



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



Facultad de Químico Farmacobiología

Estudio químico del extracto metanólico de las hojas de
Caesalpinia pulcherrima

Tesis

Que para obtener el título de:
Química Farmacobióloga

Presenta:

Karen Zuley Barrientos Martínez

Directoras:

Doctora en Ciencias Químicas Rosa Elva Norma del Río Torres
Doctora en Ciencias Químicas Yliana López Castro

Morelia, Michoacán.

Junio 2016.

Dedicatoria

A mis padres Otilia y Juvenal, pues ellos fueron los principales cimientos para mi vida profesional, sembraron en mí valores importantes y deseos de superación. Gracias a ustedes hoy soy quien soy. No hubiera podido concluir esta tesis sin su apoyo y amor.

A mi madre, por ser el espejo en el que me quiero reflejar, mi amiga y mi cómplice.

A Agradecimientos Institucionales:

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

Agradecimientos Personales:

A la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, por darme la oportunidad de hacer este proyecto de tesis bajo su asesoría y dejarme formar parte de su equipo trabajo, por sus enseñanzas, por brindarme parte de su tiempo y apoyo durante éste proyecto y, sobre todo, por su confianza y amistad.

A la D. C. Yliana López Castro, por darme parte de su tiempo coasesorándome durante la realización de éste proyecto.

A mis sinodales, que revisaron y aprobaron éste proyecto de tesis, muchas gracias por brindarme parte de su valioso tiempo.

Al M.C. Armando Talavera Alemán, por todo el apoyo que me ha brindado, por regalarme parte de su tiempo y sus conocimientos, pero más que nada por la amistad que ha compartido conmigo.

A Iroel, que más que un compañero, siempre ha sido un buen amigo y consejero. A Chely, Cristina, David, Eva, Gaby, Lorena, Martín, Ode, Ross, Rosy, Sinuhe, Viridiana y Yunuén, porque su compañerismo y amistad, hicieron amenas las horas de trabajo en el laboratorio. Gracias por todo.

A Marita, Vero y Gustavo, porque han estado a mi lado desde el día que los conocí, tanto en los momentos difíciles, como en los dichosos.

A mi hermano Kevin Thadeo, mi motivación para dar lo mejor de mí, para ser siempre el mejor ejemplo para él. Te Amo.

A las personas más importantes de mi vida, mis padres, porque desde el día en que nací han sido los cimientos que me mantienen en pie. Agradezco infinitamente todo el apoyo y la paciencia que han tenido conmigo. Estaré siempre en deuda con ustedes. Los Amo.

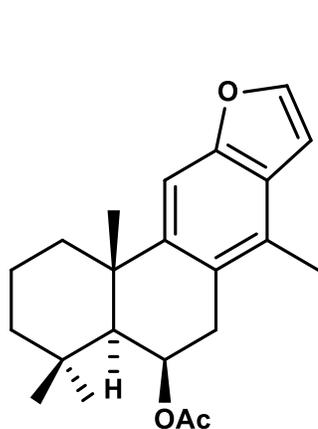
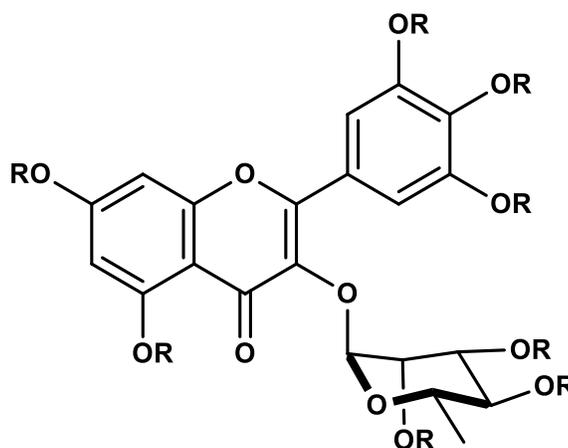
El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Química de Productos Naturales bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y la D.C. Yliana López Castro. Con el apoyo financiero de los proyectos CONACYT (183980) y CIC-UMSNH.

ÍNDICE

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
• INTRODUCCIÓN.....	1
• ANTECEDENTES.....	5
• JUSTIFICACIÓN.....	12
• OBJETIVOS.....	13
○ OBJETIVO GENERAL.....	13
○ OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
• DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	14
• CONCLUSIÓN.....	23
• PARTE EXPERIMENTAL.....	24
○ GENERALIDADES.....	24
○ MUESTRA VEGETAL.....	24
○ OBTENCIÓN DEL 6 β -acetoxi-17-metilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (16)... 24	
○ ACETILACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO.....	26
○ Peracetato de 3-O-rhamnósido de miricetina (18).....	27
• BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

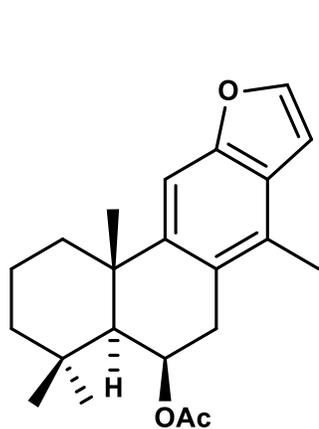
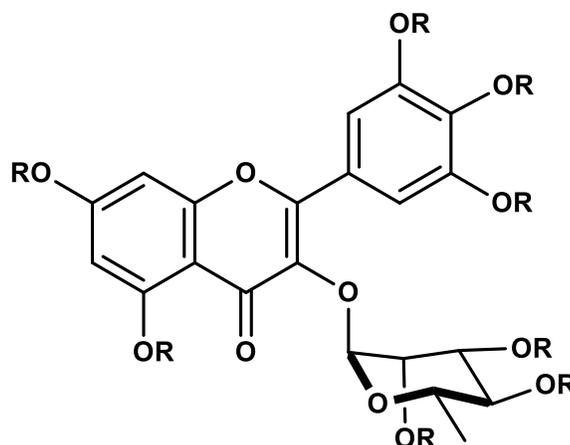
Caesalpinia pulcherrima, es una planta ornamental considerada una fuente importante de compuestos biológicamente activos, ya que cuenta con diversos estudios químicos y farmacológicos. Sin embargo, debido a la abundancia de metabolitos secundarios que presenta se continúa con su investigación química. En el presente trabajo se describe el estudio químico del extracto metanólico de las hojas de *Caesalpinia pulcherrima*, del cual, de la fracción de cloruro de metileno se obtuvo como componente minoritario al vouacapandieno **16**, mientras que en la fracción butanólica se identificó al 3-O-rhamnósido de miricetina (**22**), la acetilación del extracto metanólico condujo al aislamiento del derivado *per*acetilado **18**. Los compuestos **16** y **18** fueron caracterizados mediante sus datos de RMN y por comparación con datos de la literatura.

**16****18: R = H****22: R = Ac**

Palabras claves: *Caesalpinia pulcherrima*, vouacapano, miricetrina, flavonoides.

ABSTRACT

Caesalpinia pulcherrima is an ornamental plant considered as important source of bioactive compounds, since several chemical and pharmacological studies are reported. Due to the secondary metabolites abundance in this specie, the continuation of the chemical investigation is necessary. In this work, the chemical study of the methanolic extract of the leaves from *C. pulcherrima* is carried out, of which the dichlorometane fraction allowed the isolation of voucapandiene (**16**). On the other hand, from the butanolic fraction myricetin-3-O-rhamnoside (**22**) was identified. Peracetylation of methanolic extract yielded **18**. Compounds **16** and **18** were characterized by their NMR data and by comparison with previous reports.

**16****18: R = H****22: R = Ac**

Key words: *Caesalpinia pulcherrima*, voucapane, myricetrin, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos naturales obtenidos de las plantas han sido de suma trascendencia desde la época prehistórica, cuyos extractos eran utilizados por el hombre para realizar curaciones y pócimas. **(Marcano et al., 2002)**. Su estudio es el punto de partida de la química, dada la relevancia que presentan en la agricultura, la medicina e industria **(Ikan, 1991)**.

Aproximadamente el 80% de los habitantes del mundo hacen uso principalmente de medicinas tradicionales para el tratamiento de enfermedades, según un estimado de la Organización Mundial de la Salud. Actualmente, al menos 119 sustancias químicas, derivados de 90 especies de plantas, pueden ser consideradas como fármacos importantes. De estos 119 medicamentos, el 74% fueron descubiertos como resultado de los estudios químicos de las plantas utilizadas tradicionalmente en medicina **(Newman et al., 2000)**. Recientemente **Newman & Cragg, 2016**, realizaron una revisión del uso de los productos naturales para ser usados como fuente de nuevas drogas, con lo que el número ha aumentado a 175 moléculas.

La mayoría de los estudios realizados en vegetales son de especies herbáceas, siendo un bajo porcentaje los trabajos realizados en especies arbóreas. En un estudio de éste tipo realizado en Michoacán, se registró un total de 845 especies de árboles, agrupadas en 352 géneros y 100 familias. Las familias con mayor número de especies son Asteraceae, Fabaceae, Mimosaceae, Caesalpiniaceae y Burseraceae (Tabla 1). A nivel nacional, estas familias son superadas por Fagaceae, con 270 especies. Una ponderación interesante para Michoacán sería considerar a Fabaceae, Mimosaceae y Caesalpiniaceae como una sola familia (Leguminosae *sensu lato*), tal y como se hace en varios sistemas de clasificación. En ese caso, Leguminosae superaría con amplitud a Asteraceae, pues agruparía 180 especies (21.3%) **(Villaseñor & Ibarra-Manríquez, 1998)**.

Familia	Número de especies (géneros)	Género (Familia)	Número de especies
Asteraceae	82 (27)	<i>Bursera</i> (Burseraceae)	37
Fabaceae	74 (26)	<i>Quercus</i> (Fagaceae)	35
Mimosaceae	67 (17)	<i>Lonchocarpus</i> (Fabaceae)	19
Caesalpinaceae	39 (9)	<i>Senna</i> (Caesalpinaceae)	18
Burseraceae	38 (2)	<i>Verbesina</i> (Asteraceae)	16
Fagaceae	35 (1)	<i>Acacia</i> (Mimosaceae)	15
Euphorbiaceae	33 (14)	<i>Mimosa</i> (Mimosaceae)	15
Rubiaceae	29 (15)	<i>Pinus</i> (Pinaceae)	15
Boraginaceae	22 (5)	<i>Cordia</i> (Boraginaceae)	13
Cactaceae	23 (10)	<i>Ficus</i> (Moraceae)	11
Solanaceae	18 (3)	<i>Solanum</i> (Solanaceae)	11
Moraceae	17 (7)	<i>Randia</i> (Rubiaceae)	11
Pinaceae	17 (2)	<i>Vernonia</i> (Asteraceae)	11
Total	495 (138)	Total	227

Tabla 1. Familias y géneros con mayor número de especies de árboles en Michoacán. El número de géneros por familia se indica entre paréntesis.

Entre la flora fanerogámica de México, Leguminosae *sensu lato* es la familia más importante del su componente arbóreo de México con 579 especies, es decir, el doble de las especies reconocidas para Fagaceae. El género *Caesalpinia* es un género variado de leguminosas que se encuentra distribuido en todo el mundo en climas pantropicales y comprende más de 100 especies en las que podemos encontrar tanto árboles como arbustos, bejucos rastreros y escaladoras espinosas. Algunas especies arbustivas de América se clasificaron en el pasado en el género *Poinciana*, la mayoría no han sido investigadas aún, representando un importante grupo para la medicina y la agricultura. **(Cué-Bär et al., 2006).**

Dentro de estas especies arbóreas se encuentra el género *Caesalpinia* Plum. ex L. cuyo nombre está dedicado por Charles Plumier (1646-1704) a la memoria del famoso botánico francés Andrea Caesalpini [*Cesalpino*] (1519-1603), autor de *Le Plantis* (1583) y otras obras de botánica, quien fuera además, médico y filósofo **(López-González, 2006).**

Caesalpinia pulcherrima, del latín *pulcherrimus-a-um*, muy hermoso, por sus llamativas flores. Es una planta ornamental comunmente conocida como: Chacaloxóchitl "la flor del gusano"; xiloxóchitl "flor de jilote" en náhuatl, cabello de ángel, espuela de Santiago, flor de camarón, framboyán, maravillo, tabaquín; en el Estado de México se conoce como ciringuanico, sexinguanico; en Michoacán como San Agustín, siringuanico, surundanico; en Morelos como chacaloxochie, chacasúchil, chamalxóchitl; en Puebla como sutusoníl, conchagra, conchaira; en Quintana Roo como chaksekin, chak sii'k; en Yucatán como chak sü'ik (x-hazil), k'an-sink'in, sikin; en Veracruz como chazinkin, trasta-moya y en San Luis Potosí como san juse te. Su origen y distribución abarca todos los trópicos de América, África, Asia, y algunas áreas de clima mediterráneo. Es un arbusto que puede llegar a medir desde 2 hasta 4 metros de alto, muy ramificado, algo espinoso, con hojas compuestas de 5 a 10 pares de hojuelas. Las flores vistosas llegan a ser de color amarillo, anaranjado, rojo o rosa (Figura 1). Los frutos son legumbres pequeñas con 5-8 semillas **(Geilfus, 1994; Tandem, 2006; Sánchez, 2001).**



Fig 1. Flores de *Caesalpinia pulcherrima* (tomado de Yamuna & Padma, 2013).

Varias clases de compuestos como flavonoides, diterpenos y esteroides, aislados de *Caesalpinias* han demostrado una amplia variedad de actividades biológicas como antiulcerosa, antidiabética, antiinflamatoria, antireumática, antimicrobiana e incluso actividad anticancerígena (**Khatun & Rahman, 2006**) (**Baldim-Zanin et al., 2012; Maurya et al., 2011**).

En el presente trabajo se realizó una reinvestigación del estudio químico de *Caesalpinia pulcherrima*.

ANTECEDENTES

El género *Caesalpinia* ha sido objeto de diversas investigaciones, por ejemplo: *Caesalpinia pyramidalis* se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de trastornos como gastritis, indigestión, ardor y dolor de estómago. El extracto etanólico de su corteza interna fue administrado por vía oral en ratas, observando como resultado la formación capas gastroprotectoras a través de la inhibición significativa de la formación de úlceras inducidas por distintos agentes y el aumento de moco gástrico **(Ribeiro et al., 2013)**.

Del extracto etanólico de *Caesalpinia coriaria* se han descrito flavonoides glicosilados, los cuales mostraron un efecto antimicrobiano al ser ensayados con cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* al reducir su actividad enzimática. **(Anandhi et al., 2014)**.

La infusión o decocción de la corteza del tallo de *Caesalpinia paraguariensis* es utilizada tradicionalmente para tratar enfermedades severas, principalmente relacionadas con desórdenes de la piel. El ácido elágico y los respectivos derivados mono y dimetilados son los principales contribuyentes de su actividad inhibitoria de la lipoperoxidación **(Sgariglia et al., 2013)**.

Con el objetivo de encontrar los compuestos responsables de producir las actividades benéficas, se llevó a cabo un estudio de *Caesalpinia crista*, una planta medicinal con propagación en las regiones tropicales y subtropicales de Asia Sur-Oriental. Sus semillas se utilizan para tratar la tos, reumatismo e inflamación y se ha demostrado su actividad antimalárica, antiviral y anticancerosa. Del extracto metanólico de sus semillas secas se aisló el cassano 1 (Figura 2) **(Tian et al., 2013)**.

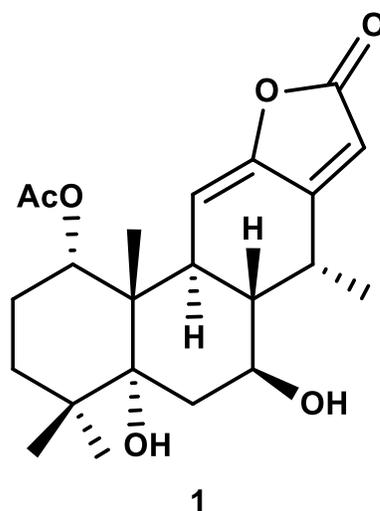


Fig 2. Estructura del cassano 1 aislado en *Caesalpinia crista*.

Del extracto de cloruro de metileno obtenida a partir de las semillas de *Caesalpinia crista* se reportaron 18 compuestos a los cuales fueron ensayados en su actividad inhibitoria sobre el crecimiento del parásito de la Malaria *Plasmodium falciparum* encontrando que el compuesto 2 (Figura 3) mostró mayor actividad inhibitoria. (Lin et al., 2005).

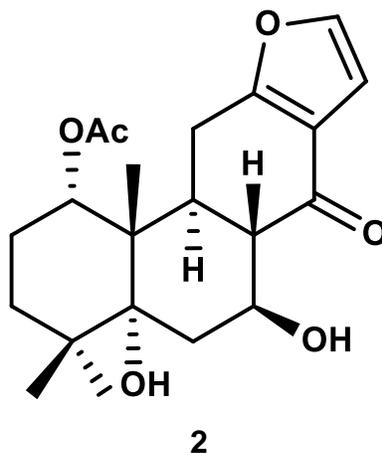


Figura 3. Estructura del norcassano 2 aislado en *Caesalpinia crista*.

Así mismo, *Caesalpinia sappan* es empleada comúnmente para el tratamiento de enfermedades como trastornos del hígado, fiebre y úlceras bucofaríngeas. De sus semillas, recolectadas en Guangxi, República Popular de

China, aislaron un nuevo cassano llamado Fangininoxi A (**3**) y otro conocido Fanginina A (**4**) (Figura 4) (Xu et al., 2013).

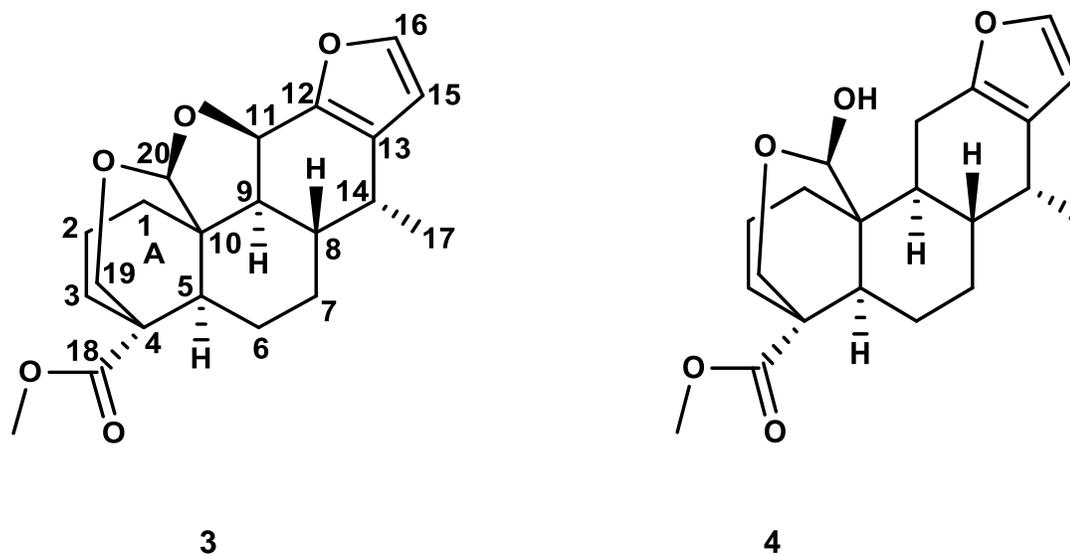


Figura 4. Cassanos de *Caesalpinia sappan*.

De los estudios realizados a *Caesalpinia pulcherrima* han surgido distintas investigaciones sobre las propiedades farmacológicas como gastoprotector contra *Helicobacter pylori* (Thombre et al., 2016), inhibidor de la enzima aldosa reductasa (Kumar et al., 2015), antioxidante (Bungihan et al., 2013; Pawar et al., 2009), citotóxica (Aker et al., 2014), antidiabética (Balasubramanian et al., 2012; Sucanya et al., 2015), antiinflamatoria (Shaikh et al., 2012; Puratchikody et al., 2005), antimicrobiana (Prakash et al., 2009) y antifúngica (Vairavasundaram et al., 2010).

Un ejemplo de éstas investigaciones fue el realizado del extracto CHCl_3 -MeOH (1:1) de las partes aéreas secas, de donde obtuvieron los compuestos 5 y 6 (Figura 5).

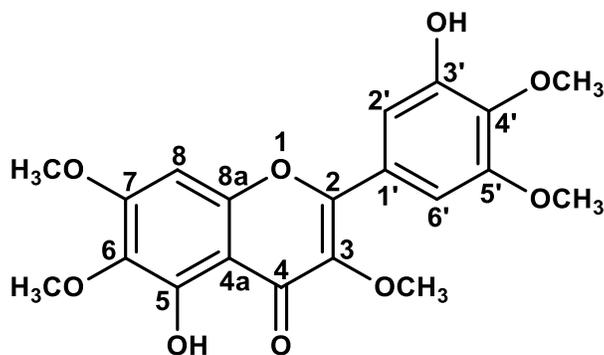
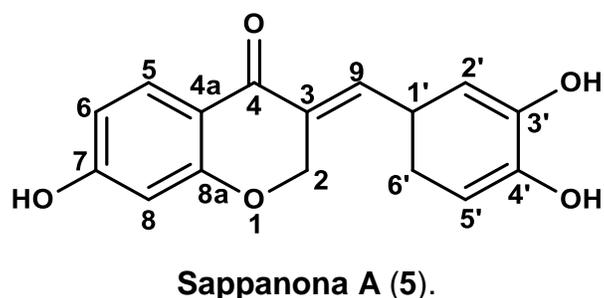
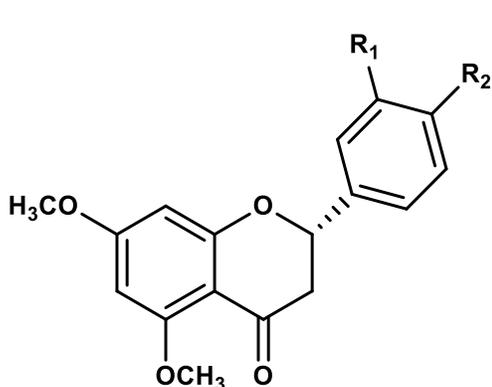


Figura 5. Compuestos derivados de la 4-chromanona aislados de *C. pulcherrima*.

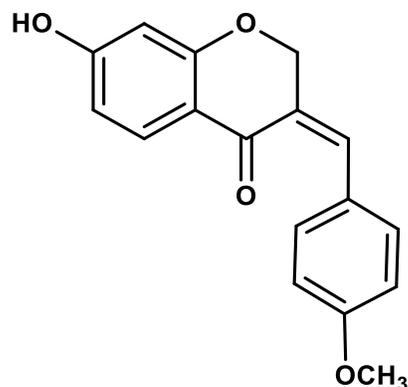
Ambos compuestos fueron ensayados para determinar su efecto inhibitorio sobre la Aldosa Reductasa (AR) la cual desempeña un papel importante en la retinopatía diabética. El estudio demostró que la flavona **6** contiene una parte activa farmacológicamente con potencial para inhibir la AR de la retina de la rata con valor de IC_{50} de $16.24 \pm 0.046 \mu M$, incidiendo en el proceso de retardo de la retinopatía diabética inducida en ratas con éste padecimiento (**Kumar et al., 2015**).

Del extracto acetónico de las partes aéreas de ésta misma especie, se aislaron cinco flavonoides (Figura 6) que presentaron actividad farmacológica como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticancerosa y antiinflamatoria (**Patil et al., 2015**).

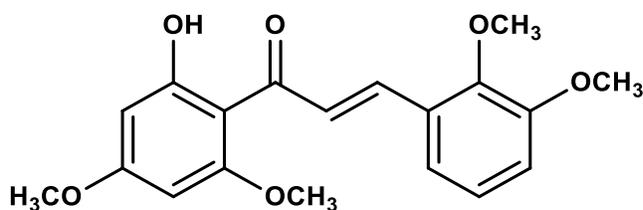


$R_1 = R_2 = H$ [5,7-Dimetoxi flavanona] (7)

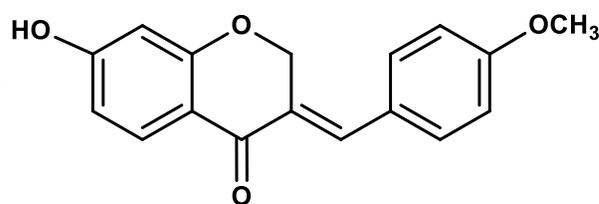
$R_1, R_2 = -OCH_2O-$ [5,7-Dimetoxi-3',
4'-metilendioxi flavanona] (8)



Isobonducellina (9)



2'-Hidroxi-2,3,4',6'-tetrametoxichalcona (10)



Bonducellina (11)

Figura 6. Flavonoides aislados de *C. pulcherrima*.

Los extractos metanólicos de tres tipos de flores de *C. pulcherrima* (naranja rosa y amarillo) fueron probados como antioxidantes ante un modelo *in vitro* de rebanadas de hígado de cabra que fueron controladas para simular un modelo *in vivo*. Los tres tipos de flores mejoraron significativamente el estado antioxidante (Yamuna & Padma., 2013).

De la flor de *Caesalpinia pulcherrima*, mediante cromatografía de gases identificaron 19 componentes de aceites, exclusivamente monoterpenoides. Los compuestos que presentaron mayor rendimiento fueron α -felandreno 36.5%, *p*-

cimeno 15.3%, γ -terpineno 7.9%, óxido *cis*-linalool 8.5%, óxido *trans*-linalool 7.9% (Ogunbinu et al., 2010).

De las partes aéreas de *C. pulcherrima*, maceradas con cloroformo-metanol (1:1), aislaron los homoisoflavonoides **12** y **13**, los cuales presentaron mayor inhibición frente a *Bacillus subtilis*, *B. sphaericus*, *S. aureus*, *Klebsiella aerogenes* y *Chromobacterium violaceum* (Figura 7) (Das et al., 2009).

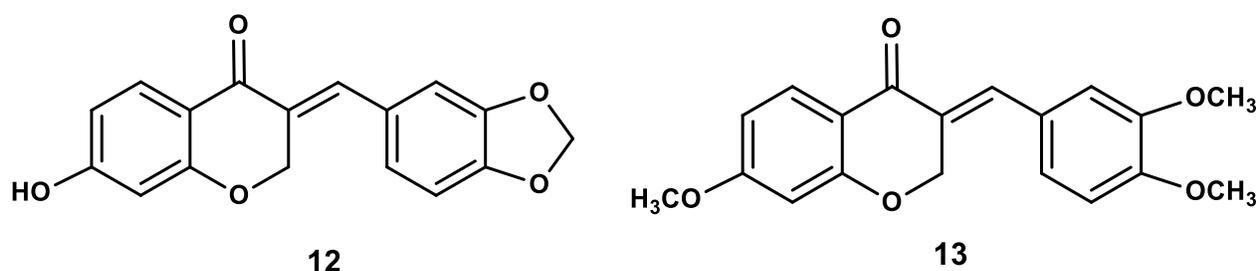


Figura 7. Estructuras de los compuestos aislados de *C. pulcherrima*.

Cassanos aislados de *C. pulcherrima* mostraron actividad citotóxica (Pranithanchai et al., 2009; Cheng et al., 2008).

Especialmente el compuesto **14** (Figura 8) mostró actividad citotóxica contra las líneas celulares HL-60 y HeLa (Das et al., 2010).

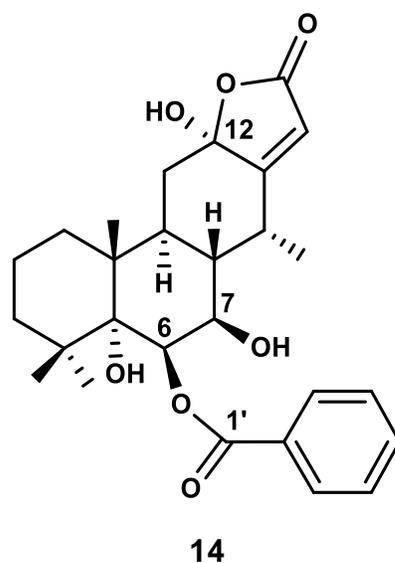


Figura 8. Cassano **14** con actividad citotóxica de *C. pulcherrima*.

Por su parte, vouacapan-5 α -ol (**15**) es un diterpeno de tipo cassano que fue aislado de las raíces de *Caesalpinia pulcherrima*. Su configuración absoluta fue determinada mediante difracción de rayos-X con el parámetro de Flack (**Fun et al., 2010**).

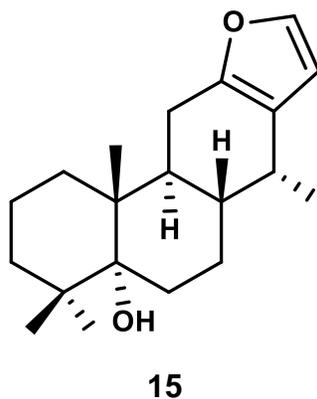


Figura 9. Cassano aislado de *C. pulcherrima*.

JUSTIFICACIÓN

La naturaleza proporciona una rica fuente de sustancias químicas de origen natural, la gran mayoría son farmacológicamente activas. Las plantas, han sido la base de los sistemas de medicina tradicional que han existido durante miles de años.

Diversos estudios han demostrado que el género *Caesalpinia* biosintetiza compuestos con actividades farmacológicas relevantes. Debido a ello, en el presente trabajo se decidió realizar el estudio químico del extracto metanólico de *Caesalpinia pulcherrima*, no obstante de ser una especie que cuenta con estudios químicos y biológicos previos, en el presente trabajo se decidió realizar un estudio químico del extracto metanólico de hojas para contribuir con la quimiotaxonomía del género.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar el estudio químico al extracto metanólico de las hojas de *Caesalpinia pulcherrima*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por bipartición del extracto metanólico.
- Aislar e identificar los metabolitos del extracto metanólico acetilado.
- Caracterizar por métodos espectroscópicos y químicos los metabolitos aislados.

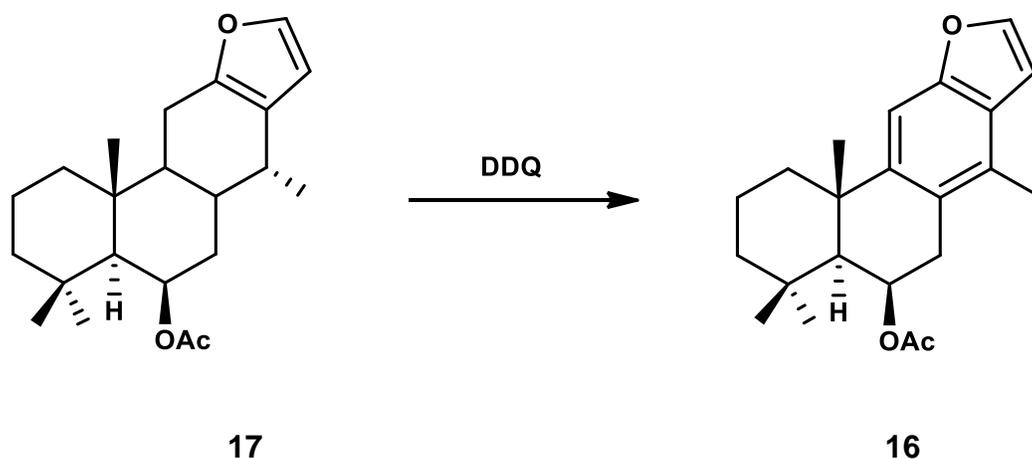
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La colecta de la especie de *Caesalpinia pulcherrima* se realizó en el rancho El Bonete, municipio de La Huacana en el Estado de Michoacán, separando sus partes aéreas y dejándose secar a la sombra. Posteriormente se maceraron 305 g de hojas con 2.7 L de metanol durante 3 días por dos ocasiones a temperatura ambiente. La maceración fue filtrada y concentrada en rotavapor a presión reducida y evaporada a sequedad. Después, se realizaron biparticiones con hexanos, cloruro de metileno y *n*-butanol, que después fueron concentradas en rotavapor.

De una fracción de 200 mg del extracto de cloruro de metileno fueron purificados a través de cromatografía en columna de 2 cm de diámetro utilizando 15 cm de gel de sílice 230-400 mallas como fase estacionaria y mezclas de hexanos-acetona en polaridad ascendente como fase móvil. En las fracciones con polaridad hexanos-acetona (17:3) se obtuvo una miel incolora. En el espectro de RMN de ^1H (Figura 10) se observó en 7.54 ppm una señal doble con $J=2.3$ Hz correspondientes al H-16, en 7.4 ppm se observó una señal simple para el protón aromático H-11. La señal del H-15 del anillo del furano se observó en 6.73 ppm como una señal doble de dobles con $J=2.3, 0.9$ Hz. En 5.84 ppm se observó una señal doble de triples con $J=5.4, 1.5$ Hz correspondiente al hidrógeno base de acetato en la posición 6. En 3.06 ppm se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 18.0 y 5.4 Hz correspondiente a H-7 y en 2.98 ppm se observó la señal para el H-7' como una señal doble con $J=18.0$ Hz. En 2.34 ppm se encontró una señal simple que integró para 3 hidrógenos correspondiente al CH_3 -17 del metilo aromático. En 1.62, 1.10 y 1.07 ppm se observaron tres señales simples correspondientes a los metilos 20, 18 y 19, respectivamente.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11) en la región de los carbonos sp^2 se observó una señal en 171.0 ppm correspondiente al carbonilo del acetato. En 153.7, 146.0, 144.4, 128.4, 125.6, 123.7, 105.1 y 104.9 ppm se observaron las señales de los carbonos del sistema benzofurano. En 67.6 ppm se ubicó la señal correspondiente al C-6 base de acetato. La señal característica del C-5 de éste esqueleto se encontró en 51.5 ppm. Por último, entre 43.0 y 16.0 ppm se observaron las señales correspondientes para el resto del esqueleto.

La comparación de los espectros de RMN con una muestra auténtica de un derivado obtenido del Vouacapano **17** oxidado con DDQ (Talavera-Alemán, 2012), indicó que se trataba del mismo compuesto. (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención del derivado **16** de manera sintética.

Cabe mencionar que ésta es la primera vez que el derivado **16** se obtiene de manera natural de *Caesalpinia pulcherrima*, anteriormente había sido aislado como componente minoritario del extracto etanólico de las partes aéreas de *Caesalpinia bonduc*, tras repetidos procesos de purificación por cromatografía por Yadav et al., 2009.

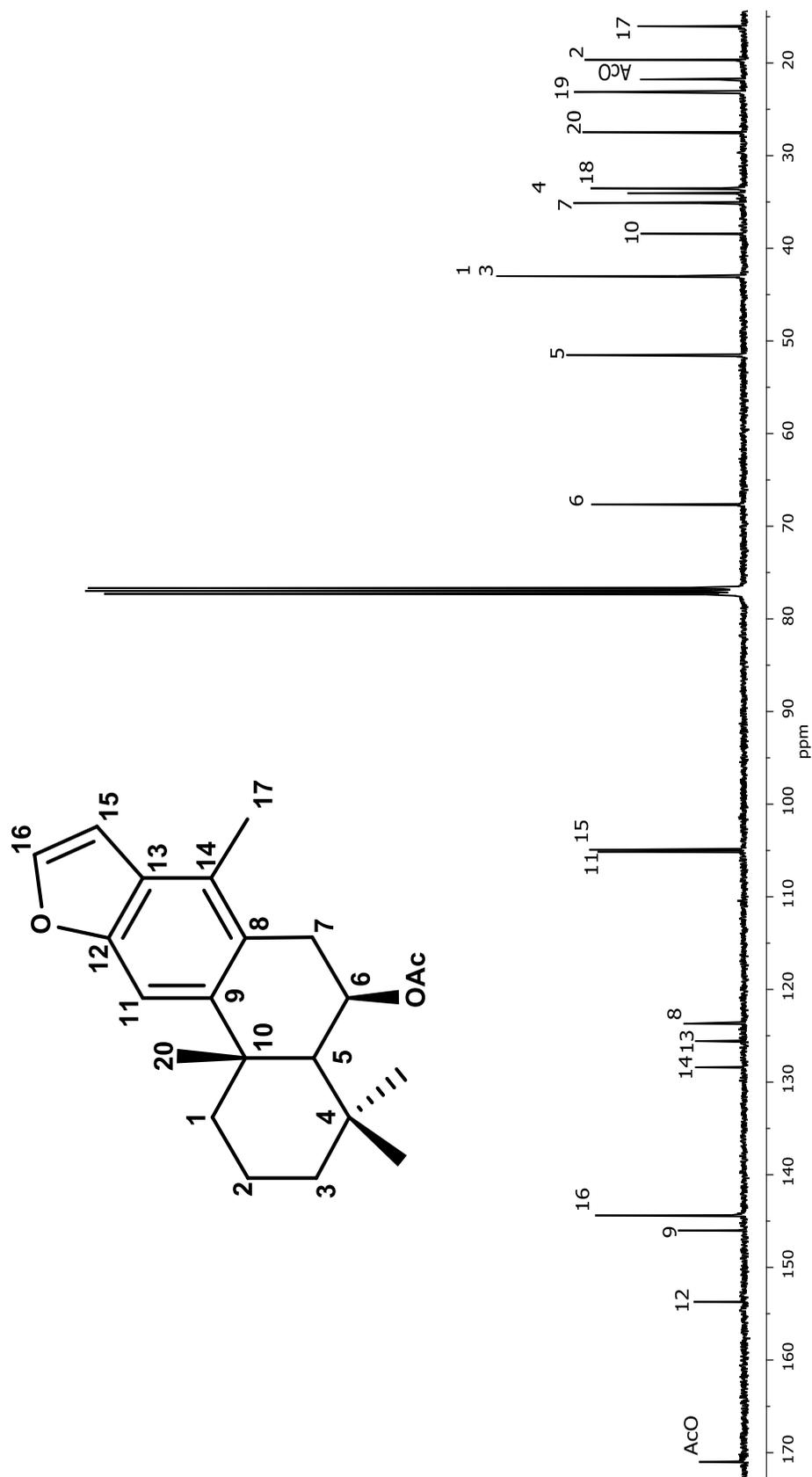


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C del 6 β -acetoxi-17-metilouacapan-8(14),9(11)-dieno (16) en CDCl_3 .

Continuando con el estudio químico, se tomó una muestra del extracto butanólico obtenido por bipartición del extracto metanólico para analizarlo mediante RMN de ^1H y determinar la naturaleza y abundancia de los componentes presentes (Figura 12) observándose en su espectro señales de hidrógenos aromáticos entre 8.0 y 6.3 ppm, así como señales en la región de los hidrógenos base de heteroátomos de 5.3 a 3.3 ppm aproximadamente, lo que sugirió que el derivado aromático se encuentra funcionalizado con un glicósido. Este patrón de señales, al ser comparado con una muestra aislada de *Bursera sarukhanii*, nos indicó que podría tratarse de 3-O-rhamnósido de miricetina (**18**) (García-Heredia, 1996).

Tras varios intentos por separar el derivado glicosilado no se logró obtener el compuesto puro, por lo que se procedió a realizar una acetilación a un gramo del extracto de MeOH disuelto en 2 mL de piridina, se le adicionaron 2 mL de anhídrido acético y se dejó reaccionar por 24 horas a temperatura ambiente obteniéndose un sólido verde oscuro el cual fue sometido a purificación en cromatografía en columna de 2 cm de diámetro, utilizando 14 cm de gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos-acetato de etilo en polaridad ascendente como fase móvil. En la fracción 43 de polaridad hexanos-acetato de etilo (1:1) se obtuvo una miel amarilla oscura. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 13) mostró 7.69 ppm una señal simple que integró para los dos protones H-6' y H-2'. En 7.30 ppm una señal doble con un $J=2.2$ Hz asignada al H-8 y en 6.84 ppm una doble con $J=2.2$ Hz asignada H-6, protones que nos confirmaron la presencia de un esqueleto flavonoide. Así mismo se observaron un grupo de señales en la región de los heteroátomos; en 5.74 ppm se observó una señal doble con una $J=1.7$ Hz característica del hidrógeno anomérico H-1'', en 5.67 ppm se observó una señal doble de doble con $J=3.3$ y 1.73 Hz correspondiente al H-2''. La señal del H-3'' se observó en 5.18 ppm como una señal doble de dobles con $J=9.8$ y 3.29 Hz, en 4.93 ppm se observó la señal del H-4'' como una señal triple con $J=9.8$ Hz lo que indica que la constante de acoplamiento de H-4 con los hidrógenos 3 y 5 posee el mismo valor. El protón H-5'' se observó en 3.82 ppm como una señal doble de cuádruples con $J=9.8$ y 6.22

Hz, mientras que el metilo de la ramnosa se observó en 0.92 ppm como una señal doble con $J=6.2$ Hz.

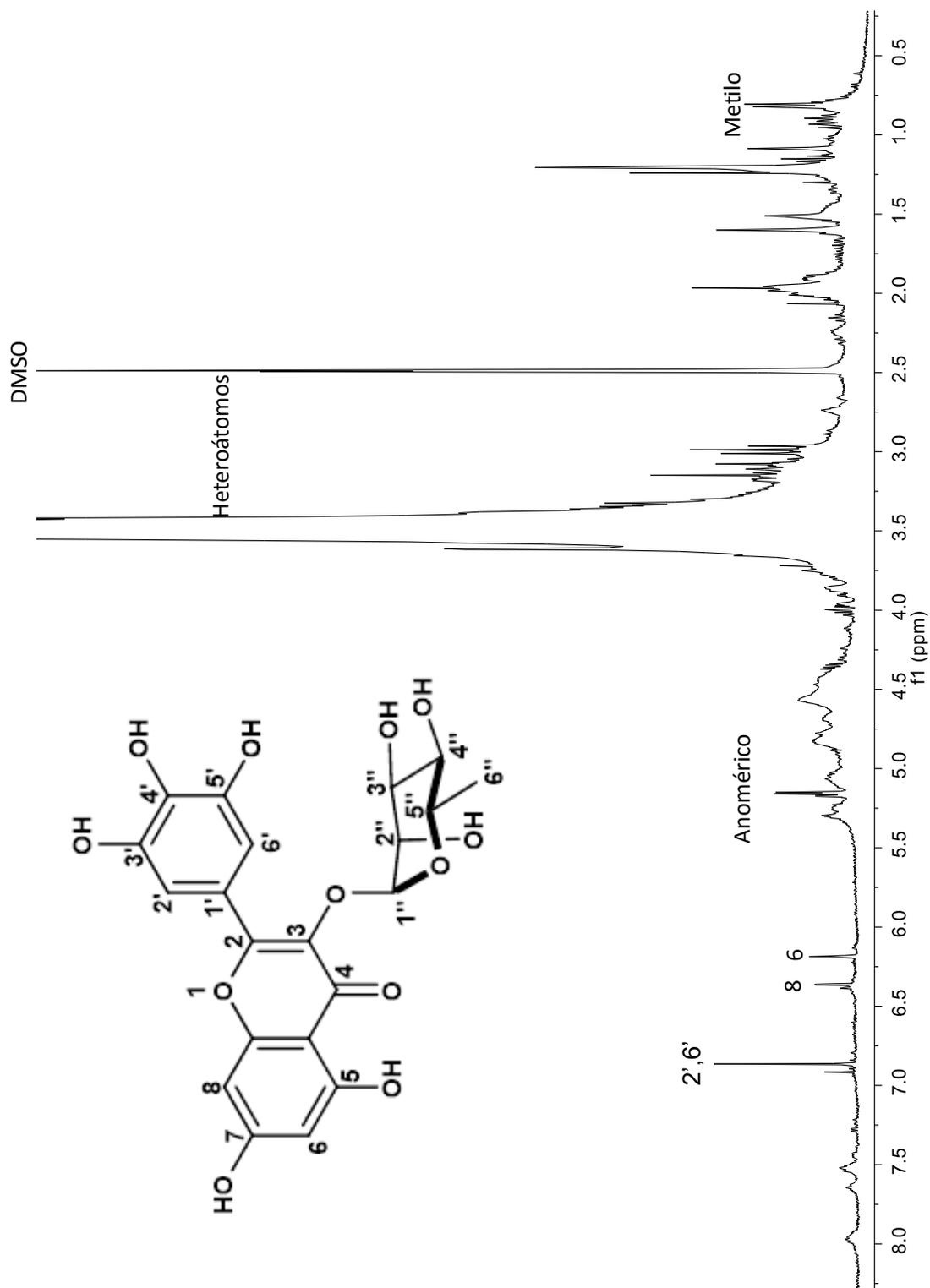


Figura 12. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del extracto metanólico de las hojas de *Caesalpinia*

Entre 1.98-2.43 ppm se observaron 7 señales correspondientes a los 8 metilos de los acetatos. Dichos datos confirman la presencia del peracetato del 3-O-rhamnósido de miricetina (**18**), ya que fueron idénticos a los comparados con **Hernández et al., 2002**. El 3-O-rhamnósido de miricetina también llamado miricetrina, aislada de las hojas de *Croton menyharthii* (**Aderogba et al., 2013; Medikizela et al., 2013; Samy et al., 2014**), fue aislado anteriormente de las vainas de *Caesalpinia pulcherrima* por **Hsu et al., 2012**. Cabe mencionar que este compuesto ha presentado diversas actividades farmacológicas como antioxidante, antimutagénica (**Haydera et al., 2008**), antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* y *Staphylococcus aureus* de la miricetrina. En Brasil fue aislada de *Mimosa artemisiana* utilizada en medicina popular como cicatrizante de quemaduras, contra la picadura de cobra y escorpión, tratamiento de dolor de cabeza, insomnio, diarrea fiebre, sedante y antiulceroso (**Nascimento et al., 2012**).

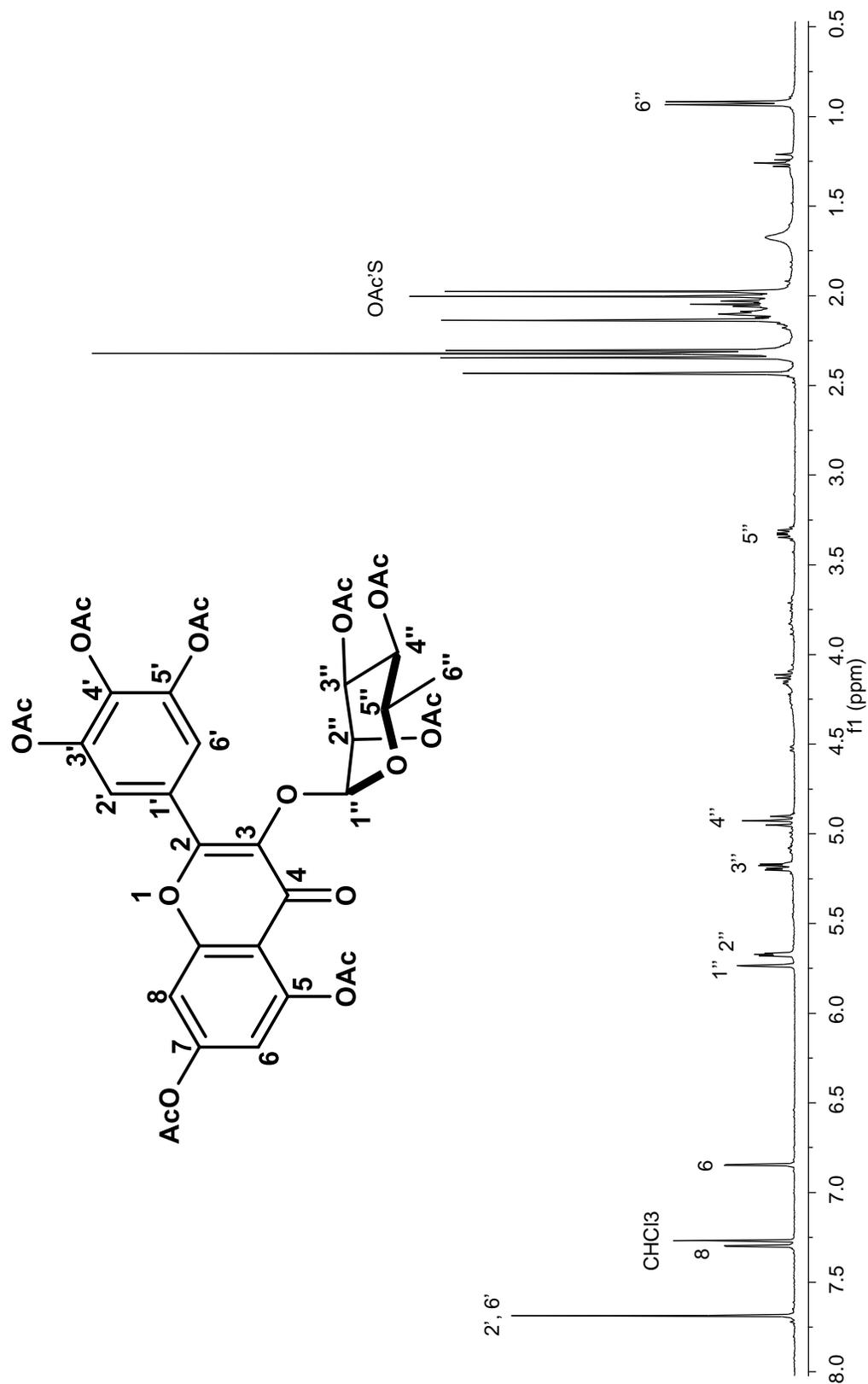
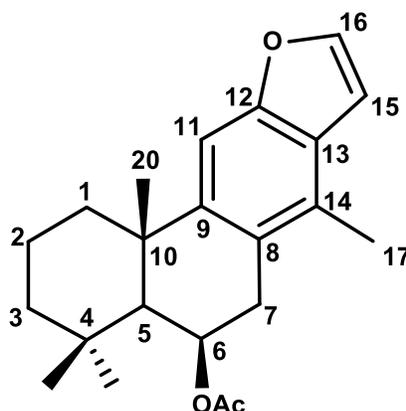


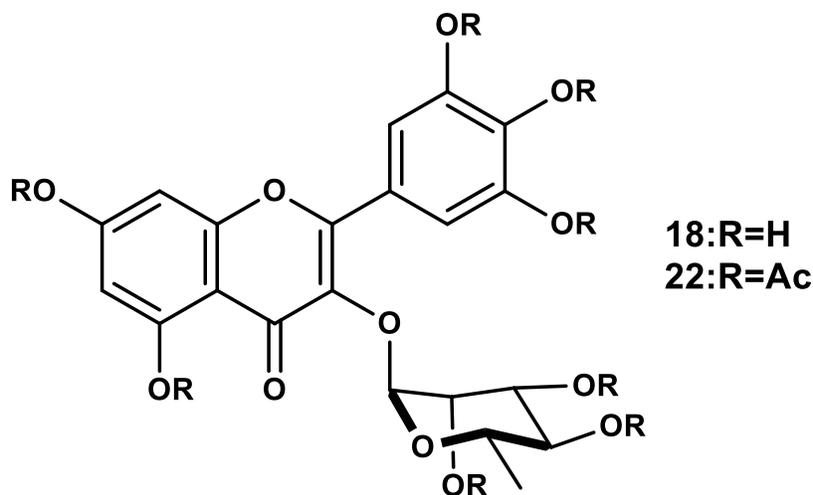
Figura 13. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del peracetato 3-O-rhamnósido de miricetrina (18).

CONCLUSIÓN

Del extracto de cloruro de metileno obtenido por bipartición de las hojas del extracto metanólico de *Caesalpinia pulcherrima* se aisló e identificó el voucapandieno **16**, es importante mencionar que, a pesar de existir varios estudios químicos de *C. pulcherrima*, es la primera vez que es aislado de las hojas de ésta especie. De la fracción butanólica obtenida por bipartición se identificó el 3-O-rhamnósido de miricetina (**22**). De la acetilación del extracto metanólico se logró aislar el derivado peracetilado 3-O-rhamnósido de miricetrina (**18**).



6β-acetoxi-17-metilvoucapan-8(14),9(11)-dieno (16).



Peracetato de 3-O-rhamnósido de miricetrina (18).

3-O-rhamnósido de miricetrina (22).

PARTE EXPERIMENTAL

GENERALIDADES:

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los diagramas bidimensionales de correlación de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR) y $^1\text{H}/^1\text{H}$ (COSY) se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400, en todas las determinaciones se utilizó como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3), salvo que se especifique algún otro disolvente y como referencia interna se utilizó tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados mediante el programa MestRe Nova 8.

Para las separaciones cromatográficas se utilizó sílica gel Merck 230-400 mallas.

Muestra Vegetal:

La planta *Caesalpinia pulcherrima*, fue colectada el 30 de marzo del 2015 en el Rancho El Bonete, municipio de La Huacana, del Estado de Michoacán. La identificación taxonómica fue realizada por el M.C Xavier Madrigal, de la Facultad de Biología de la UMSNH con número de Voucher 24526.

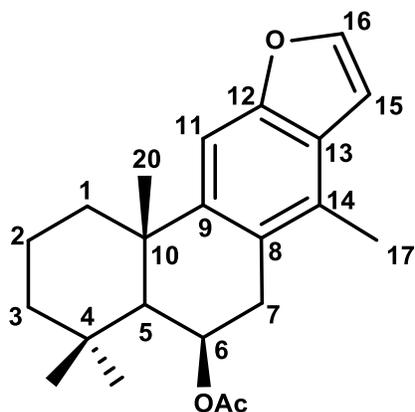
Obtención del 6 β -acetoxi-17-metilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (16).

Las hojas se separaron de las ramas y las vainas. Una vez separadas se secaron a la sombra, rotándolas para facilitar su secado. Al finalizar el secado, 140 g de hoja se maceraron con 1.2 L de metanol durante 3 días. El extractos se concentró en rotavapor y se dejó secar al aire hasta obtener un peso constante de 26.12 g.

Al extracto metanólico se le realizaron biparticiones con hexanos, cloruro de metileno, *n*-butanol. Las porciones de hexanos, cloruro de metileno y *n*-butanol se concentraron en rotavapor a presión reducida.

Del extracto de cloruro de metileno se tomaron 200 mg y se le realizó una columna cromatográfica de 2 cm de diámetro con gel de sílice de 15 cm de altura. Se disolvió la muestra en cloruro de metileno y se adicionó a la columna. Como fase móvil se usaron mezclas de hexanos-acetona en orden ascendente de polaridad. En las fracciones con polaridad hexanos-acetona (17:3) se aisló el 6 β -acetoxi-17-metilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (**16**) en forma de un sólido blanco.

6 β -acetoxi-17-metilvouacapan-8(14),9(11)-dieno (16**).**



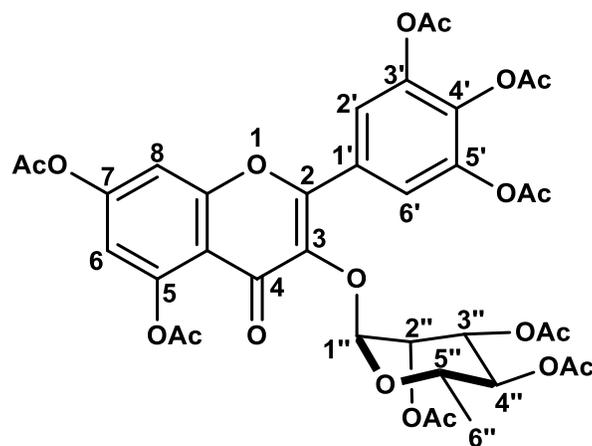
16

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-16), 7.40 (1H, s, H-11), 6.73 (dd, $J = 2.3, 0.9$ Hz, H-15), 5.84 (1H, dt, $J = 5.4, 1.5$ Hz, H-6), 3.06 (1H, dd, $J = 18.0, 5.4$ Hz, H-7), 2.98 (1H, d, $J = 18.0$ Hz, H-7'), 2.34 (3H, s, H-17), 2.32 (1H, da, $J = 16.8$ Hz, H-1), 2.02 (3H, s, OAc), 1.88 (1H, qt, $J = 13.8, 3.6$ Hz, H-2), 1.65 (1H, dt, $J = 13.8, 3.6$ Hz, H), 1.62 (3H, s, H-20), 1.58 (1H, s, H-5), 1.49 (1H, m, H-1'), 1.44 (1H, m, H-3), 1.25 (1H, td, $J = 13.5, 3.6$ Hz, H-3'), 1.10 (3H, s, H-18), 1.07 (3H, s, H-19).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 171.0 (CO, OAc), 153.7 (C, C-12), 146.0 (C, C-9), 144.4 (CH, C-16), 128.4 (C, C-14), 125.6 (C, C-13), 123.7 (C, C-8), 105.1 (CH, C-11), 104.9 (CH, C-15), 67.6 (CH, C-6), 51.5 (CH, C-5), 43.0 (CH_2 , C-3), 43.0 (CH_2 , C-1), 38.4 (C, C-10), 35.1 (CH_2 , C-7), 34.1 (C, C-4), 33.5 (CH_3 , C-18), 27.5 (CH_3 , C-20), 23.1 (CH_3 , C-19), 21.8 (CH_3 , OAc), 19.7 (CH_2 , C-2), 16.0 (CH_3 , C-17).

Acetilación del extracto metanólico.

A una solución de un gramo del extracto metanólico de *C. pulcherrima* en 2 mL de piridina se le adicionaron 2 mL de anhídrido acético en un baño de hielo. La mezcla de reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con agua solución de ácido clorhídrico al 10%, agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua. Se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y concentró en rotavapor. De la reacción de acetilación del extracto metanólico crudo se obtuvo 1g de un sólido verde oscuro, el cual se impregnó en 1 g de sílice en una columna de 2 cm de diámetro y 14 cm de altura de gel de sílice para realizar una fragmentación con una mezcla de disolventes de hexanos-acetato de etilo en orden ascendente de polaridad cada 50 mL. En la fracción 43 a polaridad hexanos-acetato de etilo (1:1) se aisló el peracetato 3-O-rhamnósido de miricetrina (**18**) en forma de sólido amarillo oscuro.

Peracetato de 3-O-rhamnósido de miricetrina (18).**18**

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (2H, s, H-6'-H-2'), 7.30 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-8), 6.84 (1H, d, $J= 2.2$ Hz, H-6), 5.74 (1H, d, $J= 1.7$ Hz, H-1''), 5.67 (1H, dd, $J= 3.3, 1.73$ Hz, H-2''), 5.18 (1H, dd, $J= 9.8, 3.29$ Hz, H-3''), 4.93 (1H, t, $J= 9.8$ Hz, H-4''), 3.82 (1H, dq, $J= 9.8, 6.22$ Hz, H-5''), 0.92 (3H, d, $J= 6.2$ Hz, CH_3 -6''), 1.98-2.43 (24H, s, OAc's).

BIBLIOGRAFÍA

- Aderogba M. A., Ndhlala A. R., Rengasamy K. R. R., Van Staden J. Antimicrobial and selected *In Vitro* enzyme inhibitory effects of leaf extracts, flavonols and indole alkaloids isolated from *Croton menyharthii*. *Molecules*. **2013**, 18, 12633-12644.
- Akter R., Uddin S. J., Grice I. D., Tiralongo, E. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. *Journal of Natural Medicines*. **2014**, 68, 246-252.
- Anandhi D., Srinivasan P. T., Praveen Kumar G., Jagatheesh S. Influence of flavonoids and glycosides from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) wild as bactericidal compound. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **2014**, 3, 1043-1051.
- Balasubramanian V., Seetaram P., Gayasuddin Md., Venkataiah G. Demonstration of β -cell regeneration and anti-diabetic activity of *Caesalpinia pulcherrima* flower extract in alloxan induced diabetic rats. *Pharmacia Lettre*. **2012**, 4, 1692-1697.
- Baldim-Zanin J. L., Carvalho B. A. de, Salles-Martineli P., dos Santos M. H., Lago J. H. G., Sartorelli P., Viegas Jr. C., Soares M. G. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules*. **2012**, 17, 7887-7902.
- Cheng J., Roach J. S., McLean S., Reynolds W. F., Tinto W. F. Three new cassane diterpenes from *Caesalpinia pulcherrima*. *Natural Product Communications*. **2008**, 3, 1751-1754.
- Cué-Bär E. M., Villaseñor J. L., Arredondo-Amezcuca L., Cornejo-Tenorio G. Ibarra-Manríquez G. La Flora Arbórea de Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **2006**, 78, 47-81.
- Das B., Srinivas Y., Sudhakar C., Mahender I., Laxminarayana K., Reddy P. R., Raju T. V., Jakka N. M., Rao J. V. New diterpenoids from *Caesalpinia* species and their cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2010**, 20, 2847-2850.

- Das B., Thirupathi P., Ravikanth B., Kumar R. A., Sarma A. L. S., Basha S. J. Isolation, Synthesis, and Bioactivity of Homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2009**, 57, 1139-1141.
- Estrada B.M., Asunción M. C. Determination of the antioxidant, phytochemical and antibacterial profiles of flowers from selected ornamental plants in Nueva Vizcaya, Philippines. *Journal of Agricultural Science and Technology B*. **2013**, 3, 833-841.
- Fun H. K., Yodsaoue O., Chantrapromma S., Karalai C. Absolute configuration of voucapen-5 α -ol. *Acta Crystallographica Section E*. **2010**, 66, 2166-2167.
- García-Heredia L. Glicosidos flavonoides de hojas de cuatro especies del género *Bursera*. Tesis presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH. **1996**.
- Gelifus F. El arbol al servicio del agricultor Manual de forestería para el servicio rural. Editorial *Enda Caribe*. **1994**, Costa Rica.
- Haydera N., Bouhlela I., Skandrania I., Kadric M., Steimanc R., Guiraudc P., Mariotteb A.M., Ghediraa K., Dijoux-Francab M.G., Chekir-Ghedir L. *In vitro* antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricetin-3-O-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray, *Toxicology in vitro*, **2008**, 22, 567–581.
- Hernández J. D., García L, Hernández A., Álvarez R., Urania Román L. Glicósidos de luteolina y miricetrina de Burseaceae. *Revista de la Siedad Química de México*. **2002**, 295-300.
- Hsu F. L., Huang W. J., Wu T. H., Lee M. H., Chen L. C., Lu H. J., Hou W. C., Lin M. H. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of polyphenolics from pods of *Caesalpinia pulcherrima*. *International Journal of Molecular Sciences*. **2012**, 13, 6073-6088.
- Ikan R. Natural Products: A Laboratory Guide. 2a Edit. *Academic Press, Inc*. **1991**. California.
- Khatun B. M. R., Rahman M. O. Taxonomic Revision of the genus *Caesalpinia* L. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*. **2006**, 12, 93-109.

- Kumar M. P., Sankeshi V., Naik R. R., Thirupathi P., Biswanath D., Raju T.N. The inhibitory effect of Isoflavones isolated from *Caesalpinia pulcherrima* on aldose reductase in STZ induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. **2015**, 237, 18-24.
- Lin T. Z., Awale S., Tezuka Y., Banskota A. H., Kalauni S. K., Attamimi F., Ueda J., Setia Asih P. B., Syafruddin D., Tanaka K, Kadota S. Cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and their antimalarial activity against the growth of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Natural Products*. **2005**, 68, 706-710.
- López-González, G.A. Los árboles y arbustos de la península ibérica e islas Baleares tomo 1. Ediciones *Mundi Prensa*, **2006**, Madrid.
- Madikizela B., Aderogba M. A., Van Staden J. Isolation and characterization of antimicrobial constituents of *Searsia chirindensis* L. (Antracardiaceae) leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 150, 609-613.
- Marcano D., Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. *Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico*. **2002**. Caracas.
- Maurya R., Ravi M., Singh S., Yadav P. P. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*. **2012**, 83, 272-280.
- Nascimento I. A., Braz-Filho R., Carvalho M. G., Mathias L., Fonseca F. A. Flavonoides e outros compostos isolados de *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. *Quimica Nova Journal*. **2012**, 11, 2159-2164.
- Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. **2016**, 79, 629-661.
- Newman D.J., Cragg G. M., Snader K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Reports*. **2000**, 17, 215-234.
- Ogunbinu A. O., Okeniyi S., Flamini G., Cioni P.L., Ogunwande A. Monoterpenoid constituents of the volatile oil of *Cynometra megalophylla* Harms., *Caesalpinia pulcherrima* L. Swartz and *Pachylobus edulis* G. Don., growing in Nigeria. *Journal of Essential Oil Research*, **2010**, 22, 536-539.
- Park K. S., Chong Y., Kim M. K. Myricetin: biological activity related to human health. *Applied Biological Chemistry*. **2016**, 59, 259-269.

- Patil N., Vaishnav R. J., Thanusubramanian H., Holla S. N., Manohar H. D., Bairy K. L. Formulation and evaluation of the hydroalcoholic extract of *Caesalpinia Pulcherrima* (Stem bark) on wound healing model in wistar rats. *International Journal of Advanced Research*. **2015**, 3, 648-654.
- Pawar, C. R., Mutha, R. E., Landge, A. D., Jadhav, R. B., Surana, S. J. Antioxidant and cytotoxic activities of *Caesalpinia pulcherrima* wood. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. **2009**, 46, 198-200.
- Prakash, S. B., Sharmistha, P., Kumar, A. R. Antibacterial activity of methanolic extract of roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *International Journal of Chemical Sciences*. **2009**, 7 (1), 16-18.
- Pranithanchai W., Karalai C., Ponglimanont C., Subhadhirasakul S., Chantrapromma K. Cassane diterpenoids from the stem of *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry*. **2009**, 20, 2847-2850.
- Puratchikody, A., Nagalakshmi, G. Antiinflammatory and analgesic activity of *Caesalpinia pulcherrima* linn. leaf extracts. *Asian Journal of Chemistry*. **2005**, 17, 1902-1906.
- Ribeiro A. R. S., Diniz P. B. F., Estevam C. S., Pinheiro M. S. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 147, 383-388.
- Samy M. N., Sugimoto S., Matsunami K., Outsuka H., Kamel M. S. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. *Journal of Natural Products*. **2014**, 7, 37-47.
- Sánchez de Lorenzo-Cáceres J. M. Guía de las Plantas Ornamentales. Editorial S.A. *Mundi-Prensa Libros*. **2001**. España.
- Sgariglia M. A., Soberón J. R., Poveda Cabanes A., Sampietro D. A.. Anti-inflammatory properties of phenolic lactones isolated from *Caesalpinia paraguariensis* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*. **2013**, 147, 63-73.
- Shaikh M. M., Kruger H. G., Bodenstein J., Smith P., Toit, K. Anti-inflammatory activities of selected synthetic homoisoflavanones. *Natural Product Research*. **2012**, 26, 1473-1482.

- Talavera-Alemán Armando. Estudio del comportamiento químico de diterpenofuranos naturales bajo condiciones de transformación oxidativa. Tesis presentada en el IIQB-UMSNH. **2014**.
- Tandem V. G. Botánica, Guía Ilustrada de Plantas Más de 10000 Especies de la A a la Z y Cómo Cultivarlas. Edit. *Gordon Cheers*. **2006**. p164.
- Thombre N. A., Guide P. S. Floating-bioadhesive gastroretentive *Caesalpinia pulcherrima*-based beads of amoxicillin trihydrate for *Helicobacter pylori* eradication. *Drug Delivery*. **2016**, 23, 405-419.
- Tian Q. J., Ou Y. H., He X. B., Liu B., Jiang Y. D. One new antitumour cassane-type diterpene from *Caesalpinia crista*. *Natural Product Research*. **2013**, 27, 537–540.
- Vairavasundaram R. P., Senthil K. Antidermatophytic activity of *Caesalpinia pulcherrima*. *BioChemistry: An Indian Journal*. **2010**, 4, 122-125.
- Villaseñor J. L., Ibarra-Manríquez G. La riqueza arbórea de México. *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara*. **1998**, 5, 95-105.
- Xu Y. J., Zhang J., Tang C. P. A new diterpenoid from the seeds of *Caesalpinia sappan* Linn. *Records of Natural Products*. **2013**, 7:2, 124-128.
- Yadav P. P., Maurya R., Sarkar J., Arora A., Kanojiya S., Sinha Sudhir, Srivastava M. N., Raghubir R., *Phytochemistry*., **2009**, 70, 256–261.
- Yamuna S.T., Padma P.R. Antioxidant potential of the flowers of *Caesalpinia pulcherrima*, Swartz in an in vitro system subjected to oxidative stress. *Journal of Pharmacy Research*. **2013**, 7, 661-665.