

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE QUÍMICA**



TESIS DE GRADO:

**“ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE**  
***Maytenus segoviarum* y *Cassine xylocarpa*”**

PRESENTADA POR:

**Lic. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ**  
**PARA OPTAR AL GRADO DE MASTER EN QUÍMICA**

ASESORES:

**Dr. MARVIN JOSÉ NÚÑEZ RIVAS**  
**Dr. LUIS GILBERTO PARADA GÓMEZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, NOVIEMBRE DE 2007**

## ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	5
2.1 Generalidades de la Familia Celastraceae	5
2.2 Genero <i>Maytenus</i>	7
2.3 Genero <i>Cassine</i>	12
2.4 Metabolitos secundarios en la Familia Celastraceae	15
2.5 Estudio Fitoquímico	28
2.5.1 Selección del material vegetal	28
2.5.2 Recolección	29
2.5.3 Extracción y Fraccionamiento	29
2.5.4 Separación y Aislamiento	31
2.6 Elucidación estructural	36
2.6.1 Espectroscopia Infrarroja	36
2.6.2 Espectrometría de masas	37
2.6.3 Espectroscopia Ultravioleta-visible	39
2.6.4 Resonancia Magnética Nuclear	40
2.6.4.1 Resonancia Magnética Nuclear Monodimensional	41
2.6.4.2 Resonancia Magnética Nuclear en dos dimensiones	46
2.6.5 Dicroísmo circular	58
2.6.6 Difracción de Rayos X	59
3. PARTE EXPERIMENTAL	62
3.1 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos secundarios aislados de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	62
3.2 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos secundarios aislados de las ramas de <i>Maytenus segoviarum</i>	63
3.3 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos secundarios aislados de la raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	64
3.4 Técnicas espectroscópicas empleadas	65

3.5 Técnicas cromatográficas	66
3.6 Programas informáticos	68
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.1 Aislamiento y elucidación de los metabolitos secundarios de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	70
4.2 Aislamiento y elucidación de los metabolitos secundarios de las ramas de <i>Maytenus segoviarum</i>	77
4.3 Aislamiento y elucidación de los metabolitos secundarios de la raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	84
4.4 Elucidación estructural de los productos nuevos aislados de raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	
4.4.1 Triterpeno H-1	99
4.4.2 Triterpeno B-1	110
4.4.3 Triterpeno F-1	121
4.4.4 20 $\alpha$ -hidroxitingenona	130
4.5 Resumen de los datos experimentales de los productos nuevos aislados de la raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	139
4.5.1 Xylocarpina	139
4.5.2 Leonatriol	140
4.5.3 29-metiléster de Cangoronina	141
4.5.4 20 $\alpha$ -hidroxitingenona	142
5. CONCLUSIONES	144
6. RECOMENDACIONES	147
7. REFERENCIAS	149
Anexos	156

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Distribución geográfica de la Familia Celastraceae	5
2	<i>Catha edulis</i> Forsk	6
3	<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook	7
4	Hoja de <i>Maytenus segoviarum</i>	9
5	Árbol de <i>Maytenus segoviarum</i>	9
6	Flor y fruto de <i>Maytenus segoviarum</i>	10
7	Ubicación geográfica de <i>M. segoviarum</i> en la región Centroamericana	11
8	Arbusto y raíz de <i>Cassine xylocarpa</i> Vent.	13
9	Ubicación geográfica de <i>Cassine xylocarpa</i> en la región Centroamericana	14
10	Biogénesis de Terpenos	16
11	Estructura de la $\beta$ -Thujona	17
12	Estructura de Triptofordin F-2, Alatusinina y Euonymina	17
13	Estructura de la Triptolida	18
14	Esquema biosintético de triterpenos	19
15	Ejemplos de estructuras de celastroloides	20
16	Estructura de triterpenos frecuentes en celastráceas	21
17	Estructura del $\beta$ -Sitosterol	22
18	Estructura de Elaodendrosido A	23
19	Estructura del Ácido polpunónico	24
20	Triterpenos con esqueleto de oleano y ursano aislados de Celastráceas	25
21	Triterpenos con esqueleto de lupano frecuentes en la Familia Celastráceas	26
22	Estructura de la Ochraceolida A	27
23	Aparato de extracción continua Soxhlet	30
24	Cromatografía en capa fina: cámara de separación	32
25	Cromatografía en capa fina: Cámara UV-VIS, Cámara de revelado y capa fina revelada	32
26	Cromatografía en columna a vacío y Cromatografía a media presión (Cromatografía flash)	33

27	Esquema de aislamiento de un compuesto utilizando Cromatografía en Capa fina preparativa	35
28	Espectro Infrarrojo del sesquiterpeno V-1	37
29	Espectro de masas de sesquiterpeno J-1	38
30	Espectro UV del sesquiterpeno V-1	40
31	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de Boscialin	42
32	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ con desacoplamiento protónico de banda ancha de Boscialin	43
33	Experimentos DEPT con distinto ángulo	45
34	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ y experimentos DEPT para Boscialin	45
35	Representación de protones acoplados	47
36	Ampliación del espectro 2D COSY de una molécula	48
37	Experimento $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY para Boscialin	48
38	Espectro TOCSY de una molécula	49
39	Espectro 2D-TOCSY del 12,14-di- <i>t</i> -butilbenzo[g]criseno	50
40	Simulación de un espectro INADEQUATE	51
41	Representación de protones de una molécula	52
42	Esquema de un experimento 2D-NOESY para una molécula	52
43	Experimento <b>NOESY</b> para Boscialin	53
44	Representación de las correlaciones $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a dos y tres enlaces	54
45	Experimento <b>HMBC</b> ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ) del Boscialin	55
46	Experimento <b>HSQC</b> ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ) del Boscialin	57
47	Dicroísmo circular de S-1 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>S</i> )-1,2,6,9,15-pentaacetoxi-4-hidroxi-8-oxodihidro- $\beta$ -agarofurano	59
48	Difractograma de Rayos X del ácido D:A-friedoolean-24-al-3-en-2-on-29-oico (Cangoronina)	60
49	Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	70
50	Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de las ramas de <i>Maytenus segoviarum</i>	77

<b>51</b>	Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de la raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	84
<b>52</b>	Metabolitos secundarios nuevos en la literatura química, aislados de la raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	86
<b>53</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de H-1	100
<b>54</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C con desacoplamiento protónico de banda ancha y Experimentos DEPT 90° y 135° para H-1	101
<b>55</b>	Experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para H-1	102
<b>56</b>	Ampliación de experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para H-1	103
<b>57</b>	Ampliación de experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para H-1	104
<b>58</b>	Experimento <b>HSQC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para H-1	105
<b>59</b>	Experimento <b>ROESY</b> para H-1	106
<b>60</b>	Estructuras de baccharanos y D:B-friedobaccharanos	109
<b>61</b>	Estructuras de Baruol y Leonal	110
<b>62</b>	Estructura de un triterpeno de la serie del glutinano	111
<b>63</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de B-1	111
<b>64</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C con desacoplamiento protónico de banda ancha y experimentos DEPT 90° y 135° para B-1	112
<b>65</b>	Ampliación de experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para B-1	113
<b>66</b>	Experimento <b>HSQC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para B-1	114
<b>67</b>	Experimento <b>ROESY</b> para B-1	115
<b>68</b>	Confórmero de mínima energía para Leonatriol (B-1)	115
<b>69</b>	Ruta biosintética propuesta para la formación de Baruol y Leonal	118
<b>70</b>	Ruta biosintética propuesta para la formación de Leonatriol	119
<b>71</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de F-1	122
<b>72</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C con desacoplamiento protónico de banda ancha y experimentos DEPT 90° y 135° para F-1	123
<b>73</b>	Experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para F-1	124
<b>74</b>	Ampliación de experimento <b>HMBC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para F-1	125
<b>75</b>	Experimento <b>HSQC</b> ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) para F-1	126
<b>76</b>	Experimento <b>ROESY</b> para F-1	127

77	Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de la $20\alpha$ -hidroxitingenona aislada de <i>Cassine xylocarpa</i>	131
78	Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de la $20\beta$ -hidroxitingenona aislada de <i>Cassine xylocarpa</i>	131
79	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la $20\alpha$ -hidroxitingenona	133
80	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ con desacoplamiento protónico de banda ancha y experimentos DEPT $90^\circ$ y $135^\circ$ para la $20\alpha$ -hidroxitingenona	134
81	Ampliación de experimento <b>HMBC</b> ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ) para la $20\alpha$ -hidroxitingenona	135
82	Experimento <b>HSQC</b> ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ) para la $20\alpha$ -hidroxitingenona	136
83	Experimento <b>ROESY</b> para la $20\alpha$ -hidroxitingenona	137

## ÍNDICE DE TABLAS

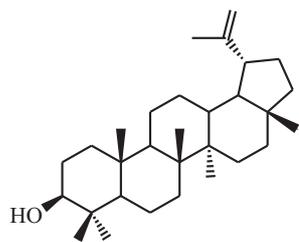
No.	CONTENIDO	PÁGINA
1	Diferentes experimentos DEPT	44
2	Constantes de acoplamiento de H-21 con H-22	106
3	Datos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de la xylocarpina (3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-3 $\beta$ (25)-epoxi-olean-12-eno)	107
4	Datos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del Leonatriol	116
5	Datos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) del 29-metiléster de la Cangoronina	128
6	Datos de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) de la 20 $\alpha$ - hidroxitingenona	138

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

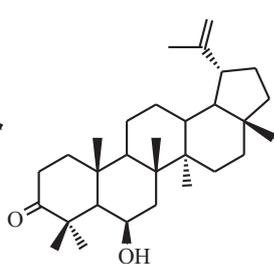
<b>No.</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Separación de los metabolitos secundarios de las hojas de <i>Maytenus segoviarum</i>	71
2	Separación de los metabolitos secundarios de las ramas de <i>Maytenus segoviarum</i>	78
3	Separación de los metabolitos secundarios de la corteza de raíz de <i>Cassine xylocarpa</i>	87

ÍNDICE DE PRODUCTOS CONOCIDOS AISLADOS DE *Maytenus segoviarum* y  
*Cassine xylocarpa*

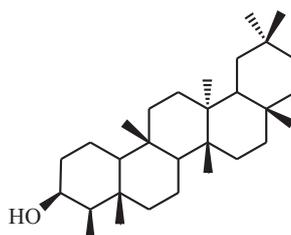
NOMBRE QUÍMICO	PÁGINA
Lupeol	75
6 $\beta$ -hidroxi-lupan-3-ona	79
<i>Epifriedelanol</i>	72
Friedelina	73
Tingenona	88
Pristimerina	89
Celastrol	92
20 $\beta$ -hidroxitingenona	90
22-hidroxitingenona	91
6-oxopristimerol	94
7-hidroxi-6-oxopristimerol	93
3- <i>O</i> -metil-6-oxotingenol	95
3 $\beta$ ,29-dihidroxi-5-eno	96
$\alpha$ -Amirina	74
Euonymina	80
4-hidroxi-7- <i>epicuchuhuanina</i> E-V	81
2-deacetil-evonina	82
Forrestina	83
$\beta$ -sitosterol	76
Siringaldehído	97



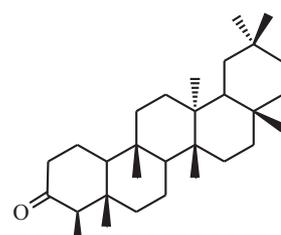
**Lupeol**  
pág. 75



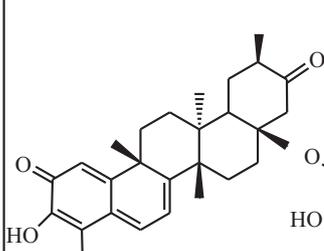
**6β-hidroxi-lupan-3-ona**  
pág. 79



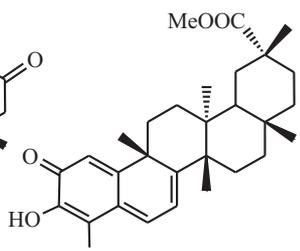
**Epifriedelanol**  
pág. 72



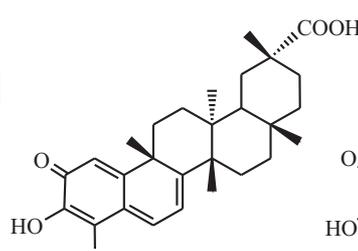
**Friedelina**  
pág. 73



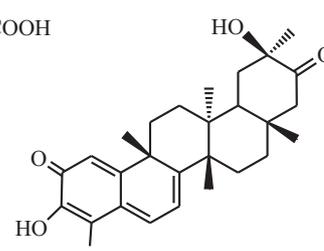
**Tingenona**  
pág. 88



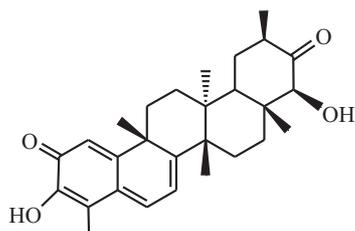
**Pristimerina**  
pág. 89



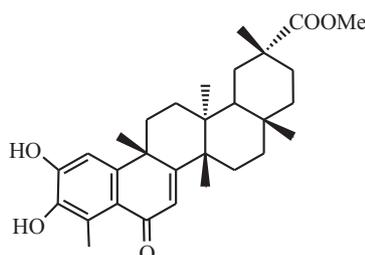
**Celastrol**  
pág. 92



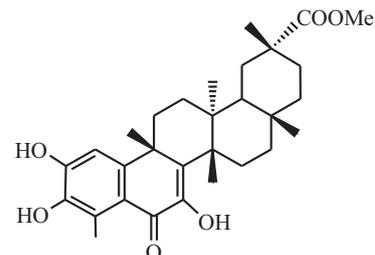
**20β-hidroxitingenona**  
pág. 90



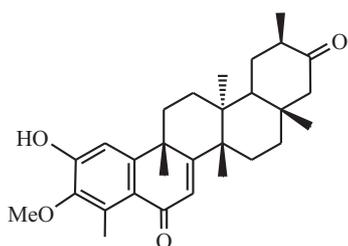
**22-hidroxitingenona**  
pág. 91



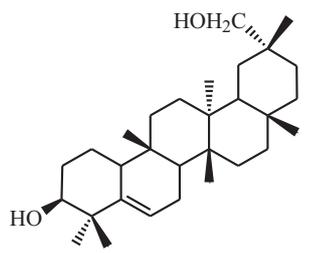
**6-oxopristimerol**  
pág. 94



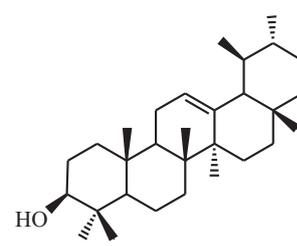
**7-hidroxi-6-oxo-pristimerol**  
pág. 93



**3-O-metil-6-oxotingenol**  
pág. 95



**3β, 29-dihidroxi-glut-5-eno**  
pág. 96



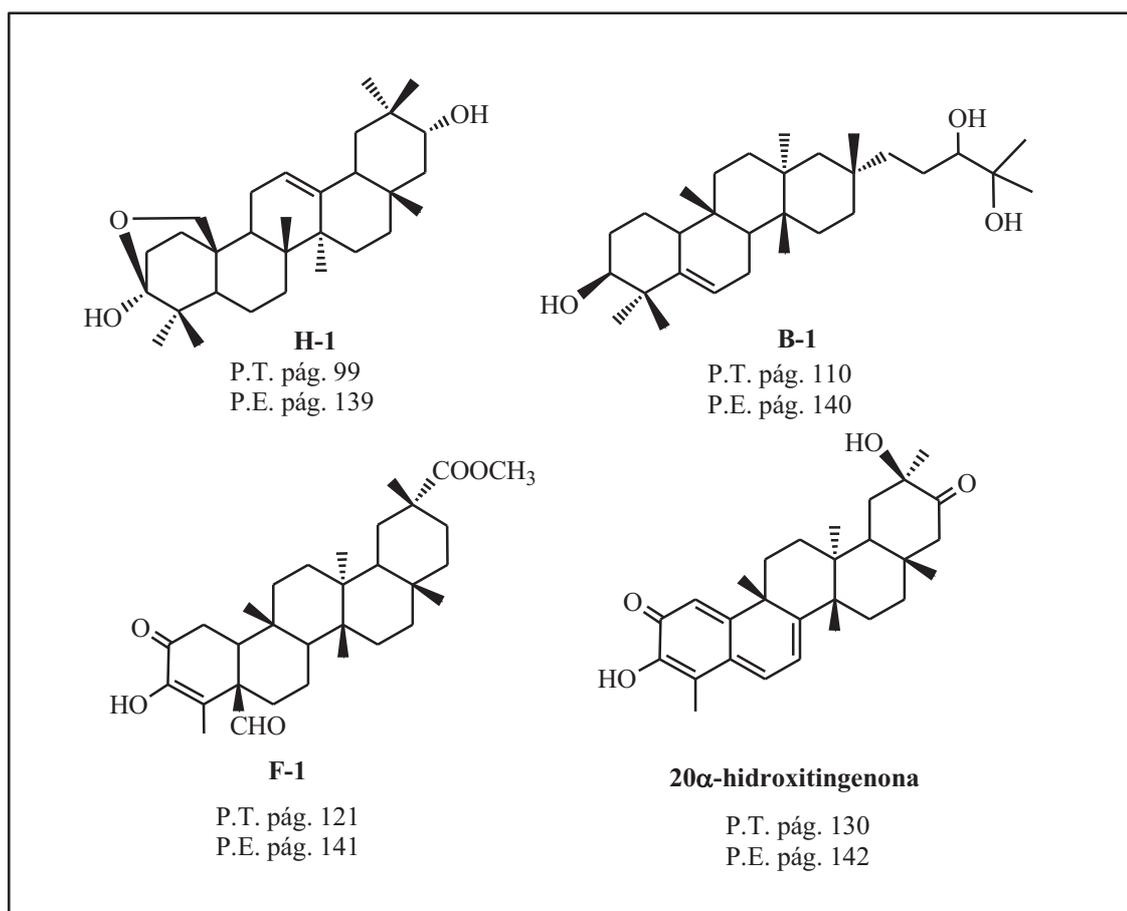
**α-Amirina**  
pág. 74

Continua



## ÍNDICE DE PRODUCTOS NUEVOS AISLADOS DE RAÍZ DE *Cassine xylocarpa*

PRODUCTO	NOMBRE QUÍMICO	PÁGINA	
		PARTE TEÓRICA	PARTE EXPERIMENTAL
H-1	XYLOCARPINA (3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-3 $\beta$ (25)-epoxi-olean-12-eno)	99	139
B-1	LEONATRIOL (3 $\beta$ ,21,22-trihidroxi-baccharan-5-eno)	110	140
F-1	29-METILESTER DE LA CANGORONINA (3-hidroxi-3,4-didehidro-5-formil-2-oxo-D:A-friedoolean-29-carboxilato de metilo)	121	141
	20 $\alpha$ -HIDROXITINGENONA	130	142



## ÍNDICE DE ANEXOS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1.1	Espectro UV de H-1	157
1.2	Espectro IR de H-1	158
1.3	Espectro de Masas de H-1	159
2.1	Espectro UV de B-1	160
2.2	Espectro IR de B-1	161
2.3	Espectro de Masas de B-1	162
3.2	Espectro UV de F-1	163
3.2	Espectro IR de F-1	164
3.3	Espectro de Masas de F-1	165
4.1	Espectro UV de la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona	166
4.2	Espectro IR de la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona	167
4.3	Espectro de Masas de la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona	168



## 1. Introducción

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante miles de años, el hombre ha hecho uso de los beneficios de las drogas provenientes de la naturaleza. Las cuales están constituidas por extractos de plantas, animales y por algunas sales inorgánicas. En la India, la medicina Ayurvédica dio paso a una gran variedad de medicinas de origen vegetal, conocidas desde 1000 años antes de Cristo, mientras que las primeras prescripciones de la medicina china datan de unos 500 años antes de Cristo. Cabe destacar, además, que ya desde el año 800, los monjes Benedictinos tenían un profundo conocimiento de las hierbas y su uso en medicina, eran capaces de aplicar *Papaver somniferum*, no sólo para el tratamiento del dolor, sino también para anestesiarse a los pacientes. El principio activo, la morfina, fue aislada por primera vez en 1806 y la preparación de una droga analgésica fue realizada por E. Merck en Alemania, en 1826. Hasta el presente, pese a los esfuerzos por sintetizar drogas que reemplacen a la morfina, ninguna alternativa se puede ofrecer aún a los pacientes con dolores severos, como en la fase terminal del cáncer.<sup>1</sup>

Gradualmente, cuando el conocimiento acerca de las drogas aumentó, las disciplinas especializadas se convirtieron en una necesidad. A principios del siglo XIX la materia médica empezó a dividirse en Farmacología (acción de los fármacos) y Farmacognosia (todos los aspectos de las drogas de origen vegetal, animal y mineral, con menos énfasis en la acción). A finales del siglo XIX los químicos empezaron a sintetizar una gran variedad de compuestos orgánicos con estructuras de complejidad creciente, algunos útiles como agentes terapéuticos. Dado que el estudio de estos productos caía fuera del alcance de la Farmacognosia, la disciplina llamada Química Médica (la ciencia de los fármacos sintéticos), dormida desde los tiempos de Paracelso, cobró nuevo vigor. Esta situación prevaleció hasta mediados del siglo XX, cuando la Farmacognosia y la Química Médica empezaron a emerger.<sup>2</sup>

Muchos fármacos del mercado han llegado hasta nosotros mediante el uso folclórico o por culturas indígenas. Estos fármacos están siendo usados de alguna manera en la medicina moderna, aunque no necesariamente con el mismo propósito para el que eran empleados por

los indígenas. La medicina folclórica ha sido una herramienta útil para el descubrimiento de muchos de los medicamentos que usamos y de otras sustancias biológicamente activas.<sup>3</sup>

En la década de los 70 y 80, los productos naturales pasaron por una fase de reducido interés en el descubrimiento de drogas, debido a los enormes esfuerzos necesarios para aislar los principios activos y elucidar sus estructuras. Sin embargo, el desarrollo tecnológico que ha permitido reducir el tiempo y la cantidad de muestra para llevar a cabo el aislamiento, elucidación estructural y ensayos biológicos, junto con el amplio espectro de variación estructural encontrado en la naturaleza, han hecho resurgir el interés por los productos naturales.<sup>4</sup>

Dado que sólo un pequeño porcentaje de los organismos vivientes en la biosfera han sido descritos hasta la fecha, existe un enorme reservorio de compuestos naturales sin descubrir, con una amplia diversidad estructural.<sup>3</sup>

Estos ofrecen compuestos que abren enfoques terapéuticos nuevos; además, han contribuido sustancialmente a la identificación y entendimiento de nuevas rutas biogénicas, con lo que no sólo se dispone de drogas, sino que también han sido una herramienta esencial para la Bioquímica, la Biología Molecular y el desarrollo académico de estas disciplinas.<sup>1</sup>

En las últimas décadas del siglo XX, con pocas excepciones, el desarrollo de fármacos sigue una lógica progresión a partir de un compuesto natural sin modificar, normalmente extraído de una planta, el cual es sometido a una modificación sintética hasta llegar a un compuesto puramente sintético que no muestra ninguna relación aparente con sus antepasados naturales.

Investigaciones fitoquímicas recientes realizadas en dos especies de la Familia Celastraceae, pertenecientes a la flora salvadoreña, *Maytenus chiapensis* y *Crossopetalum uragoga*,<sup>5</sup> dieron como resultado el aislamiento y elucidación de más de 100 metabolitos secundarios, 26 de los cuales resultaron nuevos en la bibliografía química, destacándose los

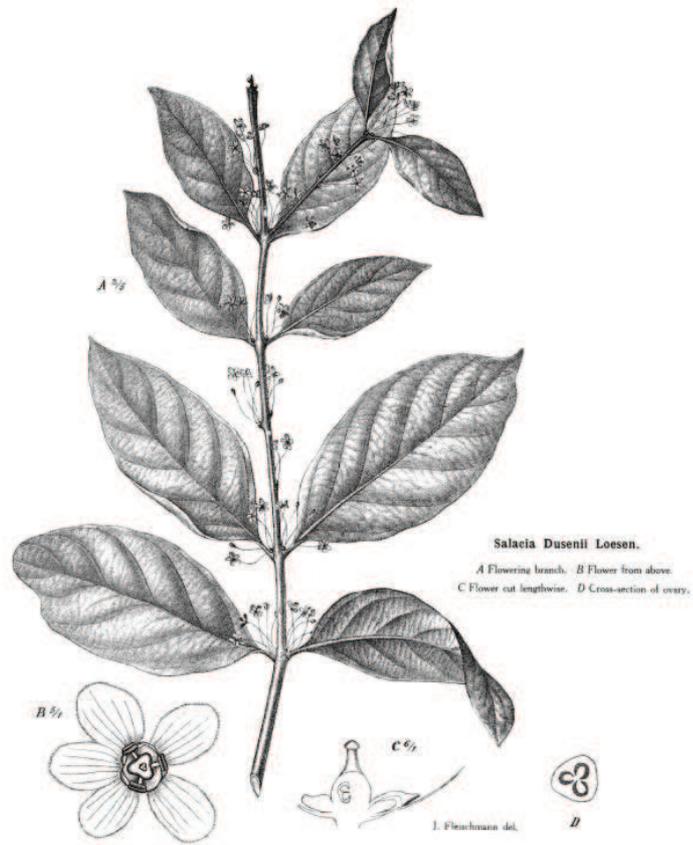
sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarofurano, alcaloides sesquiterpénicos, diterpenos del abietatrieno, triterpenos de la serie del baccharano, lupano, friedelano y oleano.

En el presente trabajo se presentan los resultados del aislamiento y elucidación de los metabolitos secundarios de dos especies de celastráceas de la flora salvadoreña: *Maytenus segoviarum* y *Cassine xylocarpa*, que se recolectaron en las cercanías del Río “El Sapo”, Morazán y en el Parque Nacional “El Imposible”, Ahuachapán, respectivamente.

Después de sucesivas cromatografías y con el empleo de técnicas espectroscópicas y la comparación con diferentes artículos científicos, se estableció la estructura de los compuestos aislados del extracto diclorometánico de las hojas de *Maytenus segoviarum*, obteniendo cinco productos conocidos en la literatura química, cuatro triterpenos: *epifriedelanol*, *friedelina*,  $\alpha$ -*amirina*, *lupeol* y un esteroide:  $\beta$ -*sitosterol*.

Del extracto diclorometánico de las ramas de *Maytenus segoviarum* se aislaron seis productos conocidos en la literatura química, dos triterpenos del lupano: *lupeol* y  $6\beta$ -*hidroxilupan-3-ona*, y cuatro alcaloides sesquiterpénicos: *euonymina*, *4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V*, *2-deacetilevonina* y *forrestina*.

Del extracto de *n*-hexano/éter etílico (1:1) de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* se aislaron trece productos conocidos en la literatura química, once triterpenos: *tingenona*, *pristimerina*,  $20\beta$ -*hidroxitingenona*,  $22$ -*hidroxitingenona*,  $7$ -*hidroxi-6-oxopristimerol*,  $6$ -*oxopristimerol*, *celastrol*,  $3$ -*O*-*metil-6-oxotingenol*,  $3\beta,29$ -*dihidroxi-5-eno*,  $\alpha$ -*amirina*, *lupeol*; un esteroide:  $\beta$ -*sitosterol*, y un derivado del ácido shikímico: *siringaldehído*. Además se aislaron, **cuatro triterpenos nuevos en la bibliografía química**, cuyas estructuras se elucidaron mediante un cuidadoso estudio de sus datos espectroscópicos y espectrométricos:  **$3\alpha,21\alpha$ -dihidroxi- $3\beta(25)$ -epoxi-olean-12-eno** (*xylocarpina*, triterpeno de la serie del oleano),  **$3\beta,21,22$ -trihidroxi-baccharan-5-eno** (*leonatriol*, triterpeno de la serie del baccharano),  **$3$ -hidroxi- $3,4$ -didehidro- $5$ -formil- $2$ -oxo-D:A-friedoolean-29-carboxilato de metilo** ( $20$ -metiléster de *cangoronina*, triterpeno de la serie del friedelano) y  **$20\alpha$ -hidroxitingenona** (triterpeno metilénquinona).



## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

## 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 2.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA CELASTRACEAE

La familia Celastraceae es conocida comúnmente como familia agridulce (bittersweet), debido al sabor de sus frutos.<sup>6</sup>

La clasificación botánica de esta familia ha experimentado cambios debido a las hibridaciones.<sup>7</sup> Así, el género *Maytenus* incluye actualmente las especies antiguamente incluidas en *Gymnosporia* y algunas especies de *Rhacoma*, hoy en día son incluidas en el género *Crossopetalum*, dando lugar a que muchas especies tengan varios sinónimos.



**Fig. 1** Distribución geográfica de la familia Celastraceae (en rosado).

Las especies de la familia Celastráceas son árboles o arbustos que comprenden aproximadamente 98 géneros y 1211 especies<sup>8</sup> que incluyen trepadoras, con distribución pantropical, aunque existe un gran número de especies distribuidas en climas cálidos y calido-templados (Fig. 1). Los géneros más representativos son *Maytenus* con 255 especies, *Eonymus* con 200 especies, *Cassine* con 40 especies y *Celastrus* con 30 especies<sup>9,10</sup>. Doce géneros de esta familia han sido reportados en Centroamérica.<sup>11</sup>

Numerosas especies de la familia Celastraceae son conocidas por su uso en la medicina tradicional o en la agricultura en todo el mundo, especialmente en Asia y América Latina.

Así por ejemplo, *Catha edulis* Forsk, conocido como “khat” (Fig. 2), es un arbusto de hojas perennes que crece a lo largo de la Costa este de África y de la península Arábiga. Las hojas y brotes del “khat” son masticadas por sus efectos estimulantes y ello constituye un evento social. Su consumo produce una sensación de bienestar y excitación, sin embargo presenta numerosos efectos secundarios como son insomnio y falta de concentración y el uso abusivo del “khat” crea grandes problemas de salud, sociales y económicos.<sup>12</sup>



**Fig. 2** *Catha edulis* Forsk

Otro ejemplo del uso de especies de celastráceas en la cultura tradicional es *Tripterygium wilfordii* Hook (Fig. 3), conocida comúnmente en China como “Lei Gong Teng” y que es sin lugar a dudas, la especie más estudiada y de la que se han aislado mayor número de principios activos. Las raíces molidas de esta especie se han usado en China durante siglos por sus propiedades insecticidas.<sup>13</sup>

Recientemente, extractos crudos y extractos refinados de *T. wilfordii* se están usando en clínica para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedades autoinmunes y diversas afecciones dérmicas.<sup>14</sup> Existen diversas patentes sobre el uso de la raíz

seca de esta especie como antitumoral y de la actividad del extracto clorofórmico como inmunosupresor y antiinflamatorio.<sup>15</sup>



**Fig. 3** *Tripterygium wilfordii* Hook

## 2.2 GÉNERO: *Maytenus*

El género *Maytenus* consta de 255 especies; su distribución es pantropical y es endémico de Centro y Sudamérica<sup>16</sup>. En el Ecuador se han registrado 5 especies; en los bosques andinos se conocen 3 especies: *Maytenus jamesonii* Briq., *M. prunifolius* Presl y *M. verticillatus* DC., Reportándose además 15 especies en Perú y 15 en Venezuela.<sup>17</sup> En Centroamérica se encuentran 11 especies.<sup>11</sup>

El género *Maytenus* fue descrito en una obra pre-Linneo por Feullée bajo el nombre de “maitén” basándose en la especie *Maytenus boaria*. Posteriormente, fue Molina en 1972 quien describió esta especie, no obstante cometió muchos errores morfológicos, lo que motivo que algunos botánicos confundieran su descripción ubicándola en otras familias o creando otros géneros.

Las plantas del género *Maytenus* tienen una larga historia de empleo en la medicina popular de varios pueblos. En la cultura Guaraní, se empleaba la corteza de diversas especies

de *Maytenus*, por ejemplo, *M. ilicifolia* se empleaba para el control de la natalidad, además han mostrado actividad anti-inflamatoria.<sup>18</sup>

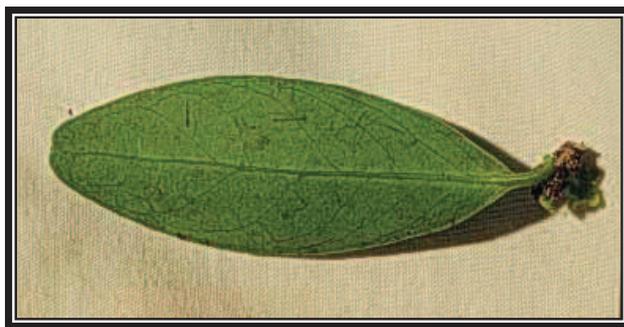
Muchos compuestos con actividad biológica han sido aislados de estas plantas, como los maitensinoides con actividad insecticida, alcaloides sesquiterpénicos piridínicos con actividad antialimentaria e inmunosupresora, poliésteres sesquiterpénicos con actividad antitumoral, triterpenoquinonas y dímeros triterpénicos con actividad antimicrobiana, sesquiterpenos con actividad antialimentaria y *nortriterpeno* metilénquinonas con actividad antimicrobiana.<sup>19</sup>

*Maytenus*, es el único genero representante de la familia Celastraceae, del que se han aislado e identificado diferentes compuestos derivados del núcleo  $\beta$ -agarofurano, los cuales comparados con otros compuestos similares, se presentan como promisorios insecticidas naturales.

#### **Descripción botánica de *Maytenus segoviarum***

Popularmente conocida como “Cola de pavo”, árbol pequeño o arbusto de 4 a 9 m de altura, hojas simples (Fig. 4), alternas, de 3.5 - 7(11) por 1.5 - 3(4) cm., elípticas, ápice agudo, redondeado, borde aserrado-dentado y de color grisáceo cuando están secas, ramitas anguladas, verdosas; estípulas diminutas y rojizas (Fig. 5).

Inflorescencias fasciculadas, flores muy pequeñas y verdosas (Fig. 6), observadas en los primeros seis meses del año y en diciembre. Frutos tipo cápsulas (Fig. 6), de 1 a 1.5 cm de largo, de globosos a obovoides, anaranjados cuando maduros, observados entre marzo, agosto, octubre y noviembre.



**Fig. 4** Hoja de *Maytenus segoviarum*



**Fig. 5.** Árbol de *Maytenus segoviarum*

Una especie con la que se confunde es *M. recondita* y de la que se reconoce por el habitat en que crece *Maytenus segoviarum* (vertiente de la zona del Pacifico) y por el clima seco en el que habita.



**Fig. 6** Flor (a) y Fruto (b) de *M. segoviarum*

- Información taxonómica:

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (Dic.)

Orden: Celastrales

Familia: Celastraceae

Nombre científico: *Maytenus segoviarum* Standl. & L. O. Williams

- Información de recolección en El Salvador<sup>22</sup>

Determinada por: R.A. Carballo, 12 Mayo 2003

Lugar de recolección: En la zona del parqueo del área protegida de El Río Sapo, Arambala, Morazán.

Elevación: 690 m

Coordenadas: 13.55N 088.06W  
Recolector(es): R.A. Carballo y J. Monterrosa  
Número de Colección: RAC00717  
Fecha de recolección: 30 Abril 2003  
Clasificación Botánica: J. Monterrosa & C. Rivera 704 (JMS-704)

La Fig. 7 muestra la presencia y distribución de *Maytenus segoviarum* en la región centroamericana.



**Fig. 7.** Ubicación geográfica de *M. segoviarum* en la región Centroamericana  
(Imagen satelital reportada por el Jardín Botánico de Missouri)

### 2.3 GÉNERO: *Cassine*

*Cassine*, nombre dado en la lengua de los indios americanos Timucua a una bebida (cassena) preparada con las hojas de *Ilex vomitoria*, de frutos parecidos.<sup>20</sup>

Comprende unas 40 especies nativas de los trópicos y subtrópicos. Son arbustos o árboles siempre verdes con ramillas tetraédricas y hojas alternas u opuestas, enteras o aserradas, coriáceas. Flores pequeñas dispuestas en cimas axilares. Perianto con 3-5 segmentos, con los sépalos a veces carnosos y los pétalos mayores que los sépalos. Androceo con 3-5 estambres más cortos que los pétalos. Fruto indehisciente, drupáceo, oblongo-globoso, ligeramente carnoso.<sup>21</sup>

#### Descripción botánica de *Cassine xylocarpa*

- Sinónimos:

*Elaodendron xylocarpum* (Vent.) DC

*Elaodendron dioicum* (Macfad.) Griseb.

*Elaodendron attenuantum* A. Rich.

*Cassine rotundata* (DC) Kuntze

*Freziera dioica* Macfad

Árbol jaspeado (Fig. 8), también conocido como árbol cuchara, árbol peligroso, coscorrón, aceituno, guayarote, mate prieto, pininpinche de sabana, bois-tan. Es un arbusto verde o árbol pequeño comúnmente de 2 a 4 metros de altura y de 5 a 8 cm de diámetro. Hojas simples, opuestas, a veces algunas alternas, de 2.5 - 10 por 1.2 - 3.3(6) cm, de obovadas a elípticas, ápice de obtuso a corto acuminado, glabras, finamente reticuladas en el envés, borde aserrado-crenado; pecíolo aplanado de hasta 1.5 cm de largo.

Inflorescencias racemosas o pequeñas panículas, de 1 - 3.5 cm de largo, axilares. Flores blanco verdosas o amarillentas, muy pequeñas y escasas en el árbol. Frutos tipo drupa, de 1.7 -

3 por 1.5 - 2 cm, de globosos a oblongo-elipsoidales, muy duros y amarillos cuando maduros; semillas hasta 1 cm de largo. La planta es soportada por un sistema de raíz lateral de poca profundidad y algunas veces una raíz principal distinguible. Las raíces son naranjas y rígidas. Las flores son observadas en febrero y los frutos en mayo.

Por la forma, venación y borde de sus hojas, se parece a otros géneros de la Familia, como *Maytenus*, *Wimmeria* y *Zinowiewia*; de los primeros se diferencia por sus hojas principalmente opuestas y del último por el borde aserrado-crenado.

Las características de las hojas de esta especie también la asemejan a otros géneros, como *Symplocos* (Symplocaceae) y *Symplococarpon* (Theaceae), pero las hojas opuestas y las estípulas diminutas en las ramitas permiten descartarlos a ambos.



**a**



**b**

**Fig. 8.** Arbusto (a) y raíz (b) de *C. xylocarpa* Vent.

- Información taxonómica:

Reino: Plantae  
Filo: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida (Dic.)  
Orden: Celastrales  
Familia: Celastraceae  
Nombre científico: *Cassine xylocarpa* Vent.

- Información de Recolección en El Salvador<sup>22</sup>

Determinada por: J. Linares  
Información de recolección: El Salvador, Ahuachapán, San Benito, El Imposible  
Elevación: 1425 m.s.n  
Coordenadas: 14.25 N 089.21W  
Recolector(es): Max Sandoval  
Número de Colección: ISB874  
Fecha de recolección: 25 de marzo de 1995  
Clasificación botánica: V. Campos s.n. (ISF-153)

En El Salvador es reportada la presencia de esta especie en el Parque Nacional “El Imposible”, Departamento de Ahuachapán. (Fig. 9)



**Fig. 9** Ubicación geográfica de *Cassine xylocarpa* en la región Centroamericana  
(Imagen satelital reportada en el Jardín Botánico de Missouri)

## 2.4 METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA FAMILIA CELASTRACEAE

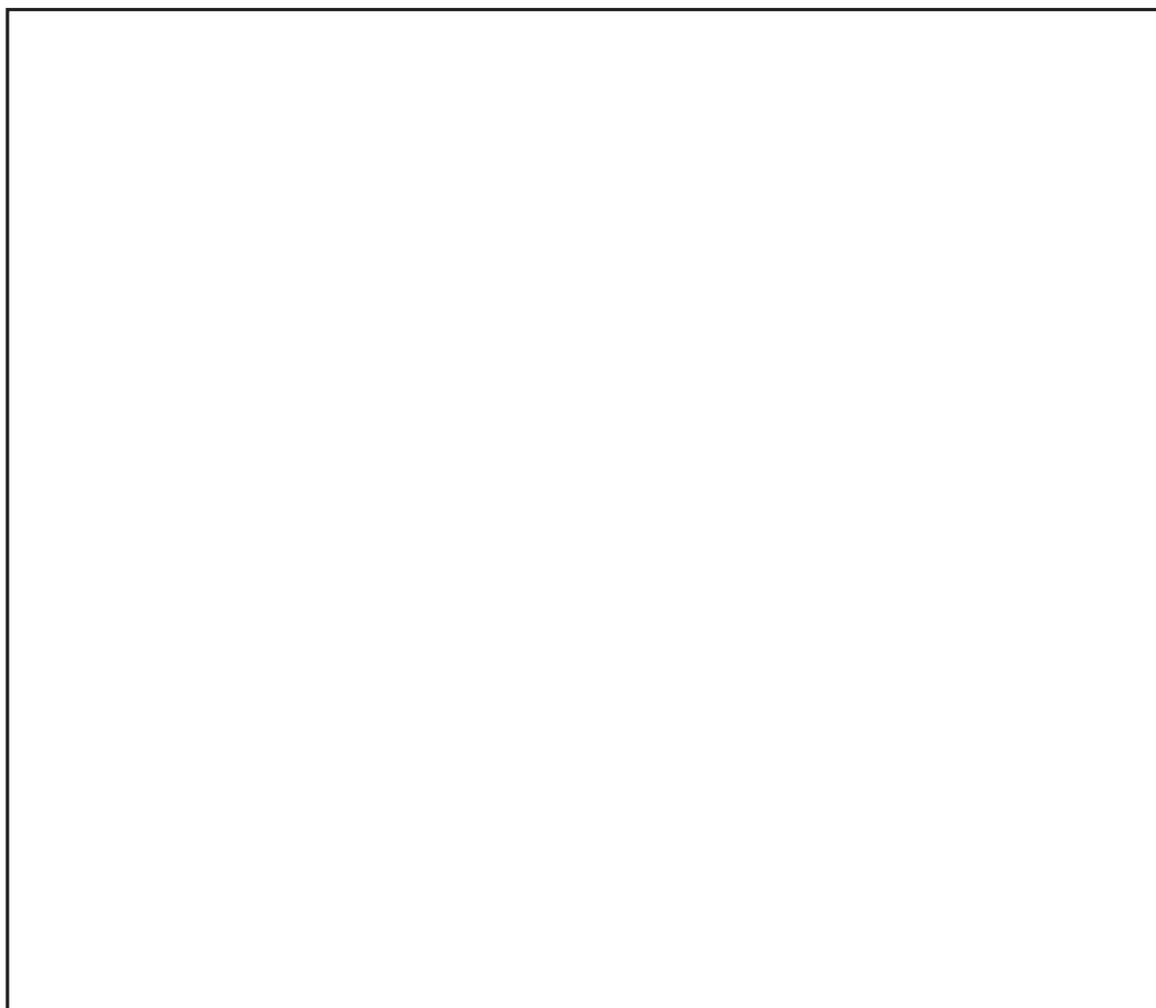
Los metabolitos secundarios, juegan un papel importante en la supervivencia del organismo en un ecosistema determinado, proporcionándole las sustancias de defensa u otros compuestos fisiológicamente importantes, a diferencia, de los metabolitos primarios, que constituyen la maquinaria básica para mantener la vida y son comunes a todos los seres vivos, en el vegetal le ayudan a su desarrollo, obtención de energía, morfogénesis y reproducción. La mayoría carecen de interés farmacéutico, ejemplos de ellos lo constituyen: Azúcares, Lípidos, Proteínas, Ácidos nucleicos y Aminoácidos.<sup>23</sup>

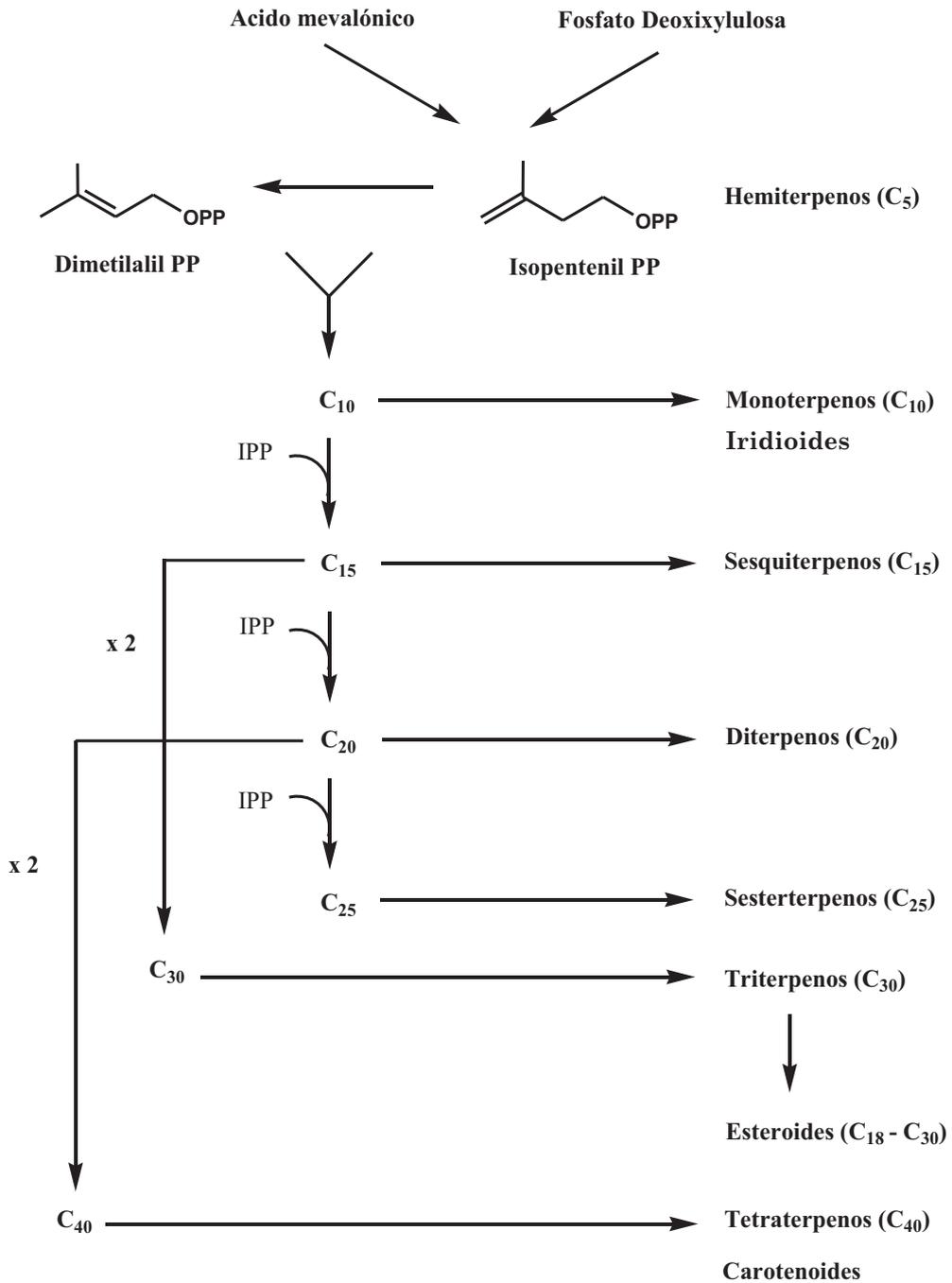
El grupo más numeroso de metabolitos secundarios aislados de la Familia Celastraceae sin duda son los **terpenoides**. Estos son un grupo de metabolitos secundarios con gran diversidad estructural, que están formados por la repetición de una unidad de isopreno, que se unen entre sí, mediante una reacción “cabeza-cola”.

Las estructuras típicas contienen esqueleto de carbono representados por  $(C_5)_n$ , y son clasificados como: hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), sesterterpenos ( $C_{25}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) y tetraterpenos ( $C_{40}$ ). (Fig. 10).

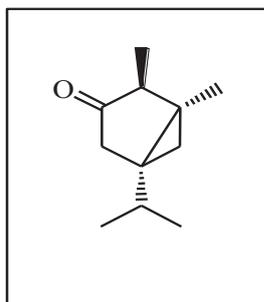
La ruta biogénica se inicia por condensación de dos moléculas de Acetil-CoA, dando acetoacetil-CoA, la cual se condensa a su vez con otra molécula de Acetil-CoA originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA.<sup>24</sup>

Los **monoterpenos** ( $C_{10}$ ), son biogénicamente derivados de dos unidades de isopreno que están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos: plantas, microorganismos e insectos; algunos tiene función específica en el individuo productor y varios presentan actividades biológicas de distinta naturaleza, son compuestos volátiles que forman parte de los aceites esenciales. La  $\beta$ -thujona (Fig. 11), es el monoterpeno responsable del olor característico de las hojas frescas del *Catha edulis* Forsk “khat”.<sup>25</sup>





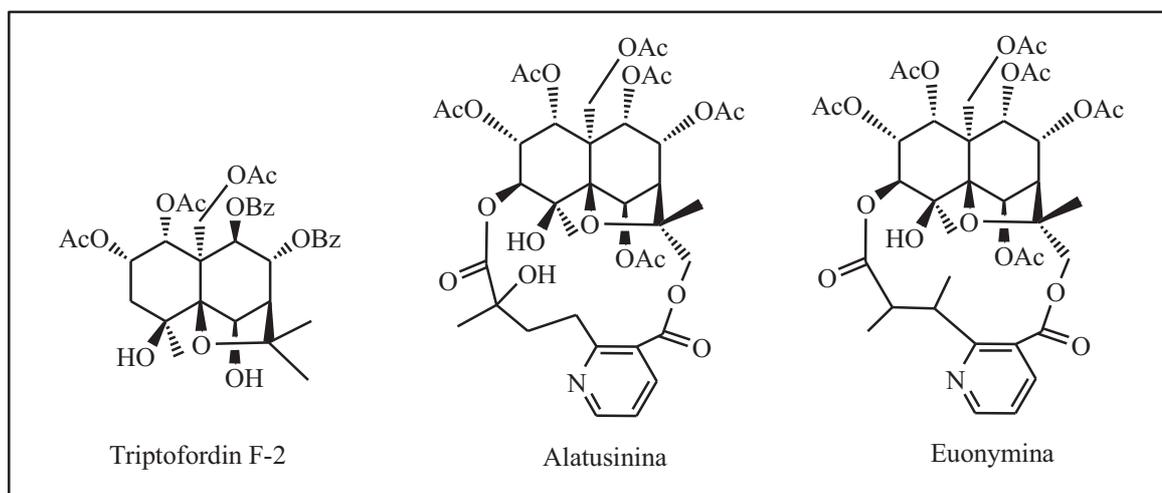
**Fig. 10** Biogénesis general de Terpenos



**Fig. 11** Estructura de la  $\beta$ -Thujona

Los **sesquiterpenos** y **alcaloides sesquiterpénicos**, con esqueleto básico de dihidro- $\beta$ -agarofurano, se consideran indicadores quimiotaxonómicos de la familia Celastraceae. (Fig. 12)

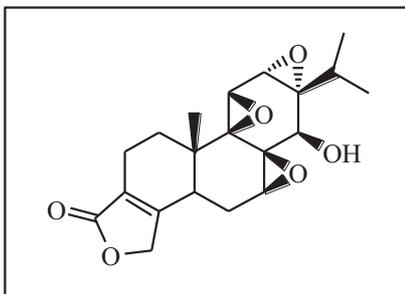
Se les ha descrito una gran diversidad de propiedades como antialimentarias e insecticidas y recientemente, como inmunosupresoras, antitumorales, inhibidoras de la multirresistencia a fármacos y de la activación del virus Epstein-Barr, así como actividad anti-VIH.<sup>26</sup>



**Fig. 12** Estructura de Triptofordin F-2 (sesquiterpeno agarofuránico), Alatusinina y Euonymina (alcaloides sesquiterpénicos)

Los **diterpenos**, son poco frecuentes en esta familia, se han aislado algunos metabolitos con esqueletos de isopimarano, abietano y abietatrieno. Estos últimos, poseen estructuras muy

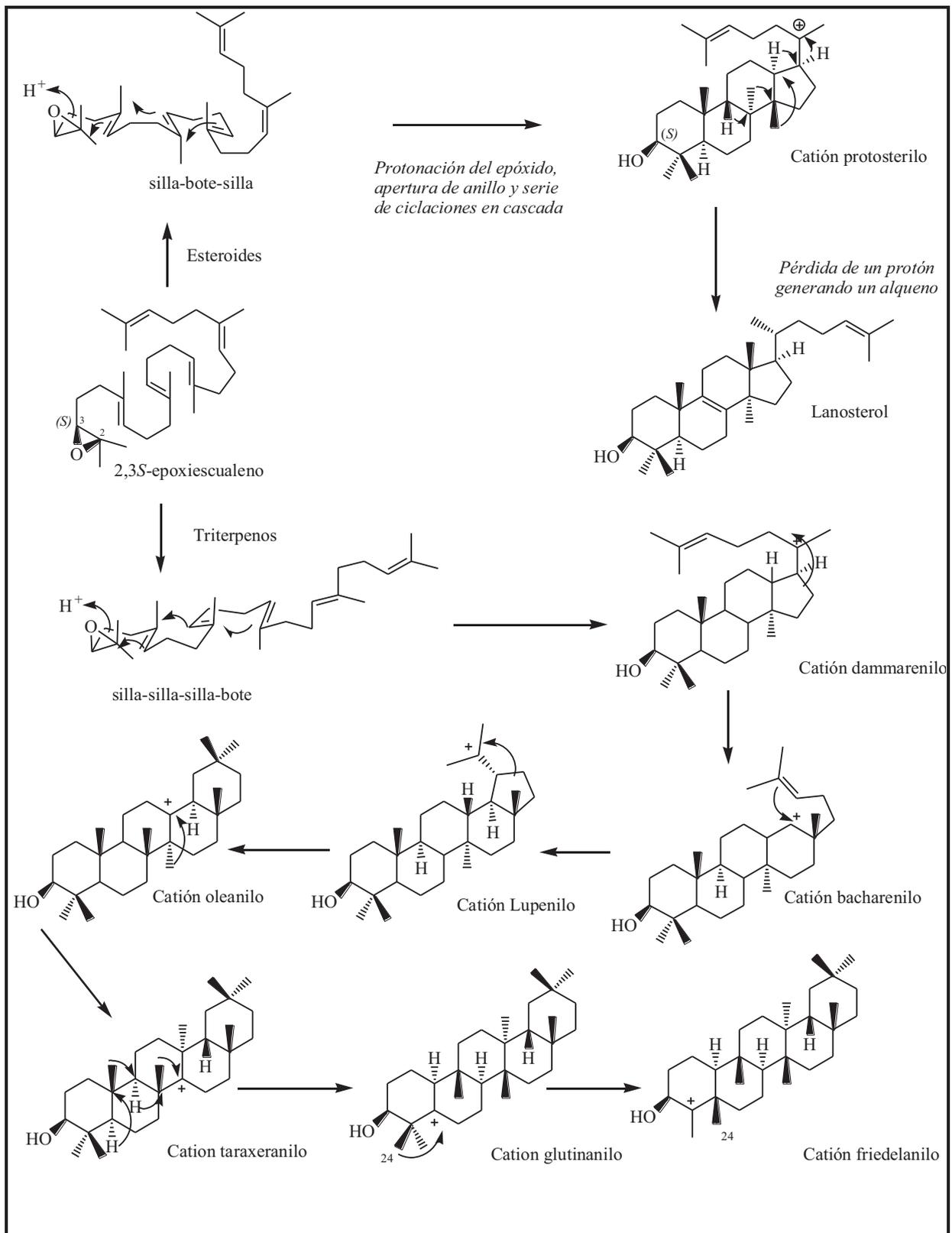
oxidadas como la triptolida (Fig. 13), un triepóxido aislado de las raíces de *T. wilfordii* y uno de los responsables de la actividad antileucémica e inmunosupresora de esta planta,<sup>27</sup> que se comercializa en China, además para el control de la fertilidad.<sup>28</sup>



**Fig. 13** Estructura de la Triptolida

Los **triterpenos**, constituyen un grupo muy amplio de metabolitos secundarios, con más de 5000 compuestos descritos hasta el momento, que pueden dividirse en diferentes familias químicas.

Estos terpenos se forman por la unión de dos unidades de farnesil pirofosfato, que da lugar al escualeno, el cual es epoxidado enantioselectivamente por la cara  $\beta$  mediante la acción enzimática, formándose el 3*S*,2,3-epoxiesqualeno.<sup>24</sup> La mayoría de los esqueletos triterpénicos, tanto tetracíclicos como pentacíclicos, derivan de la ciclación del conformero *silla-silla-silla-bote* de este epóxido. Mediante la apertura regioselectiva del grupo epóxido y a través de una secuencia de adiciones electrofílicas sobre los dobles enlaces presentes en la molécula, se generan los correspondientes anillos, formándose así el intermedio clave, el catión dammarenilo. (Fig. 14)

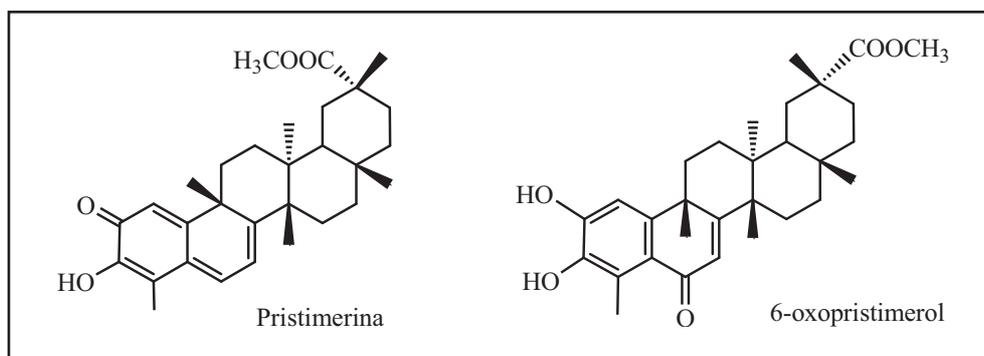


**Fig. 14** Esquema biosintético de triterpenos

La mayoría de los triterpenos naturales y esteroides contienen un grupo hidroxilo en el carbono 3 que proviene del epóxido del escualeno.

Un grupo importante de triterpenos pentacíclicos se obtienen a partir del catión dammarenilo. Están constituidos por un esqueleto de 30 carbonos que pueden estar dispuestos en cinco anillos de seis miembros, o bien en cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco como son los triterpenos con esqueleto de lupano. De esta forma los triterpenos descritos de especies de la familia Celastraceae pertenecen a las series lupano, oleano, friedelano, taraxeno, glutinano, ursano, dammarano y baccarano.<sup>29</sup>

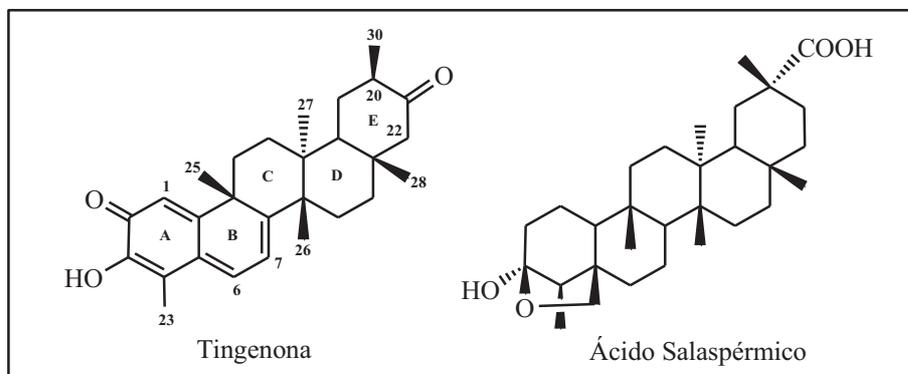
Se presentan con diferentes esqueletos con la singularidad de que algunos de ellos presentan sistemas metilenquinónicos sobre un esqueleto de friedelano, *D:A*-friedo-*nor*-oleano, que presentan oxidados los carbonos 2 y 3. Este grupo de metabolitos únicamente han sido aislados de especies de la Familia Celastraceae e Hipocrataceae, denominándose a estos compuestos *nor*triterpenometilenquinonas, considerándose un indicador quimiotaxonómico.<sup>30</sup> Este tipo de metabolitos recibieron el nombre de celastroloides<sup>31,32</sup> (Fig. 15), término que incluye a compuestos que poseen un agrupamiento fenólico, así como, los dímeros y trímeros de estos compuestos.



**Fig. 15** Ejemplos de estructuras de celastroloides

Sobre las *nor*triterpenometilénquinonas se han descrito una gran diversidad de actividades biológicas. Así, por ejemplo la tingenona (Fig. 16) presenta actividad citotóxica<sup>33</sup> y actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias.<sup>34</sup> Otro triterpeno interesante es el

ácido salaspérmico (Fig. 16), que muestra actividad anti-VIH, al ser un inhibidor de la transcriptasa inversa del virus.<sup>35</sup>



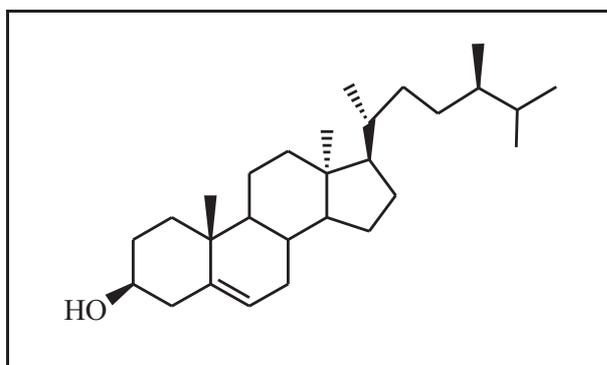
**Fig. 16** Estructuras de Triterpenos frecuentes en celastráceas

Los friedelanos rara vez contienen una función hemiacetal entre el grupo hidroxilo del carbono 24 y la cetona sobre el carbono 3. Este tipo de compuestos, como el ácido salaspérmico y el ácido orthospérmico, han sido propuestos como posibles intermedios en la biosíntesis de las quinonas triterpénicas.<sup>36</sup>

Los *nor*-triterpenofenoles, se diferencian estructuralmente de las metilénquinonas por tener una quinona en el anillo A, por lo cual son ligeramente amarillos. El esqueleto básico de los *nor*-triterpenometilénfenoles es el núcleo 24-*nor-D:A*-friedoleano aromatizado en el anillo A y con funciones oxigenadas en los carbonos C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>.

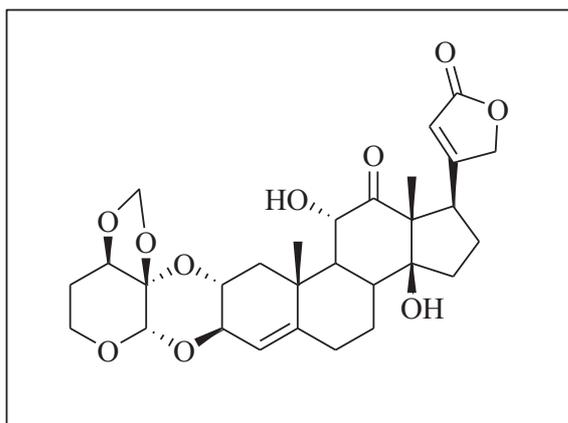
En una revisión bibliográfica realizada en el año 2000<sup>37</sup>, se da la relación de los 101 compuestos (50 triterpenometilénquinonas y 51 triterpenofenoles) aislados hasta ese momento, clasificados según el grado de conjugación de los anillos, criterio propuesto previamente por Gunatilaka.

Los **esteroides** constituyen un grupo importante de metabolitos secundarios se originan a partir de la ciclación del 3*S*,2,3-epoxiescualeno, mediante la ciclación de su conformero *silla-bote-silla-bote* originando el catión protosterilo, precursor de la estructura tetracíclica característica. Los esteroides incluyen un buen número de compuestos de gran relevancia química, biológica y médica, que se encuentran tanto en el reino animal como vegetal y en muchos microorganismos. El catión protosterilo da lugar al cicloartenol en plantas y algas o al lanosterol en animales y hongos, originando este último el colesterol que es el principal esteroide animal que forma parte de las membranas celulares y es precursor de las hormonas sexuales, ácidos biliares, vitamina D, entre otros. Un esteroide ampliamente distribuido en las plantas es el  $\beta$ -sitosterol<sup>38</sup> (Fig. 17), que ha sido utilizado junto con el estigmasterol para la semisíntesis de esteroides con utilidad farmacológica.



**Fig. 17** Estructura del  $\beta$ -Sitosterol

Los **glicósidos cardiotónicos** son muy abundantes en las semillas y raíces del género *Elaeodendrom*. Los metabolitos más interesantes de este grupo son los elaeodendrósidos (Fig. 18), esteroides aislados de *Elaeodendrom glaucum* Pers, con una marcada actividad cardiotónica.<sup>39</sup>



**Fig. 18** Eleaodendrósido A

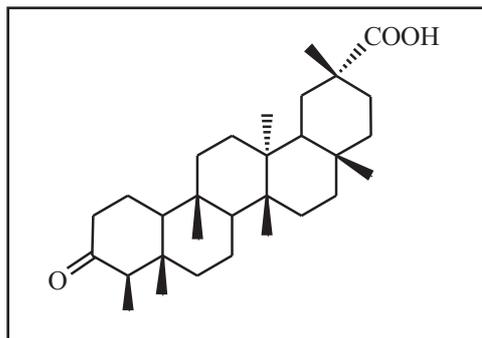
### **Actividades biológicas de los triterpenos y esteroides aislados de la Familia Celastraceae:**

En los últimos años, se ha incrementado el número de artículos científicos sobre las actividades biológicas de triterpenos y su potencial uso como fármacos. Así, por ejemplo, más de 100 triterpenos con diferentes esqueletos han revelado ser prometedores agentes citostáticos.<sup>40</sup>

La función fisiológica de los triterpenos en plantas es generalmente relacionada a la defensa química contra agentes patógenos y herbívoros. Debido a esto se tienen grandes posibilidades que ellos puedan ser usados para defender el organismo frente a agentes patógenos.<sup>41</sup>

Los triterpenos, con esqueletos de friedelano son bastante abundantes en la Familia Celastraceae, existiendo numerosos ejemplos que han mostrado una actividad significativa *in vivo* frente a diferentes tipos de células cancerígenas. Así, el ácido polpunónico (Fig. 19) aislado de *Orthosphenia mexicana*, presentó citotoxicidad frente a células A-549 (células de carcinoma de pulmón) con una  $DE_{50}$  de  $0.21 \mu\text{g/mL}$ <sup>42</sup> y su administración (100 mg/kg) disminuye el índice de ulcera (ILU) en un 55.6%.<sup>43</sup> El ácido salaspérmico, aislado del extracto

de la corteza de raíz de *T. wilfordii*, mostró una importante actividad antivírica frente al VIH.<sup>44</sup>



**Fig. 19** Estructura del Ácido polpunónico

En recientes investigaciones de la corteza de raíz de *Hippocratea excelsa*, se aislaron dos nuevos triterpenoides derivados del oleano y de la pristimerina, además los metabolitos conocidos Tingenona y Pristimerina, los cuales resultaron ser los compuestos mas activos frente a *Giardia intestinalis*, comparándolos con el Metronidazol utilizado como control.<sup>45</sup>

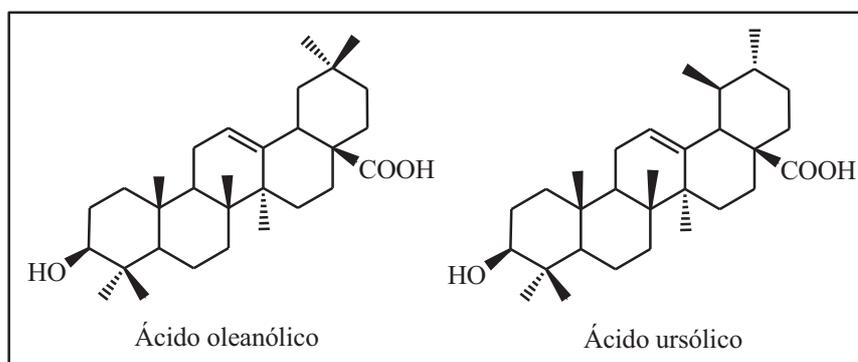
Otro grupo de triterpenos presentes en las celastráceas son aquellos de las series del oleano y ursano, los cuales han mostrado un perfil farmacológico similar al de los retinoides y esteroides, destacando su actividad antiinflamatoria, supresora tanto de la promoción tumoral como de la síntesis de inmunoglobulinas, hepatoprotectora e inductora de la síntesis de colágeno.<sup>46</sup> Durante la ultima década, se han publicado más de 700 artículos científicos sobre las actividades biológicas de los triterpenos de estas dos series, lo que refleja su enorme interés.

Así, el ácido ursólico, es un triterpeno habitual en las especies de celastráceas. Los ensayos biológicos realizados para este producto, han mostrado que posee actividad antiinflamatoria, contra artritis, diabetes y úlceras, así como, hipolipidémica y contra la arteriosclerosis. La citotoxicidad de este producto y varios ésteres derivados fue ensayada por Lee y col.<sup>47</sup>, frente a varias líneas celulares de cánceres humanos. Este ácido mostró actividad frente al crecimiento celular de las leucemias linfocíticas P-388 y L-1210 y frente al

carcinoma A-549, así como citotoxicidad frente a células tumorales de colon (HCT-8) y mama (MCF-7).<sup>48</sup>

Por otro lado, el ácido ursólico, junto con el ácido oleanólico (Fig. 20), son inhibidores de la activación del virus Epstein-Barr, con actividad similar a los revertidores de la promoción de tumores, ácido retinoico y glycyrrhizina, lo que sugiere que estos ácidos pueden ser valiosos agentes quimiopreventivos.<sup>49</sup>

Otro grupo de triterpenos frecuentes en especies de Celastráceas son los lupanos, cuyo interés se remonta al siglo XIX, siendo compuestos pentacíclicos con 30 átomos de carbono, la posición C-3 contiene un grupo OH en posición  $\beta$ . Siendo la betulina, un componente de los emplastos antisépticos.<sup>50</sup> El interés por estos metabolitos surgió en la última década, tras observar que estos compuestos mostraban una prometedora actividad antiviral (en particular anti-VIH) y antineoplásica. En particular, el ácido betulínico se reconoció como un interesante agente antitumoral<sup>51</sup> y prometedor inhibidor del virus del SIDA<sup>52</sup>. El lupeol muestra efecto antiinflamatorio, lo que junto a su baja toxicidad hacen de esta sustancia un interesante agente terapéutico. Además, tiene actividad analgésica y antipirética, con la ventaja de que no induce úlcera gástrica.



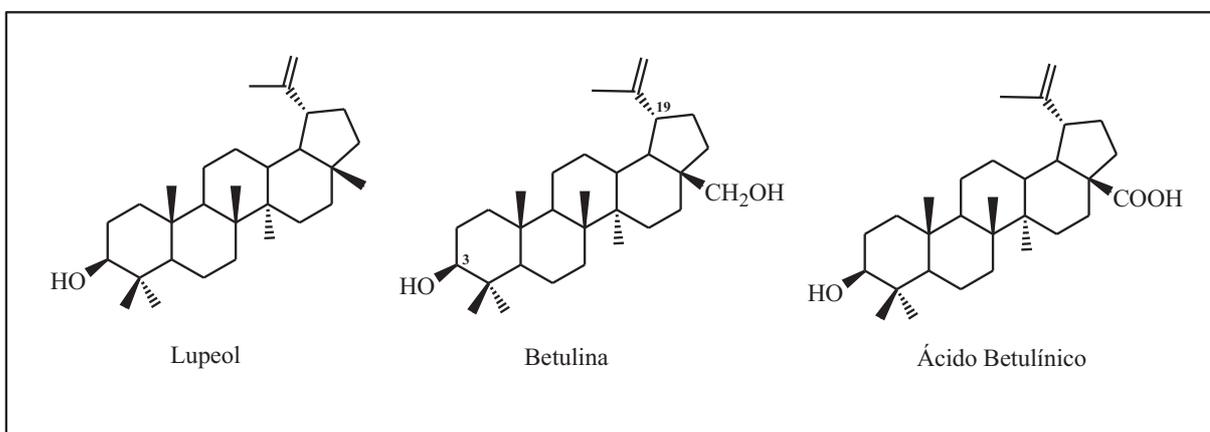
**Fig. 20** Triterpenos con esqueleto de oleano y ursano aislados de Celastráceas

A partir de estos resultados, se han llevado a cabo numerosos estudios evaluando las actividades biológicas y farmacológicas de esta clase de triterpenos.<sup>53</sup>

Se ha demostrado que los triterpenos del lupano son efectivos *in vitro* como inhibidores del óxido nítrico y en la producción de PGE<sub>2</sub> por los macrófagos. Estos compuestos reducen la producción excesiva de estos mediadores y tienen potencial para el tratamiento y prevención de diferentes patologías inflamatorias.<sup>54</sup>

En investigaciones recientes, se han descubierto nuevos terpenoides derivados del lupano los cuales han mostrado actividades antimicrobianas y citotóxicas.<sup>55</sup>

Así, el lupeol (Fig. 21) ha mostrado ser un efectivo agente citostático, además de un inhibidor de la elastasa leucocitaria humana (CI<sub>50</sub> 1.9 μM).<sup>56</sup> Así mismo, se ha publicado que inhibe el crecimiento de células leucémicas humanas (HL-60) induciendo su apoptosis<sup>57</sup> e inhibe selectivamente la topoisomerasa humana II.<sup>58</sup> La administración tópica de 1-2 mg/ratón, previene la formación y crecimiento del cáncer de piel.<sup>59</sup> Por otro lado, muestra efecto antiinflamatorio, lo que junto a su baja toxicidad hacen de esta sustancia un interesante agente terapéutico.<sup>60</sup> Además posee actividad analgésica y antipirética, con la ventaja de que no induce úlcera gástrica.<sup>61</sup>



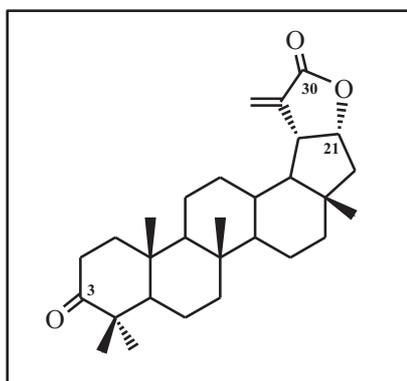
**Fig. 21** Triterpenos con esqueleto de lupano frecuentes en la Familia Celastráceas

La betulina (Fig. 21) puede inhibir la ADN topoisomerasa II a concentraciones comparables al etopósido.<sup>58</sup> Además, muestra efecto inhibitor de la activación del virus Epstein-Barr y actividad bacteriostática frente a *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*.<sup>62</sup> Así mismo, se ha publicado que presenta un efecto protector frente a

la toxicidad del cadmio, observándose que los grupos hidroxilos sobre C-3 y C-28 y el grupo isopropileno sobre C-19 son fundamentales para dicha actividad.<sup>63</sup> La administración conjunta de la betulina con aciclovir disminuye la replicación del virus VIH-1 y 2.<sup>64</sup>

El ácido betulínico ha atraído la atención en los últimos 10 años por su extraordinaria actividad biológica. Así, además de actividad anti-VIH, ha mostrado actividad citotóxica frente al melanoma humano mediante inducción de apoptosis, actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* y actividad antimalárica frente a los estadios asexuales eritrocíticos del *Plasmodium falciparum*.<sup>65</sup> Se han realizado ensayos *in vivo* que han mostrado que la administración del ácido betulínico disminuye sustancialmente los tumores de piel inducidos por el TPA (13-acetato-12-*O*-tetradecanoil-forbol) en ratones.<sup>66</sup> Su especificidad por las células de melanoma, lo hace ser una de las sustancias más prometedoras frente a este tipo de cáncer.<sup>67</sup>(Fig. 21)

La ochraceolida A (Fig. 22), es un ejemplo de lupano con un reagrupamiento  $\gamma$ -lactona entre C-21 y C-30, que exhibió actividad citotóxica frente a cultivos de células P-388 con un valor de  $CI_{50}$  de 0.26  $\mu\text{g/mL}$ , así como actividad inhibidora del farnesil-transferasa, FPTasa ( $CI_{50}$  1.0  $\mu\text{g/mL}$ ), lo que demuestra su potencial como agente anticancerígeno.<sup>68</sup> Esta actividad se pierde cuando se reduce el carbonilo en C-3, lo que sugiere esta posición como sitio de anclaje a la enzima. Este compuesto se ensayó frente a 60 líneas de células cancerígenas humanas en el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI) y ha sido seleccionado para su evaluación *in vivo* en varios sistemas xenogénicos de ratón.



**Fig. 22** Estructura de la Ochraceolida A

El  $\beta$ -sitosterol (Fig. 17) es un esteroide presente en muchas plantas superiores, sobre el se ha publicado una extensa relación de actividades biológicas.<sup>38</sup> Así, cabe destacar que posee actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona y la oxifenbutazona.<sup>69</sup> Además, presenta un amplio margen de seguridad debido a su mínimo efecto ulcerogénico, lo que le confiere un alto valor terapéutico. Recientemente se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata.<sup>70</sup>

## 2.5 ESTUDIO FITOQUÍMICO

La fitoquímica comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios. Sin embargo, existen etapas comunes, que no necesariamente ocurren al mismo tiempo.

### 2.5.1 Selección del material vegetal

La selección del material depende del interés que persiga el estudio, como se detalla a continuación:

- a) Por el interés particular: se tiene información etnobotánica de que una especie vegetal se emplea en el tratamiento de cierta enfermedad. Se localiza la especie, se comprueba su clasificación botánica, se la ubica en la literatura química (a ella, o a géneros y especies relacionados). Ello informa sobre los posibles constituyentes químicos lo que permitirá planificar el fraccionamiento, la purificación, y las pruebas biológicas tanto de los extractos como de los compuestos puros.
- b) Por el interés dirigido a un tipo de compuesto químico: por ejemplo alcaloides con cierto esqueleto particular. Se localiza una Familia botánica, un género o una especie que de acuerdo a la información bibliográfica, lo contiene. Se comprueba la presencia de alcaloides mediante pruebas químicas en diferentes partes de la especie

y, si es preciso, a diferentes edades de la misma. Posteriormente se procede a la etapa de extracción y purificación.

- c) Por el interés en una determinada actividad biológica: se buscan Familias, géneros o especies citadas con esa actividad. Se recolectan cantidades pequeñas (10-50 g) de material, indiscriminadamente. Se hacen extractos alcohólicos, hidro-alcohólicos o acuosos (directamente o provenientes del extracto alcohólico llevado a sequedad) y se comprueba en ellos esa actividad. En el caso de dificultades para solubilizar el sólido en el medio biológico, se usa un cosolvente adecuado (uno de los más usados es dimetilsulfóxido) a una concentración inocua al sistema biológico, la cual debe pre-establecerse.<sup>71</sup>

### **2.5.2 Recolección**

La recolección de la especie vegetal, debe ser realizada bajo requisitos legales y ambientales. En El Salvador, se solicita un permiso al Ministerio de Medio Ambiente, detallando el interés que se tiene en dicha especie, esta autorización demora en ser aprobada un promedio de dos meses. La recolección debe llevarse a cabo con la ayuda de un botánico, quien además de clasificar el material, guardará una muestra testigo para futuras comprobaciones.

Para cada órgano de la especie existe un momento adecuado de recolección. Las plantas herbáceas son generalmente utilizadas en su totalidad, pero en el caso de plantas leñosas es preferible seccionarlas en sus diferentes partes botánicas: flores, frutos, semillas, hojas, corteza, tallo, raíces, etc. Esto permitirá también programar la estrategia de extracción.<sup>70</sup>

### **2.5.3 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos de la fuente vegetal**

El proceso de extracción más comúnmente usado en productos naturales es la extracción continua con el aparato Soxhlet (Fig. 23), donde el sólido se coloca en el depósito superior del aparato, dentro de un cartucho de celulosa que actúa como filtro. Al calentar el

balón, el vapor del disolvente asciende por el tubo lateral y condensa en el refrigerante cayendo sobre el sólido que se encuentra en el cartucho. El disolvente extrae poco a poco el sólido y va llenando el depósito superior hasta que, cuando alcanza la parte alta del tubo lateral estrecho, cae de nuevo al matraz y el depósito superior se vacía completamente por efecto “sifón”. El proceso se repite automáticamente y la concentración del compuesto orgánico extraído va aumentando en el matraz hasta que la extracción finaliza.

Los solventes para extracción son orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol etílico, alcohol metílico, alcohol isobutílico, acetato de etilo, etc.) y de baja reactividad.

El alcohol etílico, es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios, pero a su vez, se obtiene un crudo muy complejo y su fraccionamiento se convierte en un problema. Los extractos son evaporados a presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua.<sup>72</sup>



**Fig. 23** Aparato de extracción continua Soxhlet

## 2.5.4 Separación y aislamiento de los metabolitos secundarios

La cromatografía, es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

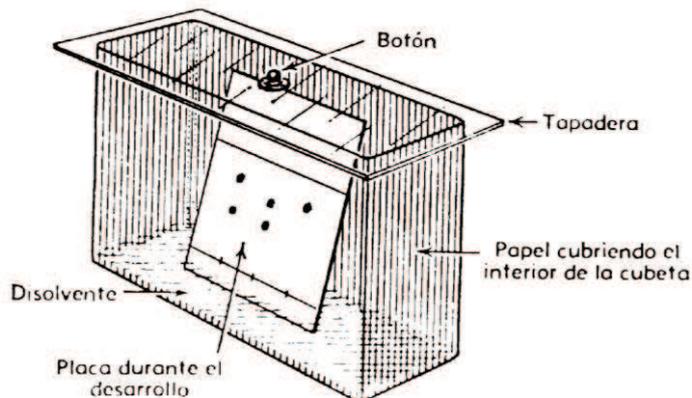
- Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido
- Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar, se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original.<sup>71</sup>

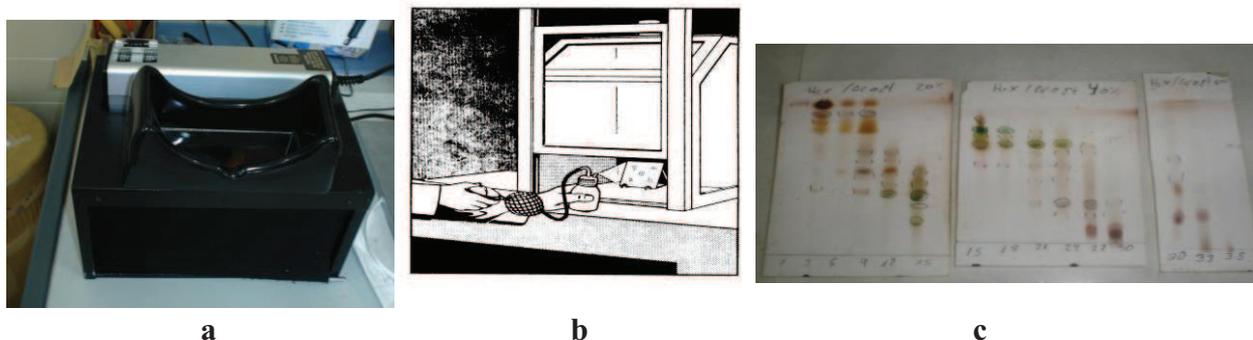
### 2.5.4.1 Cromatografía en Capa Fina

La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1 - 0.2 mm), sobre una placa de vidrio, plástico, o una lamina metálica. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación (Fig. 24). Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas.

Si el compuesto es activo a la luz ultravioleta, visualizar la placa en una lámpara Ultravioleta-Visible. Marcar con un lápiz el contorno de las manchas observadas, en caso contrario, utilizar un agente revelador.<sup>72</sup> (Fig. 25)



**Fig. 24** Cromatografía en capa fina: cámara de separación



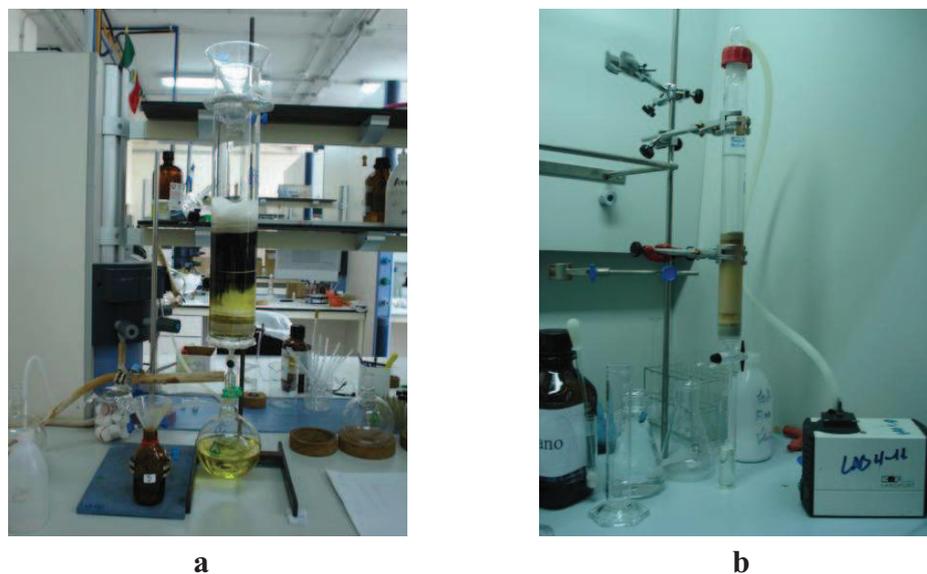
**Fig. 25** (a) Cromatografía en capa fina: Cámara UV-VIS, (b) Cámara de revelado y (c) capa fina revelada

### 2.5.4.2 Cromatografía en Columna

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, a escala preparativa.

La fase estacionaria (adsorbente) se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave, y se impregna con una fase móvil (eluyente). La mezcla a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria, y la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos son disueltos en la fase móvil, van eluyendo y se recogen en fracciones. Los menos polares, que son los que se retienen poco en el adsorbente, son los

primeros en salir. Los polares quedan más retenidos y para su elución generalente es necesario incrementar la polaridad del disolvente. El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna, recibe el nombre de tiempo de retención, y es característico para cada compuestos en unas condiciones cromatográficas determinadas.<sup>72</sup>



**Fig. 26** Cromatografía en columna a vacío (a) y Cromatografía a media presión (Cromatografía flash) (b)

El adsorbente más utilizado para cromatografía en columna es la gel de sílice. La elución de la cromatografía puede realizarse por gravedad, a vacío o a media presión (Cromatografía flash) (Fig. 26). En este último caso se conecta la cabeza de la columna a un compresor de media presión (5 -10 psi) o a una línea de aire comprimido. El tamaño de partícula de la gel de sílice para cromatografía a media presión (0.040 - 0.063 mm, 230 - 400 mesh), es más pequeño que el que se utiliza para cromatografía por gravedad (0.063 - 0.200 mm, 70 - 230 mesh).

La cromatografía a media presión proporciona, mejores resultados que la cromatografía por gravedad, debido a que emplea un tamaño de partícula menor y esto produce una separación más eficaz, además de ser mucho más rápida.<sup>72</sup>

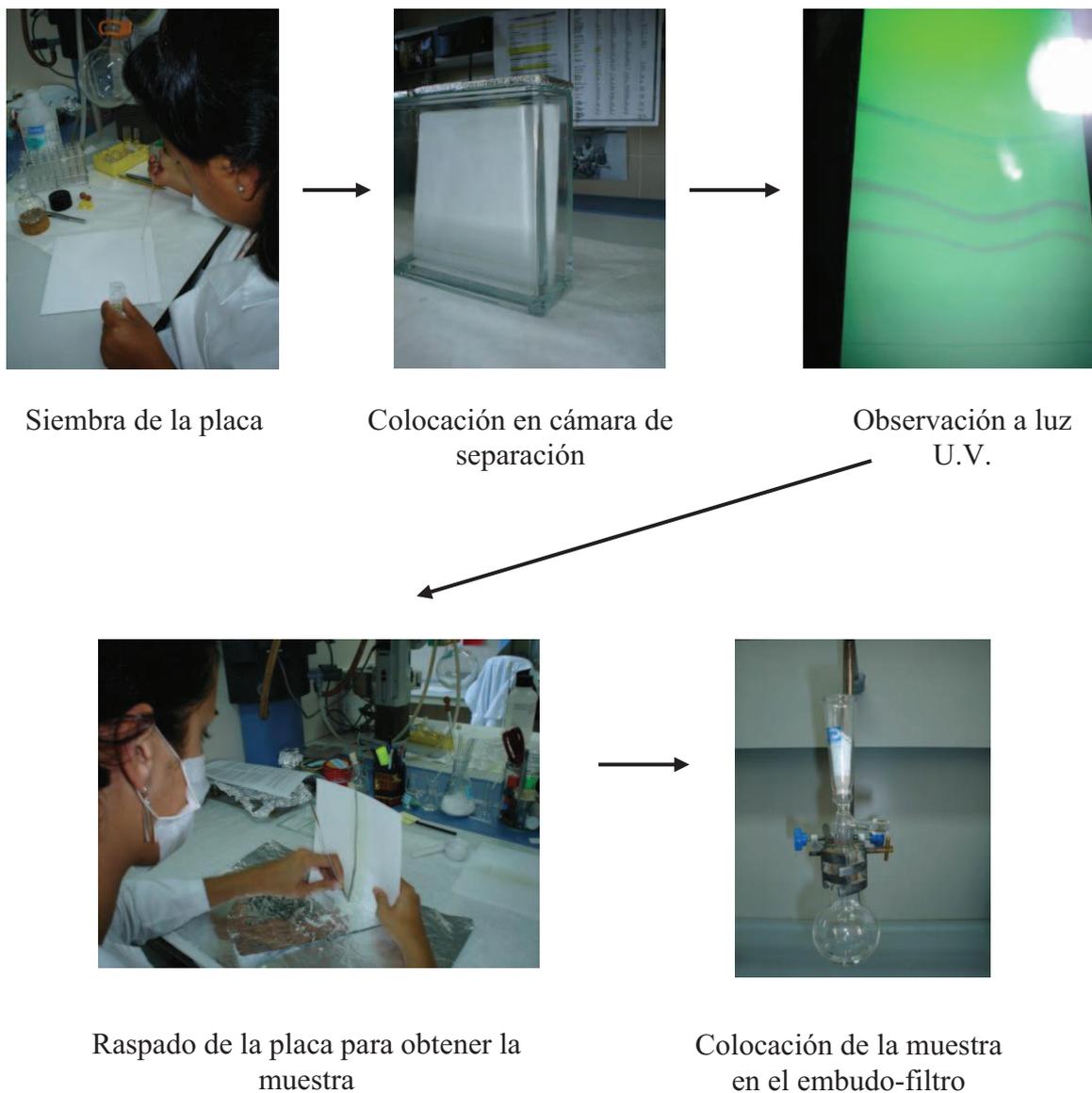
### 2.5.4.3 Cromatografía en capa fina preparativa

La cromatografía preparativa, se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1 - 2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio de 20 x 20 cm. Se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de mezclas en cantidades comprendidas entre 20 - 40 mg. (Fig. 27)

Para llevar a cabo una cromatografía preparativa se debe seguir el siguiente procedimiento:

1. Elegir la fase móvil adecuada para llevar a cabo la separación de los componentes de la mezcla mediante cromatografía analítica en capa fina.
2. En la superficie del adsorbente, trazar una línea recta con un lápiz (no utilizar tinta) a 1.5 cm. del borde inferior de la placa, marcar con suavidad, sin levantar el adsorbente.
3. Disolver la muestra en una pequeña cantidad de disolvente apropiado.
4. Utilizando una pipeta Pasteur, depositar de modo continuo la mezcla disuelta a lo largo de la línea previamente marcada. Para ello, apoyar ligeramente la pipeta con la disolución sobre el adsorbente y dejar evaporar el disolvente, repetir esta operación hasta sembrar toda la mezcla.
5. Introducir la placa en posición vertical en la cubeta, que durante la elución, debe permanecer tapada, para evitar la evaporación del disolvente, y no moverse.
6. Cuando el frente llegue a poca distancia del borde superior de la placa (ascensión por capilaridad), abrir la cubeta, sacar la placa y dejarla secar.
7. Si los compuestos no son coloreados, visualizarlos a la luz UV. En algunos casos se puede cubrir una parte de la placa y rociar con un revelador apropiado, para poder observar los productos que no absorben luz UV.
8. Marcar con un lápiz, suavemente, el entorno del compuesto a aislar.
9. Con ayuda de una microespátula, desprender del soporte de vidrio la gel de sílice con el compuesto adsorbido y transferirlo a un embudo-filtro.
10. Añadir un disolvente en el cual el compuesto a aislar sea soluble (generalmente acetato de etilo) y extraer a vacío.

11. Filtrar la gel de sílice y eliminar el disolvente a presión reducida.



**Fig. 27** Esquema de aislamiento de un compuesto utilizando Cromatografía en Capa fina preparativa

## 2.6 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

Una vez que el producto es purificado, se procede a su determinación estructural por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

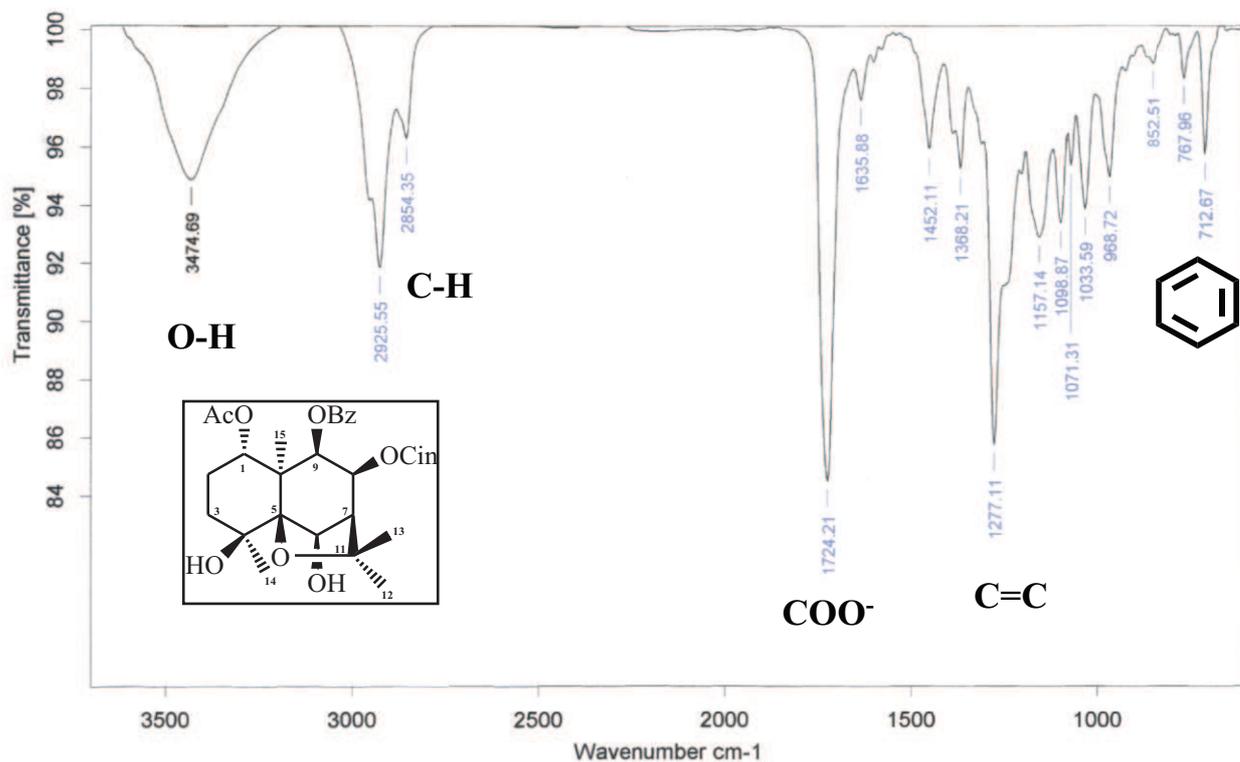
### 2.6.1 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (I.R.)

Las bandas que se observan en los espectros de infrarrojo ( $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ ), se relacionan con el cambio de los estados vibracionales de los enlaces presentes en la molécula.

La posición e intensidad de las bandas correspondientes a un grupo funcional, que generalmente aparecen distribuidas en varias zonas más o menos constantes del espectro, son muy poco afectadas por el resto de la molécula, por lo tanto el análisis del espectro ofrece información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula, tales como: -OH, -NH, -CO-, etc., así como del carácter alifático o/y aromático del compuesto.

La región comprendida entre  $1350$  y  $900 \text{ cm}^{-1}$  representa la “huella dactilar” de la molécula, pues las bandas de esa región corresponden a las vibraciones y rotaciones del esqueleto carbonado y por lo tanto son muy sensibles a los diferentes arreglos moleculares, aun para sustancias muy similares. Por esta razón esta zona debe considerarse cuidadosamente al establecer la identidad de dos muestras por comparación de sus espectros de IR.<sup>72</sup>

En el siguiente ejemplo, se muestra el espectro IR de un sesquiterpeno dihidro- $\beta$ -agarofurano (**V-1**), aislado de *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae),<sup>73</sup> observándose las tensiones: O-H a  $3474 \text{ cm}^{-1}$ , C-H a  $2925 \text{ cm}^{-1}$ , COO<sup>-</sup> a  $1724 \text{ cm}^{-1}$ , C=C a  $1277 \text{ cm}^{-1}$ , sobretonos aromáticos a  $1635 - 1368 \text{ cm}^{-1}$  y debido al anillo aromático a  $712.67 \text{ cm}^{-1}$  (Fig. 28)



**Fig. 28** Espectro Infrarrojo del sesquiterpeneo V-1

## 2.6.2 ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

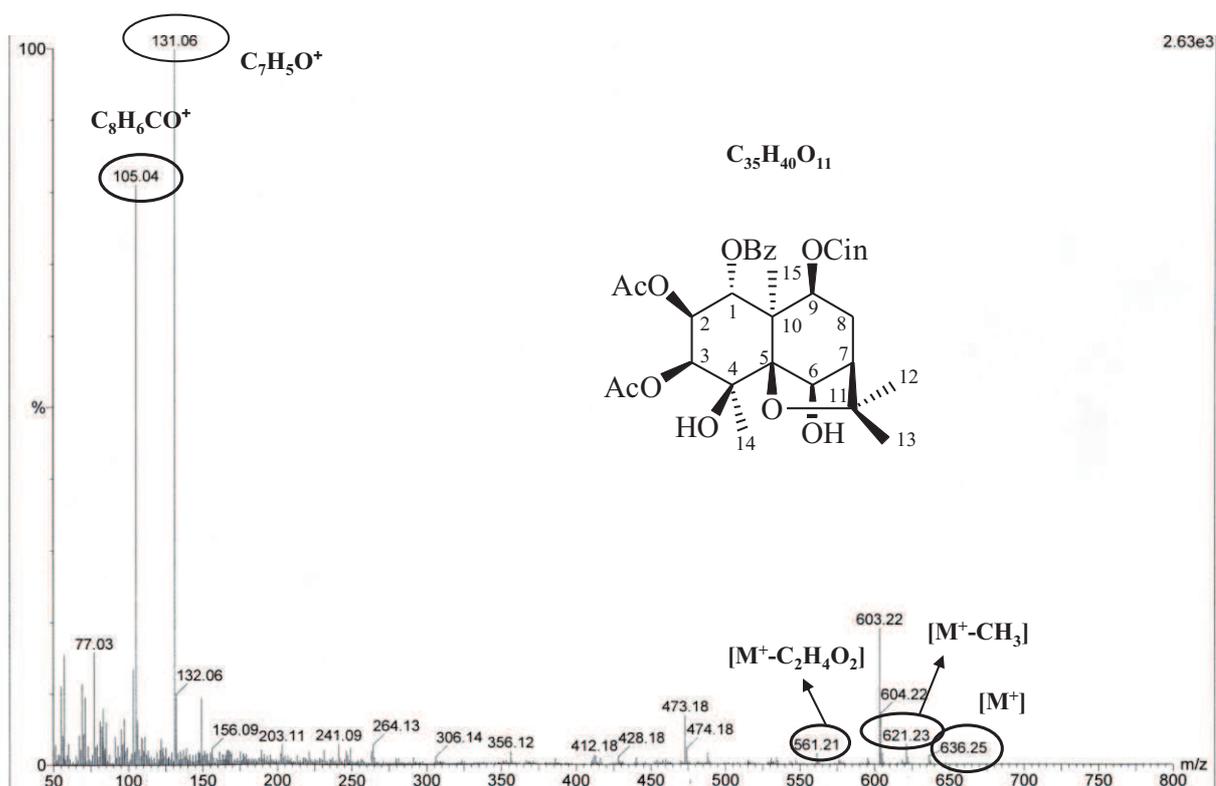
Es una técnica instrumental que contribuye a efectuar la elucidación estructural de sustancias utilizando una pequeña cantidad de muestra.

Un compuesto orgánico que se expone a una corriente de electrones de alta energía (frecuentemente a 70 eV) se degrada en fragmentos de los cuales las especies con cargas positivas se registran en el espectro de masas, según la relación masa - carga ( $m/z$ , donde  $z=1$  generalmente).

Un aparato de alta resolución registra la unidad de masa del ión molecular (la molécula que pierde un sólo electrón sin degradarse) hasta con cuatro o más cifras decimales, lo cual permite establecer la fórmula molecular correspondiente.

El patrón de fragmentación, es decir, el mecanismo de degradación, es una característica de las diferentes clases de compuestos, y esto es aprovechado para la ubicación de ciertos grupos funcionales en entornos particulares de la molécula.<sup>72</sup>

La Fig. 29 muestra el espectro de masas del sesquiterpeno dihidro-β-agarofurano denominado **J-1**, aislado de *Maytenus jelskii*<sup>74</sup>, dicho espectro presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de metilo ( $M^+ - 15$ ,  $m/z$  621,  $CH_3$ ), ácido acético ( $M^+ - 60$ ,  $m/z$  561,  $C_2H_4O_2$ ), ácido cinámico ( $M^+ - 148$ , 488  $m/z$ ,  $C_8H_7CO_2H$ , 131  $m/z$ ,  $C_8H_6CO^+$ ) y ácido benzoico ( $M^+ - 15 - 18 - 122$ , 481  $m/z$ ,  $C_7H_6O_2$ , 105  $m/z$ ,  $C_7H_5O^+$ ).



**Fig. 29** Espectro de masas del sesquiterpeno **J-1**

### 2.6.3 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE (UV-VIS)

La espectroscopía UV-VIS permite determinar la absorción de luz en una muestra; cuando la radiación incide sobre una sustancia no toda ella se ve afectada por la misma, al átomo o conjunto de átomos que absorben radiación se le denominaba cromóforo. En las moléculas existen también átomos o grupos de átomos que no absorben radiación, pero hacen que se modifique alguna de las características de la absorción del cromóforo, se denominaban a tales grupos auxocromos.

La absorción de la energía se registra de 190 a 380 nm para la región ultravioleta y de 380 a 700 nm para la región visible.

En contraste con las técnicas RMN e IR, las señales en el espectro UV son muy anchas debido a los múltiples cambios de estados vibracionales y rotacionales que acompañan a las transiciones electrónicas.

Para que se observe una absorción máxima debe existir en la molécula un cromóforo (aquellos grupos funcionales que sin unión o conjugación con otros grupos, muestran absorción electrónica en la región del visible y ultravioleta), de esta manera la técnica permite detectar la presencia de un determinado cromóforo el cual origina prácticamente el mismo patrón espectral, independientemente de la estructura total de la molécula.<sup>72</sup>

La Fig. 30 muestra el espectro UV de un sesquiterpeno (**V-1**), aislado de *Celastrus vulconicola* (Celastraceae),<sup>73</sup> observándose los máximos de absorbancia a 223 nm y 280 nm, correspondientes a los grupos cromóforos benzoato y cinamato, respectivamente

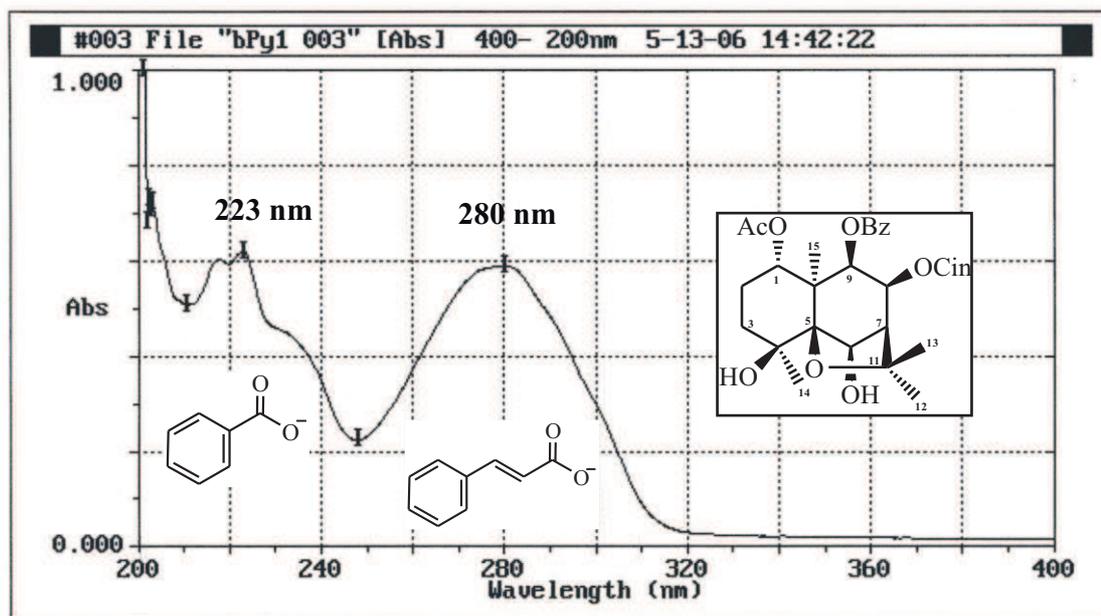


Fig. 30 Espectro UV del sesquiterpeno V-1

#### 2.6.4 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

La RMN se basa en la absorción de energía por cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. Es el método más importante y de mayor utilidad para la elucidación estructural de los productos naturales.

El análisis del espectro de RMN ofrece evidencias bastante explícitas sobre las características de los núcleos que conforman una molécula dada, y los más frecuentemente analizados son  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , siendo los dos primeros utilizados en análisis de rutina.

Los desplazamientos químicos de las señales en RMN de  $^1\text{H}$  (0-20 ppm) y de  $^{13}\text{C}$  (0-230 ppm) dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y heteroátomos, etc.) y de carbonos (en dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, unidos a oxígeno, etc.). Por la integración de las señales y el acoplamiento espín-espín (multiplicidad de la señal y magnitud de la constante de acoplamiento) que se observa en el espectro de protón, se deduce el número de hidrógenos y el modo de distribución en la molécula; por otro lado, el número de señales presentes en el espectro de carbono (registrado

por la técnica de desacoplamiento de protones) indica el número de átomos de carbono presentes en la molécula.

Las técnicas bidimensionales, entre las cuales podemos destacar los experimentos homonucleares (H,H-COSY, NOESY, ROESY, INADEQUATE, etc.) y heteronucleares (HSQC, HMBC, TOCSY, etc.) ofrecen información estructural mucho más directa y presentan ventajas enormes cuando se trata de esqueletos nuevos, poco relacionados a los ya conocidos.<sup>72</sup>

Una de las ventajas de la técnica es su carácter no destructivo, por lo que la muestra puede recuperarse si se desea.

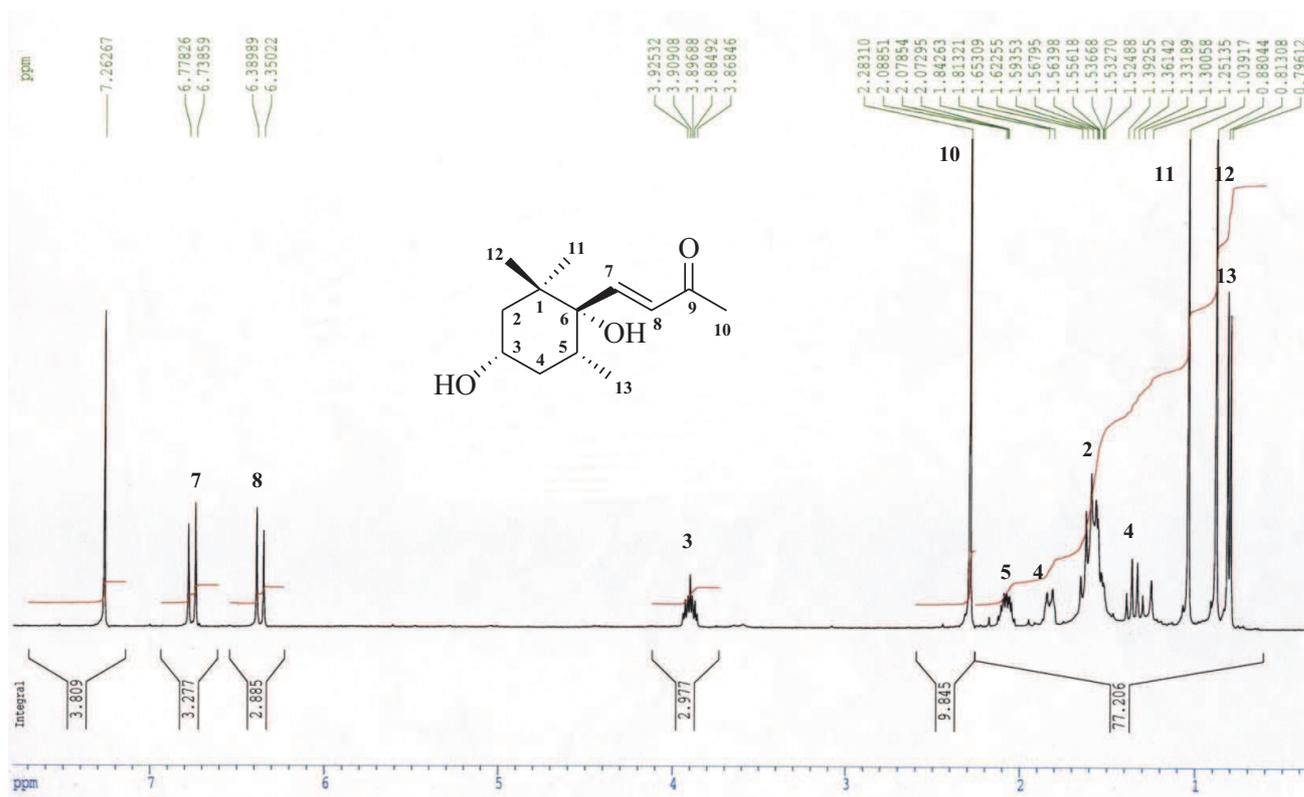
La RMN se puede utilizar en un amplio intervalo de aplicaciones, siendo las más importantes: el estudio e investigación de productos naturales, en la síntesis orgánica, el análisis de fluidos corporales (sangre, orina, bilis, etc.), establecimiento de interacciones (Proteína-Ligando, Droga-ADN, etc), control de calidad de materias primas en la industria farmacéutica, análisis de derivados del petróleo y quizá una de las aplicaciones de mayor empleo en la actualidad es en el área de imágenes diagnósticas en medicina.<sup>75, 76, 77</sup>

#### **2.6.4.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR MONODIMENSIONAL (RMN 1D)**

##### **a) Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN <sup>1</sup>H)**

El experimento más común de Resonancia Magnética Nuclear, es el de protón RMN <sup>1</sup>H. El espectro que se obtiene proporciona información del tipo y el número de hidrógenos (por integración) que contiene una molécula (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y/o unidos a heteroátomos, etc.), permitiendo elucidar su estructura. El rango de desplazamiento químico típico es de 0–20 ppm y las señales por lo general son finas. Los

cálculos de la constante de acoplamiento entre núcleos vecinos ayudan a identificar a los hidrógenos conectados a través del esqueleto molecular. A continuación se presenta el ejemplo del espectro de un metabolito aislado de *Maytenus chiapensis*<sup>5</sup>, denominado Boscialin (*nor*-isoprenoide), conocido como dihidro- $\beta$ -ionano, que posee actividades biológicas interesantes, tales como, actividad antiulcerogénica, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria. (Fig. 31)



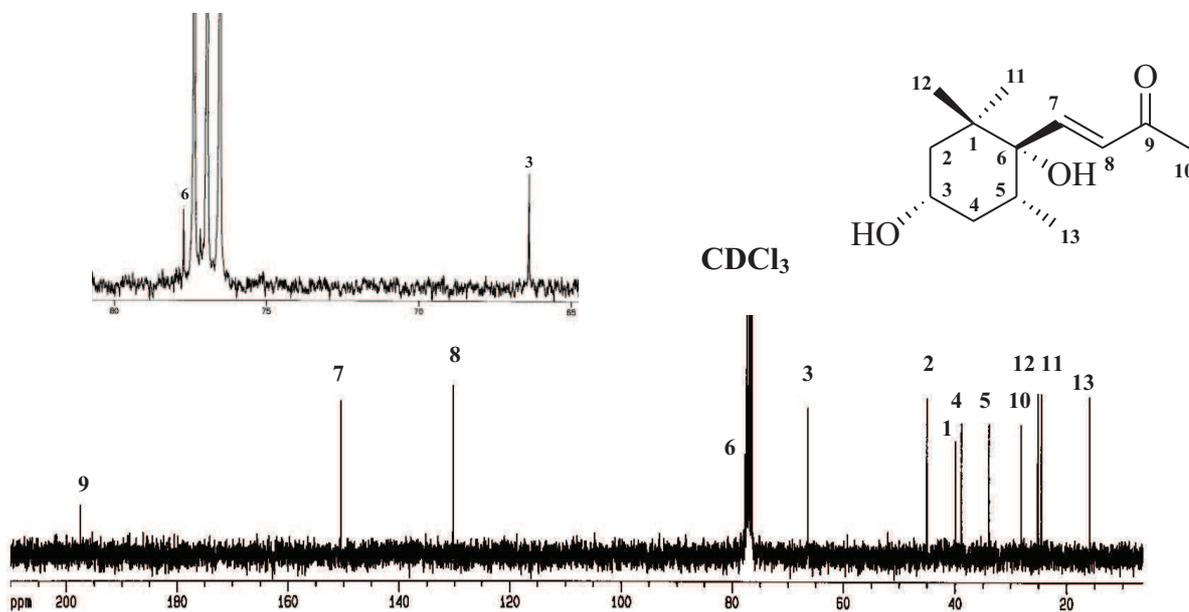
**Fig. 31** Espectro de RMN <sup>1</sup>H de **Boscialin** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

### b) Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN <sup>13</sup>C)

La resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C es complementaria a la de <sup>1</sup>H. Esta última técnica se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopia de RMN de <sup>13</sup>C determina el entorno magnético de los átomos de carbono.

El experimento de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ ), es menos sensible que el de protón, debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono posee espín y, además, la frecuencia de resonancia del  $^{13}\text{C}$ , para un campo magnético dado, es la cuarta parte de la que se da en la RMN de  $^1\text{H}$ , sin embargo, tiene un rango de desplazamiento químico mucho más grande (0-200 ppm). Desacoplando el protón se pueden obtener espectros de  $^{13}\text{C}$  en donde cada señal corresponde a un carbono. Da información acerca de la naturaleza de los carbonos, dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc.

A continuación se muestra un ejemplo de Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento protónico de banda ancha para **Boscialin** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Fig. 32)



**Fig. 32** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento protónico de banda ancha de **Boscialin** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

### c) DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)

Proporciona un espectro monodimensional de carbono que permite conocer el número de protones unido a cada átomo de carbono. Este experimento permite editar las señales del espectro 1D  $^{13}\text{C}$  en distintos subspectros de forma que se puedan distinguir grupos  $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_2$

y CH<sub>3</sub>, no observándose los carbonos cuaternarios, que son aquellos carbonos que no se encuentran unidos directamente a ningún protón. (Fig. 33)

La versión mas utilizada del DEPT se denomina DEPT-135° que permite obtener señales de grupos CH<sub>3</sub> y CH de fase opuesta a las de grupos CH<sub>2</sub>. Por convenio se ajusta la fase del espectro de manera que queden hacia arriba las señales de grupos CH<sub>3</sub> y CH.

En la secuencia hay que resaltar que el pulso final de protón no tiene que ser de 90° si no un cierto ángulo  $\theta$ . Según sea el valor de este ángulo en el experimento podemos encontrar diferentes experimentos DEPT.<sup>78</sup> (Tabla 1)

**Tabla. 1** Diferentes experimentos DEPT

Angulo teta	Espectro obtenido	Nombre del experimento
135°	Grupos -CH <sub>3</sub> y -CH signo positivos y -CH <sub>2</sub> signo negativo	DEPT-135
90°	Solo grupos CH	DEPT-90
45°	-CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> y -CH del mismo signo.	DEPT-45

La Fig. 34 muestra el espectro de RMN <sup>13</sup>C de Boscialin<sup>5</sup>, donde se distinguen cuatro metilos, dos metilenos, cuatro metinos y cuatro carbonos cuaternarios.

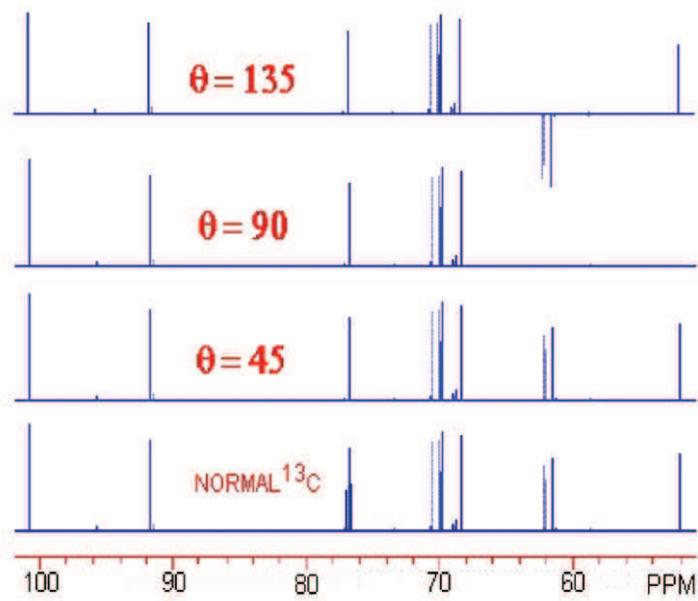


Fig. 33 Experimentos DEPT con distinto ángulo

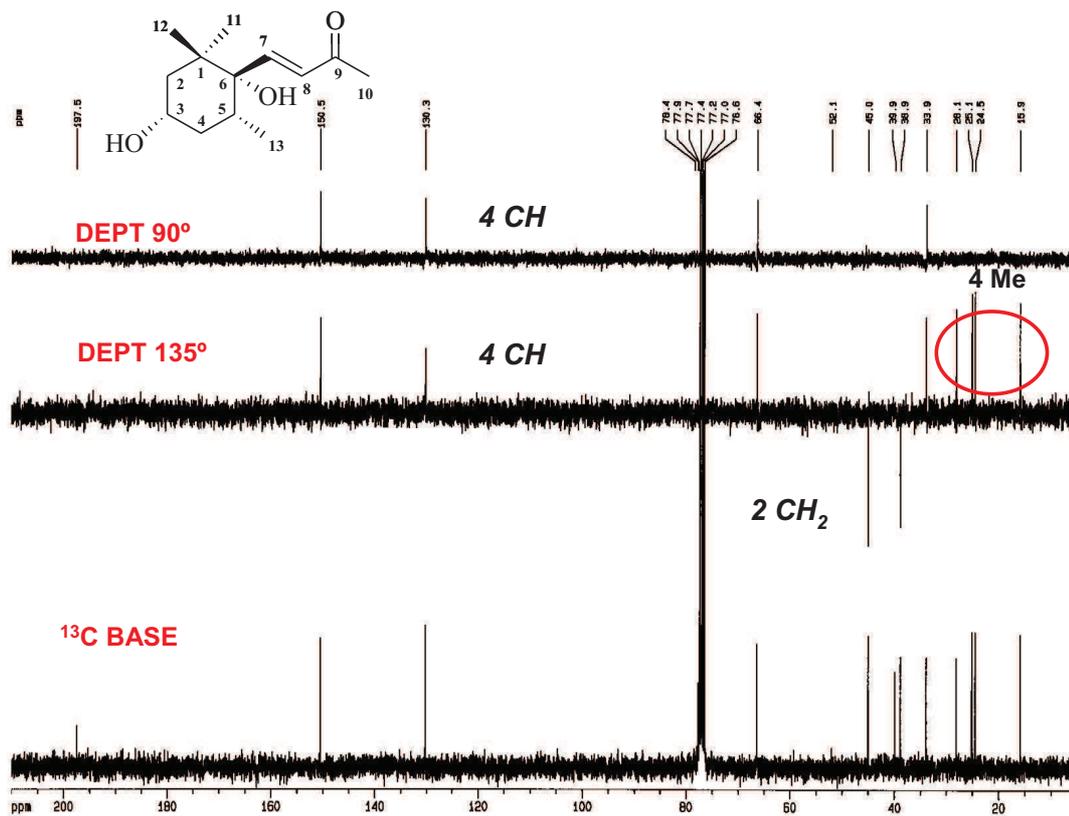


Fig. 34 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  y experimentos DEPT para **Boscialin** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

#### 2.6.4.2 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE DOS DIMENSIONES (RMN-2D)

La espectroscopía de RMN es tan útil porque existen experimentos de pulsos cuidadosamente diseñados, que permiten obtener información de relevancia química tales como ángulos de torsión de enlaces, distancias entre átomos, etc. Además, la posibilidad de dispersar esta información en un espectro con dos (o más) dimensiones, aumenta la información extraíble del espectro, especialmente en moléculas de gran complejidad.

La idea básica de la espectroscopia multidimensional es registrar la señal de RMN en función de dos o más tiempos incrementales, cada uno de estos tiempos corresponde a una dimensión en el espectro. Uno de estos tiempos, el último que aparece en la secuencia del experimento, es el tiempo de colección de datos (FID) que se usa en los experimentos de RMN-1D y se denomina tiempo de adquisición. Los demás tiempos se denominan tiempos de evolución. Los tiempos de un experimento se nombran por orden de aparición en la secuencia  $t_1$ ,  $t_2$ , etc. En el caso de la espectroscopia 2D solo hay dos tiempos, el primer tiempo que aparece (tiempo de evolución) se llama  $t_1$  y el segundo tiempo (tiempo de adquisición) se llama  $t_2$ .

Un experimento bidimensional necesita registrar una FID muchas veces, no solamente para mejorar la relación señal/ruido (S/N), sino para seguir (diseccionar) la evolución de las señales durante  $t_1$ . Los datos de la dimensión de adquisición  $t_2$  se almacenan en tiempo real; sin embargo, la evolución en  $t_1$  se construye repitiendo el experimento (la misma secuencia de pulsos) con valores diferentes de  $t_1$  (realmente con valores de  $t_1$  que se incrementan de un modo constante).<sup>78</sup>

#### **Clasificación de los espectros de RMN-2D:**

##### **- Homonucleares**

Son los espectros en dos dimensiones en los que la información se transfiere solamente entre espines del mismo tipo.

Por ejemplo, se pueden hacer experimentos homonucleares 1D-NOE, 2D-COSY, 2D-TOCSY, 2D INADEQUATE, 2D-NOESY o 2D-ROESY para un determinado núcleo como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ , o  $^{31}\text{P}$ .<sup>78</sup>

### a) 2D COSY (COrrelation SpectroscopY)

Fue el primer experimento de RMN-2D propuesto por el físico belga Jean Jeener en el año 1971. Es uno de los más simples y útiles experimentos bidimensionales.

El experimento COSY sirve para correlacionar parejas de protones acoplados a 3 enlaces vecinalmente (típicamente para valores de  $^3J_{\text{HH}}$  3-15 Hz). El espectro 2D COSY contiene picos diagonales y picos de cruce (fuera de la diagonal). Los picos de la diagonal corresponden al espectro de  $^1\text{H}$  monodimensional. Los picos de cruce son correlaciones a través del acoplamiento escalar (2 y 3 enlaces) entre una pareja de protones de la diagonal. Estos picos aparecen en posiciones simétricas respecto de la diagonal. (Fig. 35)

En el experimento COSY del ejemplo se obtiene señales de correlación: H (rojo) con H (azul) y H (rojo) con H (rosa) intensas, mientras que será muy pequeña o no deberá verse la señal de correlación H (azul) con H (rosa) por ser la constante de acoplamiento H-H a cuatro enlaces muy pequeña (Fig. 36).<sup>78</sup> En la Fig. 37, se observa el espectro COSY y las respectivas correlaciones para el Boscialin.<sup>5</sup>

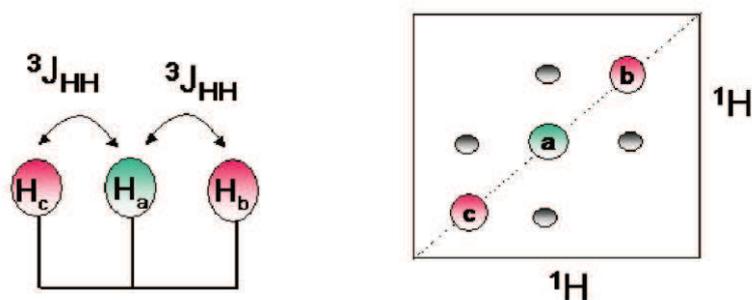


Fig. 35 Representación de protones acoplados

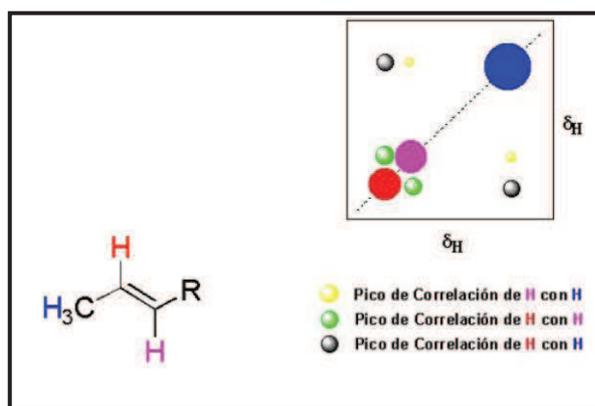


Fig. 36 Ampliación del espectro 2D COSY de una molécula

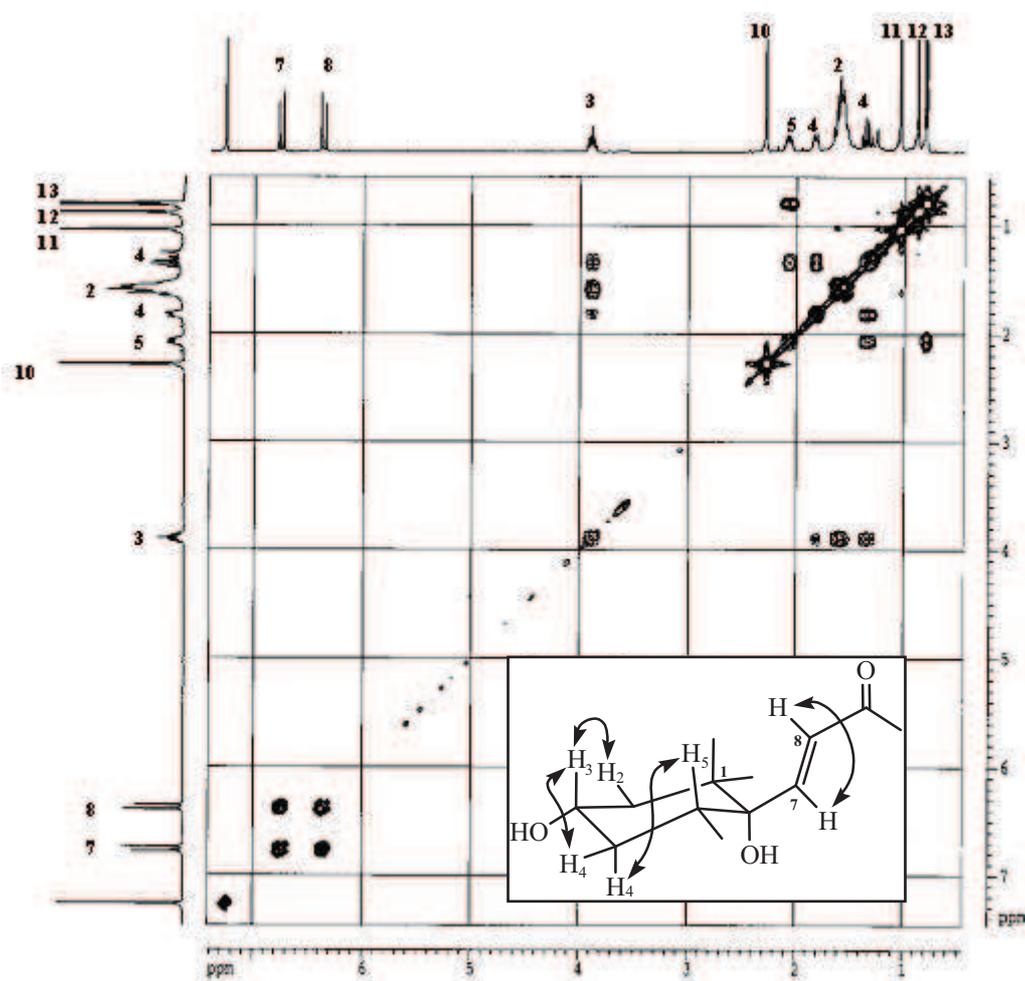
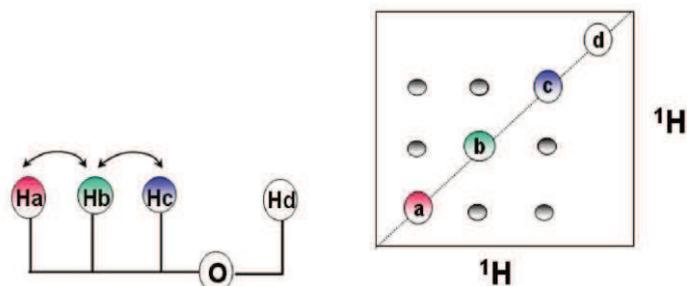


Fig. 37 Experimento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para **Boscialin**

## b) 2D TOCSY (TOtal Correlation Spectroscopy)

Este experimento es capaz de correlacionar todos los espines de una red de acoplamientos o sistema de espines acoplados. Los picos de cruce pueden ser no solamente entre núcleos acoplados directamente con una  $J$  medible, si no también entre núcleos que pertenezcan al mismo sistema de espines, aunque su  $J$  mutua sea cero. Este experimento es complementario del experimento COSY en el que solo se obtienen correlaciones con los espines acoplados con  $J$  distinta de cero. (Fig. 38)

El espectro TOCSY contiene picos diagonales y picos de cruce simétricos. Todos los picos de cruce aparecen en fase y del mismo signo que los picos diagonales, en caso contrario se trataría de artefactos.

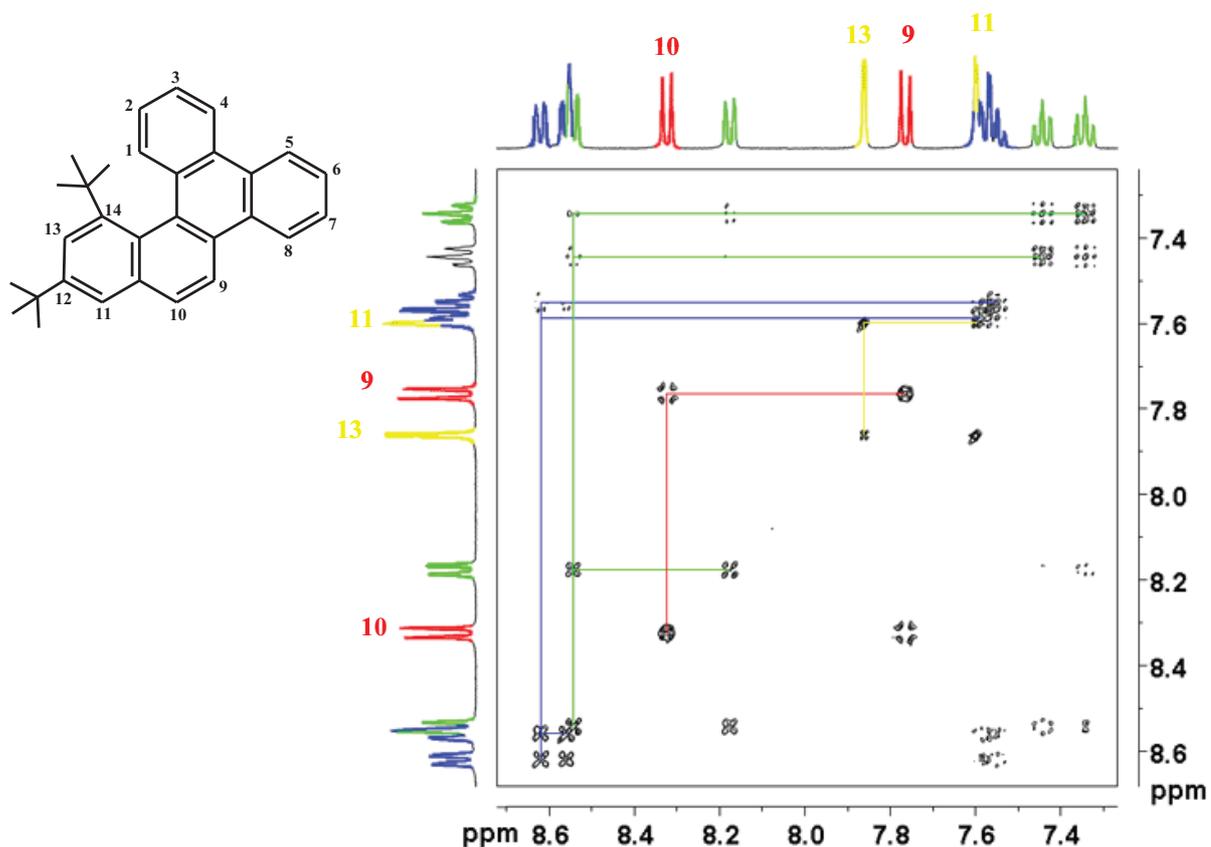


**Fig. 38** Espectro TOCSY de una molécula

En macromoléculas existe el riesgo de que aparezcan artefactos debido a la presencia de relajación cruzada (ROESY). Estos picos de artefacto son solo reconocibles porque aparecen con distinto signo de los picos diagonales. Este experimento revolucionó la asignación de señales en biomoléculas, especialmente el estudio de los carbohidratos (monosacáridos, disacáridos, etc.).

Cualquier conjunto de protones en una cadena de acoplamientos  $J$  que no este interrumpida por una constante de acoplamiento muy pequeña ( $<3$  Hz) o por un heteroátomo, puede dar lugar a picos de cruce en el experimento TOCSY.<sup>78</sup>

La Fig. 39 muestra una ampliación del espectro 2D-TOCSY del 12,14-di-*t*-butilbenzo[*g*]criseno<sup>79</sup>



**Fig. 39** Ampliación del espectro 2D-TOCSY del 12,14-di-*t*-butilbenzo[*g*]criseno

**c) 2D-INADEQUATE (Insensitive Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment)**

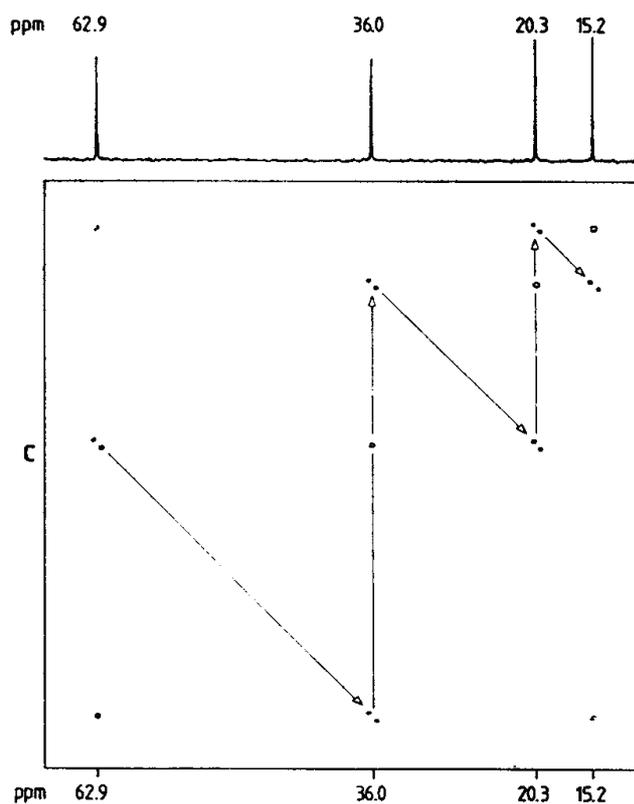
Este experimento permite realizar la conectividad carbono-carbono a través de los acoplamientos <sup>13</sup>C - <sup>13</sup>C a un enlace. Para muestras en abundancia natural de <sup>13</sup>C (1%), la probabilidad de que existan dos carbonos contiguos en la molécula es muy pequeña ( $0.01 \times 0.01 = 10^{-4}$ ) por lo que el experimento es muy insensible y requiere mucho tiempo de acumulación y utilizar una concentración de muestra elevada (100 - 500mg).

En este experimento 2D aparecen las correlaciones habituales del espectro de  $^{13}\text{C}$  a lo largo del eje horizontal, mientras que el eje vertical es un eje de frecuencias de doble cuanto (DQ) que corresponde a la suma de los desplazamientos químicos de dos carbonos acoplados a 1 enlace. Cuando una pareja de picos aparece a la misma frecuencia en la dimensión DQ significa que están acoplados.

La figura 40, indica cual es el procedimiento para analizar la conectividad de los distintos carbonos utilizando este experimento.

El espectro tiene simetría respecto de la diagonal, lo que ayuda a establecer la conectividad incluso si una de las parejas de picos es demasiado débil para ser observada.

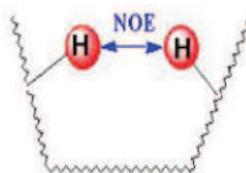
Las flechas del espectro indican la asignación del esqueleto de carbono.<sup>78</sup>



**Fig. 40** Simulación de un espectro INADEQUATE

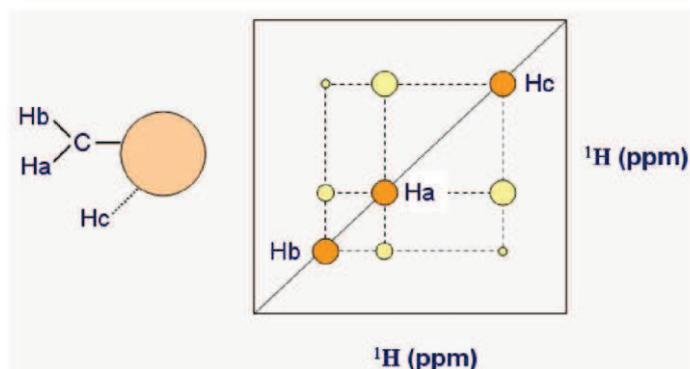
#### d) 2D NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Este experimento bidimensional sirve para determinar la estructura espacial de moléculas en disolución. Proporciona una correlación entre cada pareja de protones de la molécula que están próximos en el espacio (acoplamiento bipolar). Fig. 41



**Fig. 41** Representación de protones de una molécula

Un análisis cuantitativo de las intensidades de las señales permite determinar la distancia entre ellos.



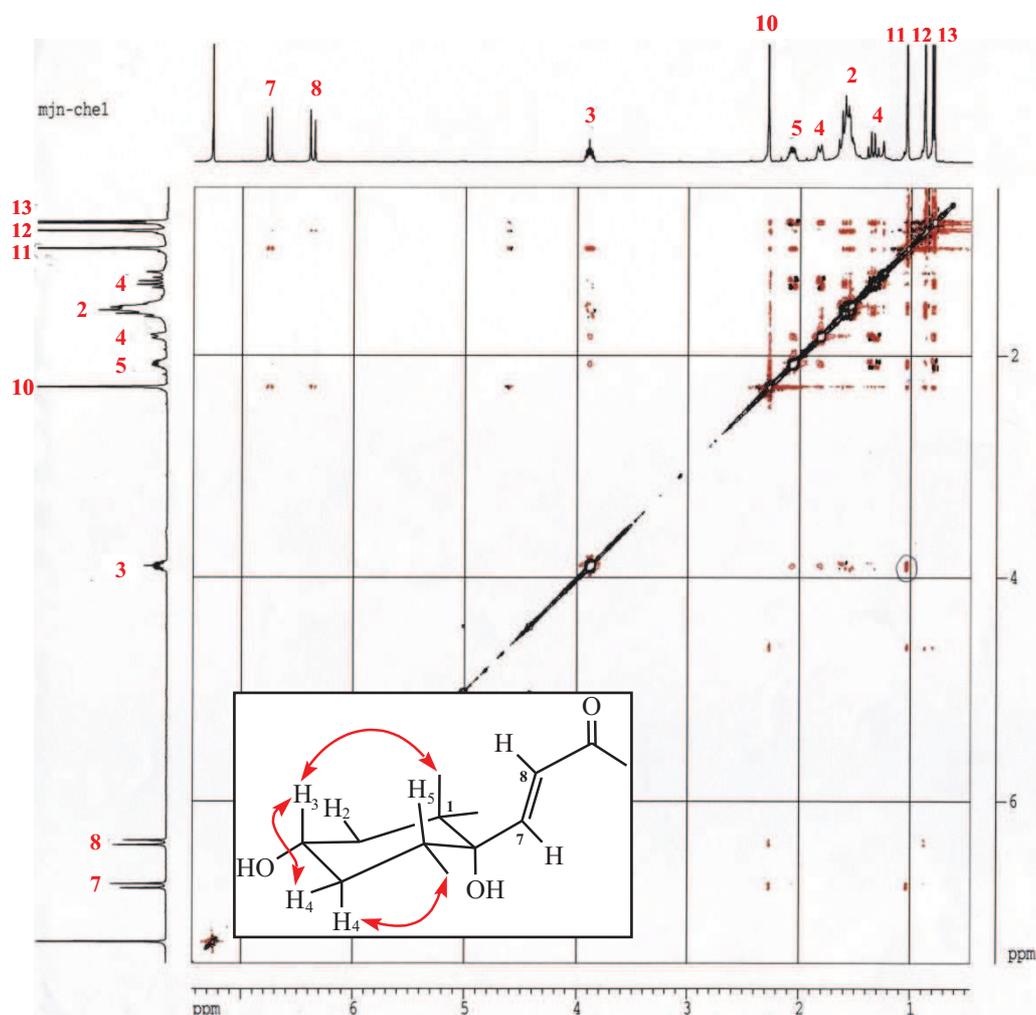
**Fig. 42** Esquema de un experimento 2D-NOESY (a la derecha) para una molécula representada a la izquierda en la figura

Los picos de la diagonal son los picos correspondientes al espectro de protón (picos Ha, Hb y Hc en color naranja.( Fig. 42) Además de estos picos, pueden aparecer otros picos fuera de la diagonal que se denominan picos de cruce (en amarillo). Para un pico de cruce se puede encontrar su correspondiente pareja de protones en la diagonal (si se mueve en el eje

vertical y en el horizontal). En principio un pico de cruce puede aparecer en el espectro cuando los dos protones correlacionados estén situados en la molécula a una distancia menor de aproximadamente  $4.5 \text{ \AA}$ . Por otro lado, la intensidad del pico de cruce en principio ha de ser tanto mayor cuanto más cerca estén los dos protones en la molécula (depende de la distancia como  $r^{-6}$ ).

Los picos de cruce del experimento aparecen en fase y pueden ser de distinto signo (moléculas pequeñas) o del mismo signo (macromoléculas) que los picos diagonales.<sup>78</sup>

La Fig. 43 muestra el espectro NOESY para Boscialin, señalándose las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (en el espacio).<sup>5</sup>



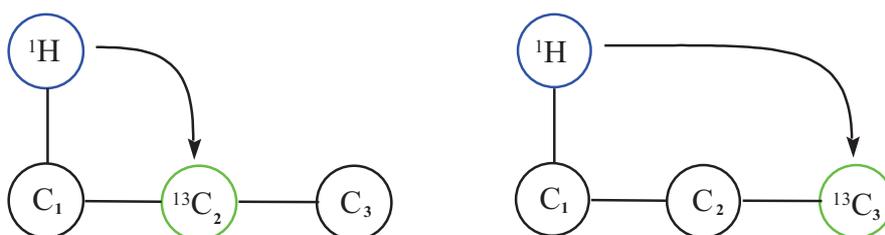
**Fig. 43** Experimento **NOESY** para **Boscialin**

## Heteronucleares

Son los espectros en dos dimensiones en la que los espines que transfieren la información durante los periodos de evolución, mezcla y/o adquisición entre distinto tipo de núcleo, por ejemplo: 2D-HMQC, 2D-HMBC y 2D-HSQC.<sup>78</sup>

### a) HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)

Es un experimento 2D que sirve para asignar señales del esqueleto de una molécula orgánica. Los picos que se observan en este experimento son correlaciones entre un protón y un heteronúcleo (por ejemplo,  $^{13}\text{C}$ , o  $^{15}\text{N}$ ) situado a una distancia de 2 o 3 enlaces. En ocasiones se puede llegar a observar correlaciones hasta 4 enlaces. En este experimento no se observan los acoplamientos directos  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  (a un enlace). Fig. 44



**Fig. 44** Representación de las correlaciones  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  a dos y tres enlaces

Este experimento permite establecer correlaciones con carbonos cuaternarios que tengan un protón a dos o tres enlaces con mucha mejor sensibilidad que en el espectro monodimensional de  $^{13}\text{C}$ , por tanto, puede ser una alternativa para detectarlos cuando la cantidad de muestra es escasa.

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de un compuesto a menudo puede determinarse mediante la información del experimento HMQC (o HSQC) que da la conectividad heteronúcleo-protón a un enlace, junto con la información obtenida del experimento HMBC que proporciona la conectividad a varios enlaces.<sup>78</sup> La Fig. 45, muestra el

espectro HMBC para el Boscialin, donde se observan por ejemplo, las correlaciones a dos enlaces del H<sub>2</sub> con el C<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> con el C<sub>3</sub> y a tres enlaces del H<sub>8</sub> con el C<sub>10</sub>.

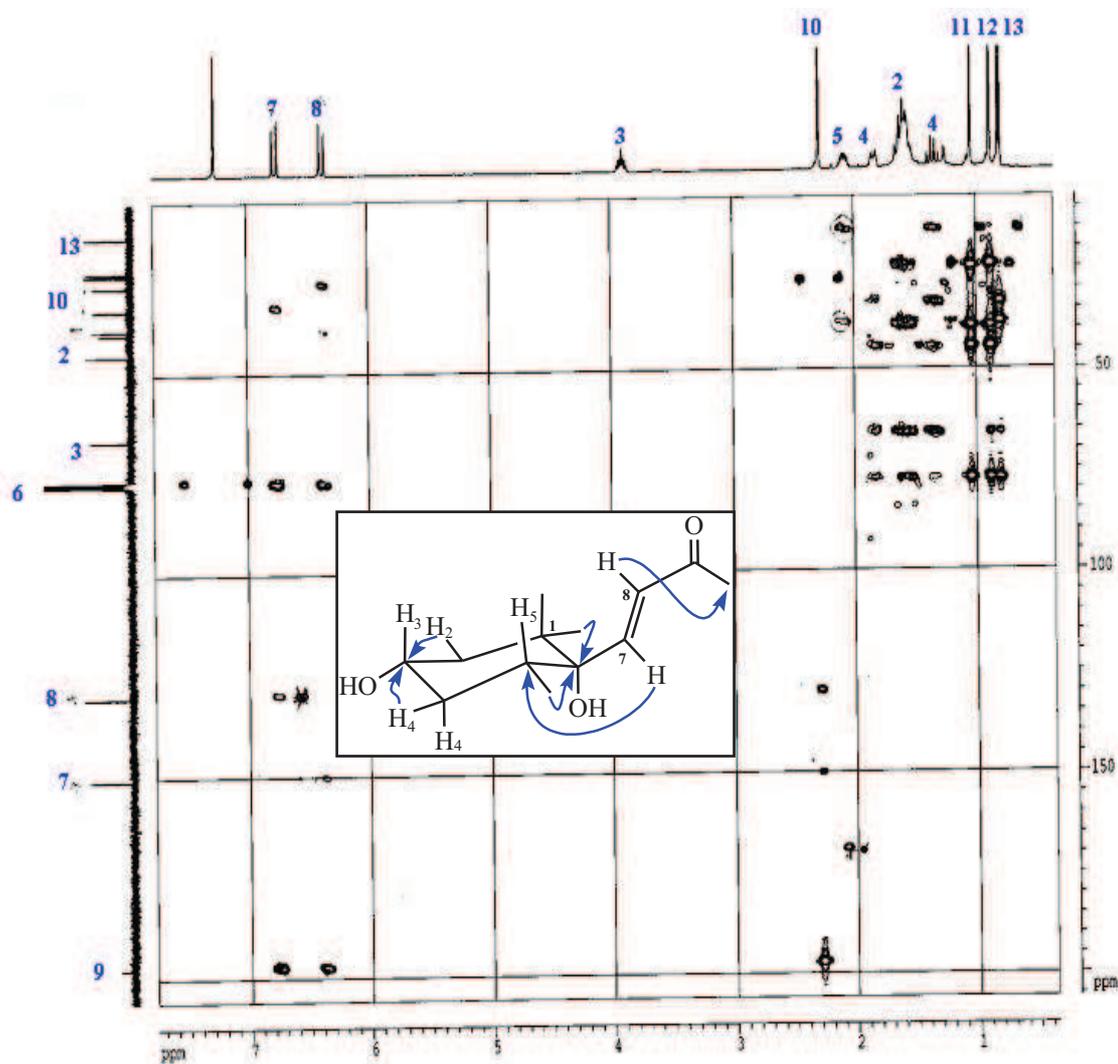


Fig. 45 Experimento HMBC (<sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C) del Boscialin

## b) 2D HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)

Este experimento proporciona correlaciones a través de acoplamiento escalar a un enlace entre un protón y el heteronúcleo al que está directamente unido.

Puede aplicarse para obtener correlaciones con heteronúcleos como  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ , etc.

Para el núcleo  $X = ^{13}\text{C}$ , el experimento HMQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  es el método de uso en la actualidad para moléculas orgánicas pequeñas. En macromoléculas se usa el experimento HSQC. Ambos experimentos HMQC y HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) proporcionan la misma información y ambos se basan en la detección exclusiva de los protones que están unidos al heteronúcleo. Cuando el núcleo es  $^{13}\text{C}$ , la secuencia debe “eliminar el 99% de los protones que están unidos a  $^{12}\text{C}$  (filtro isotópico)”.

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de un compuesto a menudo puede determinarse mediante la información del experimento HMQC (o HSQC) que da la conectividad heteronúcleo-protón a un enlace, junto con la información obtenida del experimento HMBC que proporciona la conectividad a varios enlaces. La ventaja de esta técnica es que necesita una menor cantidad de muestra, ya que la correlación C-H se establece a través del hidrógeno.<sup>78</sup>

En la Fig. 46 muestra el espectro HSQC para el Boscialin, donde se observan las correlaciones  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ , cada protón con su respectivo carbono, exceptuando los carbonos cuaternarios que no aparecen en el espectro de  $^{13}\text{C}$ .

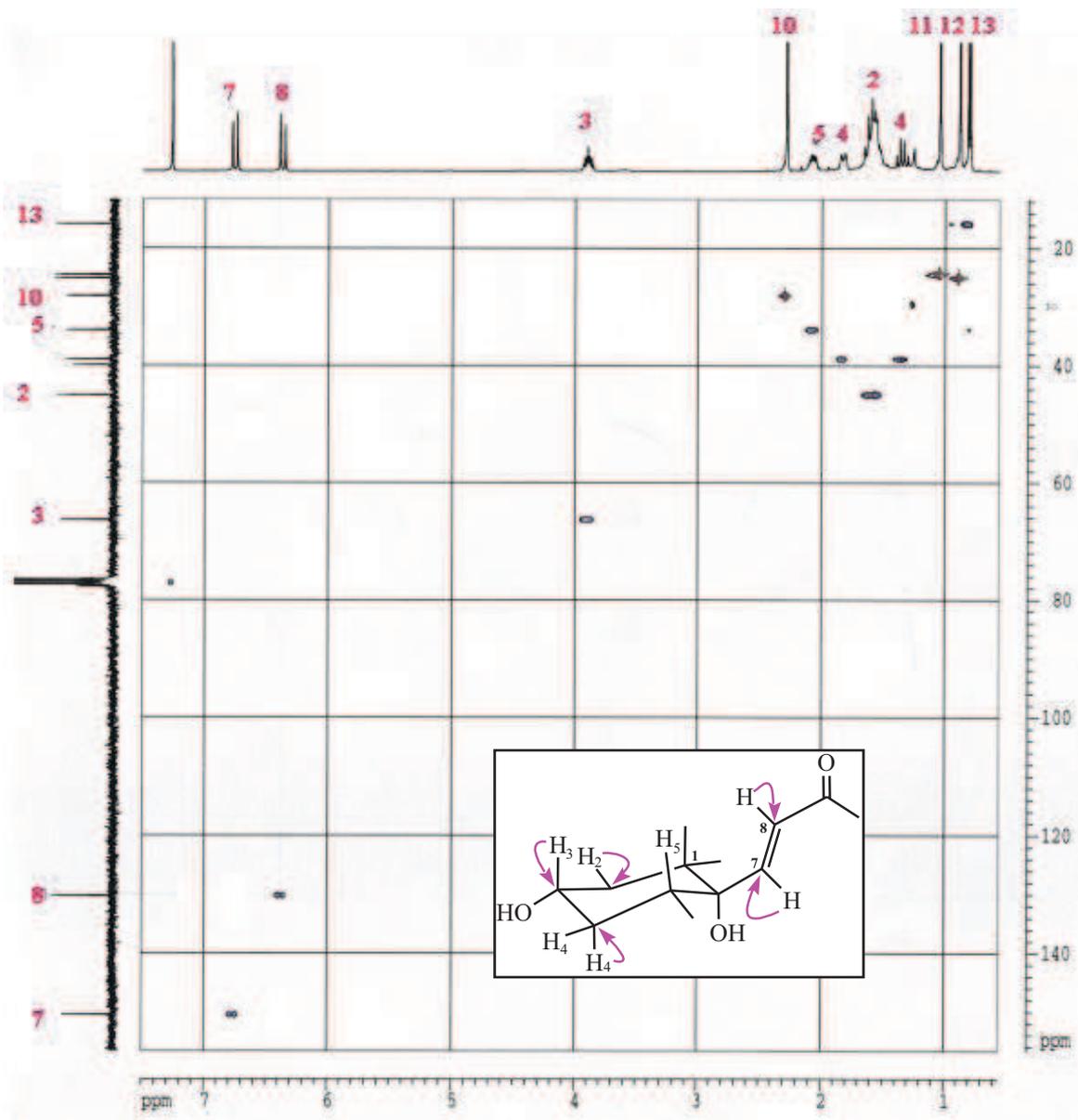


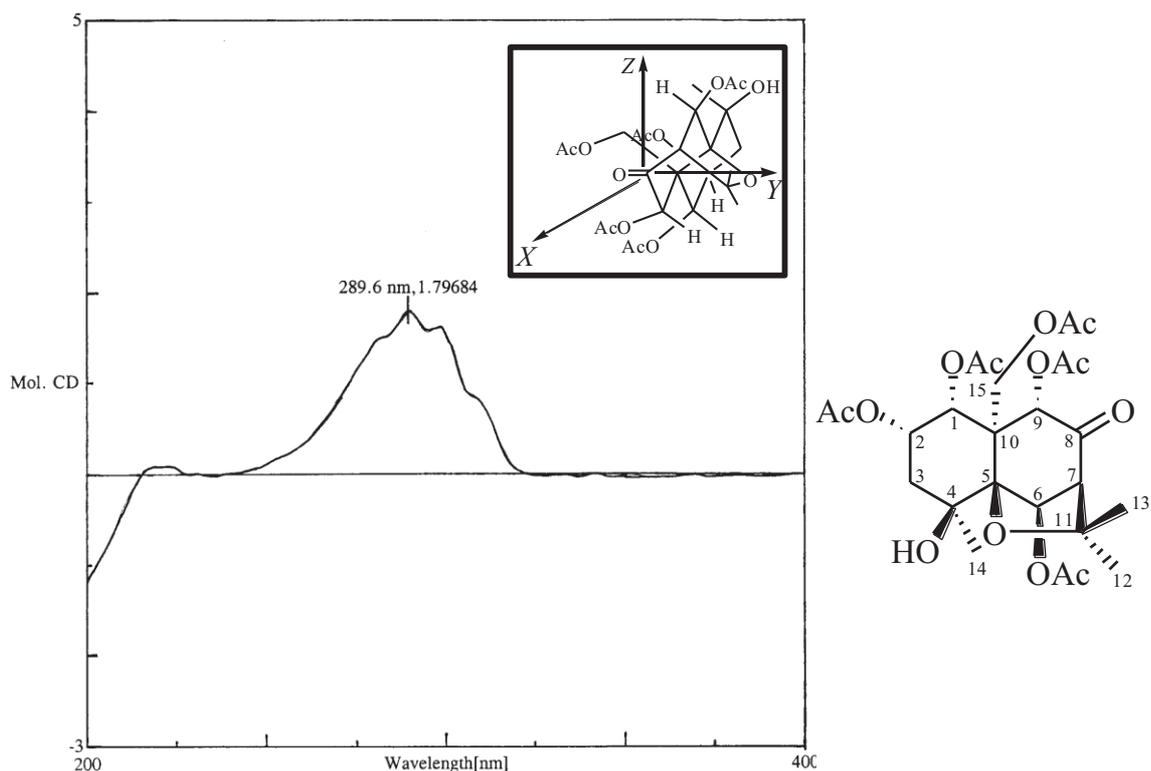
Fig. 46 Espectro HSQC del ( $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ) para Boscialin

### 2.6.5 DICROÍSMO CIRCULAR

Es un método espectroscópico en el que se irradia un rayo de luz polarizado sobre un plano formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\alpha$  y la distorsión de este plano genera una elipse.

La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. Los compuestos quirales que tienen un cromóforo que absorbe en el UV pueden dar curvas anómalas que se correlaciona con la estereoquímica de la molécula. Ello se conoce como Efecto Cotton, el cual tiene una aplicación importante para la determinación de la configuración y conformación del centro quiral en compuestos cíclicos cetónicos mediante la conocida regla del octante.<sup>72</sup>

La Fig. 47 muestra la determinación de la configuración absoluta del Sesquiterpeno **S-1**, aislado de *Crossopetalum uragoga*<sup>5</sup>, empleando la técnica del dicroísmo circular.



**Fig. 47** Dicroísmo circular de **S-1** (1*R*, 2*S*, 4*S*, 5*S*, 6*R*, 7*R*, 9*S*, 10*S*)-1,2,6,9,15-pentaacetoxi-4-hidroxi-8-oxodihidro- $\beta$ -agarofurano

## 2.6.6 DIFRACCION DE RAYOS X

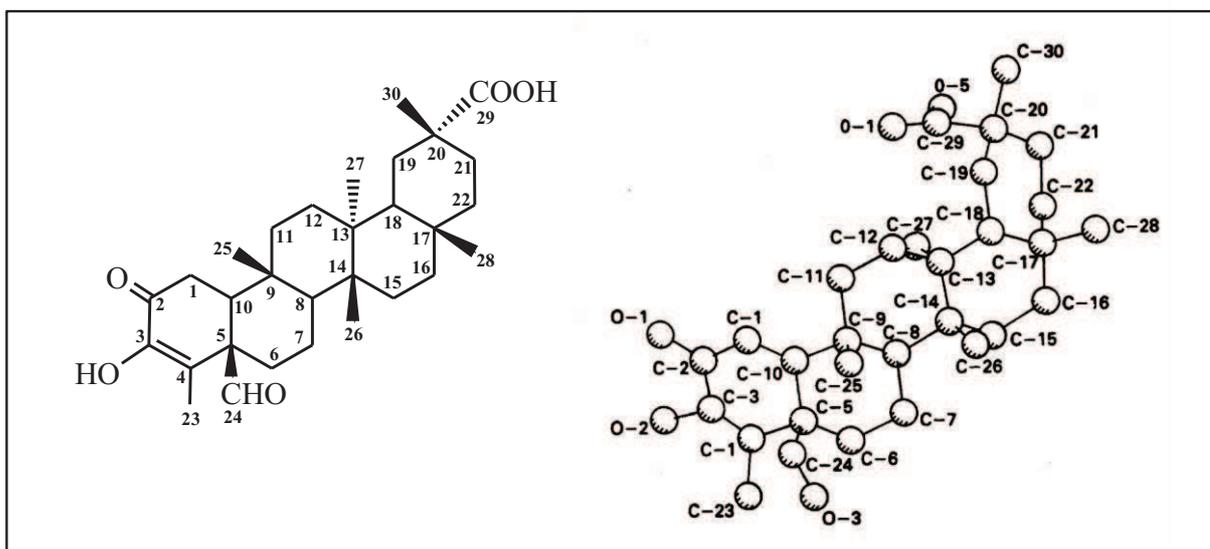
El análisis cristalográfico por rayos X es el medio más directo para determinar las estructuras, incluyendo la configuración absoluta. Aunque esta técnica, se usa con cierta frecuencia, debido a la comercialización de los aparatos automatizados, su aplicación en el área de los productos naturales es todavía limitada por cuanto es condición indispensable disponer de cristales perfectos de compuestos puros.

La interacción de los rayos X con los cristales demostró que eran radiación electromagnética de longitud de onda del orden de  $10^{-10}$  metros y que la estructura interna de los cristales era discreta y periódica, en redes tridimensionales, con separaciones de ese orden.

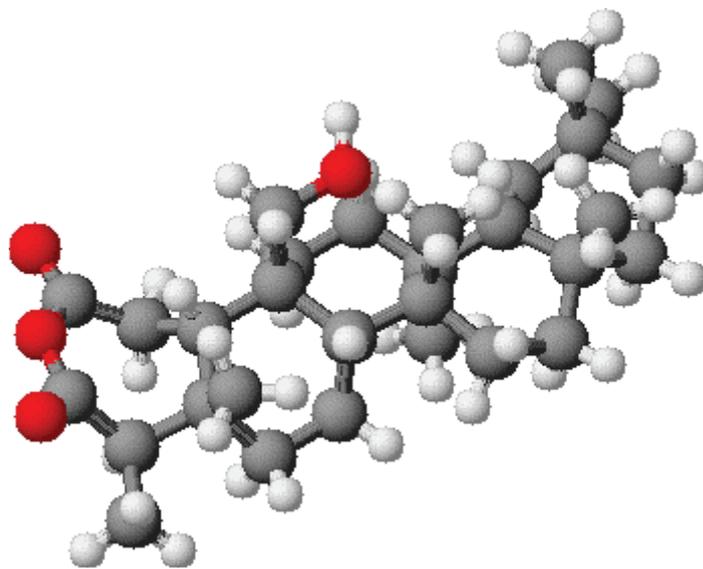
Esto hizo que, ya desde el siglo pasado, la Cristalografía se convirtiera en un aspecto básico de muchas ramas científicas y en especial de la Física y Química de la materia condensada, de la Biología y de la Biomedicina.

Los rayos X que más interesan en el campo de la *Cristalografía de rayos X*, son aquellos que disponen de una longitud de onda próxima a 1 Ångstrom (los denominados RAYOS X "duros" en el esquema superior) y corresponden a una frecuencia de aproximadamente 3 millones de THz (Tera-Hertzios) y a una energía de 12.4 keV (kilo-electrón-voltios), que a su vez equivaldría a una temperatura de unos 144 millones de grados. Estos rayos X se producen en los laboratorios de Cristalografía o en las llamadas grandes instalaciones de *sincrotrón*.<sup>80</sup>

La Fig. 48 muestra la estructura obtenida por difracción de Rayos X, del **ácido D:A-friedoolean-24-al-3-en-2-on-29-oico (Cangoronina)**, aislado del extracto metanólico de la raíz de *Maytenus ilicifolia*.<sup>81</sup>



**Fig. 48** Difractograma de Rayos X del **ácido D:A-friedoolean-24-al-3-en-2-on-29-oico (Cangoronina)**



*Lobathanhidrido*

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE *Maytenus segoviarum*

Las hojas de *Maytenus segoviarum* se recolectaron en la zona protegida del Río El Sapo, Municipio de Arambala, Departamento de Morazán, el 9 de octubre de 2004.

Se procedió a continuación al proceso de secado y luego al molido de la hoja, obteniéndose un peso de 4.63 Kg.

Los 4.63 Kg de hojas, finamente divididas, de *Maytenus segoviarum* (Celastraceae), fueron extraídas a reflujo con diclorometano en un Soxhlet, durante 5 días, obteniéndose tras evaporación del disolvente en un rotaevaporador, 191.62 g de extracto diclorometánico.

El extracto fue fraccionado mediante cromatografía líquida de vacío sobre gel de sílice, utilizando como sistema de elección inicialmente *n*-hexano, y luego mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente, hasta llegar a acetato de etilo puro. Finalmente la columna se lavo con metanol. Así fueron recogidas siete fracciones de aproximadamente dos litros cada una, que fueron reunidas de acuerdo a la similitud presentada en cromatografía en capa fina.

Las fracciones fueron sometidas a sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico, cloroformo, metanol, tolueno y benceno.

### **3.2 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS RAMAS DE *Maytenus segoviarum***

Las ramas de *Maytenus segoviarum* se recolectaron en la zona protegida del Río El Sapo, Municipio de Arambala, Departamento de Morazán, el 9 de octubre de 2004.

Se procedió a continuación al proceso de secado y luego al molido de las ramas, obteniéndose un peso de 650.0 g.

Los 650.0 g de ramas, finamente divididos de *Maytenus segoviarum* (Celastraceae), fueron extraídos a reflujo con etanol en un Soxhlet, durante 4 días, obteniéndose tras evaporación del disolvente 79.0 g de extracto etanólico, una vez separado el disolvente por medio del rotaevaporador, fue suspendido en agua y extraído con diclorometano, luego de una posterior evaporación del disolvente se obtuvieron 7.5 g de extracto diclorometánico.

El extracto fue fraccionado mediante cromatografía líquida de vacío sobre gel de sílice, utilizando como sistema de elección inicialmente *n*-hexano, y luego mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en gradiente de polaridad creciente, hasta llegar a acetato de etilo puro. Finalmente la columna se lavo con metanol. Así fueron recogidas 33 fracciones de aproximadamente 300 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo a la similitud presentada en cromatografía de capa fina.

Las fracciones fueron sometidas a sucesivas cromatografías sobre gel de sílice en columnas y placas preparativas usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico, cloroformo, metanol, tolueno y benceno.

### 3.3 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS RAICES DE *Cassine xylocarpa*

Las raíces de *Cassine xylocarpa* se recolectaron en el Parque Nacional “El Imposible”, localizado en el Municipio de San Francisco Menéndez, Departamento de Ahuachapán, en mayo de 2004.

Se procedió al secado de la raíz, posteriormente se separó la corteza y se molió, obteniéndose 985 g de polvo.

Los 985 g de corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* (Celastraceae), fueron extraídos a reflujo con una mezcla de solventes *n*-hexano/éter etílico 1:1 en un Soxhlet, durante 4 días, obteniéndose tras evaporación del disolvente en un rotaevaporador, 58.4 g de extracto.

El extracto fue fraccionado mediante cromatografía líquida de vacío sobre gel de sílice, utilizando como sistema de elección inicialmente diclorometano, y luego mezclas de diclorometano-acetona en gradiente de polaridad creciente, hasta llegar a acetona pura. Finalmente la columna se lavo con metanol. Así fueron recogidas dieciséis fracciones de aproximadamente un litro cada una, que fueron reunidas de acuerdo a la similitud presentada en cromatografía en capa fina.

Las fracciones fueron sometidas a sucesivas cromatografías en columna sephadex LH-20 (*n*-hexano:CHCl<sub>3</sub>:MeOH) (2:2:1), cromatografía sobre gel de sílice en columna y placas preparativas usando como eluyentes mezclas de *n*-hexano, acetona, acetato de etilo, diclorometano, éter dietílico, cloroformo, metanol, tolueno y benceno.

## **3.4 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS EMPLEADAS**

### **3.4.1 Resonancia Magnética Nuclear**

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT y experimentos bidimensionales se realizaron en los espectrómetros Bruker Avance 300 (300 MHz para  $^1\text{H}$  y 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) y Bruker Avance 400 (400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Los productos se disolvieron en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Se utilizó como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. En los experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singulete, (d) doblete y (m) multiplete y en los experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$ : (c)  $\text{CH}_3$ , (t)  $\text{CH}_2$ , (d) CH y (s) C.

### **3.4.2 Experimentos Bidimensionales**

Los experimentos bidimensionales se realizaron con los programas COSY, HSQC, HMBC y ROESY, suministrados por la casa Bruker.

### **3.4.3 Espectroscopía Infrarroja (IR)**

Los espectros de infrarrojo fueron realizados con los productos puros en disolución de cloroformo seco, formado una película sobre pastillas de NaCl de 0.2 mm de espesor. Se usó el espectrofotómetro Bruker IFS 55 (FTIR), los valores de  $\nu$  se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.4.4 Espectroscopía Ultravioleta (UV)**

Los espectros de ultravioleta se efectuaron con el producto disuelto en etanol, en una celda de cuarzo de 1 mL de volumen con un paso de luz de 10 mm. Se utilizó el aparato Jasco V-560. Los valores de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la muestra se expresan en nm.

### **3.4.5 Rotación Óptica ( $[\alpha]_D$ )**

La determinación del valor de la actividad óptica se realizó con el polarímetro Perkin Elmer 343, usando la línea D del sodio a 20°C. Para la realización de la medida el producto se disolvía en cloroformo seco, en una célula de 1 mL de volumen y 1 dm de paso de luz. La concentración esta expresada en gramos por 100 mL de disolución.

### **3.4.6 Espectrometría de masas de baja resolución (EM)**

La realización de los espectros de masas de baja resolución se llevaron a cabo en espectrómetro Hewlett Packard 5995, VG Micromass AZ B-2F y/o Espire 3000 Bruker. Los métodos de ionización empleados son impacto electrónico (IE) empleando potenciales de ionización de 70 eV, bombardeo con átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI)

### **3.4.7 Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)**

La determinación de las fórmulas moleculares, de fragmentos y/o iones moleculares, se realizo en el espectrómetro VG Micromass ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15-70 eV), y Fisons Instruments VG Autospec.

## **3.5 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

### **3.5.1 Cromatografía en capa fina (CCF)**

Las cromatografías en capa fina se realizaron sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV<sub>254</sub>. La detección de los productos sobre las placas se realizo por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien aspersando óleum (disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O, 1:20:4) y posterior calentamiento a 120°C.

### **3.5.2 Cromatografía preparativa en capa fina (CCFP)**

Se utilizaron placa (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluoresceína a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel SIL G-100 UV<sub>254</sub>. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 30 mg, usándose para la elución diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realizo por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien aspersando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de loa placa con una lamina de vidrio y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

### **3.5.3 Cromatografía en columna (CC)**

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se empleo gel de sílice fina, de 0.063-0.200 mm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. Las columnas secas se montaron aplicando vacío a la columna mientras se carga lentamente con gel de sílice. La mezcla a resolver se coloco en la parte superior de la columna absorbida en gel de sílice gruesa, de 0.2-0.5 mm de diámetro, de la empresa Merck. Las columnas húmedas se montaron con gel suspendido en un disolvente, con posterior compactación por presión, colando la muestra a resolver disuelta en la mínima cantidad de disolvente.

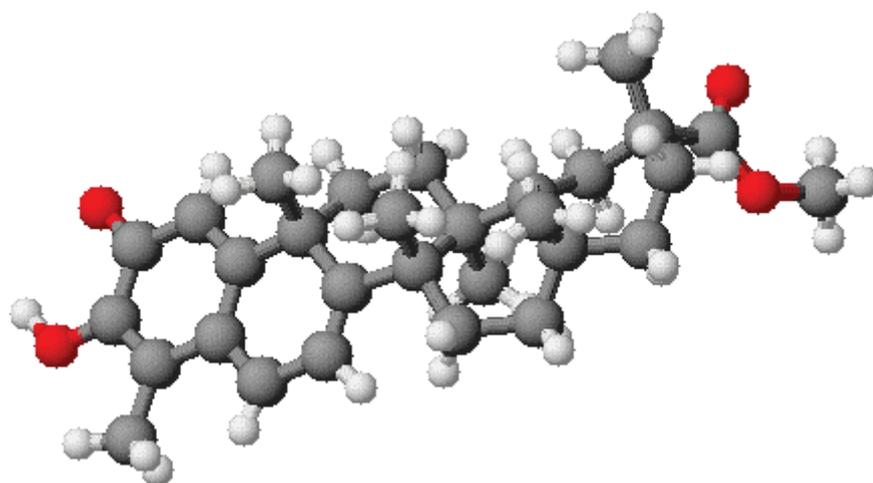
### **3.5.4 Cromatografía de exclusión molecular**

Se uso como soporte Sephadex LH-20, suministrado por la empresa Sigma, y que requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4.1 mL/g), durante al menos doce horas. A continuación, se vierte en la columna y se deja reposar durante una hora, aproximadamente. Esta columna se estabiliza, posteriormente en la mezcla que se va a usar como eluyente, para lo cual se eluye tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que en general se utiliza es *n*-hexano:cloroformo:metanol (2:1:1). La muestra a cromatografiar, tras ser filtrada, se coloco en la cabeza de la columna disuelta en

una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va a utilizar.

### **3.6 PROGRAMAS INFORMÁTICOS:**

Para los cálculos de mecánica molecular se utilizó el PC Model 7.0, en la simulación de espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  hemos empleado el ACD/Labs, para el procesamiento y el análisis de los espectros de RMN el MestREC y en la representación de las moléculas el ChemDraw Ultra 8.0



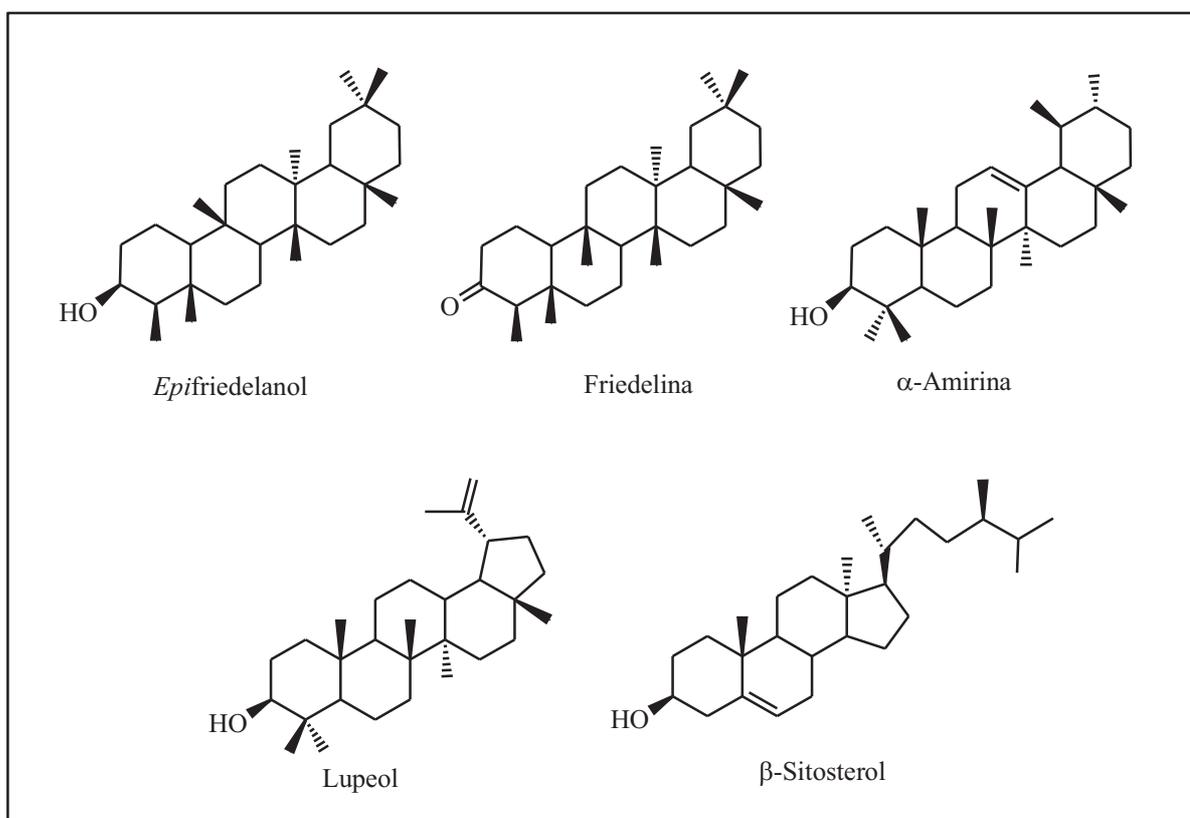
*Pristimerina*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

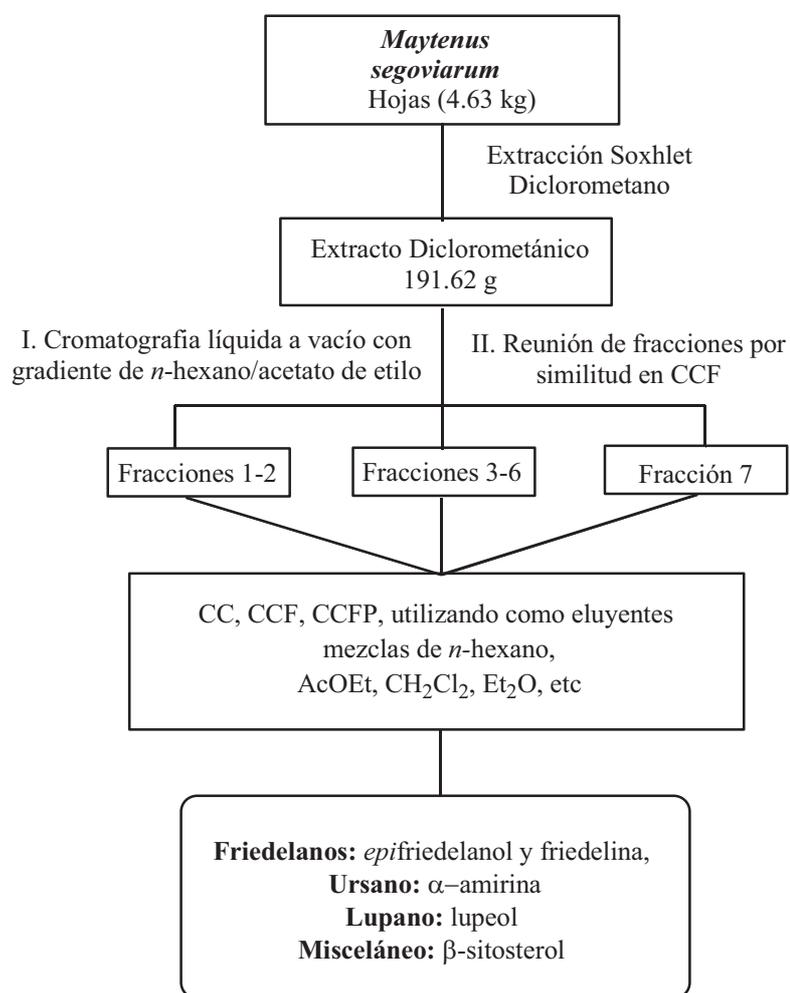
### 4.1 AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS HOJAS DE *Maytenus segoviarum*

El Extracto diclorometánico de las hojas de *Maytenus segoviarum* rindió un 4.1% y después de sucesivas cromatografías, se aislaron cinco productos conocidos en la literatura química (Fig. 49): *epifriedelanol*, *friedelina*,  $\alpha$ -*amirina*, *lupeol* y  $\beta$ -*sitosterol*. (Esquema 1)



**Fig. 49** Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de las hojas de *Maytenus segoviarum*

El esquema 1 representa el proceso de extracción, fraccionamiento y aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Maytenus segoviarum*

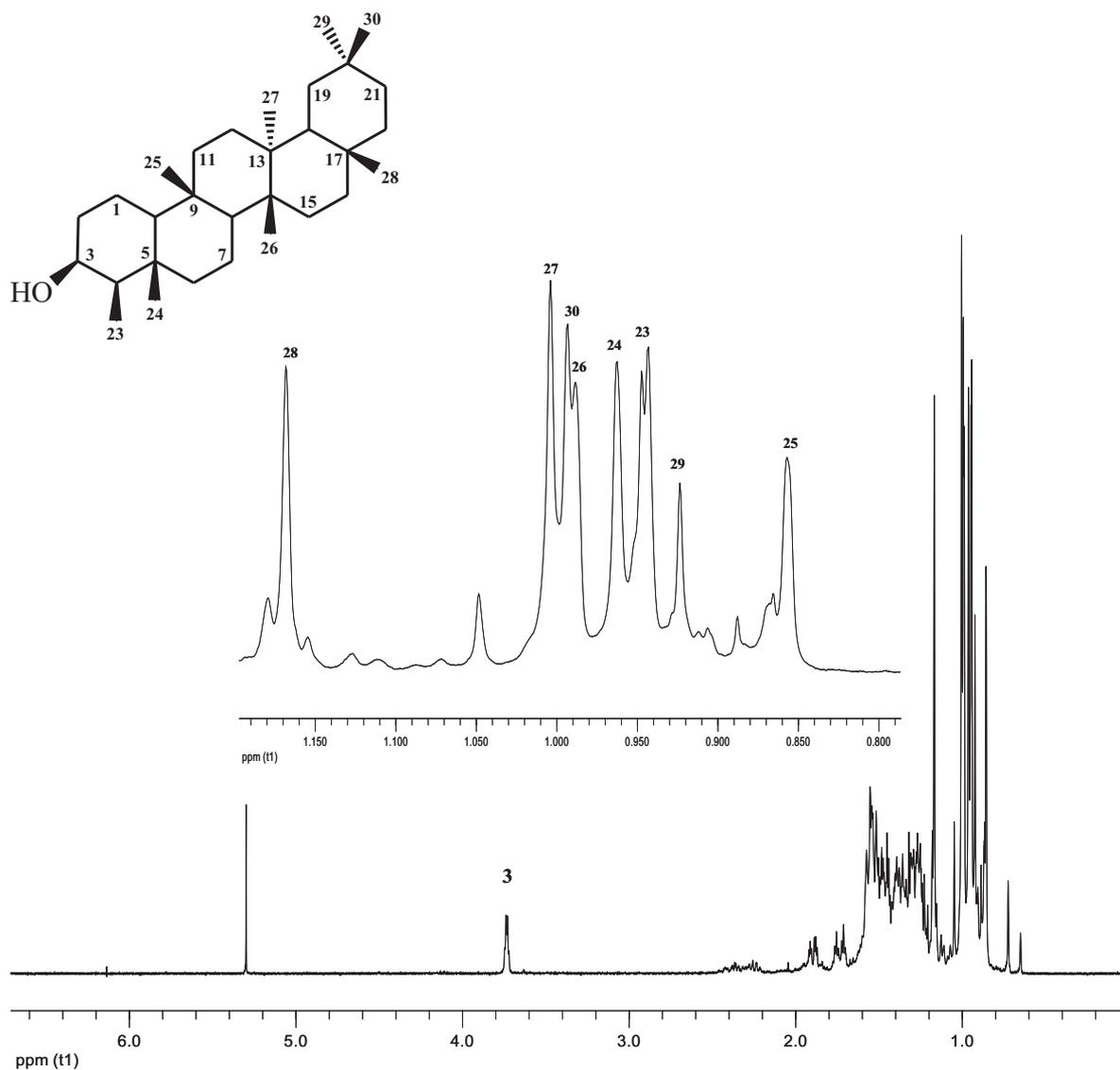


**Esquema 1.** Separación de los metabolitos secundarios de las hojas de *Maytenus segoviarum*

Los productos fueron elucidados, por medio de su comparación con datos de espectros de RMN-<sup>1</sup>H reportados en artículos científicos.

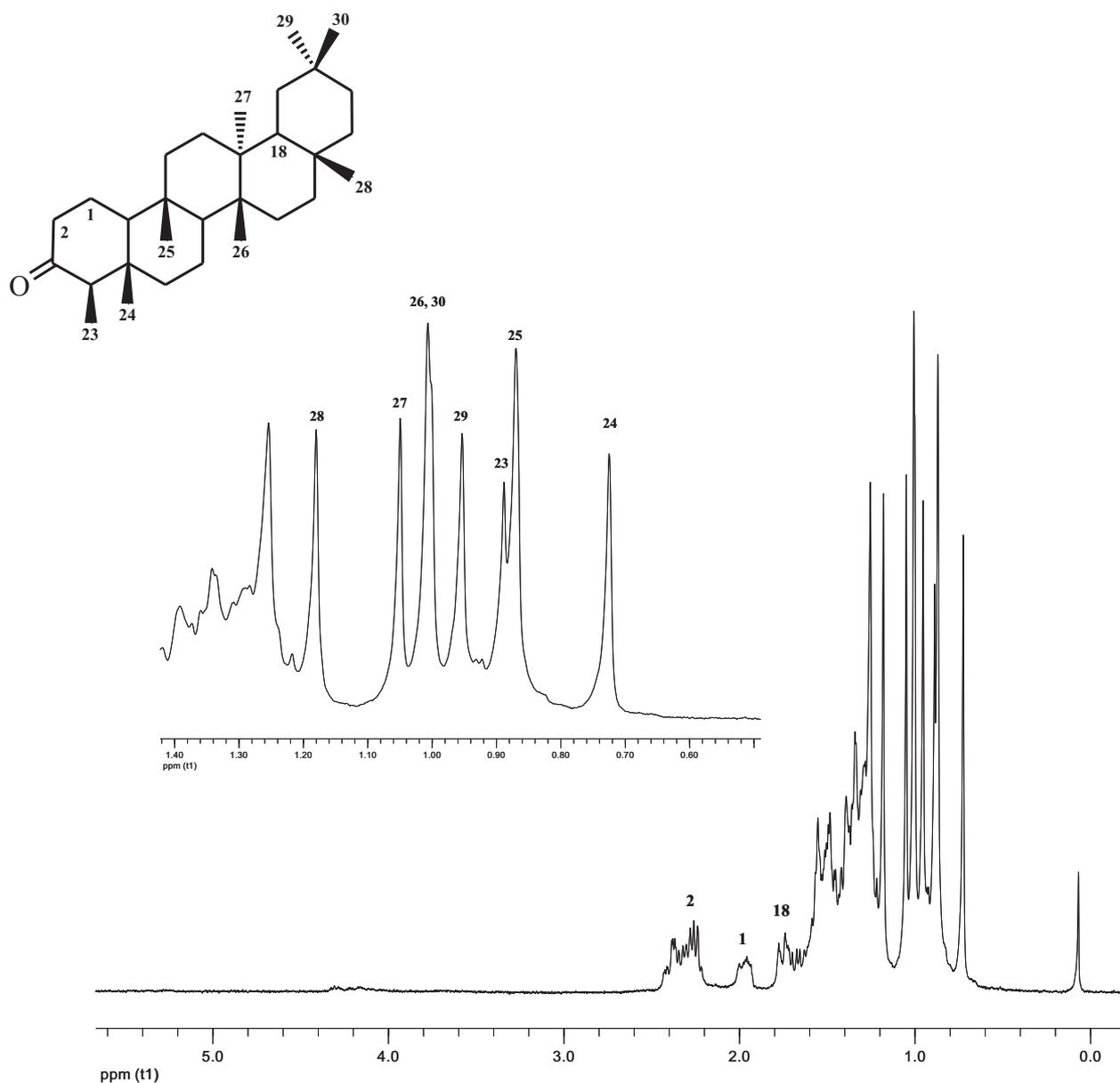
A continuación se muestran los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los distintos metabolitos secundarios aislados.

#### 4.1.1 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del epifriedelanol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



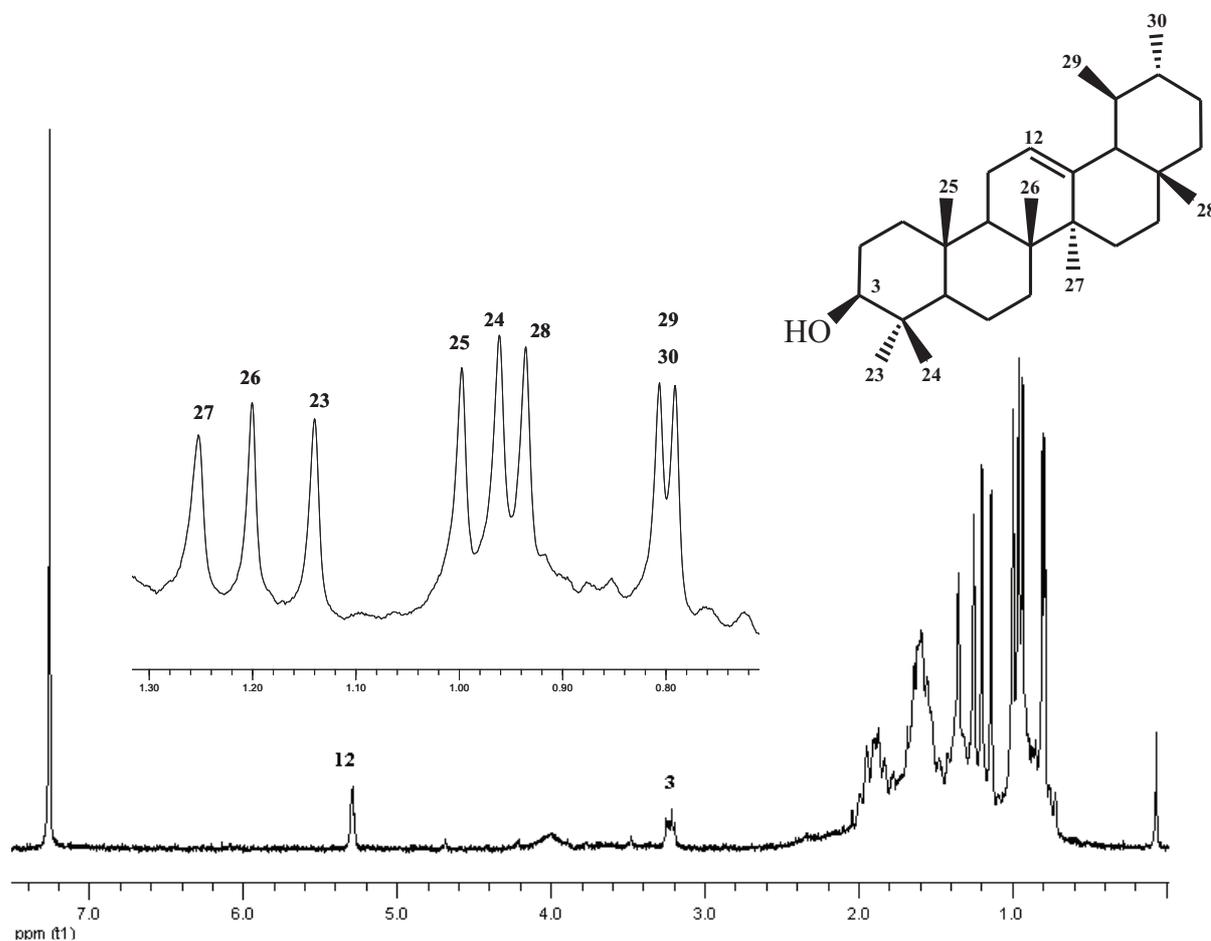
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 3.73 (1H, dd,  $J = 2.4, 4.8$  Hz, H-3), 1.17 (3H, s, H-28), 1.00 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, s, H-30), 0.988 (3H, s, H-26), 0.96 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-23), 0.92 (3H, s, H-29), 0.86 (3H, s, H-25).<sup>82</sup>

#### 4.1.2 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la Friedelina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



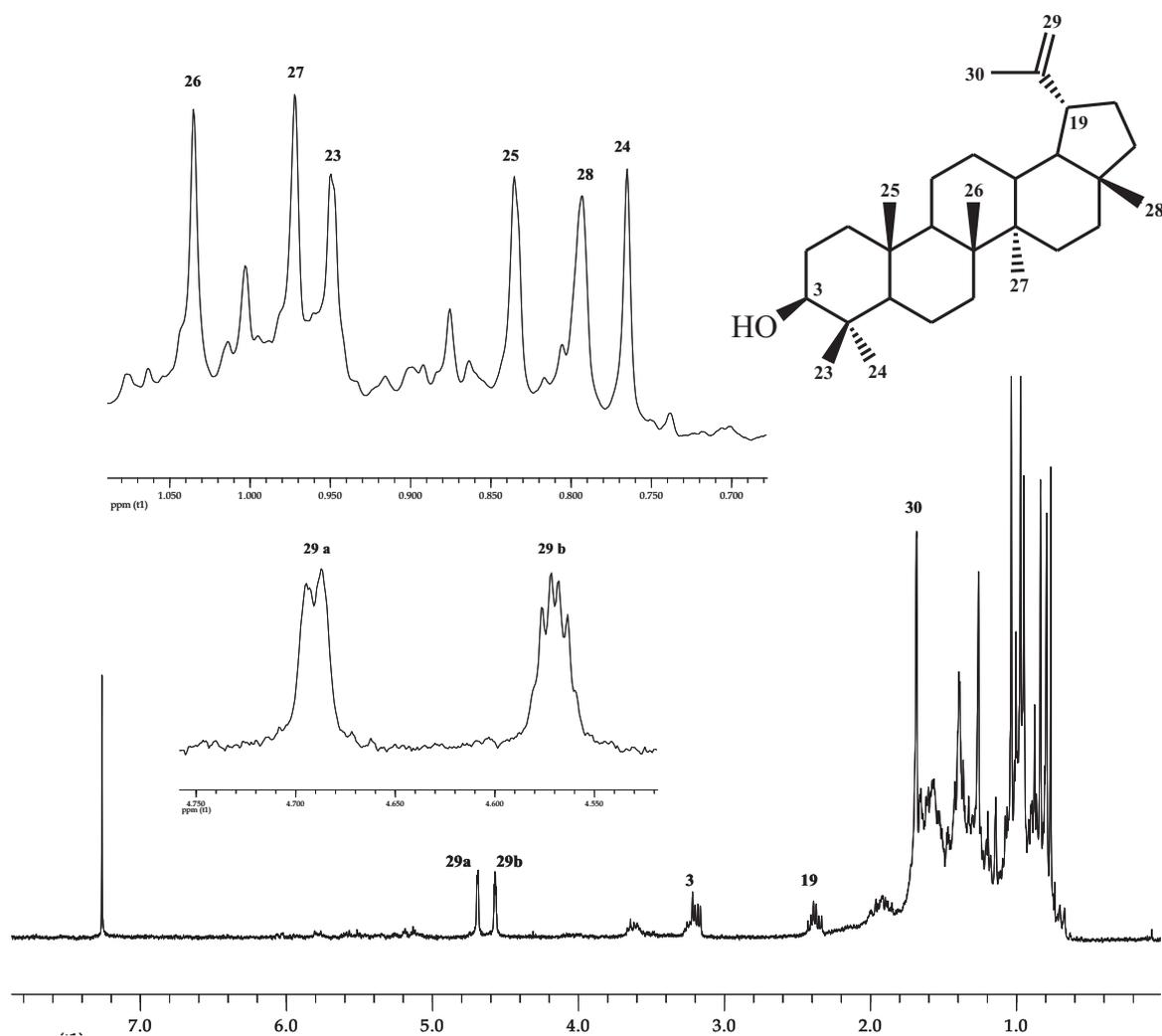
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 2.37 (1H, m, H-2), 1.97 (1H, m, H-1), 1.55 (1H, s, H-18), 1.18 (3H, s, H-28), 1.05 (3H, s, H-27), 1.0 (3H, s, H-26, 30), 0.95 (3H, s, H-29), 0.89 (3H, s, H-23), 0.87 (3H, s, H-25), 0.72 (3H, s, H-24)<sup>83</sup>

### 4.1.3 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la $\alpha$ -Amirina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



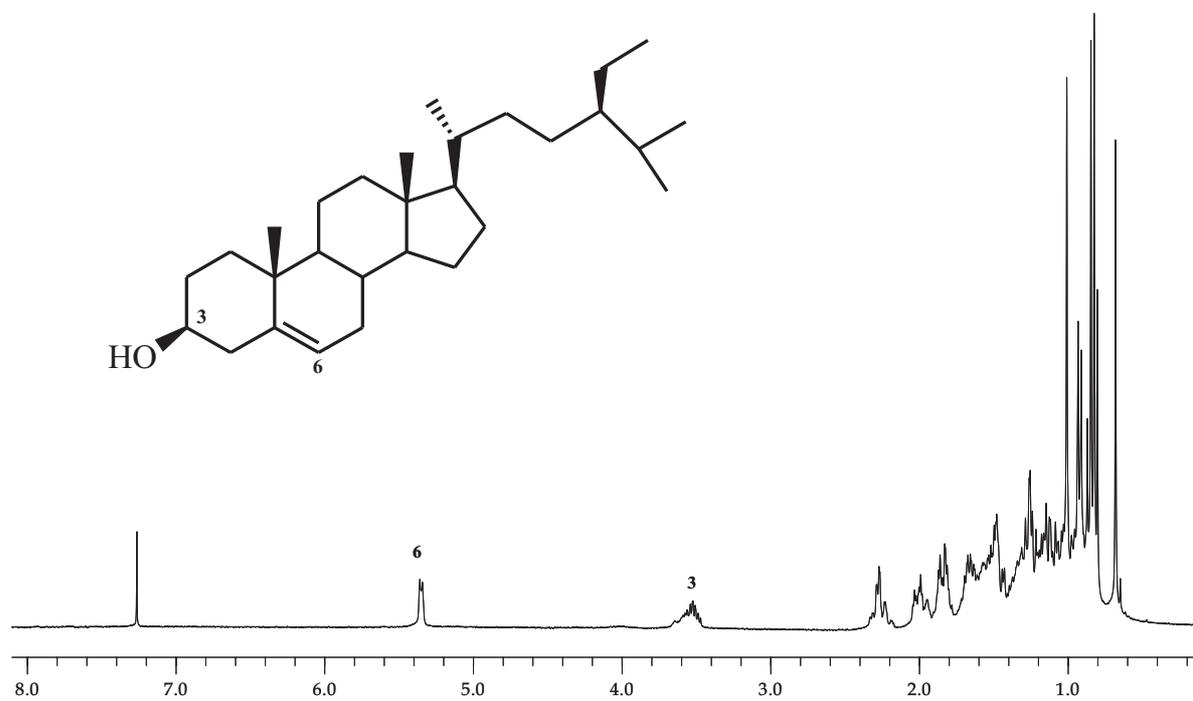
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):**  $\delta$ : 5.29 (1H, t,  $J = 6$  Hz, H-12), 3.22 (1H, dd,  $J_{ae} = 3.3$  Hz,  $J_{aa} = 15.6$  Hz, H-3), 1.25 (3H, s, H-27), 1.2 (3H, s, H-26), 1.14 (3H, s, H-23), 1.0 (3H, s, H-25), 0.96 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-28), 0.80 (6H, d,  $J = 6$  Hz, H-29, H-30)<sup>84, 85</sup>

#### 4.1.4 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del Lupeol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 4.69 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-29a), 4.57 (1H, sext,  $J = 1.2$  Hz, H-29b), 3.18 (1H, dd,  $J = 5.1, 10.8$  Hz, H-3), 2.39 (1H, m, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 0.97 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-25), 0.79 (3H, s, H-28), 0.77 (3H, s, H-24)<sup>86, 87</sup>

#### 4.1.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del $\beta$ -Sitosterol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )

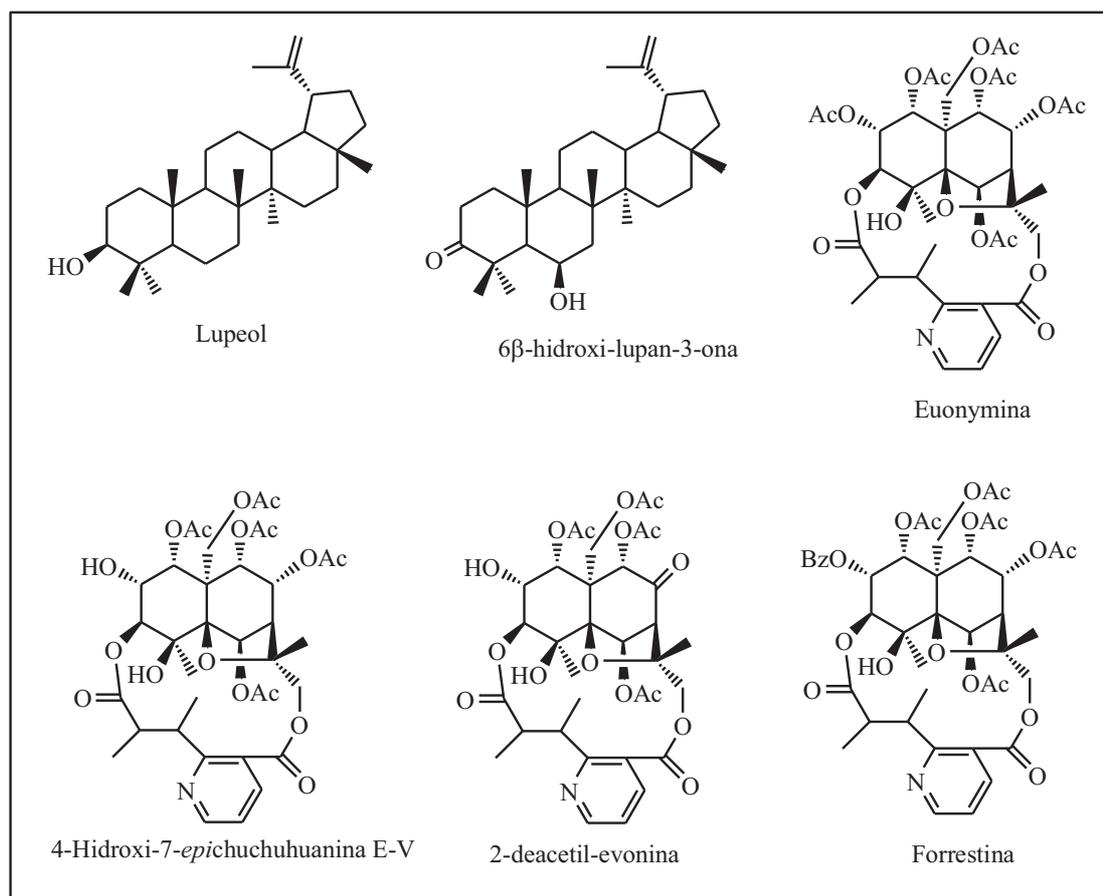


RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 5.35 (1H, d,  $J = 6$  Hz, H-6), 3.41 (1H, m, H-3), 0.59-2.34 (48 H, m).<sup>88</sup>

## 4.2 AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS RAMAS DE *Maytenus segoviarum*

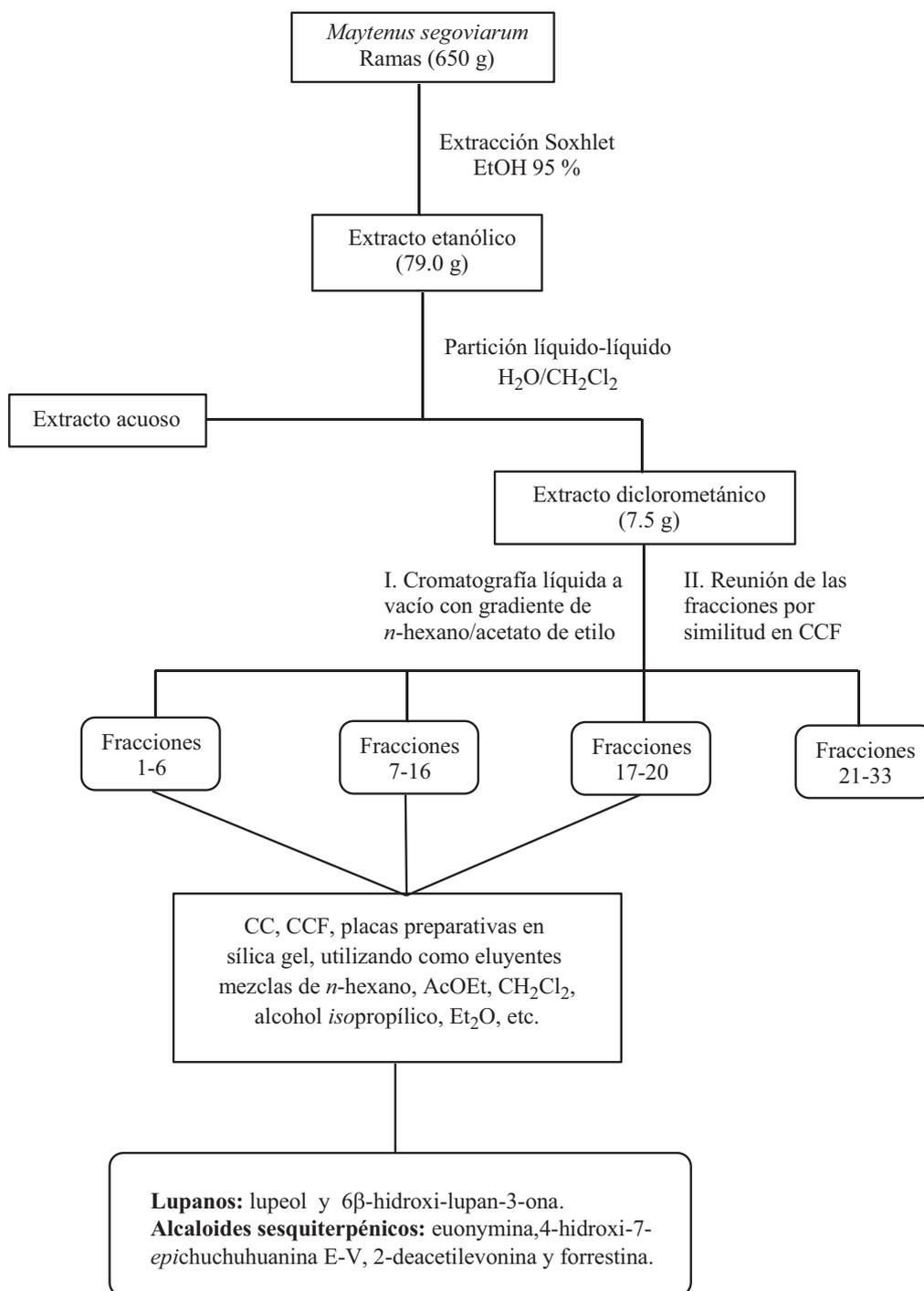
El extracto etanólico de las ramas de *Maytenus segoviarum* obtuvimos un rendimiento de 12.2% y del extracto diclorometánico 9.5%.

Después de sucesivas cromatografías, del extracto diclorometánico de las ramas de *Maytenus segoviarum* se aislaron seis productos conocidos (Fig. 50) en la literatura química: lupeol (Pág. 75), 6 $\beta$ -hidroxi-lupan-3-ona, euonymina, 4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V, 2-deacetil-evonina y forrestina.



**Fig. 50** Estructuras de los metabolitos secundarios aislados de las ramas de *Maytenus segoviarum*

El esquema 2 representa el proceso de extracción, fraccionamiento y aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en las ramas de *Maytenus segoviarum*

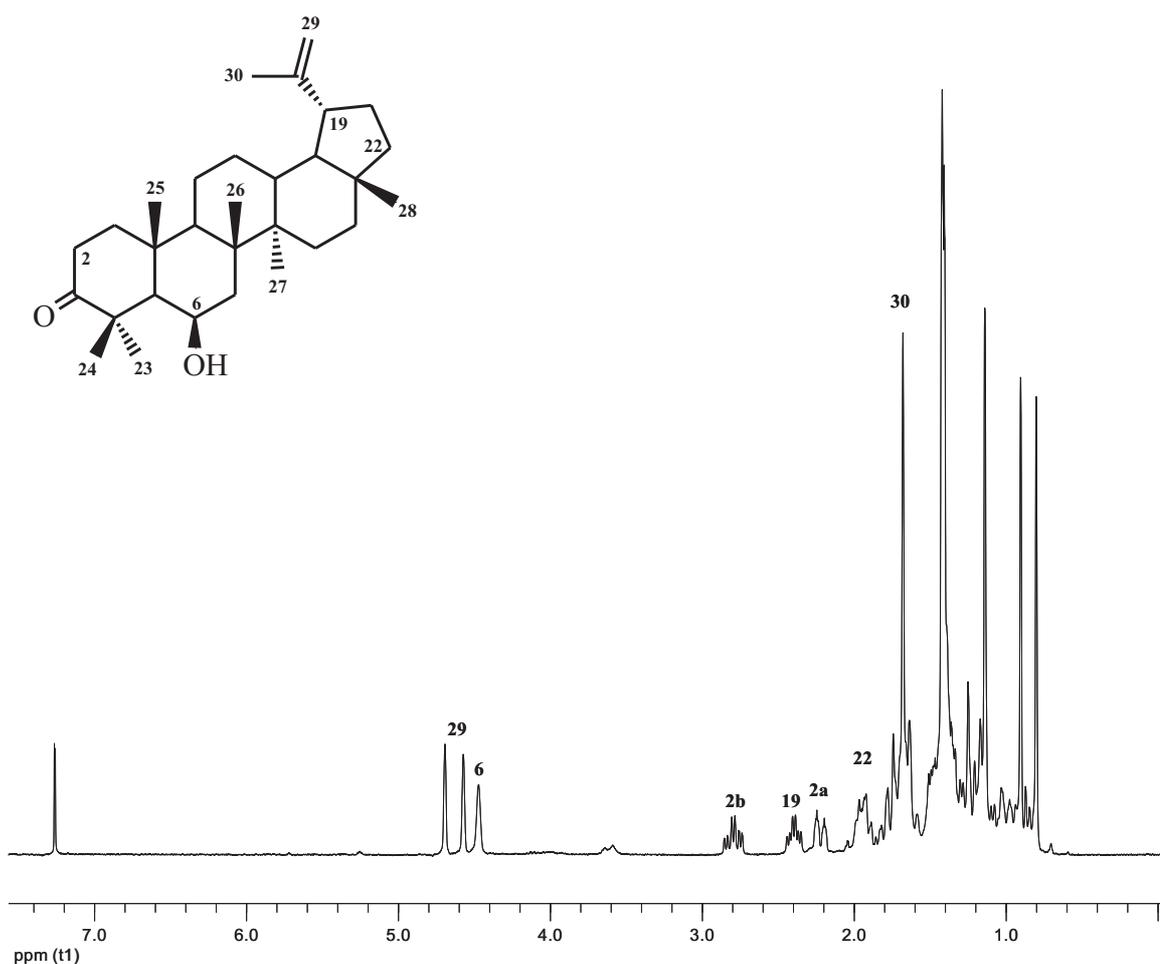


**Esquema 2.** Separación de los metabolitos secundarios de las ramas de *Maytenus segoviarum*

Los productos fueron elucidados, por medio de su comparación con datos de espectros de RMN  $^1\text{H}$  reportados en artículos científicos de la especialidad.

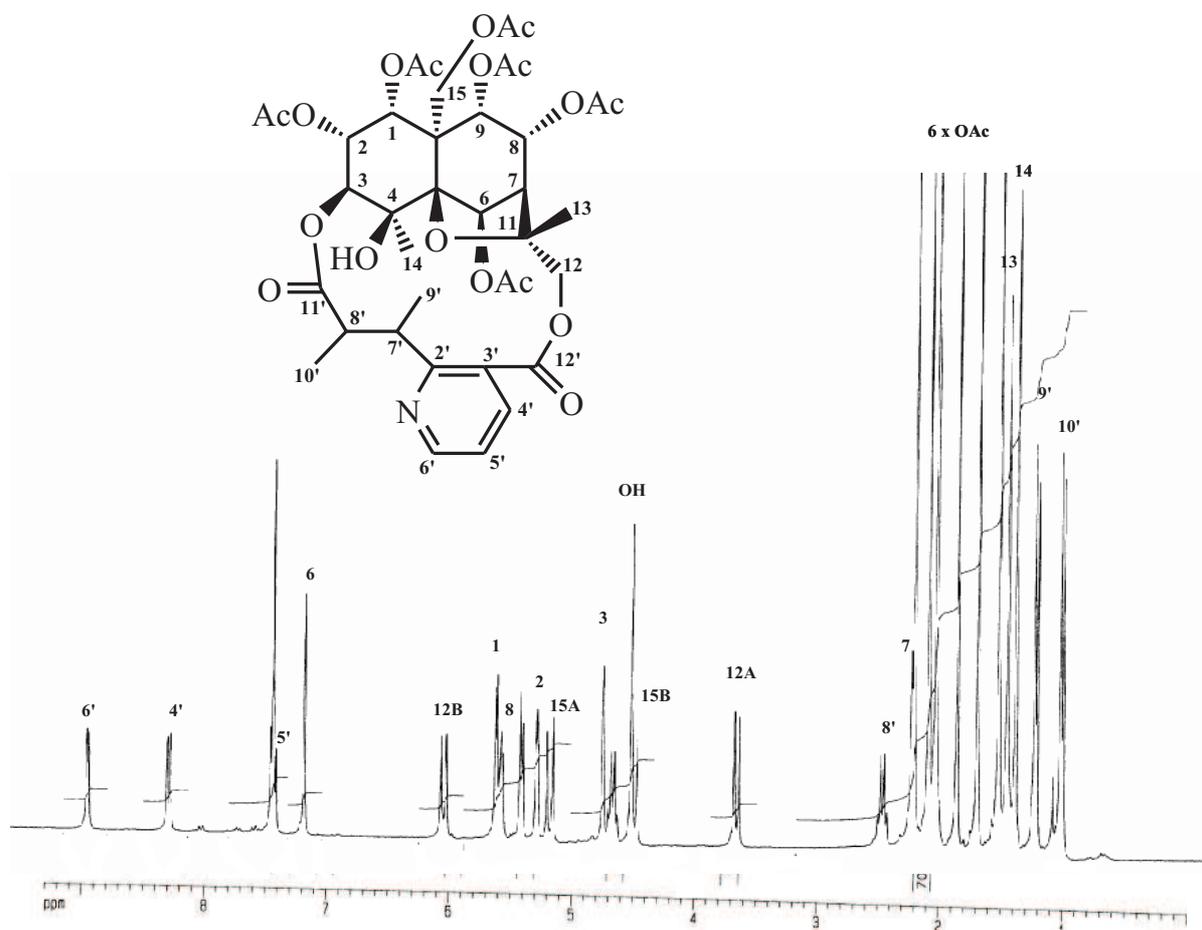
A continuación se muestran los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los distintos metabolitos secundarios aislados.

#### 4.2.1 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 6 $\beta$ -hidroxi-lupan-3-ona (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



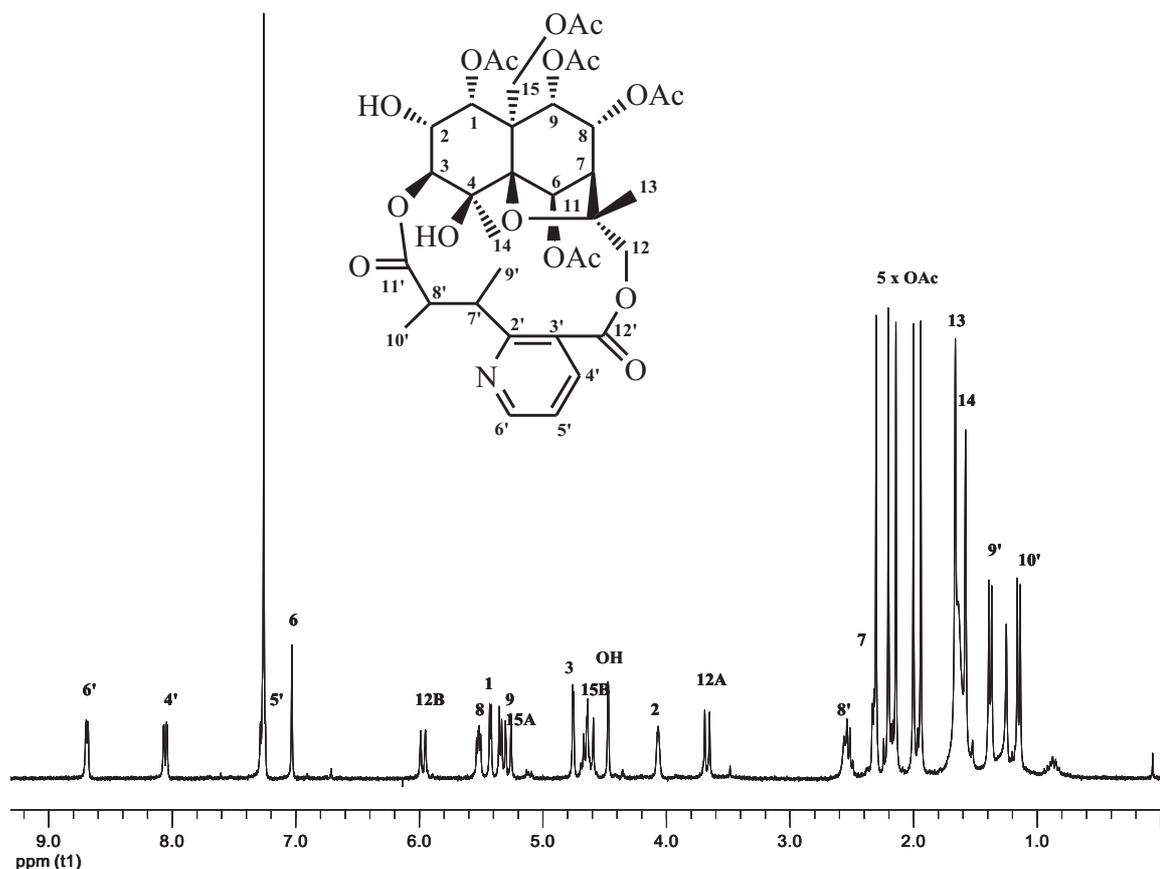
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  4.63 (1H, s, H-29a), 4.57 (1H, s, H-29b), 4.47 (1H, s, H-6), 2.79 (1H, tdd,  $J = 5.4, 6.6, 14.1$  Hz, H-2b), 2.40 (1H, ddd,  $J = 5.7, 11.1$  Hz, H-19), 2.32 (1H, dt,  $J = 1.8, 15$  Hz, H-2a), 1.92 (1H, m, H-22), 1.68 (3H, s, H-30), 1.42, 1.41 (9H, s, H-23, H-25, H-26), 1.14 (3H, s, H-24), 0.91 (3H, s, H-27), 0.80 (3H, s, H-28).<sup>89</sup>**

#### 4.2.2 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la Euonymina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



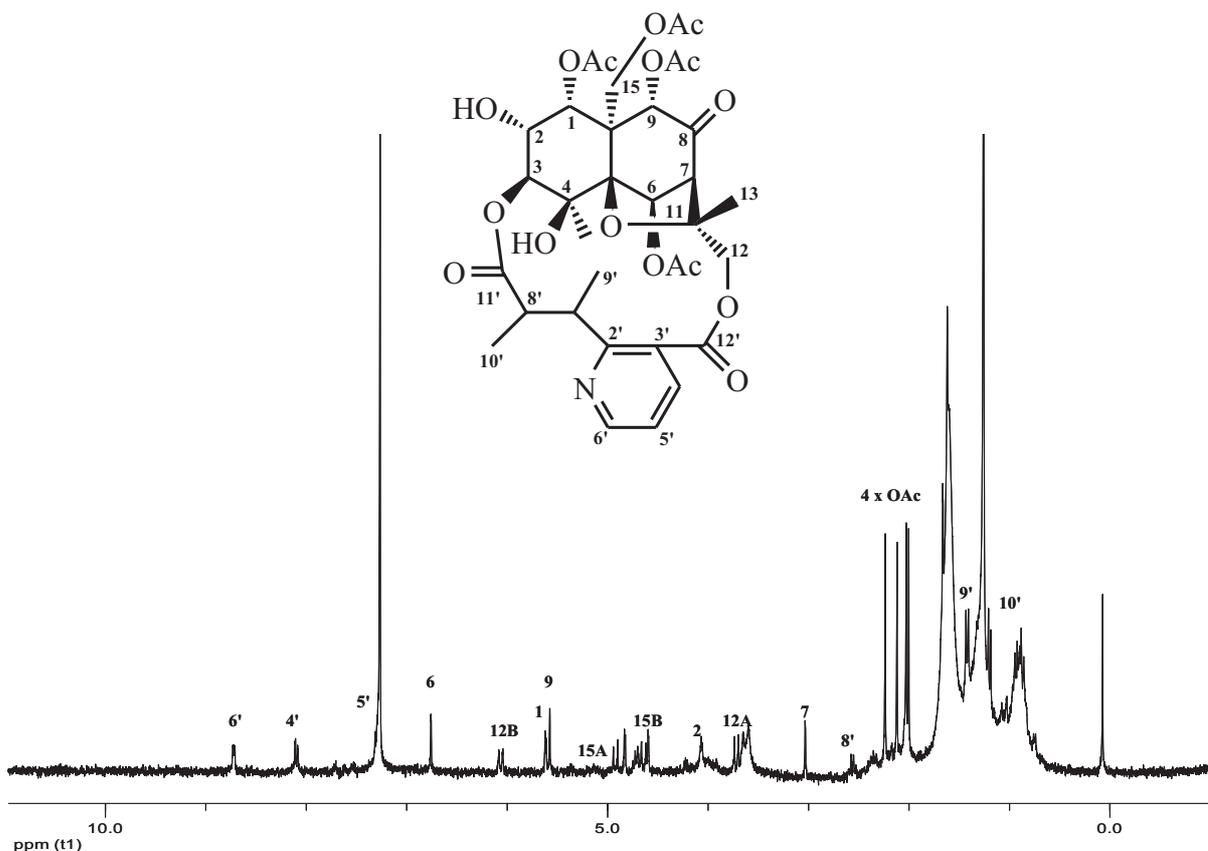
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)**  $\delta$  8.69 (1H, dd,  $J = 1.5, 4.9$  Hz, H-6'), 8.06 (1H, dd,  $J = 1.6, 7.8$  Hz, H-4'), 7.24 (1H, dd,  $J = 4.6, 7.6$  Hz, H-5'), 7.02 (1H, s, H-6), 5.95 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.7$  Hz, H-12B), 5.54 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-1), 5.52 (1H, dd,  $J = 4.0, 6.0$  Hz, H-8), 5.34 (1H, d,  $J = 6.2$ , H-9), 5.23 (1H, t,  $J = 2.5$  Hz, H-2), 5.12 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 13.6$  Hz, H-15A), 4.72 (1H, d,  $J = 2.2$  Hz, H-3), 4.65 (1H, c,  $J = 6.5$  Hz, H-7'), 4.50 (1H, d,  $J = 5.5$  Hz, OH-4), 4.45 (1H, s, H-15B), 3.68 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.5$  Hz, H-12A), 2.52 (1H, c,  $J = 7.0$  Hz, H-8'), 2.34 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-7), 2.32 (3H, s, OAc-15), 2.21 (3H, s, OAc-6), 2.15 (6H, s, OAc-8, OAc-2), 2.00 (3H, s, OAc-9), 1.94 (3H, s, OAc-1), 1.67 (3H, s, H-13), 1.59 (3H, s, H-14), 1.31 (3H, d,  $J = 3.2$  Hz, H-9'), 1.18 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-10').<sup>90</sup>

### 4.2.3 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



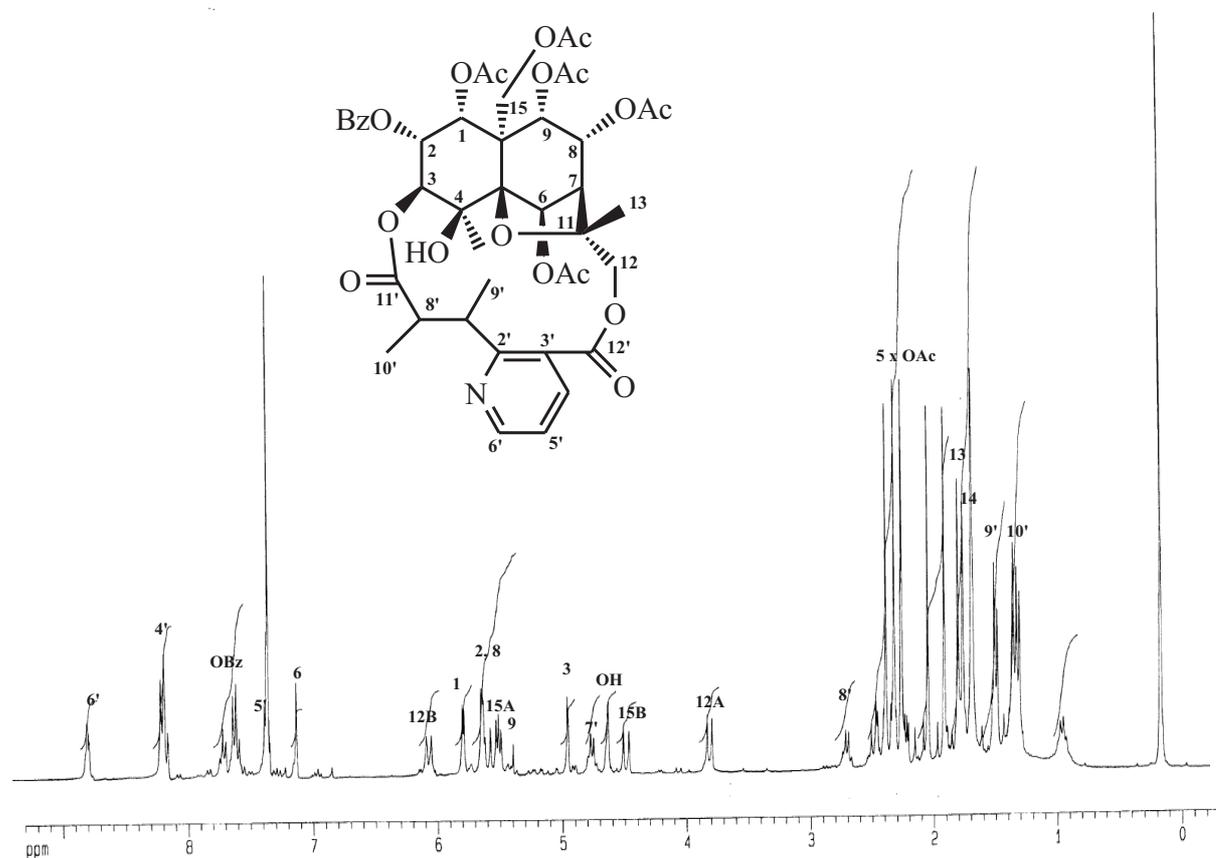
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.68 (1H, dd,  $J = 1.9, 4.6$  Hz, H-6'), 8.04 (1H, dd,  $J = 1.9, 7.6$  Hz, H-4'), 7.25 (1H, dd,  $J = 4.6, 7.6$  Hz, H-5'), 7.03 (1H, s, H-6), 5.97 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.5$  Hz, H-12B), 5.52 (1H, dd,  $J = 4.0, 6.0$  Hz, H-8), 5.41 (1H, d,  $J = 3.6$  Hz, H-1), 5.34 (1H, d,  $J = 6.0$ , H-9), 5.28 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 13.7$  Hz, H-15A), 4.74 (1H, d,  $J = 4.74$  Hz, H-3), 4.65 (1H, c,  $J = 7.0$  Hz, H-7'), 4.62 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 13.7$  Hz, H-15B), 4.45 (1H, s, OH-4), 4.06 (1H, s ancho, H-2), 3.67 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.4$  Hz, H-12A), 2.52 (1H, c,  $J = 7.1$  Hz, H-8'), 2.32 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-7), 2.30 (3H, s, OAc-15), 2.20 (3H, s, OAc-6), 2.14 (3H, s, OAc-8), 2.00 (3H, s, OAc-9), 1.93 (3H, s, OAc-1), 1.65 (3H, s, Me-13), 1.57 (3H, s, H-14), 1.36 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-9'), 1.14 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-10').<sup>91</sup>

#### 4.2.4 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 2-deacetil-evonina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)**  $\delta$  8.71 (1H, dd,  $J = 1.5, 4.8$  Hz, H-6'), 8.10 (1H, dd,  $J = 1.2, 7.5$  Hz, H-4'), 7.29 (1H, dd,  $J = 4.6, 7.6$  Hz, H-5'), 6.75 (1H, s, H-6), 6.06 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz, H-12B), 5.61 (1H, d,  $J = 3.4$  Hz, H-1), 5.57 (1H, s, H-9), 4.92 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 13.4$  Hz, H-15A), 4.83 (1H, d,  $J = 2.82$  Hz, H-3), 4.64 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 13.5$  Hz, H-15B), 4.07 (1H, s ancho, H-2), 3.03 (1H, s, H-7), 2.35 (1H, c,  $J = 8.1$  Hz, H-8'), 2.24 (3H, s, OAc), 2.12 (3H, s, OAc), 2.03 (3H, s, OAc), 2.00 (3H, s, OAc), 1.42 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-9'), 1.19 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-10').<sup>92</sup>

#### 4.2.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la Forrestina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )

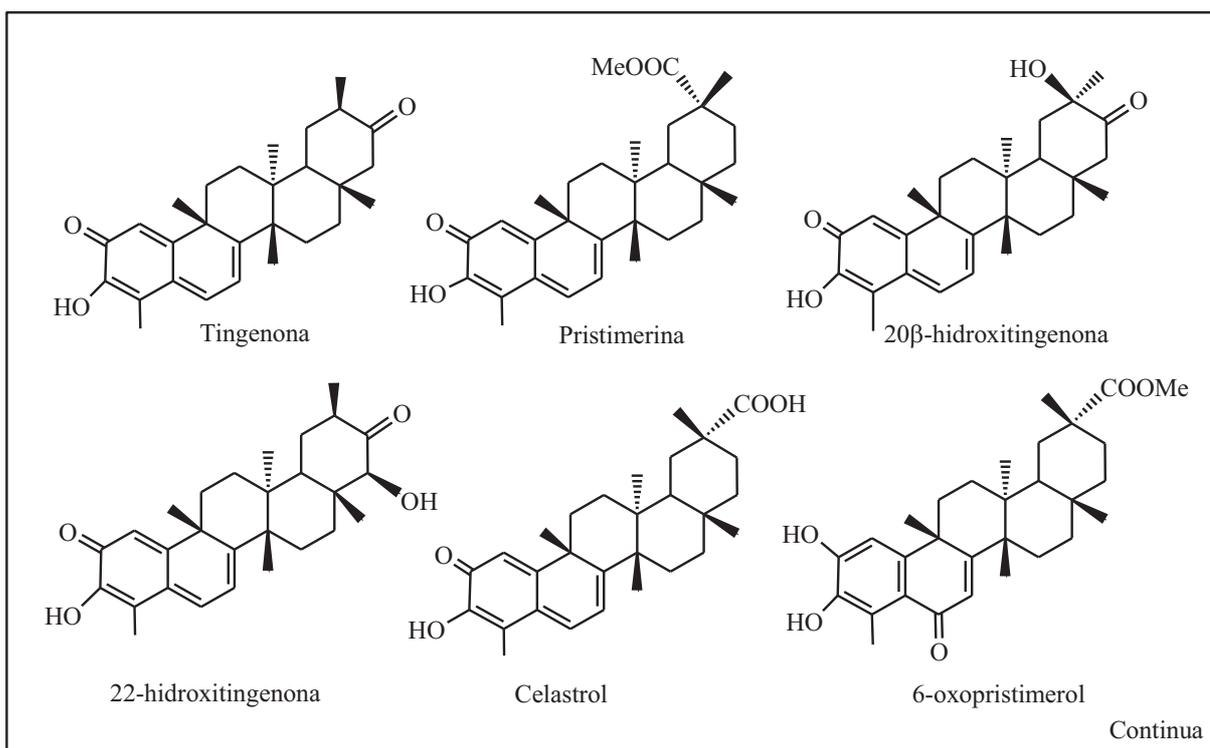


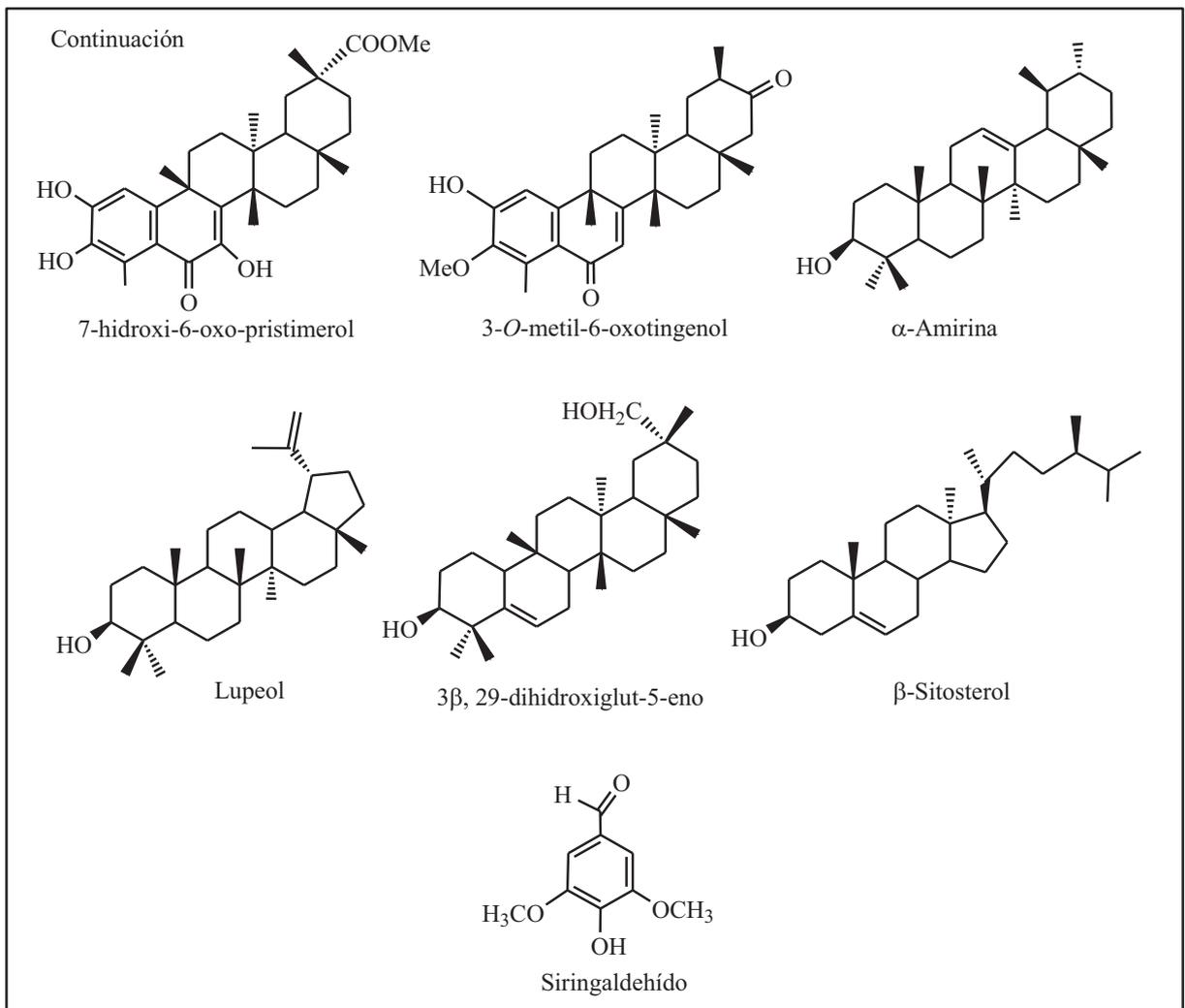
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)**  $\delta$  8.70 (1H, dd,  $J = 1.5, 4.7$  Hz, H-6'), 8.08 (1H, dd,  $J = 7.7, 16.8$  Hz, H-4'), 7.63, 7.26 (5H, s, OBz), 7.25 (1H, dd,  $J = 4.6, 7.6$  Hz, H-5'), 7.03 (1H, s, H-6), 5.97 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.5$  Hz, H-12B), 5.69 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz, H-1), 5.54 (2H, m, H-2, H-8), 5.48 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.5$  Hz, H-15A), 5.41 (1H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-9), 4.74 (1H, d,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 4.65 (1H, m, H-7'), 4.54 (1H, s, OH-4), 4.42 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.5$  Hz, H-15B), 3.67 (1H,  $d_{\text{AB}}$ ,  $J = 11.4$  Hz, H-12A), 2.60 (1H, m, H-8'), 2.37 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-7), 2.30 (3H, s, OAc), 2.22 (3H, s, OAc), 2.16 (3H, s, OAc), 1.95 (3H, s, OAc), 1.82 (3H, s, OAc), 1.57 (3H, s, H-14), 1.42 (3H, d,  $J = 7.6$  Hz, H-9'), 1.21 (3H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-10').<sup>93</sup>

### 4.3 AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA RAÍZ DE *Cassine xylocarpa*

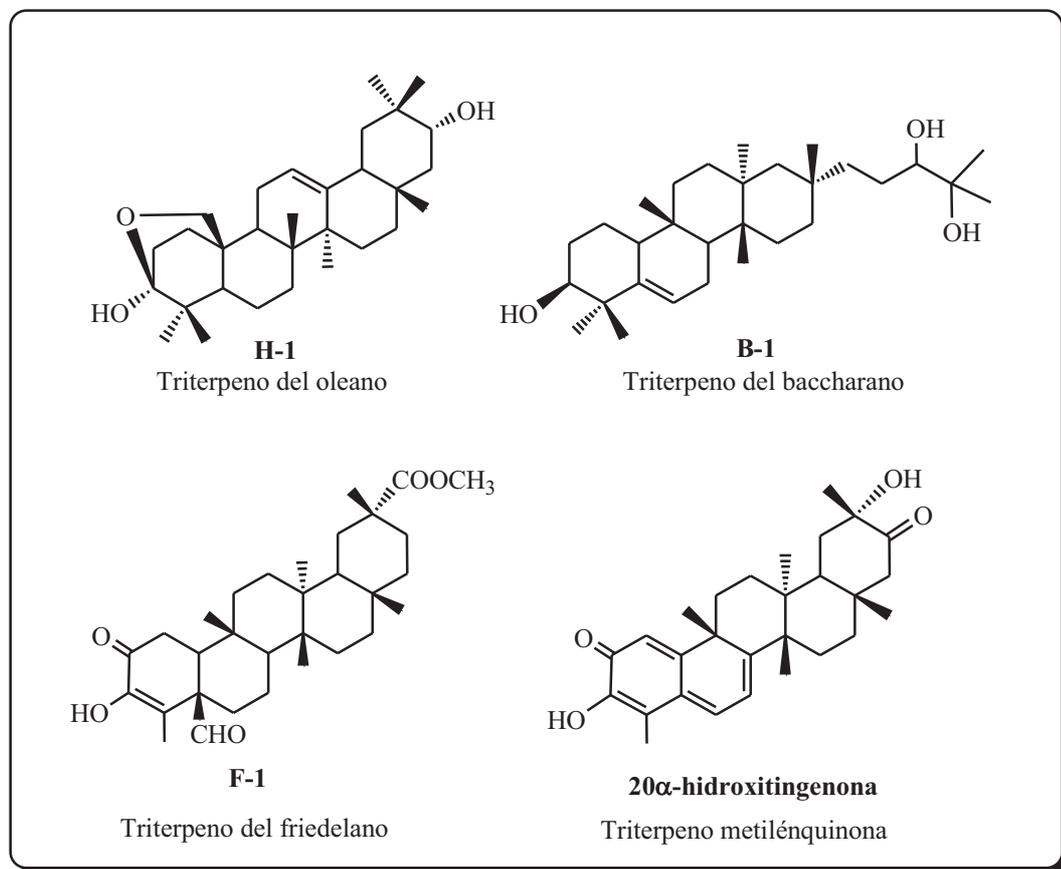
El extracto de *n*-hexano/éter etílico (1:1) de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* obtuvimos un rendimiento del 5.9%.

Después de sucesivas cromatografías, del extracto de corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* se aislaron trece productos conocidos en la literatura química (Fig. 51): tingenona, pristimerina, 20 $\beta$ -hidroxitingenona, 22-hidroxitingenona, celastrol, 7-hidroxi-6-oxopristimerol, 6-oxopristimerol, 3-*O*-metil-6-oxotingenol, 3 $\beta$ ,29-dihidroxi-5-eno,  $\alpha$ -amirina (Pág. 74), lupeol (Pág. 75),  $\beta$ -sitosterol (Pág. 76) y siringaldehído. Además de cuatro productos nuevos en la literatura química (Fig. 52): denominados: **H-1** (triterpeno con esqueleto de oleano), **B-1** (triterpeno con esqueleto de baccharano), **F-1** (triterpeno con esqueleto de friedelano) y la **20 $\alpha$ -hidroxitingenona** (triterpeno metilénquinona).



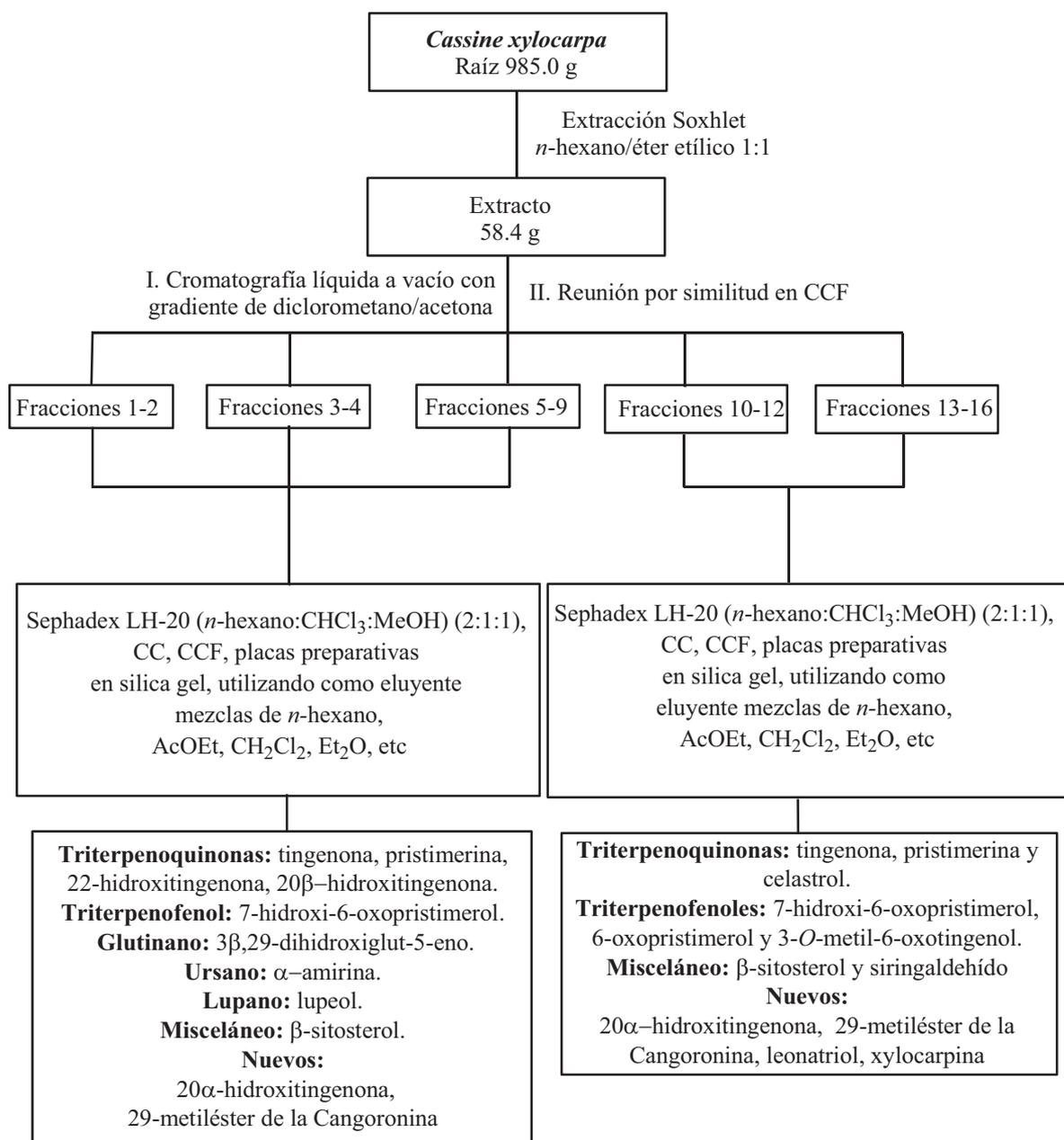


**Fig. 51** Estructuras de los metabolitos secundarios conocidos aislados de la raíz de *Cassine xylocarpa*



**Fig. 52** Metabolitos secundarios nuevos en la literatura química, aislados de la raíz de *Cassine xylocarpa*

El esquema 3 representa el proceso de extracción, fraccionamiento y aislamiento de los metabolitos secundarios presente en la raíz de *Cassine xylocarpa*

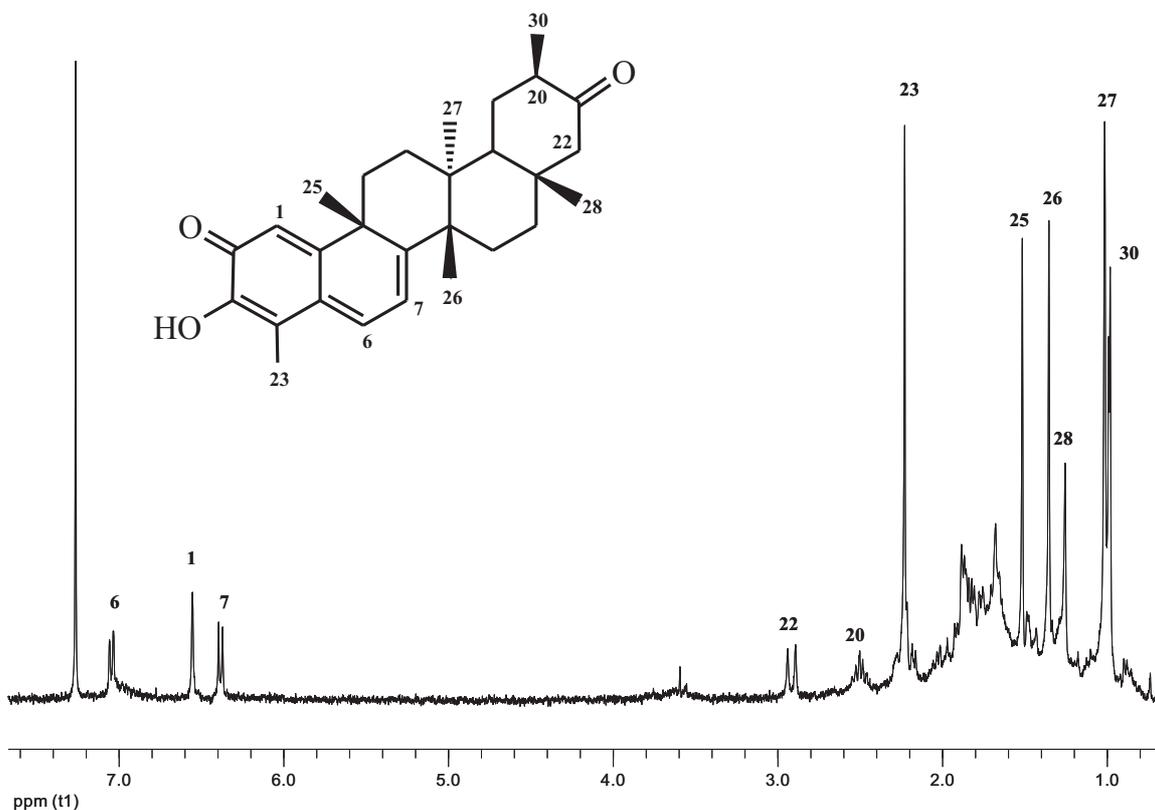


**Esquema 3.** Separación de los metabolitos secundarios de la raíz de *Cassine xylocarpa*

Los productos fueron elucidados, por medio de su comparación con datos de espectros de RMN <sup>1</sup>H reportados en artículos científicos.

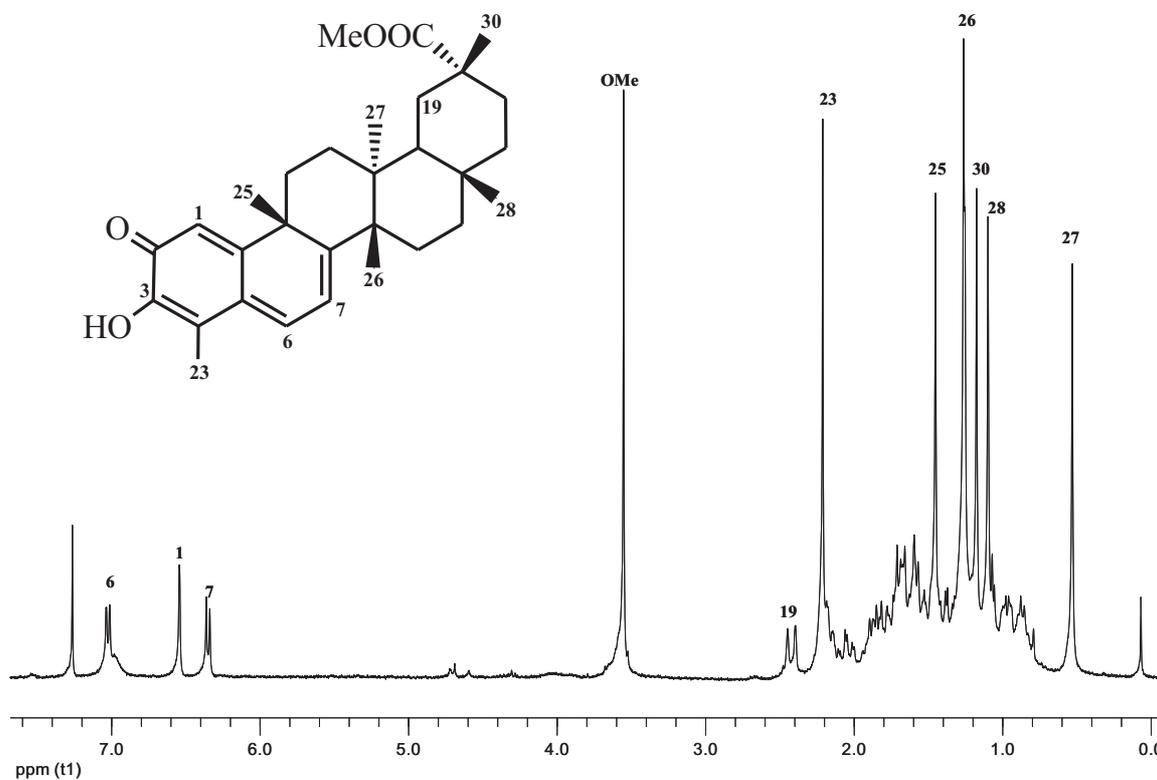
A continuación se muestran los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los distintos metabolitos secundarios aislados.

#### 4.3.1 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la Tingenona (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



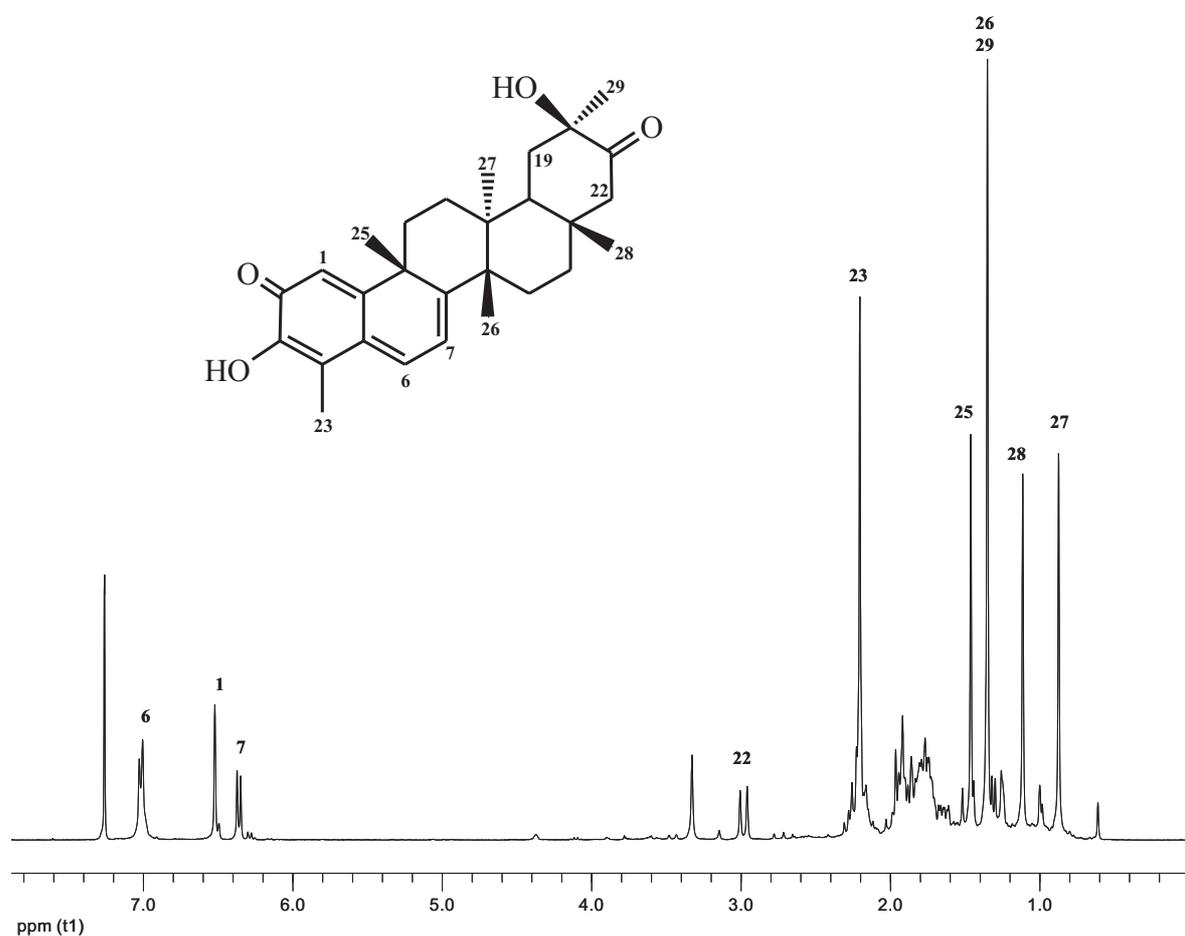
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 7.06 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz, H-6), 6.55 (1H, s, H-1), 6.39 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 2.92 (2H, d,  $J = 14.3$  Hz, H-22), 2.49 (1H, m,  $J = 7.4$  Hz, H-20), 2.23 (3H, s, H-23), 1.52 (3H, s, H-25), 1.35 (3H, s, H-26), 1.26 (3H, s, H-28), 1.01 (3H, s, H-27), 0.99 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-30)<sup>94</sup>

### 4.3.2 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la Pristimerina (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



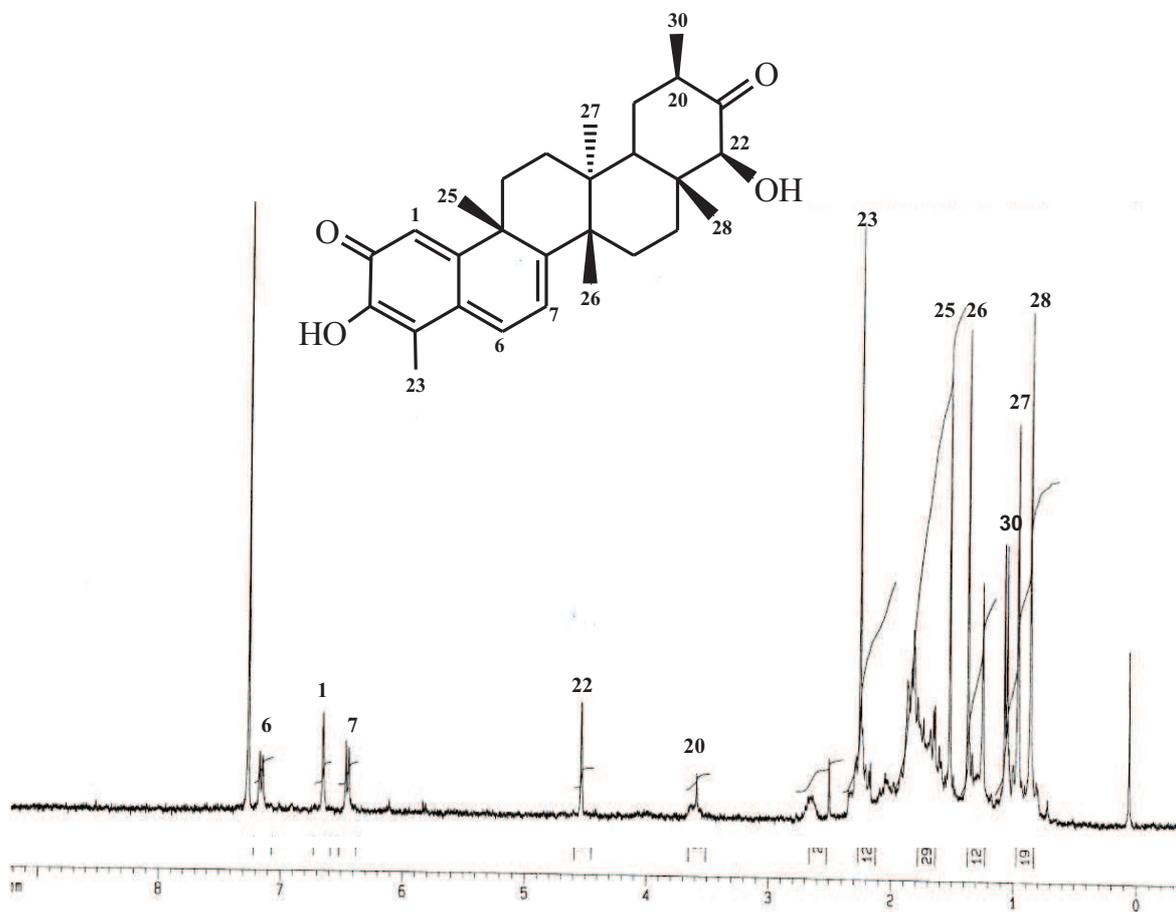
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 7.02 (1H, dd,  $J = 0.9, 7.2$  Hz, H-6), 6.54 (1H, s, H-1), 6.35 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 3.55 (3H, s, COOMe), 2.42 (2H, d,  $J = 15.0$  Hz, H-19), 2.21 (3H, s, H-23), 1.45 (3H, s, H-25), 1.26 (3H, s, H-26), 1.18 (3H, s, H-30), 1.09 (3H, s, H-28), 0.53 (3H, s, H-27)<sup>95, 96</sup>

### 4.3.3 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 20 $\beta$ -hidroxitingenona (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



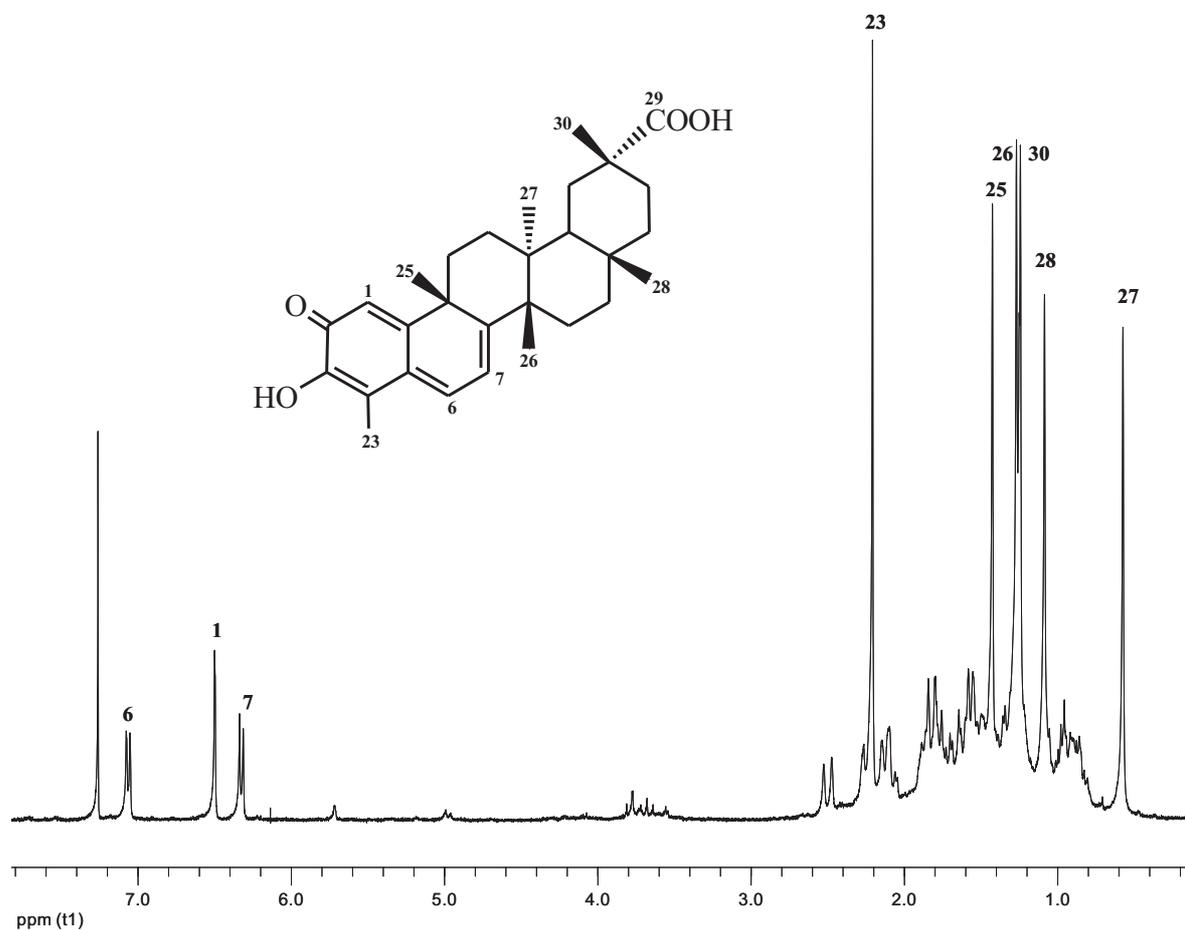
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 7.02 (1H, d,  $J = 5.3$  Hz, H-6), 6.53 (1H, s, H-1), 6.37 (1H, d,  $J = 6.4$  Hz, H-7), 2.99 (2H, d,  $J = 14.2$  Hz, H-22), 2.22 (3H, s, Me-23), 1.46 (3H, s, Me-25), 1.35 (6H, s, Me-26 y Me-29), 1.12 (3H, s, Me-28), 0.88 (3H, s, Me-27).<sup>97</sup>

#### 4.3.4 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la 22-hidroxitingenona (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



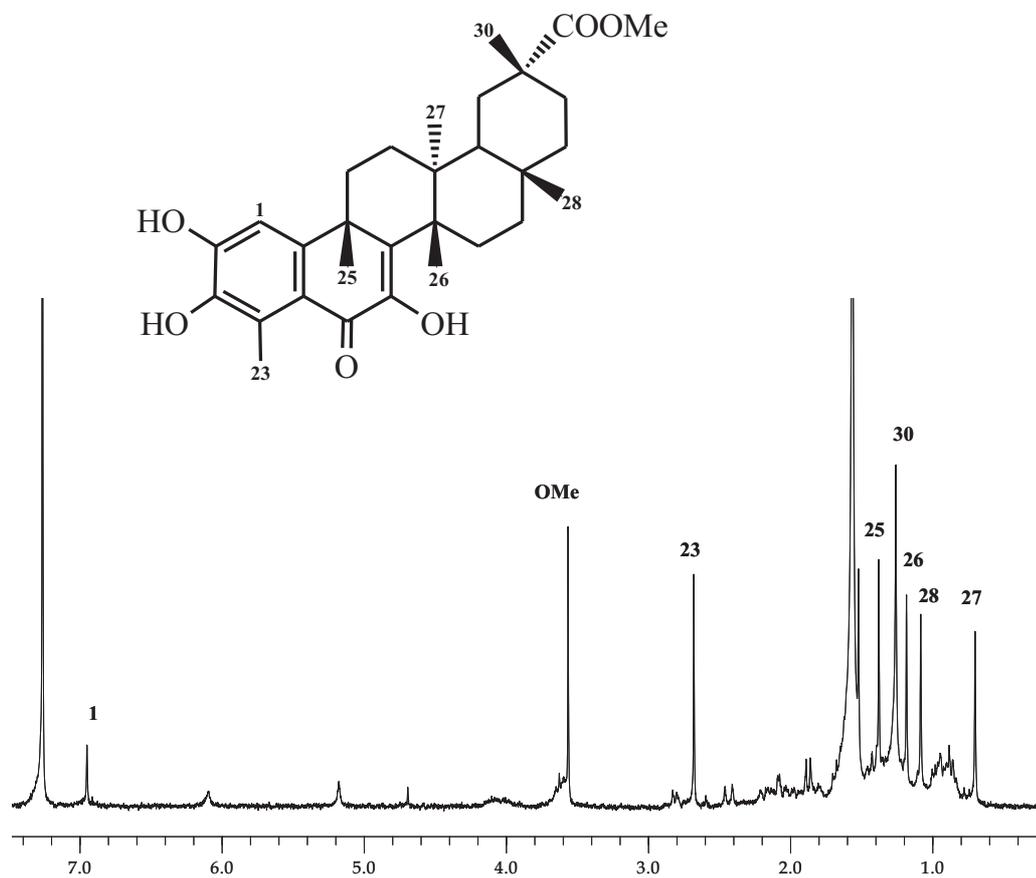
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 7.16 (1H, d,  $J = 6.7$  Hz, H-6), 6.66 (1H, s, H-1), 6.46 (1H, d,  $J = 7.1$  Hz, H-7), 4.54 (1H, s, H-22), 3.69 (1H, s, H-20), 2.26 (3H, s, H-23), 1.53 (3H, s, H-25), 1.38 (3H, s, H-26), 1.07 (3H, d,  $J = 6$  Hz, H-30), 0.97 (3H, s, H-27), 0.87 (3H, s, H-28)<sup>98</sup>

#### 4.3.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del Celastrol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



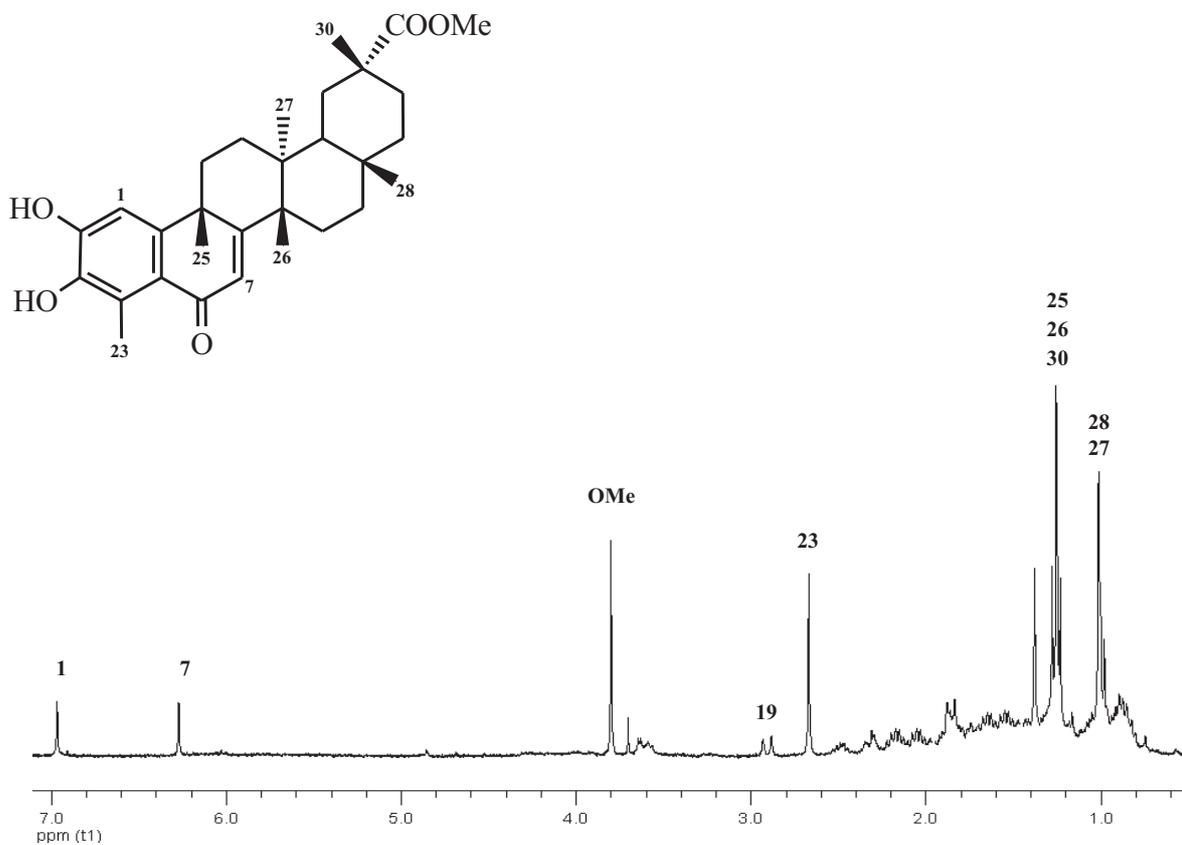
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 7.06 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-6), 6.5 (1H, s, H-1), 6.32 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, H-7), 2.21 (3H, s, H-23), 1.43 (3H, s, H-25), 1.26 (3H, s, H-26), 1.21 (3H, s, H-30), 1.08 (3H, s, H-28), 0.57 (3H, s, H-27)<sup>99</sup>

#### 4.3.6 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 7-hidroxi-6-oxopristimerol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



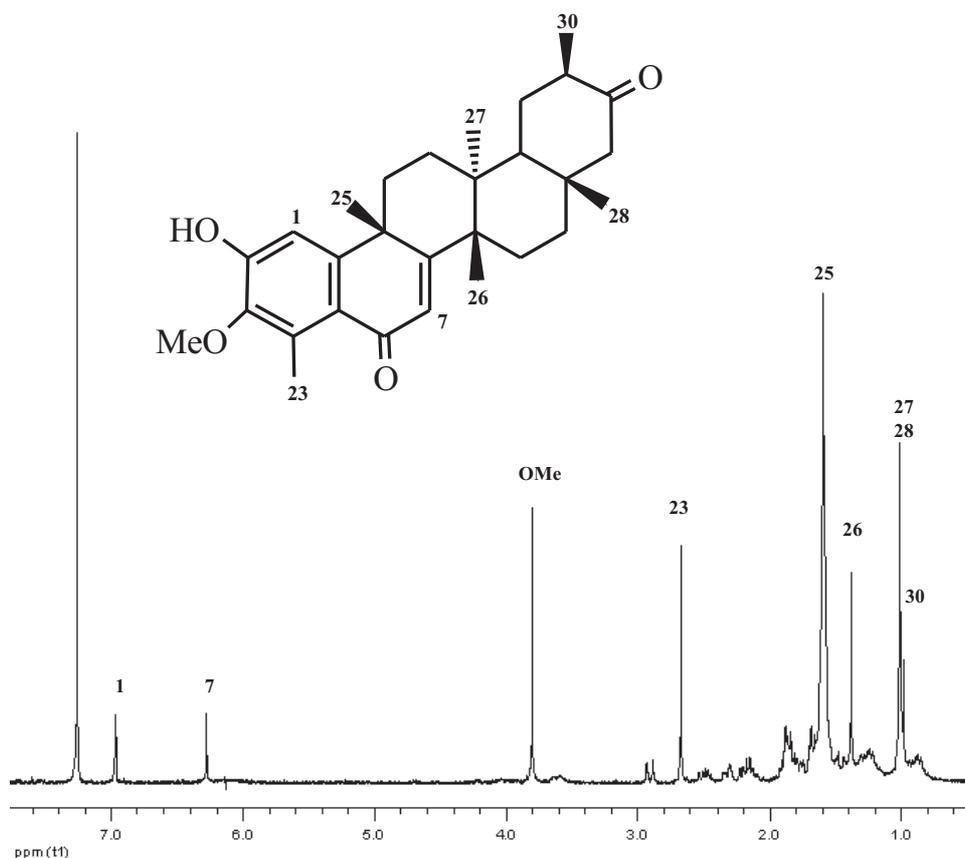
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 6.95 (1H, s, H-1), 3.57 (3H, s, COOMe), 2.68 (3H, s, H-23), 1.38 (3H, s, H-25), 1.26 (3H, s, H-30), 1.18 (3H, s, H-26), 1.09 (3H, s, H-28), 0.70 (3H, s, H-27).<sup>100, 101</sup>

#### 4.3.7 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 6-oxopristimerol (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



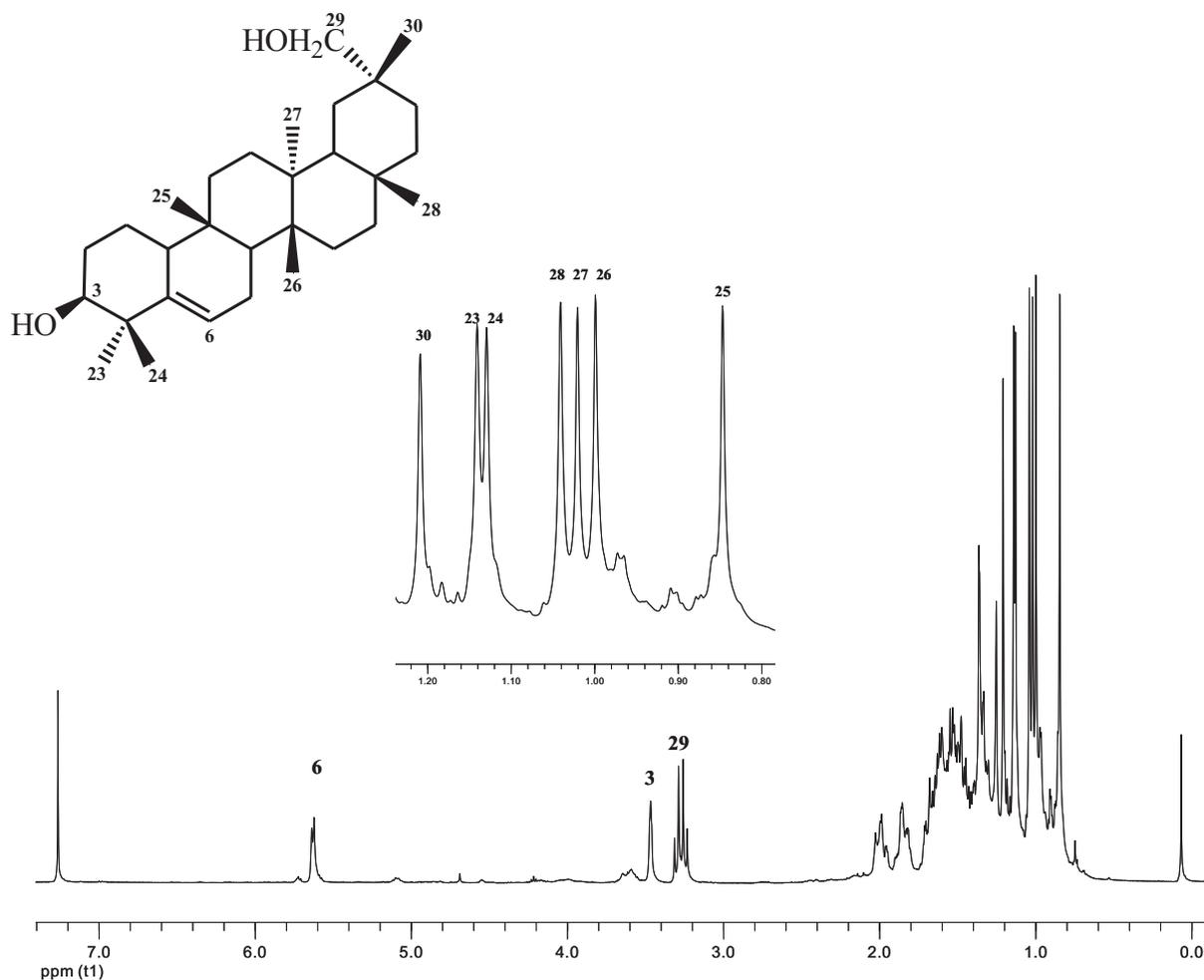
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 6.97 (1H, s, H-1), 6.27 (1H, s, H-7), 3.80 (3H, s, COOMe-29), 2.91 (1H, d,  $J = 13.5$  Hz, H-19), 2.67 (3H, s, H-23), 1.38 (3H, s, H-25), 1.30 (6H, s, H-26, H-30), 1.01 (3H, s, H-28), 0.98 (3H, s, H-27).<sup>100, 101</sup>

#### 4.3.8 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 3-*O*-metil-6-oxo-tingenol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



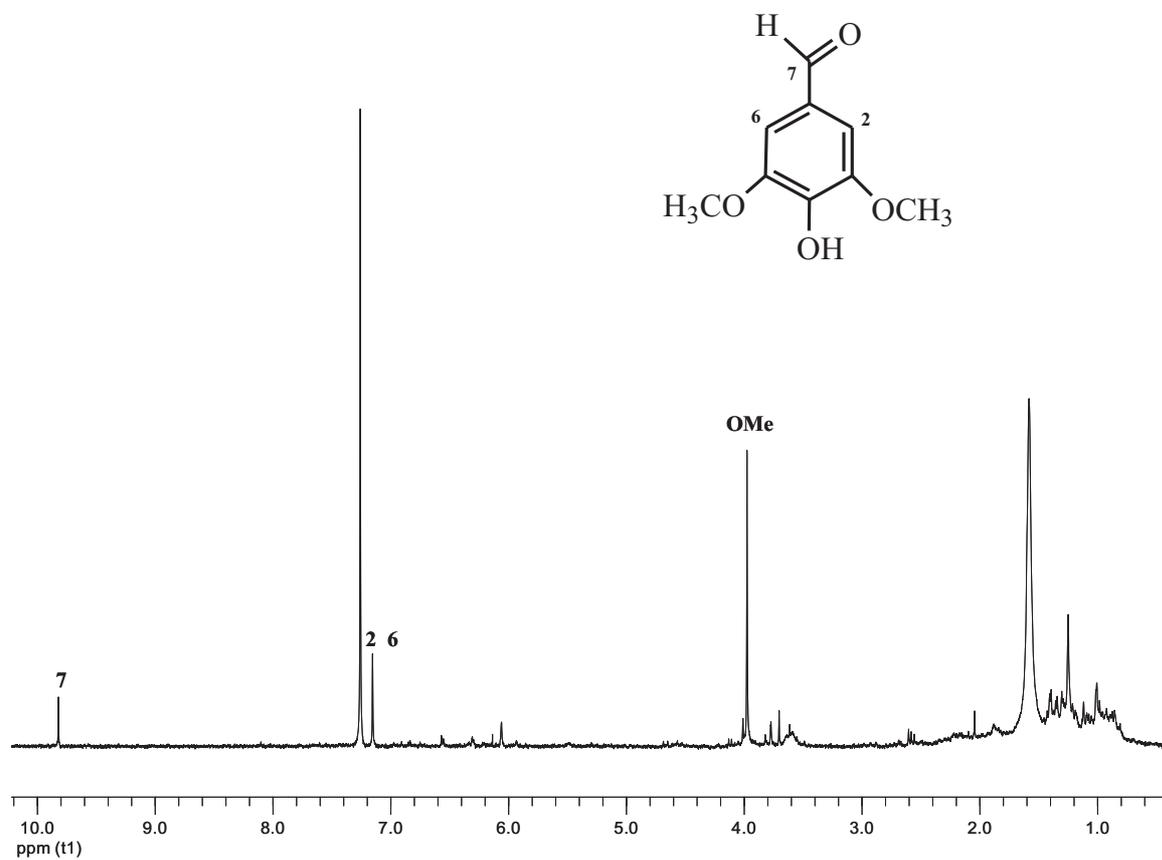
**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 6.97 (1H, s, H-1), 6.28 (1H, s, H-7), 3.80 (3H, s, OMe), 2.67 (3H, s, H-23), 1.60 (3H, s, H-25), 1.38 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-27, H-28), 0.98 (3H, d,  $J = 5.9$  Hz, H-30).<sup>102</sup>

#### 4.3.9 Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 3 $\beta$ ,29-dihidroxi-5-eno (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )

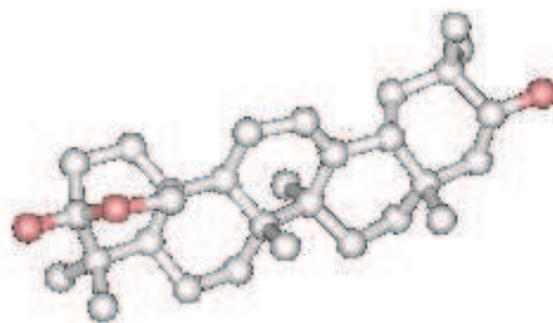


**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):**  $\delta$ : 5.63 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz, H-6), 3.47 (1H, s, H-3), 3.27 (2H, dd,  $J = 7.8, 16.8$  Hz, H-29), 1.21 (3H, s, H-30), 1.14 (3H, s, H-23), 1.13 (3H, s, H-24), 1.04 (3H, s, H-28), 1.02 (3H, s, H-27), 1.00 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, s, H-25).<sup>81, 103</sup>

#### 4.3.10 Espectro de RMN $^1\text{H}$ de Siringaldehído (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ : 9.81 (1H, s, H-7), 7.21 (2H, s, H-2, H-6), 3.90 (6H, s, OMe).<sup>104</sup>



*TRITERPENO DEL OLEANO*

## 4.4 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS PRODUCTOS NUEVOS AISLADOS DE LA RAÍZ DE *Cassine xylocarpa*

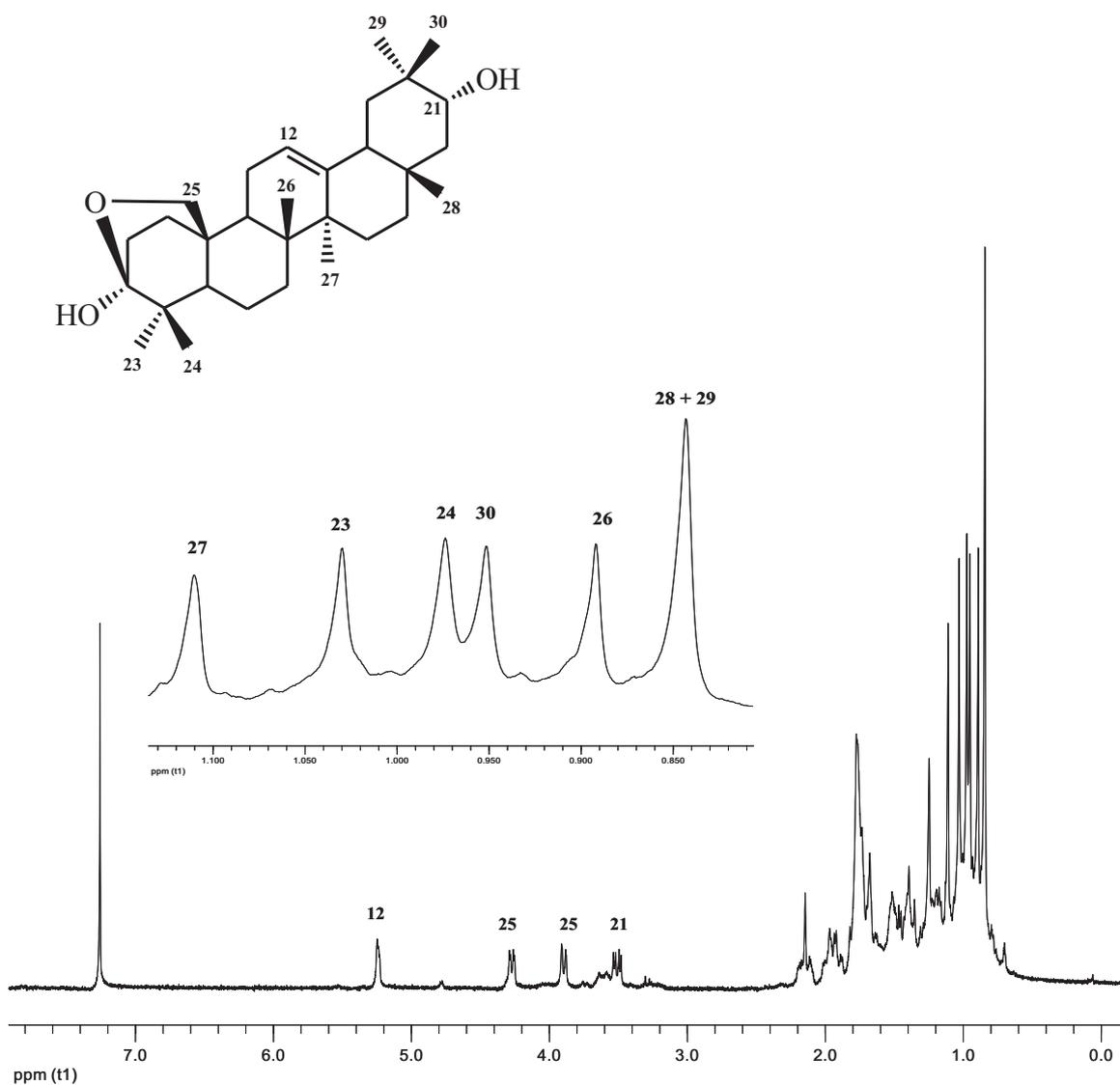
### 4.4.1 TRITERPENO H-1

El compuesto denominado **H-1** presentó una fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución, indicando siete grados de insaturación. El espectro de masas presentó un fragmento de 438  $m/z$   $[M-18]^+$ , correspondiente a la pérdida de agua y de 423  $m/z$   $[M-15-18]^+$ , correspondiente a la pérdida de agua y metilo. En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo a  $3404\text{ cm}^{-1}$  y doble enlace ( $2927$ ,  $1730$  y  $756\text{ cm}^{-1}$ ).

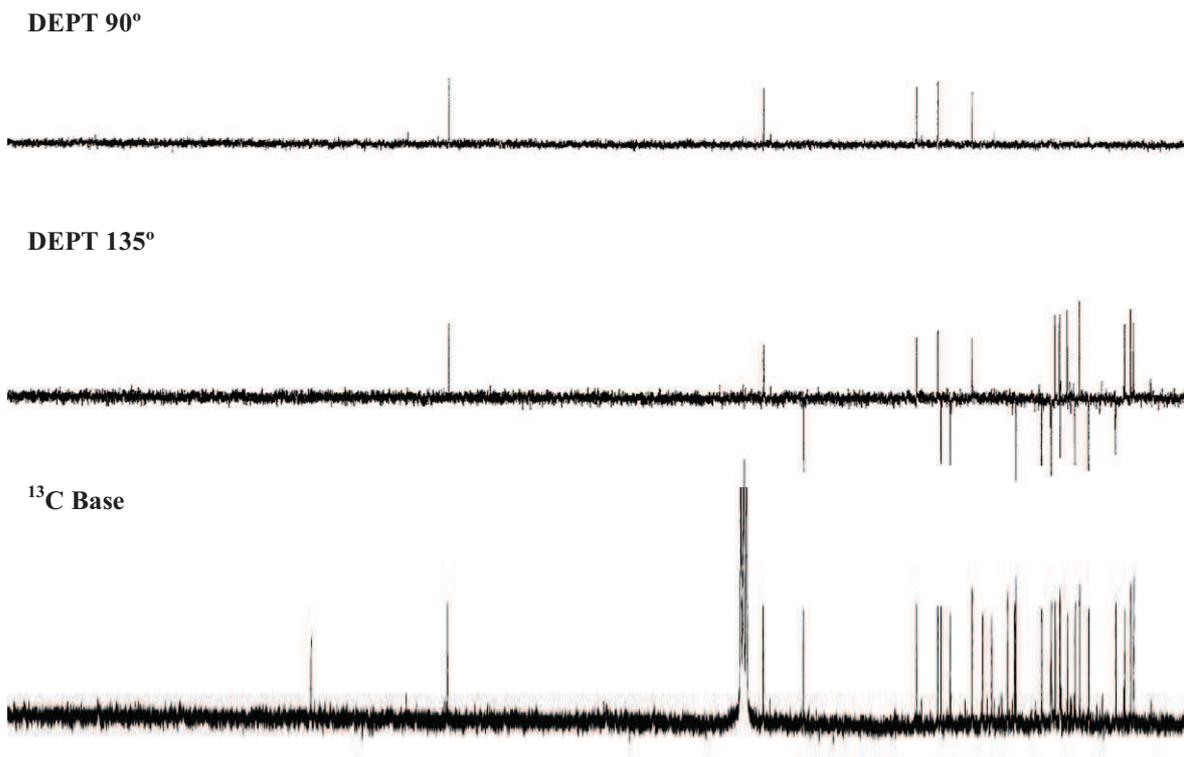
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 53, Tabla 3) presentó señales para siete metilos como singuletes a  $\delta_{\text{H}}$  0.84 x 2, 0.89, 0.95, 0.97, 1.03 y 1.11, Un doble doblete asignable a un protón geminal a un alcohol secundario a  $\delta_{\text{H}}$  3.51 ( $J = 4.8$ ,  $12.0\text{ Hz}$ ), además se observaron señales de un sistema AM de dos protones metilénicos unidos a oxígeno a  $\delta_{\text{H}}$  3.90 ( $J = 8.7\text{ Hz}$ ) y  $\delta_{\text{H}}$  4.27 ( $J = 2.7$ ,  $8.4\text{ Hz}$ ), el primero doblete y el segundo doblete, así como un multiplete a  $\delta_{\text{H}}$  5.25, característico de un esqueleto  $\Delta^{12}$ -oleano.

Su espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento protónico de banda ancha (Fig. 54, Tabla 3), mostró señales para 30 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$ , indicaron la existencia de siete metilos, diez metilenos, cinco metinos y ocho carbonos cuaternarios, lo que nos sugiere que uno de los metilos se ha oxidado, formando un hidroximetileno, y además se observó un carbono cuaternario a  $\delta_{\text{C}}$  98.0, característico de un sistema hemicetálico, además de señales a  $\delta_{\text{C}}$  122.3 (d) y 143.4 (s) correspondientes a los carbonos 12 y 13 del esqueleto  $\Delta^{12}$ -oleano.

Todos estos datos nos indican que **H-1** es un triterpeno con esqueleto de oleano, con un alcohol secundario y un hemicetal.

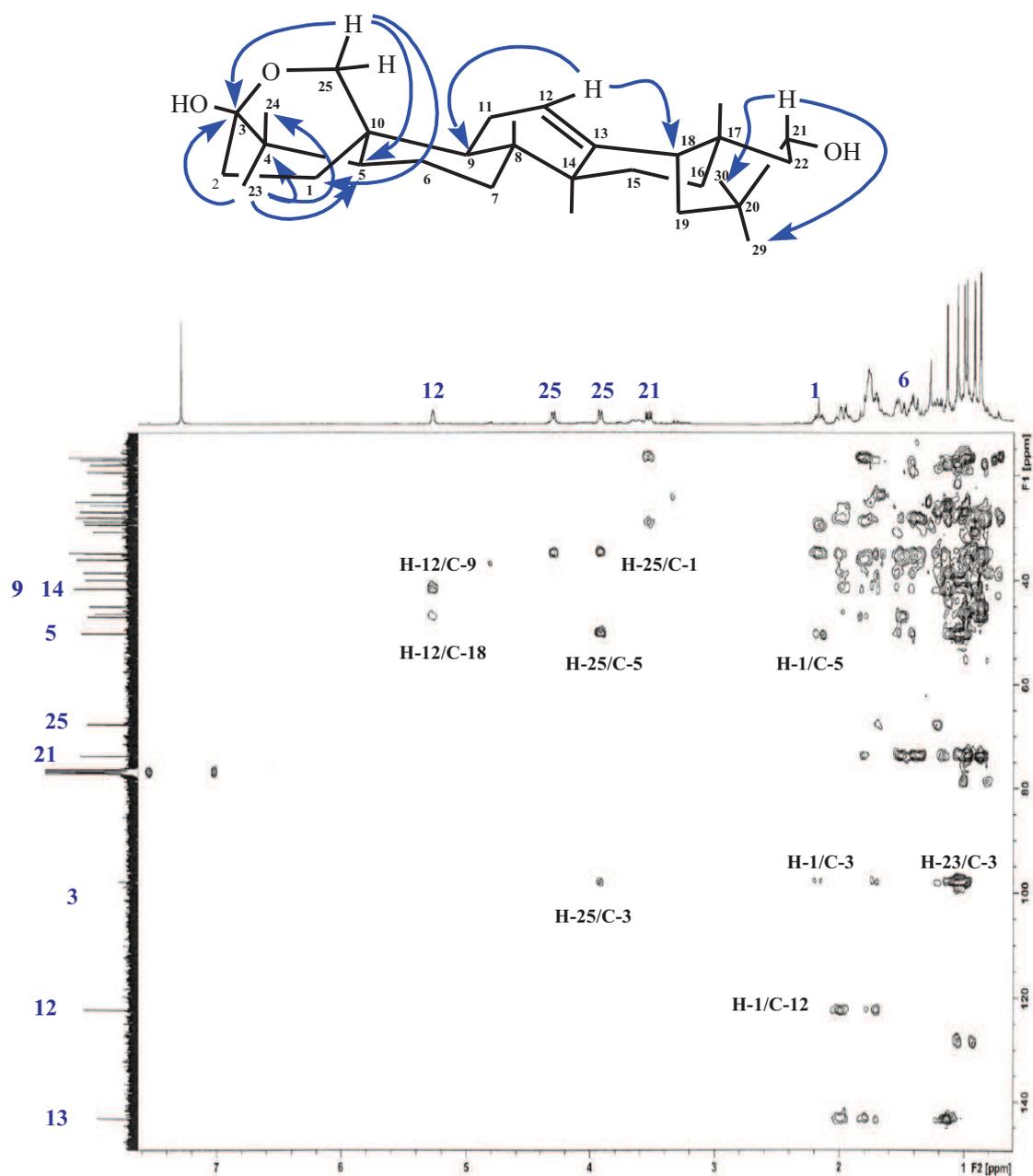


**Fig. 53** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **H-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

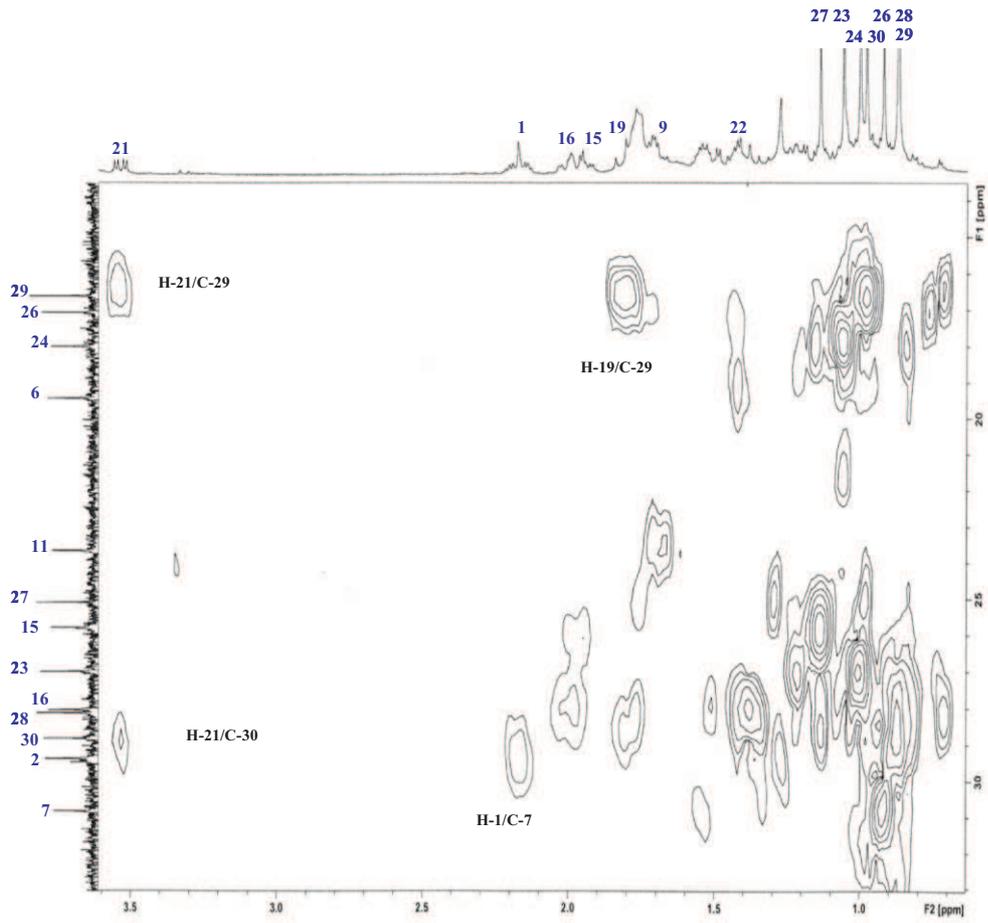
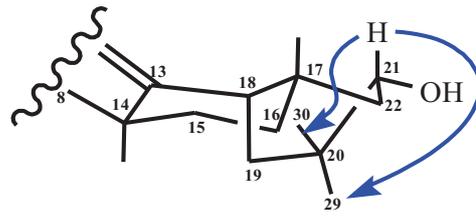


**Fig. 54** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento protónico de banda ancha y experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  para **H-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

La posición de los grupos funcionales en la molécula se determinó mediante un experimento HMBC (Fig. 55), en el cual se observó correlación del Me-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1.03) con un carbono metínico a  $\delta_{\text{C}}$  50.2 (C-5), con dos carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$  40.0 (C-4) y 98.0 (C-3), y con el carbono metílico a  $\delta_{\text{C}}$  18.0 (C-24), así como correlación de los protones a  $\delta_{\text{H}}$  3.90 (H-25 $\alpha$ , d,  $J = 8.7$  Hz) y 4.27 (H-25 $\beta$ , dd,  $J = 2.7, 8.4$  Hz) y a  $\delta_{\text{H}}$  1.68, 2.15 (H-2) con el carbono hemicetálico a  $\delta_{\text{C}}$  98.0 (C-3), además de la correlación de H-25 $\alpha$  con C-5. Estos datos permiten situar el hemicetal cíclico entre C-3 y C-25.

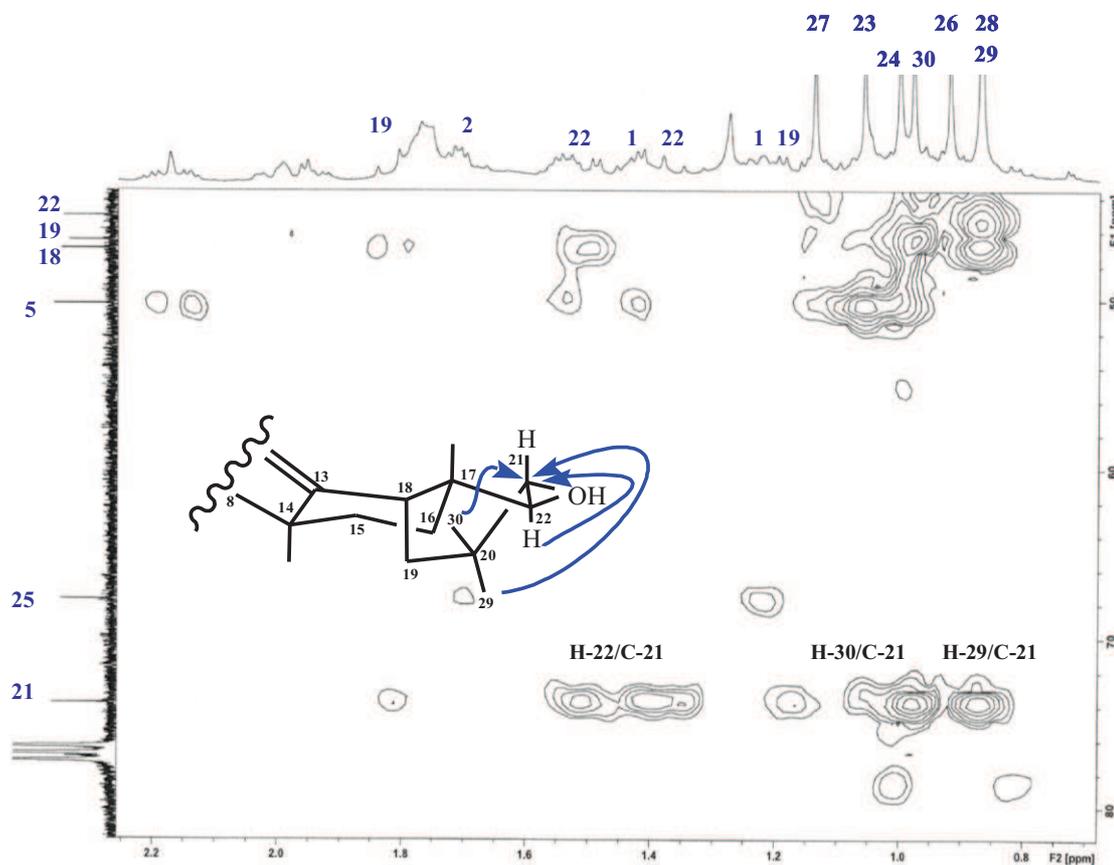


**Fig. 55** Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para H-1



**Fig. 56** Ampliación de Experimento **HMBC** de **H-1**

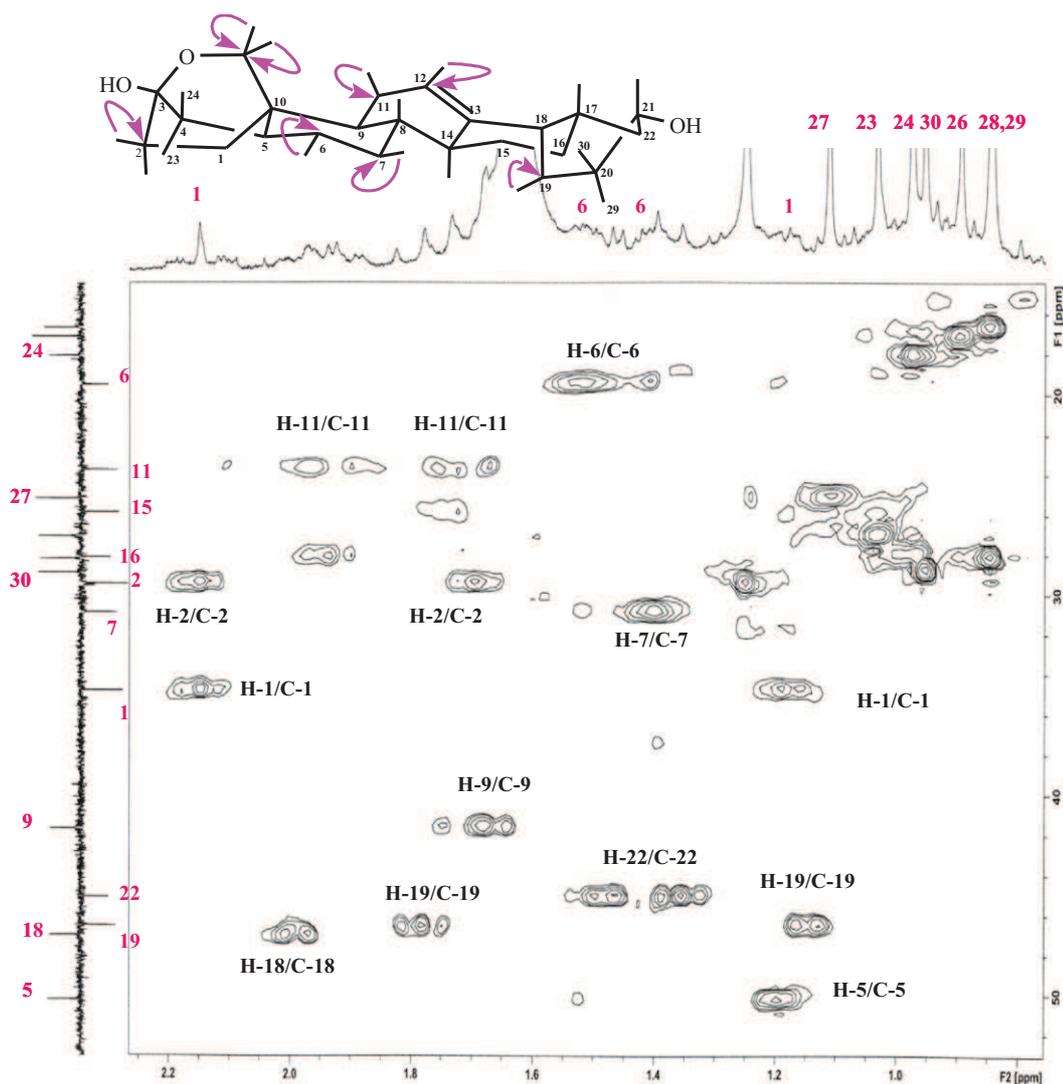
Las correlaciones observadas entre la señal del hidroximetino (H-21) y dos señales de carbonos metílicos a  $\delta_C$  16.6 (Me-29) y 28.8 (Me-30), así como, correlación de los protones a  $\delta_H$  1.35, 1.48 (H-22) con el carbono 21, indicaron que el grupo hidroxilo secundario se ubica sobre el C-21. (Fig. 57)



**Fig. 57** Ampliación de Experimento HMBC de H-1

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó mediante las correlaciones observadas en un experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Fig. 58

Considerando la unión *cis* y la conformación silla-silla de los anillos D y E, en los triterpenos del oleano, la estereoquímica relativa del grupo hidroxilo sobre C-21 fue determinada mediante el análisis de las constantes de acoplamiento, el estudio del experimento



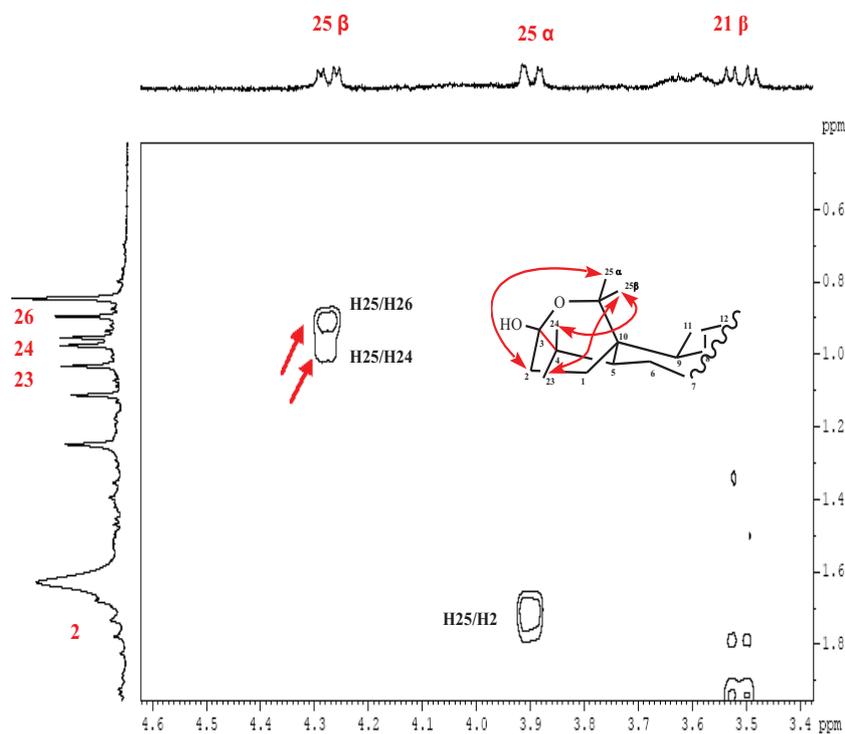
**Fig. 58** Experimento  $HSQC$  ( $^1H$ - $^{13}C$ ) para **H-1**

ROESY y del programa de modelización PC Model 6.0. Así de comparación de las constantes de acoplamiento de H-21 con los protones de H-22, obtenidas del espectro de RMN  $^1H$  y las constantes de acoplamiento calculadas utilizando el programa de modelización PC Model 6.0 (Tabla 2), determinó que el grupo hidroxilo sobre el carbono 21 presenta orientación ecuatorial y el H-21 se encuentra axial. El experimento ROESY, permitió establecer la estequímica relativa del OH sobre C-21 como  $\alpha$ .

**Tabla 2.** Constantes de Acoplamiento de H-21 con H-22

Valores de $J$ obtenidos <sup>1</sup>		Valores de $J$ calculados <sup>2</sup>		Valores de $J$ calculados <sup>2</sup>	
H21 <sub>ax</sub> – H22 <sub>ax</sub>	H21 <sub>ax</sub> – H22 <sub>ec</sub>	H21 <sub>ax</sub> – H22 <sub>ax</sub>	H21 <sub>ax</sub> – H22 <sub>ec</sub>	H21 <sub>ec</sub> – H22 <sub>ax</sub>	H21 <sub>ec</sub> – H22 <sub>ec</sub>
12.0 Hz	4.8 Hz	11.6 Hz	3.1 Hz	2.3 Hz	4.4 Hz

La estereoquímica relativa de los protones H-25 (Fig. 59), fue determinada mediante un experimento ROESY, donde se observó correlación entre H-25 $\beta$  ( $\delta_H$  4.27) con los metilos 24 y 26 y de H-25 $\alpha$  ( $\delta_H$  3.90) con H-2. Estos datos nos permitieron establecer la estructura de **H-1** como 3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-3 $\beta$ (25)-epoxi-olean-12-eno, para el que proponemos el nombre de **xylocarpina**.



**Fig. 59** Experimento **ROESY** para **H-1**

<sup>1</sup> Valores de Constante de acoplamiento obtenidas del espectro y que se comparan con las obtenidas por el programa PC Model 6.0

<sup>2</sup> Valores de Constante de acoplamiento obtenidas del Programa PCModel 6.0

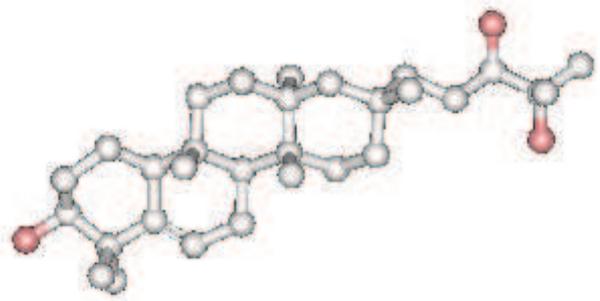
**Tabla 3. Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) de la xylocarpina (3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-3 $\beta$ (25)-epoxi-olean-12-eno)**

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
1	1.17, 2.14 s	34.7 t
2	1.68, 2.15	29.4 t
3	-	98.0 s
4	-	40.0 s
5	1.20	50.2 d
6	1.42, 1.52	19.4 t
7	1.40	30.8 t
8	-	38.5 s
9	1.68	41.6 d
10	-	35.0 s
11	1.74, 1.97	23.6 t
12	5.25 m	122.3 d
13	-	143.4 s
14	-	41.6 d
15	1.73	25.8 t
16	1.95	28.0 t
17	-	36.0s
18	1.99	47.0 d
19	1.15, 1.80	46.5 t
20	-	36.0 s
21	3.51 $\beta$ dd (4.8, 12.0)	73.8 d
22	1.35, 1.48	45.0 t
23	1.03 s	27.0 c
24	0.97 s	18.0 c
25	3.90 $\alpha$ d (8.7), 4.27 $\beta$ dd (2.7, 8.4)	67.7 t
26	0.89 s	17.0 c
27	1.11 s	25.1 c
28	0.84 s	28.1 c
29	0.84 s	16.6 c
30	0.95 s	28.8 c

<sup>a</sup> $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

<sup>b</sup> $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

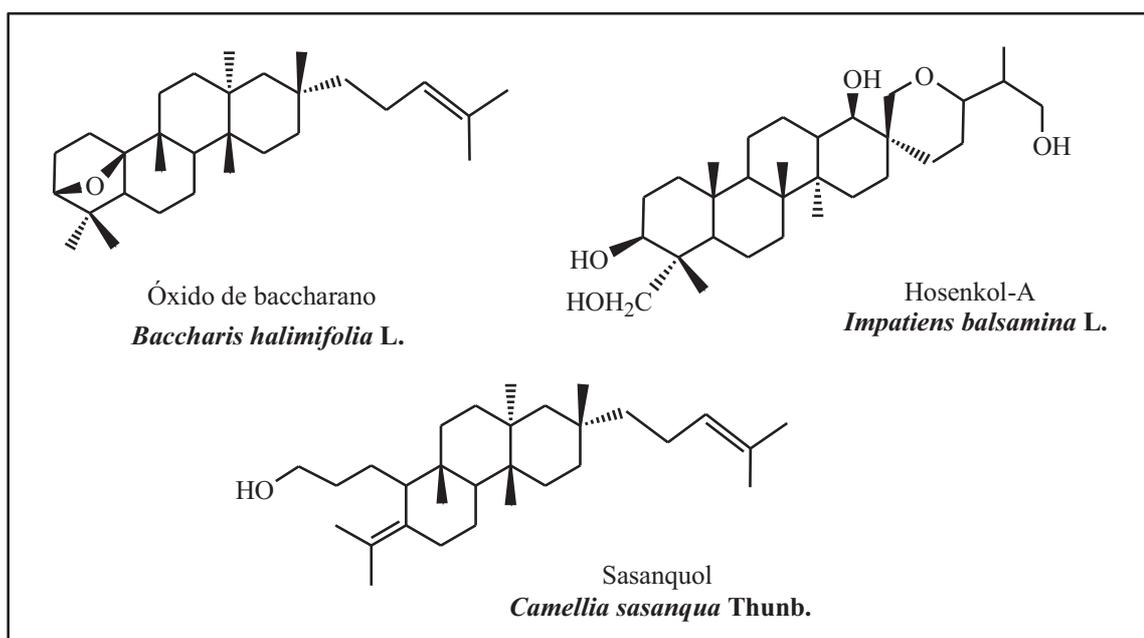
s= singulete, d= doblete, dd= doble doblete, t= triplete, c=cuartete y m= multiplete.



*TRITERPENO DEL BACCHARANO*

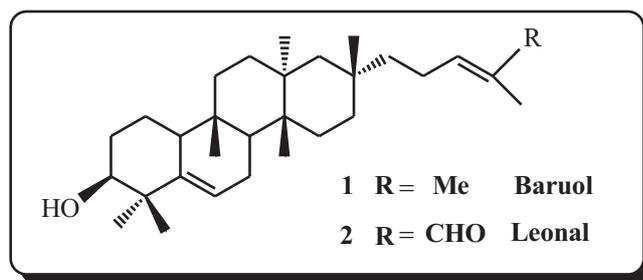
Los triterpenos con esqueleto de baccharano son escasos en el campo de los productos naturales, con pocas excepciones<sup>105</sup>, están restringidos a las plantas terrestres.

El nombre Baccharano deriva del óxido de baccharano,<sup>106</sup> aislado de *Baccharis halimifolia* L. (Compositae). Hosenkol A,<sup>107</sup> con un esqueleto pentacíclico y sasanquol,<sup>108</sup> con esqueleto 3,4-*seco*-tricíclico, fueron los primeros baccharanos y D:B-friedobaccharanos, respectivamente, reportados en la literatura. (Fig. 60)



**Fig. 60** Estructuras de baccharano y D:B-friedobaccharanos

En investigaciones recientes del extracto de la corteza de raíz de *Maytenus blepharodes* Lundell, se aisló el primer ejemplo de triterpeno tetracíclico con esqueleto de friedobaccharano, denominado Baruol,<sup>109</sup> y casi simultáneamente se aisló del extracto diclorometánico de las hojas de *Maytenus chiapiensis*, un compuesto triterpénico también con estructura de friedobaccharano, denominado Leonal,<sup>109</sup> siendo este último considerado como un producto de oxidación en el carbono 30 del Baruol. (Fig. 61)



**Fig. 61** Estructuras de **Baruol** (1) y **Leonal** (2)

#### 4.4.2 TRITERPENO B-1

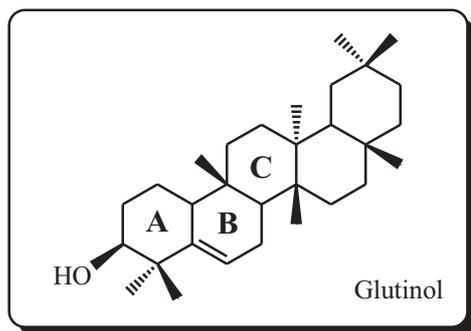
El compuesto denominado como **B-1** presentó una fórmula molecular  $C_{30}H_{52}O_3$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. Esta fórmula indica 5 grados de insaturación correspondientes a un doble enlace y cuatro anillos. El espectro de masas presentó fragmentos correspondientes a la pérdida de agua a  $442 m/z [M-18]^+$ , metilo a  $445 m/z [M-15]^+$  y  $H_2O +$  metilo a  $427 m/z [M-15-18]^+$ .

En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo ( $3423\text{ cm}^{-1}$ ) y doble enlace ( $2929, 1729, 756\text{ cm}^{-1}$ ).

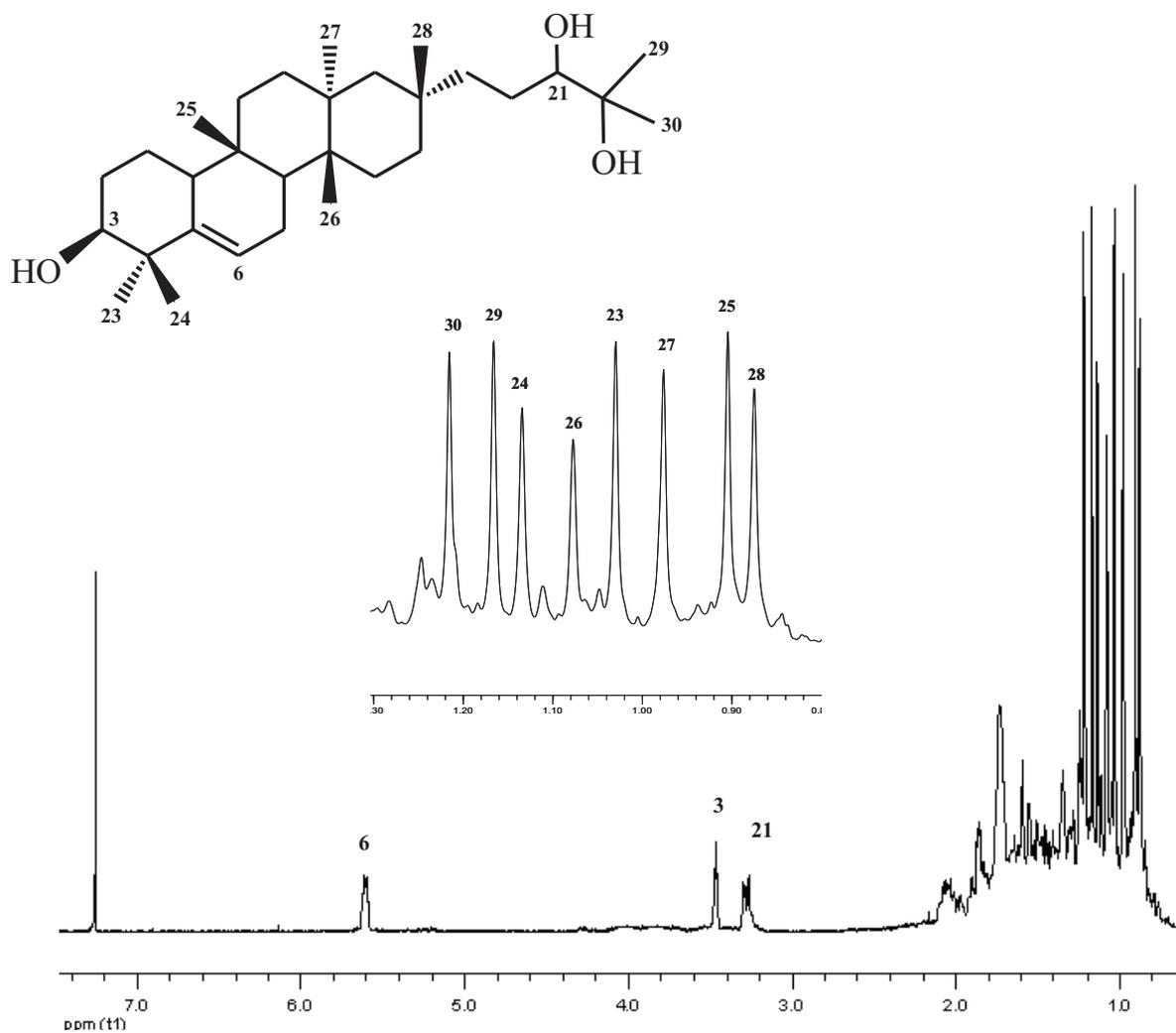
Su espectro RMN  $^1H$  (Fig. 63, Tabla 4), mostró señales para ocho metilos singletes a  $\delta_H$  0.88, 0.90, 0.98, 1.03, 1.08, 1.13, 1.17, 1.22. Además se observaron señales correspondientes a dos alcoholes secundarios a  $\delta_H$  3.28, (dd,  $J = 2.7, 9.6\text{ Hz}$ ) y  $\delta_H$  3.47, (t,  $J = 2.4\text{ Hz}$ ), y un doble enlace trisustituído ( $\delta_H$  5.61, t,  $J = 2.4\text{ Hz}$ ).

Los datos anteriores se corroboraron con su espectro de RMN  $^{13}C$  con desacoplamiento protónico de banda ancha (Fig. 64, Tabla 4), mostrando señales para 30 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$ , indican la presencia de ocho metilos, diez metilenos, cinco metinos y siete carbonos cuaternarios, siendo las señales más significativas, las correspondientes a un doble enlace trisustituído ( $\delta_c$  121.7, d y  $\delta_c$  141.8, s) y tres carbonos unidos a oxígeno ( $\delta_c$  73.0, s,  $\delta_c$  76.1, d y  $\delta_c$  79.6, d). Estos datos y la comparación con las señales de RMN dadas en la bibliografía para los anillos A, B y C del glutinol<sup>110</sup>(triterpeno de

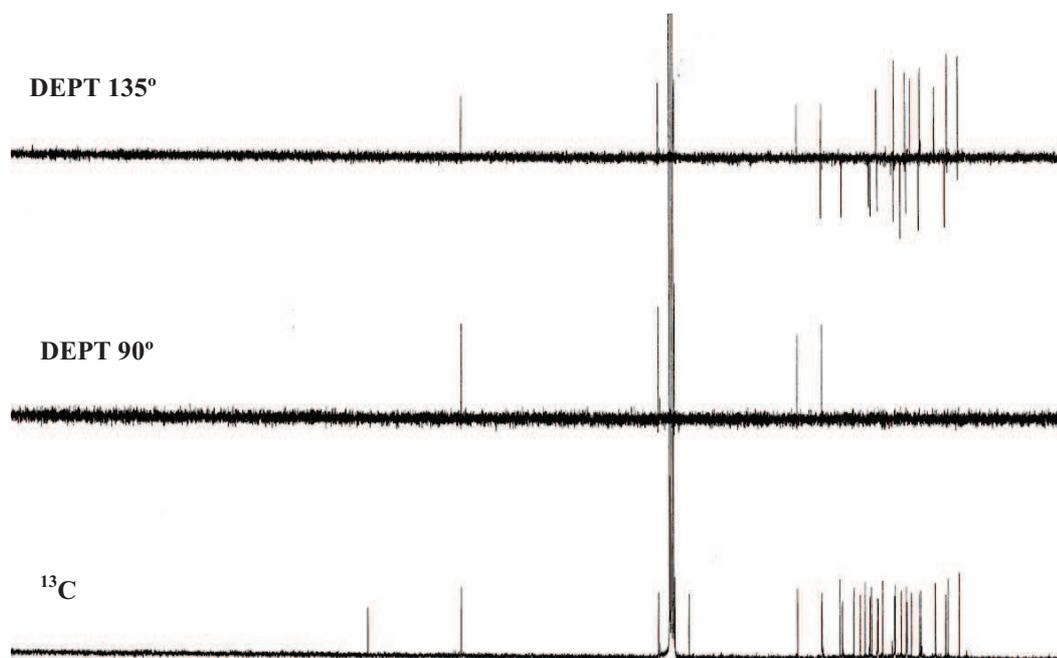
la serie del glutinano) (Fig. 62), sugieren que **B-1** es un triterpeno tetracíclico con esqueleto de baccharano.



**Fig. 62** Estructura de un triterpeno de la serie del glutinano



**Fig. 63** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **B-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



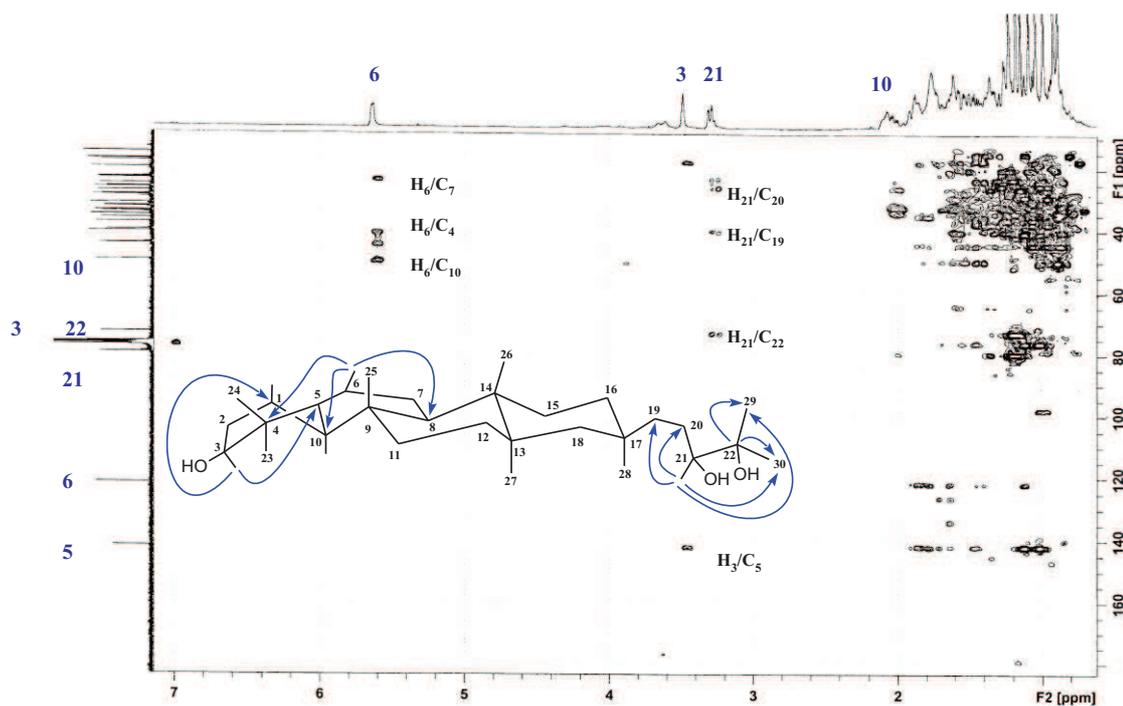
**Fig. 64** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con desacoplamiento protónico de banda ancha y experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  para **B-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

Las asignaciones de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se establecieron a través de las conectividades observadas en los experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC y HMBC.

El estudio del experimento HMBC permitió situar los grupos funcionales de la molécula de forma inequívoca; así un grupo hidroxilo fue localizado sobre el C-3 al observar correlación a tres enlaces entre el protón a  $\delta_{\text{H}}$  3.47 (H-3) con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  17.8 (t, C-1) y  $\delta_{\text{C}}$  141.8 (s, C-5). El segundo grupo hidroxilo secundario, fue localizado sobre C-21 al observar las correlaciones entre el protón a  $\delta_{\text{H}}$  3.28, a dos enlaces con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  26.2 (t, C-20) y  $\delta_{\text{C}}$  73.0 (s, C-22), y a tres enlaces con las señales a  $\delta_{\text{C}}$  40.1 (t, C-19), 23.1 y 26.4 (c, Me-29, Me-30).

El grupo hidroxilo terciario, se ubicó sobre C-22 al observar correlaciones a dos enlaces entre el carbono a  $\delta_C$  73.0 con los hidrógenos a  $\delta_H$  1.17 y 1.22 (s, H-29, H-30) y un protón unido a oxígeno a  $\delta_H$  3.28 (dd,  $J = 2.7, 9.6$  Hz, H-21).

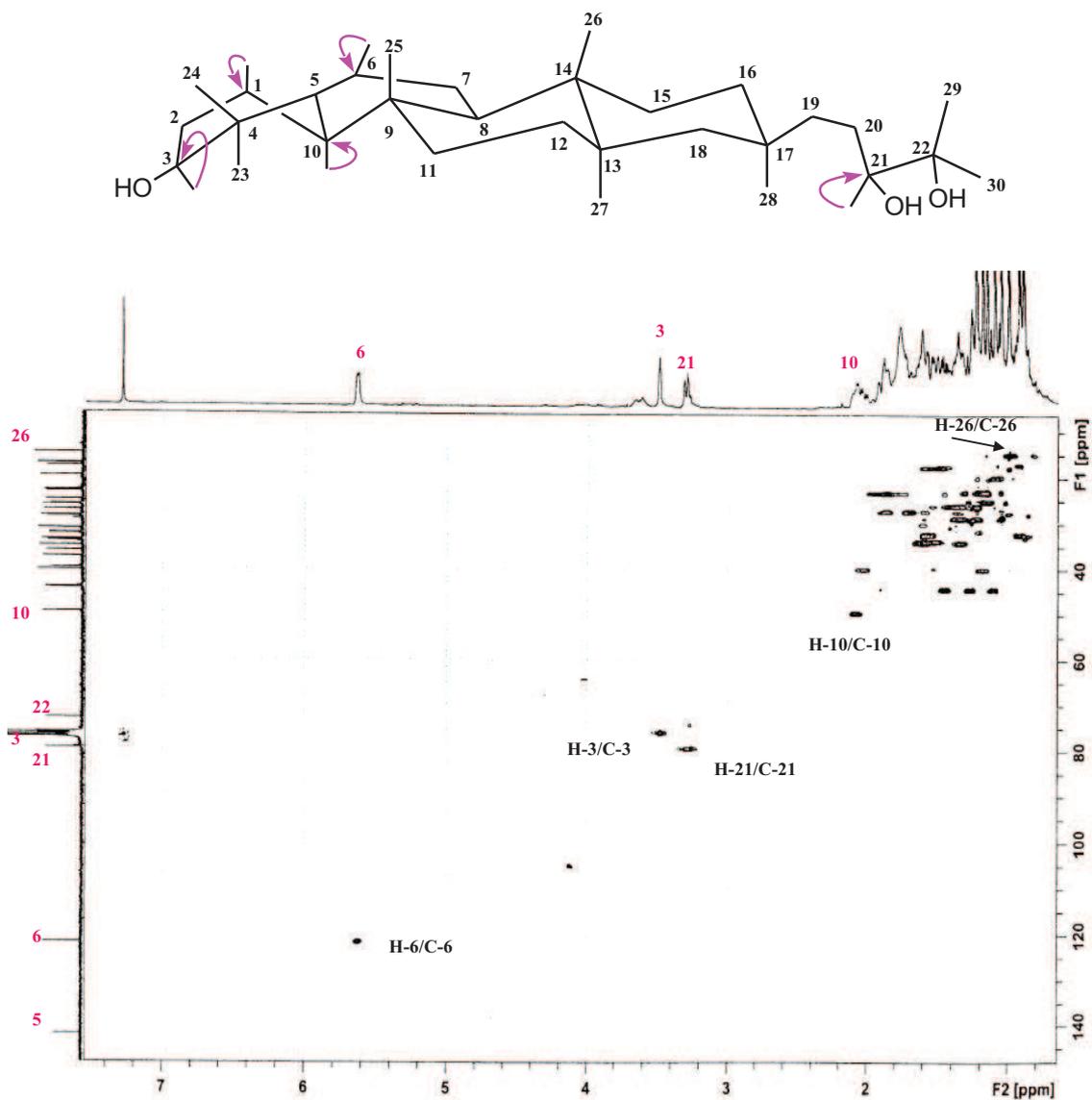
El doble enlace fue fijado entre el C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> al observar correlación entre la señal de protón a  $\delta_H$  5.61 (H-6) con los carbonos a  $\delta_C$  40.6 (s, C-4), 23.4 (t, C-7), 44.4 (d, C-8) y 49.7 (d, C-10). (Fig. 65)



**Fig. 65** Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para B-1

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó mediante las correlaciones observadas en un experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Fig. 66

La estereoquímica del grupo hidroxilo sobre el carbono C-3, se determinó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento y fue confirmada por un experimento ROESY, donde se observó correlación entre H-3 ec con los metilos 23 y 24, lo que indica una estereoquímica  $\beta$  para dicho hidroxilo. (Fig. 67)



**Fig. 66** Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para **B-1**

Estos datos y la comparación con las señales reportadas en la literatura para Baruol y Leonal, nos permitieron conjuntamente con estudios de modelización molecular y consideraciones biogénicas, establecer la estructura de **B-1** como 3 $\beta$ , 21, 22-trihidroxibaccharan-5-eno, y para el que proponemos el nombre de **Leonatriol**.

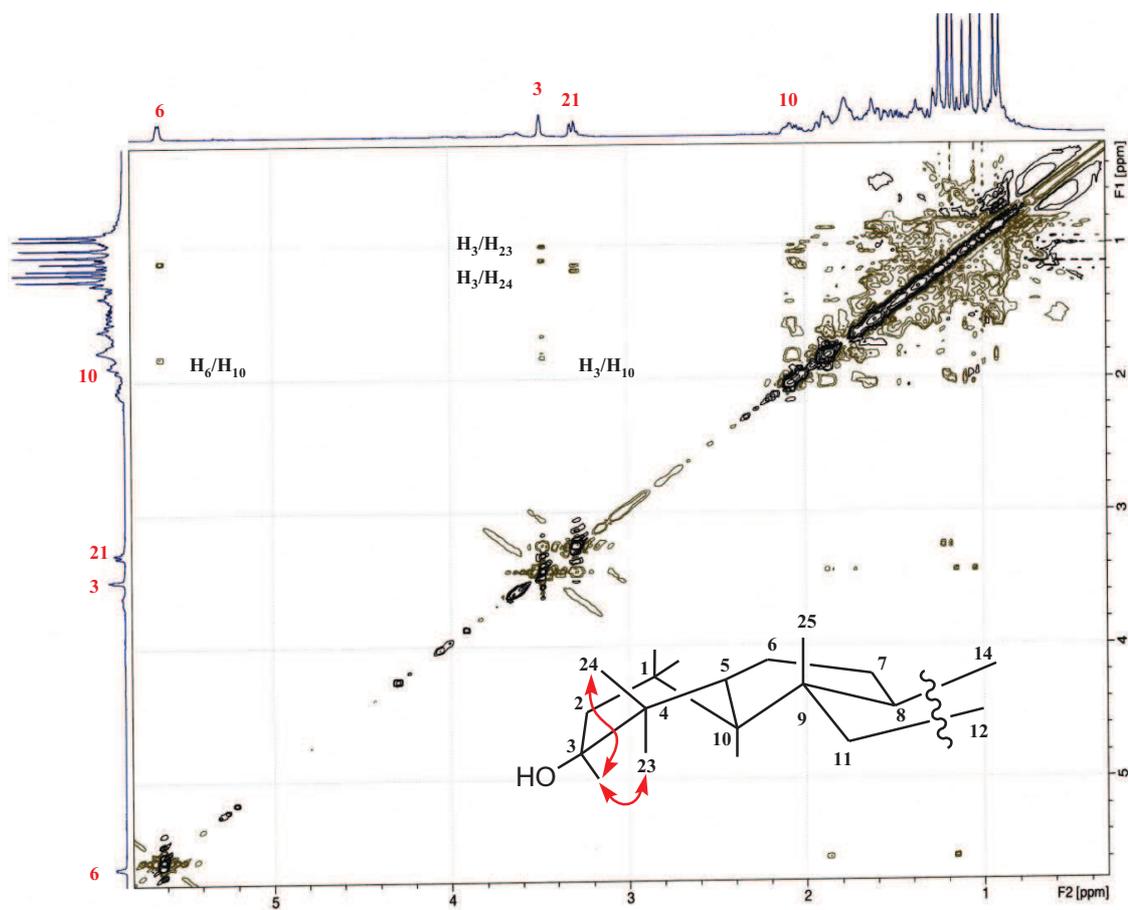


Fig. 67 Experimento ROESY para Leonatriol (B-1)

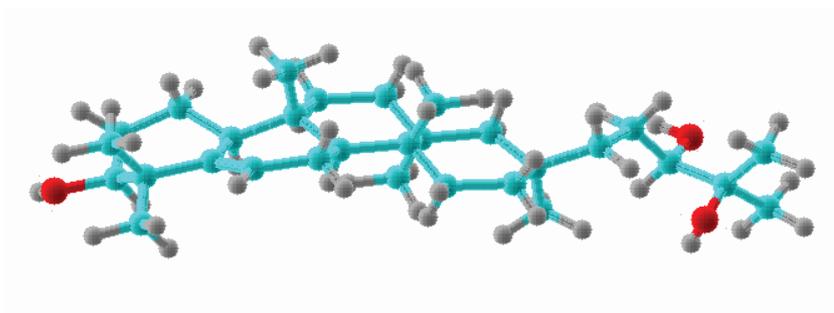


Fig. 68 Confórmero de mínima energía para Leonatriol (B-1)

**Tabla 4. Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del Leonatriol**

Posición	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$
1	1.48, 1.59	17.8 t
2	1.70, 1.87	27.5 t
3	3.47 t (2.4)	76.1 d
4	-	40.6 s
5	-	141.8 s
6	5.61 t (2.4)	121.7 d
7	1.86	23.4 t
8	1.45 m	44.4 d
9	-	35.3 s
10	2.04 m	49.7 d
11	1.63	34.2 t
12	1.30, 1.52	33.9 t
13	-	36.3 s
14	-	37.7 s
15	-	32.5 t
16	1.19, 2.00 d (7.5)	29.0 t
17	-	31.5 s
18	1.11, 1.24	44.5 t
19	1.23, 1.34	40.1 t
20	1.38	26.2 t
21	3.28 dd (2.7, 9.6)	79.6 d
22	-	73.0 s
23	1.03 s	28.8 c
24	1.13 s	25.2 c
25	0.90 s	17.3 c
26	0.98 s	20.0 c
27	1.08 s	15.0 c
28	0.88 s	32.6 c
29*	1.17 s	23.1 c
30*	1.22 s	26.4 c

<sup>a</sup> $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

<sup>b</sup> $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

s= singulete, d= doblete, dd= doble doblte, t= triplete, c= cuartete y m= multiplete.

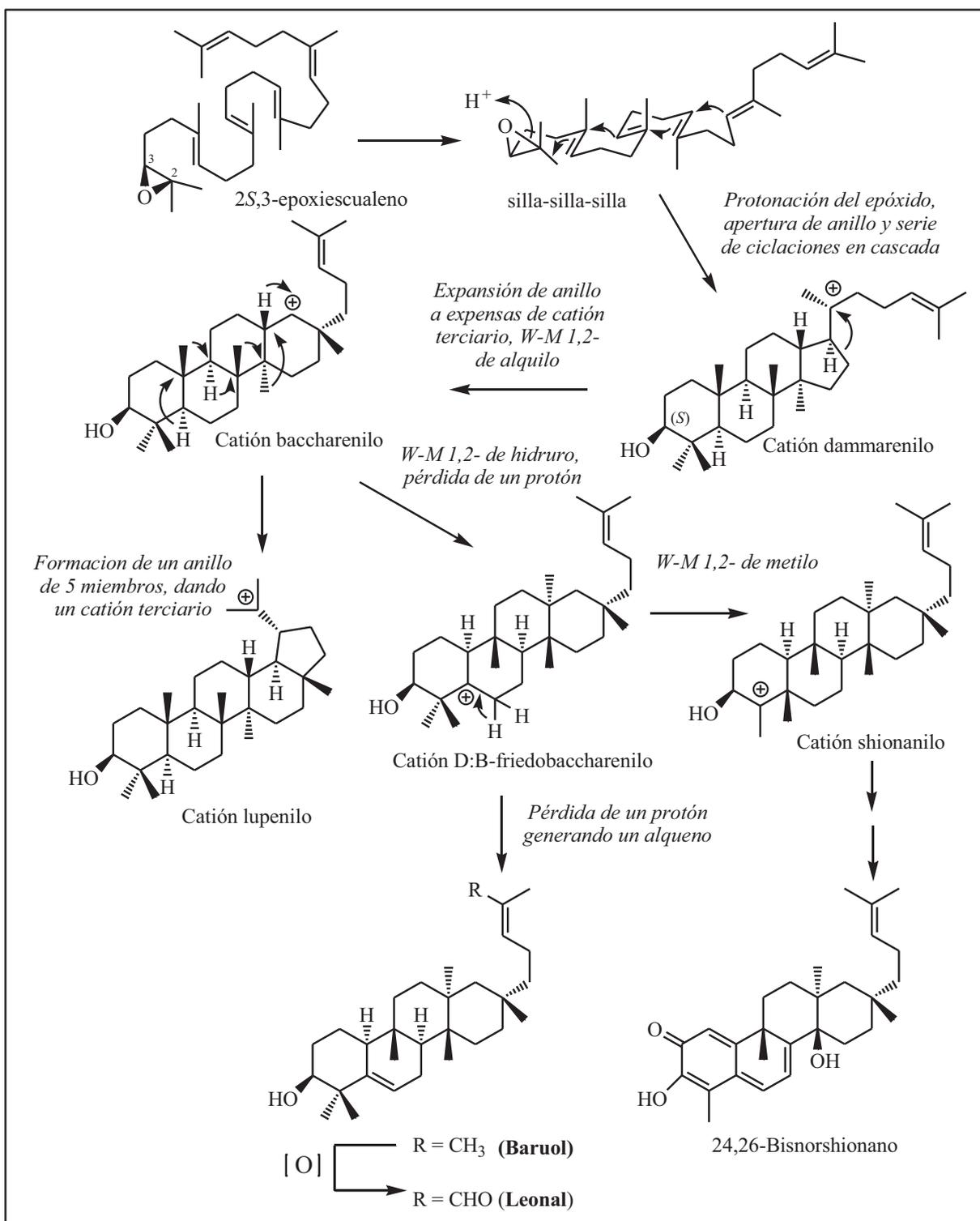
\*= valores intercambiables

Los triterpenos en plantas se originan, biogenéticamente, a partir del epoxiescualeno, a través de la protonación del epóxido, apertura del mismo y una serie de ciclaciones en cascada, que dan lugar al catión dammarenilo; posteriores reagrupamientos de Wagner-Meerwein dan lugar a las diferentes series de triterpenos tetra y pentacíclicos.

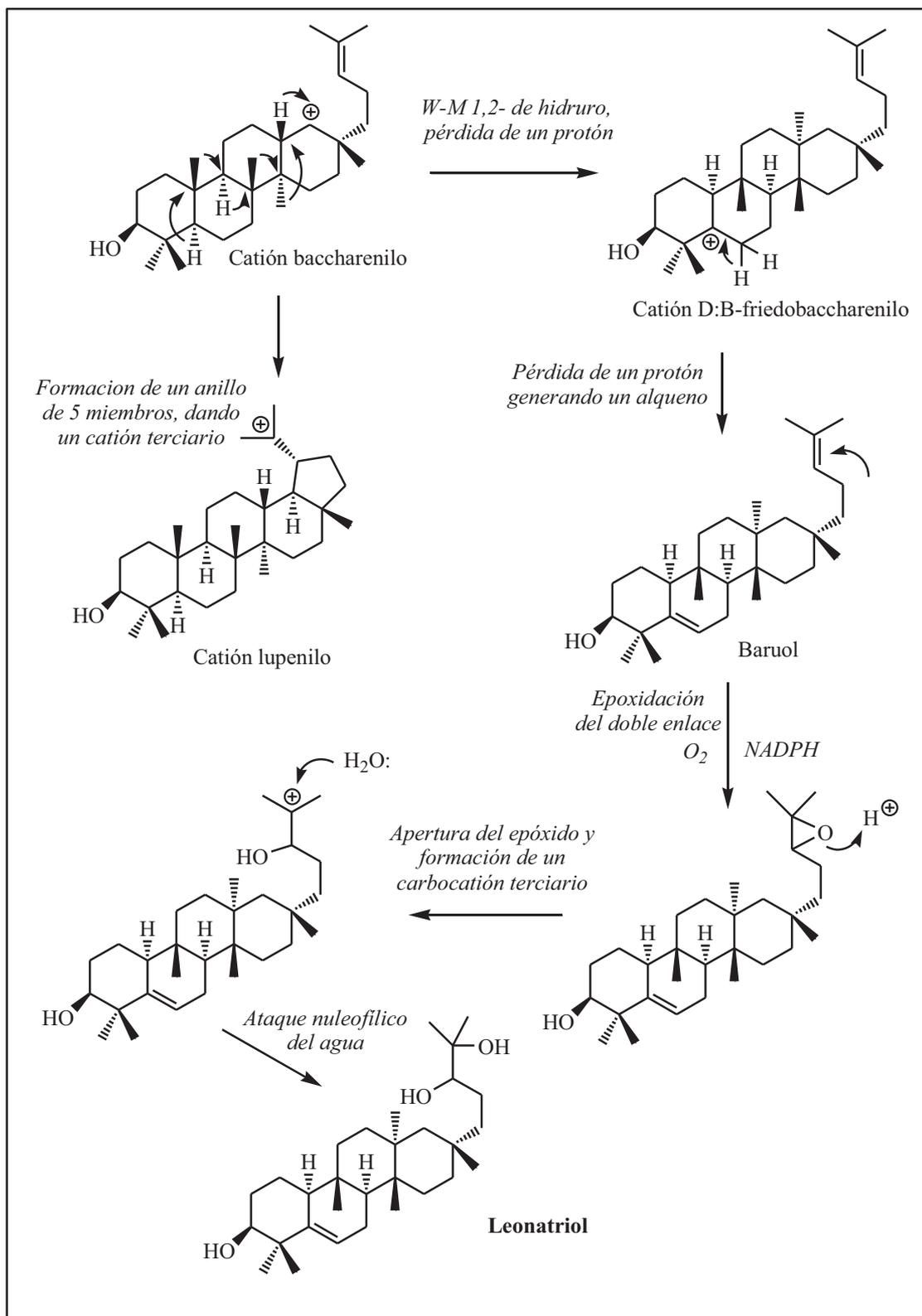
La biogénesis de los triterpenos con esqueleto de baccharano y shionano tienen un origen común, el cation dammarenilo, vía reagrupamiento frito (Fig. 69). La expansión del anillo D del cation dammarenilo conduce al catión baccharanilo, el cual por posterior ciclación, con participación del enlace olefínico, genera el catión lupenilo. Una vía alternativa, implicaría un reagrupamiento de Wagner-Meerwein 1,2 de hidruro y posterior pérdida de un protón para dar lugar a la formación del cation D:B-friedobaccharanilo, cuya desprotonación en el C-6, conduciría a los triterpenos D:B-friedobaccharan-5,21-dieno, ruta que podría explicar la formación de Baruol y Leonal. Por otro lado, la migración 1,2 de un metilo en el cation D:B-friedobaccharanilo, llevaría a la formación del esqueleto de shionano.

El triterpeno denominado Baruol, represento el primer ejemplo de triterpeno tetracíclico con un esqueleto de D:B-friedobaccharano. Aun cuando, el cation D:B-friedobaccharanilo había sido postulado como intermedio entre los triterpenos de la serie del baccharano y shionano, el aislamiento de Baruol apoya la hipótesis de la formación de un intermedio común para ambos esqueletos, baccharano y shionano.

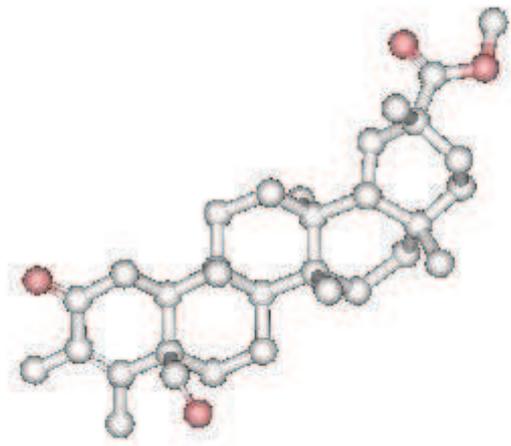
La Fig. 70, representa la ruta biosintética propuesta para la formación de Leonatriol, partiendo del Baruol, en la cual éste sufre una epoxidación sobre el doble enlace, catalizado por la enzima monooxigenasa en presencia de nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADPH) que dona oxígeno, seguida de la apertura del epóxido, generación de un alcohol secundario y un carbocatión terciario, el posterior ataque nucleofílico del agua y formación de un grupo hidroxilo, dando origen al Leonatriol.



**Fig. 69** Ruta biosintética propuesta para la formación de **Baruol** y **Leonal**



**Fig. 70** Ruta biosintética propuesta para la formación del **Leonatriol**



***TRITERPENO DEL FRIEDELANO***

#### 4.4.3 TRITERPENO F-1

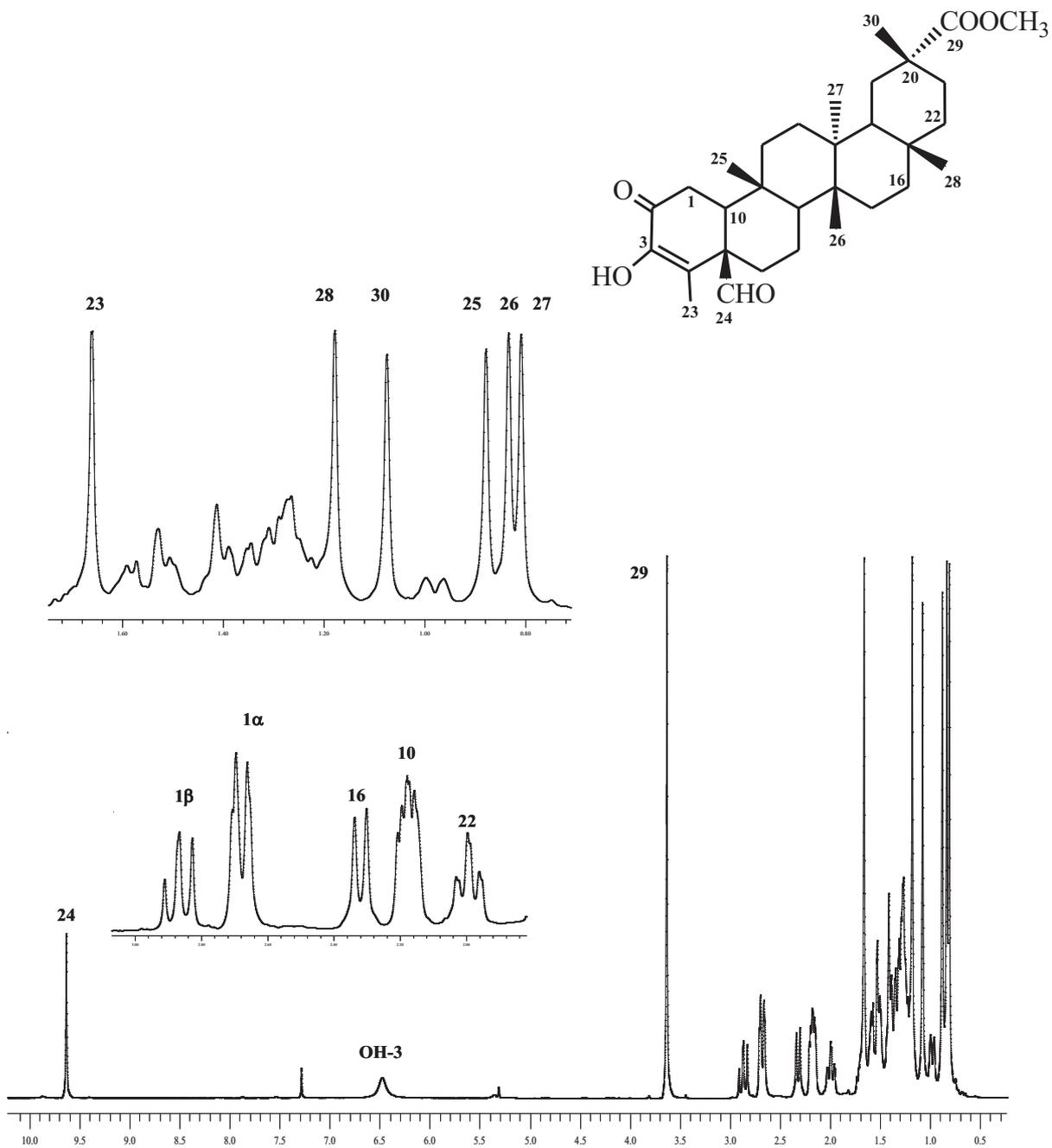
El compuesto denominado **F-1**, presentó una fórmula molecular  $C_{31}H_{46}O_5$  determinada por espectrometría de masas de alta resolución, indicando nueve grados de insaturación. El espectro de masas presentó fragmentos correspondientes a pérdida de aldehído ( $469 m/z [M-29]^+$ ,  $100, CHO^+$ ), éster ( $438 m/z [M-60]^+$ ,  $31, HCOOCH_3$ ) y ( $28 m/z, 33, C\equiv O^+$ ).

En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo ( $3408\text{ cm}^{-1}$ ), aldehído ( $2868\text{ cm}^{-1}$ ) y carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $1659\text{ cm}^{-1}$ ).

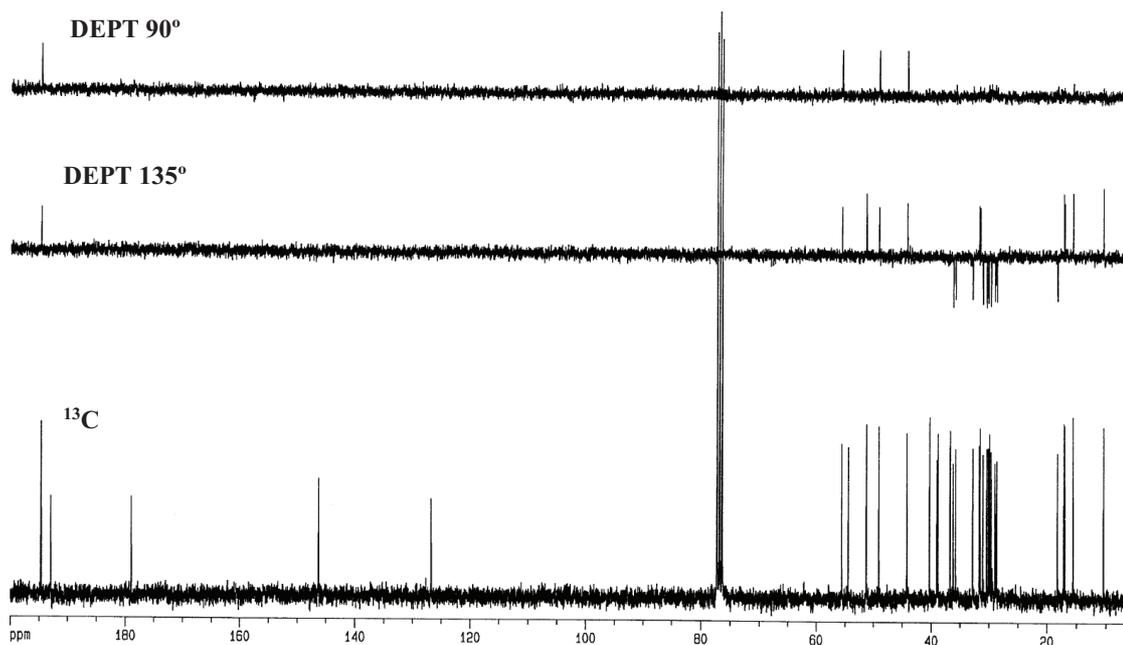
En el análisis del espectro de RMN  $^1H$  (Fig. 71, Tabla 5), mostró señales correspondientes a seis metilos como singuletes a  $\delta_H$  0.81, 0.83, 0.88, 1.07, 1.18 y 1.66, además, se observa una señal característica de metiléster a  $\delta_H$  3.63 y un protón de aldehído a  $\delta_H$  9.63.

Los datos anteriores se corroboran con su espectro de RMN  $^{13}C$  (Fig. 72, Tabla 5) con desacoplamiento protónico de banda ancha, al observarse señales para 31 carbonos, lo que conjuntamente con los experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$ , nos indicó la existencia de siete metilos, diez metilenos, tres metinos y diez carbonos cuaternarios; destacando la presencia de las señales correspondientes, a un carbono carbonílico a  $\delta_C$  191.9, un grupo aldehído a  $\delta_C$  194.7, un carbono carboxílico a  $\delta_C$  178.9 y carbonos vinílicos a  $\delta_C$  146.2 y  $\delta_C$  126.7. Todos estos datos sugieren que **F-1**, es un triterpeno de la serie del friedelano.

La posición de los grupos funcionales en la molécula fue determinada mediante un experimento HMBC, donde se observó correlación del protón a  $\delta_H$  1.66 (Me-23), a dos enlaces con el carbono a  $\delta_C$  126.7 (C-4), a tres enlaces con las señales de carbono a  $\delta_C$  146.2 (C-3) y  $\delta_C$  54.4 (C-5), y a cuatro enlaces con la señal a  $\delta_C$  194.7 (C-24), lo que permitiendo ubicar la estructura de la  $\alpha$ -hidroxi- $\alpha,\beta$ -cetona insaturada sobre el anillo A.



**Fig. 71** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de F-1



**Fig. 72** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con acoplamiento de banda ancha y experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  para **F-1** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

La señal a  $\delta_{\text{H}}$  9.63 (H-24), mostró correlación a dos enlaces con el carbono  $\delta_{\text{C}}$  54.4 (C-5) y a tres enlaces con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  55.6 (C-10) y  $\delta_{\text{C}}$  31.1 (C-6), lo que permitió fijar el aldehído sobre el C-24.

La posición del metiléster sobre el C-20, se estableció por medio de la correlación mostrada a dos enlaces entre la señal a  $\delta_{\text{H}}$  1.18 (Me-30) con la señal de carbono a  $\delta_{\text{C}}$  40.3 (C-20), y a tres enlaces con los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  29.6 (C-21),  $\delta_{\text{C}}$  30.4 (C-19) y  $\delta_{\text{C}}$  178.9 (C-29).

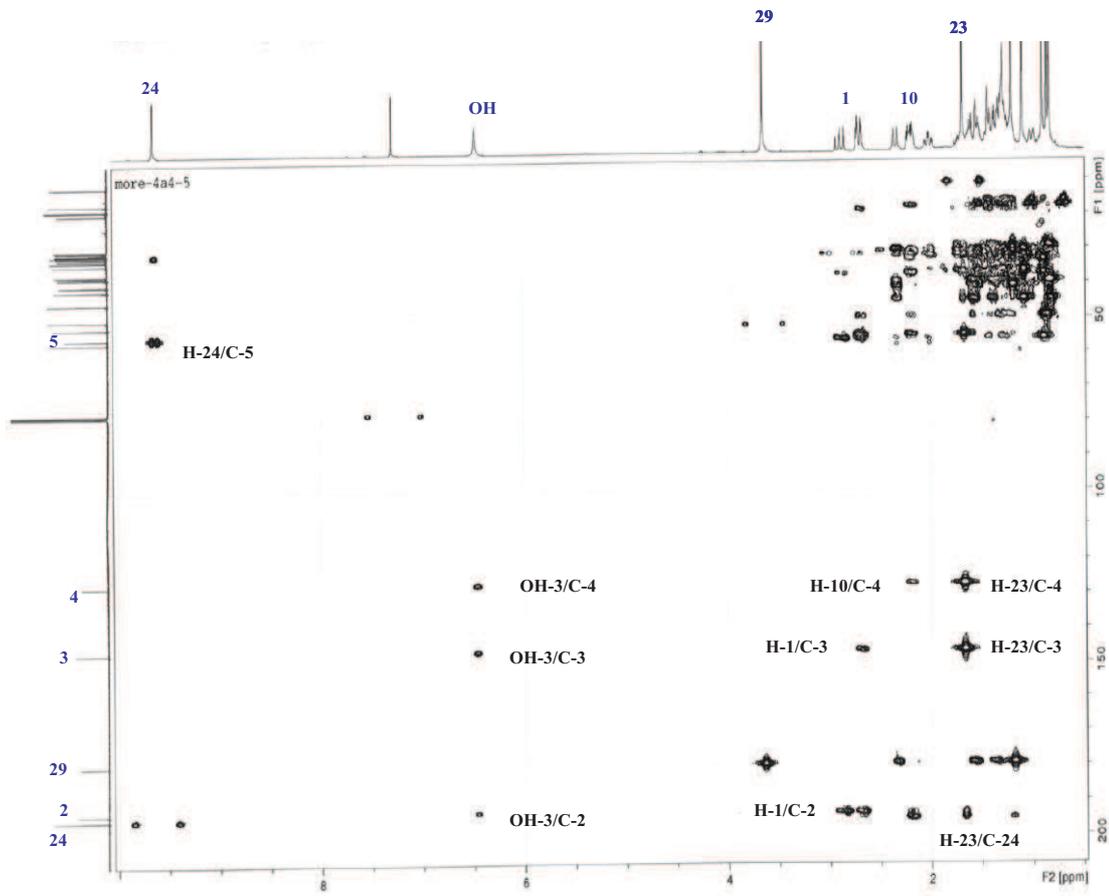
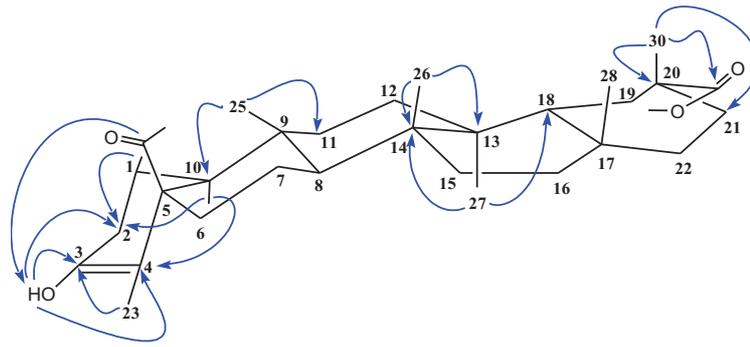
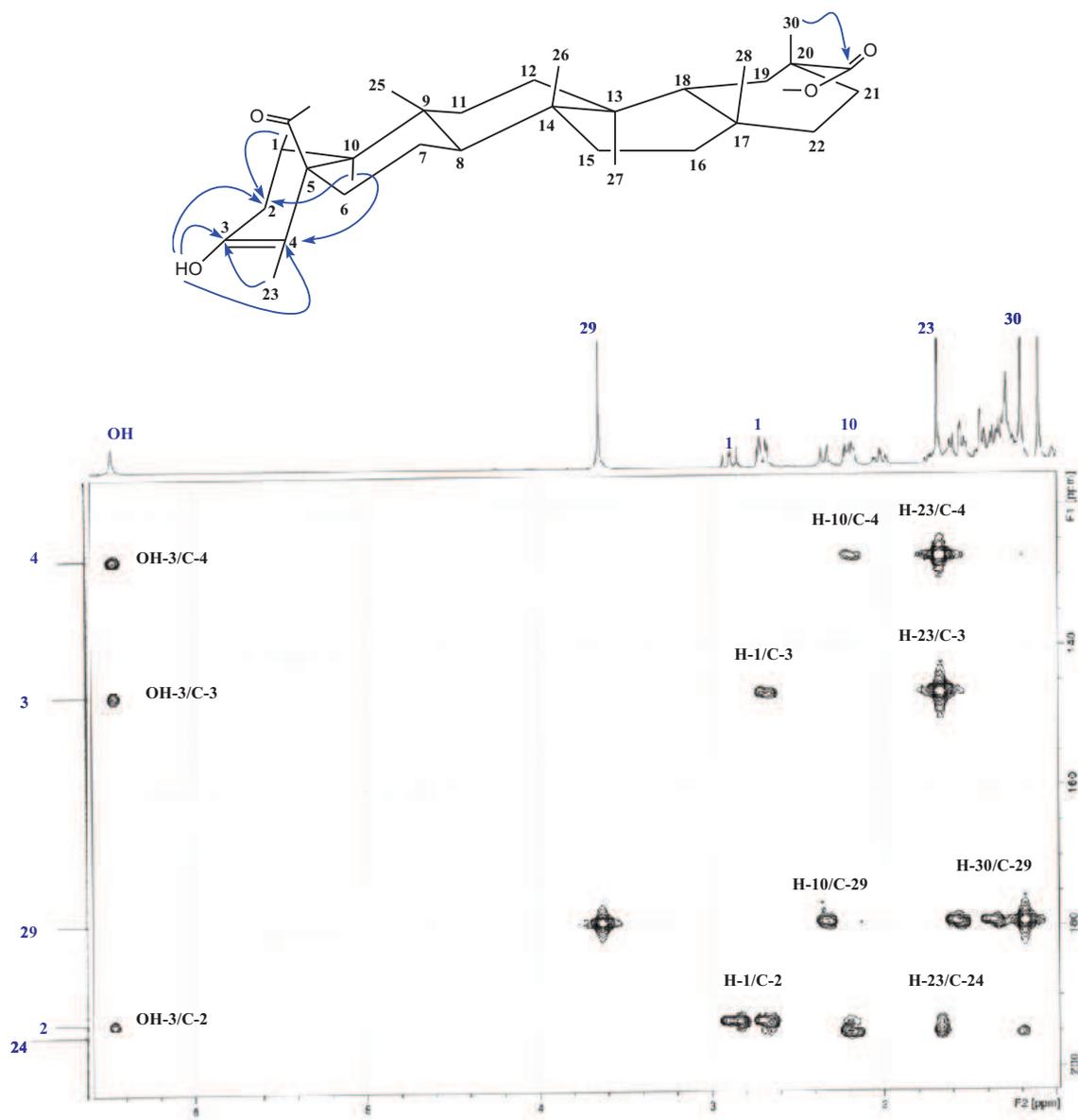


Fig. 73 Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para F-1

En la figura 74 se pueden observar las correlaciones del Me-23 con los carbonos C-4 y C-3; así como correlación del Me-30 con el C-29, de los protones H-1 con el C-2 y C-3, y del OH-3 con los carbonos C-4, C-3 y C-2, entre otras.



**Fig. 74** Ampliación del espectro HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para F-1

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó mediante las correlaciones observadas en un experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Fig. 75

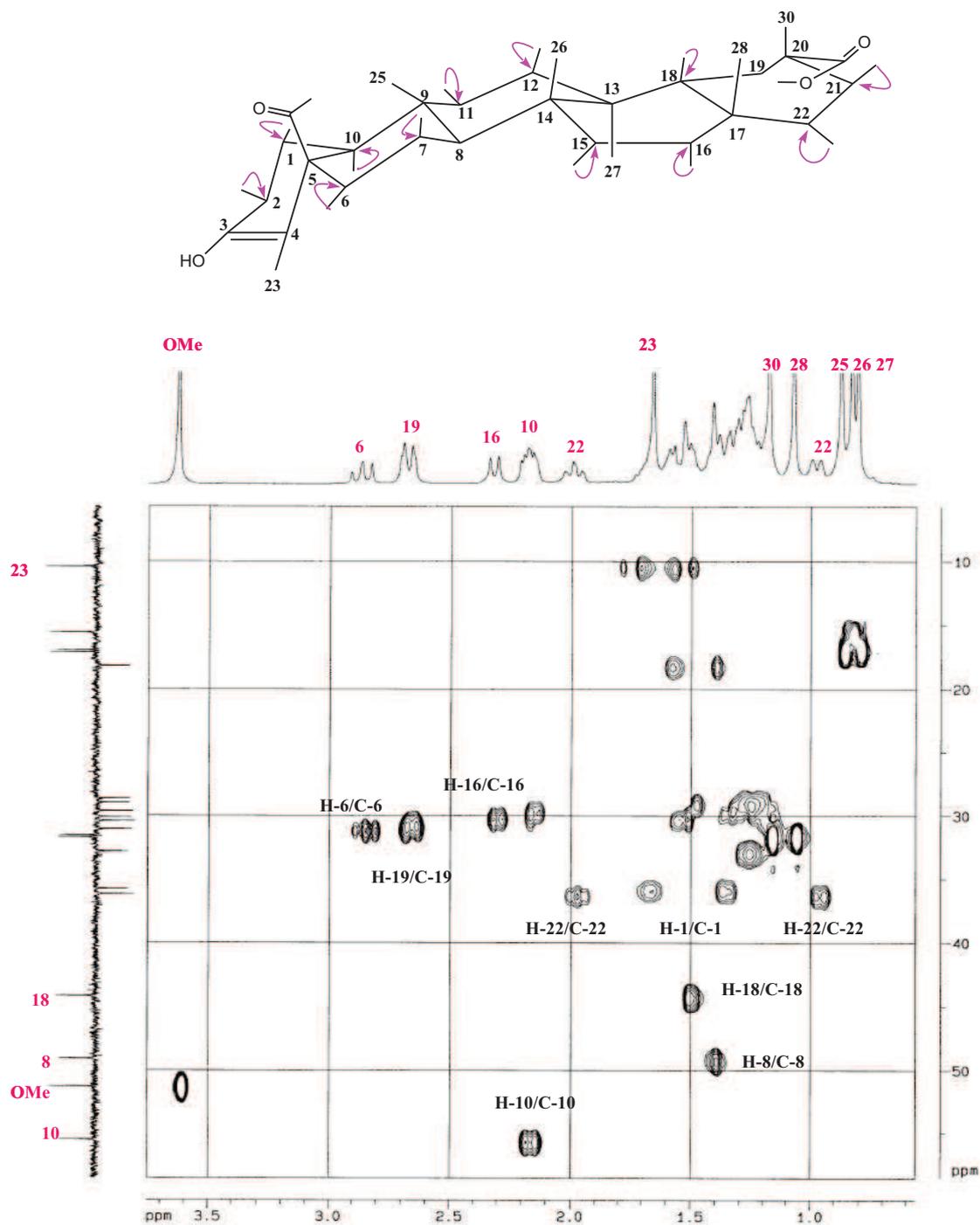
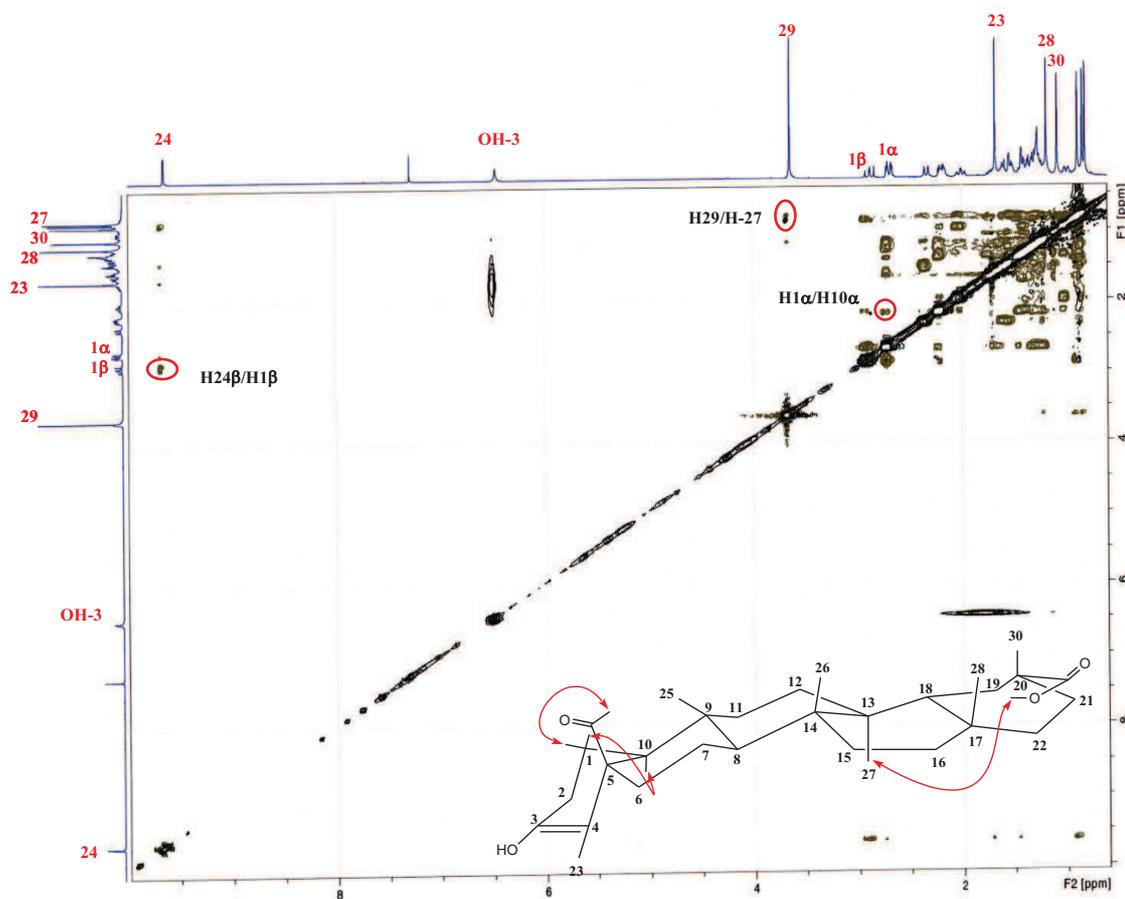


Fig. 75 Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para F-1

Un cuidadoso estudio de las constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (Fig. 76), en el que se observó efecto NOE de H-1 $\alpha$  con H-10 $\alpha$  y de H-1 $\beta$  con H-24. Además, se fijó el metiléster sobre C-29, al observar efecto NOE de éste con Me-27. La comparación con los datos reportados en la literatura para cangoronina<sup>81</sup> y otros productos similares<sup>111</sup>, nos permitió establecer la estructura de **F-1** como 3-hidroxi-3,4-didehidro-5-formil-2-oxo-D:A-friedoolean-29-carboxilato de metilo, para el que proponemos el nombre de 29-metiléster de la Cangoronina.



**Fig. 76** Experimento ROESY para F-1

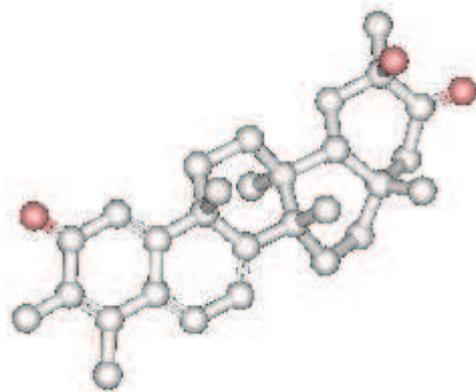
**Tabla 5. Datos de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) y <sup>13</sup>C (100 MHz) del 29-Metiléster de la Cangoronina**

Posición	$\delta_H^a$	$\delta_C^b$
1	1.40 $\alpha$ m, 1.70 $\beta$	35.8 t
2	-	192.9 s
3	-	146.2 s
4	-	126.7 s
5	-	54.4 s
6	2.78 dd (13.7, 11.4)	31.1 t
7	1.44, 1.60	18.2 t
8	1.43	49.1 d
9	-	36.7 s
10	2.16 m	55.6 d
11	1.23, 1.31	31.9 t
12	1.29, 1.51 sa	29.0 t
13	-	38.8 s
14	-	39.0 s
15	1.29, 1.51 sa	28.7 t
16	1.6, 2.32 da (10.8)	30.1 t
17	-	29.9 s
18	1.52 d (6.6)	44.2 d
19	2.68 dd (3.6, 13.8), 2.77	30.4 t
20	-	40.3 s
21	2.11, 2.15 m	29.6 t
22	0.98 da (10.5), 1.987 dt (2.4, 13.5)	36.2 t
23	1.66 s	10.4 c
24	9.63 s	194.7 d
25	0.88 s	17.1 c
26	0.83 s	15.6 c
27	0.81 s	17.0 c
28	1.07 s	31.6 c
29	-	178.9 s
30	1.18 s	31.7 c
COOMe	3.63 s	51.3 c

<sup>a</sup> $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

<sup>b</sup> $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

s = singulete, sa= singulete ancho, d = doblete, da= doblete ancho, dd= doblete, dt= doblete de triplete, t = triplete, c= cuartete y m= multiplete.



*TRITERPENOMETILÉNQUINONA*

#### 4.4.4 20 $\alpha$ -HIDROXITINGENONA

La 20-hidroxitingenona, se aisló por primera vez en 1973 por Brown y *col.*,<sup>112</sup> como un pigmento naranja de *Euonymus tingens* (Celastraceae), asignándose la orientación del grupo hidroxilo sobre C-20 como  $\alpha$ , a pesar de la falta de evidencias que permitieran establecer la estereoquímica de dicho grupo. Años mas tarde, Fernando y *col.*,<sup>113</sup> describen de nuevo su aislamiento de *Casine balae* (Celastraceae) y dan una asignación completa de sus datos de RMN <sup>13</sup>C,<sup>114</sup> sin embargo, tampoco justifican la configuración relativa del C-20.

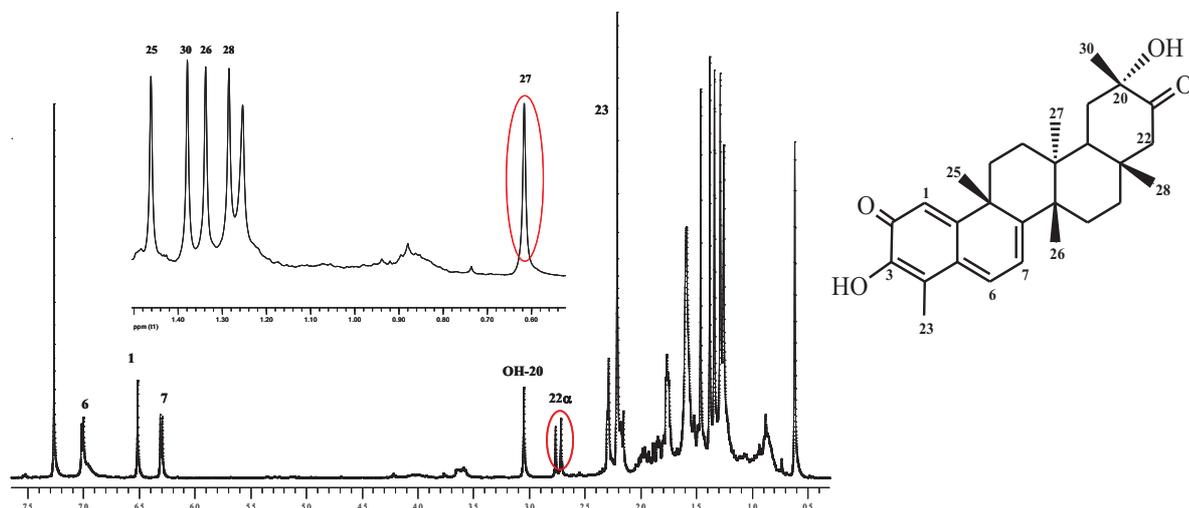
En 1993, Likhitwitayawuid y *col.*,<sup>97</sup> aislaron la 20-hidroxitingenona de la corteza de tallo de *Glyptopetalum sclerocarpum* (Celastraceae) y haciendo uso de técnicas de RMN bidimensionales (HMBC, ROESY e INEPT selectivo), revisan la estructura propuesta por Brown y *col.*<sup>112</sup> para la 20-hidroxitingenona. Así, establecen la configuración relativa del C-20 mediante un detallado estudio de los efectos NOE observados en un experimento ROESY y su estructura queda perfectamente establecida como la 20 $\beta$ -hidroxitingenona, que denominan como 20-hidroxi-20-*epi*-tingenona, reportando una rotación óptica de  $[\alpha]_D^{20} +102^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; *c* 0.1).

Ngassapa y *col.*<sup>115</sup> en el año de 1994, caracterizaron por RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) la 20 $\beta$ -hidroxitingenona, aislada a partir del extracto de éter de petróleo de la corteza de tallo de *Kokoona ochracea* (Celastraceae) y sus datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C fueron coincidentes con los descritos anteriormente, sin embargo, la medición de la rotación óptica de dicho compuesto fue reportada como  $[\alpha]_D^{25} -23^\circ$ , sin llegar a establecer el solvente y la concentración a la cual se realizó dicha medición.

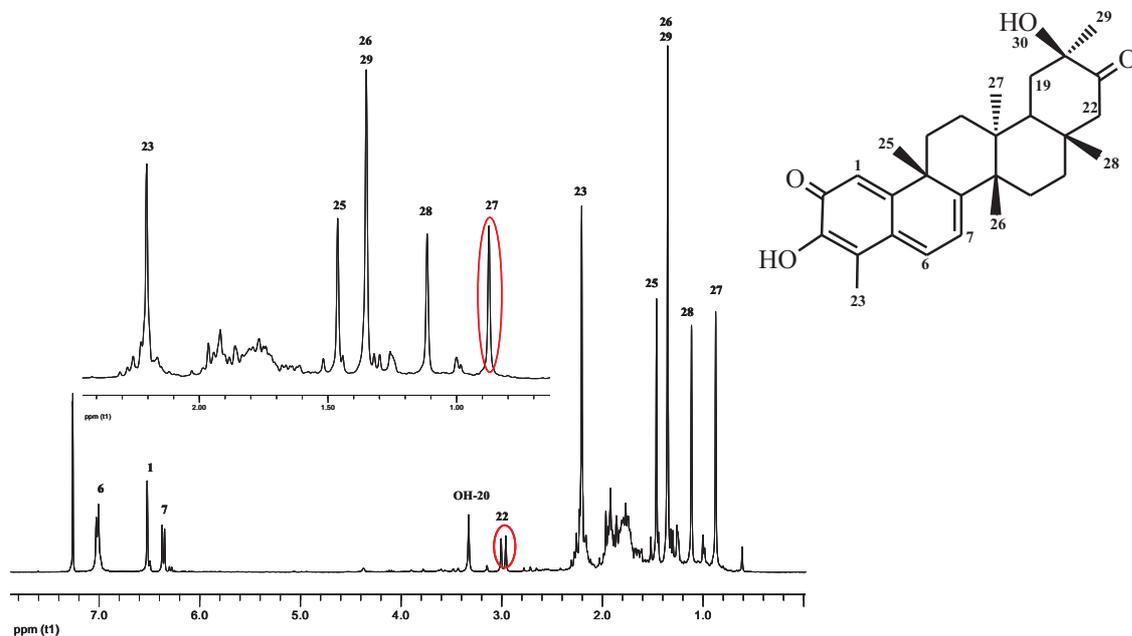
En 1996 A.A. Leslie Gunatilaka,<sup>98</sup> publicó una revisión bibliográfica de compuestos Celastroloides donde se reporta la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona, pero hace una referencia al pie de página, que en revisiones recientes<sup>97</sup> este compuesto se asignó como 20 $\beta$ -hidroxitingenona.

Con lo anteriormente expuesto podemos concluir que hasta el momento solamente se ha reportado el aislamiento y elucidación estructural de la 20 $\beta$ -hidroxitingenona.

De las raíces de *Cassine xylocarpa* se aisló tanto la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona como la 20 $\beta$ -hidroxitingenona (Fig. 77 y 78), los espectros de RMN  $^1\text{H}$  presentaron como principales diferencias los desplazamientos químicos del Me-27 y de los protones sobre C-22, siendo para la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona  $\delta_{\text{H}}$  **0.62** y  $\delta_{\text{H}\alpha}$  **2.74**, d, respectivamente, y para la 20 $\beta$ -hidroxitingenona  $\delta_{\text{H}}$  **0.88** y  $\delta_{\text{H}\alpha}$  **2.99**, d,  $J = 14.2$  Hz, respectivamente.



**Fig. 77** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de la **20 $\alpha$ -hidroxitingenona** aislada de *Cassine xylocarpa*



**Fig. 78** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de la **20 $\beta$ -hidroxitingenona** aislada de *Cassine xylocarpa*

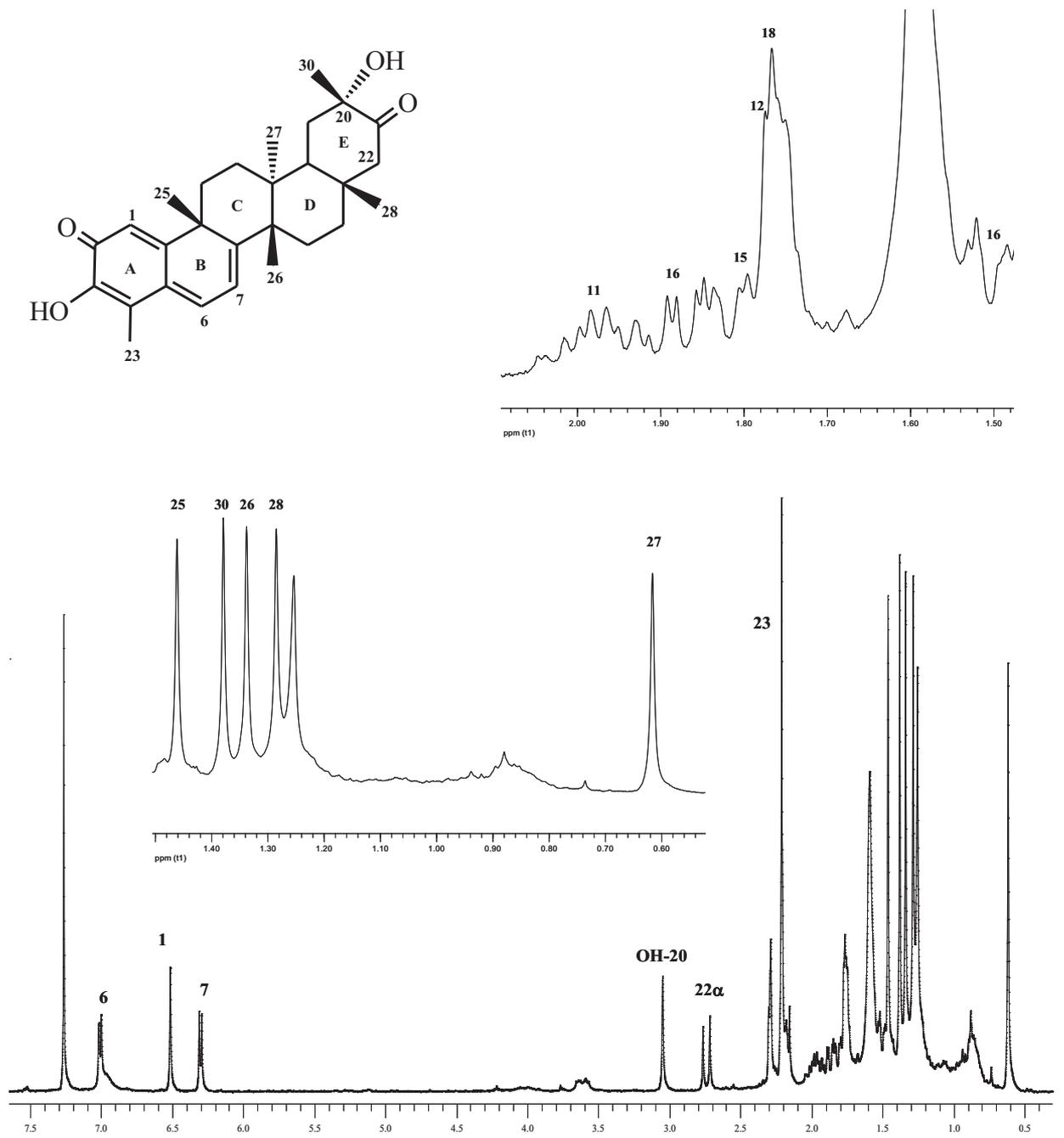
El compuesto denominado **20 $\alpha$ -hidroxitingenona**, es una laca amarilla-anaranjada de fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> calculada por espectrometría de masas de alta resolución (EMAR), indicando once grados de insaturación. En el espectro de masas se observó el ión molecular a 202 *m/z*.

En su espectro de IR se observaron bandas de absorción correspondientes a grupo hidroxilo (3375 cm<sup>-1</sup>), dos carbonilos, uno de ellos sobre un ciclo de seis miembros (1714 cm<sup>-1</sup>) y el otro  $\alpha,\beta$ -insaturado (1595 cm<sup>-1</sup>), lo que sugiere la estructura de una metilénquinona.

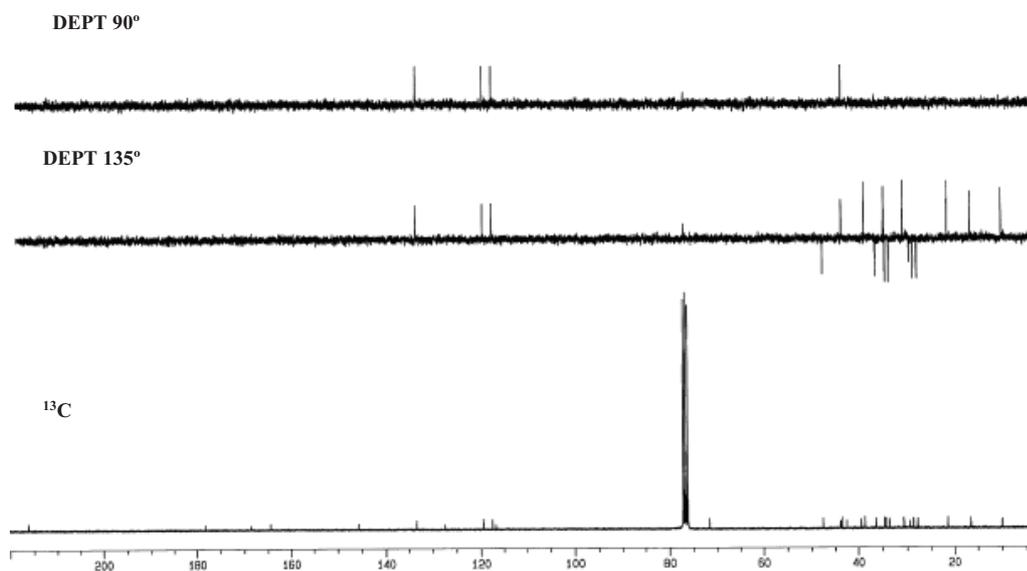
En su espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 79, Tabla 6), se observan señales correspondientes a seis metilos singuletes, el último asignable a un metilo sobre anillo aromático ( $\delta_H$  0.62, 1.29, 1.34, 1.38, 1.46, 2.21), un sistema AMX de tres protones vinílicos a  $\delta_H$  6.30 (d, *J* = 5.4 Hz), 6.51 (s) y 7.01 (d, *J* = 4.8 Hz), característicos de un sistema triterpenoquinónico. Además, se observó la presencia de un protón como singulete a  $\delta_H$  3.33, intercambiable con D<sub>2</sub>O, y una señal a  $\delta_H$  2.74 (d, *J* = 12.0 Hz).

El análisis de su espectro de RMN <sup>13</sup>C (Fig. 80, Tabla 6), mostró señales para 28 carbonos, lo que junto con los experimentos DEPT 90° y 135°, indicaron la existencia de seis metilos, seis metilenos, cuatro metinos y doce carbonos cuaternarios; destacando la señal correspondiente a una cetona a  $\delta_C$  216.1 y a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada a  $\delta_C$  178.2.

Estos datos nos indicaron que la estructura corresponde con una *nor*-triterpeno-metilénquinona derivada de la tingenona.



**Fig. 79** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  para la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

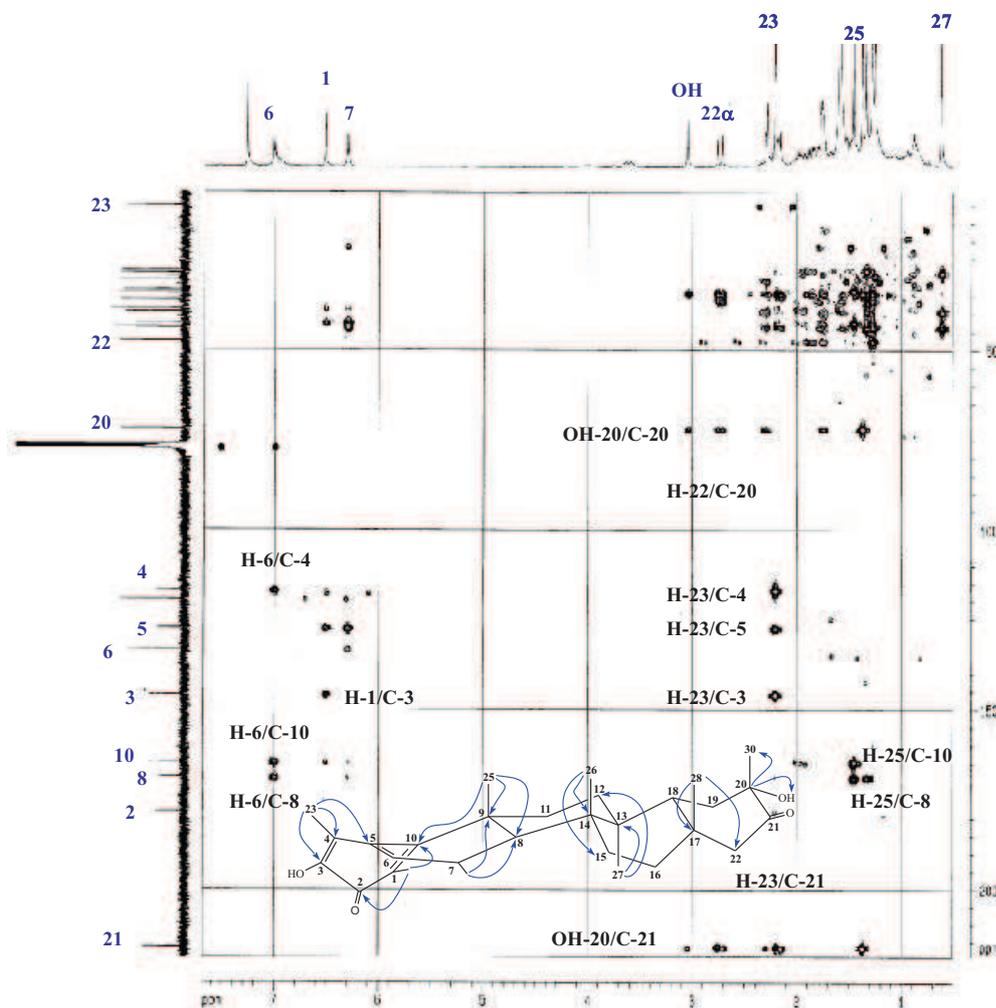


**Fig. 80** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  con acoplamiento de banda ancha y experimentos DEPT  $90^\circ$  y  $135^\circ$  para la **20 $\alpha$ -hidroxitingenona** ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

El estudio del experimento de HMBC (Fig. 81), nos permitió fijar la posición de cada uno de los grupos funcionales en la molécula de forma inequívoca. Así, las correlaciones observadas entre el protón H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  6.51) a dos enlaces con los carbonos C-2 (s,  $\delta_{\text{C}}$  178.2) y C-10 (s,  $\delta_{\text{C}}$  164.5) y a tres enlaces con los carbonos cuaternarios C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  127.4), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  145.8) y C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  42.5), y las correlaciones del Me-23 a dos enlaces con C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  116.8, s) y a tres enlaces con C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  145.8, s) y C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  127.4, s), permitió establecer la estructura del anillo A.

Los dobles enlaces del anillo B, se situaron entre C-5 y C-6 y entre C-7 y C-8 al observar las correlaciones del H-6 a dos enlaces con C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  117.6, d) y C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  127.4, s), y a tres enlaces con el C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  168.6, s), C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  164.5, s) y C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  116.8, s) y del H-7 a dos enlaces con C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  168.6, s) y C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  133.4 d) y a tres enlaces con C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  42.5) y C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  116.8, s).

Las correlaciones observadas entre el C-21 ( $\delta_C$  216.1) a dos enlaces con H-22 $\alpha$  ( $\delta_H$  2.74) y a tres enlaces con H-19 ( $\delta_H$  1.3, 2.3), Me-30 ( $\delta_H$  1.38) y OH-20 ( $\delta_H$  3.33), nos permitió establecer la regiosustitución del anillo E.



**Fig. 81** Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para la **20 $\alpha$ -hidroxitingenona**

La asignación completa de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó mediante las correlaciones observadas en un experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ). Fig. 82

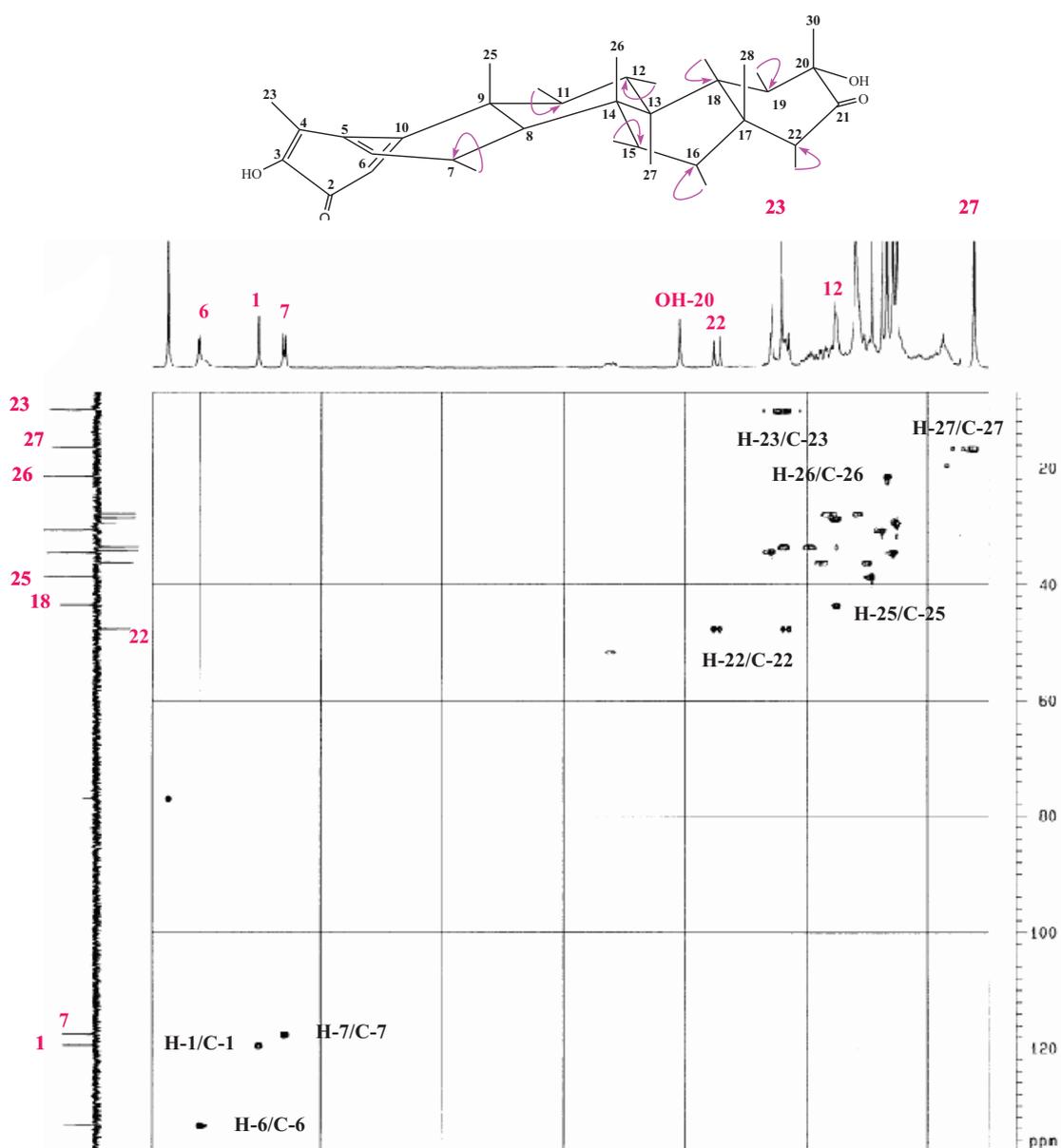


Fig. 82 Experimento HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) para 20 $\alpha$ -hidroxitingenona

La estereoquímica relativa de los protones de H-22 se determinó mediante el estudio de sus constantes de acoplamiento y un experimento ROESY (Fig. 83), en el que se observó efecto NOE entre el protón de H-22 $\alpha$  con el Me-27 $\alpha$ .

La estereoquímica relativa del alcohol sobre C-20, fue establecida por medio de un experimento ROESY, donde se observó el efecto NOE entre el Me-28 $\beta$  y el Me-30, lo que indica una disposición relativa  $\beta$  del Me-30 y por lo tanto, del grupo hidroxilo sobre C-20 como  $\alpha$ .

Estos datos y la comparación con los datos dados en la literatura para 20 $\beta$ -hidroxitingenona, nos permitió establecer la estructura de la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona.

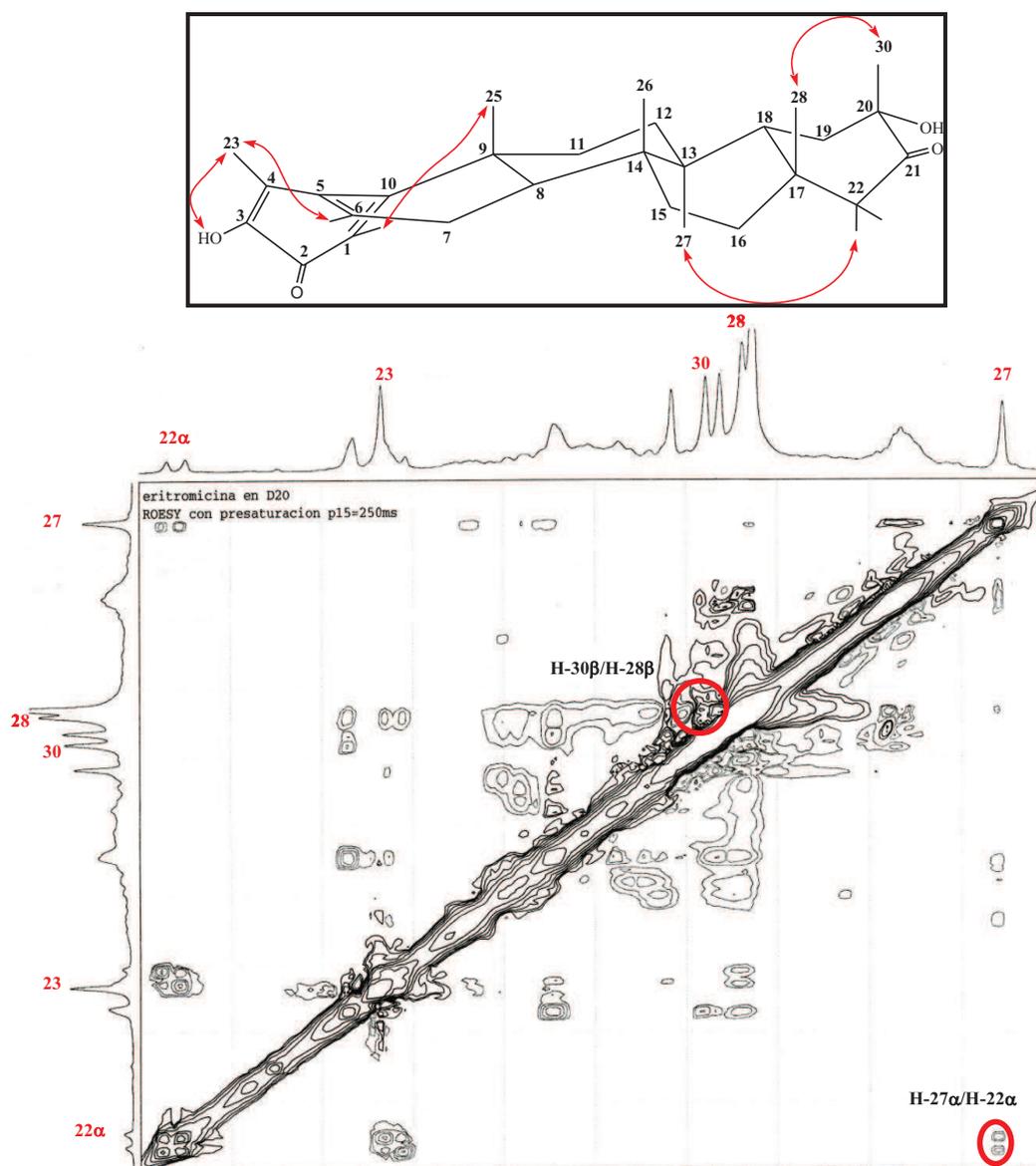


Fig. 83 Experimento ROESY para 20 $\alpha$ -hidroxitingenona

**Tabla 6. Datos de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) y <sup>13</sup>C (100 MHz) de la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona**

Posición	$\delta_H^a$	$\delta_C^b$
1	6.51 s	119.5 d
2	-	178.2 s
3	-	145.8 s
4	-	116.8 s
5	-	127.4 s
6	7.01 d (4.8)	133.4 d
7	6.30 d (5.4)	117.6 d
8	-	168.6 s
9	-	42.5 s
10	-	164.5 s
11	1.95, 2.20	33.5 t
12	1.77, 1.28	28.7 t
13	-	39.4 s
14	-	43.9 s
15	1.80 d (3.0), 1.59 sa	27.9 t
16	1.89 d (3.3), 1.5	36.3 t
17	-	34.5 s
18	1.74	43.6 d
19	1.30, 2.30 d (3.0)	34.3 t
20	-	71.7 s
21	-	216.1 s
22	2.17 $\beta$ , 2.74 d $\alpha$ (12.0)	47.6 t
23	2.21 s	10.0 c
24	-	-
25	1.46 s	38.6 c
26	1.34 s	21.5 c
27	0.62 s	16.5 c
28	1.29 s	34.4 c
29	-	-
30	1.38 s	30.6 c
OH-20	3.33 s	-

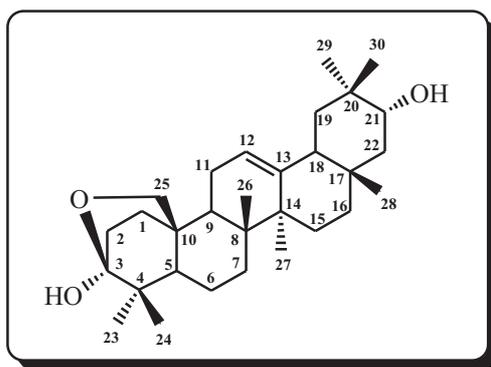
<sup>a</sup> $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz. *J* en paréntesis en Hz. Datos basados en experimentos COSY y HSQC.

<sup>b</sup> $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz. Datos basados en experimentos DEPT, HSQC y HMBC.

s= singulete, sa = singulete ancho, d= doblete, t= triplete y c=cuartete.

## 4.5 RESUMEN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES DE LOS PRODUCTOS NUEVOS AISLADOS DE LA RAÍZ DE *Cassine xylocarpa*

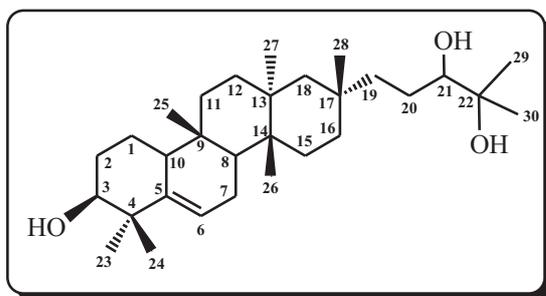
### 4.5.1 XYLOCARPINA (3 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -dihidroxi-3 $\beta$ (25)-epoxi-olean-12-eno)



Polvo amarillo;  $[\alpha]_D^{20} +44.5$  (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>); **IR** (película)  $\nu_{\text{máx}}$  3404, 2927, 2864, 2361, 2338, 1730, 1460, 1379, 1038, 755 cm<sup>-1</sup>; **RMN** <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  0.84 (6H, s, Me-28, Me-29), 0.89 (3H, s, Me-26), 0.95 (3H, s, Me-30), 0.97 (3H, s, Me-24), 1.03 (3H, s, Me-23), 1.11 (3H, s, Me-27), 1.15 (1H, H-19), 1.17, (1H, H-1), 1.2 (1H, H-5), 1.35 (1H, H-22), 1.4 (2H, H-7), 1.42 (1H, H-6), 1.48 (1H, H-22), 1.52 (1H, H-6), 1.68 (1H, H-9), 1.68 (1H, H-2), 1.73 (2H, H-15), 1.74 (1H, H-11), 1.8 (1H, H-19), 1.95 (2H, H-16), 1.97 (1H, H-11), 1.99 (1H, H-18), 2.14 (1H, H-1), 2.15 (1H, H-2) 3.51 (1H, dd, *J* = 4.8, 12.0 Hz, H-21 $\beta$ ), 3.90 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-25 $\alpha$ ), 4.27 (1H, dd, *J* = 2.7, 8.4 Hz, H-25 $\beta$ ), 5.25 (1H, sa, H-12); **RMN** <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  16.6 (c, C-29), 17.0 (c, C-26), 18.0 (c, C-24), 19.4 (t, C-6), 23.6 (t, C-11), 25.1 (c, C-27), 25.8 (t, C-15), 2.0 (c, C-23), 28.0 (t, C-16), 28.1 (c, C-28), 28.8 (c, C-30), 29.4 (t, C-2), 30.8 (t, C-7), 34.7 (t, C-1), 35.0 (s, C-10), 36.0 (s, C-17, C-20), 38.5 (s, C-8), 40.0 (s, C-4), 41.6 (d, C-9, C-14), 45.0 (t, C-22), 46.5 (t, C-19), 47.0 (d, C-18), 50.2 (d, C-5), 67.7 (t, C-25), 73.8 (d, C-21), 98.0 (s, C-3), 122.3 (d, C-12), 143.4 (s, C-13); **EMIE**<sup>+</sup> *m/z* (%) 456 (M<sup>+</sup>, 100), 438 (33), 300 (17), 273 (19), 272 (18), 271 (53), 255 (60), 253 (19), 234

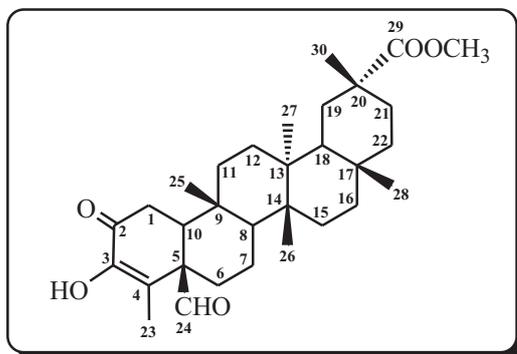
(36), 219 (28), 159 (33), 145 (44), 135 (55), 133 (58), 119 (60); **EMAR**  $m/z$  456.3605 (calculado para  $C_{30}H_{48}O_3$ , 456.3603). Ver Anexo 1

#### 4.5.2 LEONATRIOL (3 $\beta$ ,21,22-trihidroxi-baccharan-5-eno)



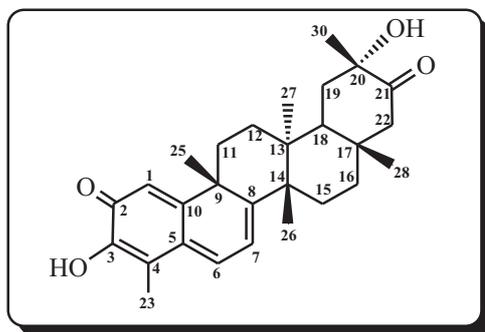
Laca incolora;  $[\alpha]_D^{20} +25$  ( $c$  0.54,  $CHCl_3$ ); **IR** (película)  $\nu_{max}$  3423, 2929, 2868, 1729, 1461, 1380, 1168, 756  $cm^{-1}$ ; **RMN**  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  0.88 (3H, s, Me-28), 0.90 (3H, s, Me-25), 0.94 (1H, H-15), 0.98 (3H, s, Me-26), 1.08 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-23), 1.11 (1H, H-18), 1.13 (3H, s, Me-24), 1.17 (3H, s, Me-29, 30), 1.19 (1H, H-16), 1.22 (3H, s, Me-29, 30), 1.23 (1H, H-19), 1.24 (1H, H-18), 1.30 (1H, H-12), 1.34 (1H, H-19), 1.38 (2H, H-20), 1.45 (1H, H-8), 1.48 (1H, H-1), 1.52 (1H, H-12), 1.58 (1H, H-15), 1.59 (1H, H-1), 1.63 (2H, H-11), 1.70 (1H, H-2), 1.86 (1H, H-7), 1.87 (1H, H-2), 2.00 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz, H-16) 2.04 (1H, m, H-10), 3.28 (1H, dd,  $J = 2.7, 9.6$  Hz, H-21), 3.47 (1H, t,  $J = 2.4$  Hz, H-3), 5.61 (1H, t,  $J = 5.4$  Hz, H-6); **RMN**  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta$  15.0 (c, C-27), 17.3 (c, C-25), 17.8 (t, C-1), 20.0 (c, C-26), 23.1 (c, C-29 o 30), 23.4 (t, C-7), 25.2 (c, C-24), 26.2 (t, C-20), 26.4 (c, C-29 o 30), 27.5 (t, C-2), 28.8 (c, C-23), 29.0 (t, C-16), 31.5 (s, C-17), 32.5 (t, C-15), 32.6 (c, C-28), 33.9 (t, C-12), 34.2 (t, C-11), 35.3 (s, C-9), 36.3 (s, C-13), 37.7 (s, C-14), 40.1 (t, C-19), 40.6 (s, C-4), 44.4 (d, C-8), 44.5 (t, C-18), 49.7 (d, C-10), 73.0 (s, C-22), 76.1 (d, C-3), 79.6 (d, C-21), 121.7 (d, C-6), 141.8 (s, C-5); **EMIE** $^+$   $m/z$  (%) 460 ( $M^+$ , 5), 424 (10), 308 (52), 290 (29), 275 (40), 257 (19), 248 (14), 233 (13), 191 (42), 189 (37), 152 (86), 134 (100), 121 (44), 95 (54); **EMAR**  $m/z$  460.3924 (calculado para  $C_{30}H_{52}O_3$ , 460.3916). Anexo 2

#### 4.5.3 29-METILESTER DE LA CANGORONINA (3-hidroxi-3,4-didehidro-5-formil-2-oxo-D:A-friedoolean-29-carboxilato de metilo)



Cristales transparentes ligeramente amarillos;  $[\alpha]_D^{20} +37.4$  ( $c$  0.85,  $\text{CHCl}_3$ ); **IR** (película)  $\nu_{\text{máx}}$  3408, 2930, 2868, 1727, 1659, 1455, 1387, 1358, 1214, 1099, 756, 666  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  0.81 (3H, s, Me-27), 0.83 (3H, s, Me-26), 0.88 (3H, s, Me-25), 0.98 (1H, da,  $J = 10.5$  Hz, H-22), 1.07 (3H, s, Me-28), 1.18 (3H, s, Me-30), 1.23 (1H, H-11), 1.29 (2H, H-12, 15), 1.31 (1H, H-11), 1.40 (1H, H-1), 1.43 (1H, H-8), 1.44 (1H, s, H-7), 1.51 (1H, sa, H-12), 1.51 (1H, sa, H-15), 1.52 (1H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-18), 1.60 (1H, H-7), 1.6 (1H, H-16), 1.66 (3H, s, Me-23), 1.7 (1H, H-1), 1.99 (1H, dt,  $J = 2.4, 13.5$  Hz, H-22), 2.11 2.15 (2H, m, H-21), 2.32 (1H, da,  $J = 10.8$  Hz, H-16), 2.68 (1H, dd,  $J = 3.6, 13.8$  Hz, H-19), 2.77 (1H, H-19), (H-6), 9.63 (1H, s, H-24); **RMN**  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  10.4 (c, C-23), 15.6 (c, C-26), 17.0 (c, C-22), 17.1 (c, C-25), 18.2 (t, C-7), 28.7 (t, C-15), 29.0 (t, C-12), 29.6 (t, C-21), 29.9 (s, C-17), 30.1 (t, C-16), 30.4 (t, C-19), 31.1 (t, C-6), 31.6 (c, C-28), 31.7 (c, C-30), 32.9 (t, C-11), 35.8 (t, C-1), 36.2 (t, C-22), 36.7 (s, C-9), 38.8 (s, C-13), 39.0 (s, C-14), 40.3 (s, C-20), 44.2 (d, C-18), 49.1 (d, C-8), 51.3 (c, Me-unido a Oxígeno), 54.4 (s, C-5), 55.6 (d, C-10), 126.7 (s, C-4), 146.2 (s, C-3), 178.9 (s, C-29), 192.9 (s, C-2), 194.7 (d, C-24); **EMIE** $^+$   $m/z$  (%) 498 ( $\text{M}^+$ ), 470 ( $\text{M}^+ - 28, \text{CO}^+$ , 33), 469 ( $\text{M}^+ - 29, \text{CHO}^+$ , 100), 409 ( $\text{M}^+ - 60, \text{HCOOCH}_3$ , 31), 249 (22), 177 (25), 137 (92), 121 (22), 109 (25), 95 (33); **EMAR**  $m/z$  498.3326 (calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_5$ , 498.3345) Anexo 3

#### 4.5.4 20 $\alpha$ -HIDROXITINGENONA



Laca amarilla-anaranjada,  $[\alpha]_D^{20}$  -2.1 ( $c$  0.99,  $\text{CHCl}_3$ ); UV (EtOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  (long  $\epsilon$ ) 209 cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada (3.03), 242 dieno homoanular (2.98), 288 (2.21), 421 (3.10) nm; **IR** (película)  $\nu_{\text{máx}}$  3375 (OH), 2927-2857 (CH, alifático), 1715 (C=O), 1595, 1517, 1445, 1381, 1290, 1088, 870, 759  $\text{cm}^{-1}$ ; **RMN**  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  0.62 (3H, s, Me-27), 1.28 (1H, H-12), 1.29 (3H, s, Me-28), 1.30 (1H, H-19), 1.34 (3H, s, Me-26), 1.38 (3H, s, Me-30), 1.46 (3H, s, Me-25), 1.50 (1H, H-16), 1.59 (1H, H-15), 1.75 (1H, sa, H-18), 1.77 (1H, sa, H-12), 1.80 (1H, d,  $J$  = 2.96 Hz, H-15), 1.89 (1H, d,  $J$  = 3.3 Hz, H-16), 1.95 (1H, H-11), 2.17 (1H, H-22), 2.20 (1H, H-11), 2.21 (3H, s, Me-23), 2.3 (1H, d,  $J$  = 3 Hz, H-19), 2.74 (1H, d,  $J$  = 12 Hz, H-22), 3.05 (1H, s, OH-29), 6.30 (1H, d,  $J$  = 5.4 Hz, H-7), 6.51 (1H, s, H-1), 7.01 (1H, d,  $J$  = 4.8 Hz, H-6); **RMN**  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  10.0 (c, C-23), 16.5 (c, C-27), 21.5 (c, C-26), 27.9 (t, C-15), 28.7 (t, C-12), 30.6 (c, C-30), 33.5 (t, C-11), 34.3 (t, C-19), 34.4 (c, C-28), 34.5 (s, C-17), 36.3 (t, C-16), 38.6 (c, C-25), 39.4 (s, C-13), 42.5 (s, C-9), 43.6 (d, C-18), 43.9 (s, C-14), 47.6 (t, C-22), 71.7 (s, C-20), 116.8 (s, C-4), 117.6 (d, C-7), 119.5 (d, C-1), 127.4 (s, C-5), 133.4 (d, C-6), 145.8 (s, C-3), 164.5 (s, C-10), 168.6 (s, C-8), 178.2 (s, C-2), 216.1 (s, C-24); **EMIE** $^+$   $m/z$  (%) 436 ( $\text{M}^+$ , 59), 253 (20), 241 (30), 215 (16), 214 (16), 202 (100), 201 (69), 81 (15), 69 (16), 55 (27); **EMAR**  $m/z$  436.2616 (calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_4$ , 436.2614).

Anexo 4



## 5. CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

- Se aislaron del extracto diclorometánico de las hojas de *Maytenus segoviarum* cinco productos conocidos en la literatura química, cuatro triterpenos: *epifriedelanol*, *friedelina*,  $\alpha$ -*amirina*, *lupeol* y un estero:  $\beta$ -*sitosterol*.
- Del extracto diclorometánico de las ramas de *Maytenus segoviarum* se aislaron seis productos conocidos en la literatura química, dos triterpenos del lupano: *lupeol* y  $6\beta$ -*hidroxi-lupan-3-ona*, y cuatro alcaloides sesquiterpénicos: *euonymina*, *4-hidroxi-7-epichuchuhuanina E-V*, *2-deacetilevonina* y *forrestina*.
- Del extracto de *n*-hexano/éter etílico de la corteza de raíz de *Cassine xylocarpa* se aislaron trece productos conocidos en la literatura química, once triterpenos: *tingenona*, *pristimerina*,  $20\beta$ -*hidroxitingenona*,  $22$ -*hidroxitingenona*,  $7$ -*hidroxi-6-oxopristimerol*,  $6$ -*oxopristimerol*, *celastrol*,  $3$ -*O*-*metil-6-oxotingenol*,  $3\beta,29$ -*dihidroxi-glut-5-eno*,  $\alpha$ -*amirina*, *lupeol*; un estero:  $\beta$ -*sitosterol*, y un derivado del ácido shikímico: *siringaldehído*.
- Se aislaron de la raíz de *Cassine xylocarpa*, cuatro triterpenos nuevos en la bibliografía química, cuyas estructuras se elucidaron mediante un cuidadoso estudio de sus datos espectroscópicos y espectrométricos, como:  **$3\alpha,21\alpha$ -dihidroxi- $3\beta(25)$ -epoxi-olean-12-eno** (*xylocarpina*, triterpeno de la serie del oleano.),  **$3\beta,21,22$ -trihidroxi-baccharan-5-eno** (*leonatriol*, triterpeno de la serie del baccharano),  **$3$ -hidroxi- $3,4$ -didehidro- $5$ -formil- $2$ -oxo-D:A-friedoolean- $29$ -carboxilato de metilo** ( $29$ -metiléster de la cangoronina, triterpeno de la serie del friedelano) y  **$20\alpha$ -hidroxitingenona** (triterpeno metilénquinona).
- Los baccharanos son triterpenos muy escasos en la Familia Celastráceas y en el presente estudio se logra aislar el tercer ejemplo de un triterpeno con estructura de

D:B-friedobaccharano, que denominamos Leonatriol, para el que se propone en el presente estudio una posible ruta biogénica de formación.

- Se aísla de la raíz de *Cassine xylocarpa* la 20 $\alpha$ -hidroxitingenona y se aclara con esto muchas confusiones generadas en la literatura química en torno a la elucidación estructural de este metabolito.



## **6. RECOMENDACIONES**

## 6. RECOMENDACIONES

- Completar el estudio fitoquímico de *Maytenus segoviarum* analizando el fruto y la raíz de dicha especie.
- Determinar la configuración absoluta de Leonatriol empleando la reacción de “Complejación *in situ* de ésteres ácidos de  $\alpha$ -metoxifenilacético con Bario (II)”, y para su análisis RMN  $^1\text{H}$ .
- Completar el estudio fitoquímico de *Cassine xylocarpa* analizando las ramas, hojas y fruto de esta especie.
- Se recomienda ensayar los diferentes metabolitos secundarios aislados, frente a diferentes actividades biológicas, dependiendo de la estructura química que presenten.
- Continuar el estudio fitoquímico de otras especies de Celastráceas pertenecientes a la flora salvadoreña, entre las que se pueden mencionar, por ejemplo: *Wymmeria cylocarpa*, *Zinowiewia cuneifolia* y *Quetzalia reynae*.



## 7. REFERENCIAS

## 7. REFERENCIAS

1. Grabley, S.M; Thiericke, R. *Drug Discovery from Nature*, Springer-Verlag, Germany, **1999**
2. Kennedy Rolon, M.L; Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife, España, **2002**
3. Prance, G.T. *Ethnobotany and the search for new drugs*, Ciba Foundation Symposium 185. Ed. John Wiley & Sons, **1994**
4. Kubinyi; H. *Pharmazie*, 50, 647-662, **1995**
5. Núñez Rivas, M.J. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, Tenerife, España, **2003**
6. Standley, P.C; Stegermark, J.A. *Flora de Guatemala*; Fieldiana Botany, Vol. 24, Part VI; Chicago Natural History Museum: Chicago, **1949**
7. Buening, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*, 17, 1821 – 1858, **1978**
8. Simmons, M.P. Celastraceae. *The families and genera of vascular plants*. Kubitzki, K., Ed.; Springer: Berlin, Vol. 6, pp 29-64, **2004**.
9. Heywood, V.H.; *Flowering Plants of the world*, Oxford University Press, New York, **1993**
10. Woodland, D.W., *Contemporary Plant Systematics*, Prentice-Hall, New Jersey, **1991**
11. Hammel, B., *Manual de Plantas de Costa Rica*, **2001**
12. Krikorian, A.D.J., *Etnopharmacol.*, 12, 115-178, **1984**
13. Chou, T.Q.; Mei, P.F.J., *Physiology*, 10, 529-534, **1936**
14. Wang, X.W.; Xie, H., *Drugs of the future*, 24, 991-997, **1999**
15. Zheng, J.R.; Gu, K; Xu, L; Gao, J.; Yu, Y; Tang, M. *Acta Acad. Med. Sin.*, 13, 391-397, **1991**
16. Gentry, A. Comparative ecology of African and south American arid to submed ecosystems. *Biological relationships between Africa and South America*, Goldbatt, P., Ed.; Yale University Press: New Haven, pp 500-547, **1993**
17. <http://www.elbosquechileno.cl/maiten.html>
18. Olarte, J. C. Contribución al estudio de la flora colombiana, Bogotá, **1976**
19. [newton.cnc.una.py/Resource-1138/2001v1n3-07.pdf](http://newton.cnc.una.py/Resource-1138/2001v1n3-07.pdf)
20. <http://www.arbolesornamentales.com/Cassineorientalis.htm>
21. <http://www.arbolesornamentales.com/Celastraceae.htm#Cassine>

22. Herbario del Jardín Botánico de La Laguna, El Salvador. 2007
23. Haslam, E., *Nat. Prod. Rep.*, 3, 217-249, **1986**
24. Dewick, P.M.; *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons Ltd.; Ed. Baffins Lane, Chichester, 2<sup>nd</sup> Ed. **2002**
25. Szendrei, K. *Lausanne International Council on Alcohol and Addiction*, 91, **1983**
26. Spivey, A.; Weston, M.; Woodhead, S., *Chem. Soc. Rev.*, 31, 43-59, **2002**
27. Yang, D.; Ye, M. X.; Pang, K.W.; Zou, N.; Letcher, R. M. J., *Org. Chem*, 63, 6446-6447, **1998**
28. Zhang, Z.; Ding, L; Qian, S.; An, D.J.; *Chin. Pharm. Sci.*, 2, 144, **1993**
29. Alvarenga N.; Ferro, E.; *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 635-702, Elsevier Science: The Netherlands, , **2005**
30. Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*., Basel: Birkhäuser, **1996**
31. Brüning, R.; Wagner, H. *Phytochemistry*, 17, 1821, **1978**.
32. Gunatilaka, A. A. L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 67, 1-123, **1996**
33. Setzer, W.N.; Setzer, M.C.; Hopper, A.; Moriarty, D.; Lehrman, G.K.; Niekman, A.; Morcomb, S.; Bates, R.B.; McClure, K.; Stessman, C.; Haber, W., *Plant. Med.*, 64, 583, **1998**
34. Sotanaphun, U.; Lipipum, V.; Suttisri, R.; Bavovada, R., *Plant. Med.*, 65, 450-452, **1999**
35. Chen, K.; Shi, Q., Kashiwada, Y., Zhang, D.; Hu, C.; Jin, J.; Nozaki, H.; Kilkuskie, R.; Tramontano, E.J., *Natural Product.*, 55, 340-346, **1992**
36. González, A.G., González, C.M; Ferro, E.A.; Ravelo, A.G.; Domínguez, X.A.; *J. Chem. Res. S.*, 20, 264-272, **1988**
37. Rodríguez, F.M. Estudio fitoquímico de especies de la Familia Celastraceae (Flora panameña): *Maytenus blepharodes* y *Crossopetalum lobatum*, *Tesis Doctoral*, Universidad de La Laguna, **2000**
38. Ovesna, Z; Vachalkova, A.; Horvathova, K. *Neoplasma*, 51, 407-414, **2004**
39. Shimada, K.; Kyuno, T.; Nambara, T.; Uchida, I.; *Heterocycles*, 15, 355-360, **1981**
40. Setzer, W. N.; Setzer, M. C. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 3, 540-556, **2003**
41. Tane, P.; Tsopmo, A.; Ngnokan, D.; Ayafor, J.F.; stetner, O. *Tetrahedron*, 47, 14989-14994, **1996**

42. Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J.J.; Lee, K.H. *J. Nat. Prod.*, 53, 1039-1041, **1990**
43. Andrade, S. F.; Antonioli, D.; Comunello, E.; Cardoso, L. G. V.; Carvalho, J. C. T.; Bastos, J. K. *J. Biosciences.*, 61, 329-333, **2006**.
44. Chen, K.; Shi, Q.; Kashiwada, Y.; Zhang, D. C.; Hu, C. Q.; Jin, J. Q.; Nozaki, H.; Klilkuskie, R. E.; Tramontano, E.; Chen, Y. C.; McPhail, D. R.; McPhail, A. T.; Lee, K. H. *J. Nat. Prod.*, 55, 340-346, **1992**.
45. Mena-Rejón, Gonzalo; Pérez-Espadas, Aída; Moo-Puc, Rosa; Cedillo-Rivera, Roberto; Bazzocchi, I.L., Jiménez-Díaz, I.A. y Quijano, Leovigildo; *J. Nat. Prod.*, 70, 863-865, **2007**
46. Liu, J. *J. Ethnopharm.*, 3, 92-94, **2005**.
47. Lee, K. H.; Lin, Y. M.; Wu, T. S.; Zhang, D. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I. H.; Chang, J. J.; Wu, R. Y.; Yang, T. H. *Planta Med.*, 54, 308-311, **1988**.
48. Gunatilaka, A.A.L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 67, 1-123, **1996**
49. Tokuda, H.; Oigáis, H.; Koshimu, K.; Ito, Y. *Cancer Lett.*, 33, 279-288, **1986**
50. Weeler, J. *Pharm. J.*, 494-505, **1989**
51. Einsznhamer, D. A.; Xu, Z. Q. *Drugs.*, 7, 359-373, **2004**.
52. DeClercq, E. *Curr. Med. Chem.*, 8, 1543-1572, **2001**
53. Tolstikoba, T.G.; Sorokina, I.V.; Tolstikov, G.A.; Flekhter, O.B. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 32, 42-55, **2006**
54. Reyes, C.P, Nuñez, M.J, Jimenez, I.A., Busserolles, J., Alcaraz, M, Bazzocchi, I., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 1573-1579, **2006**
55. Núñez, M.J., Reyes, C.P, Jiménez, I.A., Moujir, L., Bazzocchi, I. L., *J. Nat. Prod.*, 68, 1018-1021, **2005**
56. Mitaine-Offer, A. C.; Hornebeck, W.; Sauvain, M.; Zesch-Hanrot, M. *Planta Med.*, 68, 930-932, **2002**
57. Aratanechemuge, Y.; Hibasami, H.; Sanrin, K.; Katsuzaki, H.; Imai, K.; Komiya, T. *Oncol. Rep.*, 11, 289-292, **2004**
58. Wada, S. I.; Iida, A.; Tanaka, R. *J. Nat. Prod.*, 61, 1545-1547, **2001**.
59. Saleem, M.; Afad, F.; Adhauri, V. M.; Mukhtar, H. *Oncogene.*, 23, 5203-5214, **2004**.

60. Ramírez-Apan, A. A.; Pérez-Castorena, A. L.; De Vivar, A. R. *Naturforsch.*, 59, 237-243, **2004**
61. Patocka, J. J. *J. App. Biomed.*, 7-12, **2003**.
62. Krasutsky, P.; Carlson, R. M. *PCT Int. Appl.*, 97, **2002**.
63. Hiroya, K.; Takahashi, T.; Miura, N.; Naganuma, A.; Sakamoto, T. *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 3229-3236, **2002**.
64. Zhang, H. J.; Tang, G. T.; Hoang, V. D.; Hung, N, V.; Cuong, N. M.; Soejarta, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. U. S. *J. Nat. Prod.*, 66, 263-268, **2003**.
65. Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E.M. *Planta Med.*, 63, 255-257, **1997**.
66. Jasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M.; Nakagawa, S. *Oncology.*, 48, 72-76, **1991**.
67. Zuko, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, K.; Marchesi, E.; Gambacorti, C. Formelli, F. *Cancer Lett.*, 175, 17-25, **2002**
68. Sturm, S.; Gil, R. R.; Chai, H. B.; Ngassapa, O. D.; Santisuk, T.; Reutrakul, V.; Howe, A.; Moss, M.; Besterman, J. M.; Yang, S. L.; Farthing, J. E.; Tait, R. M., Lewis, J. A.; O'Neill, M. J.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.*, 59, 658-663, **1996**
69. Villasenor, I.M.; Angelada, J.; Canlas, A.P.; Echegoyen, D. *Phytother. Res.*, 16, 417-421, **2002**
70. Wilt, T. J. *B. J. U. International.*, 83, 976-983, **1999**
71. Martínez Grau, M. A. y otros, *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*, Editorial Síntesis, España, **2001**
72. Marcano, D. y otros, *Fitoquímica Orgánica*, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 54-57, **2002**
73. Torres, D.; Memoria de Investigación: "Metabolitos secundarios aislados de *Celastrus vulcanicola* (Celastraceae), Universidad de La Laguna, **2006**
74. Rodríguez Perestello, N., Memoria de Investigación: "Metabolitos secundarios aislados de *Maytenus jelskii* (Celastraceae), Universidad de La Laguna, **2005**
75. Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, D.; "NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis" Wiley-VCH, **1998**

76. Miknis, F.P., "Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Petroleum" Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. John Wiley & Sons, pp 6849-6875, **2000**
77. Gilles, G.G.; "Application of SNIF-NMR and other isotopic methods for testing the authenticity of food products" Magnetic Resonance in Food Science 157, 120-126, **1995**
78. Pastor, M; *Curso Introductorio a la espectroscopia de RMN*. Parte II, Aspectos experimentales, Universidad de Santiago de Compostela, España, **2005**
79. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/tecnicas/2d/tocsy/tocsy.html>
80. [http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_05.html](http://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05.html)
81. Itokawa, H., Shiota, O., Ikuta, H., Morita, H., Takeya, K., Itaka, Y., Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*, *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 11, 3713-3716, **1991**
82. Sheng-Chih, Chen; Hong, Li-Ling; Chang, Chung-Yang; Chen, Chun-Jen; Hsu, Mei-Hua, Huang, Yuan-Chao, Huang, Tai-Hung y Kuo, Shen-Chu, *The Chinese Pharmaceutical Journal*, 55, 109-119, **2003**
83. Mensah, I.A.; Achenbach, H., *Phytochemistry*, 24, 1817, **1985**
84. Abramovitch, R.A.; Micetich R. G., *Can. J. Chem*, 41, 2362, **1963**
85. Seo S.; Tomita, Y.; Tori, K., *Tetrahedron Lett.*, 7, **1975**
86. Wenkert, E.; Baddeley, G.V.; Burfitt, I.; Moreno, I.; *Org. Magn. Resonance*, 11, 337, **1978**
87. Ito K.; Lai, J.; *Yakugaku Zasshi*, 98, 249, **1978**
88. McCarthy, F.; Chopra, J.; Ford, A.; Hogan, S.; Kerry, J.; O'Brien, N.; Ryan, E.; Maguire, A.; *Org. Biomol. Chem.*, 3, 3059-3065, **2005**
89. Drewes, S.; Mashinbye, J.; Field, J.; Ramesar, N.; *Phytochemistry*, Vol.30, 3490-3493, **1991**
90. Kimio, S; Yoshikazu, S.; Hiroshi, W.; Koyoyuki, Y.; Yoshimasa, H. *Tetrahedron Lett.*; 29, 2733-2736, **1971**
91. Nuñez, M.J.; Memoria de Investigación: "Estudio fitoquímico de *Maytenus chiapensis* L. (Celastraceae)" Universidad de La Laguna, **2001**
92. Yamada, K.; Shizuri, Y.; Hirada, Y. *Tetrahedron*, Vol. 34, 1915-1920, **1978**
93. Chunguan, C.; Jikai, L.; Dagang, W., *Phytochemistry*, Vol. 31, No. 12, 4391-4392, 1992
94. Fernando, H.C.; Gunatilaka, A.; Tezuka, Y., Kikuchi, T.; *Tetrahedron*, 45, 5867, **1989**
95. Bhatnagar, S.S. y Johnson, A.; *J. Sci. Ind. Res.*, 10B, 56, **1951**

96. González, A.G.; Francisco, C.; Freire, R.; Hernández, R.; Salazar, J.; Suárez, E.; *Phytochemistry*, 14, 1067, **1975**
97. Likhitwitayawuid, K.; Bavovada, R.; Lin, L.; Cordell, G.; *Phytochemistry*, Vol 34, 3, 759-763, **1993**
98. Gunatilaka, A., Triterpenoid Quinomethides and Related compounds (Celastroloids), Springer Wien, New York, **1996**
99. Johnson, A.; Juby, P.; King, T.; Tam, S.; Pristimerin, part IV: Total structure, *J. Chem. Soc.*, 2884, 1963
100. Shirota, O.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; *J. Nat. Prod.*, 57, 12, 1675-1681, **1994**
101. Rodríguez, F.; López, M.; Jiménez, I.; Moujir, L.; Ravelo, A.; Bazzocchi, I.; *Tetrahedron*, 61, 2513-1519, **2005**
102. González, A.; Alvarenga, N.; Ravelo, A.; Jiménez, I., Bazzocchi, I.; *Phytochemistry*, 43, 129-132, **1996**
103. Tachi, Y.; Kamano, Y.; Sawada, J.; Tanaka, I.; Itokawa, H. *Yakugaku Zasshi*, 98, 349, 1978
104. Kim, Hoon y otros, *Org. Biomol. Chem.*, 1, 268-281, **2003**
105. Poincot, J.; Adam, P.; Trendel, J.M.; Albrecht, P.; Riva, A. *Geochim Cosmochim.*, 57, 3201-3205, **1993**
106. Mo, F.; Anthonsen, T.; Bruun, T. *Acta Chem. Scand*, 26, 1287-1288, **1972**
107. Shoji, N.; Umeyama, A.; Taira, Z.; Takemoto, T.; Nomoto, K.; Mizukawa, K.; Ohizumi, Y. *J. Chem. Soc., Chem Commun*, 871-873, **1983**
108. Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Kimura, Y.; Yamanouchi, S.; Tamura, T. *Phytochemistry*, 48, 301-305, **1998**
109. Núñez, M.J., López, M.R.; Bazzocchi I.L.; Jiménez, I.A.; Moujir, L.; Ravelo, A.G. *Tetrahedron Lett.*, 45, 7367-7370, **2003**
110. González, A.G.; Ferro, E.A.; Ravelo, A.G. *Phytochemistry*, 26, 2785-2788, **1987**
111. Duan, H.; Yoshihisa, T.; Momota, H.; Ohmoto, Y.; Taki, T.; Jia, Y.; Li, D. *Phytochemistry*, 53, 805-810, **2000**
112. Brown, P.M.; Moir, M.; Thomson, R.H.; King, T.J.; Krishnamoorthy, V; Seshadri, T.R., *J. Chem. Soc.; Perkin Trans*, 1, 2721, **1973**

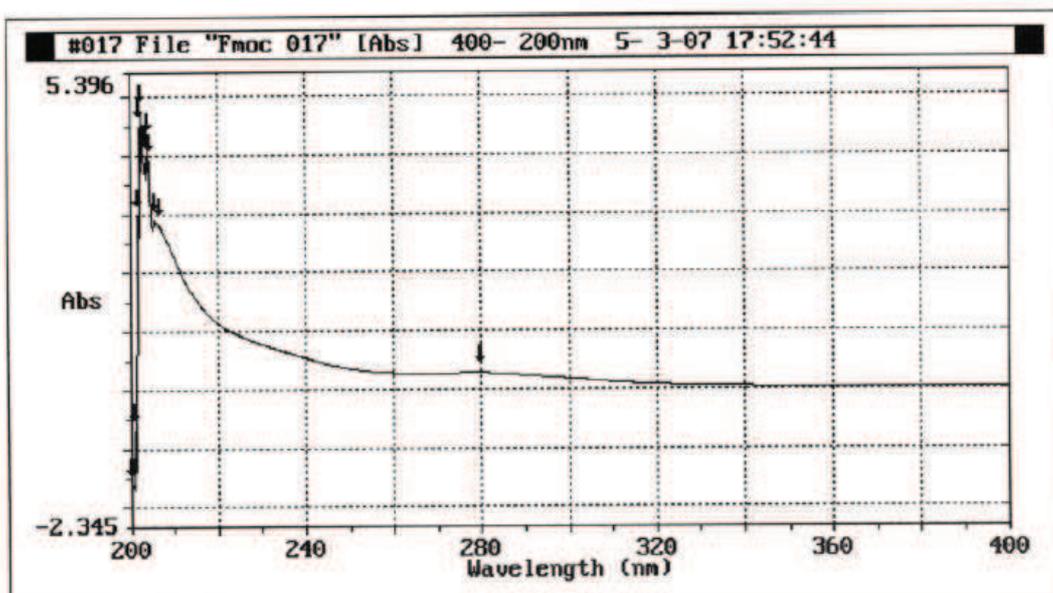
113. Fernando, H.C.; Gunatilaka, A.A. L; Tesuka, Y.; Kikuchi, T. *Tetrahedron*, 45(18), 5867-5876, **1989**
114. Gunatilaka, A.A.L; Fernando, C.; Kikuchi, T.; Tesuka, Y. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 27(8), 803-807, **1989**
115. Ngassapa, O.; Soejarto, D.D.; Pezzuto, J.M.; Fransworth, N. R., *J. Nat. Prod.*; Vol. 57, 1-8, **1994**

# ANEXOS

## ANEXO 1

### 1. DATOS ESPECTRALES DE H-1

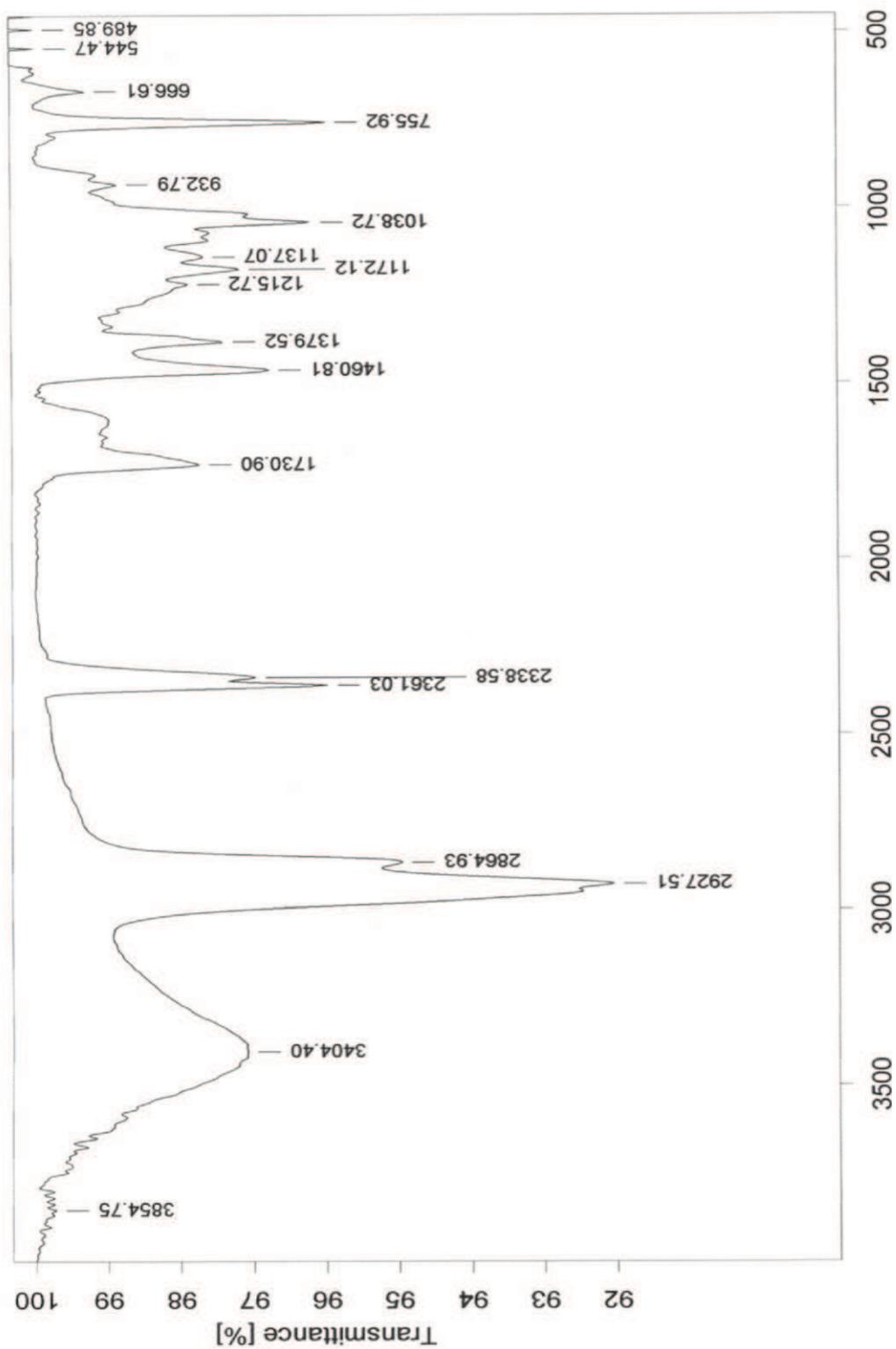
#### 1.1 Espectro UV de H-1



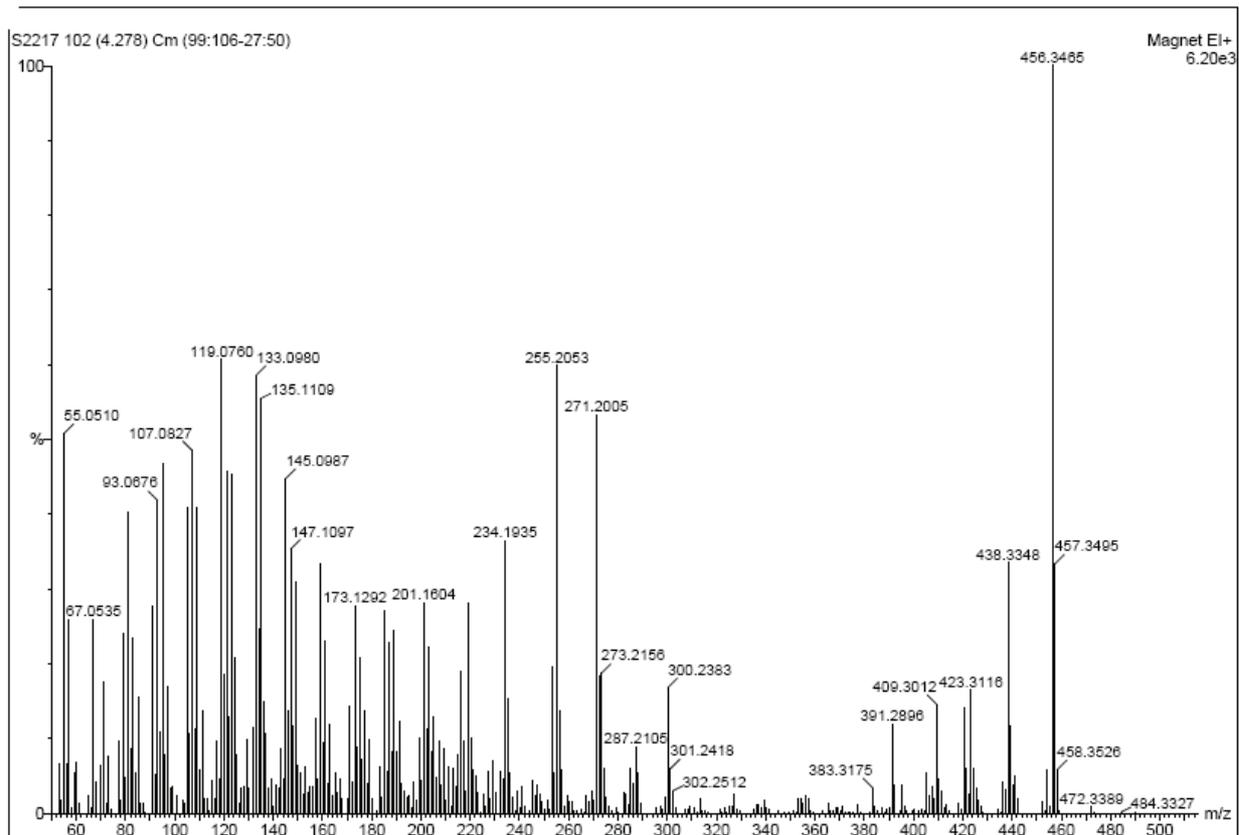
>>> Results <<<

No. of peaks 12		
279.8 nm	0.272	Abs
206.6 nm	2.815	Abs
205.4 nm	2.905	Abs
204.4 nm	3.912	Abs
204.0 nm	4.250	Abs
203.6 nm	3.994	Abs
202.6 nm	4.751	Abs
202.2 nm	4.504	Abs
201.8 nm	2.953	Abs
201.0 nm	-0.703	Abs
200.6 nm	-1.604	Abs
200.2 nm	-1.615	Abs

## 1.2 Espectro IR de H-1



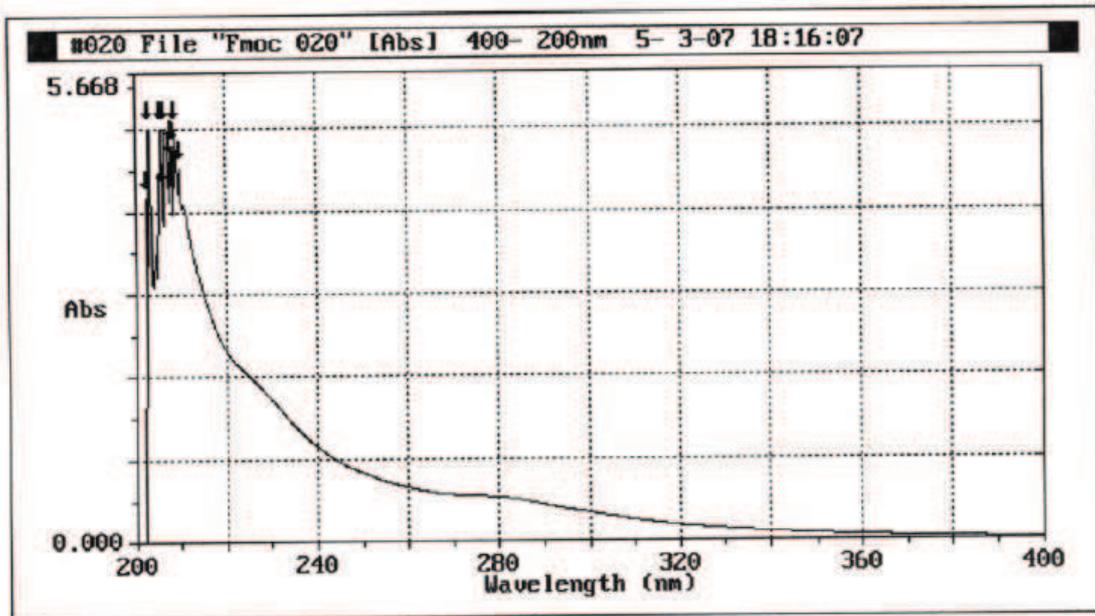
### 1.3 ESPECTRO DE MASAS DE H-1



## ANEXO 2

### 2. DATOS ESPECTRALES DE B-1

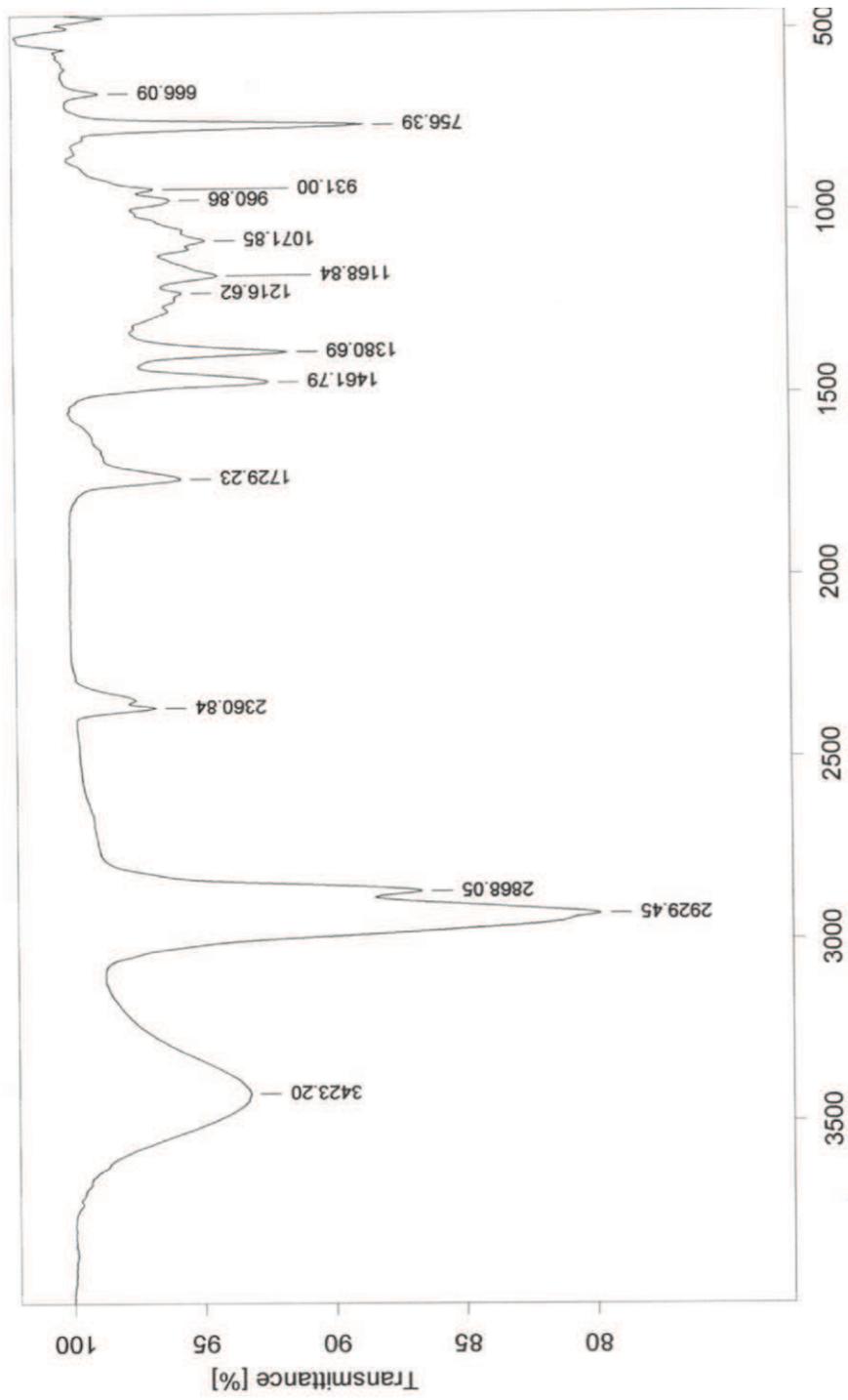
#### 2.1 ESPECTRO UV DE B-1



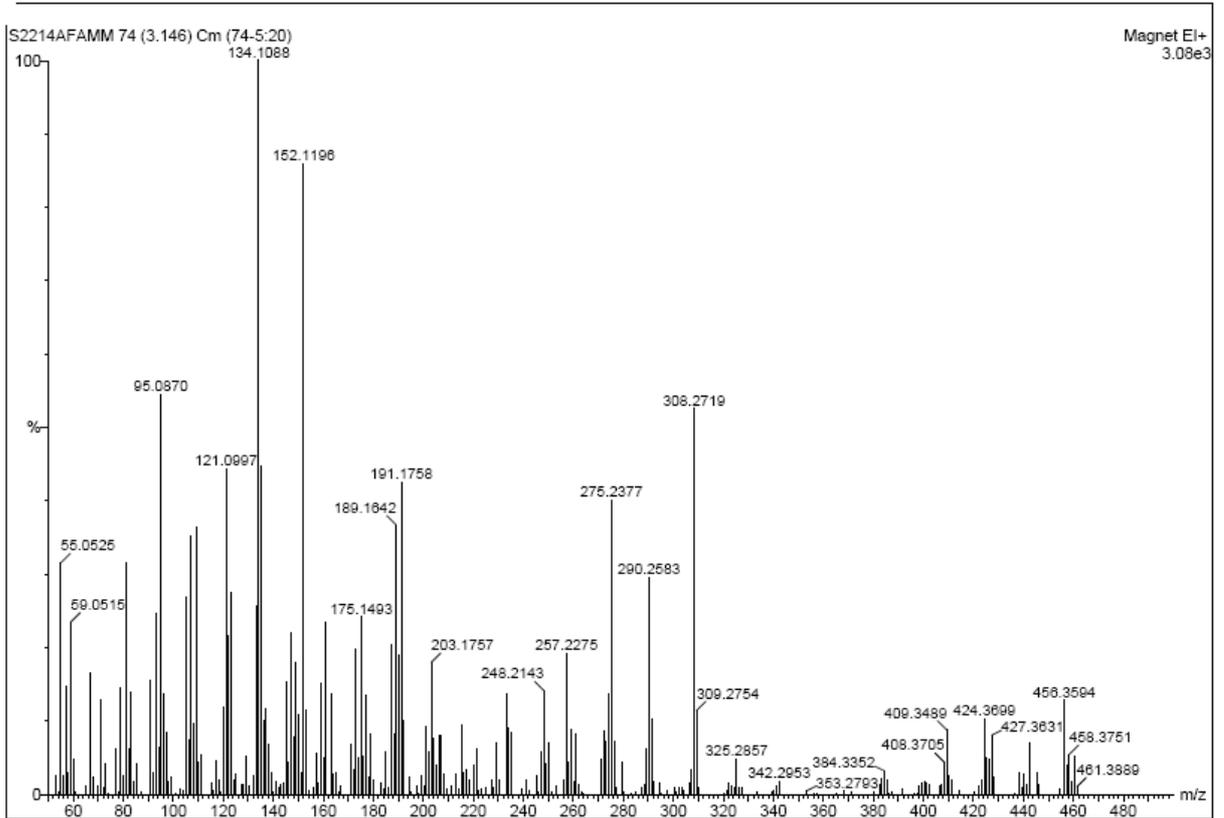
>>> Results <<<

No. of peaks	10
209.8 nm	4.521 Abs
208.8 nm	5.000 Abs
208.4 nm	4.743 Abs
207.8 nm	4.776 Abs
207.4 nm	4.595 Abs
206.4 nm	5.000 Abs
206.0 nm	4.241 Abs
205.4 nm	5.000 Abs
203.0 nm	5.000 Abs
202.6 nm	4.156 Abs

## 2.2 ESPECTRO IR DE B-1



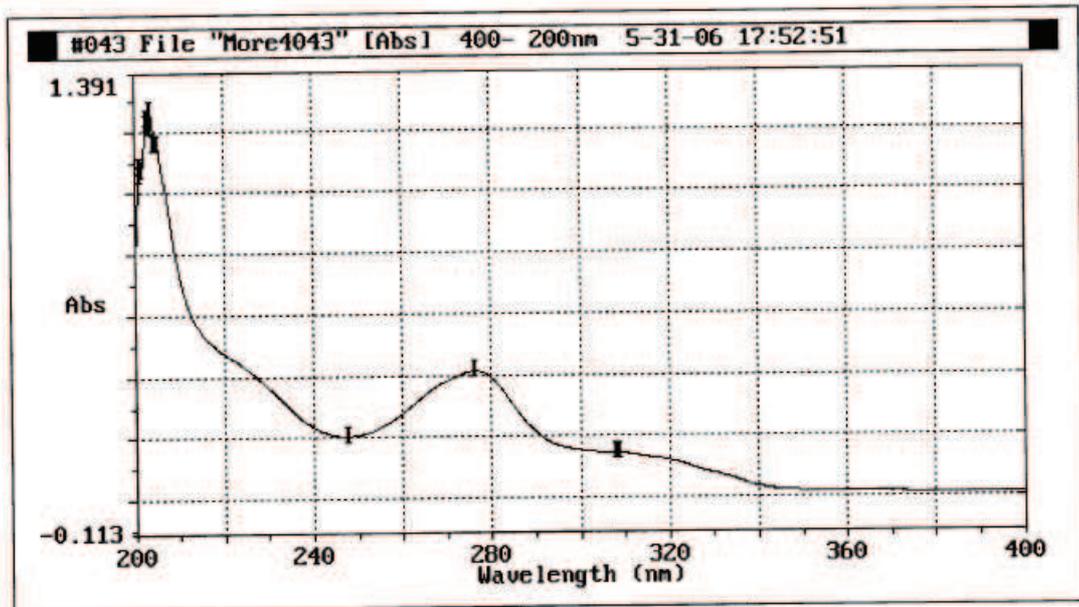
### 2.3 ESPECTRO DE MASAS DE B-1



### ANEXO 3

### 3. DATOS ESPECTRALES DE F-1

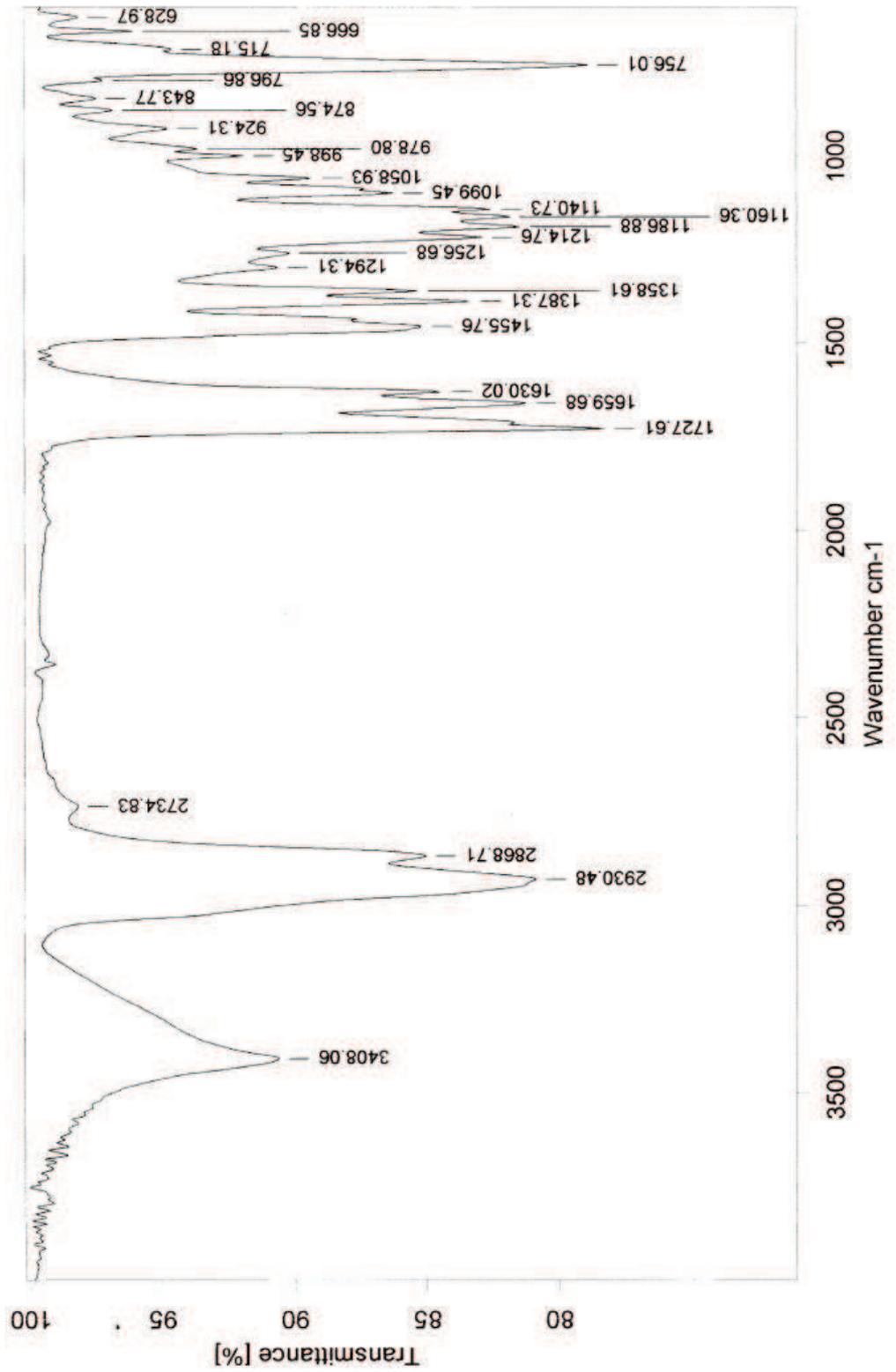
#### 3.1 ESPECTRO UV PARA F-1



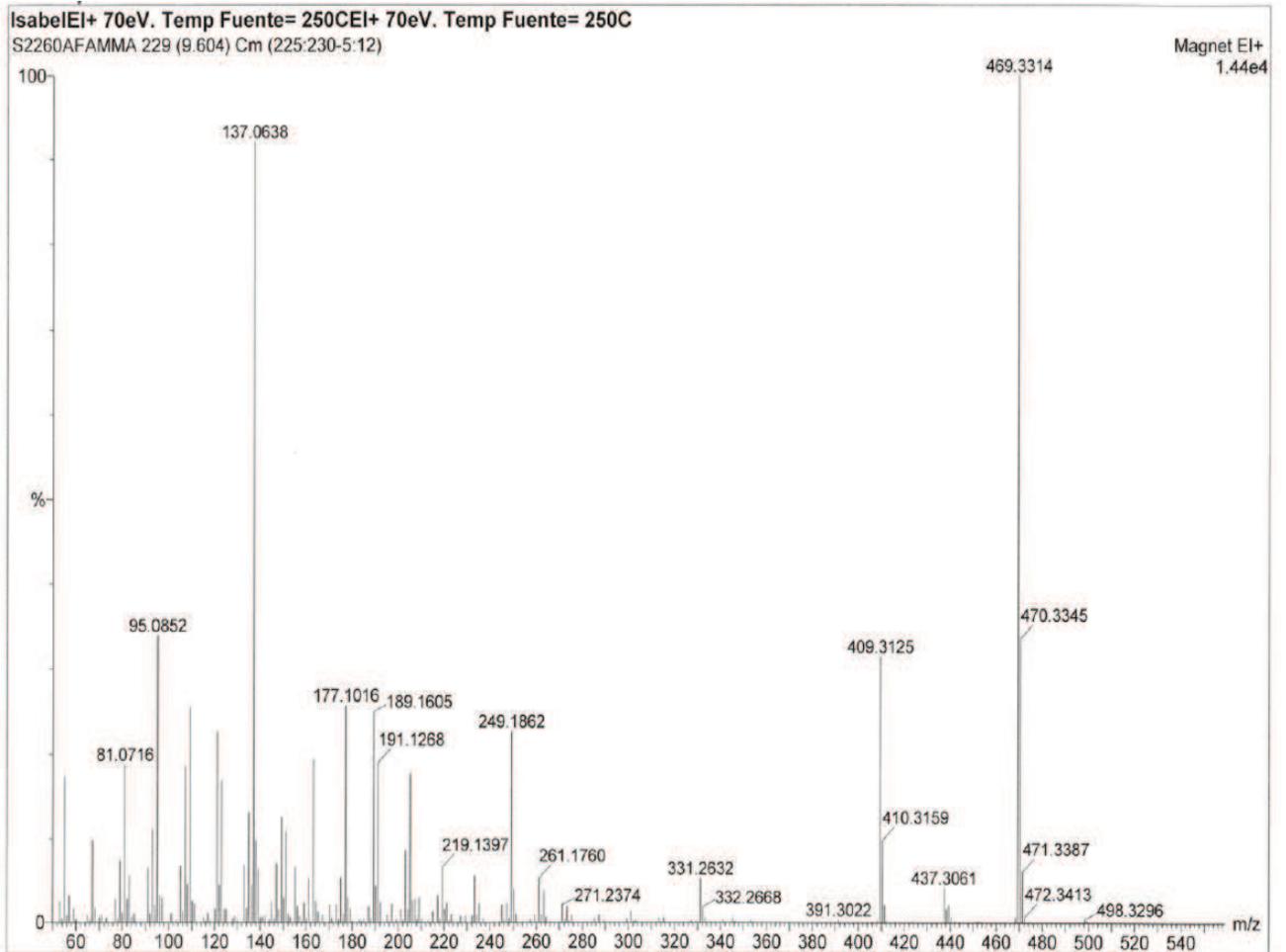
>>> Results <<<

```
No. of peaks 17
308.8 nm 0.147 Abs P
308.0 nm 0.146 Abs V
276.4 nm 0.414 Abs P
247.8 nm 0.204 Abs V
205.2 nm 1.153 Abs P
205.0 nm 1.152 Abs V
204.8 nm 1.156 Abs P
204.6 nm 1.154 Abs V
203.8 nm 1.266 Abs P
203.6 nm 1.211 Abs V
203.4 nm 1.232 Abs P
```

### 3.2 ESPECTRO I.R. DE F-1



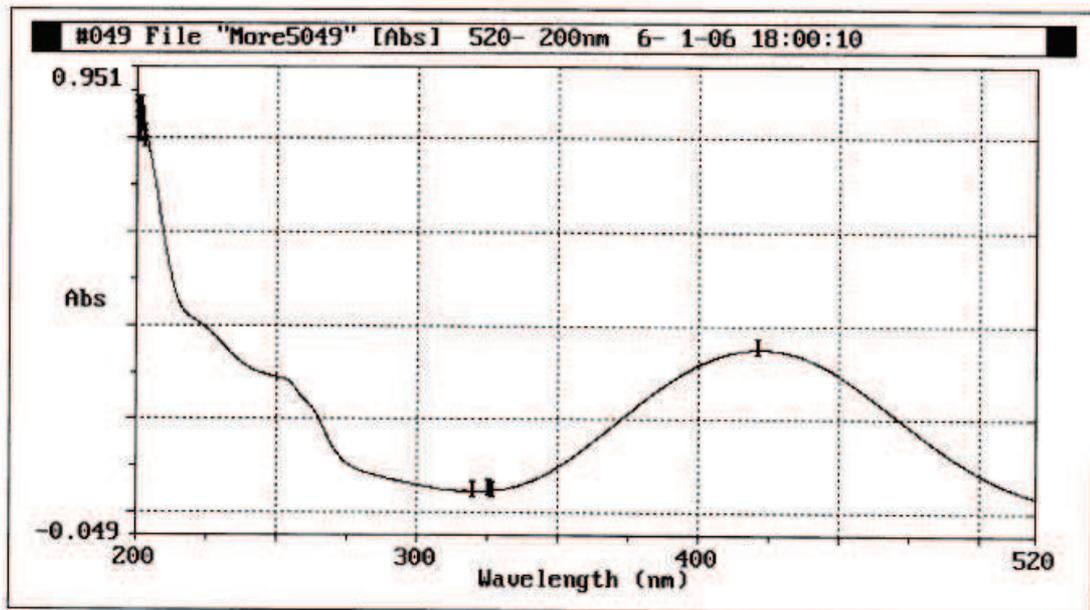
### 3.3 ESPECTRO DE MASAS DE F-1



## ANEXO 4

### 4. DATOS ESPECTRALES DE 20 $\alpha$ HIDROXITINGENONA

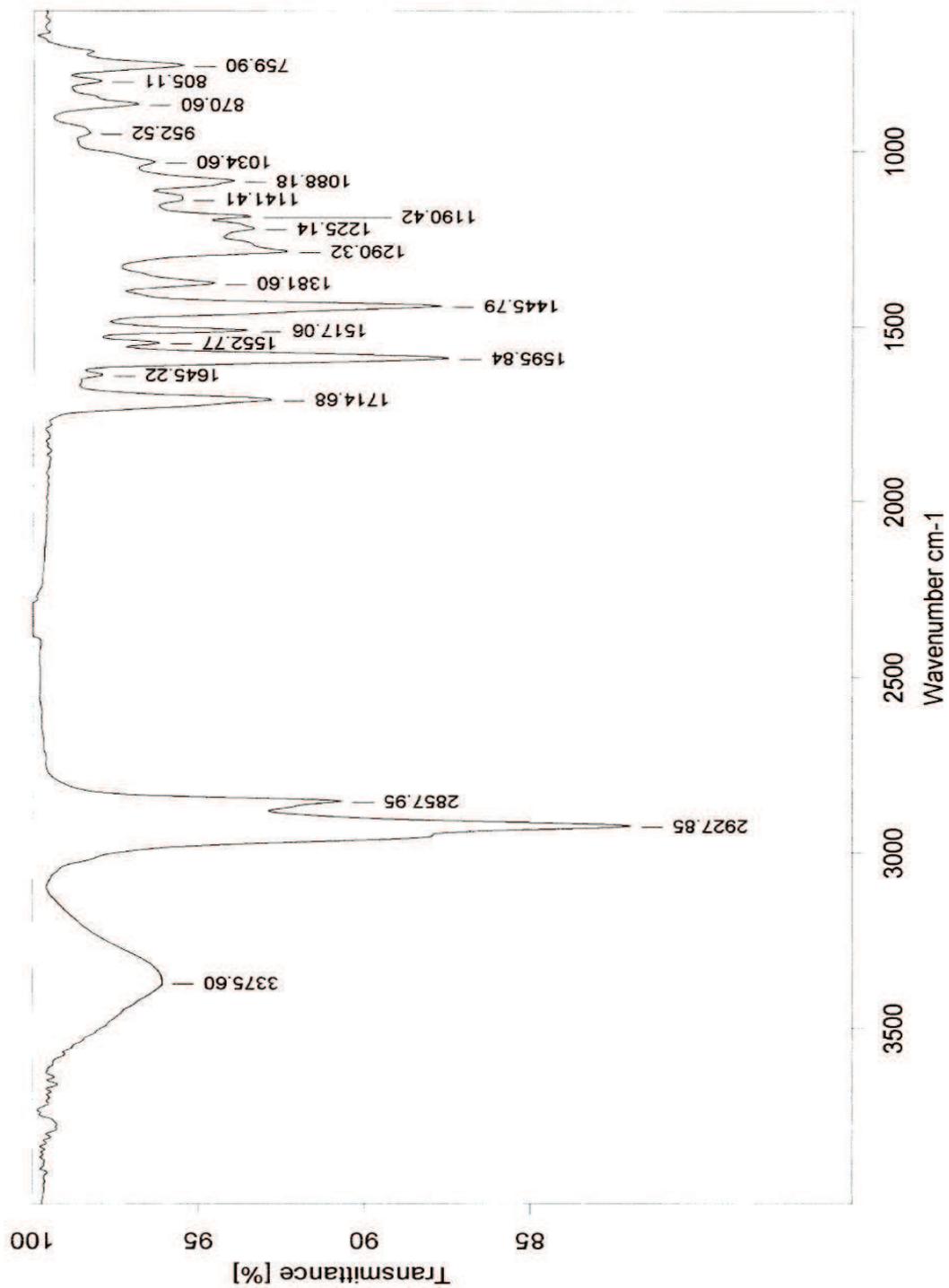
#### 4.1 ESPECTRO UV DE LA 20 $\alpha$ HIDROXITINGENONA



>>> Results <<<

```
No. of peaks 11
421.4 nm 0.350 Abs P
327.2 nm 0.047 Abs V
326.0 nm 0.048 Abs P
320.4 nm 0.046 Abs V
203.6 nm 0.809 Abs P
203.4 nm 0.794 Abs V
202.2 nm 0.867 Abs P
201.6 nm 0.805 Abs V
201.0 nm 0.868 Abs P
200.8 nm 0.853 Abs V
200.6 nm 0.856 Abs P
```

## 4.2 ESPECTRO IR DE LA 20 $\alpha$ HIDROXITINGENONA



### 4.3 ESPECTRO DE MASAS DE LA 20 $\alpha$ HIDROXITINGENONA

