte alícuota (198.8 mg) para su separación empleando como fase móvil una mezcla de hexano: AcOEt (9:1). De esta separación se obtuvieron 33 mg de la sustancia pura, la interpretación de los

resultados obtenidos de ^1H y ^{13}C confirmaron la presencia de **3** la cual también fue aislada de F (21 – 22).

6.7 Fracción H (31 – 36)

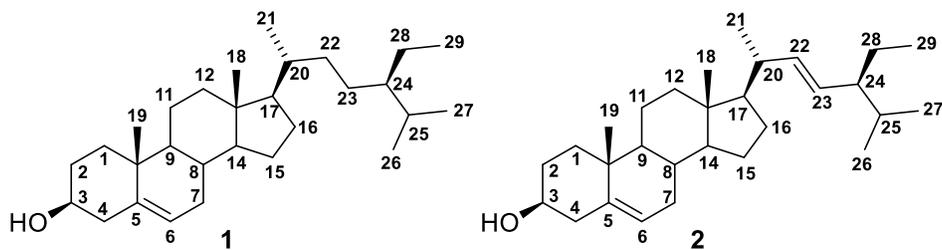
El aspecto físico de la fracción H sugirió la presencia de lípidos (consistencia grasosa), lo cual era consistente con el análisis por CCD donde fueron observables sustancias de menor polaridad. Los tratamientos (lavados) sucesivos de este residuo con cantidades mínimas de acetona permitieron la obtención de un sólido el cual resultó una mezcla de **1**, **2** en proporción 4:1, de acuerdo al análisis realizado por RMN ^1H y ^{13}C .

Sólido blanco cristalino (mezcla de β -sitosterol **1** y estigmasterol **2**)

p.f. 133 – 136 °C

R_f 0.425 (Hexano:AcOEt (80:20))

Cantidad 26.4 mg (0.019%)



Nota: Los valores de β -sitosterol se encuentran subrayados y los de estigmasterol identificados con el símbolo ”.

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 140.93 (C-5"), 138.46(C-22"), 129.45(C-23"), 121.87 (C-6"), 71.98 (C-3"), 57.04 (C-14"), 56.95 (C-14), 56.24 (C-17), 56.14 (C-17"), 51.41 (C-24"), 50.32 (C-9"), 46.02 (C-24), 42.49 (C-4), 42.39 (C-4", 13"), 40.64 (C-20"), 39.95 (C-12), 39.86 (C-12"), 37.43 (C-1"), 36.68 (C-10"), 36.31 (C-20), 34.13 C-22), 32.08 (C-7", 8",25"), 31.85 (C-2"), 29.35 (C-25), 29.07 (C-16"), 28.41 (C-16), 26.28 (C-23), 25.56 (C-28"), 24.53 (C-15"), 24.47 (C-15), 23.25 (C-28), 21.38 (C-26"), 21.26 (C-21", 11"), 19.97 (C-26), 19.56 (C-19") 19.21 (C-27), 19.15 (C-27"), 18.95 (C-21), 12.40 (C-29), 12.21 (C-18"), 12.15 (C-18), 12.03 (C-29).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 5.35 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H-6"), 5.16 (dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, H-23"), 5.02 (dd, $J = 15.1, 8.3$ Hz, H-22"), 3.58 – 3.46 (ddd, 2H).

Mediante el procedimiento descrito se logró el aislamiento de un sólido blanco amorfo de apariencia mate cuyo análisis mostró que se trataba del ácido lipídico **33**.

6.8 Cromatografía, proceso secundario de I (37 – 99)

El análisis por CCD de la fracción I (37 – 99) indicó la presencia de varias manchas homogéneas, por lo que se realizó un fraccionamiento secundario empleando cromatografía por gravedad (columna abierta). Se empleó una columna de vidrio de 100 mm de diámetro y 500 mm de largo la cual se empacó con 510 g de sílica gel, el residuo (25.49 g) fue adsorbido en sílica gel (27.40 g). De esta separación se obtuvieron 105 fracciones (Tabla 14, 15).

Tabla 14. Eluatos del fraccionamiento secundario de I

Disolventes	Concentración %	Eluatos
Hexano	100	1 – 6
	90:10	7 – 23
	80:20	24 – 68
	70:30	69 – 74
	60:40	75 – 81
	50:50	82 – 87
hexano:AcOEt	40:60	88 – 94
	Acetona	95 – 105

Tabla 15. Agrupamiento de las fracciones obtenidas de I

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1 – 6	7 – 11	12 - 21	22 - 23	24 - 42	43 - 54	55 – 75	76 - 96	97 – 107

Del procesamiento de estos eluatos no fue posible el aislamiento y caracterización de sustancias.

6.9 Cromatografía, proceso secundario de J (100 – 183)

El análisis por CCD de este residuo indicó la presencia de sustancias aislables, por lo que se realizó el fraccionamiento secundario por CCA en una columna de vidrio de 100 mm de diámetro y 500 mm de largo empacada con sílica gel (604.2 g), el residuo (28.3 g) fue adsorbido en sílica gel (29.5 g) (Tabla 16, 17).

Tabla 16. Eluatos del fraccionamiento de J

Disolvente	Concentración %	Eluatos
hexano	100	1 – 5
	95:5	6 – 16
	90:10	17 – 35
	85:15	36 – 45
	80:20	46 – 61
	75:25	62 – 74
	hexano – AcOEt	70:30
	60:40	103 – 113
	50:50	114 – 134
	40:60	135 – 152
	30:70	153 – 172
	20:80	173 – 191
acetona	100	192 – 213

Tabla 17. Agrupamiento de fracciones del proceso cromatográfico de J

Agrupamiento de fracciones	Eluatos	Agrupamiento de fracciones	Eluatos
A	1 – 2	K	79 – 85
B	10 – 13	L	86 – 95
C	14 – 17	M	96 – 108
D	18 – 22	N	109 – 116
E	23 – 31	Ñ	117 – 142
F	32 – 38	O	143 – 157
G	39 – 42	P	158 – 169
H	43 – 46	Q	170 – 201
I	47 – 72	R	201 – 218
J	73 – 78		

De este fraccionamiento se observó una mezcla (fracción O´ 143 – 157), por lo que se decide su separación en componentes menos complejos por CCA empacada con gel dextrano (Sephadex®) y CPP. La resolución de la mezcla no

pudo ser realizada debido a que esta era muy lábil, por lo tanto no se obtuvieron resultados concluyentes.

6.10 Cromatografía, proceso secundario de K (184 – 218)

La última fracción obtenida del fraccionamiento primario fue K (184 – 218), la cual por la complejidad que se observó en el monitoreo inicial por CCD, se decidió el montaje de un fraccionamiento secundario en una columna de vidrio de 90 mm de diámetro, 500 mm de largo empacada con sílica gel (452.40 g), el residuo (44.53 g) fue adsorbido en sílica gel (44.50 g), de esta mezcla compleja se obtuvieron 180 eluatos (Tabla 18, 19).

Tabla 18. Eluatos del fraccionamiento K

Disolventes	Concentración %	Eluatos
hexano	100	1 – 5
	95:5	6 – 11
	90:10	12 – 24
	85:15	25 – 34
	80:20	35 – 42
	70:30	43 – 59
hexano:AcOEt	60 :40	60 – 76
	50:50	77 – 99
	40:60	100 - 115
	30:70	116 - 126
	20:80	127 - 142
acetona	10:90	143 - 169
	100	170 - 180

Tabla 19. Agrupamiento de fracciones del fraccionamiento de K

Agrupamiento de fracciones	Eluatos	Agrupamiento de fracciones	Eluatos
A	1 -9	I	54 - 71
B	10 -11	J	72 - 85
C	12 – 13	K	87 – 112
D	14 – 15	L	113 – 121
E	16 – 18	M	122 – 145
F	19 – 30	N	146 – 155
G	31 – 45	Ñ	156 – 165
H	46 – 53	O	166 – 180

De este fraccionamiento se observó una sustancia de aislable en la fracción I' (54 – 71) que al revelar la cromatoplaque con $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$ en ácido sulfúrico la mancha se torna en un color negro, y al aplicar temperatura, se torna amarillo intenso. Para la purificación de este compuesto se realizó un ensayo por CCD usando $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ como fase móvil, la cual permitió obtener una mejor resolución en la separación de los componentes, esta fase móvil se emplea en el fraccionamiento terciario el cual nos proporciona los siguientes resultados.

6.10.1 Fraccionamiento terciario I' (54 – 71) proveniente de K (184 – 218)

El fraccionamiento es realizado en una columna de vidrio de 30 mm de diámetro y 230 mm de largo empacada con sílica gel (30.3 g), el residuo (0.60 g) es adsorbido en sílica gel (0.80 g) (Tabla 20, 21).

Tabla 20. Fraccionamiento terciario de I'

Disolventes	Concentración %	Eluatos
CH ₂ Cl ₂	100	1 – 10
	99:1	11 – 20
CH ₂ Cl ₂ :MeOH	98:2	21 – 37
	97:3	38 – 44

Tabla 21. Agrupamiento de I' por similitud en sus perfiles cromatográficos

A	B	C	D
21 – 25	26 – 27	28 – 35	36 - 44

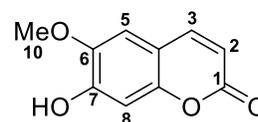
La fracción A'' es la que presenta el producto de la apariencia antes descrita, a dicha fracción se le somete a una CCD para eliminar impurezas obteniendo el compuesto **19**.

Sólido amarillo cristalino en forma de agujas (escopoletina)

p.f. 205 - 209 °C

R_f 0.425 (CH₂Cl₂:MeOH (99:1))

Cantidad 8.4 mg (0.0065%)



19

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃) δ 161.56 (C-1), 150.43 (C-9), 149.86 (C-7), 144.17 (C-6), 143.42 (C-3), 113.57 (C-2), 111.65 (C-4), 107.66 (C-5), 103.35 (C-8), 56.57 (C-10).

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-3), 6.92 (H-8), 6.84 (H-5), 6.26 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-2), 3.95 (H-10).

Tabla 22. Datos de difracción de rayos X de **19**

Grupo espacial	P-1	Celda unitaria	a 7.614(4)	b 8.800 (6)	c 6.984 (2)
Grupo espacial No	2	(Å, °)	α 88.96 (4)	β 99.36 (4)	γ 70.03 (5)
Índice R (%)	5.1 0	Temperatura (k)	295	Densidad (g/cm ³)	1.475

Esta substancia fue sometida a análisis por difracción de rayos x, confirmándose la estructura propuesta (Tabla 22).

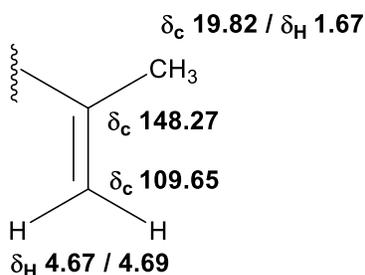
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los detalles de los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo para el aislamiento de las sustancias se informan en la sección de metodología. En esta sección se describe el análisis de datos físicos y espectroscópicos que permitieron la elucidación de las estructuras moleculares. En las fracciones A y B (ver diagrama 2, p.24) se encuentran ceras.

7.1 Determinación estructural de 3-oxo-21 α H-hop-22(29)-eno (moretenona) (9), aislada de la fracción C (11, 12)

A partir de esta fracción se obtiene un sólido blanco cristalino que fue analizado por RMN. El espectro totalmente desacoplado de RMN ^{13}C (Espectro 1, Tabla 23) de esta sustancia mostró 29 señales, lo cual sugería que se trataba de un triterpeno donde probablemente alguna señal se encontraba superpuesta. Esta hipótesis estructural está de acuerdo con el perfil del espectro de RMN ^1H , donde se puede deducir la presencia de 7 metilos en la zona de δ_{H} 0.69 – 1.07, la mayor parte de las señales se encuentran a campo alto. La señal en δ_{C} 218.35 es asignable a un carbonilo de cetona (en la literatura se reporta que los carbonilos de cetona resuenan en δ_{C} 195 – 220). Otras señales interpretables de los espectros de RMN ^{13}C y ^1H permitieron establecer la presencia de un metileno vinílico disustituido geminalmente, donde uno de los sustituyentes es un metilo.

Las asignaciones espectroscópicas que sustentan la presencia de este fragmento estructural son las siguientes:



La búsqueda de la similitud de los valores de RMN ¹³C obtenidos con los informes en la literatura para sustancias triterpénicas que incorporan en su estructura al fragmento vinílico *gem*-disustituido y un carbonilo de cetona, permitió identificar que 28 de los 29 valores correspondían a un triterpeno similar a la moretenona.

En el análisis de los espectros de RMN en las modalidades DEPT 90 y DEPT 135 (Espectros 3-5) se deduce la presencia de 7 metilos, 11 metilenos, 5 metinos y 7 carbonos cuaternarios, determinados por la ausencia de señales en DEPT 135 comparadas con ¹³C.

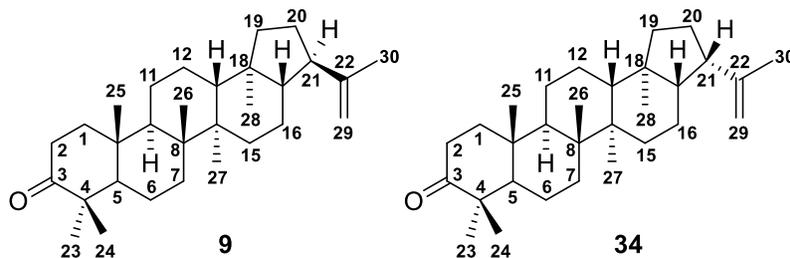
Los resultados de RMN de ¹³C proporcionan 29 señales observando que en δ 29.85 se encontró una señal que no corresponde a la molécula de moretenona observada en DEPT 135 como una señal de metileno, la cual fue indicativo de la presencia de un contaminante. Esto se confirmó al comparar el espectro de RMN ¹³C de **9** con el de la muestra residual, en el cual se identifica a esta señal de elevada intensidad presente en el contaminante.

Tabla 23. Datos de RMN ^{13}C de **9** (75 MHz, δ)

Número de Carbono	Referencia [45] <i>epi-moretenona</i>	Referencia [44] 75 MHz	Referencia [45] 100 MHz	Referencia [46]	Resultado experimental
1	39.60	39.57	39.60	39.57	39.73
2	34.20	34.15	34.20	34.19	34.35
3	218.20	217.88	217.90	218.14	218.35
4	47.40	47.40	47.40	47.37	47.53
5	54.90	54.86	54.90	54.85	54.99
6	19.70	19.76	19.80	19.74	19.91
7	33.70	32.67	32.70	32.58	32.80
8	41.60	41.60	41.60	41.64	41.80
9	49.60	49.73	49.70	49.70	49.86
10	36.80	36.80	36.80	36.82	36.99
11	21.60	21.59	21.60	21.54	21.73
12	23.90	23.92	23.90	23.92	24.06
13	49.60	48.83	48.80	48.71	48.94
14	42.10	42.32	42.30	42.31	42.46
15	32.60	32.67	32.70	32.61	32.80
16	21.60	20.83	20.80	20.83	20.98
17	54.90	53.87	53.90	53.82	53.98
18	44.70	44.18	44.20	44.20	44.34
19	41.90	40.19	40.20	40.17	40.33
20	27.30	27.33	27.80	27.32	27.48
21	46.40	47.85	47.90	47.86	48.01
22	148.60	147.97	148.00	148.09	148.27
23	26.60	26.58	26.60	26.58	26.72
24	21.10	21.10	21.10	21.13	21.27
25	15.70	15.74	15.70	15.78	15.93
26	16.40	16.50	16.50	16.48	16.65
27	16.60	16.50	16.50	16.51	16.65
28	16.10	15.17	15.20	15.17	15.32
29	110.10	109.50	109.50	109.56	109.65
30	25.00	19.67	19.70	19.66	19.82

Se comparan los valores de moretenona **9** con los de epi-moretenona **34** y se enmarcan aquellos carbonos en los que el valor de δ_c presenta un Δ cercano ó mayor a 1.

La molécula de moretenona (3-oxo-21 α -H-hop-22(29)-eno) está constituida de 30 átomos de carbono, sin embargo, en el espectro de RMN de ^{13}C se observan 28 señales debido a que el desplazamiento en δ_c 32.8 ppm corresponde a los carbonos 7 y 15, situación que se repite con la señal en δ_c 16.65 ppm que corresponden a los carbonos 26 y 27, esto debido a que las interacciones con los carbonos vecinos dan lugar al mismo valor en su desplazamiento químico, es así que obtenemos los valores de las señales de los 30 átomos de carbono que conforman la molécula.



La tabla 24 presenta comparativamente las asignaciones de RMN ^1H (Espectro 2) informadas en la literatura con los obtenidos experimentalmente. La similitud de los valores (considerando las variaciones experimentales) permite confirmar que se trata de la misma substancia.

Tabla 24. Datos de RMN ^1H de **9** (300 MHz, δ)

# de carbono	Referencia [44]	Referencia [46]	Referencia [47] 200 MHz	Experimental
21		2.25		2.25
23	1.05	1.08	1.08	1.07
24	0.93	1.03	1.03	1.023
25	1	0.93	0.93	0.93
26	1	1.02	1.02	1.16
27	0.91	0.95	0.95	0.95
28	0.67	0.69	0.69	0.69
29	4.65/4.67	4.68 / 4.70	4.68/ 4.70	4.67/ 4.69
30	1.65	1.68	1.68	1.67

La similitud del rango experimental del punto de fusión obtenido para la muestra de *S. longicuspis* 196 – 197°C con el informado en la literatura (196 – 198 °C [48]) confirma la identidad de la sustancia.

El análisis del experimento NOESY (Figura 5) permitió identificar las interacciones entre los protones a través del espacio (Espectro 6), y lo cual permitió confirmar las asignaciones.

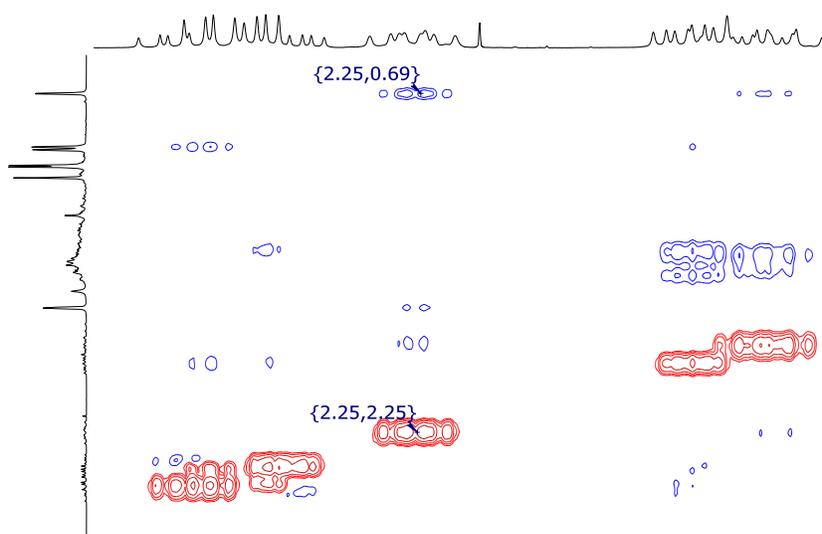


Figura 5. Experimento NOESY de **9**

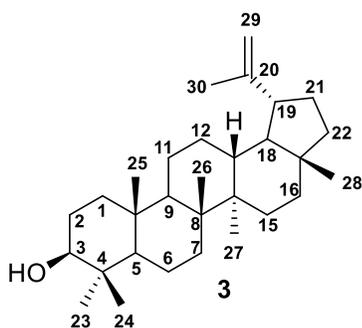
7.2 Determinación estructural del ácido lignocérico (33), aislado de la fracción D (13 – 18)

El espectro de RMN de ^{13}C de esta sustancia (Espectro 7) muestra una señal en δ_{C} 179.34, la cual es consistente con la presencia de un carbonilo de ácido carboxílico (las cuales aparecen en δ_{C} 170 – 185). El ácido lignocérico solo debe mostrar la señal del carbonilo, metilenos y un metilo, por lo que se analiza por el experimento DEPT 135 (Espectro 9) observando la presencia de estas señales. La señal para el metilo aparece en δ_{C} 14.27, concordando con lo esperado para el ácido lignocérico. Es también observable una señal intensa en δ_{C} 29.86. A pesar de que las señales no son acumulativas para carbono, observamos una señal de gran intensidad en δ 29.86 el cual indica la presencia de numerosos metilenos en la molécula. Por otro lado el ^1H (Espectro 8) mostró la señal correspondiente a un metileno en δ_{H} 2.35 equivalente a 2 H, otro en δ_{H} 1.6 para 2H más, la señal en δ_{H} 1.26 integra para 40 H, y la señal en δ_{H} 0.88 intensa para 3 H. La integral total explica la presencia de 47 H, sin embargo, se conoce que la molécula de ácido lignocérico tiene una fórmula molecular de $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$, el H faltante es del ácido carboxílico esperado en δ_{H} 10 – 13 y no se resuelve debido a que el análisis no se continuo a campo más bajo. El punto de fusión 69 - 73°C es menor al reportado (84°C [49]), por lo que el abatimiento del p.f probablemente puede deberse a la presencia de contaminantes en la muestra.

7.3 Determinación estructural del lupeol (3), aislado de G' (44 – 46) y F'' (21 - 22)

Tabla 25. Datos de RMN ¹³C de 3 (75 MHz, δ)

Se obtuvo un sólido blanco en forma de escamas color blanco mate de p.f 209 - 214°C, dato que concuerda con el reportado en la literatura para el lupeol (209 - 215°C) [50].



El espectro de RMN ¹³C (Espectro 10) muestra 30 señales principales y algunas señales pequeñas adicionales atribuibles a impurezas. La Tabla 25 enlista las asignaciones comparadas con las informadas en la literatura.

Se emplea el experimento DEPT 90 y 135, los cuales permitieron ubicar los 6 metinos, 10 metilenos, 8 metilos y 6 carbonos cuaternarios correspondientes al lupeol (Espectro 12-14).

El desplazamiento observado a δ 79.19 ppm corresponde al carbono 3 unido a un grupo hidroxilo. Otras señales características son correspondientes al grupo

# de carbono	Referencia	
	[50] 100 MHz	Experimental
1	38.70	38.90
2	27.50	27.63
3	79.30	79.19
4	39.80	39.04
5	55.50	55.49
6	19.00	18.50
7	34.20	34.48
8	41.10	41.03
9	50.90	50.64
10	37.20	37.36
11	21.20	21.12
12	25.30	25.35
13	38.50	38.25
14	42.80	43.02
15	27.20	27.60
16	35.90	35.77
17	43.20	43.18
18	48.50	48.50
19	47.80	48.16
20	151.20	151.12
21	30.10	30.04
22	40.30	40.18
23	28.40	28.16
24	15.60	15.53
25	16.20	16.24
26	16.10	16.16
27	14.80	14.73
28	18.10	18.18
29	109.50	109.47
30	19.80	19.48

vinílico observadas claramente δ_c 151.12 y δ_c 109.47 correspondientes a los carbonos 20 y 29. Los datos de RMN ^1H (Espectro 11) muestra valores concordantes con los reportados en la literatura (Tabla 26) lo que confirma la presencia de lupeol.

Tabla 26. Datos de RMN ^1H de **3** (300 MHz, δ)

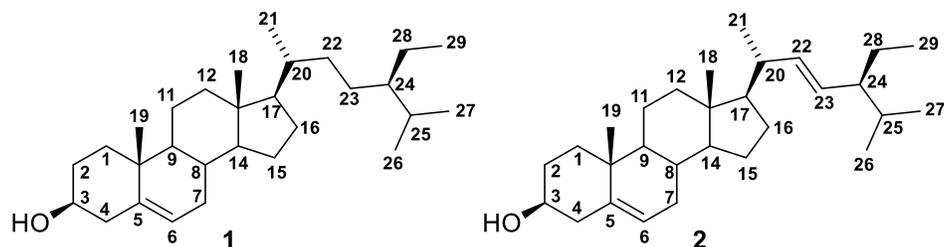
Hidrógeno	Referencia [50] 400MHz	Experimental
2	1.61	1.61
3	3.18	3.19
18	1.39	1.39
19	2.38	2.36
21	1.27	1.26
22	1.19	1.20
23	0.97	0.97
24	0.77	0.76
25	0.84	0.83
26	1.04	1.03
27	0.96	0.95
28	0.80	0.79
29	4.68a/4.56 b	4.69a/4.57b
30	1.70	1.68

7.4 Determinación estructural de β -sitosterol (1) y estigmasterol (2) de la fracción H (31 – 36)

El análisis de este sólido blanco se realizó empleando la técnica de RMN de ^{13}C la cual mostró 42 señales (Espectro 15). La mezcla de β -sitosterol y estigmasterol suman 58 carbonos, sin embargo, es reportado en la literatura que estas dos substancias tienen señales en común (Tabla 27), que resuenan en el mismo desplazamiento químico. Se observan 11 señales compartidas, a continuación se indican los carbonos que presentan el mismo valor de δ_c : 37.43 (C-1"), 31.85 (C-2"), 71.98 (C-3"), 140.93 (C-5"), 121.87 (C-6"), 32.08 (C-7"",C-8"", C-

25”), 50.32 (C-9”), 36.68 (C-10”), 21.26 (C-11”, C-21”), 42.39 (C-13”, C-4”), 19.56 (C-19”).

Se analizan a la par los experimentos DEPT 90 y 135 confirmando la presencia de las 42 señales (Espectro 17-19).



En el espectro de RMN ^1H (Espectro 16, Tabla 28) se observan cuatro señales características, la señal observada en δ_{H} 3.52 (Figura 6) corresponde al carbono 3 enlazado al grupo hidroxilo, se observa un *ddd*.

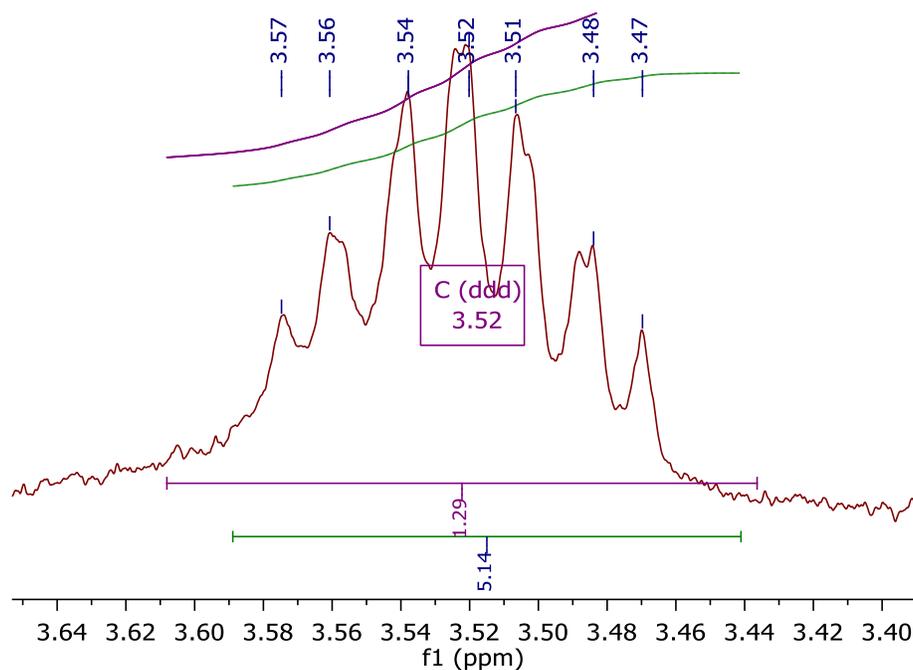


Figura 6. Señal del protón enlazado al grupo hidroxilo

Las señales centradas en δ_H 5.02 y δ 5.16 (Figura 7) corresponden a las señales del estigmasterol ya que en este se encuentran los carbonos vinílicos en C-22 y C-23.

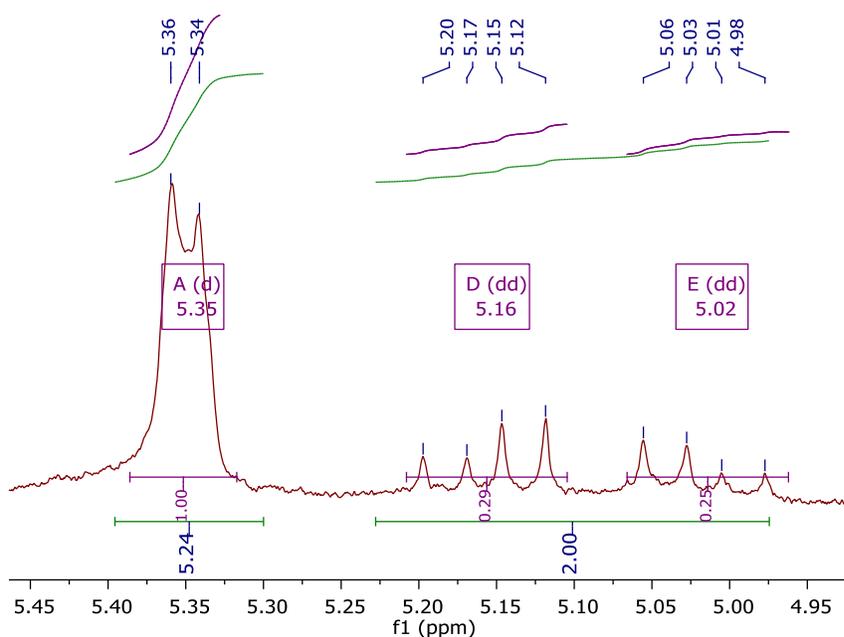


Figura 7. Señales características de la mezcla de β -sitosterol-estigmasterol

La señal del H-6 centrada en δ_H 5.35 es característica de un protón olefínico característico de los compuestos de tipo esterol (Figura 7). El análisis de las integrales en el espectro de RMN 1H nos permiten determinar una relación 4:1 (β -sitosterol: estigmasterol).

Tabla 27. Datos de RMN ^{13}C de **1, 2** (75 MHz, δ)

# DE CARBONO	Referencia [51] 125 MHz		Experimental	
	β -sitosterol	estigmasterol	β -sitosterol	Estigmasterol
1		37.22		37.43
2		31.63		31.85
3		71.80		71.98
4	42.19		42.26	42.49
5		140.72		140.93
6		121.71		121.87
7		31.87		32.08
8		31.87		32.08
9		50.10		50.32
10		36.48		36.68
11		21.07		21.26
12	39.74		39.66	39.95
13		42.26		42.39
14	56.73		56.85	56.95
15	24.29		24.34	24.47
16	28.22		28.91	28.41
17	56.02		55.93	56.24
18	11.84		12.03	12.15
19		19.39		19.56
20	36.12		40.48	36.31
21	18.76		21.07	18.95
22	33.91		138.31	34.13
23	26.02		129.25	26.28
24	45.81		51.22	46.02
25	29.11		31.87	29.35
26	19.80		21.20	19.97
27	19.01		18.96	19.21
28	23.04		25.39	23.25
29	11.97		12.23	12.03

Tabla 28. Datos de RMN ^1H de **1, 2** (300 MHz, δ)

Hidrógeno	Teórico [51] 500 MHz		Experimental ppm	
	sitosterol	estigmasterol	sitosterol	Estigmasterol
6	5.36 (d, J= 4.8 Hz)		5.35 (d, J= 5.5 Hz)	
		5.03 (dd, J=15.2,8.4 Hz)		5.02 (dd, J= 15.1, 8.3 Hz)
22		5.17 (dd, J=15.2, 8.4Hz)		5.16 (dd, J15.2, 8.4 Hz)

El punto de fusión depende de las propiedades relativas de los componentes de la mezcla, en la literatura el p.f. reportado para la mezcla es de 134 – 136°C [53], el obtenido experimentalmente es de 133 – 136 °C

7.5 Escopoletina (19) aislada de la fracción A'' (21 – 25)

El análisis de RMN ^{13}C (Espectros 20,22/ Tabla 29) muestra la presencia de 10 señales, por lo que en un inicio se pensó en un monoterpeno, sin embargo, al analizar los resultados se observó que las señales presentaban similitud con los compuestos de tipo cumarina. Los datos se analizan mediante los experimentos HSQC, HMBC, COSY y NOESY (Espectros 23 – 26) encontrando las relaciones entre H-C (Tabla 30 – 33), se compara contra la literatura los resultados y se encuentra concordancia (considerando las variaciones experimentales) en RMN ^{13}C [54-58] con la cumarina escopoletina (Tabla 29), las correlaciones confirman que se trata de esta sustancia. Se observa una señal en δ_{C} 56.57 característico del grupo éter donde se encuentra el rango de δ_{C} 50 – 90, las señales a excepción de la antes mencionada se encuentran desplazadas a campo bajo. Las señales de ^1H (Espectro 21) se correlacionan a cada carbono por experimento HSQC (Espectro 23).

La similitud en el intervalo del punto de fusión 205 – 207°C con el reportado en la literatura (200 - 207°C [58]) indica que se trata de la sustancia escopoletina **19**.

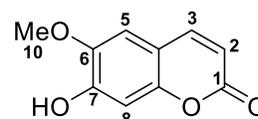
El análisis por difracción de rayos X, confirmó que el compuesto aislado es la escopoletina.

Tabla 29. Datos de RMN ^{13}C de **19** (125 MHz, δ)

<i># de carbono</i>	Referencia [54] Acetona- d_6	Experimental CDCl_3
1	160.80	161.56
2	113.30	113.57
3	144.70	143.42
4	112.10	111.65
5	109.90	107.66
6	146.00	144.17
7	151.90	149.86
8	103.70	103.35
9	151.20	150.43
10	56.70	56.57

Tabla 30. Correlaciones HSQC de **19**

HSQC	
H	C
7.57	143.42 C-3
6.26	113.57 C-2
6.85	107.66 C-5
6.92	103.35 C-8
3.95	56.57 C-10

**19****Tabla 31.** Correlaciones NOESY y COSY de **19**

NOESY		COSY	
H	Correlaciona con H	H	Correlaciona con H
7.57 C-3	6.85 C-5 6.26 C-2	7.57 C-3	6.26 C-2
6.85 C-5	7.57 C-3 3.95 C-10	6.26 C-2	7.57 C-3
6.92 C-8	-		

Tabla 32. Correlaciones HMBC de **19**

HMBC	
H	C
7.57 C-3	161.56 C-1
6.26 C-2	
7.57 C-3	150.43 C-9
6.92 C-8	
6.85 C-5	
6.85 C-5	143.42 C-3
6.92 C-8	
3.95 C-10	144.17 C-6
6.92 C-8	111.65 C-4
6.26 C-2	
7.57 C-3	107.66 C-5
6.85 C-5	103.35 C-8

Tabla 33. Datos de RMN ^1H de **19** (500 MHz, δ)

# de carbono	Referencia [54] Acetona- d_6	Experimental CDCl_3
2	6.25 (J= 9.75)	6.26 (J= 9.47)
3	7.84 (J=9.75)	7.57 (J= 9.44)
5	7.19	6.85
8	6.79	6.92
10	3.90	3.95

8. CONCLUSIONES

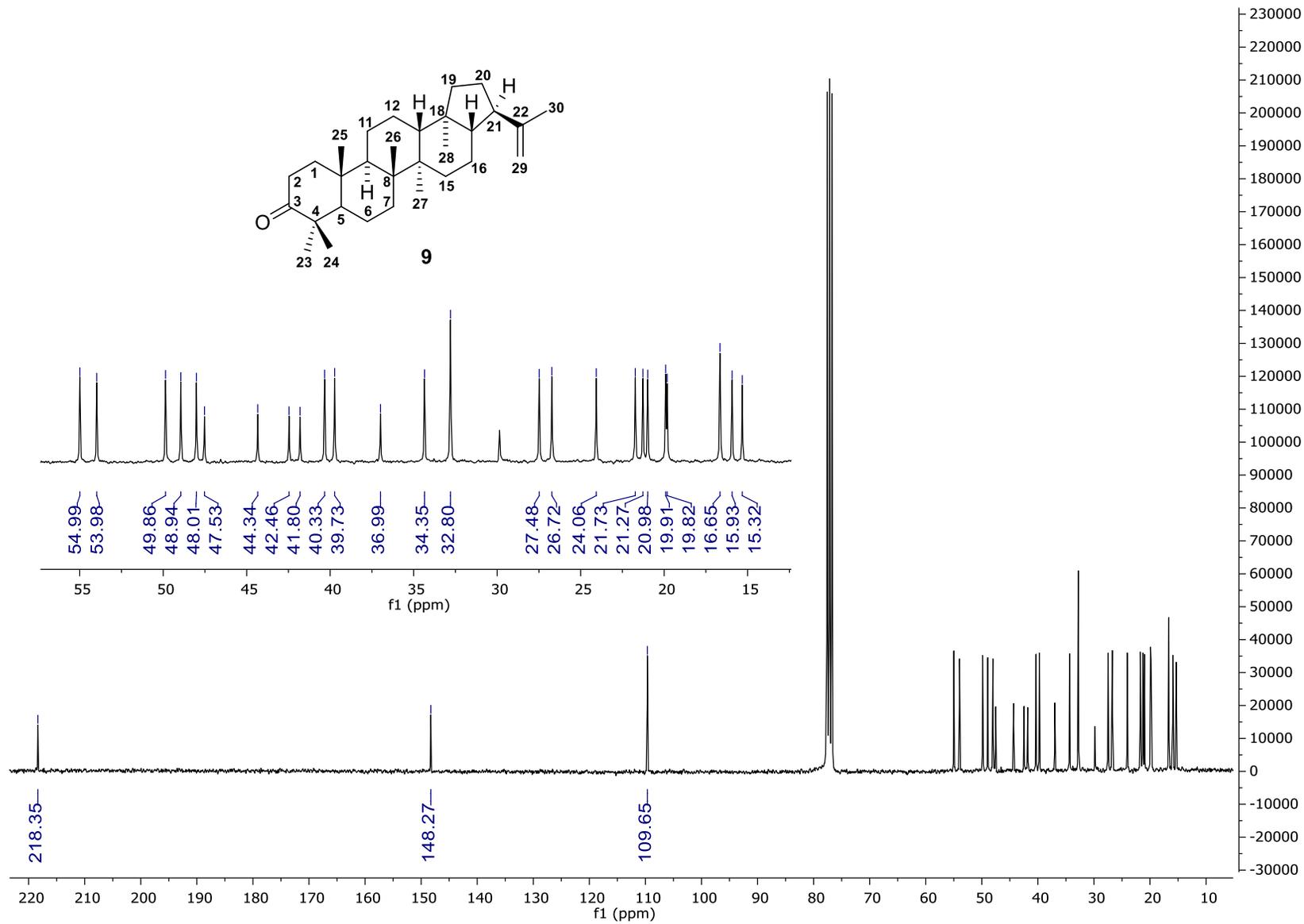
El estudio químico de las ramas de *Sebastiania longicuspis* permitió aislar, purificar y caracterizar una serie de compuestos que inciden dentro de las sustancias reportadas para la especie. En este estudio se aislaron compuestos de tipo triterpeno como el lupeol **3**, la moretenona **9**, esteroides como β -sitosterol **1** y estigmasterol **2**, de tipo cumarina como escopoletina **19** y el ácido lignocérico **33**. Las sustancias fueron aisladas en cantidades relativamente bajas (inferiores al 1% con respecto al peso del extracto). Las sustancias aisladas (a excepción del ácido lignocérico) poseen diversas actividades biológicas, las cuales han sido previamente estudiadas, por lo que esta especie es fuente de sustancias de interés terapéutico.

El aislamiento y caracterización estructural de los Productos Naturales presentes en *S. longicuspis* constituye una aportación original al conocimiento científico de la flora de nuestro país.

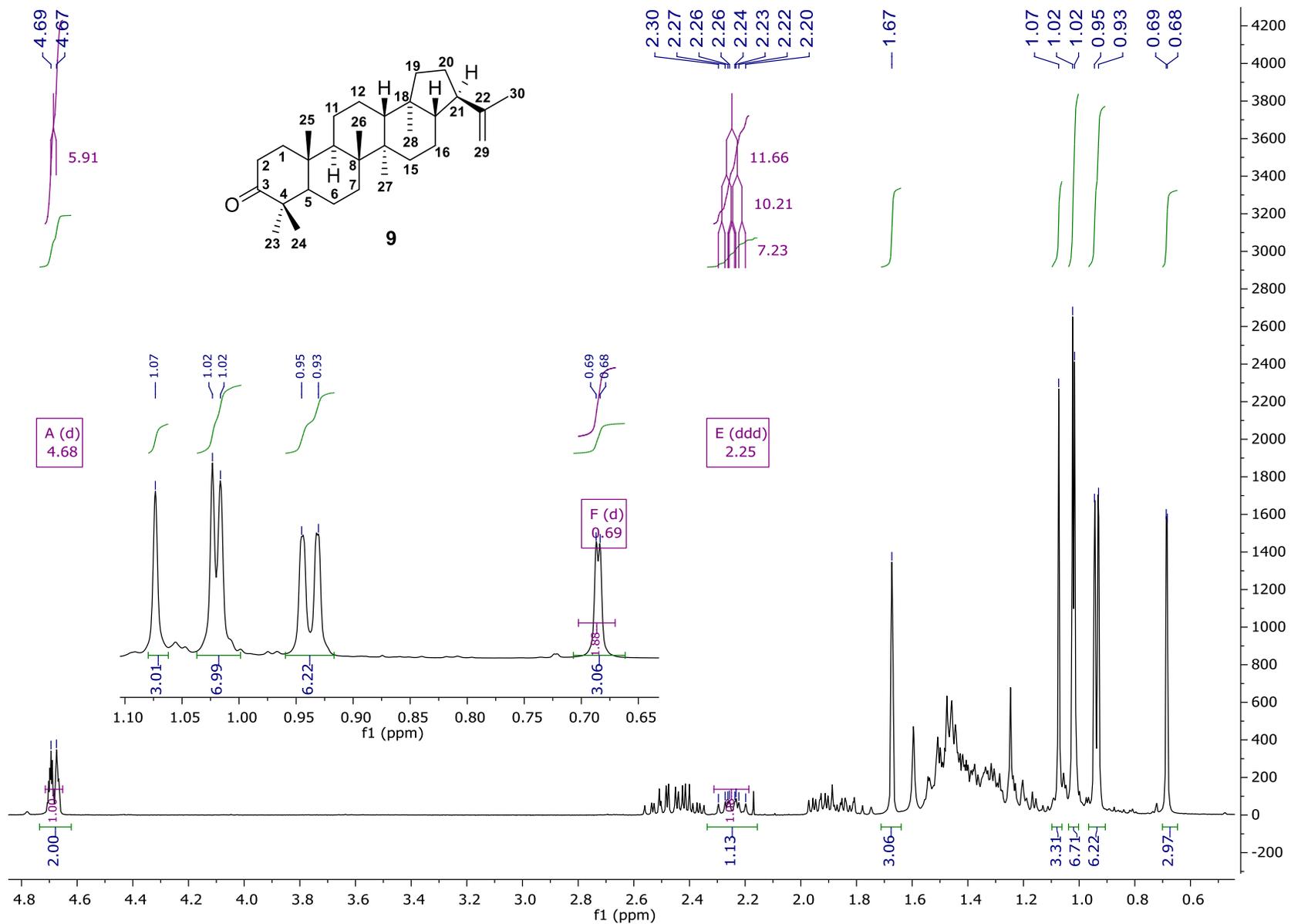
9. RECOMENDACIONES

Considerando la cantidad limitada de Productos Naturales aislados en el material analizado y la presencia de sustancias muy minoritarias y lábiles, es recomendable coleccionar mayor cantidad de material vegetal para su estudio químico, con el fin de lograr el aislamiento de cantidades manejables y analizables por métodos espectroscópicos, y eventualmente, generar la posibilidad de estudios biológicos.

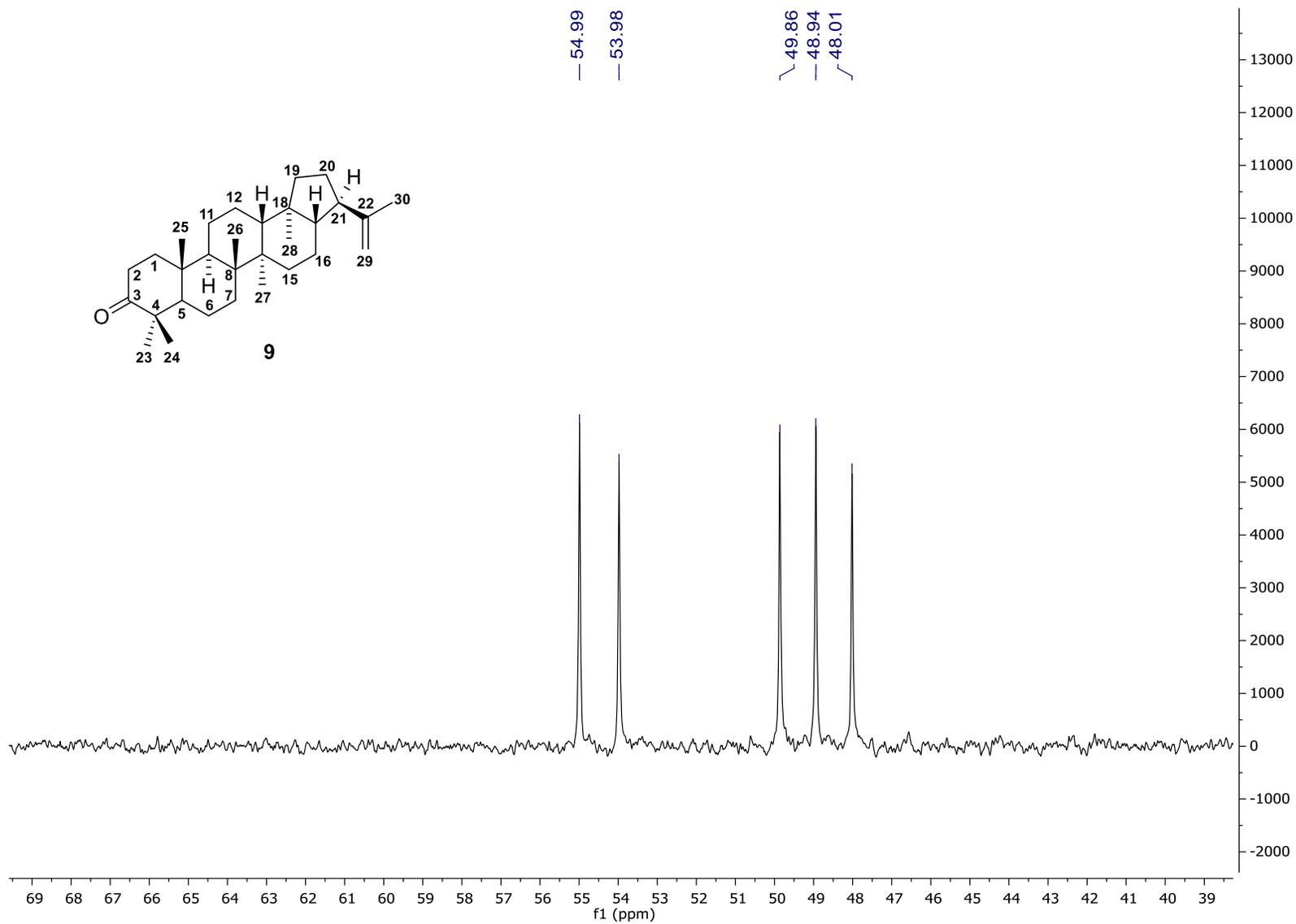
10. ANEXO. ESPECTROS DE RMN



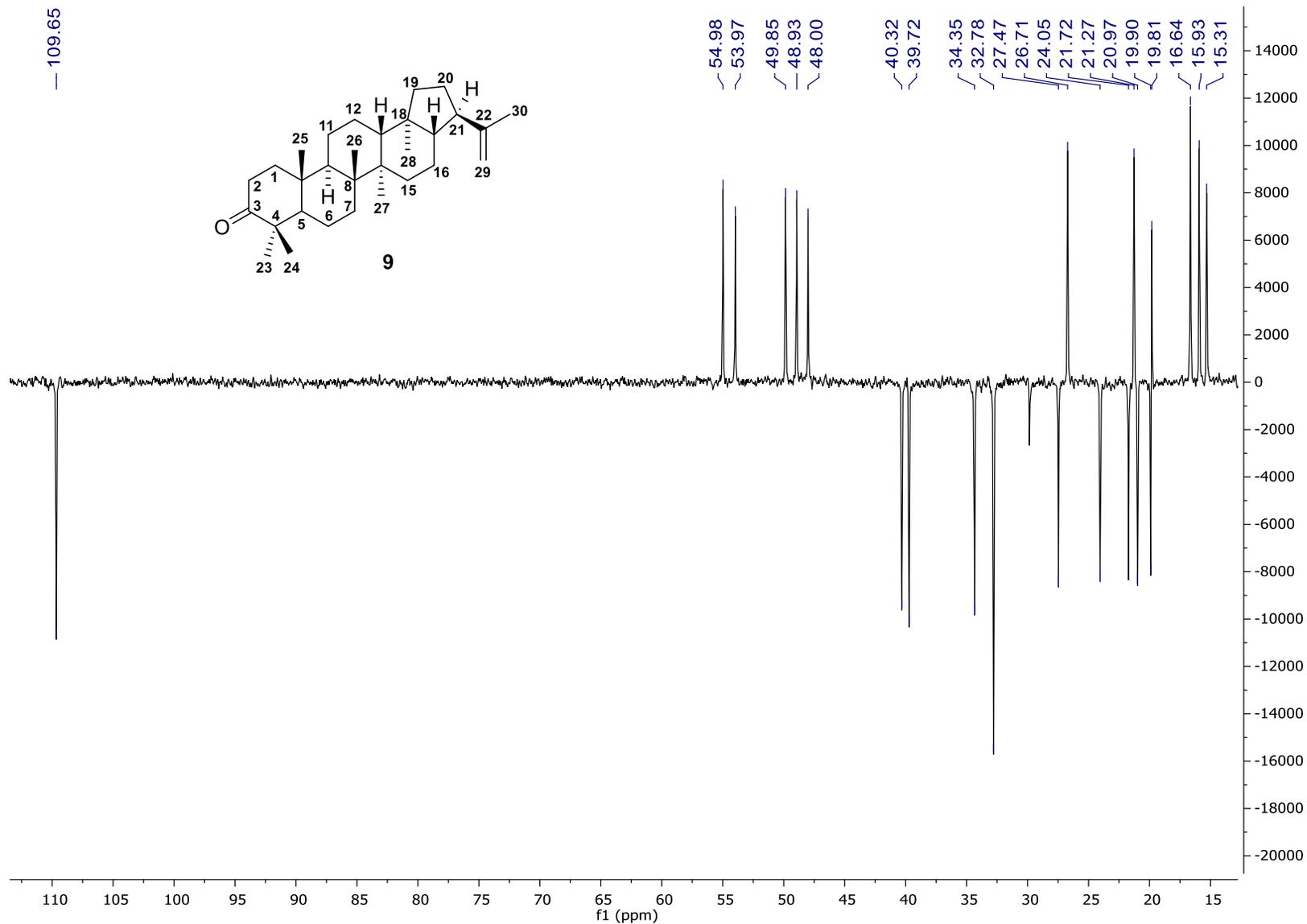
Espectro 1. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS) de moretenona **9**



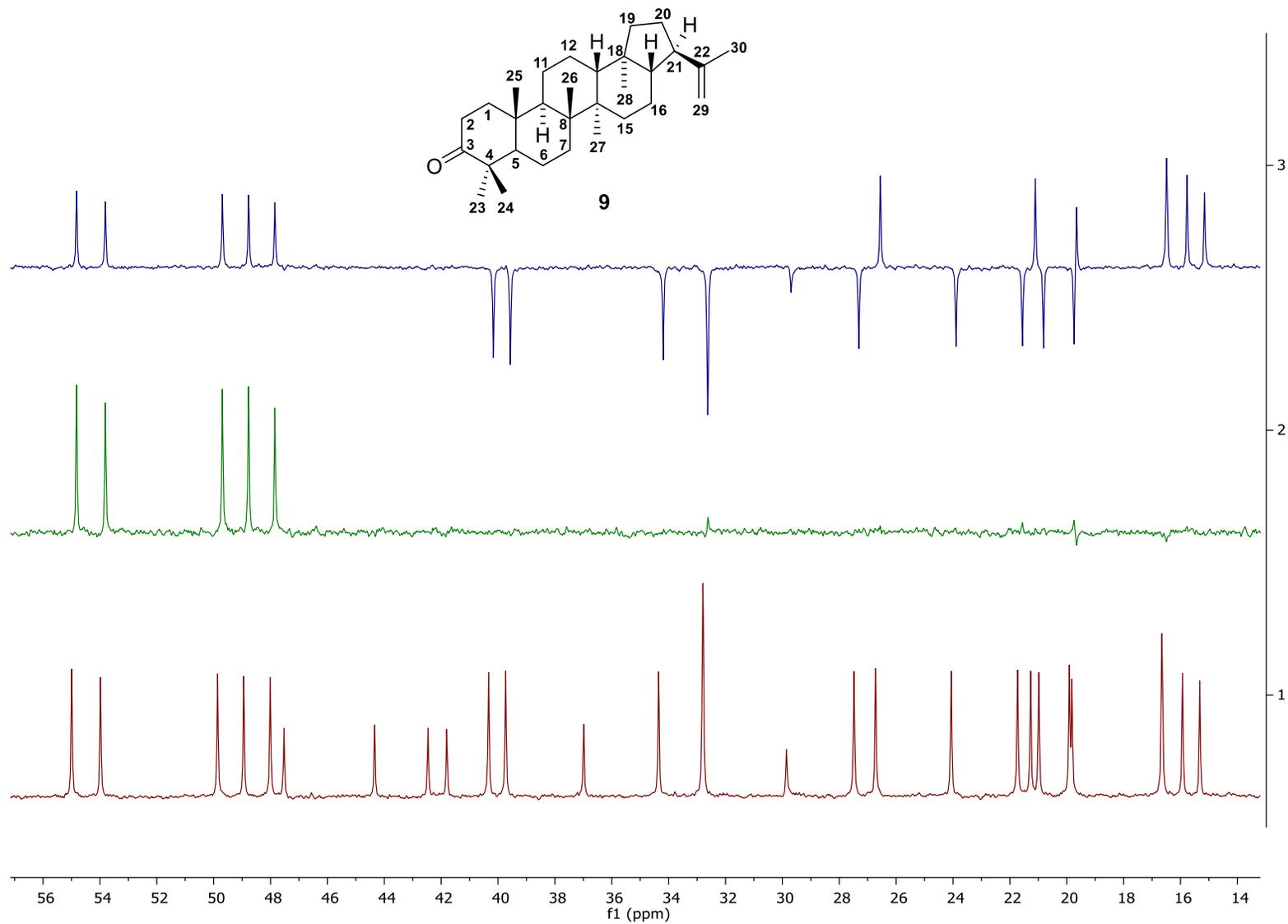
Espectro 2. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de **9**



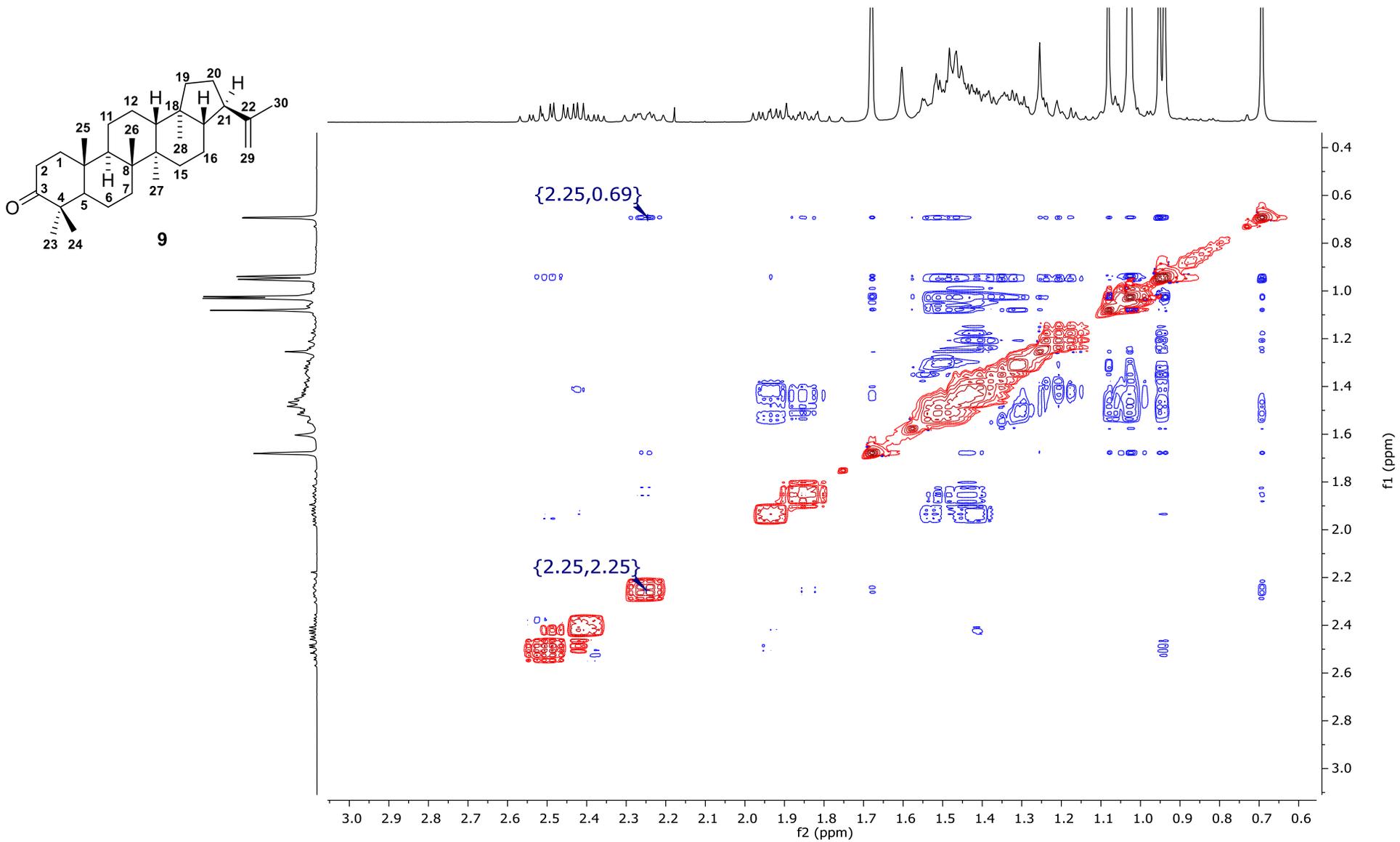
Espectro 3. RMN ^{13}C DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) de **9**



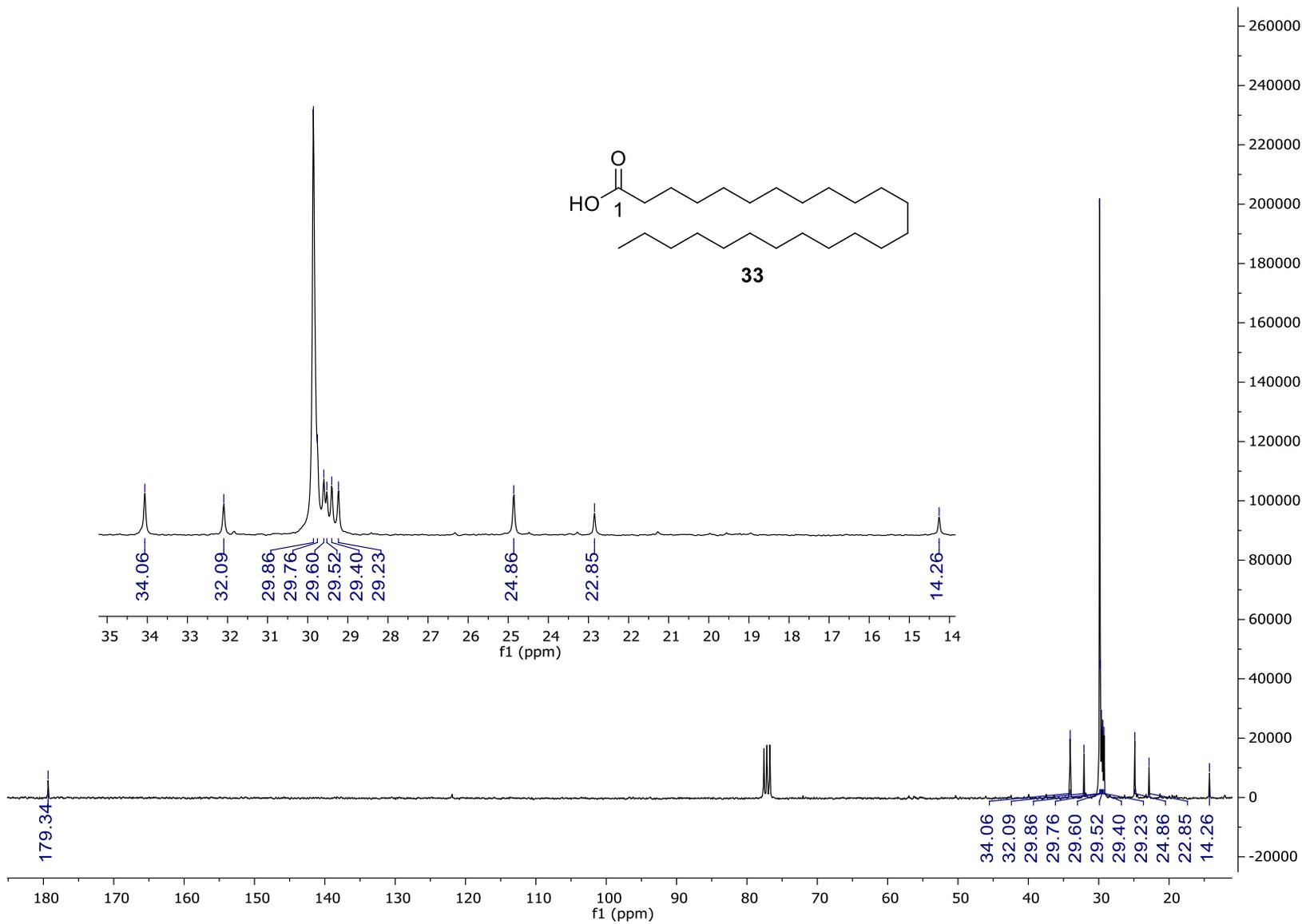
Espectro 4. RMN ¹³C DEPT 135 (75 MHz, CDCl₃) de **9**



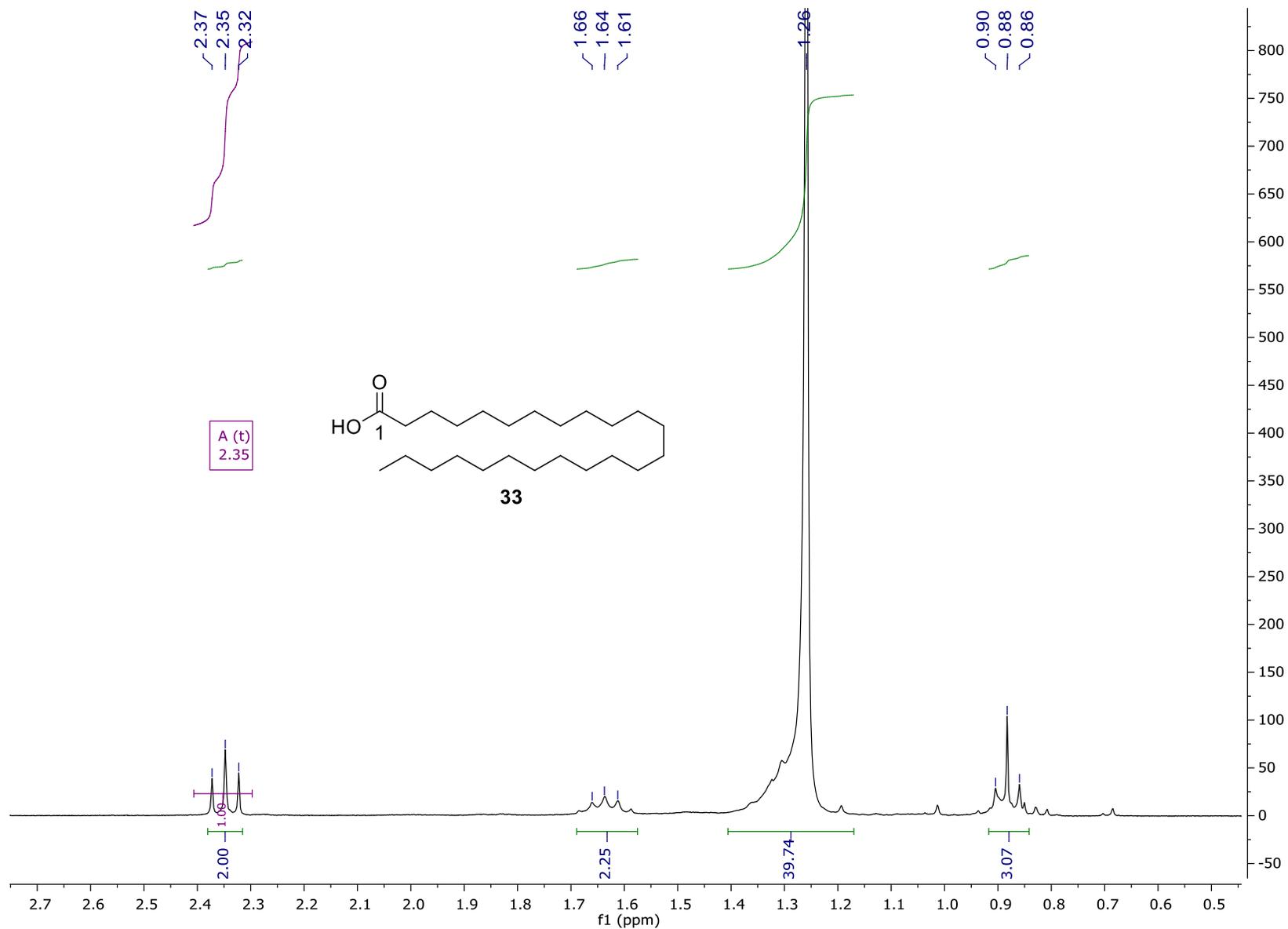
Espectro 5. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de **9**



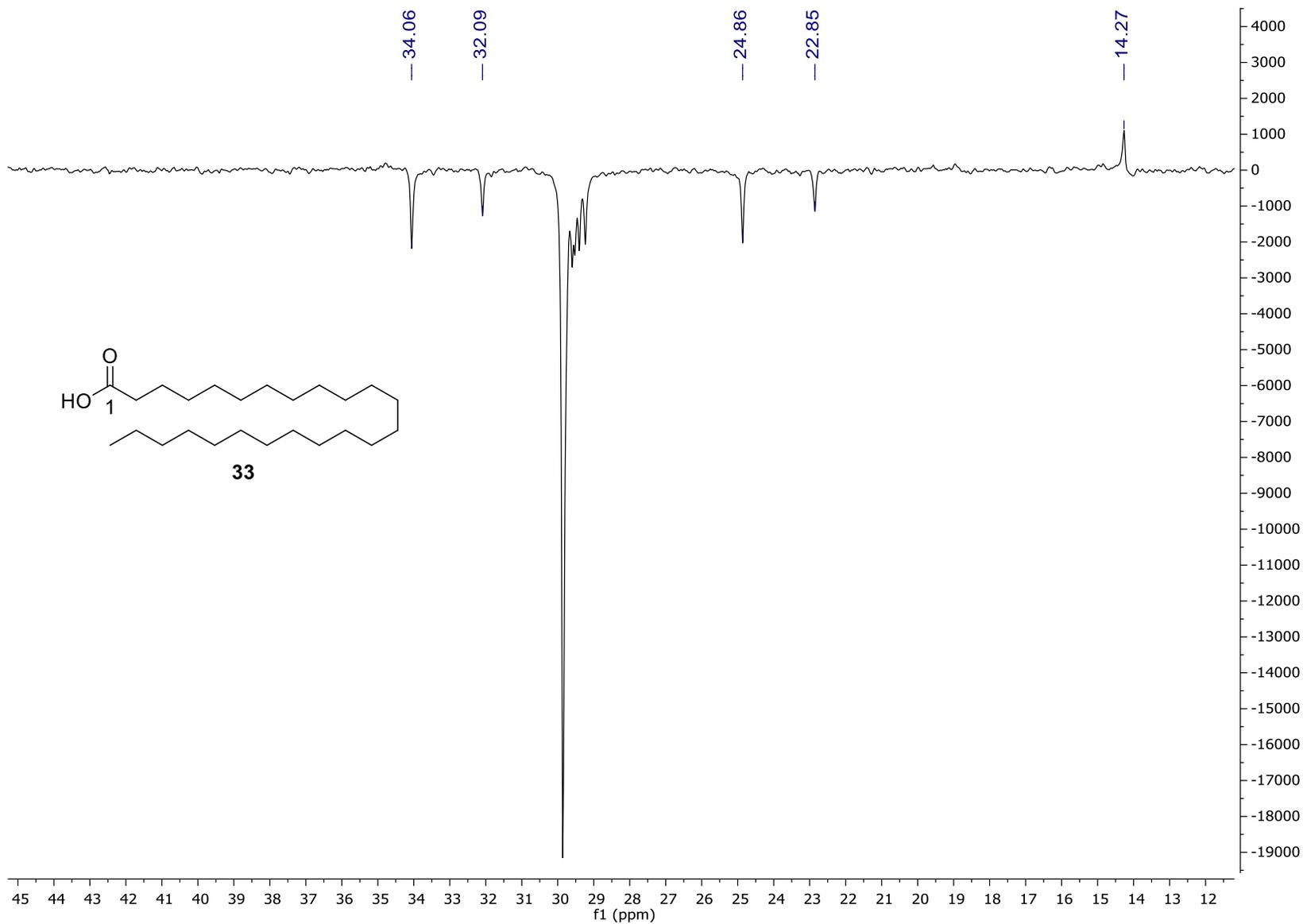
Espectro 6. NOESY (300 MHz, CDCl₃) de 9



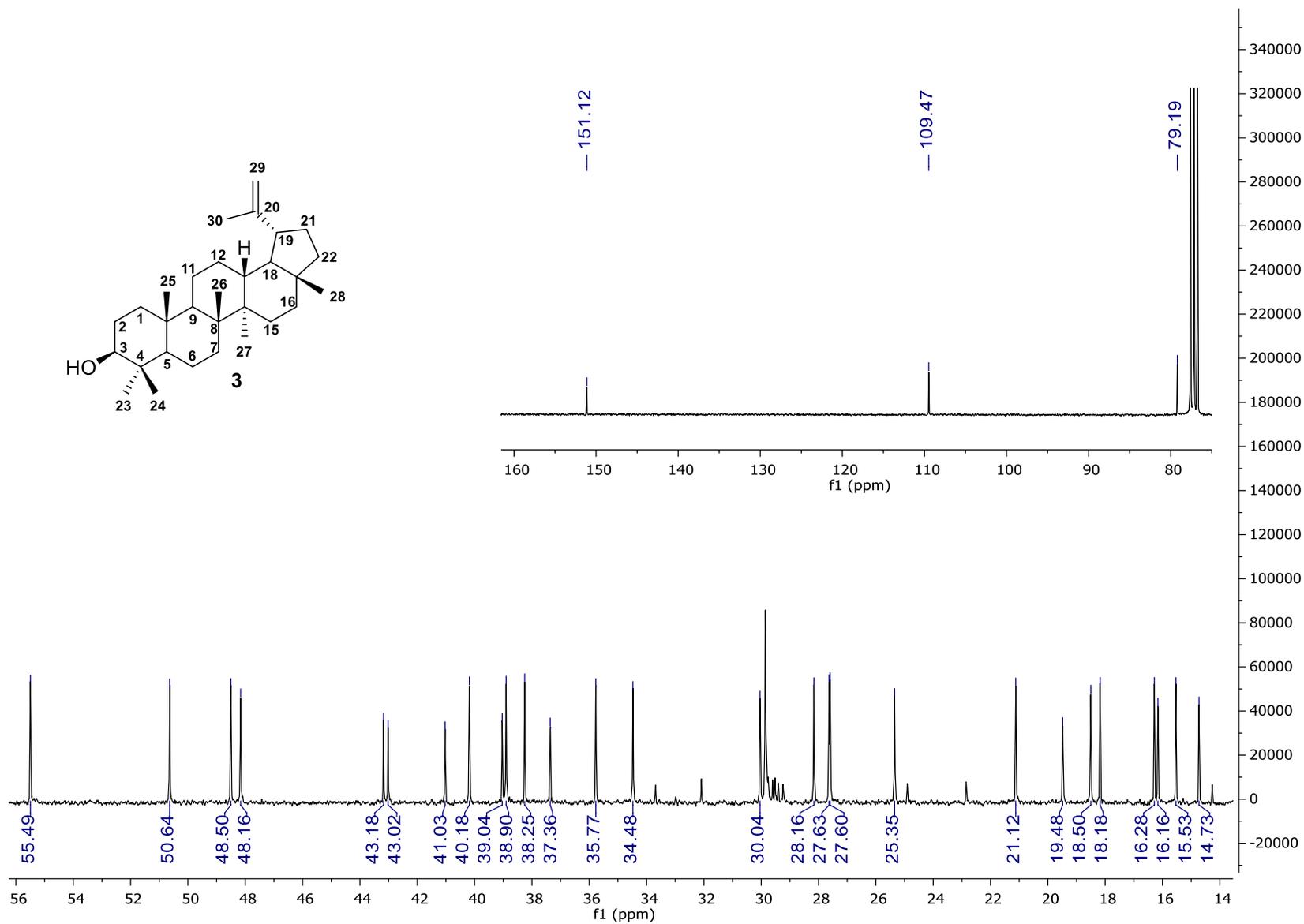
Espectro 7. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 33



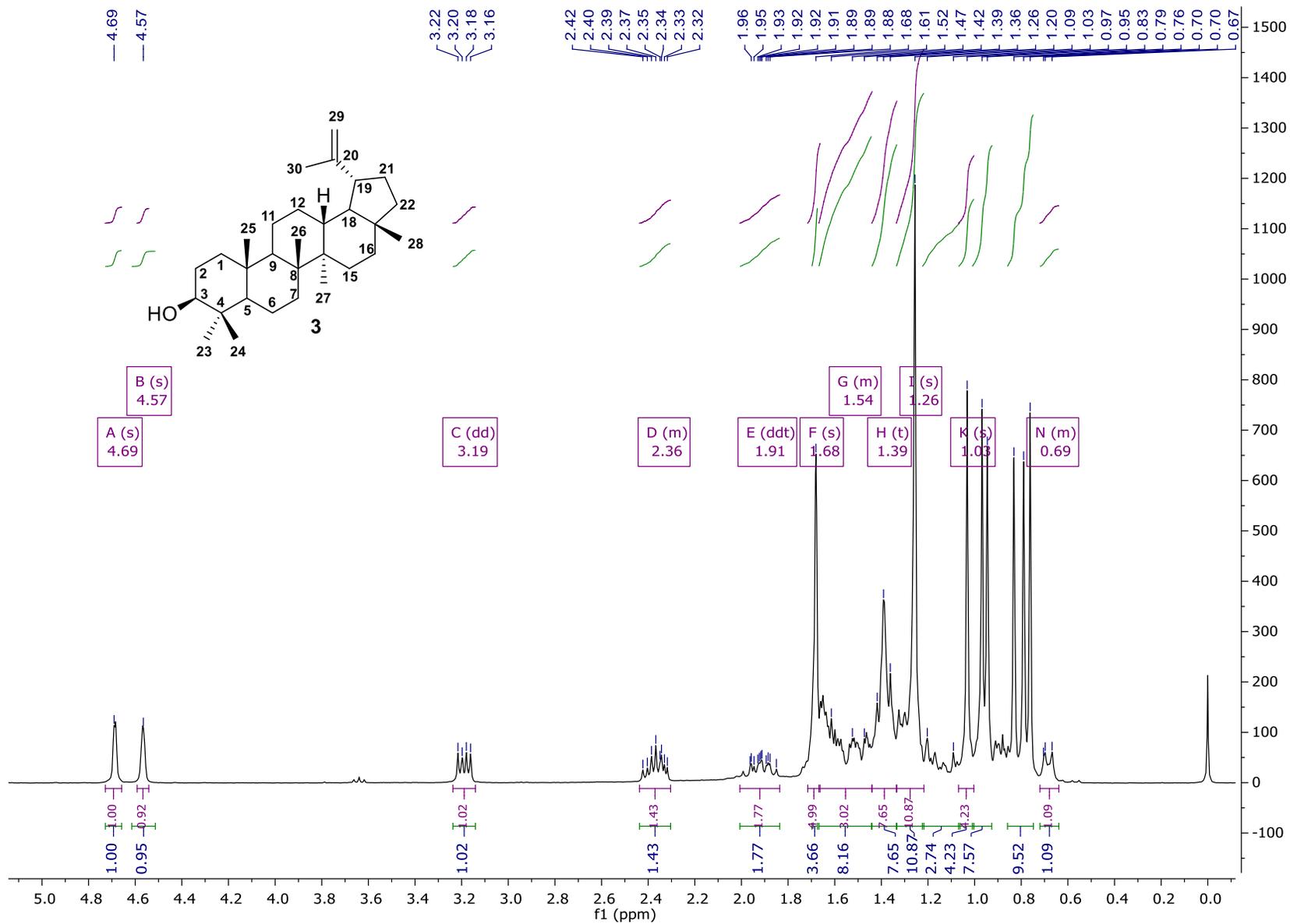
Espectro 8. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de **33**



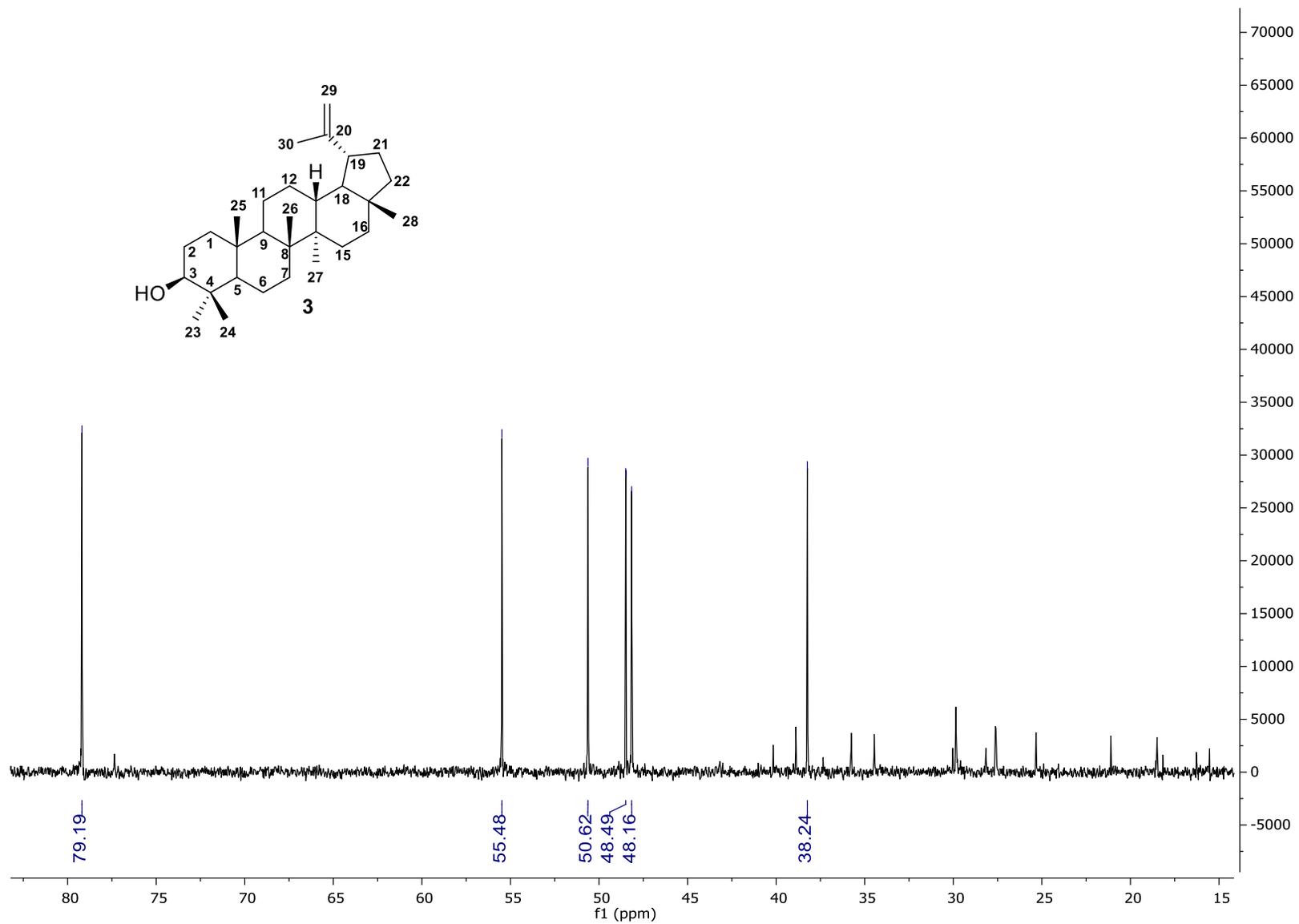
Espectro 9. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de **33**



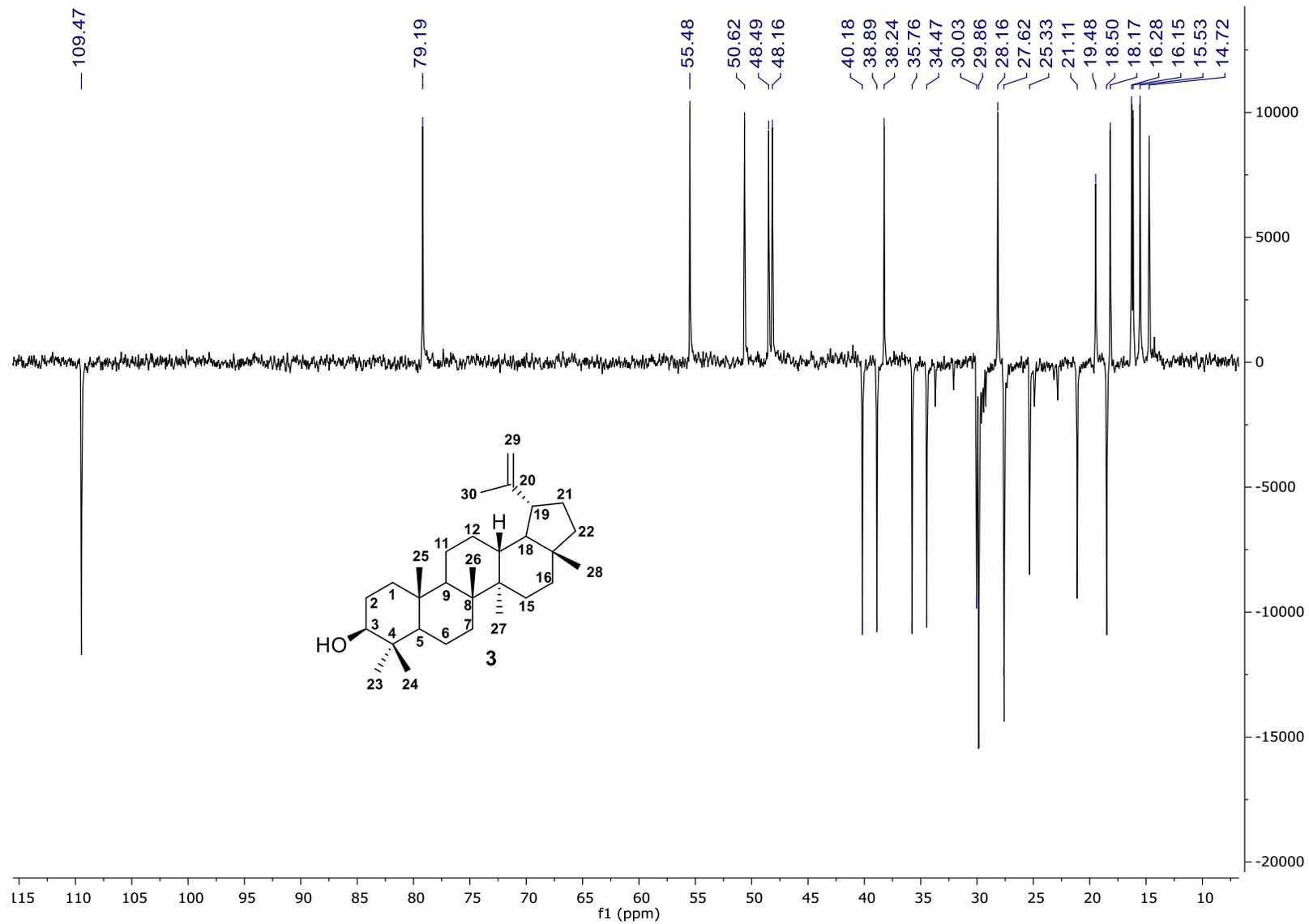
Espectro 10. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **3**



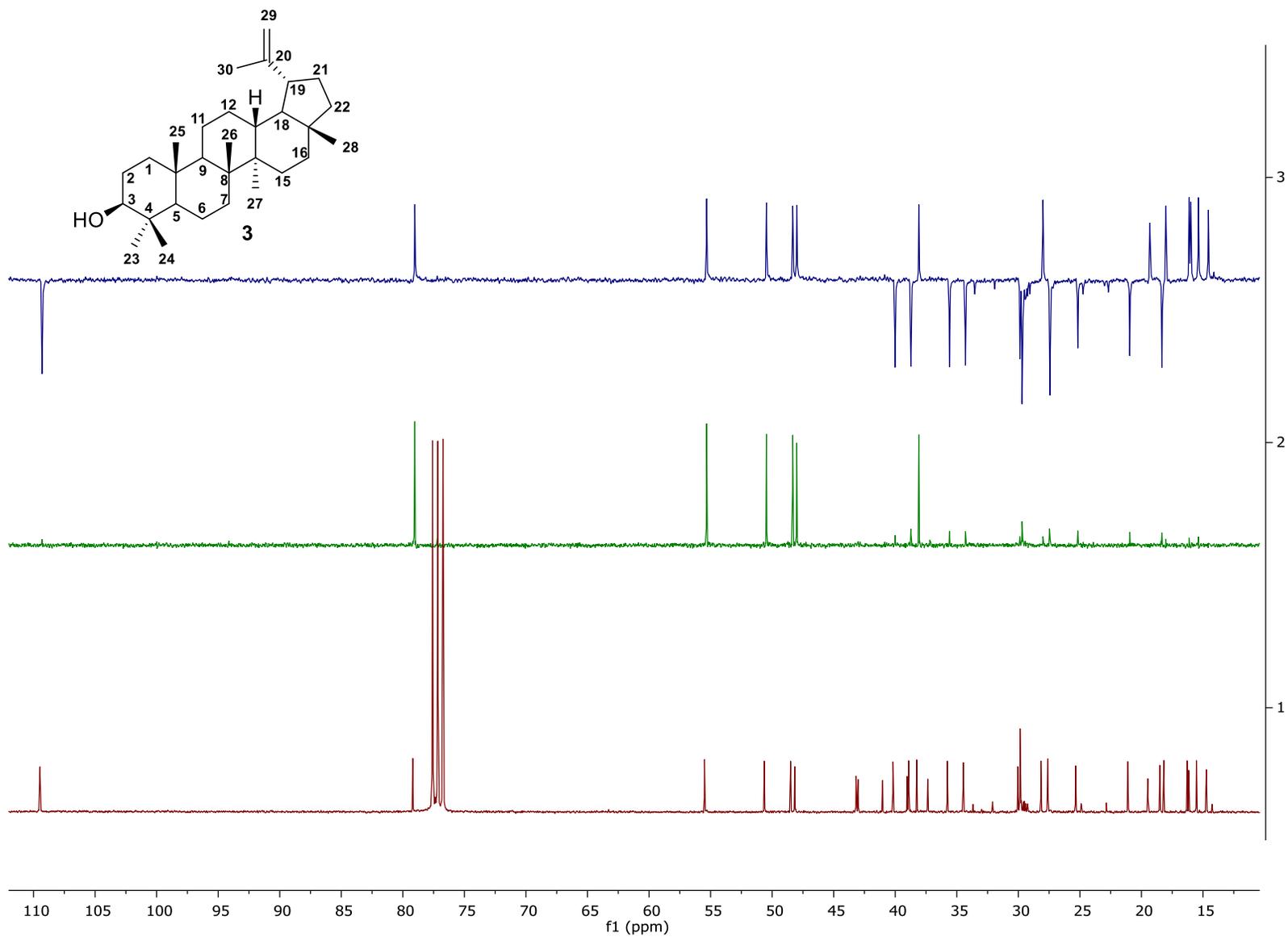
Espectro 11. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 3



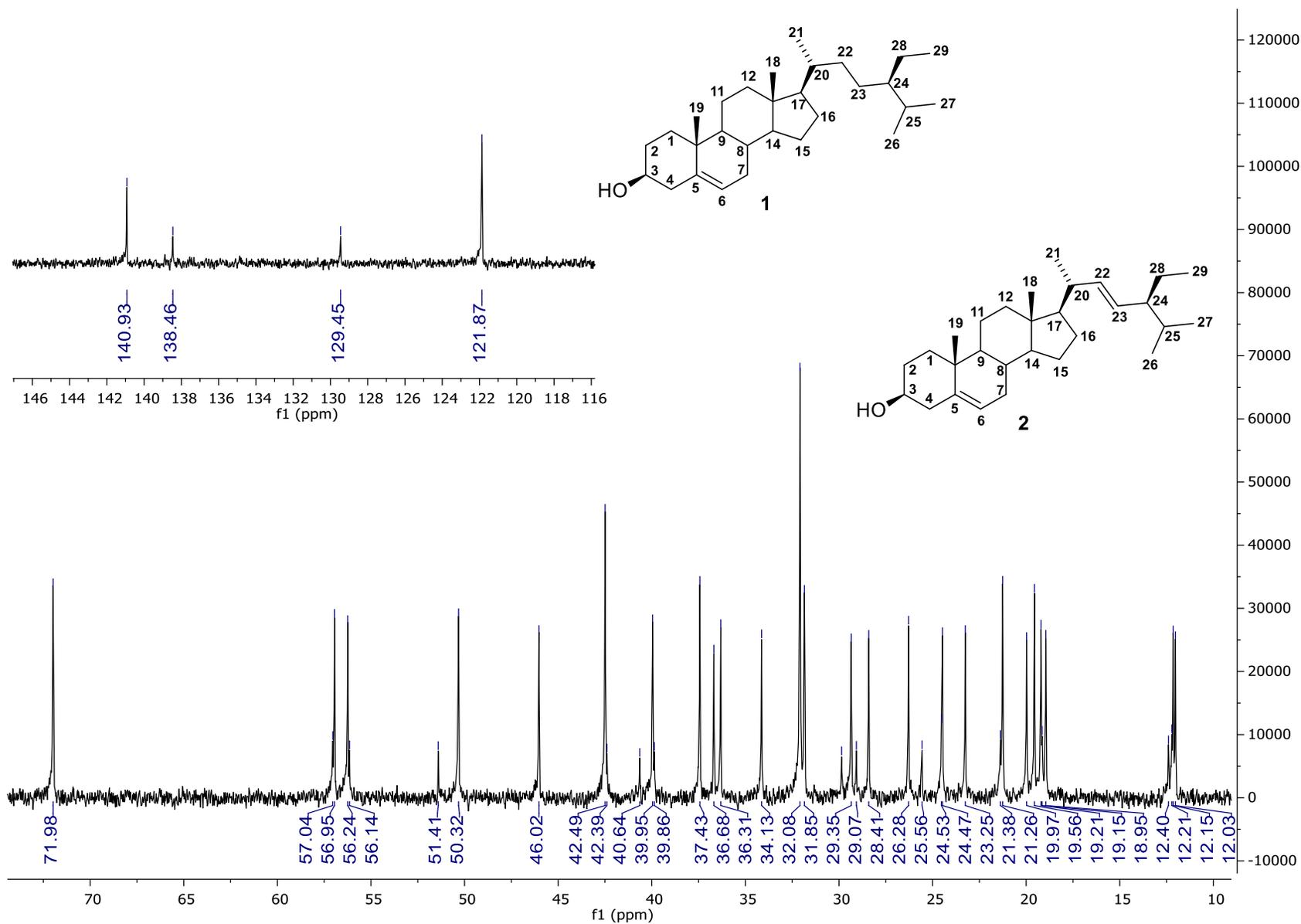
Espectro 12. RMN ^{13}C DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) de **3**



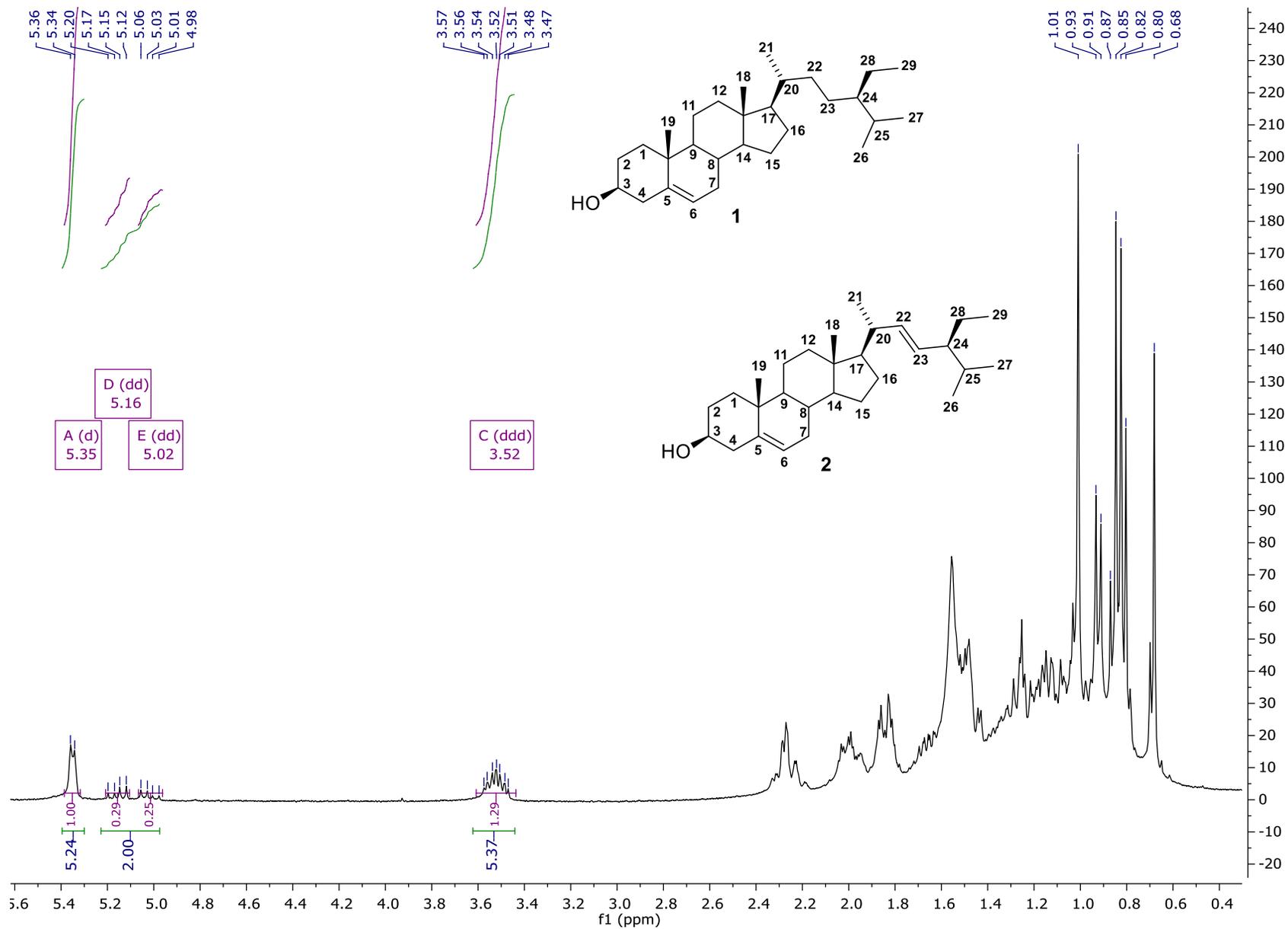
Espectro 13. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 3



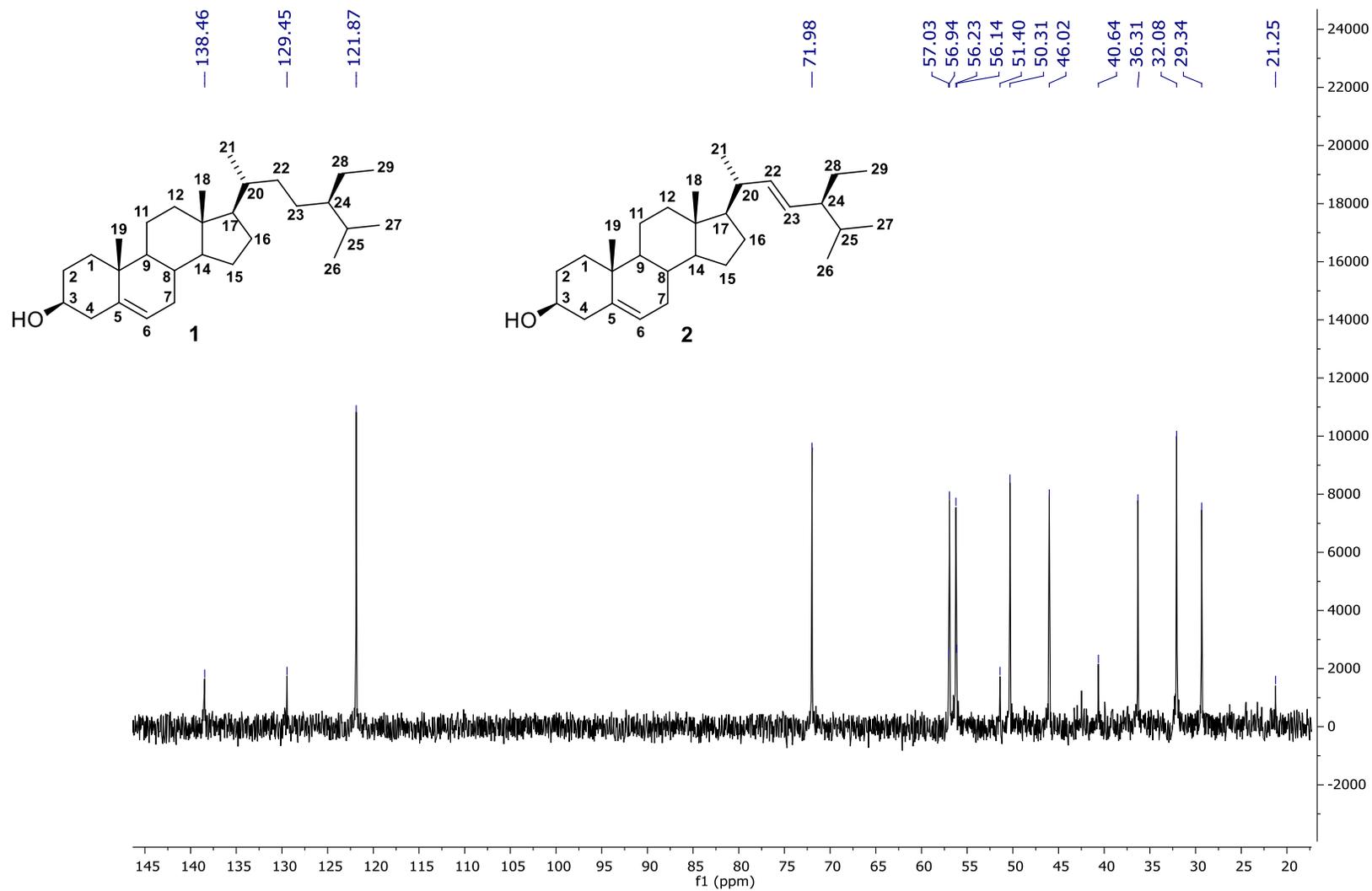
Espectro 14. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de **3**



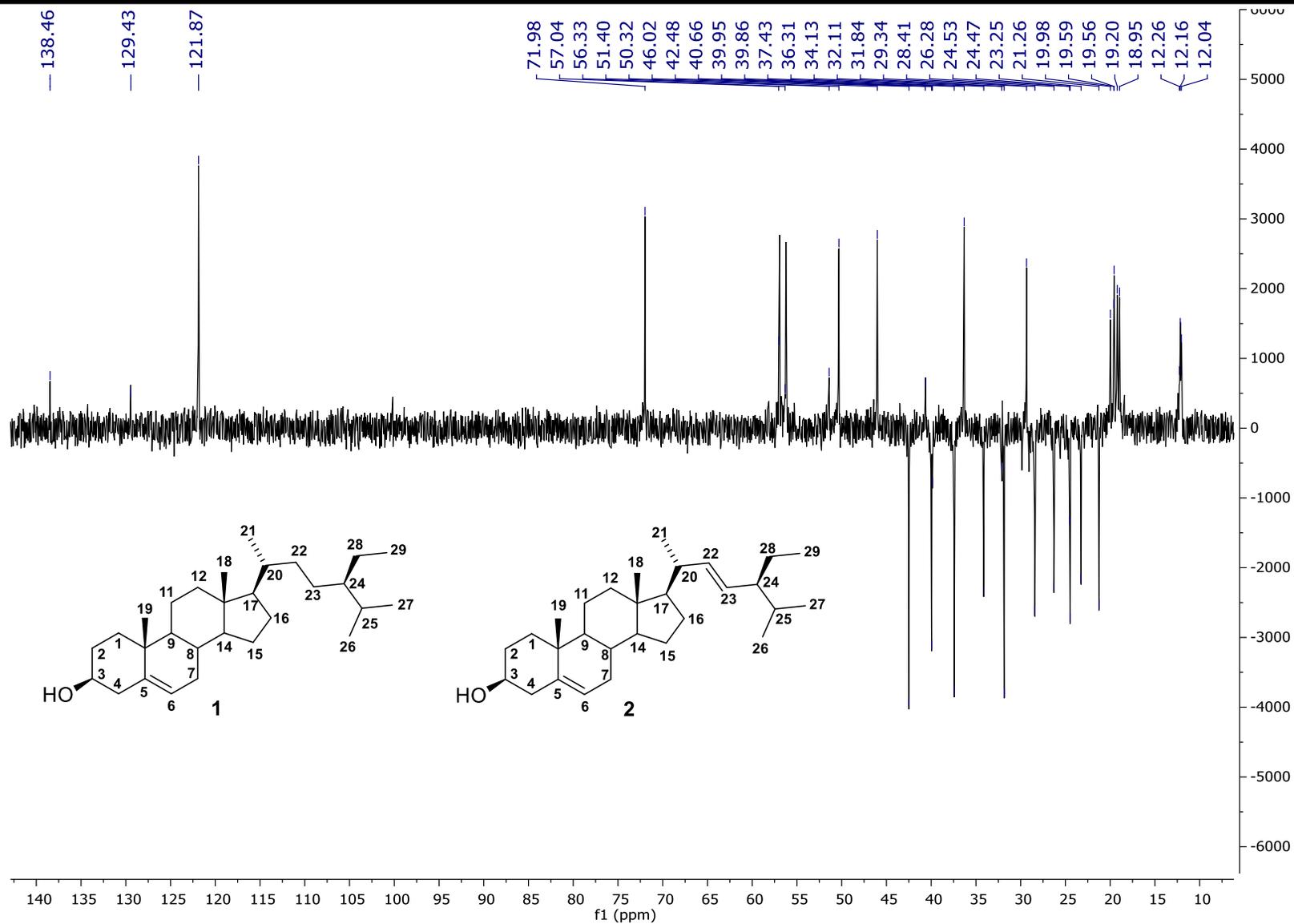
Espectro 15. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS) de 1,2



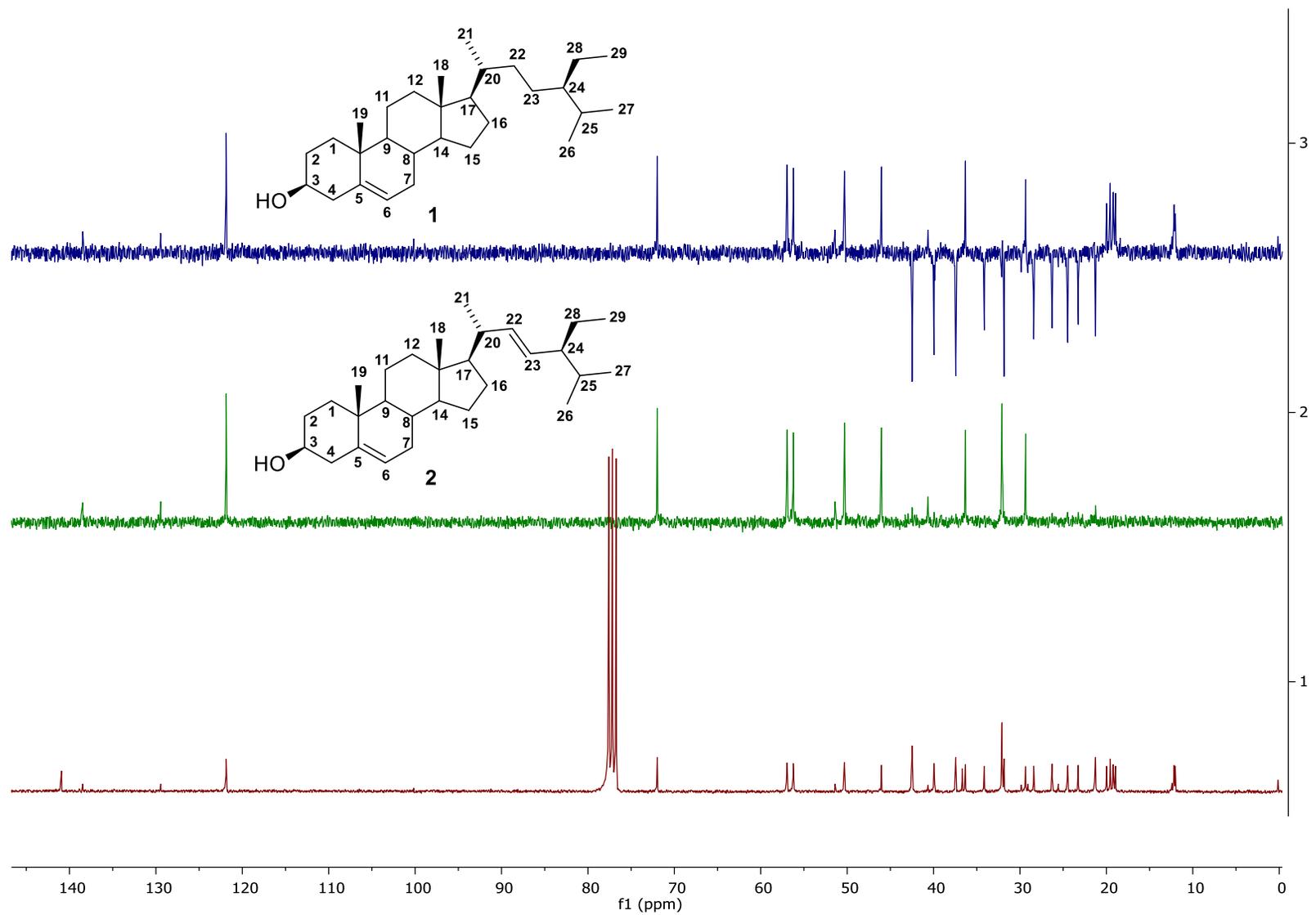
Espectro 16. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **1,2**



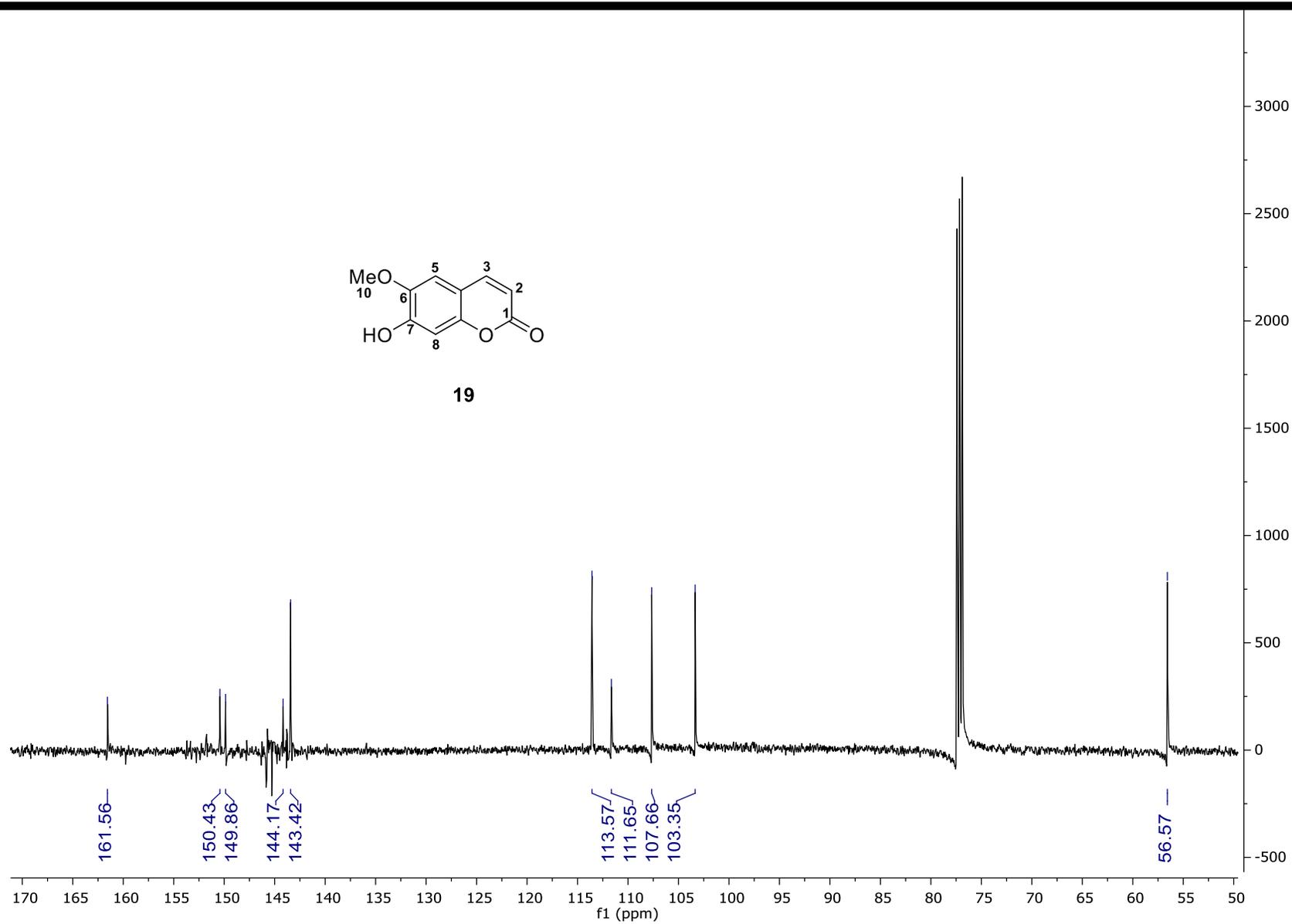
Espectro 17. RMN ¹³C DEPT 90 (75 MHz, CDCl₃) de 1,2



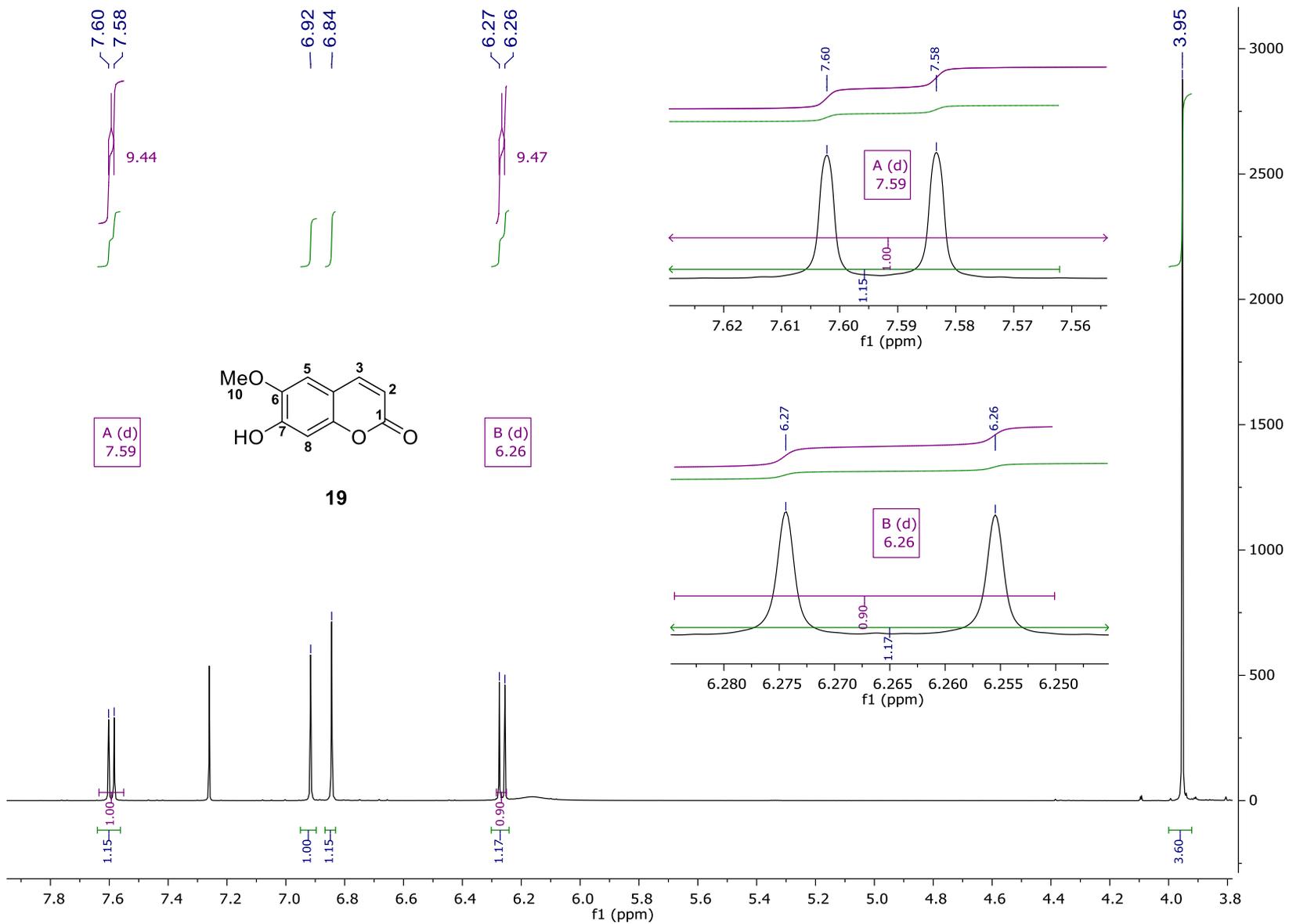
Espectro 18. RMN ^{13}C DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) de 1,2



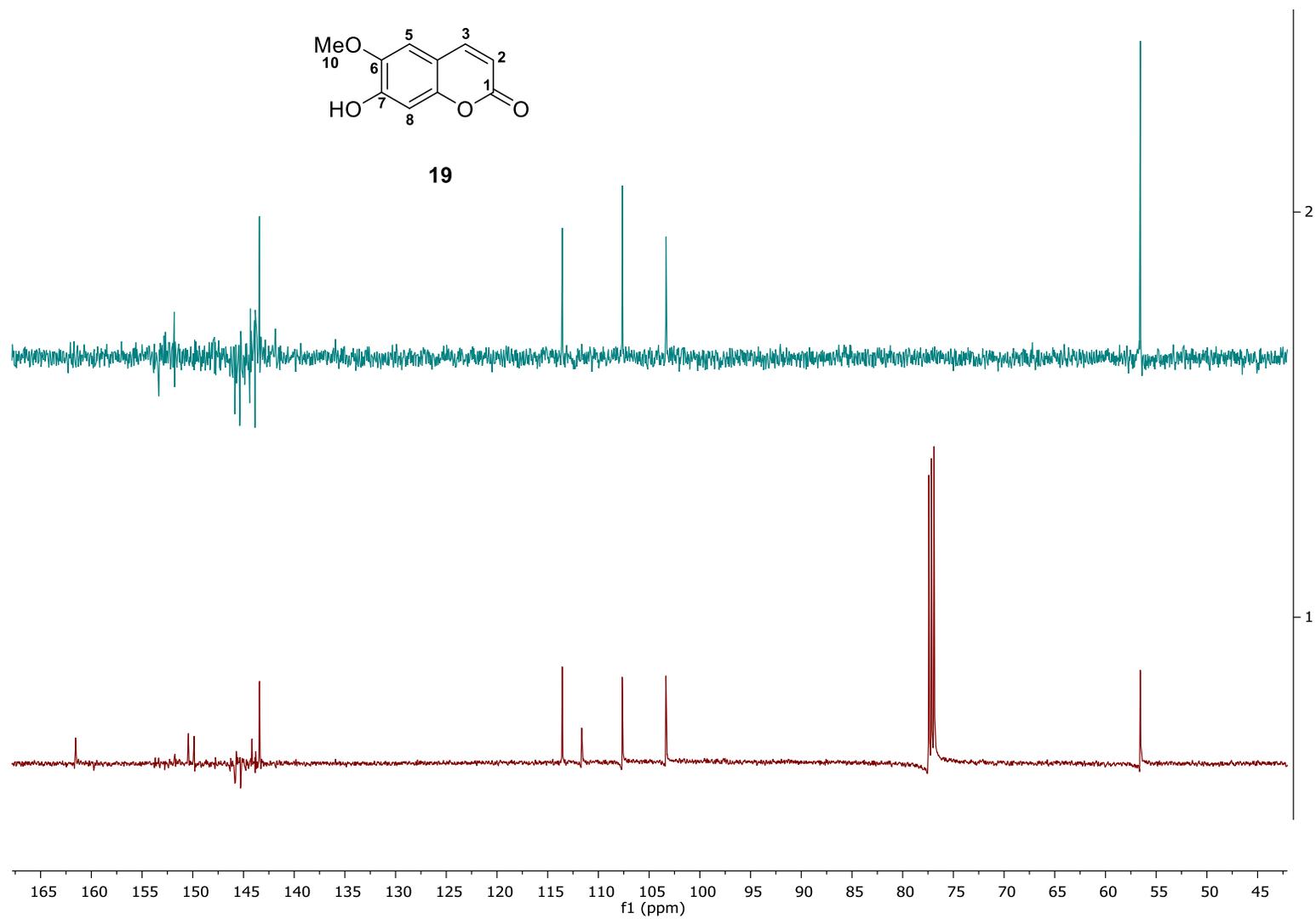
Espectro 19. ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135 apilados (75 MHz, CDCl_3) de 1,2



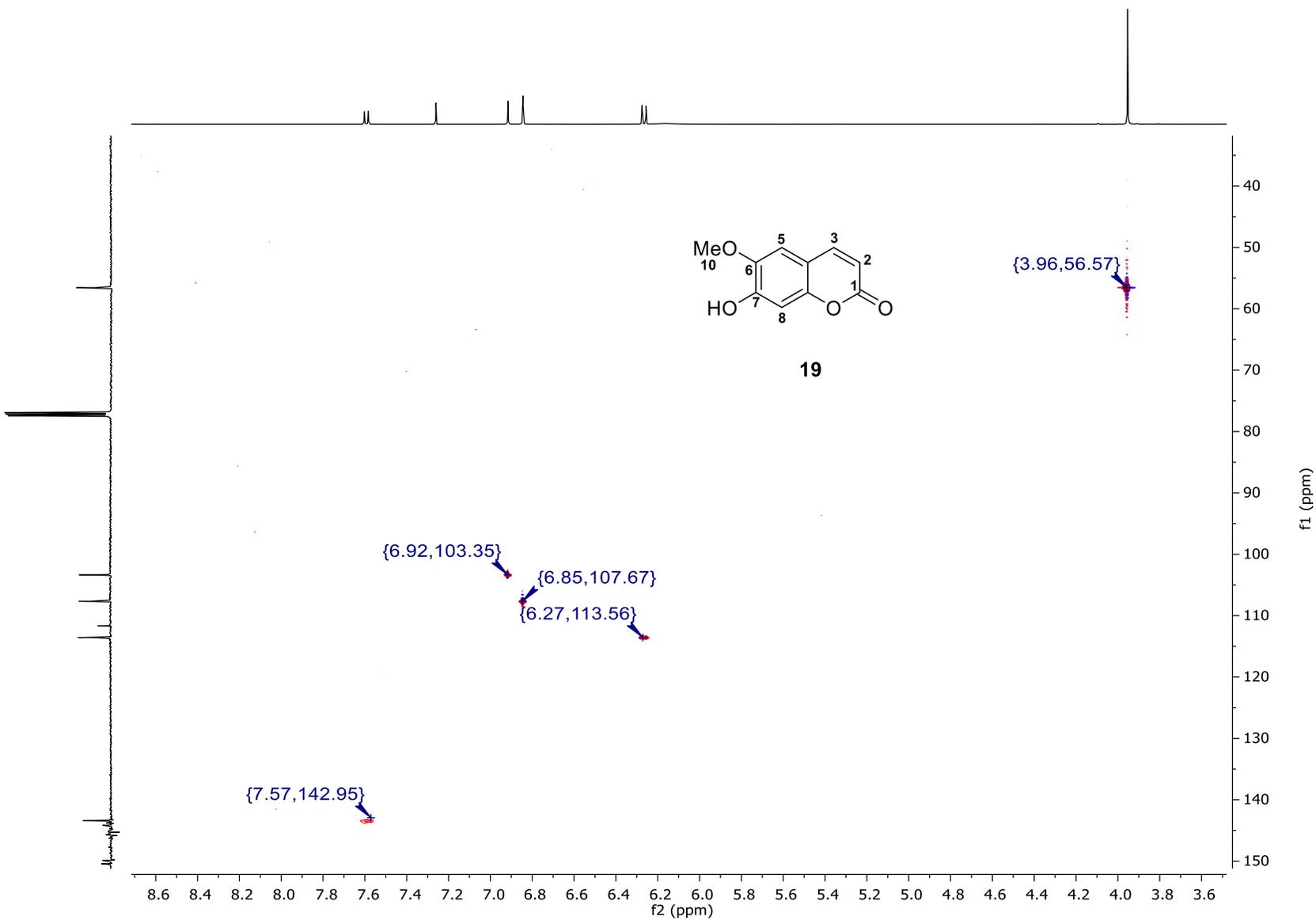
Espectro 20. RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **19**



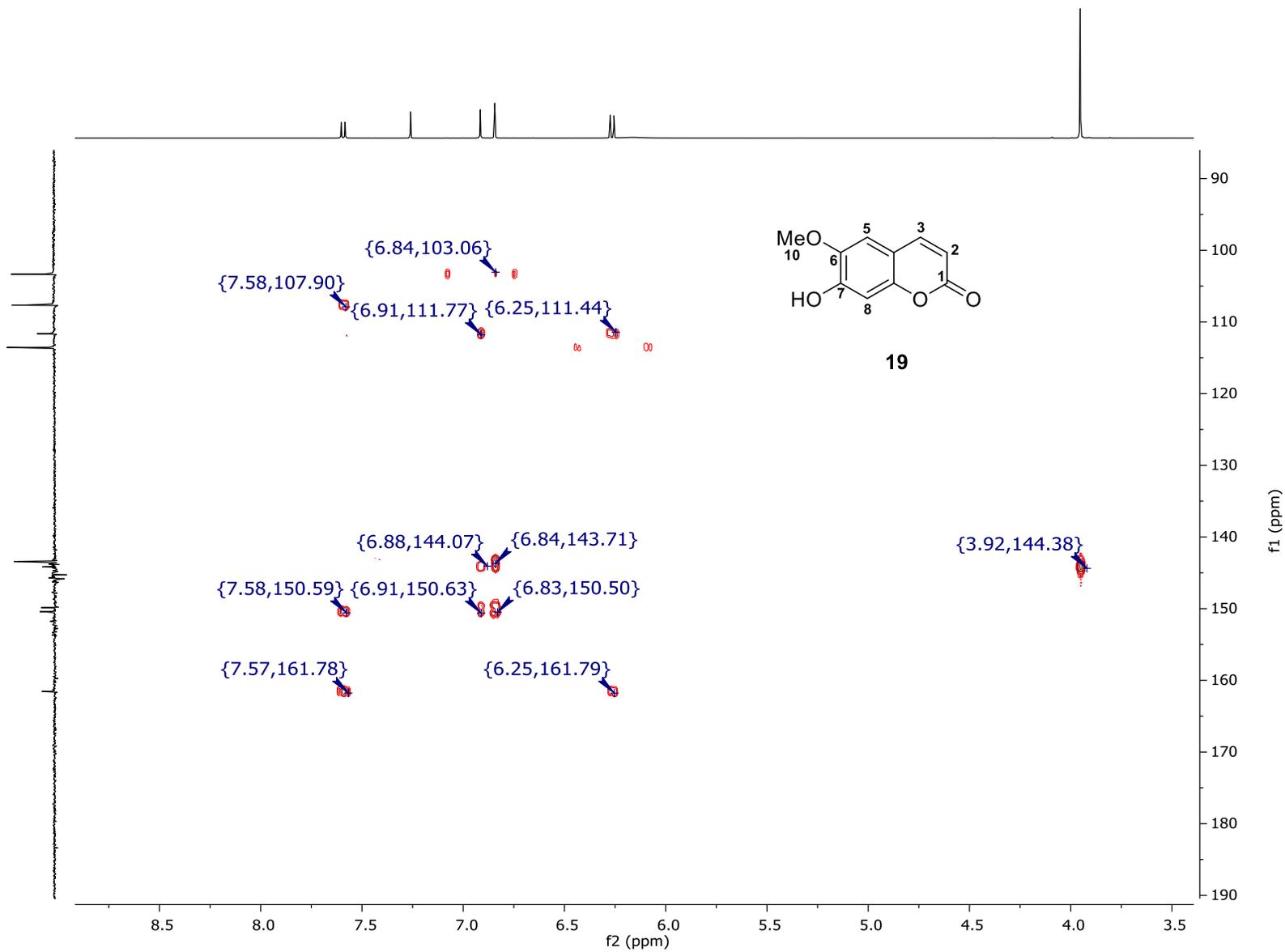
Espectro 21. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de 19



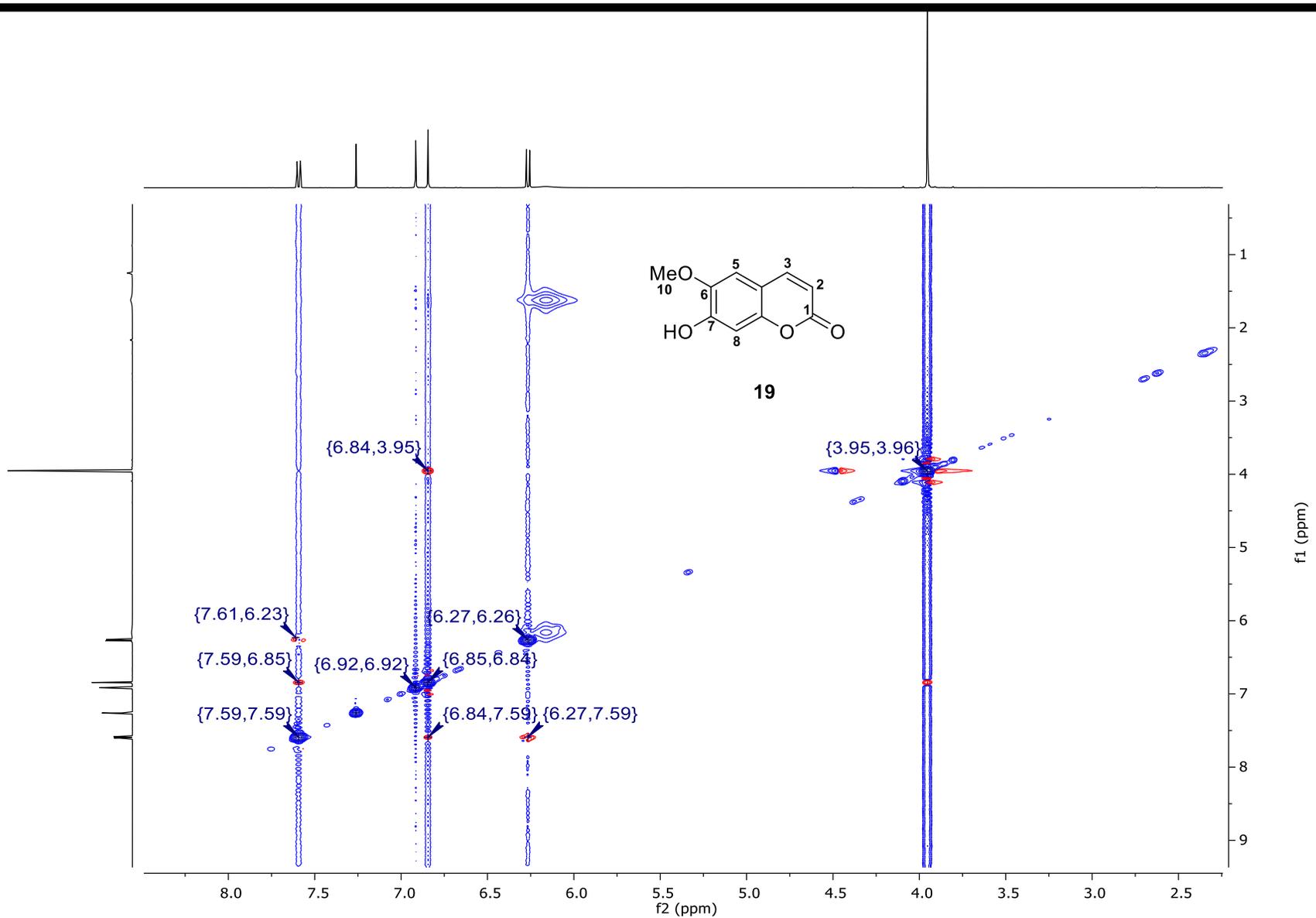
Espectro 22. ^{13}C , DEPT 135 apilados (125 MHz, CDCl_3) de **19**



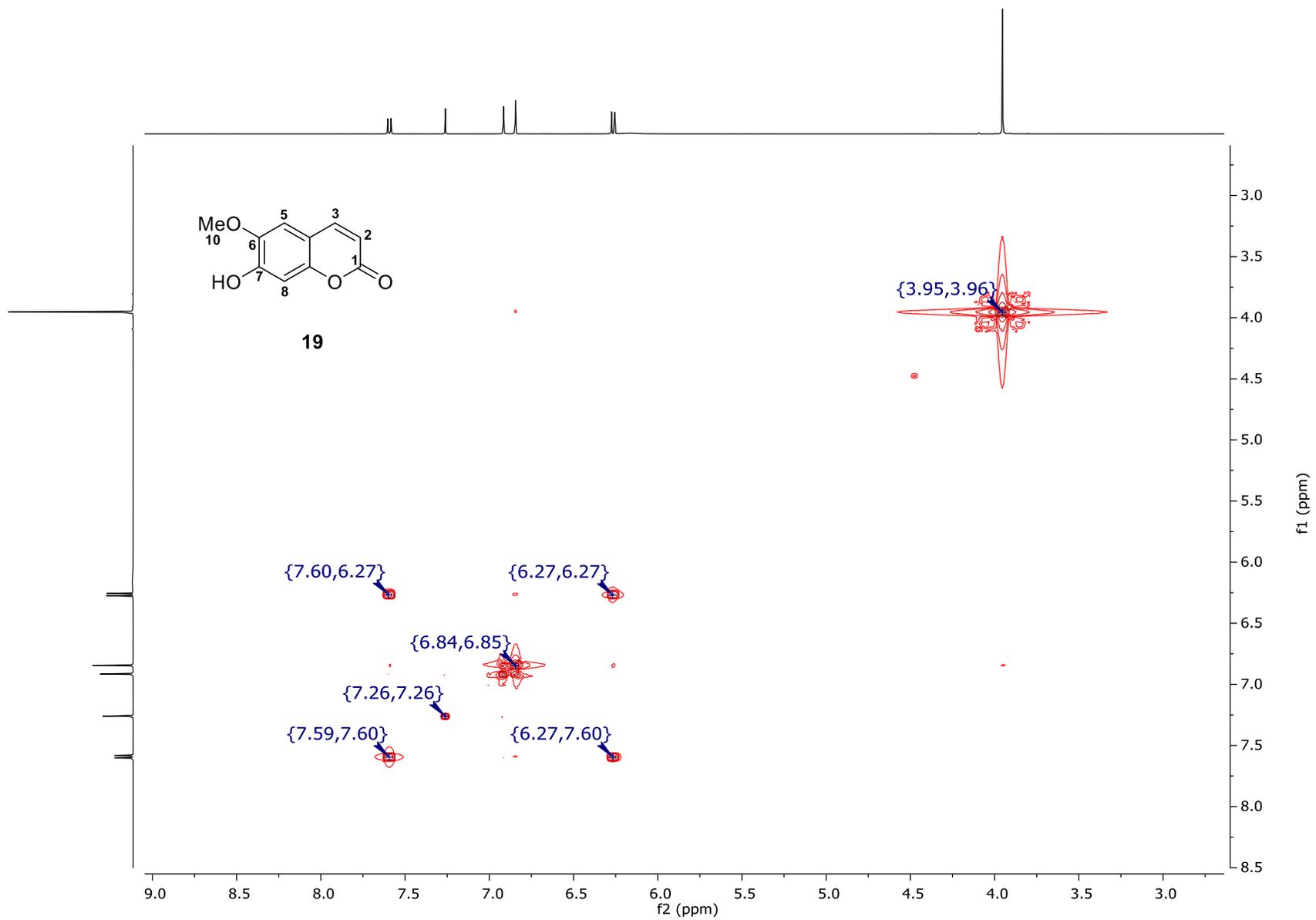
Espectro 23. HSQC (500 MHz, CDCl₃) de **19**



Espectro 24. HMBC (500 MHz CDCl_3) de **19**



Espectro 25. NOESY (500 MHz, CDCl₃) de 19



Espectro 26. COSY (500 MHz, CDCl₃) de **19**

11. REFERENCIAS

1. Delgado, G. *Ciencia*. **2005**, 6-16.
2. Carey, F. Química orgánica; 6th ed.; Mc Graw Hill: Distrito Federal, **2003**; pp. 530-579.
3. Liang, X.; Liu, Z.; Cao, Y.; Meng, D.; Hua, H. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, 57, 345-349.
4. Vaz, A.; Costa, R.; Melo, A.; Oliva, M.; Santana, L.; Silva-Lucca, R.; Coelho, L.; Correia, M. *Food Chem.* **2010**, 119, 1507-1513.
5. Branco, A. Pizzolatti, M. *Quim. Nova* **2002**, 25, 15-19.
6. Gaertner, M.; Müller, L.; Roos, J.; Cani, G.; Santos, A.; Niero, R.; Calixto, J.; Yunes, R.; Delle Monache, F.; Cechinel-Filho, V. *Phytomedicine* **1999**, 6, 41-44.
7. Garcia-Alvarez, M.; Moussa, I.; Njomnang Soh, P.; Nongonierma, R.; Abdoulaye, A.; Nicolau-Travers, M.; Fabre, A.; Wdzieczak-Bakala, J.; Ahond, A.; Poupat, C.; Ikhiri, K.; Benoit-Vical, F. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 149, 676-684.
8. Khera, S.; Jolad, S.; Carducci, M.; Timmermann, B. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2003**, 59, o1403-o1404.
9. Lee, C. J. *Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2010**, 53, 464-469.
10. Lima, M.; Lima, J.; Arriaga, Â.; Andrade-Neto, M.; Santiago, G.; Bezerra, B.; Fereira, Y.; Veras, H.; Braz-Filho, R. *Quim. Nova* **2009**, 32, 348-353.
11. Machado, D.; Palmeira Júnior, S.; Conserva, L.; de Lyra Lemos, R. *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, 33, 555-558.
12. Hnatyszyn, O.; Juárez, S.; Ouviaña, A.; Martino, V.; Zacchino, S.; Ferraro, G. *Pharm. Biol.* **2007**, 45, 404-406.
13. Macías-Rubalcava, M.; Hernández-Bautista, B.; Jiménez-Estrada, M.; Cruz-Ortega, R.; Anaya, A. *J. Chem. Ecol.* **2006**, 33, 147-156.

-
14. Toledo Ramos, D.; Maranhão, L.; Godoi, A.; Carvalho Filho, M.; Lacerda, L.; de Vasconcelos, E. *Water, Air, Soil Pollut.: Focus* **2009**, *9*, 293-302.
 15. Sugio, A.; Dubreuil, G.; Giron, D.; Simon, J. *J. Exp. Bot.* **2014**, *66*, 467-478.
 16. Sepúlveda, J.G.; Porta, D.H.; Rocha, S.M. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2003**, *21*, 355-363.
 17. Del Fabbro, C.; Prati, D. *Basic Appl. Ecol.* **2015**, *16*, 28-35.
 18. Gong, B.; Zhang, G. *Acta Ecol. Sin.* **2014**, *34*, 325-336.
 19. War, A.; Paulraj, M.; Ahmad, T.; Buhroo, A.; Hussain, B.; Ignacimuthu, S.; Sharma, H. *Plant Signaling Behav.* **2012**, *7*, 1306-1320.
 20. Delgado, G.; Romo de Vivar, A. *Temas Selectos de Química de Productos Naturales*; Guillermo Delgado: México, **2015**.
 21. Aniszewski, T. *Alkaloids - secrets of life*; Elsevier: Amsterdam, **2007**.
 22. American Chemical Society. *The discovery of Camptothecin and Taxol*. Washington: American Chemical Society; **2003**.
 23. Calderón Gómez, E. *Rev. Colomb. Cienc. Quim.-Farm.* **1969**, *1*, 137 – 149.
 24. Sharma, G. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B.* **2012**, *83*, 141-145.
 25. Cordell, G. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 391-398.
 26. Cui, G.; Tan, R. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 99-102.
 27. Barbosa, P.; Fascio, M.; Martins, D.; Silva Guedes, M.; Roque, N. *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 307-308.
 28. Del Castillo Cotillo, H.; De Simone, F.; De Feo, V. *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, *24*, 463-464.
 29. Peng, Q.; Li, G.; Ma, Y.; Huang, J.; Wei, X.; Wang, J. *Biochem. Syst. Ecol.* **2012**, *43*, 64-66.
 30. Chen, R.; You, C.; Wang, Y.; Zhang, W.; Yang, K.; Geng, Z.; Liu, Z.; Deng, Z.; Wang, Y.; Du, S. *Biochem. Syst. Ecol.* **2014**, *57*, 1-5.

-
31. Martínez Gordillo M, Jiménez Ramírez J, Cruz Durán R, Juárez Arriaga E, García R, Cervantes A, Mejía Hernández R. *An. Inst. Biol., Univ. Nac. Auton. Mex.* **2002**, 73, 155-281.
32. Salamanca Grosso G. La familia Euforbiaceae como condición promisoría para la obtención de metabolitos secundarios. Colombia. Facultad de Ciencias Universidad del Tolima. **2015**, 1-12.
33. Anyanwu, C.; Ibeto, C.; Ezeoha, S.; Ogbuagu, N. *Renewable Energy* **2015**, 81, 745-752.
34. Prabhakaran Nair, K. The agronomy and economy of important tree crops of the developing world; Elsevier: Amsterdam, **2010**.
35. Poltronieri, P. Hong, Y. Applied plant genomics and biotechnology; Elsevier: Reino Unido, **2015**.
36. Coutinho, D.; Barbosa, M.; Souza, R.; Silva, A.; Silva, S.; Oliveira, A. *Renewable Energy* **2016**, 91, 275-281.
37. Abdelgadir, H.; Van Staden, J. *S. Afr. J. Bot.* **2013**, 88, 204-218.
38. Trejo-Hernández, L.; Olson-Zúnica, M.; Bye-Boettler, R. *Rev. Mex. Biodiv.* **2015**, 86, 478-485.
39. Canales, M.; Hernández, T.; Caballero, J.; Vivar, A.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 97, 429-439.
40. Sánchez-Medina, A.; García-Sosa, K.; May-Pat, F.; Peña-Rodríguez, L. *Phytomedicine* **2001**, 8, 144-151.
41. Alonso-Castro, A.; Domínguez, F.; Zapata-Morales, J.; Carranza-Álvarez, C. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, 175, 335-345.
42. Filho, V.; Lima, E.; Morais, V.; Gomes, S.; Miguel, O.; Yunes, R. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, 53, 171-173.
43. Cseke, L. Natural products from plants; CRC/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, **2006**.
44. David, J.; Meira, M.; David, J.; Guedes, M. *Quim. Nova* **2004**, 27, 62-65.

-
45. Sousa, G.; Duarte, L.; Alcântara, A.; Silva, G.; Vieira-Filho, S.; Silva, R.; Oliveira, D.; Takahashi, J. *Molecules* **2012**, *17*, 13439-13456.
46. McLean, S.; Perpick-Dumont, M.; Reynolds, W.; Jacobs, H.; Lachmansing, S. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 2519-2525.
47. Lopes, D.; Villela, C.; Kaplan, M.; Carauta, J. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 279-280.
48. Kouno, I.; Saishoji, T.; Sugiyama, M.; Kawano, N. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 790-791.
49. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10724.html?rid=dd979275-e81a-4bd9-b39c-c170c49d955a> (Accesado 31 de Agosto 2016).
50. Malca Garcia, G.; Hennig, L.; Sieler, J.; Bussmann, R. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, *25*, 92-97.
51. De-Eknamkul, W. Potduang, B. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 389-398.
52. Kongduang, D.; Wungsintaweekul, J.; De-Eknamkul, W. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4067-4072.
53. Velázquez, A.; Reyes, B.; Álvarez, J.; Rodríguez, J. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2013**, *44*, 39-44.
54. Darmawan, A.; Kosela, S.; Kardono, L.; Syah, Y. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 175 – 177.
55. Siddiqui, B.; Sattar, F.; Ahmad, F.; Begum, S. *Arch. Pharmacol Res.* **2007**, *30*, 919-923.
56. Zhang, B.; Dai, Y.; Liao, Z. *Chin. J. Nat. Med.* **2011**, *9*, 33-37.
57. Jerezano, A.; Jiménez, F.; del Carmen Cruz, M.; Montiel, L.; Delgado, F.; Tamariz, J. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 185-198.
58. Mehul, B.; Kishor, D.; Ajay, K. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, *01*, 138 – 144.