

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



TEMA:

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE TERPENOIDES
DE LA CORTEZA DE COPINOL (*HYMENAEA COURBARIL*).**

PRESENTADO POR:

Br. SAMI ALEXANDER PINEDA MEJÍA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS.

DOCENTES DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE.

Msc. GUILLERMO DÍAZ Crespín.

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO DEL 2016.

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



TEMA:

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE TERPENOIDES
DE LA CORTEZA DE COPINOL (*HYMENAEA COURBARIL*).

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

Br. SAMI ALEXANDER PINEDA MEJÍA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS.

DOCENTES DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

Msc. GUILLERMO DÍAZ Crespín.

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO DEL 2016.

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



TEMA:

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE TERPENOIDES
DE LA CORTEZA DE COPINOL (*HYMENAEA COURBARIL*).

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

Br. SAMI ALEXANDER PINEDA MEJÍA

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS QUÍMICAS.

TRIBUNAL EVALUADOR:

Dr. NÉSTOR ORELLANA VELADO

Msc. BESSY EVELYN GÁLVEZ CARDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO DEL 2016.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

AUTORIDADES:

Lic. LUIS ARGUETA ANTILLÓN.

RECTOR.

Dra. ANA LETICIA DE AMAYA.

SECRETARIA GENERAL

Licda. NORA BEATRIZ MELÉNDEZ.

FISCAL GENERAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

Lic. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA.

DECANO

Lic. DAMARIS MELANY HERRERA TURCIOS.

SECRETARIA

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos muy especiales a la Dra. Ana Estévez Braun y al Dr. Angel Amesty Arrieta del Grupo de investigación de Química y Bioactividad de Compuestos Basados en Productos Naturales del Instituto Universitario de Bio-orgánica “Antonio González” (IUBO), Universidad de La Laguna (Tenerife), por hacer posible la estancia en su laboratorio, durante la cual se realizó la parte experimental, así como los espectros de RMN y espectrometría de masas de los compuestos presentados en este trabajo.

Agradecimientos especiales a mis amigos y asesores Alex Adonaí Osorio Landaverde (aaauuuu, hijo hoy toca el menú de pollo), y a Guillermo Díaz Crespín (memito apúrese, que ya es tarde-usted hijo tiene la culpa de llegar en el momento menos indicado, y soportar ese ambiente toxico de laboratorio), por permitirme trabajar con ellos, y guiarme en este trabajo de investigación. Al Dr. Orellana que con sus bandeadas me impulsaba y no permitía que me estancara, al Dr. Parada que me acepto y brindo la confianza, y por permitirme estar en su changarro. A los docentes que durante el trascurso de este camino me brindaron los conocimientos necesarios para poder llegar hasta aquí.

A mis compañeros de batallas, que brindaban el apoyo para continuar con una lucha incansable; a esos amigos con los que en las tardes de café planeábamos conquistar el mundo como químicos, a todos aquellos con los cuales nos desvelábamos por días para cumplir con las obligaciones de las materias. A esas personas que siempre estuvieron ahí para poder darme una palmadita en la espalda, y escucharme así fuera una loca idea que tuviera.

A esas personas que me brindaban el equipo necesario para poder hacer liberaciones controladas de metabolitos secundarios, se les agradece su arduo trabajo, e incansable disposición. A todos que por alguna razón ya no están acá, pero que en su momento fueron compañeros de lucha.

Gracias.

DEDICATORIA

Al Dios Todopoderoso, que me permitió culminar este proceso, y me regalo vida para poder llegar hasta acá.

A mis padres que siempre han estado para darme el impulso que necesito, por todo su amor y comprensión.

A mis hermanos que me permitieron cumplir este sueño, y que se fajaron para ver este logro.

A mis tios (Angelita y Lito) y mi prima Angelita, gracias por sus palabras de aliento, y apoyo que me brindaron.

A ti, Verónica, que hoy estas en el cielo, y que fuiste como una hermana más, gracias por todo tu amor, y apoyo, estoy seguro que disfrutarás este logro tanto como yo.

A mi esposa Krissia, que has sido y serás mi compañera de batallas, que me apoyaste en todo este proceso, que cuidaste de mí, y me impulsaste para nunca desmayar, por tu amor y comprensión, al tesoro de mi vida Sofía Lissette, que eres el motor que me mueve día a día; eres la razón de ser.

Gracias

INDICE DE CONTENIDOS.

Índice de tablas.

Índice de figuras.

I. INTRODUCCIÓN	<i>i</i>
II. OBJETIVOS	5
Objetivo general.	5
Objetivos específicos.	5
III. MARCO TEÓRICO	6
3.1. METABOLISMO	6
3.2 PRINCIPALES RUTAS BIOSINTÉTICAS	7
3.3 AISLAMIENTO DE PRODUCTOS NATURALES	9
3.3.1 Extracción con disolventes	9
3.3.2 Cromatografía.	9
3.3.2.1 Cromatografía de capa fina analítica, y preparativa.	9
3.3.2.2 Cromatografía en columna (CC)	11
3.3.2.3 Cromatografía de exclusión molecular (CEM)	12
3.4 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.	12
3.4.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	13
3.4.2 COSY (Correlated Spectroscopy).	16
3.4.3 NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).	16
3.4.4 HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence)	17
3.4.5 HMBC (Heteronuclear Multibond Coherence).	17
3.5 GENERALIDADES SOBRE HYMENAEA COURBARIL	17
3.5.1 Usos etnobotánicos.	19
3.5.2 Algunos terpenos aislados de <i>H. courbaril</i> .	20
3.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO BETULÍNICO.	21
3.7 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL B-SITOSTEROL.	25
IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	28
4.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.	28
4.1.2 Proceso de estrujado, secado y separación.	28

4.2 CROMATOGRAFÍA	31
4.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	31
4.2.2. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)	31
4.2.3. Cromatografía en columna (CC)	32
4.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño.	32
4.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	32
4.4 ESPECTROSCOPIA DE MASAS.	33
<i>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA CORTEZA DE HYMENAEA COURBARIL.</i>	35
5.1. AISLAMIENTO DE TRITERPENO DE LA SERIE LUPANO Y EL ESTEROL.	35
5.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.	36
Compuesto 1	36
Compuesto 2.	42
<i>VI. CONCLUSIONES</i>	48

Índice de tablas.

Introducción

Tabla 1. Diferencias entre metabolitos primarios y secundarios	<i>i</i>
Tabla 2. Fármacos derivados de productos naturales aprobados por la FDA durante el periodo 2005-2010	<i>i</i>

Marco teórico.

Tabla 3. Núcleos más comunes usados en RMN y sus propiedades	14
Tabla 4. Experimentos Monodimensionales	16
Tabla 5. Clasificación taxonómica de la familia <i>Fabaceae</i>	19

Procedimiento Experimental

Tabla 6. Sistemas de elución utilizados	30
--	----

Resultados y discusión.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (600 MHz) para C-1 en CDCl ₃	41
Tabla 8. Desplazamientos químicos de RMN- ¹ H (500 MHz) y ¹³ C (600 MHz) para C-2 en CDCl ₃	44

Índice de figuras.

Introducción

Figura 1. Análisis realizado por Newman y *col.* de nuevas entidades químicas aprobadas para su uso clínico entre 1981-2010 i

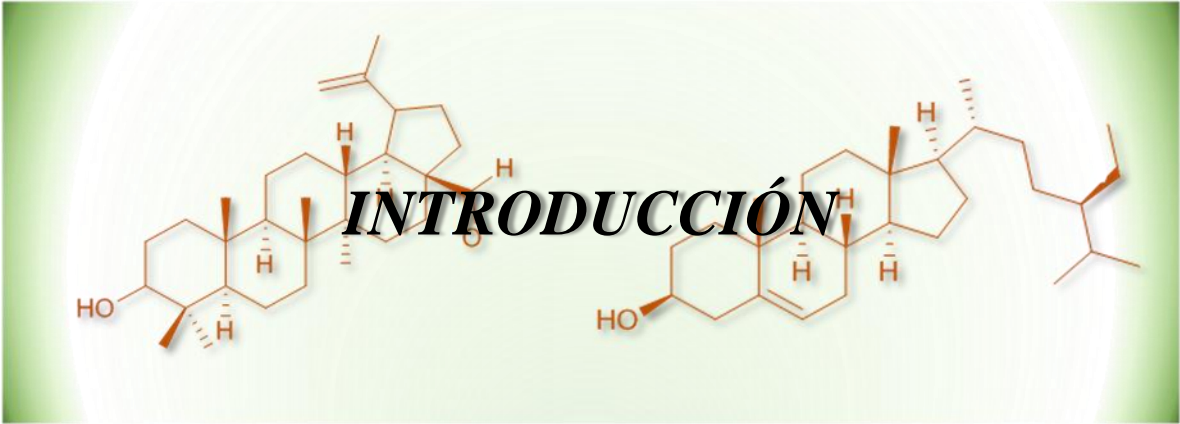
Marco Teórico.

Figura 2. Principales rutas biosintéticas	8
Figura 3. Cromatografía en capa fina	11
Figura 4. Cromatografía en columna	12
Figura 5. Efecto del campo magnético	15
Figura 6. Área de distribución natural de <i>H. Courbaril</i> en América Central	18
Figura 7. Frutos y hojas del copinol	19
Figura 8. Sesquiterpenos a) cariofileno y b) oxido de cariofileno, aislados de las hojas de <i>Hymenaea courbaril</i>	20
Figura 9. Diterpenos de la serie a) <i>ent</i> -clerodano, b) <i>ent</i> -labdano y c) <i>ent</i> -halimano, aislados de <i>Hymenaea courbaril</i>	21
Figura 10. Estructura del ácido betulínico	22
Figura 11. Lupanos con actividad anti-VIH (Bevirimat: compuesto en fase clínica)	24
Figura 12. Derivados 3,28-disustituídos del ácido betulínico con actividad anti VIH	24
Figura 13. Estructura esteroidal de a) colesterol y b) β -sitosterol	25

Procedimiento experimental.

Figura 14. Zona de recolección de la muestra	28
Figura 15. Esquema de separación	29

Figura 16. Terpenos de la serie del lupano aislados de <i>Cassine xylocarpa</i>	36
Figura 17. Espectro de masas de alta resolución del ácido betulínico	37
Figura 18. Propuesta de fraccionamiento del ácido betulínico	37
Figura 19. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de C1	38
Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) y HSQC (600 MHz) de C1	39
Figura 21. Espectro de HSQC editado (600 MHz) de C1	40
Figura 22. Espectro de HMBC (600 MHz) de C1	41
Figura 23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de C2	42
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) de C2	43
Figura 25. Espectro de HSQC (600 MHz) de C2	43
Figura 26. Espectro de masas de alta resolución de β -sitosterol	45
Figura 27. Patrones de fragmentación obtenidos del análisis del espectro de masas del β -sitosterol.	46



I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los siglos, la naturaleza ha dotado al ser humano con los medios para atender las necesidades básicas. Las plantas, en particular, desempeñaron un papel significativo que constituye la base de sistemas de medicina tradicional. Es así como las sustancias químicas derivadas de animales, plantas y microorganismos se han utilizado para tratar enfermedades humanas desde los albores de la medicina.

METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Una de las diferencias entre plantas y animales es su capacidad de síntesis de numerosas y diversas sustancias. Las plantas sintetizan y acumulan sustancias muy variadas como el ADN, ARN, proteínas, polisacáridos, azúcares y lípidos a partir de nutrientes inorgánicos. Las plantas, al igual que los hongos y las bacterias, mediante sus procesos metabólicos sintetizan dos categorías de compuestos orgánicos conocidos como: **Metabolitos primarios y metabolitos secundarios**.¹

Metabolitos primarios.

Los metabolitos primarios, son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta y se encuentran presentes en grandes cantidades, son de fácil aislamiento y su extracción con fines comerciales es relativamente barata.² Entre ellos se encuentran aminoácidos proteicos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, algunos ácidos carboxílicos.

¹ Harborne, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic. San Diego, California. USA. **1982**.

² Petiard, V.; Bariaud-Fontanel, A. El cultivo de células. Mundo Científico 7: 730-736. **1987**.

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios tienen como precursores a los metabolitos primarios, pero su distribución en el reino vegetal es más limitada y para determinados compuestos queda restringida a ciertas especies, por lo tanto es improbable que desarrollen un papel fundamental en el metabolismo primario. En cuanto a su función, podríamos decir que los metabolitos secundarios son una medida de la adecuación de un organismo para la supervivencia en un ecosistema determinado.³

PAPEL FISIOLÓGICO.

Para muchos metabolitos secundarios, aún no está bien determinado su papel fisiológico en el metabolismo de la planta.³ Así, estos compuestos no tienen una función definida en los procesos de respiración, asimilación y transporte, tal como los posee los carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.⁴ En cambio se ha propuesto que los metabolitos secundarios, son el resultado de un proceso evolutivo, que confiere mayor aptitud de supervivencia a los organismos.³ Como su mismo nombre lo indica no son esenciales para la vida como tal, aunque ello no excluye la posibilidad de que puedan ser de gran utilidad para el organismo particular que los produce. Se corresponden con el concepto más restringido de **producto natural**, tal y como suele usarse en la literatura actual.

En la tabla 1 se resumen las principales diferencias entre los metabolitos primarios y secundarios.

³ Harborne, J. B. Recent advances in chemical ecology. Natural Products Reports 6: 85-108. **1989**.

⁴ Taiz, L.; Zeiger, Surface protection and secondary defense compounds. Plant Physiology. 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers. USA. . **1998**.

Tabla 1. Diferencias entre metabolitos primarios y secundarios ³

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Productos del metabolismo general ampliamente distribuidos en plantas y Microorganismos Indispensables para la vida	Productos del metabolismo especial Biosintetizados a partir del metabolismo primario Distribución restringida a ciertas plantas y microorganismos.
Aminoácidos de proteínas, monosacáridos, lípidos, ácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucósidos, etc.	Distribución taxonómica restringida (a veces característico de un género dado o de una especie)
	No indispensables para la vida: alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, cumarinas, etc.

Históricamente, los **productos naturales** han jugado un papel clave en el descubrimiento de nuevos fármacos.⁵ Esto queda reflejado en la gran cantidad de sustancias en evaluación clínica. Así por ejemplo, entre los años 2000 y 2006, se encontraban en alguna etapa de desarrollo clínico 26 productos naturales.⁶

Newman y Cragg publicaron su cuarto análisis sobre nuevas entidades químicas aprobadas para su uso clínico, cubriendo el periodo 1981-2010⁷ como se muestra en la Figura 1.

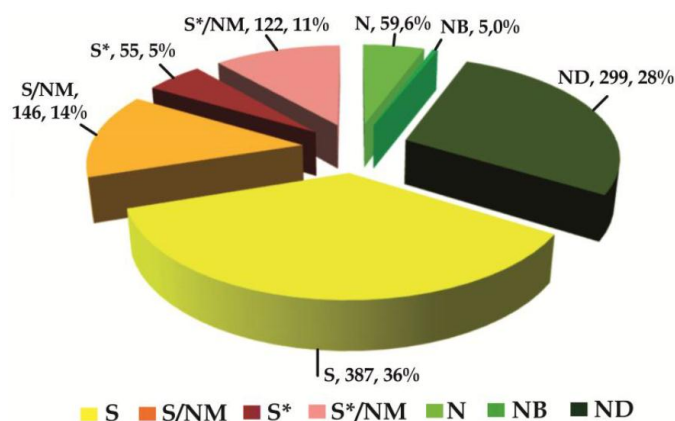


Figura 1. Análisis realizado por Newman y *col.* sobre nuevas entidades químicas aprobadas para su uso clínico entre 1981-2010. N: productos naturales ND: derivado de productos naturales (semisíntesis) S: sintético S*: compuesto sintetizado utilizando un farmacóforo de un producto natural. NM: producto natural mimético (S/NM o S*/NM).

⁵ Cordel, G.A.; Colvard, M.D. *Journal Natural Products*, 75, 514-525. 2012.

⁶ Lachance, H.; Wetzel, S.; Kumar, K.; Waldmann, H. *Journal Medical Chemistry*, 55, 5989-6001. 2012.

⁷ Newman, D.J.; Cragg, G.M. *Journal Natural Products*, 75, 311-335. 2012.

Por tanto, los productos naturales constituyen, sin lugar a dudas, un buen punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos, como se observa en la figura 1, y corresponden al 34% de las nuevas entidades aprobadas para su uso clínico.^{8,9,10.}

También se debe destacar que, entre los años 2005 a 2010, fueron aprobados para su uso en clínica, diecinueve entidades químicas basadas en productos naturales (**Tabla 2**), de los cuales siete corresponden a productos naturales, diez semi-sintéticos y dos compuestos sintéticos derivados de productos naturales.⁸

Bajo estos hechos, normalmente se considera que los productos naturales son *estructuras privilegiadas* que han sido seleccionadas por la evolución, por su capacidad de interaccionar con una amplia variedad de proteínas y otras dianas biológicas. Así mismo, son sustancias que ejercen su función interaccionando con distintos dominios proteicos del entorno celular de las plantas y microorganismos que los producen, con lo cual también pueden ejercer un efecto similar en los humanos.^{9,10}

Esto refleja la importancia del aislamiento e identificación de productos naturales lo cual conduce al descubrimiento de nuevas moléculas para beneficio de la Humanidad.

La presente memoria resume el estudio fitoquímico realizado sobre la corteza del árbol de “copinol” (*Hymenaea courbaril*) colectado en el municipio de Zacatecoluca, departamento de La Paz, El Salvador, Centro América. Para llevar a cabo este estudio se emplearon diversas técnicas cromatográficas. Para su elucidación estructural, se emplearon técnicas espectroscópicas y espectrométricas incluyendo: espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ¹H, ¹³C, y Espectrometría de Masas (EM).

⁸ Mishra, B. B.; Tiwari, V. K. *European Journal Medical Chemistry*, 46, 4769-4807. **2011**.

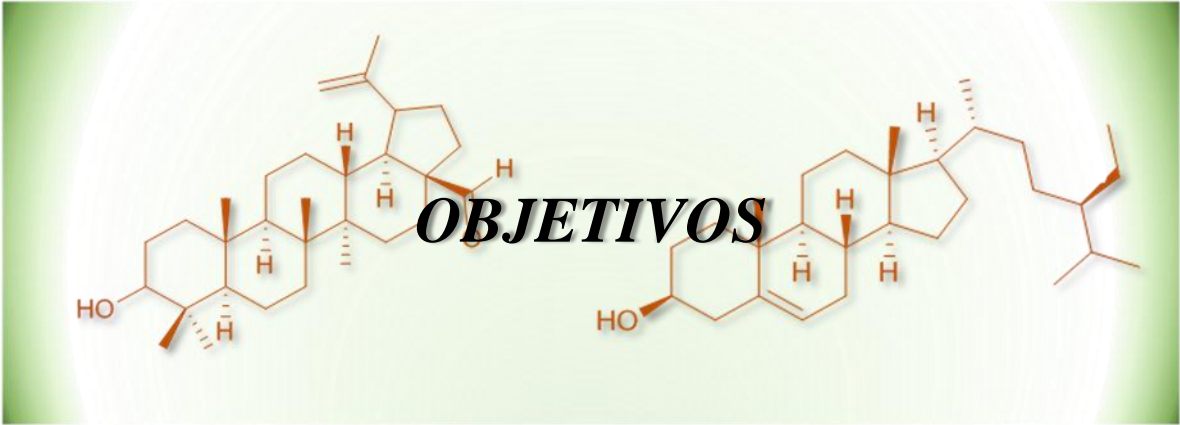
⁹ Kellenberger, E.; Hoffmann, A.; Quinn, R. *Journal Natural Product*, 28, 1483-1492. **2011**.

¹⁰ Vasilevich, N.I.; Kombarov, R.V.; Genis, D.V.; Kirpichenok, M.A. *Journal Medical Chemistry*, 55, 7003-7009. **2012**.

Tabla 2. Fármacos derivados de productos naturales aprobados por la FDA durante el periodo 2005-2010 ⁸

Año	Nombre genérico	Cabeza de serie	Clasificación	Enfermedad
2005	Dronabinol/Cannabidol (Sativex [®])	Dronabinol/Cannabidol	Natural	Dolor
	Fumagilina (Flisint [®])	Fumagilina	Natural	Antiparasitario
	Doripenem (Finibax [®] /Doribax [™])	Tienamicina	Derivado PN	Antibacteriano
	Tigeciclina (Tygacil [®])	Tetraciclina	Semisintético PN	Antibacteriano
	Ziconotida (Priair [®])	Ziconotida	Natural	Dolor
	Zotarolimus (Endeavor [™])	Sirolimus	Semisintético PN	Cardiovascular
2006	Anidulafungina (Eraxis [™] /Ecalta [™])	Equinocandina B	Semisintético PN	Antifúngico
	Exenatida (Byetta [®])	Exenatida-4	Natural	Diabetes
2007	Lisdexanfetamina (Vyvanse [™])	Anfetamina	Derivado PN	ADHD
	Retapamulina (Altanax [™] /Altargo [™])	Pleuromutilina	Semisintético PN	Antibacteriano
	Temsirolimus (Torisel [™])	Sirolimus	Semisintético PN	Oncología
	Trabectedina (Yondelis [™])	Trabectedina	Natural	Oncología
	Ixabepilona (Ixempra [™])	Epotilona B	Semisintético PN	Oncología
2008	Metilnaltrexona (Relistor [®])	Naltrexona	Semisintético PN	Dolor
2009	Everolimus (Afinitor [®])	Sirolimus	Semisintético PN	Oncología
	Telavancina (Vibativ [™])	Vancomicina	Semisintético PN	Antibacteriano
	Romidepsina (Istodax [®])	Romidepsina	Natural	Oncología
	Capsaicina (Qutenza [®])	Capsaicina	Natural	Dolor
2010	Monobactam aztreonam (Cayston [™])	Aztreonam	Semisintético PN	Antibacteriano

ADHD: Déficit de Atención con Hiperactividad. **PN:** Producto Natural.



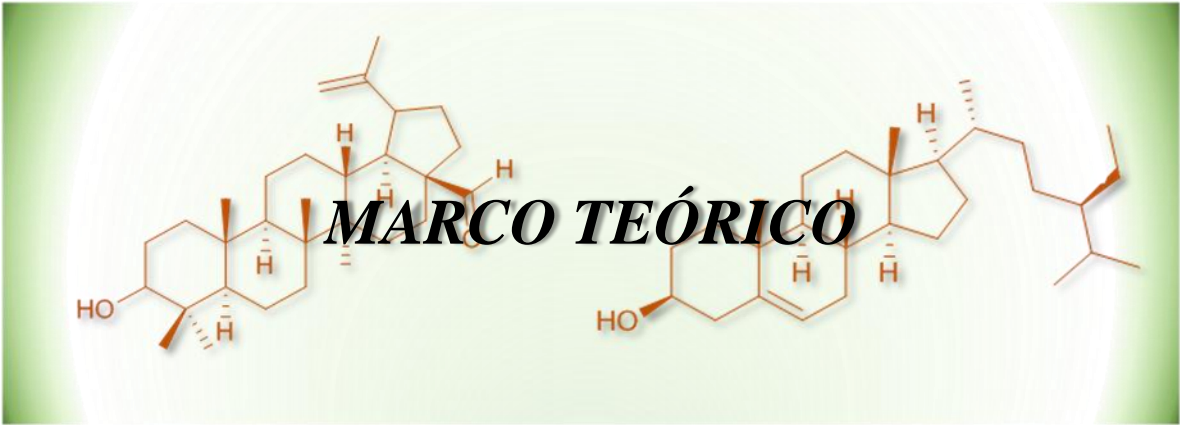
II. Objetivos

Objetivo general.

Aislar e identificar terpenoides de la corteza del árbol de Copinol (*Hymenaea courbaril*).

Objetivos específicos.

- Identificar taxonómicamente, la especie vegetal en el herbario de la Asociación Jardín Botánico La Laguna, Antiguo Cuscatlán, El Salvador.
- Extraer los metabolitos secundarios de la corteza de *Hymenaea courbaril*, empleando métodos de maceración y extracción continua (sistema Soxhlet).
- Obtener el extracto en diclorometano de la corteza de copinol, a fin de separar la mayor cantidad de metabolitos secundarios con diversos grupos funcionales.
- Aislar y purificar terpenoides que contiene el extracto en diclorometano de la corteza de copinol.
- Elucidar la estructura de los terpenos del extracto en diclorometano de la corteza de copinol, mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 1-D y 2-D, y espectrometría de masas.



III. MARCO TEÓRICO.

Los productos naturales son tan antiguos como el hombre. Cuando la especie humana comenzó a explorar todo lo que había a su alrededor, lo más accesible eran los minerales y las plantas. No resulta extraño que, durante siglos, los extractos de plantas fueran la principal fuente de remedios contra dolencias y enfermedades, perfumes, especias, así como pócimas mágicas o filtros de amor, sin olvidar los venenos, ya fueran utilizados para cazar el alimento o para acabar con los enemigos. La química orgánica comenzó como la química de los productos naturales, haciendo posible determinar a qué sustancias se debían atribuir las virtudes medicinales de una determinada especie.¹¹

En las últimas dos décadas se ha producido un renovado interés, lo que algunos denominan renacimiento, en el campo de los productos naturales. Ahora somos plenamente conscientes del valor de la diversidad de estructuras químicas que encontramos en la naturaleza, lo que ha estimulado la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Asimismo, dichos compuestos constituyen herramientas valiosas en bioquímica y biología molecular para explorar los detalles moleculares de la función celular. Mientras que en el pasado eran considerados como meros productos de desecho del metabolismo, actualmente prevalece la idea de que la síntesis de tales compuestos representa una ventaja evolutiva para el organismo que lo produce.¹²

3.1. METABOLISMO

Metabolismo es el conjunto de transformaciones por medio de las cuales un organismo construye sus propias moléculas que lo mantienen vivo. Estas reacciones incluyen la obtención de energía, la síntesis de moléculas, el trabajo mecánico y el transporte de moléculas o iones en el organismo. El metabolismo es un signo inequívoco de vida que se caracteriza por una producción continua de sí misma: auto mantenimiento. Un organismo vivo que metaboliza continuamente, se perpetúa mediante la actividad química, y se construye a sí mismo.^{11, 12.}

¹¹ Ruiz, P. G. *Productos naturales*. Universidad Pública de Navarra. **2002**.

¹² Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons. **2002**.

3.2 PRINCIPALES RUTAS BIOSINTÉTICAS

Los bloques de construcción para los metabolitos secundarios se forman del metabolismo primario. En la figura 2 se muestra cómo los productos del proceso de la fotosíntesis proporcionan los intermedios biosintéticos necesarios. Podemos apreciar que a partir de un número muy limitado de precursores se origina una gran cantidad de compuestos. Es evidente por tanto la interconexión entre productos del metabolismo primario y secundario.¹¹

Los bloques más importantes utilizados en la biosíntesis de metabolitos secundarios derivan de la **acetil-CoA**, que ocupa un lugar central, del **ácido sikímico** (shikimato, en forma ionizada) y el **ácido mevalónico** (o mevalonato) que constituyen las tres principales rutas biosintéticas.¹²

El grupo acetato de la **acetil-CoA** da lugar por condensación a los policétidos que, a su vez, originan ácidos grasos por reducción, antraquinonas por ciclación y otros compuestos que se sitúan en la interfase entre metabolismo primario y el secundario. El **shikimato**, derivado de los carbohidratos, es el compuesto clave para la formación de compuestos aromáticos como ácidos cinámicos, cumarinas, ligninas o aminoácidos aromáticos que son los precursores directos de los alcaloides. El **mevalonato**, formado a partir de tres moléculas de acetil-CoA, da lugar a una serie de compuestos diferente a la de la vía del acetato, como son terpenos y esteroides. Hay grupos de metabolitos que tienen biogénesis mixta, es decir, en su síntesis se combinan elementos de diferentes rutas. Así, por ejemplo, los flavonoides derivan de un policétido (acetato) y del ácido cinámico (sikimato). Esto incrementa la diversidad estructural y hace que las subdivisiones basadas únicamente en las rutas biosintéticas sean más difíciles.¹²

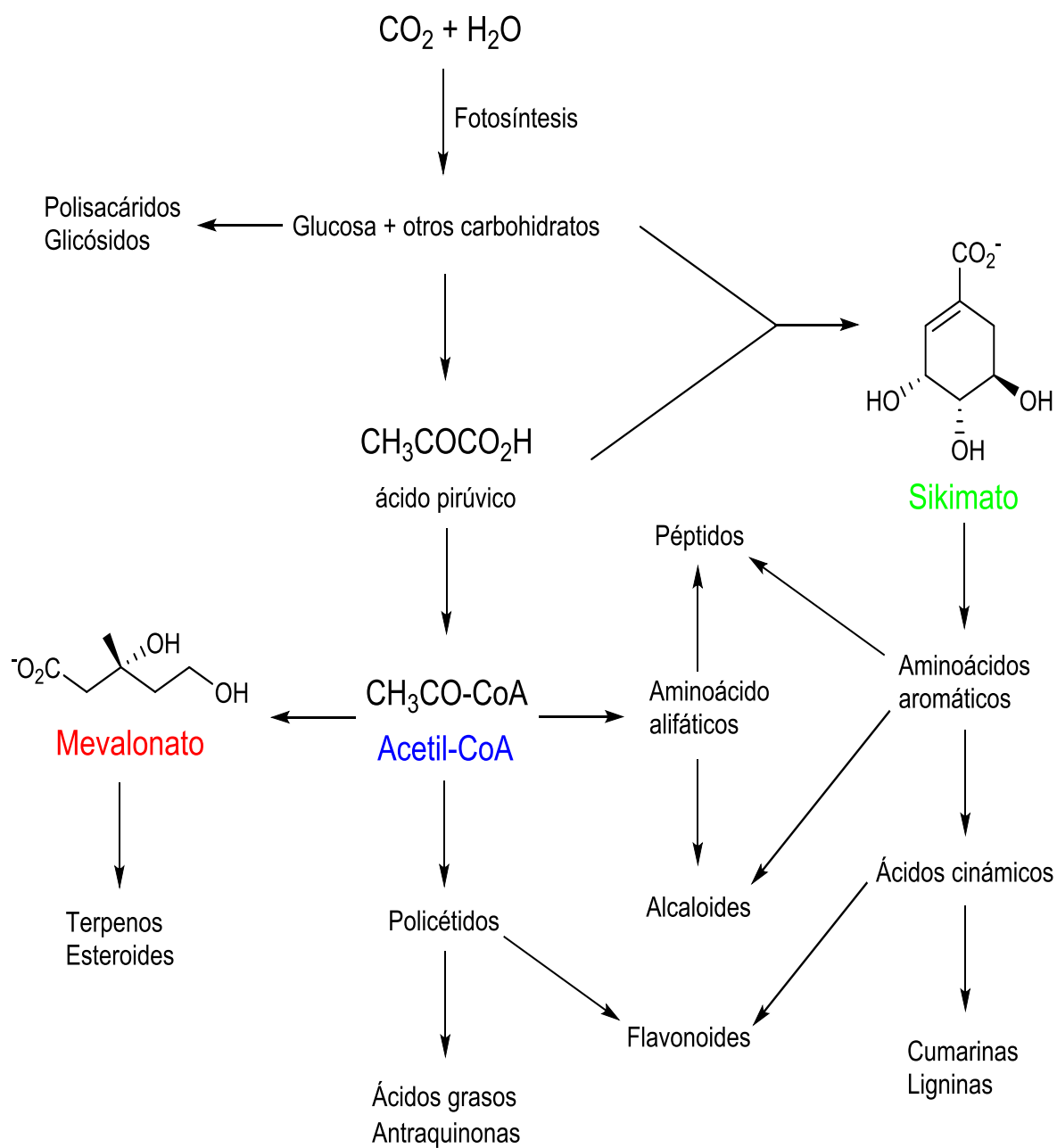


Figura. 2 Principales rutas biosintéticas.

3.3 AISLAMIENTO DE PRODUCTOS NATURALES

3.3.1 Extracción con disolventes

La elección del disolvente a utilizar en una extracción es muy importante ya que para que sea efectiva, se tendrá que asegurar de que en el extracto se encuentre la mayor cantidad de metabolitos. Esto se puede hacer bien mediante una serie de extracciones con disolventes de polaridad variable (algunos de los más empleados, por orden creciente de polaridad son: hexano, diclorometano, acetato de etilo, etanol, metanol y agua.) o, lo que es más común, utilizando un disolvente polar como el metanol o etanol que va a disolver la mayor parte de los compuestos presentes. Una vez realizada la extracción inicial, normalmente todavía hay que enfrentarse a una mezcla compleja. Es por eso que se lleva a cabo una serie de extracciones líquido-líquido con sistemas de disolventes que permitan el reparto o separación de los distintos componentes de la mezcla según su polaridad. ¹³

3.3.2 Cromatografía.

Dependiendo de la naturaleza del compuesto o compuestos a aislar, en numerosas ocasiones a la extracción inicial o después de una extracción líquido-líquido, le sigue una separación basada en métodos cromatográficos. La cromatografía supone, en esencia, la distribución de un compuesto entre una fase móvil (disolvente) y una fase estacionaria (soporte). ¹³

3.3.2.1 Cromatografía de capa fina analítica, y preparativa (CCF y CCFP).

La Cromatografía es definida como una técnica por la cual los componentes de una mezcla son separados en un proceso de migración diferencial dinámico dentro de un sistema, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos los cuales son **retención y desplazamiento**.

Retención es el 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. ¹³ Y el desplazamiento es

el efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico.¹³

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria, luego una fase 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. El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de **elusión**.¹³

La cromatografía en capa fina analítica es una técnica cualitativa que se utiliza con los siguientes fines: Monitoreo de una reacción, identificación de un compuesto, determinación de los componentes de una mezcla, comprobación de la pureza de un compuesto, determinación del disolvente apropiado para llevar a cabo una separación mediante cromatografía preparativa y análisis de las fracciones recogidas en una cromatografía en columna.¹³ 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 lámina metálica.¹³

Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) se emplea en la separación de componentes de una mezcla con el fin no solo de identificarlos, sino de cuantificarlos mediante su recuperación a partir de la placa ó cromatofolio. A diferencia de la cromatografía de capa fina analítica, la cromatografía preparativa se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de mezclas en cantidades comprendidas entre 100 y 200 mg. Este tipo de cromatografía, se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio de 20x20 cm.¹³

En ambos casos 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 (Figura 3). 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, se visualiza bajo una lámpara de luz ultravioleta.¹³

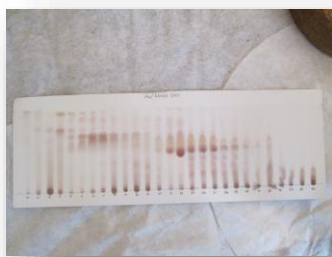


Figura 3. Cromatografía en capa fina.

3.3.2.2 Cromatografía en columna (CC).

Uno de los métodos más utilizados es la cromatografía en columna (CC) (Figura 4) en la que se introduce en una columna de vidrio un sólido adsorbente (fase estacionaria) normalmente gel de sílice, se añade la muestra a separar y se deja circular el eluyente (fase móvil) que, en la mayor parte de los casos consiste en una mezcla de dos disolventes de distinta polaridad. Los componentes se separan según la distinta retención en la fase estacionaria, lo que a su vez viene determinado por la polaridad del compuesto: los más polares quedan más retenidos y serán eluidos más tarde de la columna, recogándose por tanto en las últimas fracciones.¹³

¹³ Rubinson, K.A., Rubinson, J.F., *Análisis Instrumental*, Edición en español., Pearson Educación, S.A., Madrid, 2001.



Figura 4. Cromatografía en columna.

3.3.2.3 Cromatografía de exclusión molecular (CEM).

Este tipo de cromatografía está exenta de interacciones entre la fase estacionaria y el soluto.

La fase móvil pasa por la fase estacionaria, ocurriendo la separación debido a la diferencia de tamaño de las moléculas que componen la mezcla. Las moléculas de menor tamaño son retenidas en los poros que conforman la fase estacionaria, eluyendo primero las moléculas de mayor tamaño. El tamaño del poro puede ser controlado según la resina que se emplea en la elaboración de la fase estacionaria.¹³

3.4 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL.

Una vez purificados los metabolitos aislados se lleva a cabo la determinación de la estructura del compuesto puro. La complejidad estructural de los productos naturales ha tenido mucho que ver en el desarrollo de los métodos espectroscópicos de elucidación estructural. Las principales técnicas que forman la base de análisis estructural moderno son: espectroscopia ultravioleta (**UV**) e Infrarrojo (**IR**), Espectrometría de masa (**EM**) y espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (**RMN**).¹¹

Considerando el hecho de que la RMN se ha convertido en una técnica absolutamente imprescindible en la investigación de los productos naturales, es conveniente definir algunos

conceptos básicos de esta herramienta y de los diferentes experimentos realizados en el desarrollo de este trabajo.

3.4.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopia de RMN es una técnica que proporciona información estructural y estereoquímica de gran interés en un espacio de tiempo relativamente corto. Se trata de una técnica no destructiva que estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen *spin* nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo.¹⁴

El hecho de que ciertos núcleos posean número cuántico de spin distinto de cero y momento magnético, hacen que estos núcleos cuando son sometidos a un campo magnético externo sufran una división de sus niveles de energía.¹⁴

Los electrones, neutrones y protones, los tres tipos de partículas que constituyen el átomo, tienen una propiedad intrínseca que se llama espín. El espín aparece de forma natural como un cuarto número cuántico de la función de onda cuando se resuelve la ecuación de Schrödinger incluyendo el efecto relativista.¹⁴

El espín representa una propiedad general de las partículas que puede entenderse fácilmente por analogía con las propiedades de los electrones. Es sabido que los electrones que circulan por una bobina generan un campo magnético en una determinada dirección. De manera análoga, los electrones del átomo circulan alrededor del núcleo y generan un campo magnético que llevara asociado un determinado momento angular. Existe un momento angular asociado a la partícula misma; ya se trate del electrón, protón y neutrón, y éste se describe mediante el número cuántico de espín que, puede tomar valores de $+1/2$ y $-1/2$.

De particular interés para la Resonancia Magnética Nuclear es el espín de los protones y neutrones del núcleo atómico. En el núcleo atómico, cada protón se puede aparear con otro protón con espín antiparalelo (algo análogo a los que sucede con los electrones en los enlaces químicos). Los neutrones también pueden hacerlo. Los pares de partículas que resultan de

combinar un espín de signo positivo con otro negativo, da como resultado un espín neto de valor cero. Por esta razón núcleos con número de protones y neutrones impar dan lugar a un espín neto, donde el número de desapareamientos contribuye con $\frac{1}{2}$ al **total del número cuántico de espín nuclear**, denominado ***I***, por tanto entre los elementos de la Tabla Periódica, cada isótopo de un determinado átomo, dependiendo de cuál sea el número de protones y neutrones del núcleo, va a tener un determinado valor de ***I***.¹⁴

Entre los núcleos activos en RMN los más interesantes son aquellos cuyo número cuántico de spin (*I*) es igual a $\frac{1}{2}$. En la tabla 3 se pueden observar algunos núcleos comunes y algunas de sus propiedades.¹⁵

Tabla 3. Núcleos más comunes usados en RMN y sus propiedades.

NÚCLEOS	SPIN	ABUNDANCIA ISOTÓPICA	SENSIBILIDAD*
¹ H	1/2	99.98	1.000
¹³ C	1/2	1.11	0.00018
¹⁴ N	1	99.63	0.001
¹⁹ F	1/2	100	0.833
³¹ P	1/2	100	0.066
³³ S	3/2	7.67	0.002

*Sensibilidad relativa con respecto a un número igual de protones en un campo constante.¹¹

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la figura 5, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .¹⁵

¹⁴ L.G. Wade Jr. *Química Orgánica.*, Quinta Edición, Pearson Educación, S.A., Madrid, **2004**

¹⁵ Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis, 2 edición, **2005**.

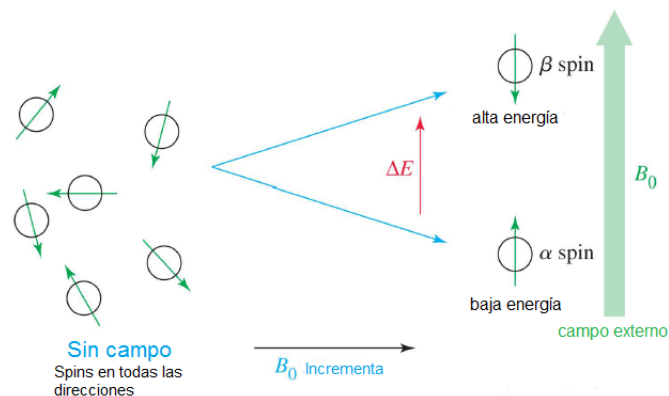


Figura 5. Efecto del campo magnético

La diferencia de energía es directamente proporcional al campo magnético externo:

$$\Delta E = h \nu = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde γ es la razón giromagnética, es una constante característica para cada núcleo (por ejemplo, $26,753 \text{ s}^{-1}\text{gauss}^{-1}$ para ^1H).¹⁵

Los desplazamientos químicos observados en un espectro de RMN de ^1H para los diferentes núcleos que componen una molécula, se deben a los distintos entornos electrónicos en que se encuentran esos núcleos.

Donde σ es llamada **constante de apantallamiento** o parámetro protector; σ es adimensional y aparece e influye en la condición de resonancia. Cuanto más apantallado se encuentra un núcleo, mayor es σ .¹⁵ Como se muestra en la siguiente ecuación.

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad (\text{Ec.2})$$

Para representar el desplazamiento químico, se usa una escala arbitraria, en la cual la sustancia de referencia es normalmente tetramétilsilano (TMS) para establecer el cero de la escala. La escala, llamada delta (δ) que equivale a una parte por millón (ppm) de la frecuencia de funcionamiento del espectrómetro¹⁵, esta se puede definir como:

$$\delta = \frac{\text{desplazamiento químico observado (Hz)}}{\text{Frecuencia del espectrómetro en MHz}} \quad (\text{Ec.3})$$

En el caso de RMN de ^1H , la escala va de 0 a 10 ppm, y para ^{13}C , de 1 a 220. Es importante notar que, puesto que la escala es *relativa*, no cambiará aunque cambie la frecuencia de operación del instrumento.¹⁵

A continuación en la tabla 4, se resume la información general que aportan los experimentos de ^1H y para ^{13}C , llamados experimentos monodimensionales.

Tabla 4. Experimentos Monodimensionales

EXPERIMENTO	INFORMACIÓN	CONCLUSIONES
RMN ^1H	Valor del desplazamiento químico (en ppm), la multiplicidad de cada señal, y la constante de acoplamiento para cada hidrógeno,	Permite relacionar estrechamente cada protón con los átomos de carbono adyacentes.
RMN ^{13}C	Evidencia todos los carbonos de la molécula.	Hibridación de cada átomo de carbono, así como su funcionalización.

3.4.2 COSY (Correlated Spectroscopy).

Proporciona un medio de identificación de protones entre si y a la vez una forma muy eficaz en establecer conectividades cuando un gran número de redes de acoplamiento deben ser identificados. El experimento **COSY** determina las correlaciones escalares a dos y a tres enlaces de distancia entre los núcleos que se acoplan escalarmente. El experimento se utiliza para identificar núcleos que comparten un acoplamiento escalar (J).¹⁵

3.4.3 NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

Además de los desplazamientos químicos y de los acoplamientos escalares existe un efecto muy importante para la determinación de estructuras mediante RMN, el llamado Efecto Nuclear Overhauser (**NOE**). Es una interacción a través del espacio mediante la cual cambia

la intensidad de la señal de un determinado núcleo cuando se irradia otro núcleo vecino (cercano en el espacio). El **NOE** es una interacción dipolo-dipolo que nos permite medir distancias interatómicas de pocos Å.¹⁵

3.4.4 HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

El espectro **HSQC** es bidimensional y presenta un eje para ¹H y el otro para ¹³C o ¹⁵N, los cuales son los heteronúcleos mayoritariamente utilizados. Los espectros contienen una señal para cada único protón unido al heteronúcleo considerado (¹J_{H-C} o ¹J_{H-N}). Así, si el desplazamiento químico de un protón específico es conocido, el desplazamiento químico del heteronúcleo acoplado puede ser determinado, y viceversa.¹⁵

3.4.5 HMBC (Heteronuclear Multibond Coherence).

Los experimentos **HMBC** se encuentran entre las principales herramientas de RMN bidimensional para realizar elucidación estructural. Las principales aplicaciones incluyen la asignación de las resonancias de los núcleos carbono o nitrógeno no protonados y la correlación a larga distancia (2 y 3 enlaces) de carbonos protonados que están separados por carbonos no protonados o por otros heteronúcleos. Así, este método muestra la detección de los acoplamientos de tipo ^{2y3}J_{H-C} o ^{2y3}J_{H-N}.¹⁵

3.5 GENERALIDADES SOBRE HYMENAEA COURBARIL

Hymenaea courbaril, nombre común guapinol o copinol, jatobá, Algarrobo, es un árbol de la familia Caesalpiniaceae.¹⁶ El Copinol del género Hymenaea, tiene una amplia distribución. Desde el sur de México, a lo largo de América Central, hasta Perú, Bolivia, Brasil y Guayana Francesa. En las Antillas, desde Cuba y Jamaica hasta Trinidad y Tobago (Figura 6). Plantada a nivel experimental en Honduras y Costa Rica.¹⁶

¹⁶ Aidar M.P.M., Martínez C. A., Costa A. C., Costa P. M. F., Dietrich S. M. C., Buckeridge M. S. *Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, Hymenaea courbaril L. (Leguminosae, Caesalpinioideae).* Biota Neotropica. **2002.**



Figura 6. Área de distribución natural de *H. Courbaril* en la América Central.

La corteza es pardo rojiza con manchas blancuzcas horizontales amorfas, ramifica a partir de la mitad del fuste y tiene ramas muy retorcidas. Posee hojas bifolioladas, alternas, asimétricas, con puntos translúcidos y una venación poco prominente. Los frutos son tipo legumbre con una cáscara leñosa muy dura, pero entre la cáscara y las semillas tiene un polvo blanco que los indígenas usaron como ingrediente en la elaboración de la mazamorra, una comida típica hecha con maíz blanco partido y hervido, que se come fría o caliente, y que puede aderezarse con leche, azúcar o miel.¹⁶

Los frutos de *Hymenaea courbaril* miden unos 13 cm de largo por 6 de ancho, y se les puede ver maduros colgando en el árbol por un periodo prolongado, tiene flores blancas (Figura 7).¹⁷

La clasificación taxonómica de esta familia se presenta a continuación (Tabla 5):

¹⁷ Lee Y.T.; Langenheim, J.H. *Additional new taxa and new combinations in Hymenaea (Leguminosae, Caesalpinioideae)*. Journal of the Arnold Arboretum. 55(3): 441-452. **1974**

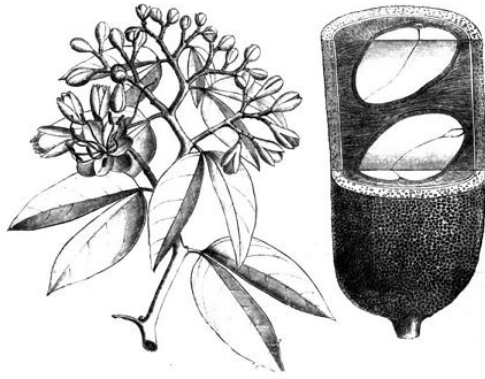


Figura 7. Frutos y hojas del copinol.

Tabla 5. Clasificación taxonómica de la familia *Fabaceae*.¹⁷

<i>Reino:</i>	<i>Plantae</i>
<i>División:</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase:</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Orden:</i>	<i>Fabales</i>
<i>Familia:</i>	<i>Fabaceae</i>
<i>Subfamilia:</i>	<i>Caesalpinioideae</i>
<i>Tribu:</i>	<i>Detarieae</i>
<i>Género:</i>	<i>Hymenaea</i>
<i>Especie:</i>	<i>H. Courbaril</i>

H. courbaril es una especie caducifolia, aunque en ocasiones muestra comportamiento “siempre verde”, característica de los bosques secos hasta húmedos, con precipitaciones anuales de 800 a 4000 mm, temperaturas desde 20 a 30°C. Crece con preferencia a lo largo de bosques riparios, en sitios hasta con pendientes fuertes, a altitudes desde cerca del nivel del mar hasta 1300 msnm. Se desarrolla mejor en suelos profundos, arenosos, fértiles y bien drenados, con pH de 4.8 a 6.8, aunque se le puede encontrar en una amplia variedad de suelos, incluso arcillosos, siempre que no sean demasiado húmedos¹⁸.

3.5.1 Usos etnobotánicos.

El árbol de copinol ha sido muy valorado por sus propiedades medicinales. El tronco exuda una resina que se emplea en el tratamiento de heridas, bronquitis y malestares estomacales.¹⁹ Sus frutos producen harina con alto contenido en proteínas y fibra.²⁰ Así también, se ha reportado actividad antiinflamatoria del extracto hidro-alcohólico de la corteza.²¹ La corteza

¹⁸ *Sytematics of the Genus Hymenaea L, Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae.* University of California Publications in Botany 69.

¹⁹ a) Marsaioli, A. J.; Leitao Filho, H. F.; de Campello. *Diterpenes in bark of Hymenaea courbaril. Phytochemistry, 14,* 1882-1883. **1975.** b) Correa, M .P. *Diccionario de Plantas Úteis do Brasil.* Ministerio de Agricultura, IBDF. Imprenta Nacional, Rio de Janeiro, pp. 593-599. **1984.**

²⁰ Chang, Y. K.; Silva, M. R.; Gutkoski, L. C.; Sebio, L.; Da Silva, M. A. A. P. *Development of extruded snacks using jatobá (Hymenaea stigonocarpa Mart) flour and cassava starch blends. Journal of the Science of Food and Agriculture.* 78, 59–66. **1998.**

²¹ Neves, M. C. A.; Neves, P. C. A.; Zanini, J. C.; Medeiros, Y. S.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Analgesic and antiinflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of Hymenaea martiana. Phytotherapy Research.* 7, 356-362. **1993.**

ha sido usada para tratar la diarrea, disentería, úlceras estomacales y alimento para niños.¹⁹

En América Central se utiliza como desparasitante, problemas de hipertensión y reumatismo. Se dice que es un buen sustituto de la quinina, y aparentemente puede emplearse en el combate contra la malaria.¹⁹

3.5.2 Algunos terpenos aislados de *H. courbaril*.

De las investigaciones realizadas por Stubblebine y Langenheim, se determinó que el exudado de la corteza del árbol, contiene cariofileno y β -selineno los cuales presentan actividad insecticida contra las larvas de *Spodoptera exigua*.²²

Además Arrhenius y Langenheim, encontraron que el **óxido de cariofileno** presente en la resina *H. courbaril*, es un potente inhibidor de crecimiento de varias especies del hongo *Pestalotiopsis*, lo cual, lo convierte en un agente antifúngico de amplio espectro.²³ Así mismo se ha determinado que el óxido de cariofileno (Figura. 8), también funciona como agente defensivo contra las hormigas cortadoras de hojas de *H. Courbaril*, ya que inhibe el crecimiento de los hongos que ellas cultivan para alimentarse.²⁴



Figura 8. Sesquiterpenos a) **cariofileno** y b) **óxido de cariofileno**, aislados de las hojas de *Hymenaea courbaril*.

²² Stubblebine, W. H., and J. H. Langenheim. *Effects of Hymenaea courbaril leaf resin on the generalist herbivore Spodoptera exigua (beet army worm)*. *Journal of Chemical Ecology*. 3, 633-647. **1977**.

²³ a) Arrhenius, S. P. and J. H. Langenheim. *Inhibitory effects of Hymenaea and Copaifera leaf resins on the leaf fungus Pestalotia subcuticularis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 11, 361-366. **1983**. b) Arrhenius, S. P., and J. H. Langenheim. *The association of Pestalotia on the leguminous tree genera Hymenaea and Copaifera in the Neotropics*. *Mycologia*. 78, 673-676. **1986**.

²⁴ Hubbell, S.; D. F. Weimer and A. Adejare. *An antifungal terpenoid defends a Neotropical tree (Hymenaea) against attack by a fungus-growing ant (Atta)*. *Oecologia*. 60, 321-327. **1983**.

Estudios fitoquímicos posteriores, han determinado que los extractos alcohólicos de las hojas, resina y corteza del tronco de *Hymenaea*, producen principalmente sesquiterpenos de la serie **cariofilano**, diterpenos de la serie **ent-clerodano** diterpenos de la serie **ent-labdano** (Figura. 9).²⁵ También se han aislado diterpenos de tipo **ent-halimano** de la resina de las vainas.²⁶ Normalmente, los diterpenos de la resina polimerizan al contacto con el aire, lo que la convierte en un excelente sellador de fisuras, así como fuente de ámbar.

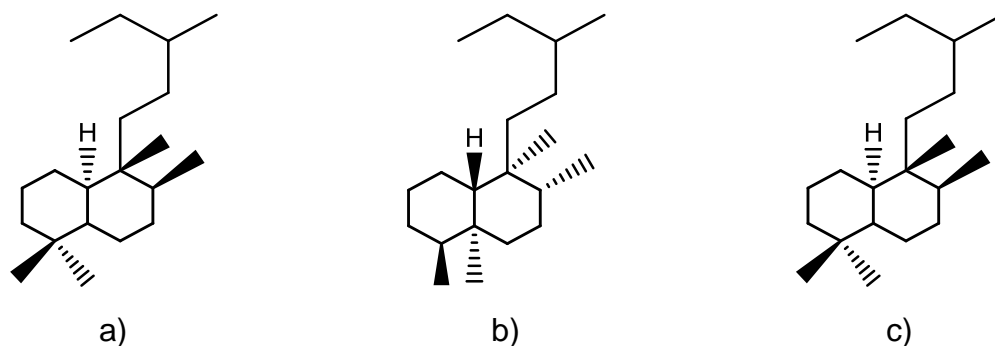


Figura 9. Diterpenos de la serie a) *ent-clerodano*, b) *ent-labdano* y c) *ent-halimano*, aislados de *Hymenaea courbaril*.

3.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO BETULÍNICO.

Por otra parte, se ha reportado el aislamiento del **ácido betulínico** (Figura 10), un triterpeno pentacíclico que posee un amplio espectro de actividades biológicas algunas de las cuales pueden ser utilizadas medicamente en el tratamiento del VIH.²⁷

²⁵ a) Nakano, T.; Djerassi, C. *Terpenoids. XLVI. Copalic acid. Journal of Organic Chemistry.* 26, 167-173. **1961.** b) Cunningham, A.; Martin, S. S.; Langenheim, J. H. *Resin acids from two Amazonian species of Hymenaea. Phytochemistry.* 12, 633-635. **1973.** c) Cunningham, A.; Martin, S. S.; Langenheim, J. H. *Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in trunk resin of Amazonian Hymenaea courbaril. Phytochemistry.* 13, 294-295. **1974.**

²⁶ a) Imamura, P. M.; Marsaioli, A. J.; Barata, L. E. S.; Rúveda, E. A. ¹³C NMR spectral analysis of Eperuane diterpenes. *Phytochemistry.* 16, 1842-1844. **1977.** b) Khoo, S. F.; Oehlschlager, A. C.; Ourisson, G. *Structure and stereochemistry of the diterpenes of Hymenaea courbaril (Caesalpinioideae) seed pod resin. Tetrahedron.* 29, 3379-3388. **1973.**

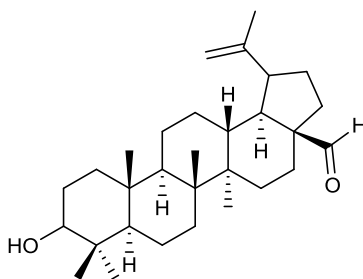


Figura 10. Estructura del ácido betulínico.

El potencial terapéutico de los compuestos pertenecientes a este grupo como lo son lupeol, betuli y ácido betulínico, ha sido muy estudiada en los últimos años. El ácido betulínico es un compuesto especialmente prometedor. Este triterpeno es capaz de inducir apoptosis en células cancerígenas. Debido a su aparente especificidad por las células del melanoma, el ácido betulínico parece ser un anticancerígeno más prometedor que drogas tales como el taxól.²⁷ Sus principales fuentes se encuentran en las plantas de la familia *Betulaceae* como lo son la *Betula alba*, *betula péndula*; así también en la *Hymenaea Courbaril*.²⁸

Una propiedad interesante del ácido betulínico, desde el punto de vista clínico es el aumento de la efectividad a pH menor de 6.8, lo cual ocurre en la mayoría de tumores.²⁹

Las células cancerosas que sufren hiperplasia muestran una elevada sensibilidad al ácido betulínico, mientras que la sensibilidad en células no cancerosas permanece sin cambios. Esta característica hace que el ácido betulínico, único en comparación con otros compuestos que son normalmente utilizados en terapias cancerígenas tales como el taxól, camptotecina, etoposido, vinblastina o vincristina.²⁹ Todos estos compuestos antitumorales son muy tóxicos e inhiben la replicación tanto de células cancerígenas como de células normales. Sin embargo a pesar de su toxicidad siguen siendo muy usados hoy día preferentemente en quimioterapia.²⁹ El ácido betulínico ha mostrado poseer también efectos anti-angiogénicos

²⁷ Zuco V, Supino R, Righelti SC, Cleris L, Marchesi E, Gambacorti-Passerini C, and Formelli F.. *Selective cytotoxicity of betulinic acid in tumor cell lines, but not on normal cells. Cancer Letters.* 175, 17. **2002.**

²⁸ Patocka J. *Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. Journal of Applied Biomedicine.* 1,7-12. **2003**

²⁹ Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, and Bashford CL. *Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. Molecular Medicine Today.* 6, 15-19. **2000.**

que han sido asociados a su capacidad de inhibir la enzima aminopeptidasa N, con una **(concentración inhibitoria)** $IC_{50}=7.3\pm 1.4 \mu\text{M}/\text{mL}$. Dicha enzima forma parte de la actividad angioproliferativa y metastásica en diferentes tipos de tumores.³⁰ Aunque otros estudios asocian estos efectos anti-angiogénicos con los niveles de toxicidad propios del producto, ya que dicho efecto inhibitorio no ha podido ser reproducido.³¹

Por último, en cuanto a la toxicidad *in vivo* del ácido betulínico, se han realizado ensayos en ratón demostrando que este compuesto es activo contra tumores inducidos por TPA (12-O-tetradecanoil-13-acetato), en cáncer de ovario y melanoma.²⁹ El betulínico no mostró efectos tóxicos en ratones hasta concentraciones de 500 mg/kg. Sin embargo, dosis menores de 5mg/kg han sido suficientemente significativas para impedir el desarrollo de tumores. Los resultados mostraron que tras 41 días de administración (6 dosis diarias de 50 mg/kg), los ratones desarrollaron una regresión del tumor de hasta un 80%.⁸

Fundamentalmente el ácido betulínico posee una amplia gama de actividades biológicas descritas en los últimos años, entre las que destacan la actividad citotóxica, anti-VIH, así como sus propiedades para el tratamiento de la diabetes.^{32,33}

Este compuesto que presenta una extraordinaria actividad biológica. Así, además de su actividad anti-VIH, ha mostrado actividad citotóxica frente al melanoma humano por inducción de apoptosis, actividad leishmanicida frente a *Leishmania amazonensis* y actividad antiparasitaria frente a los estadios asexuales eritrocíticos de *Plasmodium falciparum*.^{32, 33}

Cabe destacar a los derivados del ácido betulínico como potenciales agentes antivirales. Así, esterificación en C3 del ácido betulínico condujo al descubrimiento de Bevirimat (DSB, PA-457, ácido 3',3'-dimetilsuccinilbetulínico) (Figura 11), el primer inhibidor de la maduración

³⁰ Melzig MF, and Bormann H. *Betulinic acid inhibits aminopeptidase N activity*. *Plant Medicinal*. 64, 655-657. **1998**.

³¹ Kwon HJ, Shim JS, Kim JH, Cho HY, Yum YN, Kim SH, and Yu J. *Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells*. *Journal Cancer Research*. **93**, 417-425.

³² Osorio L., A. A., *Metabolitos secundarios aislados de la Cassine xylocarpa y Elaeodendron orientale (Celastraceae): Potenciales agentes antivirales y citotóxicos.*, Tesis de doctorado, Universidad de La Laguna, España, **2012**

³³ Oliver, C., Bedoya, L.M., A.A, Osorio. *et all, Isolation Structural Modification, and HIV Inhibition of Pentacyclic Lupane-Type Triterpenoids from Cassine xylocarpa and Maytenus cuzcoina*, *Journal Natural Products*, 78 (5), pp 1045–1055. **2015**.

del VIH-1 descrito. El Bevirimat ha llegado hasta los ensayos de fase clínica III desarrollado por la farmacéutica Panacos.^{32, 33}

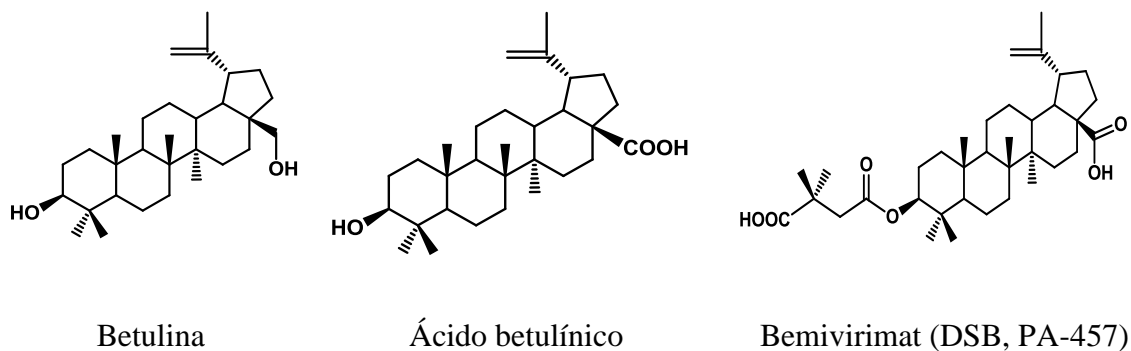


Figura 11. Lupanos con actividad anti-VIH (Bemivirimat: compuesto en fase clínica)

Recientemente, dos nuevos derivados 3,28-disustituídos del ácido betulínico, presentaron actividad anti-VIH ligeramente mayor que el Bemivirimat, siendo por tanto considerados como excelentes candidatos a estudios clínicos (Figura 12).^{32, 33}

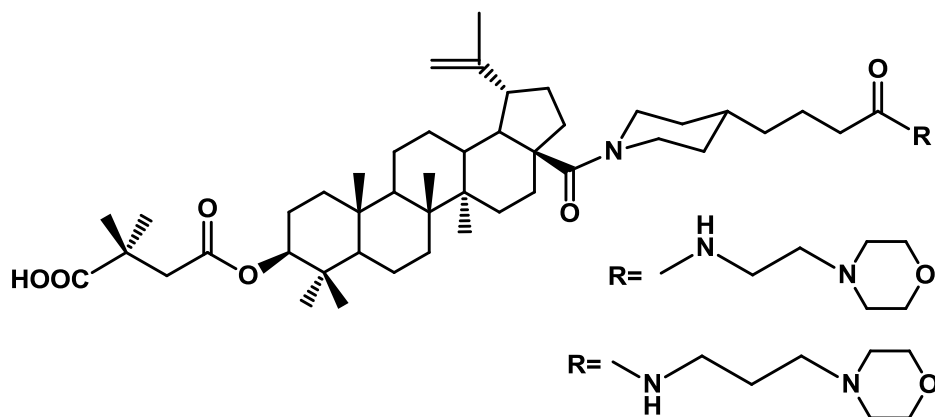


Figura 12. Derivados 3,28-disustituídos del ácido betulínico con actividad anti VIH

3.7 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL B-SITOSTEROL.

Los esteroides son triterpenoides, un grupo de compuestos producidos en plantas y animales.³⁴ En general, los esteroides son metabolitos bien distribuidos en el reino animal y vegetal y comparten mucho de su estructura química con los triterpenos, ya que provienen de la misma ruta biosintética.³⁵ Ellos están esparcidos en la naturaleza y desempeñan importantes funciones biológicas tales como: reguladores de los niveles de sal en los seres humanos, entre otras. Algunas hormonas y el colesterol son esteroides. Ellos están caracterizados por un esqueleto con cuatro anillos fusionados, generalmente arreglados en un orden 6-6-6-5. La fusión de los cuatro anillos le da rigidez a la molécula del esteroide. La estructura principal está presente en la figura 13.³⁶

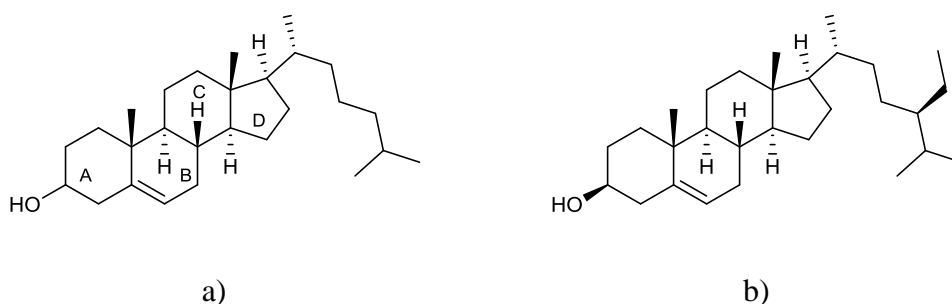


Figura 13: Estructura esteroidal de a) colesterol y b) β -sitosterol [15]

Los esteroides son un subgrupo de esteroides con un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A. Ellos son lípidos antipáticos, moléculas que son mayoritariamente lípidos (hidrofóbicos) en estructura, pero un extremo de la cadena poseen una región polar o iónica (hidrofílico) y en general, la molécula es bastante plana. Los esteroides están divididos en dos áreas: en plantas son llamados “**fitosteroides**” mientras que en animales son conocidos como “**zoosteroides**”. Uno de los más importantes zoosteroides es el colesterol y en el caso de los fitosteroides se tiene el campesterol, el estigmasterol y **sitosterol**.²⁴

³⁴ Miettinen, T. A.; Puska, P.; Gylling, H.; Vanhanen, H.; Vartiainen, E. “Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population”. *New England Journal of Medicine*, 333(20), 1308-12; **1995**.

³⁵ W. D. *Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols*. *Chemical Review*, 111, 6423-6451. **2011**.

³⁶ Martin. G.E., *Hidrogenación de β -sitosterol a β -sitostanol sobre diferentes catalizadores de Pd*. Tesis de grado, *Universidad Simón Bolívar*, 5; **2008**.

Los esteroides de plantas, incluyendo los sitosteroides, son constituyentes de creciente importancia en nuestra dieta. Entre estos el **β -sitosterol** es probablemente el más abundante y ampliamente distribuido.³⁷ Este esteroide, relacionado estructuralmente con el colesterol contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico.

Los sitosteroides de plantas han generado un considerable interés debido a su capacidad de disminuir el colesterol³⁸ y a su utilidad terapéutica en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna.³⁹ Varios estudios han demostrado la efectividad clínica de la fitoterapia basada en fitosteroides (principalmente β -sitosterol) en el tratamiento de las patologías antes mencionadas, dando así soporte científico al uso tradicional y de larga data que se le ha dado en algunos países europeos. De hecho, por ejemplo en Alemania al menos 5 fitofármacos indicados para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y 4 utilizados como agentes reductores de los niveles de colesterol, se encuentran disponibles en el mercado.⁴⁰

A pesar de que numerosas investigaciones se han llevado a cabo, aun no se logra comprender cabalmente el mecanismo de acción del β -sitosterol en estas patologías.⁴¹ Sin embargo su baja toxicidad y el hecho de que se trata de un “producto natural“, sugiere que su uso aumentara en los próximos años.⁴¹

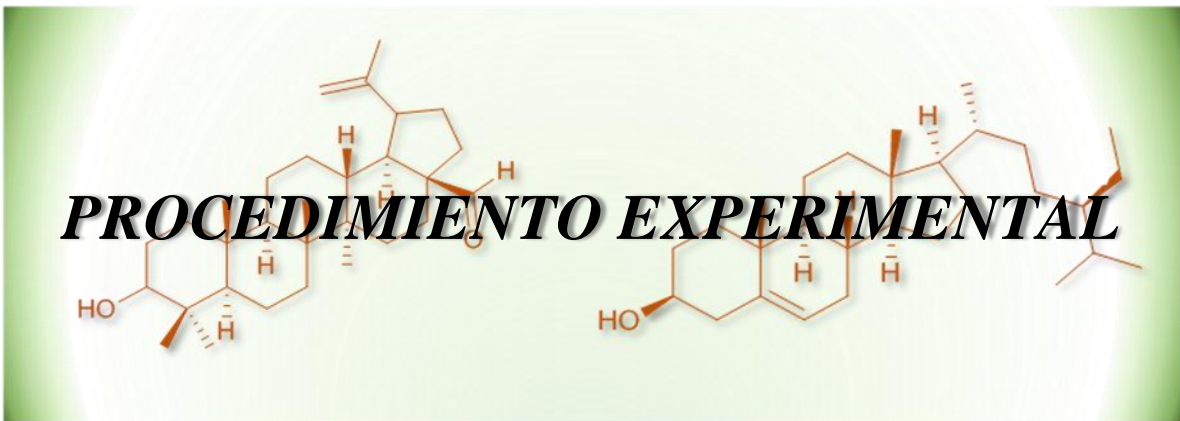
³⁷ Nes, W. D. *Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols. Chemical Reviews.*, 111, 6423-6451. **2011.**

³⁸ N.C. Wong. *The beneficial effects of plant sterols on serum cholesterol. Canadian Journal Cardiol.*, **17**, 715-721, **2001.**

³⁹ R.R. Berges, J. Windeler, H.J. Trampisch, T. Senge, and the β -sitosterol study group. *Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia.* *Lancet.* **345**, 1529-1532, **1995.**

⁴⁰ Rote Liste, 58046, 58048, 82155, 82157; **1996.**

⁴¹ F.C. Lowe, J.C. Ku. *Phytotherapy in treatment of benign prostatic hiperplasia: a critical review.* *Urology.* 48, 12-20, **1996.**



IV. Procedimiento experimental.

4.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL.

La corteza del árbol de *Hymenaea Courbaril* fue recolectada en una área de las faldas del volcán de San Vicente (Chinchontepec, Figura 14.), en la jurisdicción de Zacatecoluca, departamento de La Paz, el 20 de Febrero del 2013.



Figura 14. Zona de recolección de la muestra.

4.1.2 Proceso de estrujado, secado y separación.

La corteza recolectada se sometió a un proceso de secado al aire durante 4 semanas y luego se estrujó, obteniéndose una masa de 2.7 kg.

La corteza seca de *Hymenaea Courbaril* estrujada, se sometió a un proceso de maceración en etanol durante 10 días, el etanol se recuperó a presión reducida. El extracto etanólico obtenido se suspendió en agua, y se extrajo con diclorometano (CH_2Cl_2), éste se eliminó a presión reducida hasta sequedad, obteniéndose 19.0 g de extracto crudo.

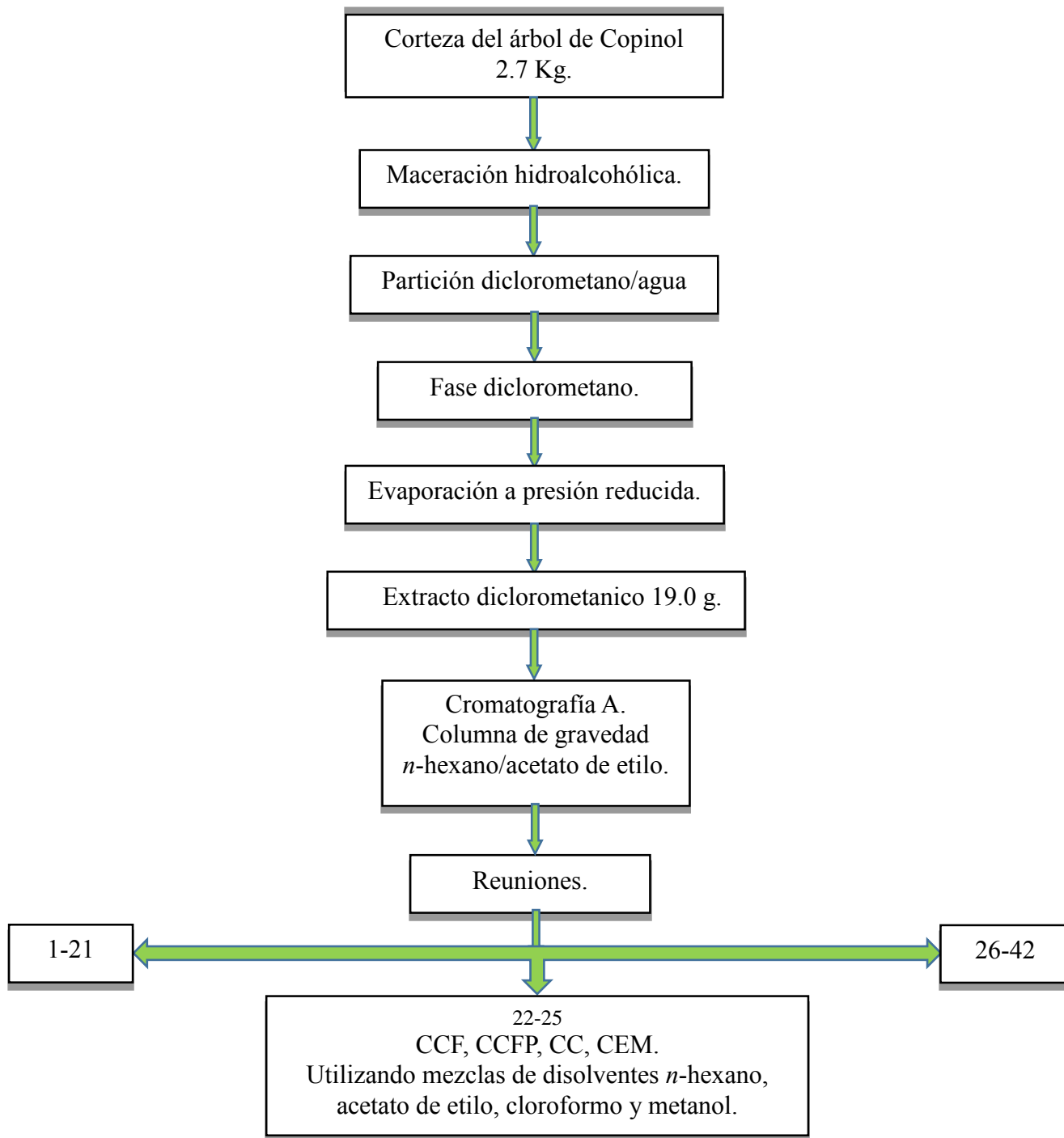


Figura 15. Esquema de separación.

El extracto crudo se sometió a análisis cualitativo por Cromatografía de Capa Fina (CCF), a efecto de encontrar la mejor fase móvil para la separación de los metabolitos mayoritarios y lograr su purificación. Se utilizó Gel de Sílice 60, con indicador fluorescencia UV₂₅₄, en placas con un espesor de 0.20 mm, y como sistema de elución, mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo con gradiente de polaridad creciente de 90:10, 50:50 y 10:90. Las placas se revelaron con Óleum (Ácido Sulfúrico en Ácido Acético). De este análisis, se determinó que la fase móvil adecuada para la separación de los metabolitos es la mezcla *n*-hexano/acetato de etilo 90:10.

Posteriormente el extracto fue fraccionado mediante una columna de cromatografía a presión atmosférica, utilizando como fase estacionaria gel de sílice (Silica Gel 60, con un tamaño de partícula de 0.063 mm), y como sistema de elución, mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo, en las proporciones que se presentan en la tabla 6.

Tabla 6. Sistemas de elución utilizados.

Sistema de elución.	Porcentaje.
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	99:1
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	98.5:1.5
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	98:2
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	97.5:2.5
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	97:3
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	96.5:3.5
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	96:4
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	95:5
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	94:6
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	93:7
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	92:8
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	90:10
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	80:20
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	70:30
<i>n</i> -hexano/Acetato de etilo	50:50

Se recogieron 42 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo a la similitud que presentaron después del análisis por CCF.

La reunión de las fracciones 22-25, fueron sometidas a sucesivas cromatografías en columna sobre gel de sílice, cromatografía sobre Sephadex LH-20 (Cromatografía de Exclusión por Tamaño), usando diferentes sistema de elución. La purificación de los productos se efectuó mediante cromatografía en capa fina preparativa.

4.2 CROMATOGRAFÍA

4.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0.20 mm de espesor, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum (disolución de H₂O:H₂SO₄:AcOH, 4:1:20) o una disolución de vainillina (EtOH:H₂SO₄:AcOH, 15:1:1.3, añadiendo un gramo de vainillina por cada 10 ml de AcOH) y posterior calentamiento a 120°C.

4.2.2. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)

Se utilizan placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄, de la empresa Macherey-Nagel SIL G-100 UV₂₅₄. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión diferentes mezclas de disolventes. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien pulverizando óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio, y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

4.2.3. Cromatografía en columna (CC)

La CC se realizó empleando gel de sílice fina de 0.063–0.200 nm de diámetro, de la empresa Macherey-Nagel. El gel de sílice se suspende en el eluyente y se compacta con una bomba de vacío. La muestra fue adsorbida en gel de sílice de 0.063 nm de diámetro.

4.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño.

Se utilizó como fase estacionaria la resina lipofílica Sephadex LH–20 (25–100 μm), de Sigma–Aldrich Co. Las columnas fueron preparadas humectando la resina en metanol durante 12 horas, siguiendo las instrucciones del fabricante, y empaquetadas por gravedad con la elución mínima de tres volúmenes muertos de metanol antes de cada cambio de fase móvil. El eluyente que en general se utiliza es *n*-hexano–cloroformo–metanol (2:1:1). La muestra a eluir, tras ser filtrada, se coloca 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 utilizar.

4.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de RMN se realizaron en los espectrofotómetros Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) y/o Bruker AMK 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C). Los productos se disuelven en cloroformo deuterado (CDCl_3) que contiene tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en **ppm** y las constantes de acoplamiento (*J*) en **Hz**. En los experimentos de RMN ^1H , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: (s) singulete, (d) doblete y (m) multiplete y en los experimentos de RMN ^{13}C , (c) CH_3 , (t) CH_2 , (d) CH y (s) C. Se utilizaron

programas ⁴² COSY, ⁴³ ROESY, ⁴⁴, ⁴⁵ HSQC⁴⁶ y HMBC convencionales de la librería de pulsos de BRUKER. El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuaron utilizando los programas Mestre Nova (MestreLab Research) y TopSpin™ v.2.1 (Bruker®), según las necesidades.

4.4 ESPECTROSCOPIA DE MASAS (HMRS).

Las medidas de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) fueron llevadas a cabo en un espectrómetro de masas VG AutoSpec FISIONS. Los espectros EI- HRMS, ESI-HRMS y ESI-FTICR fueron realizados en un espectrómetro Micromass ® Autopec.

⁴² Pegg, D. T.; Doddrell, D. M.; Bendall, M. R. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 2745.

⁴³ (a) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229. (b) Nagayama, K. y col. *J. Magn. Reson.* **1980**, *40*, 321.

⁴⁴ Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207.

⁴⁵ Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355.

⁴⁶ Muller, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481.



V. Resultados y discusión: estudio fitoquímico de la corteza de *Hymenaea courbaril*.

Con los antecedentes anteriormente citados y siguiendo los objetivos propuestos, realizamos el estudio fitoquímico de la corteza de *Hymenaea courbaril*.

Así, tras repetidas cromatografías de la fracción soluble en diclorometano, (obtenida a partir del extracto etanólico) de la corteza de *Hymenaea courbaril*, como se detalla en la parte experimental, aislamos un triterpeno pentacíclico de la serie del lupano y un esteroide de la serie de los esteroides.

Las estructuras de los dos metabolitos aislados, fueron elucidadas mediante técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos homo (COSY) y heteronucleares (HSQC y HMBC), así como espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). A continuación, se describe la elucidación estructural de estos dos compuestos.

5.1. Aislamiento de triterpeno de la serie lupano y el esteroide.

El extracto en diclorometano de la corteza de *Hymenaea courbaril* fue fraccionado dando lugar 42 fracciones, de las cuales la reunión 22-25, fue seleccionada por presentar compuestos mayoritarios, al ser evaluadas por CCF, dando lugar al aislamiento de un triterpeno con esqueleto de **lupano** (Compuesto 1, 76.3 mg) (Figura 16), y un terpeno de la serie de los **esteroides** (Compuesto 2, 136.4 mg).

A continuación se describe la elucidación estructural de los dos compuestos aislados.

5.2 Elucidación estructural.

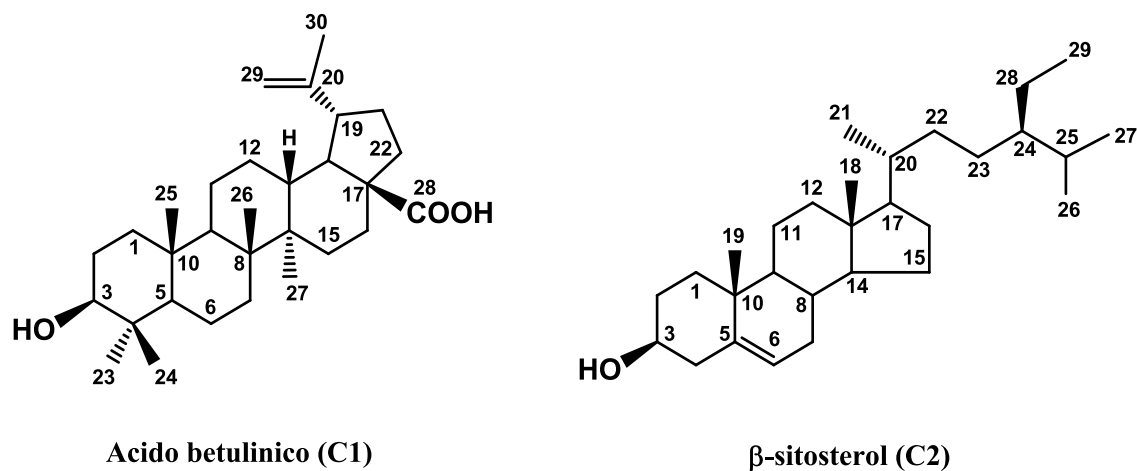


Figura 16. Terpenos aislados de *Hymenaea courbaril*.

Compuesto 1

El **compuesto 1**, aislado como un sólido blanco amorfo, presentó en su espectro de masas de alta resolución (HMRS, Figura 17-C1), un ion molecular a $456.2\ m/z$ y una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, indicando 7 grados de insaturación. Además presentó un pico que resulta de la pérdida de agua ($438\ m/z$, $M^+ - 18$, H_2O) y otro pico correspondiente a la pérdida de un grupo carboxilo ($411\ m/z$, $M^+ - 45$, $-COOH$). Así también, el pico a $248\ m/z$ indica que la molécula se ioniza en el carbono 20 (C20, Figura 18), se transfiere, producto de una ruptura homolítica, un radical hidrógeno desde C13 y un protón desde C12, permitiendo la ruptura de los enlaces C8-C14 y C9-C11 mediante una reacción retro Diels-Alder.

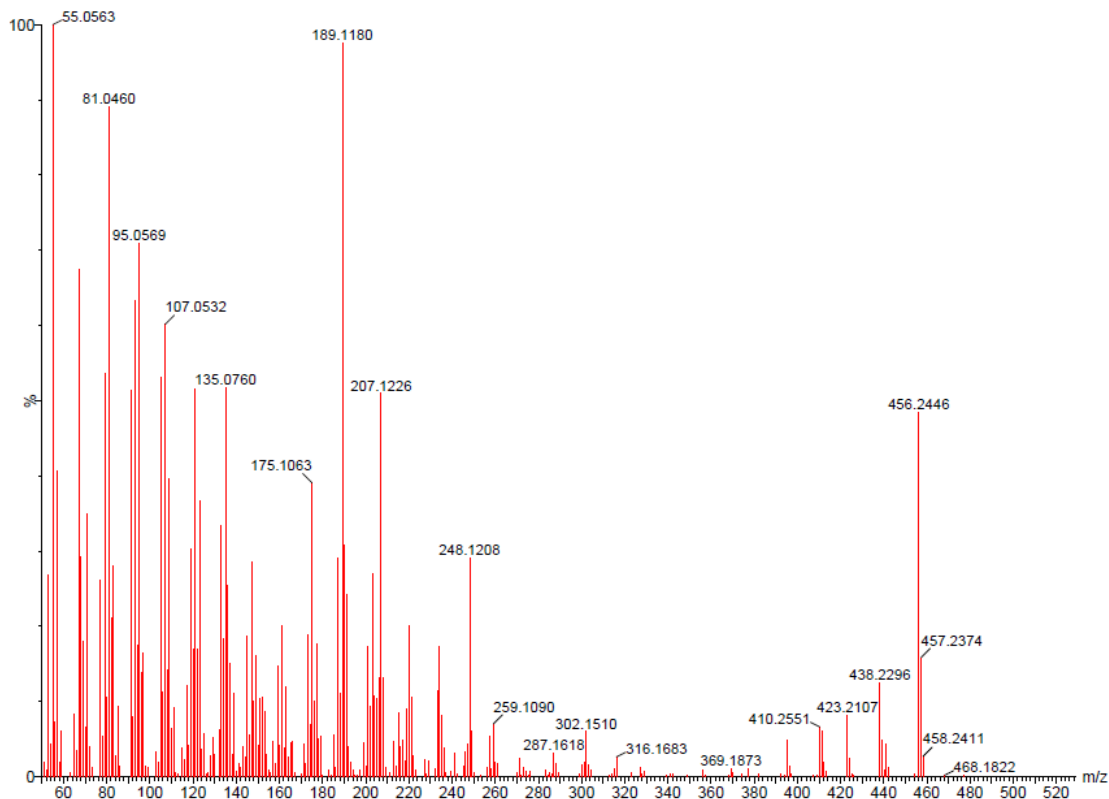


Figura 17. Espectro de masas de alta resolución del ácido betulínico.

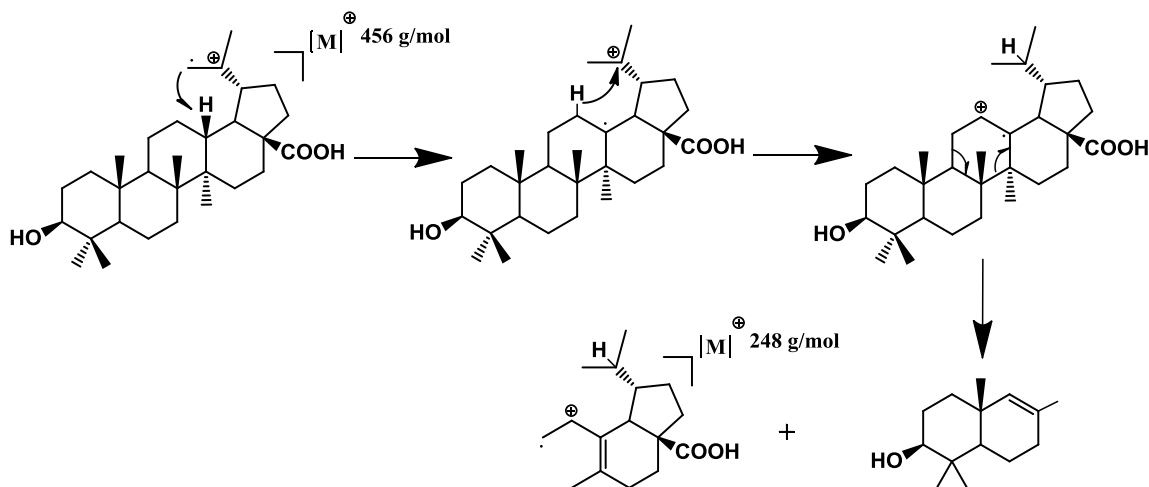


Figura 18. Propuesta de fraccionamiento del ácido betulínico

Por otra parte su espectro de RMN ^1H (figura 19) mostró señales que corresponden a seis metilos, cinco de ellos como singuletes a 0.80, 0.85, 0.98, 1.01 y 1.02 δH , y uno de ellos sobre doble enlace a 1.74 δH ; dos protones vinílicos como singuletes anchos a 4.65 y 4.79

δ H; un protón geminal a grupo hidroxilo secundario, a 3.20 δ H como doble doblete, y con constantes de acoplamiento de 11.5, 4.8 Hz; un protón lupenilo H-19, como triplete de doblete a 3.02 δ H ($J= 10.8, 4.9$ Hz).

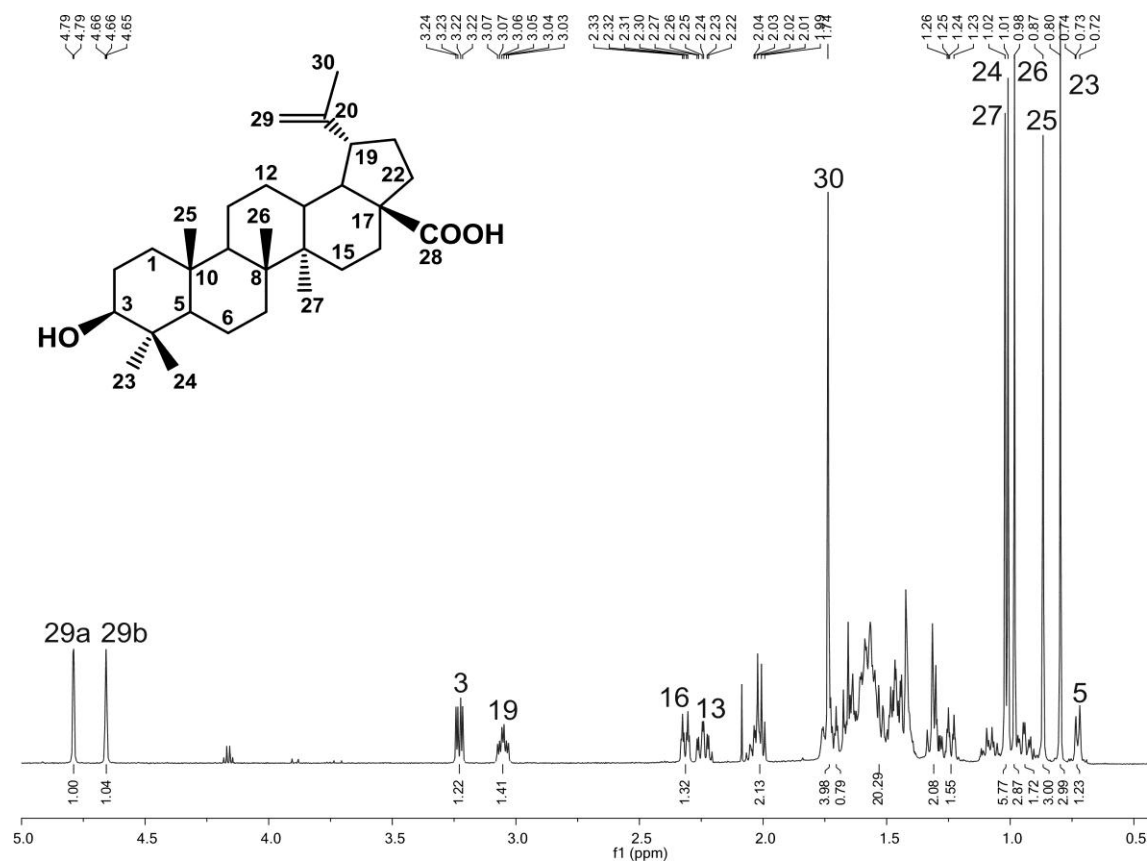


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) del **Compuesto 1**.

Su espectro de RMN ^{13}C (Figura 20) mostró señales para 30 carbonos, lo que junto con un experimento HSQC editado (Figura 21), corroboró la existencia de seis metilos, once metilenos, seis metinos y siete carbonos cuaternarios.

La molécula posee un grupo isopropilideno que es característico de los triterpenos con esqueleto de lupano. Este grupo se determinó, por la presencia de un carbono cuaternario a 150.4 δ C y un metileno a 109.7 δ C. Además, se confirmó la existencia de un grupo carbonilo

de ácido carboxílico a 179.0 δC , así como un alcohol secundario, al observarse un carbono metínico a 79.0 δC . El conjunto de estos datos, está de acuerdo con la estructura de un triterpeno de la serie del lupano con un grupo hidroxilo secundario, y un grupo carboxilo. El grupo hidroxilo, debía estar localizado en carbono 3, dada la forma, multiplicidad y el desplazamiento químico de la señal del protón geminal al mismo, que es característico de un grupo hidroxilo biogenético.

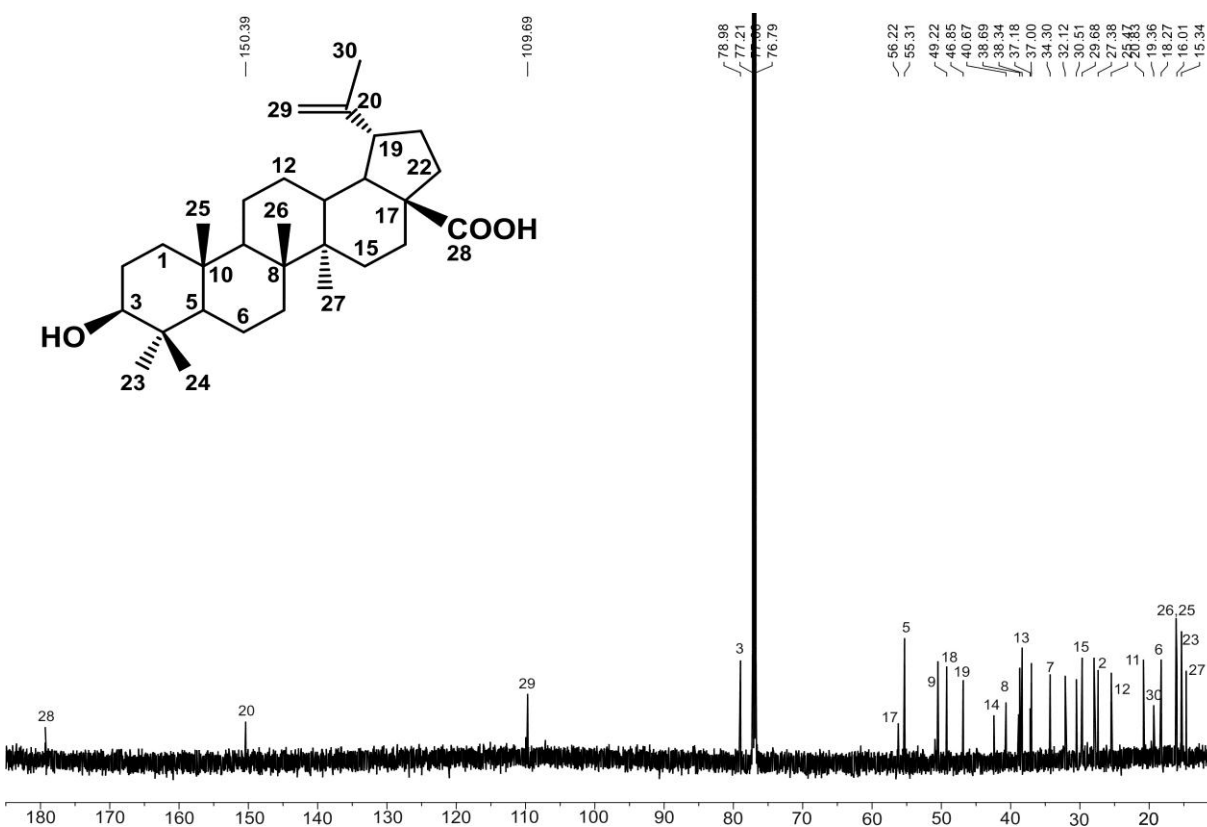


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) y HSQC (600 MHz) del **Compuesto 1**.

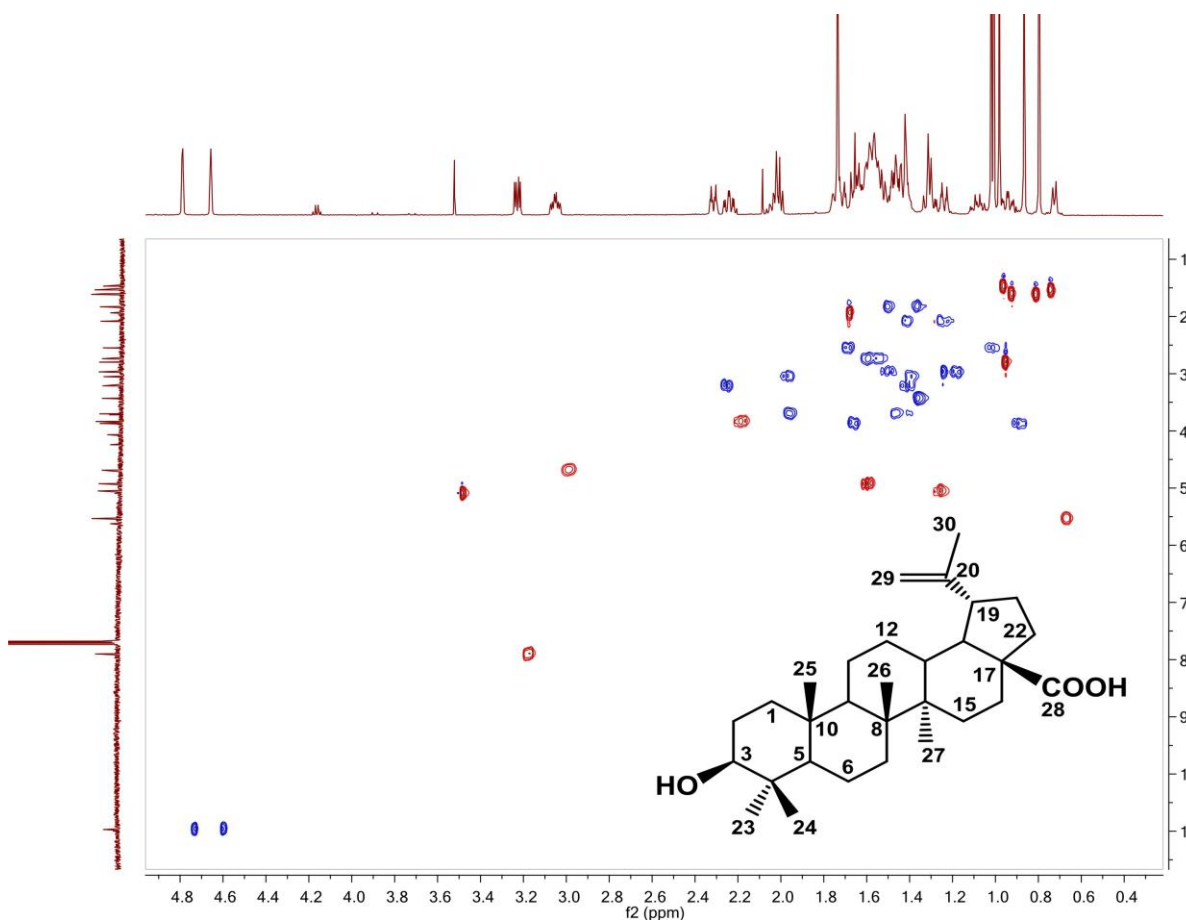


Figura 21. Espectro de HSQC con editado de multiplicidad (600 MHz) del **Compuesto 1**.

El estudio de un experimento bidimensional homonuclear COSY, así como experimentos bidimensionales heteronucleares (HSQC y HMBC), nos permitió situar los grupos funcionales en la molécula de forma inequívoca. En primer lugar, en el experimento HMBC (Figura 22) podemos destacar las correlaciones entre los metilos 23 y 24 a 0.80 y 1.01 δ H, respectivamente, con un hidroxilo a 79.0 δ C; un carbono cuaternario a 38.9 δ C (C4) y un carbono metínico a 55.3 δ C (C5), lo que confirma la presencia del grupo hidroxilo sobre el carbono C3. Por otra parte, se observa la correlación del metilo a 1.74 δ H (CH₃-30) con los carbonos vinílicos situados 150.4 δ C (C20) y 109.7 δ C (C29), corroborando la estructura del grupo isopropilideno en el esqueleto de lupano. La correlación de los protones H-18 (1.65 δ H) y H₂-22 (1.50 δ H) con un carbono carboxílico a 179.0 δ C, situó el ácido carboxílico sobre el carbono C28. Esto permitió asignar la estructura del **compuesto 1** como **Ácido betulínico**.

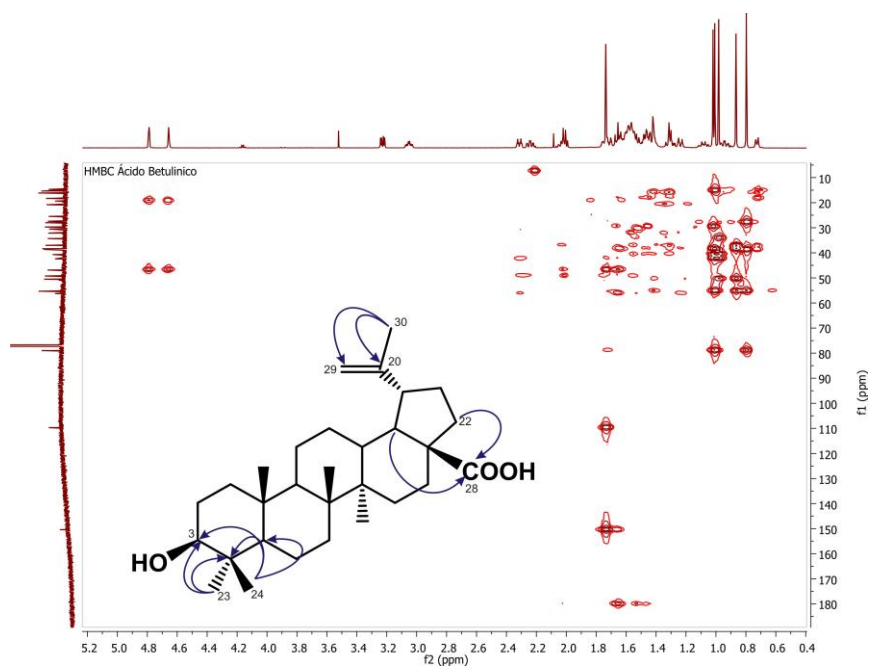


Figura 22. Espectro HMBC (600 MHz) de **Compuesto 1** y correlaciones importantes.

Tabla 7. Datos RMN- ^1H (500 MHz) y ^{13}C (600 MHz) del **Compuesto 1** en CDCl_3

N°	δH	δC	N°	δH	δC
1	0.94, 1.70	38.7 t	16	1.45, 2.32 d. (12.0)	32.1 t
2	1.62 t	27.4 t	17		56.2 s
3	3.20 dd (11.5, 4.8)	79.0 d	18	1.65 m	49.2 d
4		38.9 s	19	3.02 td (10.8, 4.9)	46.8 d
5	0.73 d (12)	55.3 d	20		150.4 s
6	1.53, 1.39 m	18.3 t	21	2.0, 1.42 m	30.5 t
7	1.39 m	34.3 t	22	2.0, 1.50	37.2 t
8		40.7 s	23	0.80 s	15.3 c
9	1.23 d	50.8 d	24	1.01 s	28.0 c
10		37.0 s	25	0.87 s	16.0 c
11	1.44, 1.27 m	20.8 t	26	0.98 s	16.1 c
12		25.5 t	27	1.02 s	14.0 c
13	2.25 t	38.3 d	28		179.0 s
14		42.4 s	29	4.65 s, 4.79 s	109.7 t
15	1.54, 1.21 m	29.7 t	30	1.74 s	19.3 c

Compuesto 2.

El compuesto 2, aislado como sólido cristalino, mostró en su espectro de RMN ^1H (Figura 23) señales que corresponden a seis metilos, dos de ellos como singuletes a 0.68, 1.00 δH , dos como dobletes, 0.91 y 0.85 δH y dos como multiplete a 0.82 δH ; un protón vinílico como singulete ancho a 5.35 y un protón geminal a grupo hidroxilo secundario, a 3.53 δH como multiplete. Su espectro de RMN ^{13}C (Figura 24) mostró señales para 29 carbonos, lo que junto con un experimento HSQC editado (Figura 25), corroboró la existencia de seis metilos, once metilenos, nueve metinos y tres carbonos cuaternarios. Estos datos y un estudio de las señales de carbono más detallado, permitió reconocer el esqueleto de un esteroide.

En primer lugar se observa la señal de un CH unido a oxígeno, lo que confirma la presencia de un alcohol secundario a 71.8 δC (d), así como dos carbonos vinílicos a 121.7 (d) y 140.7 δC (s) respectivamente, corroborando al **compuesto 2** como un esteroide que posee un grupo hidroxilo y un doble enlace en su estructura.

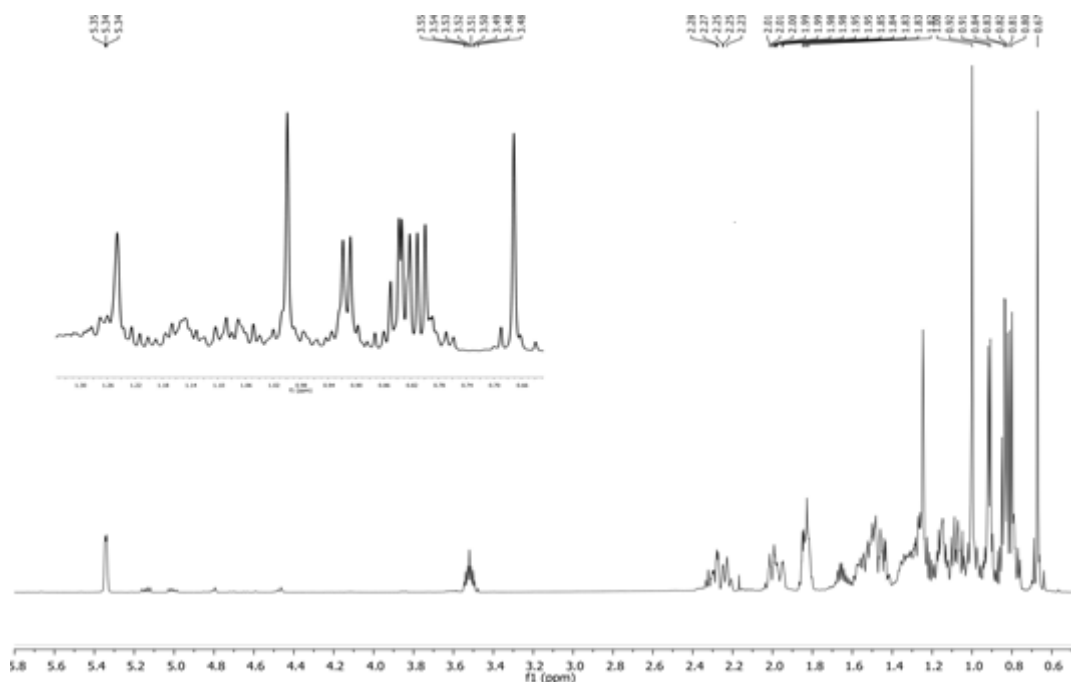


Figura 23. Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) de **C2**.

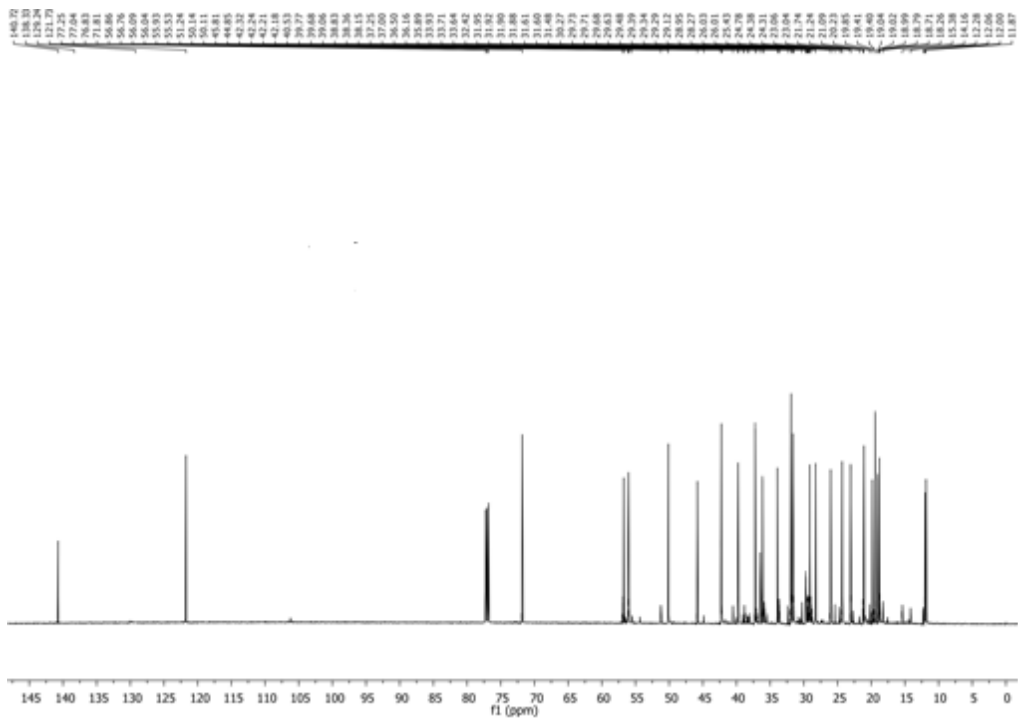


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz) de Compuesto 2

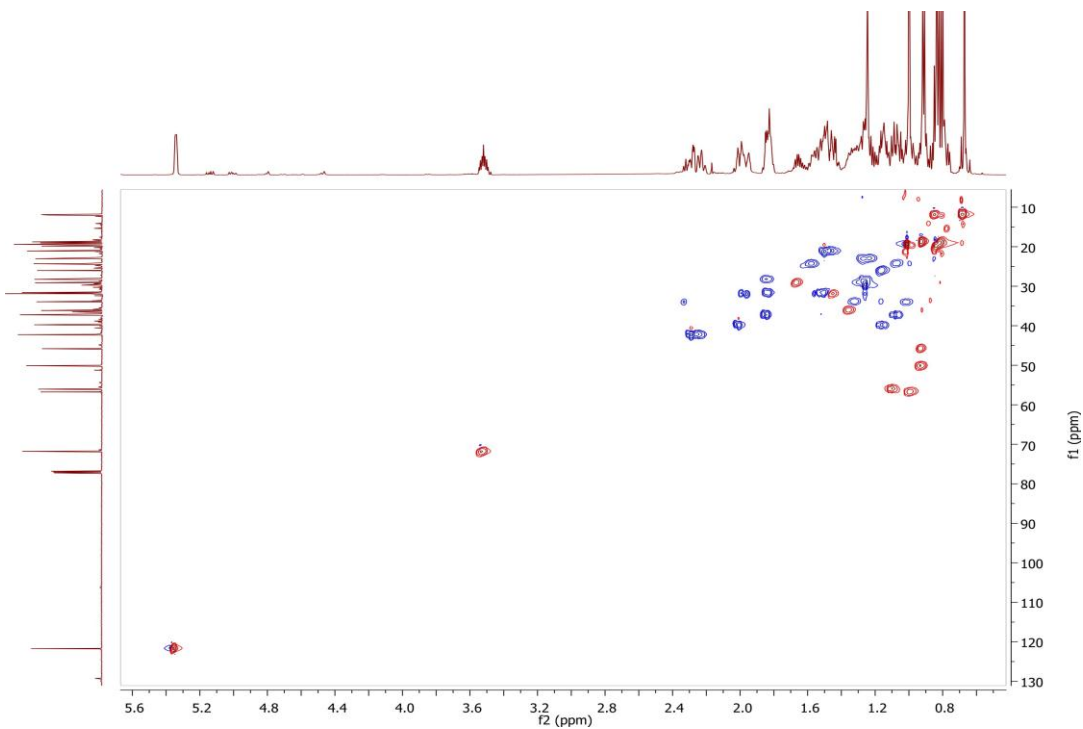


Figura 25. Espectro de HSQC editado (CDCl_3 , 600 MHz) de C2.

Tabla 8. Datos RMN-¹H (500 MHz) y ¹³C (600 MHz) para **C-2** en CDCl₃

N°	δH	δC	N°	δH	δC
1	1.47	37.28	16	1.84	28.25
2	1.56	31.69	17	1.49	56.09
3	3.53	71.81	18	0.68	11.86
4	2.28	42.33	19	1.00	19.40
5	-	140.72	20	1.64	36.52
6	5.35	121.73	21	0.91	18.79
7	2.03	31.69	22	0.88	33.98
8	1.67	31.93	23	1.04	26.14
9	1.48	50.17	24	1.50	45.88
10	-	36.52	25	1.65	28.91
11	1.52	21.10	26	0.82	19.80
12	1.49	39.80	27	0.82	18.79
13	-	42.33	28	1.04	23.10
14	1.50	56.79	29	0.85	11.99
15	1.60	24.37			

La elucidación estructural completa para este compuesto, se realizó mediante el estudio de las distintas fragmentaciones en su espectro de masas de alta resolución (HRMS), que se describe a continuación.

El compuesto **2**, aislado como un sólido blanco cristalino, presentó en su espectro HRMS (Figura 26) un ión molecular a 414.37 *m/z* (**I**) y una fórmula molecular C₂₉H₅₀O, indicando 5 grados de insaturación.

La fragmentación del anillo D produce un ion C₁₆H₂₆O⁺ [M-180], *m/z* 234 (**II**); así también, se observa el ion C₁₆H₂₃⁺, *m/z* 215 (**III**), que corresponde a la eliminación de H₂O a partir del ión II. Por otra parte, el ion IV, se produce por deshidratación de I mediante un mecanismo por transposición de tipo McLafferti; generando el fragmento C₂₉H₄₈⁺ [M-18], *m/z* 396 (**IV**), el cual también experimenta una fragmentación de la cadena lateral, formando el ion C₁₉H₂₇⁺, *m/z* 255 (**V**). El ion C₁₉H₂₉O⁺ con *m/z* 273 (**VII**), se produce por pérdida de la cadena lateral de I. El fragmento VIII C₂₇H₄₅O⁺ con *m/z* 385, se produce por pérdida de 29 unidades,

atribuidas la eliminación de un radical etilo [M-29]. Finalmente, el ion $C_{28}H_{47}O^+$ [M-15], m/z 399 (VI), se produce por la pérdida de un radical metilo.

En la figura 27 se detallan ocho patrones de fragmentación obtenidos del análisis de HRMS, los cuales han permitido asignar la estructura del **compuesto 2** como **β -sitosterol**.

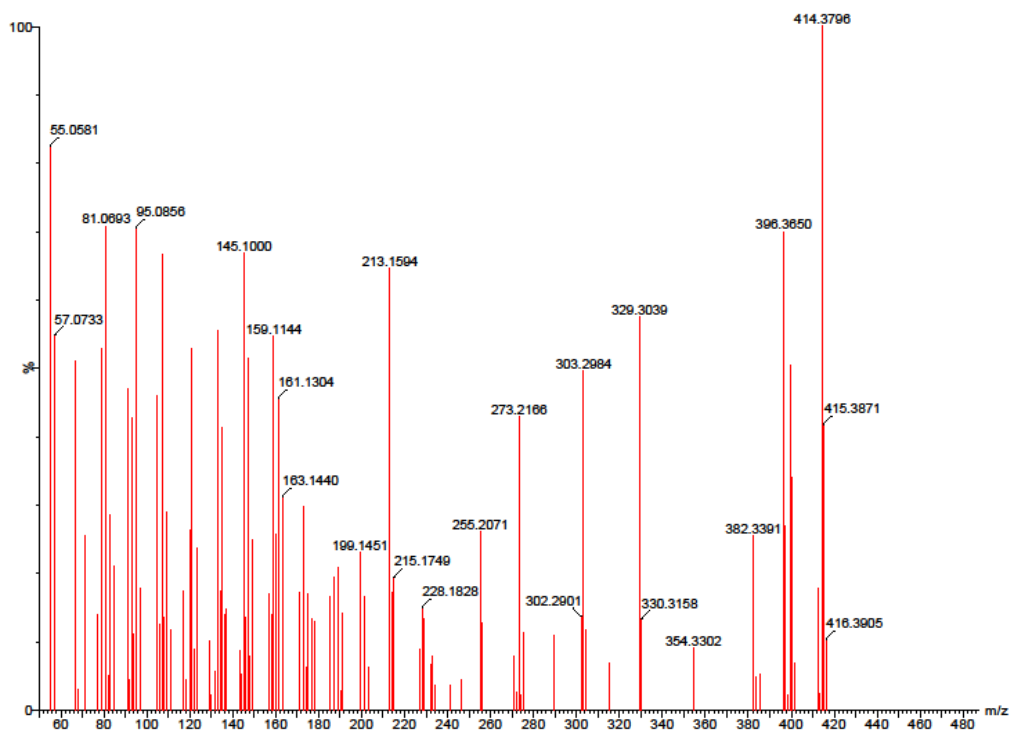


Figura 26. Espectro de masas de alta resolución de β -sitosterol

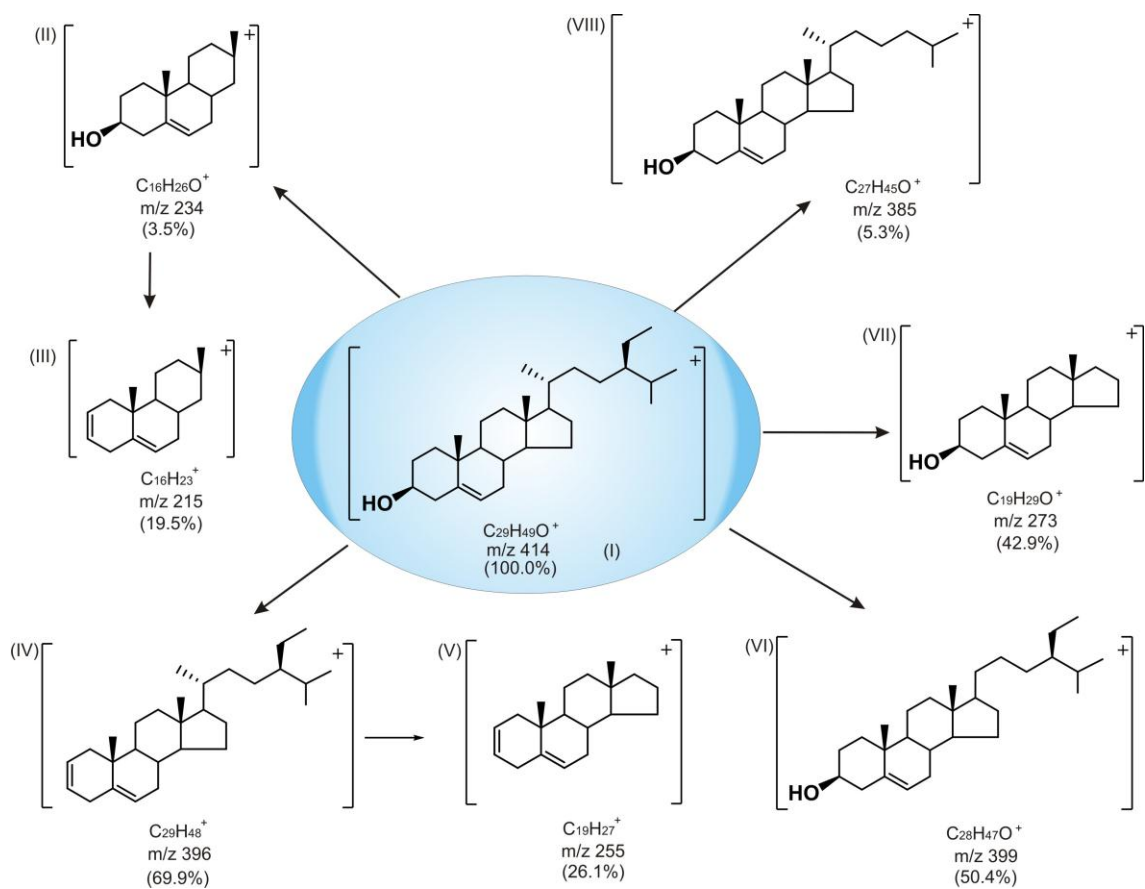
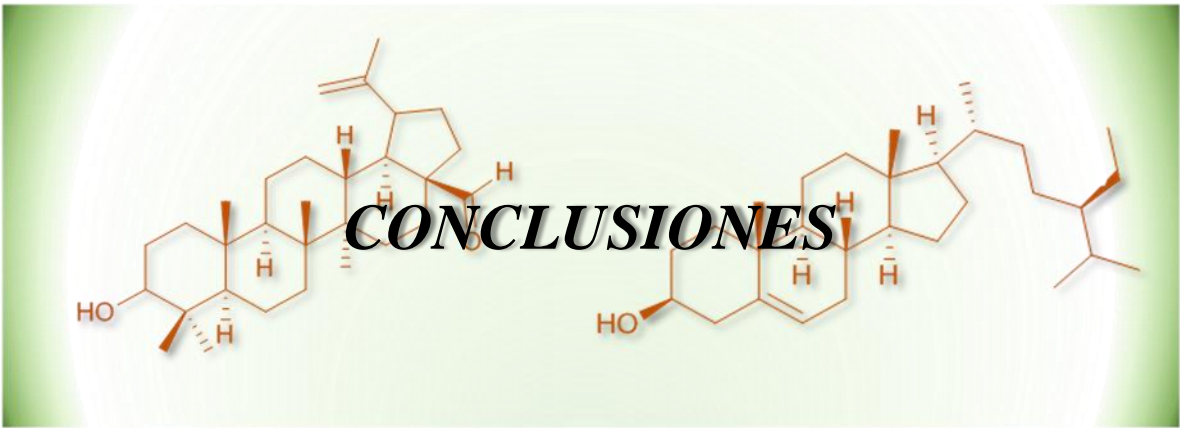


Figura 27. Patrones de fragmentación obtenidos del análisis del espectro de masas del β -sitosterol.



VI. Conclusiones

Las actividades de investigación para realizar este trabajo de graduación incluyen, el estudio fitoquímico del extracto en diclorometano de la corteza de *Hymenaea courbaril*, la elucidación estructural de dos metabolitos secundarios, así como la revisión bibliográfica de *Hymenaea courbaril* y los metabolitos aislados en estudios previos. De la presente investigación podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El extracto en diclorometano de *Hymenaea courbaril* presenta en su perfil cromatográfico en CCF, una serie aproximada de diez metabolitos secundarios, que eluyen utilizando mezclas *n*-hexano/acetato de etilo, a gradientes de *n*-hexano/acetato de etilo 90:10 hasta *n*-hexano/acetato de etilo 70:30, obteniéndose **42 fracciones**.
2. La reunión 22-25, rindió dos terpenos, los cuales se purificaron por cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), eluyendo con una fase móvil de *n*-hexano/acetato de etilo 70:30. En la elucidación estructural de ambos compuestos, se establece que se trata de un lupano, **ácido betulínico** (76.3 mg) y un esteroide, **β -sitosterol** (136.4 mg). Para la elucidación estructural de los dos compuestos, se emplearon técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C , incluyendo experimentos homo (COSY) y heteronucleares (HSQC; HMBC), así como HRMS.
3. Es importante destacar que, el ácido betulínico no se había reportado como componente del copinol, con lo cual en este trabajo, se ha logrado un aporte importante al conocimiento de la composición química del copinol, al ser productor de un compuesto con una estructura privilegiada para la hemisíntesis de farmacóforos con potencial anticancerígeno y en el tratamiento del VIH.