



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Maestría en Ciencias Químicas

**Estudio químico dirigido al aislamiento y caracterización de cassanos de
Caesalpinia platyloba.**

Tesis

Que para obtener el título de:
Maestro en Ciencias Químicas

Presenta:

Q.F.B. Esaú Neftalí Hernández Reynoso

Directores:

D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres

D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado

Morelia, Michoacán, febrero de 2024.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en la Ciudad de Morelia, Michoacán; bajo la dirección de la D. C. Rosa Elva Norma del Río Torres, con apoyo económico de la CIC.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme brindado los medios necesarios para mi desarrollo académico.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por la oportunidad de cursar mis estudios en el programa de Maestría en Ciencias Químicas.

Al CONACyT por la beca otorgada con numero de apoyo 774272.

A la D.C. Rosa Elva Norma del Rio Torres y al D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, mis asesores, por la hospitalidad en su equipo de trabajo; por la confianza, la paciencia, las observaciones y el consejo brindados en la realización de este proyecto; por su generosidad y su calidad humana.

A los miembros de mi comité tutorial: D.Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. Yliana López Castro y D.C. Edgar García Sánchez por sus opiniones, aportaciones y correcciones a esta investigación.

A la D.C. Concepción Armenta Salinas del IIQB-UMSNH por su apoyo en el procesamiento de las muestras para obtener los espectros de RMN.

A mis compañeros y amigos del IIQB Gaby, Goretti, Monse, Toño, Ulises, Irving, Yoaly, Lissa, Dalia, Eva y Armando por hacer mi estancia mucho más amena y por todos los momentos que guardo en mi memoria. En especial a Ode y Sinu por su apoyo y cariño incondicionales.

A mi familia: Zary y L, mis hermanos, y Lalo y Lupita, mis padres, por el amor, el apoyo y la confianza que siempre depositan en mí.

ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS.	IV
ÍNDICE.	V
ÍNDICE DE FIGURAS.	VI
RESUMEN.	VIII
ABSTRACT.	IX
INTRODUCCIÓN.	1
ANTECEDENTES.	5
JUSTIFICACIÓN.	17
OBJETIVOS.	18
Objetivo general.	18
Objetivos específicos.	18
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	19
Material vegetal	19
Extractos de <i>Caesalpinia platyloba</i> .	19
Purificación de (13 <i>E</i>)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (73).	25
Purificación de 6 β -acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (11).	30
CONCLUSIÓN.	38
PARTE EXPERIMENTAL.	39
Generalidades.	39
Material vegetal.	39
Obtención de extractos.	39
Obtención de (13 <i>E</i>)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (73).	39
Obtención de 6 β -acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (11).	40
REFERENCIAS	42

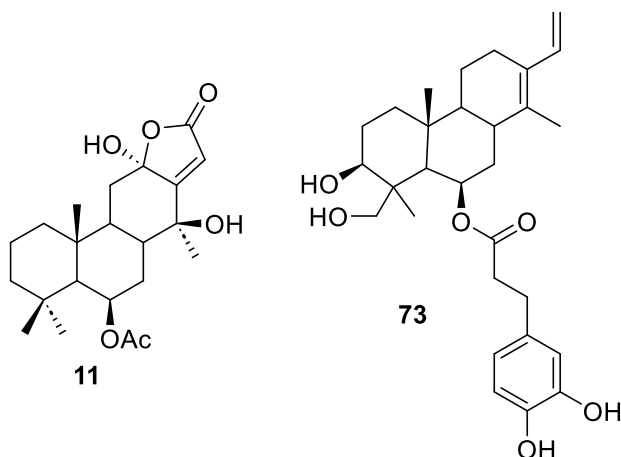
ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Esqueleto base de los cassanos.	3
Figura 2 Cassanos aislados de la raíz de <i>C. bonduc</i>	5
Figura 3 Cassanos aislados del extracto etanólico de la raíz de <i>C. bonduc</i>	6
Figura 4 Cassanos aislados del extracto etanólico de la planta de <i>C. bonduc</i>	7
Figura 5 Cassanos aislados de las semillas de <i>C. crista</i>	7
Figura 6 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia crista</i>	8
Figura 7 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia cucullata</i>	8
Figura 8 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia decapetala</i>	9
Figura 9 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia echinata</i>	10
Figura 10 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia magnifoliolata</i>	11
Figura 11 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia major</i>	11
Figura 12 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia minax</i>	12
Figura 13 Casanos aislados de <i>Caesalpinia sinensis</i>	13
Figura 14 Cassanos aislados de los tallos de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	14
Figura 15 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	15
Figura 16 Cassanos aislados de <i>Caesalpinia platyloba</i>	16
Figura 17 Cassadientos de <i>Caesalpinia platyloba</i>	16
Figura 18 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de hojas septiembre 2020.	21
Figura 19 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de tallos.	22
Figura 20 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de hojas mayo 2021.	23
Figura 21 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del barrido metanólico del extracto CH_2Cl_2 de hojas en $\text{DMSO}-d_6$	24
Figura 22 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 73 en $\text{DMSO}-d_6$	27
Figura 23 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 73 trazo inferior. Trazo superior + D_2O	28
Figura 24 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del cassano 73 en $\text{DMSO}-d_6$	29
Figura 25 Estructura del (13 <i>E</i>)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno.	30
Figura 26 Estructuras de derivados aislados de <i>C. bonduc</i>	31

Figura 27 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 11 en DMSO- d_6	32
Figura 28 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto 11 en DMSO- d_6	33
Figura 29 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto 11 en Piridina- d_5	34
Figura 30 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto 11 en Piridina- d_5	35
Figura 31 Trazo superior: espectro en Piridina, trazo inferior: espectro en DMSO.....	37

RESUMEN.

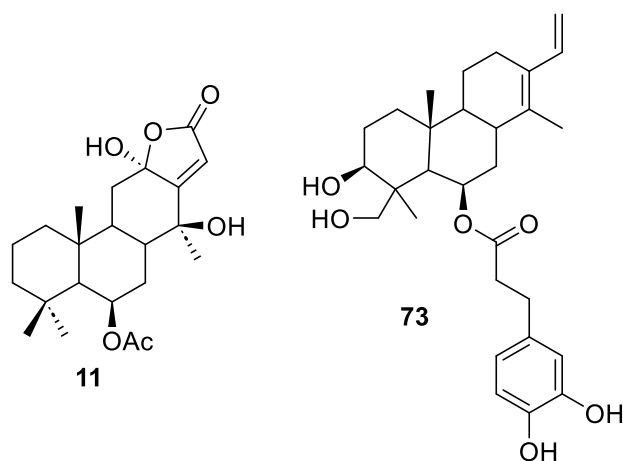
En el presente trabajo se describe la reinvestigación química del extracto de cloruro de metileno de hojas de *Caesalpinia platyloba* colectada en la localidad de Los Charcos, municipio de Buenavista Tomatlán, Michoacán. La separación del extracto realizado por medio de columnas cromatográficas, condujo al aislamiento e identificación de dos diterpenos de tipo cassano. El cassano **11** correspondió al 6 β -acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (**11**) de estructura conocida. El cassadieno **73** correspondió a un compuesto novedoso del cual no existen reportes el (13*E*)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (**73**). Ambos fueron identificados mediante el análisis de los datos físicos y espectroscópicos.



Palabras clave: Cassadienos, *Caesalpinia platyloba*, *Coulteria platyloba*, diterpenos, fitoquímica

ABSTRACT.

The present work describes the chemical reinvestigation of the methylene chloride extract of *Caesalpinia platyloba* leaves collected in the locality of Los Charcos, municipality of Buenavista Tomatlán, Michoacán. Separation of the extract performed by chromatographic columns, led to the isolation and identification of two cassane-type diterpenes. Cassane **11** corresponded to 6 β -acetoxy-12,14-dihydroxycassa-(13)15-en-16,12-olide (**11**) of known structure. Cassadiene **73** corresponded to a novel compound for which there are no reports the (13*E*)-3,18-dihydroxy-6-(2',3'-dihydrocaffeoyl)cassa-13,15-diene (**73**). Both were identified by analysis of physical and spectroscopic data.



Key words: Cassadienes, *Caesalpinia platyloba*, *Coulteria platyloba*, diterpenes, phytochemistry

INTRODUCCIÓN.

Todos los organismos enfrentan desafíos bióticos y abióticos a lo largo de su vida. Según la teoría de la Selección Natural, los organismos más aptos tienen el potencial genético para defenderse, resistir o evitar las consecuencias del estrés que obstaculizan sus funciones fisiológicas, permitiéndoles crecer, desarrollarse, sobrevivir y reproducirse. Las plantas, al ser organismos sésiles, están continuamente expuestas a distintos tipos de estrés, como el ataque de herbívoros o patógenos, la sequía, la salinidad, la radiación ultravioleta, las temperaturas extremas y los desequilibrios nutricionales en los entornos naturales (Jan et al., 2021); han desarrollado varios tipos de compuestos orgánicos en respuesta al estrés al que se encuentran sometidas (Teklić et al., 2021). De esta forma, aseguran la competitividad y supervivencia en condiciones adversas.

Los compuestos químicos producidos por las células de los seres vivos se conocen como metabolitos y se clasifican como primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todos los procesos necesarios para mantener vivo y en desarrollo al organismo. Comprenden los glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los metabolitos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales, algunos de ellos son aprovechados por el organismo que los sintetiza para interactuar con su entorno (Ringuelet & Viña, 2013).

Históricamente, a estos compuestos se les ha denominado “productos naturales” o “metabolitos secundarios”, en las plantas los productos naturales se clasifican en tres grandes familias: los terpenos, los alcaloides y los compuestos fenólicos (Gershenzon & Dudareva, 2007; Qaderi et al., 2023).

Los metabolitos secundarios de las plantas están involucrados en una amplia gama de actividades, incluido el desarrollo de la planta, la defensa, la señalización de la respuesta defensiva y la respuesta al estrés; también brindan tareas vitales, como combatir enfermedades y plagas, funcionar como señales para la simbiosis planta-microorganismo y alterar las poblaciones microbianas asociadas con los huéspedes (Karen, 2022).

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como

materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico o interés industrial, como estructuras privilegiadas que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos. Sin lugar a duda los productos naturales son estructuras biológicamente validadas a través de la coevolución con el resto de los seres vivos (Ravelo & Braun, 2009).

Aunque la distribución de los metabolitos primarios es universal, no es el caso de los metabolitos secundarios, ya que están restringidos a familias, géneros e incluso a especies, debido a que estos metabolitos son producto de un largo proceso de coevolución de las especies y se producen como una respuesta adaptativa al ecosistema en el que se encuentran (Kroymann, 2011).

Las relaciones recíprocas de las plantas y los herbívoros que se alimentan de ellas han producido una respuesta escalonada de coevolución que llevó a una gran diversidad estructural de metabolitos secundarios con potenciales actividades biológicas (Ehrlich & Raven, 1964).

Desde hace miles de años los seres humanos han encontrado en la naturaleza sustancias derivadas de plantas, animales, hongos, microorganismos y minerales que han utilizado como medicamentos para mejorar su salud.

Las plantas medicinales son una fuente importante de moléculas novedosas potencialmente bioactivas, por lo que es importante su estudio para dar validez a su uso medicinal, generar medicamentos basados en productos naturales económicos y descubrir nuevos prototipos de fármacos. (Zanin et al., 2012).

Los productos naturales y sus derivados siguen siendo cruciales para el descubrimiento de fármacos, a pesar de que el ingenio humano ha creado una gran variedad de compuestos químicos con una actividad farmacéutica excepcional sin inspiración de la naturaleza. La recolección de materiales de plantas, la preparación de extractos a partir de estos materiales, la purificación de los principios bioactivos mediante fraccionamiento y la caracterización son etapas necesarias para la producción de nuevos fármacos a partir de compuestos naturales (Cox & King, 2013).

Los metabolitos secundarios son una expresión bioquímica de la individualidad de las especies, ya que se encuentran solo en organismos o grupos de organismos específicos, no se producen en todas las condiciones y, en la mayoría de los casos, se desconoce la función

de estos compuestos y su beneficio para el organismo. Sin embargo, algunos se producen como materiales tóxicos que brindan defensa contra los depredadores, como atrayentes volátiles hacia la misma u otra especie, o como agentes colorantes para atraer o advertir a otras especies (Dewick, 2009).

Los terpenos son el grupo más grande de productos naturales que se encuentran principalmente en las plantas, aunque también se encuentran en los animales; los esteroides y el escualeno. Son responsables del aroma, sabor y pigmentación de las plantas. Estos se clasifican según la organización y la cantidad de unidades de isopreno que contienen (Tissier et al., 2014).

Las funciones de los terpenos no se limitan a ser pigmentos, aromas o saborizantes, sino que también tienen importantes efectos terapéuticos, lo que los hace interesantes para aplicaciones en medicina, biotecnología, industria farmacéutica y cosmética (Gershenzon & Dudareva, 2007).

Los diterpenos son compuestos no volátiles con 20 átomos de carbono, formados por cuatro unidades de isopreno. Son metabolitos de una variedad de organismos, incluidos plantas, animales, hongos, bacterias, algunos insectos y organismos marinos. Tienen una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas, y muchos de ellos, como el taxol, la oridonina, el ginkgólido y el andrografólido, se utilizan en los productos farmacéuticos comercializados actualmente (Abdallah & Quax, 2017; Demain & Fang, 2000).

Un tipo importante de diterpenos son los cassanos, que se encuentran principalmente en plantas de la familia Fabaceae, especialmente en las del género *Caesalpinia*. Estos compuestos se biosintetizan a partir del pimarano en la ruta de los diterpenos y se caracterizan estructuralmente por un esqueleto tricíclico con un grupo etilo en el C-13 y un grupo metilo en el C-14 (**Figura 1**) (Maurya et al., 2012).

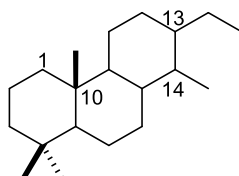


Figura 1 Esqueleto base de los cassanos.

El género *Caesalpinia* es particularmente rico en diterpencassanos, que son los constituyentes principales y compuestos químicos característicos de estas plantas medicinales (Jing et al., 2019). Los diterpenocassanos, junto con sus actividades biológicas, se han convertido en objetivos especialmente atractivos para el descubrimiento de compuestos líderes, debido a que gracias a sus esqueletos tricíclicos altamente funcionalizados, poseen actividades farmacológicas importantes (Li et al., 2020). Se han aislado cassanos estructuralmente diversos, con diferentes tamaños de anillo, sustituciones y potencial farmacológico, ya que han demostrado tener una amplia gama de actividades biológicas como antitumorales, antipalúdicos, antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos, antitripanosomales, cardiotónica, antinociceptivos, antioxidantes y antituberculosa (Kalauni et al., 2006).

En esta investigación se realizó la búsqueda de cassanos minoritarios presentes en las hojas de *Caesalpinia platyloba*.

ANTECEDENTES.

El género *Caesalpinia*, perteneciente a la familia Fabaceae, tiene más de 200 especies que se distribuyen por todo el mundo, principalmente en regiones tropicales o subtropicales, en las que se incluyen árboles, arbustos y trepadoras leñosas que se cultivan como plantas ornamentales, estas plantas son conocidas por sus propiedades medicinales (Vij et al., 2023) y constituyen una fuente importante de sustancias bioactivas, se ha demostrado que las plantas del género *Caesalpinia* contienen diferentes clases de constituyentes, como polisacáridos, derivados fenólicos, saponinas, flavonoides y terpenoides (Pournaghi et al., 2020).

Especies de este género han sido utilizadas en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo, este uso se ha validado mediante estudios que demostraron que estas plantas exhiben actividades farmacológicas, como actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antipiréticas, antimicrobianas, antipalúdicas, antirreumáticas, antiulcerosas y antidiabéticas (Gilani et al., 2019).

La especie *C. bonduc* es usada en la medicina tradicional de India y el Caribe, ya que posee actividades antipiréticas, febrífugas, antiinflamatorias y antidiarreicas, por lo que, ha sido objeto de numerosos estudios en los que se reporta el aislamiento de compuestos de tipo cassano (**Figura 2**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Del extracto etanólico de las raíces aislaron tres cassanos, caesaldecarina C (**1**), caesaldecarina F (**2**) y caesaldecarina G (**3**), que están relacionados con efectos farmacológicos (Peter et al., 1998).

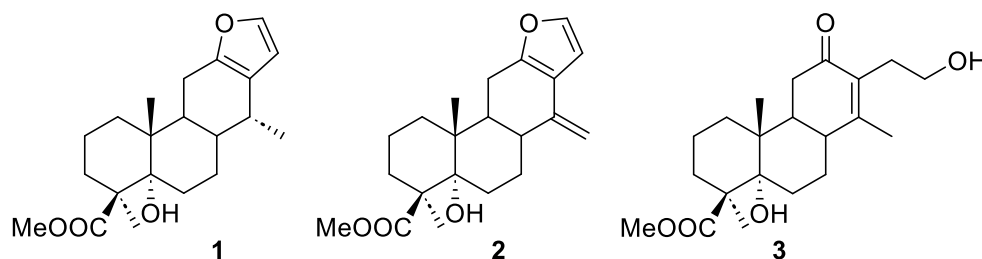


Figura 2 Cassanos aislados de la raíz de *C. bonduc*.

En otro estudio, también del extracto etanólico de las raíces, aislaron los cassanos caesaldecarina A (**4**), demetilcaesaldecarina C (**5**) y las caesaldecarinas H-L (**6-10**); sin

embargo, los compuestos **7** y **10** fueron identificados a partir de sus derivados acetilados (Lyder et al., 1998). (**Figura 3**).

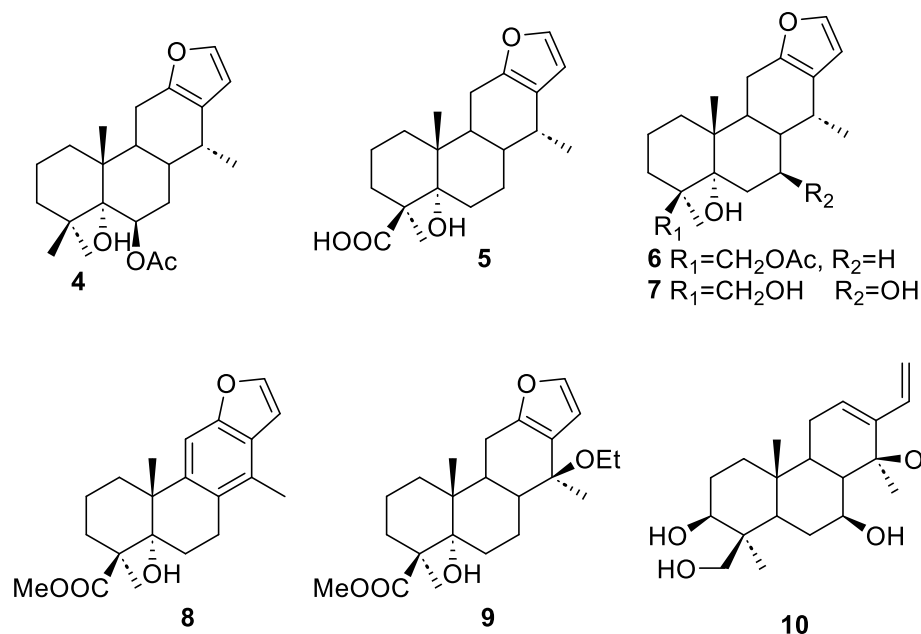


Figura 3 Cassanos aislados del extracto etanólico de la raíz de *C. bonduc*.

De un estudio realizado al extracto etanólico de la planta entera obtuvieron los compuestos **11** y **12** que fueron caracterizados mediante RMN de 1D y 2D, evaluaron la actividad antiproliferativa frente a varias líneas celulares de cáncer demostrando una inhibición significativa de las líneas celulares MCF-7 de cáncer de mama con un IC_{50} de 12.8 y 6.1 μM respectivamente (Yadav et al., 2007). En un estudio posterior aislaron los cassanos **13-15** de los cuales **14** mostró una mejor inhibición de las líneas celulares C33A de cáncer cuello uterino a una concentración más baja ($\text{IC}_{50} = 58.2 \mu\text{M}$) (Yadav et al., 2009) (**Figura 4**).

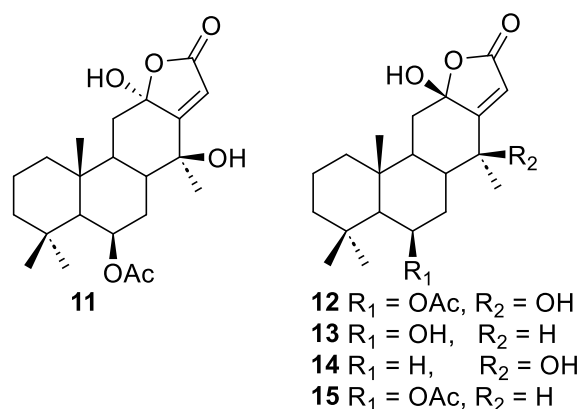


Figura 4 Cassanos aislados del extracto etanólico de la planta de *C. bonduc*.

Del extracto de diclorometano de las semillas de *C. crista*, una planta medicinal popular en el sudeste asiático utilizada como agente analgésico, antiinflamatorio, antipirético, antihelmíntica y antipalúdica, lograron aislar diferentes diterpencassanos, que presentaron un grupo hidroxilo en el C-5 y que correspondieron a los compuestos **16-22** (**Figura 5**) cuyas estructuras fueron determinadas mediante el análisis de sus datos espectroscópicos (Kalauni et al., 2004; Kalauni et al., 2005).

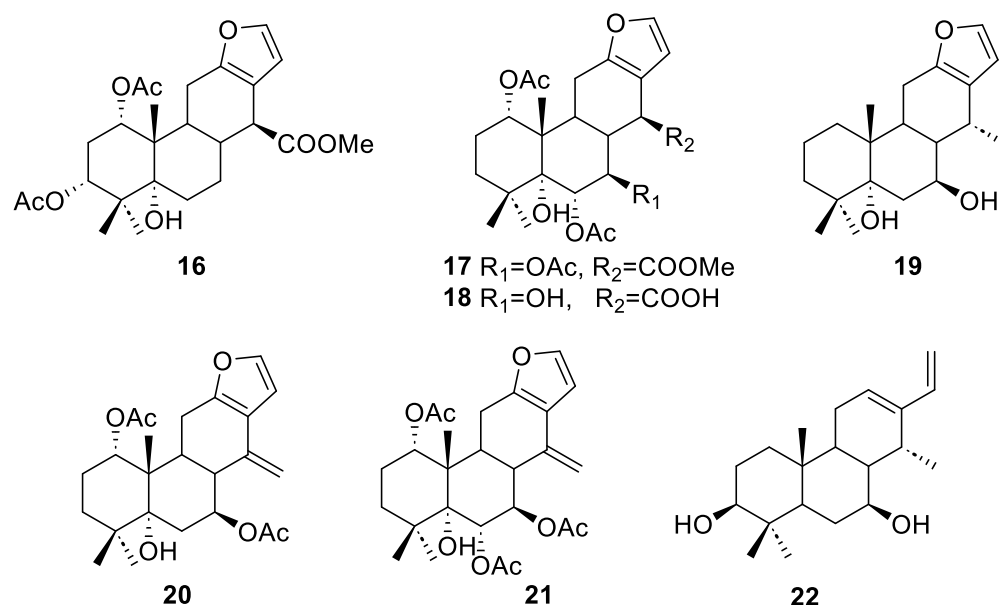


Figura 5 Cassanos aislados de las semillas de *C. crista*.

Este tipo de cassanos han presentado actividad antimalárica: el ensayo del extracto crudo en ratones infectados con *Plasmodium berghei* mostró una inhibición del 98.6 % con una dosis de 10 mg/kg. Posteriormente aislaron los compuestos **23-25**, que fueron evaluados *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, revelando una significativa actividad contra el crecimiento del parásito, siendo el cassano **25** el que presentó el efecto inhibitor más potente, con una IC₅₀ de 0.65 μ M (Linn et al., 2005).

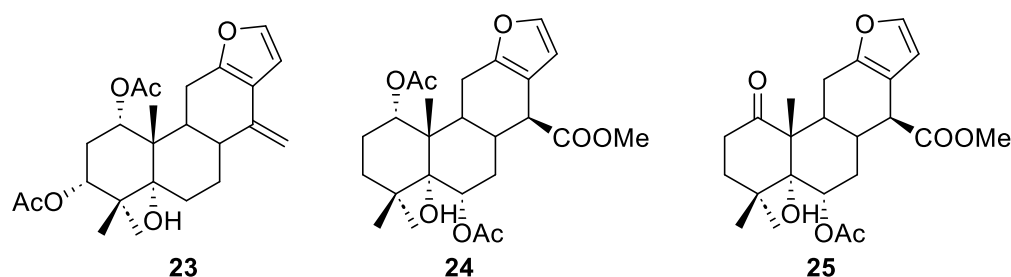


Figura 6 Cassanos aislados de *Caesalpinia crista*.

La planta *C. cucullata* Roxb. es utilizada en la medicina tradicional principalmente para tratar el reumatismo, la tos y la hemorragia traumática. Mediante el primer estudio realizado al extracto etanólico de sus semillas encontraron los cassanos **26-29** (**Figura 7**), a los cuales les evaluaron la capacidad para inhibir la producción de óxido nítrico en las células RAW 264.7, los cuatro compuestos obtuvieron resultados positivos, mostrando así una moderada actividad antiinflamatoria. Sus estructuras fueron elucidadas a partir de sus datos espectroscópicos y por dicroísmo circular electrónico (Wang et al., 2022).

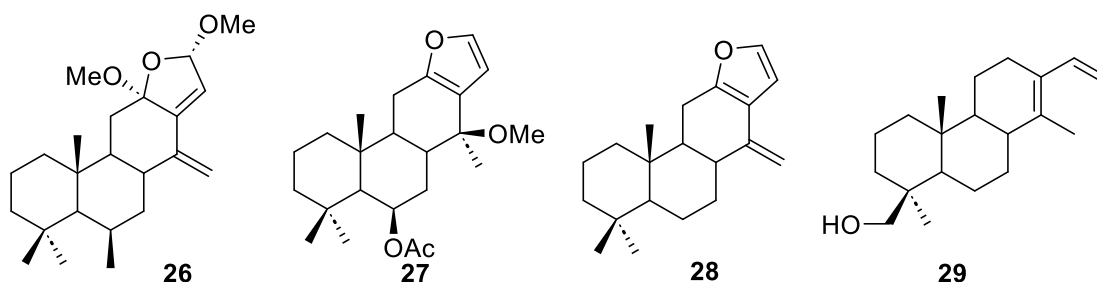


Figura 7 Cassanos aislados de *Caesalpinia cucullata*.

Caesalpinia decapetala es una planta medicinal versátil que se ha utilizado para diversas indicaciones médicas. Un estudio del extracto de semillas, obtenido mediante reflujo con metanol, llevó al aislamiento de los compuestos de tipo cassano **30-32** (**Figura 8**; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Las estructuras de estos tres compuestos fueron determinadas basándose en el análisis de sus datos espectroscópicos de RMN y de DCE. Un estudio biológico realizado a estos compuestos determinó que presentaban actividad contra el Virus de Mosaico del Tabaco (VMT), siendo el cassano **31** el más activo, con un 35.7 % de inhibición, comparable con el 39.4 % de inhibición que presenta la ribavirina, el antiviral comercial disponible para tratar la infección por VMT y control positivo del estudio. Por lo que esta planta puede ser potencialmente útil para proteger los cultivos y los compuestos bioactivos puedan considerarse como agentes candidatos de agroquímicos anti-VTM (Xu et al., 2016). Adicionalmente, del extracto metanólico de las hojas de *C. decapetala*, aislaron el compuesto **33** llamado cesaldecano, la estructura de este cassano fue dilucidada a partir de sus datos de RMN de 1D y 2D (Kiem et al., 2005).

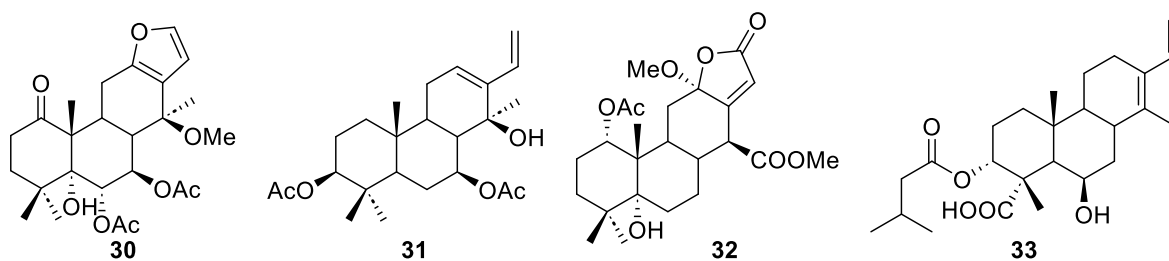


Figura 8 Cassanos aislados de *Caesalpinia decapetala*.

Una investigación del extracto etanólico de tallos de *Caesalpinia echinata* condujo al aislamiento y la elucidación, mediante métodos espectroscópicos, de cinco diterpencassanos **34-38** junto con el ácido lambertiánico (**39**) (**Figura 9**). Adicionalmente determinaron el efecto leishmanicida. Los resultados de este estudio demostraron que el extracto crudo eliminó el 94% de las formas amastigotes de *Leishmania amazonensis*, mientras que los compuestos **34**, **35** y **39**, fueron los que presentaron una mayor actividad, solo eliminaron el 56 %, 69 % y 62 % respectivamente (Cota et al., 2011).

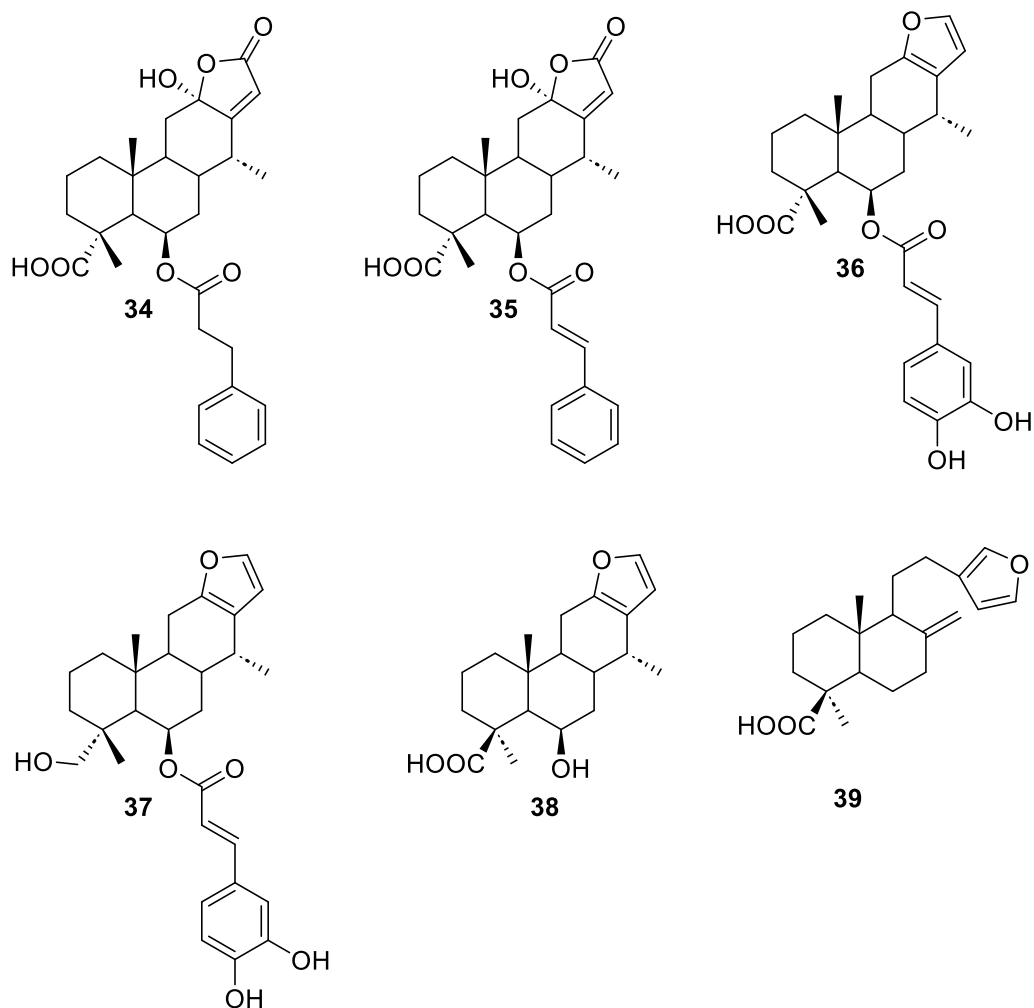


Figura 9 Cassanos aislados de *Caesalpinia echinata*.

La planta *C. magnifoliolata* es utilizada en la medicina tradicional china para el tratamiento del reumatismo. En un estudio realizado al extracto metanólico de las semillas de esta especie reportaron los diterpencassanos (**Figura 10**), llamados magnicaesalpin (**40**) y neocaesalpin O (**41**) (Yin et al., 2008).

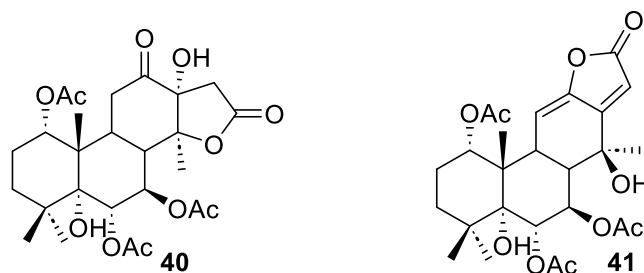


Figura 10 Cassanos aislados de *Caesalpinia magnifoliolata*.

C. major es una planta tropical que se utiliza como planta medicinal en la medicina herbaria de Tailandia como agente expectorante, antitusivo y antihelmíntico, así como para el tratamiento del reumatismo y el dolor de espalda. De los estudios de las raíces y semillas de esta planta han aislado y caracterizado a los diterpencassanos **42-44** (**Figura 11**). Del extracto metanólico de las raíces obtuvieron las caesaldecarrinas A y B (**42** y **43**) (Kitagawa et al., 1994). Del extracto metanólico de las semillas obtuvieron el compuesto **44** (Roengsumran et al., 2000).

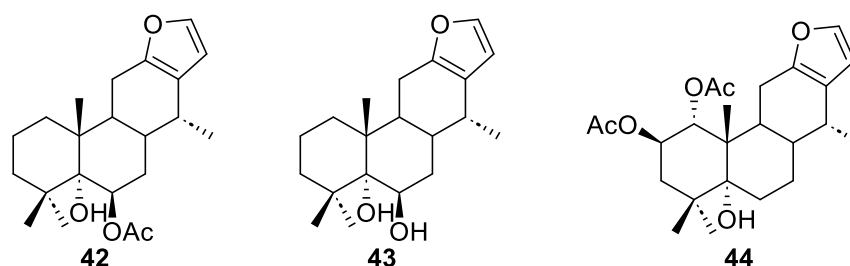


Figura 11 Cassanos aislados de *Caesalpinia major*.

Una de las especies más estudiadas del género *Caesalpinia* es *C. minax*, una planta que ha sido utilizada históricamente en la medicina popular china para el tratamiento del resfriado común, la gripe, la fiebre, el reumatismo y la disentería. Estas investigaciones han validado su uso tradicional. Ensayaron la actividad antiinflamatoria reportada por la medicina tradicional china; utilizaron el extracto de etanol de las semillas en ratas con artritis inducida, los resultados sugieren que esta actividad se debe a la presencia de cassanos (**Figura 12**), ya que son los constituyentes principales del extracto utilizado (Tong et al., 2018). Del extracto metanólico de las semillas aislaron los cassanos **45-49** y ensayaron la citotoxicidad frente a

las líneas celulares Hela, HCT-8, HepG-2, MCF-7 y A549 encontrando una moderada actividad citotóxica ante las cinco líneas celulares (Ma, Xu, et al., 2012). Un estudio realizado al extracto etanólico de la parte aérea de la planta resultó en el aislamiento y caracterización de los cassanos **50-52** (Ma et al., 2014). *C. minax* es una importante fuente de diterpencassanos con potencial actividad biológica, investigaciones han reportado la identificación de hasta 51 compuestos de este tipo mediante el análisis por HPLC del extracto clorofórmico de las semillas esta planta (Wu et al., 2015).

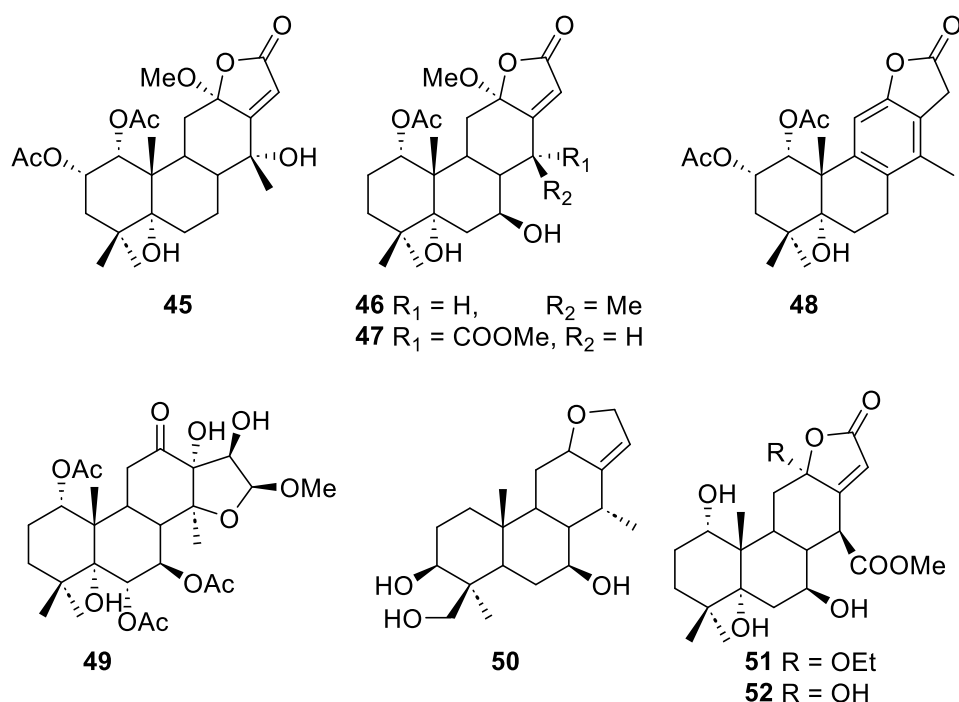


Figura 12 Cassanos aislados de *Caesalpinia minax*.

El estudio químico realizado a las semillas de *C. sinensis* condujo al aislamiento y la caracterización de los diterpencasanos **53-55** (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) cuyas estructuras fueron dilucidadas mediante espectrometría de masa, IR, RMN de 1H y ^{13}C , difracción de rayos X de monocristal y cálculo de DCE. Evaluaron la actividad antiinflamatoria de estos compuestos examinando la capacidad de inhibir la producción de óxido nítrico, encontrando que el compuesto **53** presentó una mayor tasa de inhibición debido a que reduce la actividad de la enzima iNOS (Wang et al., 2021).

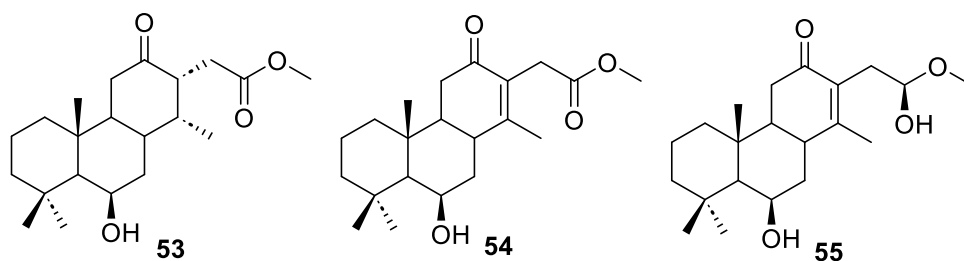


Figura 13 Casanos aislados de *Caesalpinia sinensis*.

La especie *C. pulcherrima* es utilizada en la medicina popular asiática por sus propiedades medicinales; las raíces, las hojas y la corteza son conocidas por sus propiedades abortivas, también es utilizada en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como antipalúdico, vermífugo, antipirético y para combatir infecciones fúngicas. Investigaciones fitoquímicas reportan la presencia de diterpencasanos (**Figura 14**).

Del estudio del extracto de diclorometano de los tallos aislaron los compuestos **56-61** que se encuentran funcionalizados con grupos benzoatos y cinamatos, que fueron caracterizados mediante sus datos espectroscópicos (Pranithanchai et al., 2009).

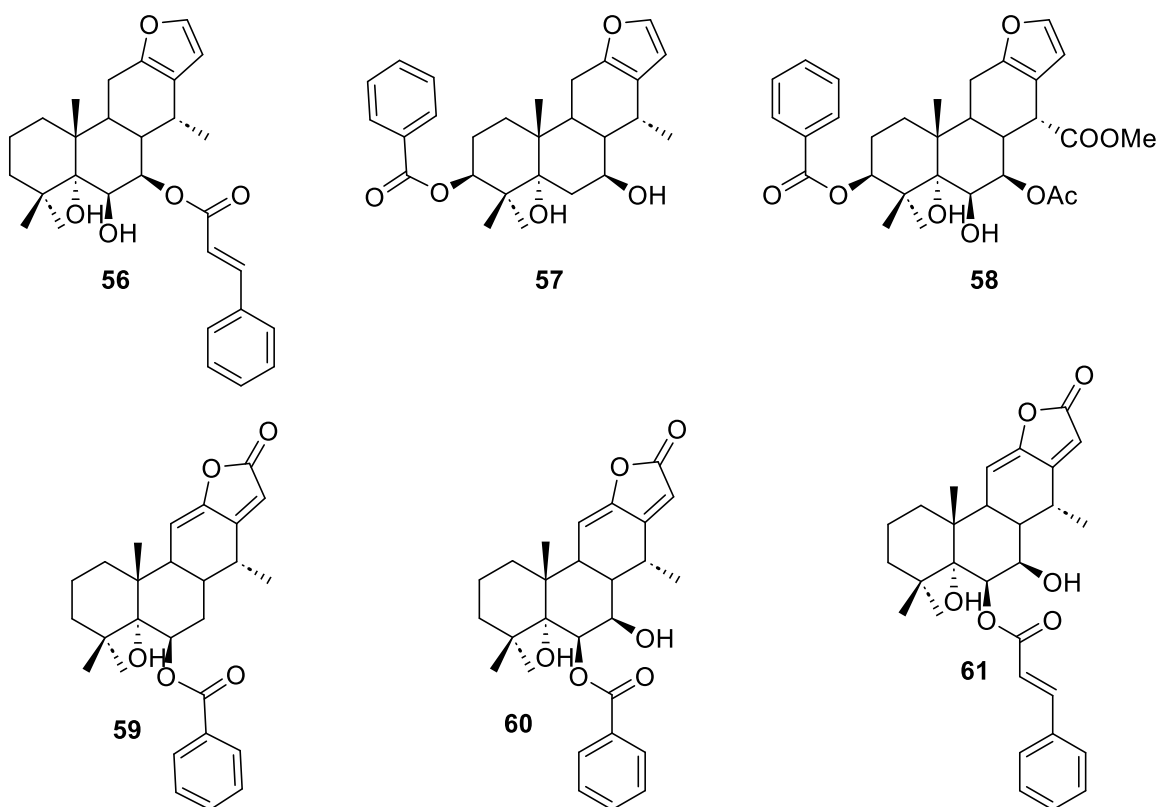


Figura 14 Cassanos aislados de los tallos de *Caesalpinia pulcherrima*.

Otra serie de cassanos **62-66** conteniendo igualmente grupos benzoatos y cinamatos aislados de *C. pulcherrima* fueron probados mediante un bioensayo que mide las actividades antialimentaria e insecticida contra dos especies de polillas (**Figura 15**), siendo **62** y **64** los que presentaron mejor actividad antialimentaria contra *Mythimna separata* y **63** y **65** contra *Plutella xylostella*. Por otro lado, las mejores actividades insecticidas las tuvieron **62** y **64** contra *M. separate* y **65** y **66** contra *P. xylostella* (Li et al., 2020).

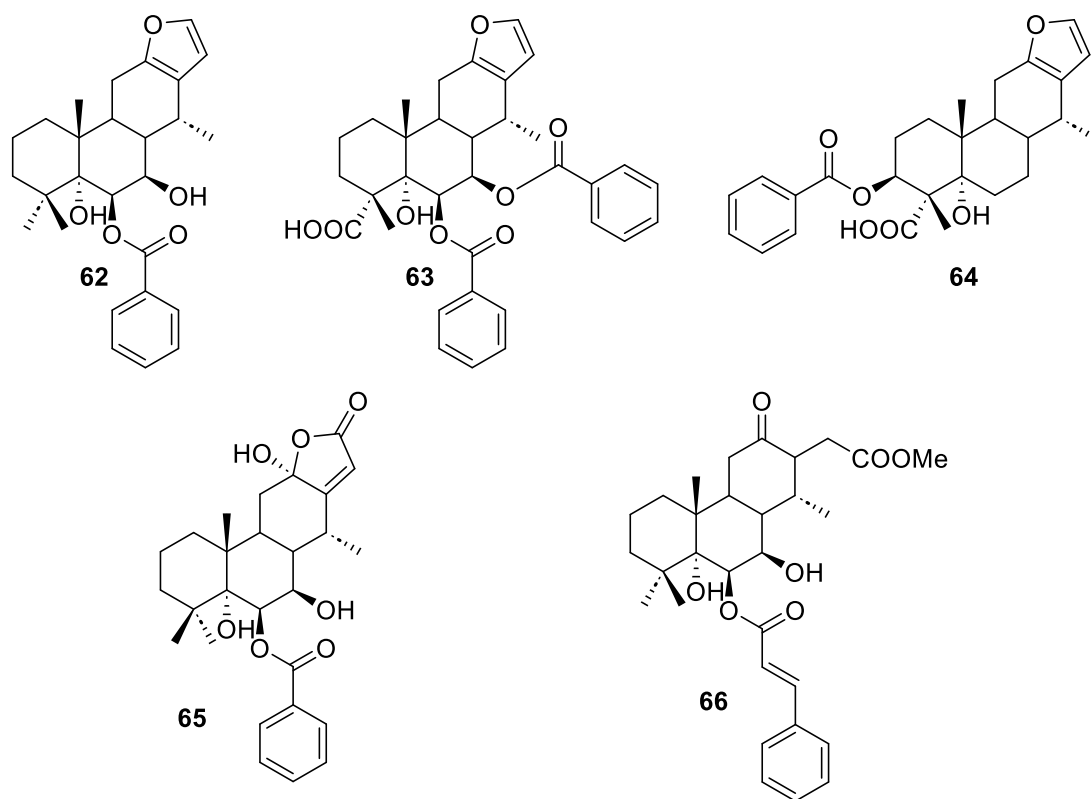


Figura 15 Cassanos aislados de *Caesalpinia pulcherrima*.

La especie *Caesalpinia platylova*, comúnmente conocida como “frijolillo”, es un árbol originario de México que puede crecer hasta cinco metros de altura con corteza amarillenta y madera rojiza. Presenta hojas doblemente compuestas, racimos de flores amarillas en las puntas de las ramas y frutos en forma de vainas marrones, cada una de las cuales contiene de 4 a 8 semillas planas de color marrón. Se utiliza como cerco vivo aprovechando las características de la madera. Fue descrita por primera vez en 1886 y clasificada en la familia Fabaceae (Watson, 1886).

Sin embargo, estudios recientes basados en análisis moleculares y morfológicos han demostrado que esta especie no pertenece al género *Caesalpinia*, sino a un género separado llamado *Coulteria*, que incluye alrededor de 15 especies de árboles y arbustos tropicales. Por tanto, el nombre científico actual de la especie es *Coulteria platylova*, y el nombre anterior, *Caesalpinia platyloba*, se considera sinonimia (Gagnon et al., 2016).

El estudio químico del extracto de diclorometano de hojas de *C. platyloba* condujo al aislamiento de los diterpencassanos **67-69** (**Figura 16**). Las estructuras y la estereoquímica

de los compuestos se determinaron mediante el análisis de los datos espectroscópicos de RMN 1D y 2D, difracción de rayos X y dicroísmo circular vibracional (Gómez-Hurtado et al., 2013).

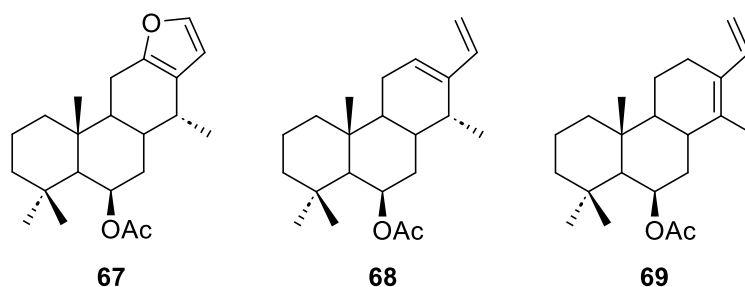


Figura 16 Cassanos aislados de *Caesalpinia platyloba*.

Adicionalmente, en un estudio químico del extracto de CH₂Cl₂ de hojas de *Caesalpinia platyloba* realizado en el grupo de trabajo aislaron tres nuevos cassadienos minoritarios al 3 β ,13 α -dihidroxi-6 β -acetoxicassan-14(17),15-dieno (**70**), 3 β ,13 β -dihidroxi-6 β -acetoxicassan-14(17),15-dieno (**71**) y al 3 β -hidroxi-6 β -acetoxicassa-13,15 dieno (**72**) (**Figura 17**), los cuales no pudieron ser caracterizados totalmente (Pamatz-Bolaños, 2018). Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó una reinvestigación del extracto de cloruro de metileno de hojas, para aislar cassaddieno minoritarios.

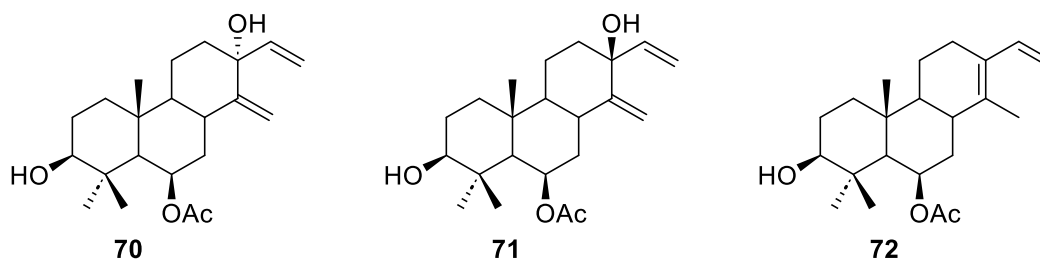


Figura 17 Cassadienos de *Caesalpinia platyloba*.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a la importancia que han demostrado tener los cassanos y a su significativa distribución en el género *Caesalpinia* surge el interés por continuar con la búsqueda de compuestos novedosos de interés farmacológico, considerando que los reportes indican la presencia de cassanos con actividad biológica en otras especies del género. De esta manera se aportará a la quimiotaxonomía de los géneros *Caesalpinia* y *Coulteria*.

OBJETIVOS.

Objetivo general.

Aislar y purificar cassanos minoritarios presentes en *Caesalpinia platyloba*, por métodos cromatográficos, para establecer sus características estructurales mediante técnicas espectroscópicas.

Objetivos específicos.

Obtener los extractos de hojas y tallos de *Caesalpinia platyloba*.

Aislar los cassanos de *Caesalpinia platyloba*.

Caracterizar los cassanos mediante métodos físicos y espectroscópicos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como se mencionó anteriormente, Pamatz-Bolaños 2018, aisló diferentes cassadienos del extracto de diclorometano de hojas de *C. platyloba*, pero debido a que en ese estudio se obtuvieron en bajas cantidades, se decidió explorar el extracto en cuestión en la búsqueda de completar su caracterización espectroscópica, para lo cual se inició con el análisis cromatográfico del extracto, siguiendo la metodología descrita. Es importante señalar que el estudio cromatográfico y de RMN de las fracciones obtenidas no arrojaron datos que evidenciaron la presencia de dichos diterpenos. Lo anterior, puede deberse a la temporada de la colecta, el lugar donde esta se realizó, así como factores climáticos y ambientales, por lo que se optó por realizar colecta de las hojas en diferentes épocas del año.

Material vegetal

Las hojas de la especie *C. platyloba* se colectaron en la localidad de los Charcos municipio de Buenavista Tomatlán, Michoacán. Se dejaron secar a la sombra, una vez secas, lotes de aproximadamente 2 kg de hojas se molieron y se sometieron a maceraciones sucesivas con hexanos y CH_2Cl_2 durante tres días con 15 L de cada disolvente. Se filtró en cada ocasión y los disolventes fueron recuperados por medio de rotavapor, obteniendo los respectivos extractos totales. Los extractos de CH_2Cl_2 se obtuvieron con un rendimiento entre 6.6 y 7.0%.

Extractos de *Caesalpinia platyloba*.

Una muestra del extracto total de CH_2Cl_2 de las hojas colectadas en septiembre del 2020, fue analizada por RMN de ^1H (**Figura 18**) y el espectro mostró las señales características de compuestos tipo terpenos alifáticos, a pesar de que se observan señales de dobles enlaces, indicando la posible presencia de dienos, no se observan señales en aproximadamente 2.0 ppm que indiquen la presencia del metilo de acetato presente en los derivados de cassanos aislados previamente de *C. platyloba*.

También se realizaron extractos de cloruro de metileno de tallos, como se puede observar en el espectro de RMN de ^1H (**Figura 19**) mostró señales del anillo de furano en 7.2 ppm y 6.2 ppm, las señales del sistema dieno se observan en muy pequeña concentración.

Una muestra del extracto total de CH_2Cl_2 de las hojas colectadas en mayo del 2021, fue analizada por RMN de ^1H (**Figura 20**) y el espectro mostró las señales características de los diterpencassanos del anillo de furano en 7.2 y 6.2 ppm, así como señales que indican la

presencia de sistemas de dienos de 6.8 ppm y de 5.2 a 5.0 ppm, en una mayor concentración en comparación con las muestras anteriores. Señales características del metilo de acetato en 2.0 ppm. También se observan señales en 3.2 y 3.6 ppm características de hidrógenos base de hidroxilos, aunque en muy pequeña concentración.

Este extracto se fraccionó en columna cromatográfica usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos:AcOEt en polaridades ascendentes, colectando fracciones gruesas de 100 mL, incluyendo el barrido de la columna con metanol. El disolvente de cada fracción se evaporó en rotavapor y una muestra de la fracción 12 obtenida con MeOH se analizó por RMN de ^1H (**Figura 21**) y el espectro mostró señales que sugerían la presencia de un compuesto mayoritario. Mostró señales de un sistema de dieno en 6.8 ppm, 4.9 ppm y 5.1 ppm aproximadamente.

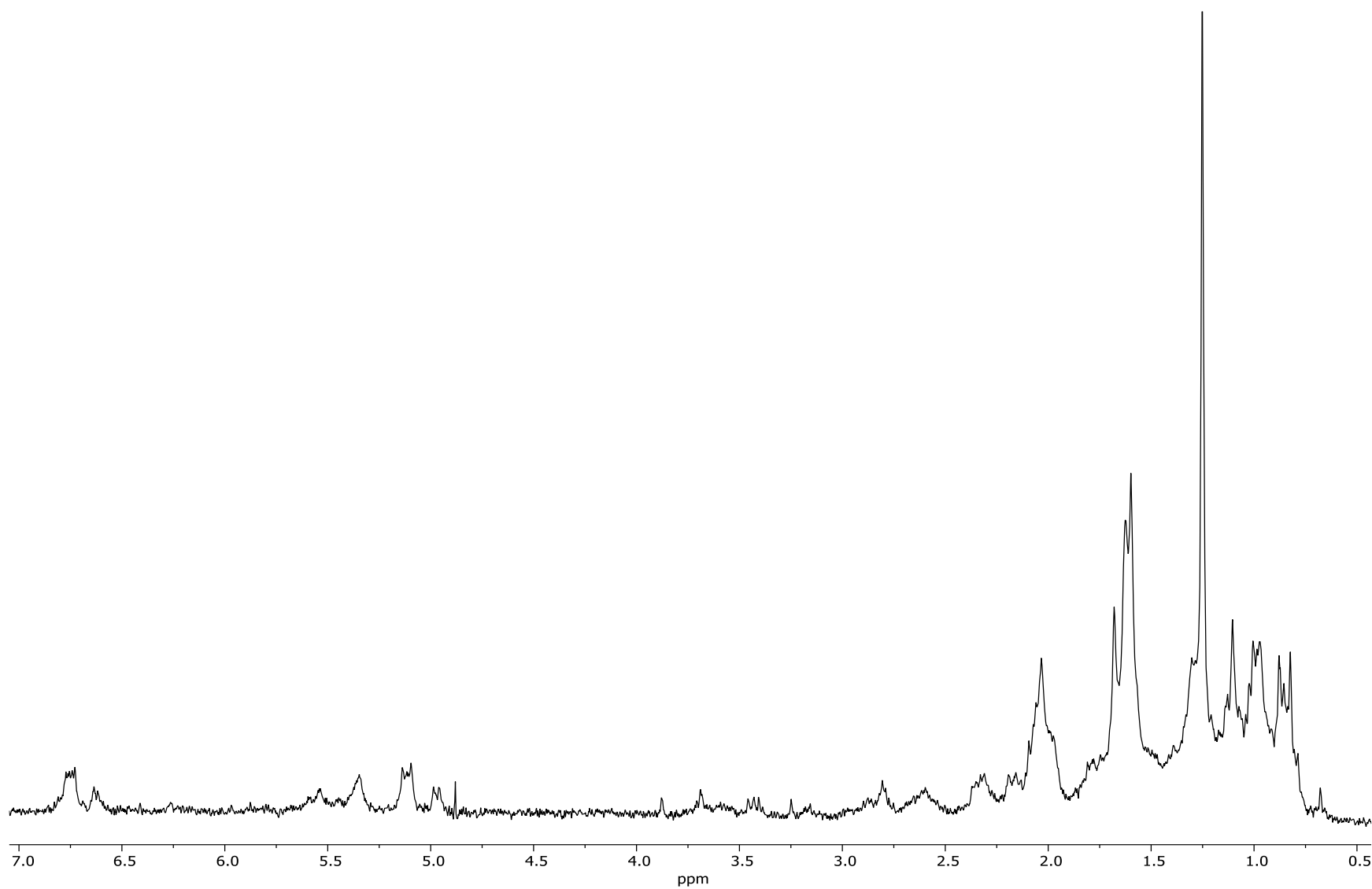


Figura 18 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de hojas septiembre 2020.

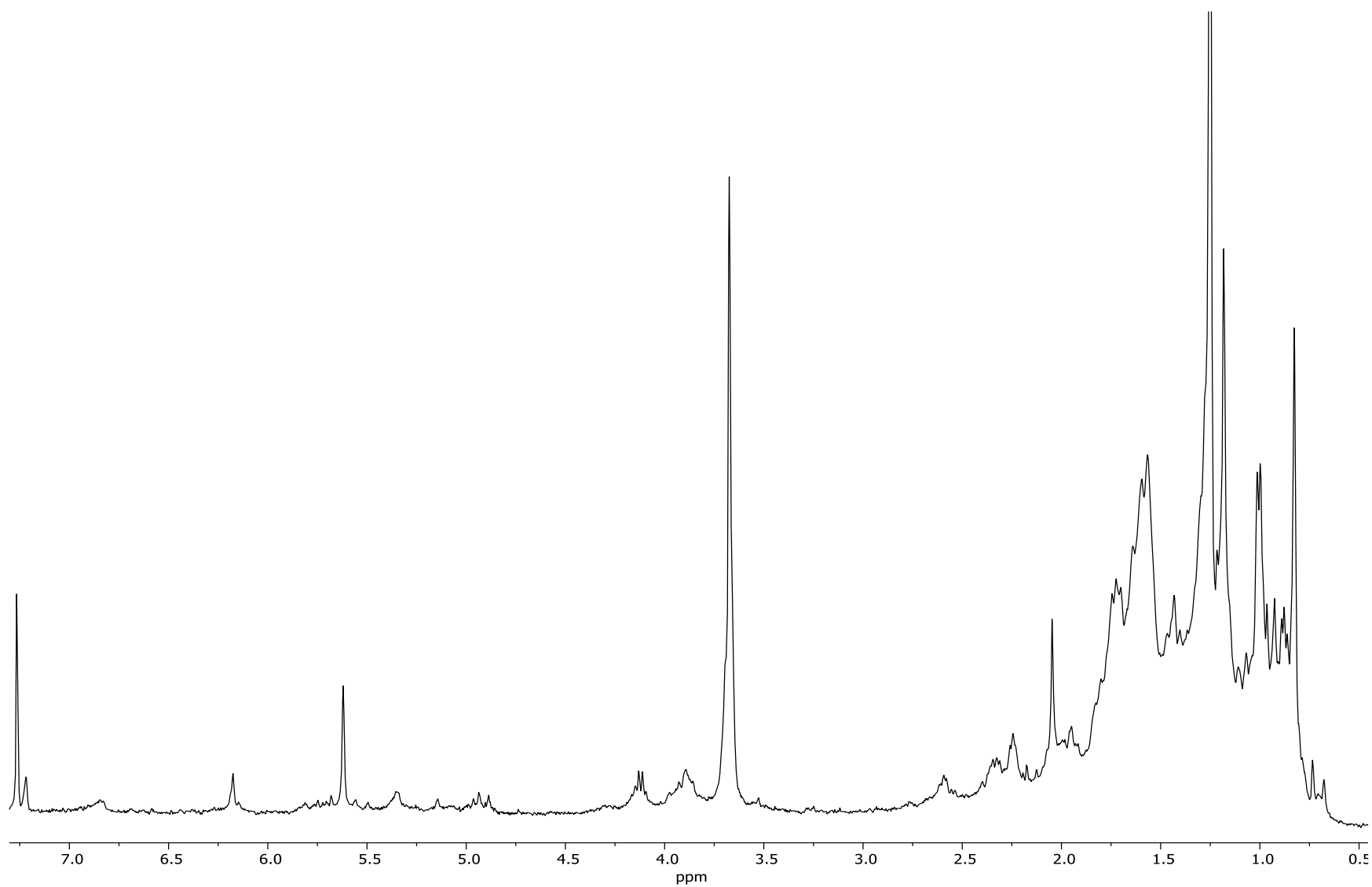


Figura 19 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de tallos.

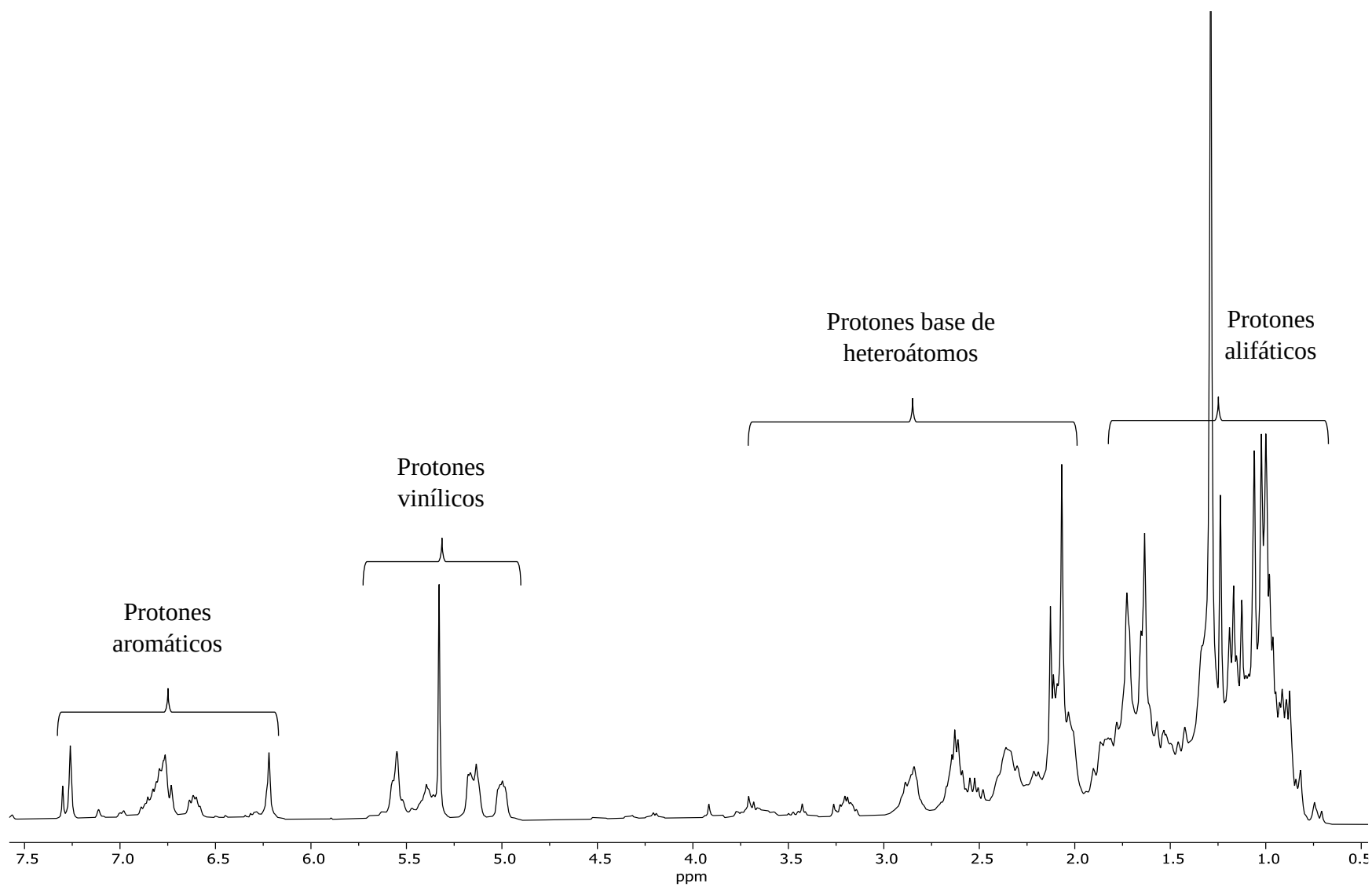


Figura 20 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto CH_2Cl_2 de hojas mayo 2021.

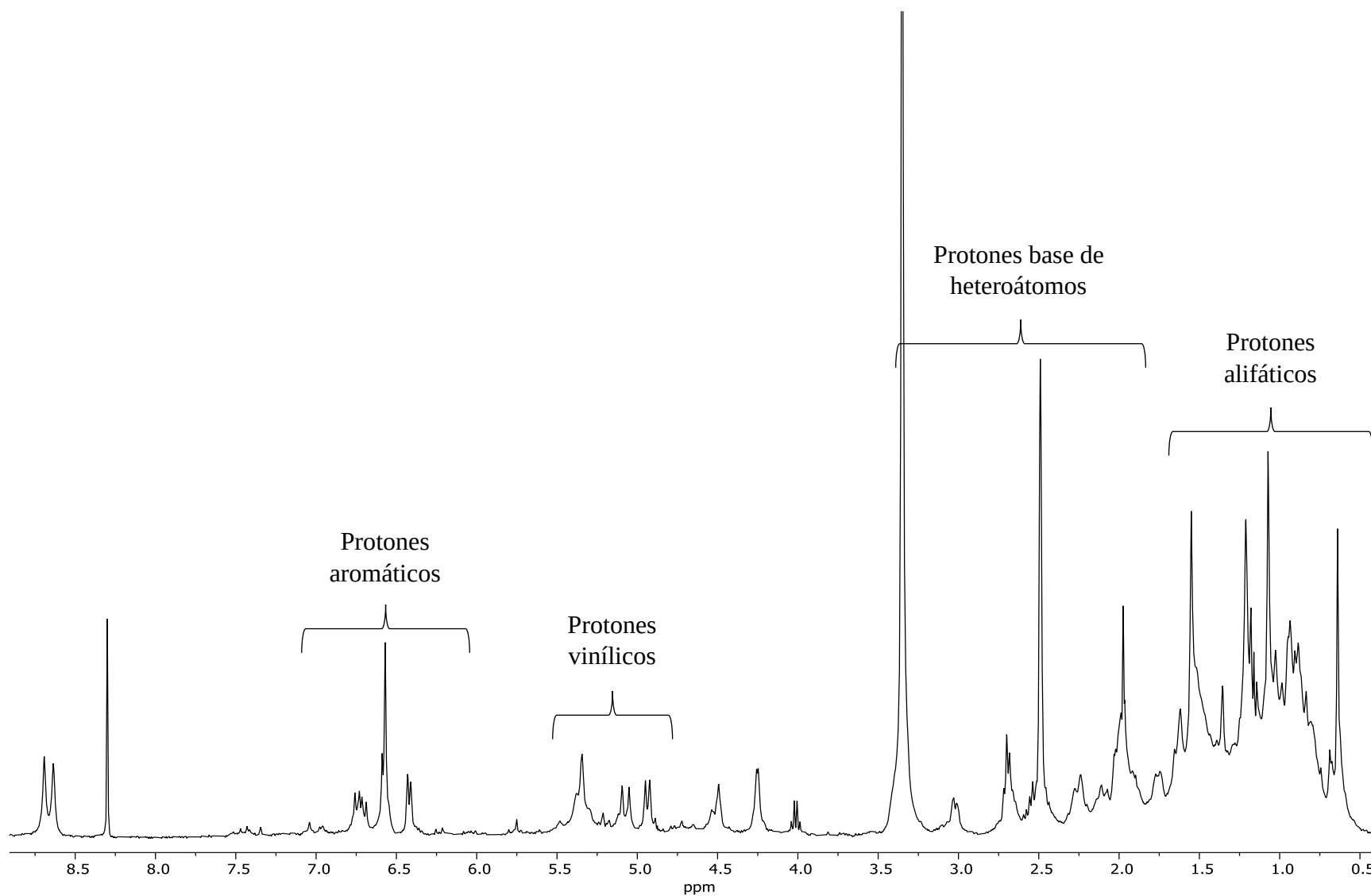


Figura 21 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del barrido metanólico del extracto CH_2Cl_2 de hojas en $\text{DMSO}-d_6$.

Purificación de (13E)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (73).

Con base en lo anterior, 45 g del barrido metanólico del extracto de CH₂Cl₂ de hojas se sometió a recromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil polaridades ascendentes de hexanos:AcOEt iniciando con la polaridad 2:3. De las fracciones 63-78 se obtuvieron 11 mg de un sólido blanco con un punto de fusión de 118-120 °C que se analizó por RMN de ¹H (**Figura 22**). El espectro mostró dos señales simples en 8.71 y 8.65 ppm correspondientes a dos protones de OH fenólico que fueron confirmados mediante el experimento de intercambio con la adición de D₂O; en 6.74 ppm se observó una señal doble de dobles con *J*=17.3 y *J*=11.0 Hz del protón H-15. En 5.08 ppm se observó la señal doble con *J*= 17.3 Hz correspondiente al H-16, mientras que el protón H-16' se observó en 4.95 ppm como una señal doble con *J*= 11.0 Hz. Estas señales fueron asociadas a un doble enlace terminal, cuyo patrón de desplazamiento químico permitió establecer la presencia de un cassadieno, este patrón de señales fue reportado previamente para cassanos aislados de *C. platyloba* (Gómez-Hurtado et al., 2013) Entre 6.60 y 6.40 ppm se observaron tres señales correspondientes a un benceno trisustituido de acuerdo con los valores de las constantes de acoplamiento, y cuya integración estableció la presencia de tres hidrógenos. En 5.35 ppm se encontró una señal simple ancha, del protón base de éster H-6. En la región de los protones base de heteroátomos destacaron tres señales, dos de ellas traslapadas con la señal de la humedad del disolvente en 3.40 y 3.33 ppm, la tercera señal se observó como una señal doble de dobles en 3.02 ppm, estas señales se simplificaron al adicionar D₂O a la muestra, observándose ahora las señales en 3.33 y 3.02 ppm como dos señales dobles correspondientes a un sistema AB de los protones H-18 y H-18' con una *J*=10.4 Hz. La presencia de este sistema AB y la presencia de tres metilos en 1.56, 1.08 y 0.65 ppm como señales simples, permitió establecer que uno de los metilos se encontraba funcionalizado con grupo hidroxilo. La señal característica del protón H-5 se observó como una señal simple en 1.36 ppm. El resto de las señales del esqueleto se encuentran entre 2.70 y 0.80 ppm.

En la (**Figura 23**) se observa la comparación del espectro de RMN de ¹H del compuesto **73** antes y después de la adición de D₂O. Se aprecia la desaparición de las señales de los grupos OH fenólicos, así como la simplificación de las señales de los hidrógenos del metileno en la posición 18 al perder su acoplamiento con el hidroxilo en C-18.

En el análisis de RMN de ^{13}C (**Figura 24**) se observaron 11 señales de carbonos sp^2 , en 171.71 ppm se observó la señal del carbonilo del éster. Entre 146 y 110 ppm se observaron las señales correspondientes a los seis carbonos del benceno y cuatro del dieno. En la región de los carbonos alifático, de 70.0 a 12.0 ppm, se encontraron 18 señales. Las señales correspondientes a los tres carbonos base de oxígeno se encontraron entre 70.0 y 62.0 ppm. Adicionalmente, se realizó un experimento DEPT que permitió determinar la presencia de tres metilos, ocho metilenos, cinco metinos y dos carbonos cuaternarios. La presencia de 8 metilenos en el espectro de carbono-13 permitió deducir la presencia del grupo dihidro cafeico. El análisis completo de RMN permitió proponer la estructura del compuesto aislado como un cassadieno, el cual presenta dos grupos hidroxilo posiciones C-3 y C-18, así como una esterificación con un grupo dihidro cafeato en la posición C-6. Compuestos con este esqueleto han sido reportados de diferentes especies vegetales, por ejemplo, de *Myrospermum frutescens*, de la cual aislaron un cassadien que presentó sustituciones con grupos hidroxilo en C-18 y C-6, el cual presentó actividad frente a *Trypanosoma cruzi* en forma intracelular (Torres-Mendoza et al., 2003). Aunque el cassadieno reportado en este trabajo presenta un grupo hidroxilo adicional resulta interesante determinar su potencial biológico, lo que se establecerá en trabajos futuros.

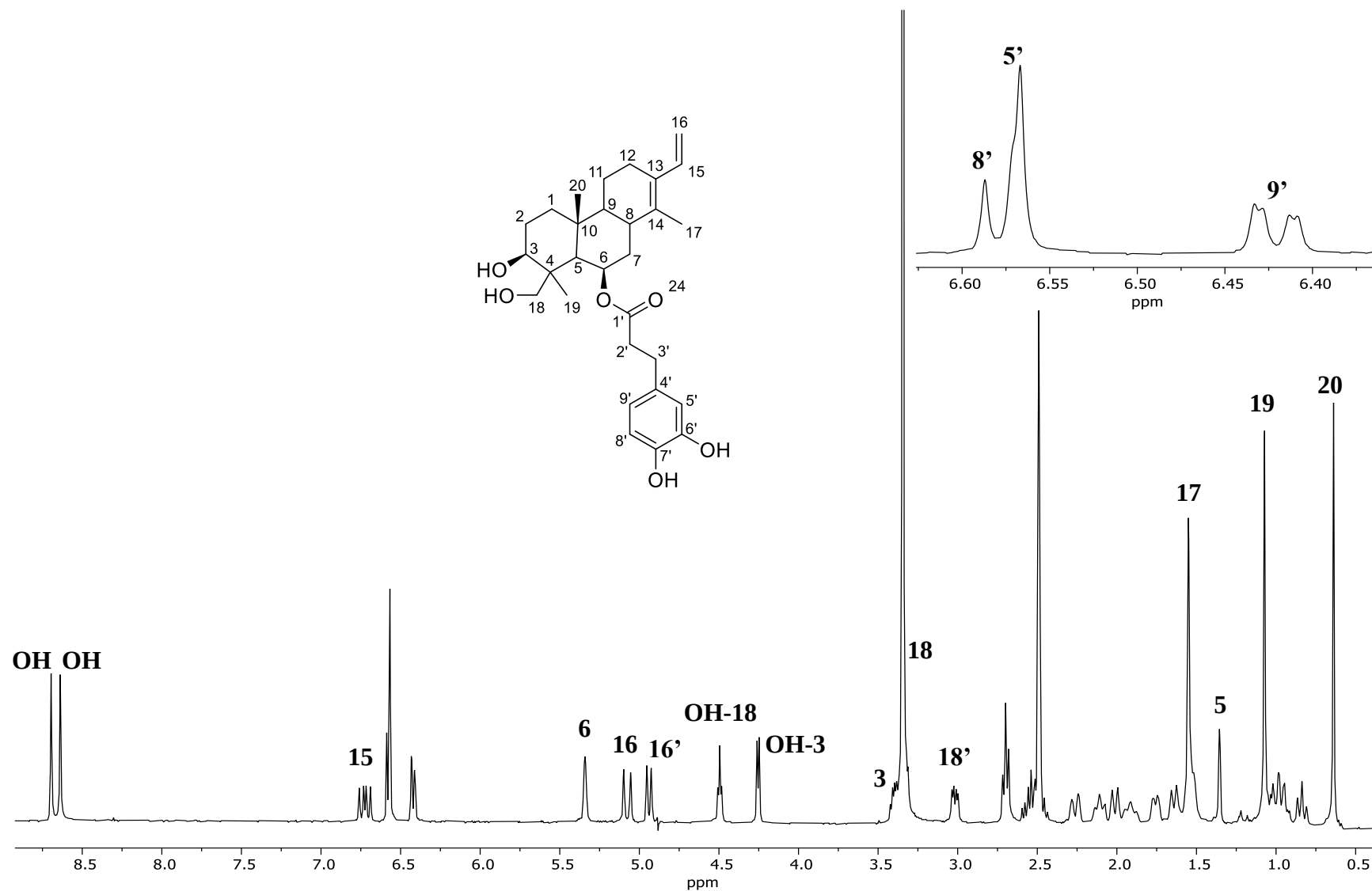


Figura 22 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **73** en $\text{DMSO}-d_6$.

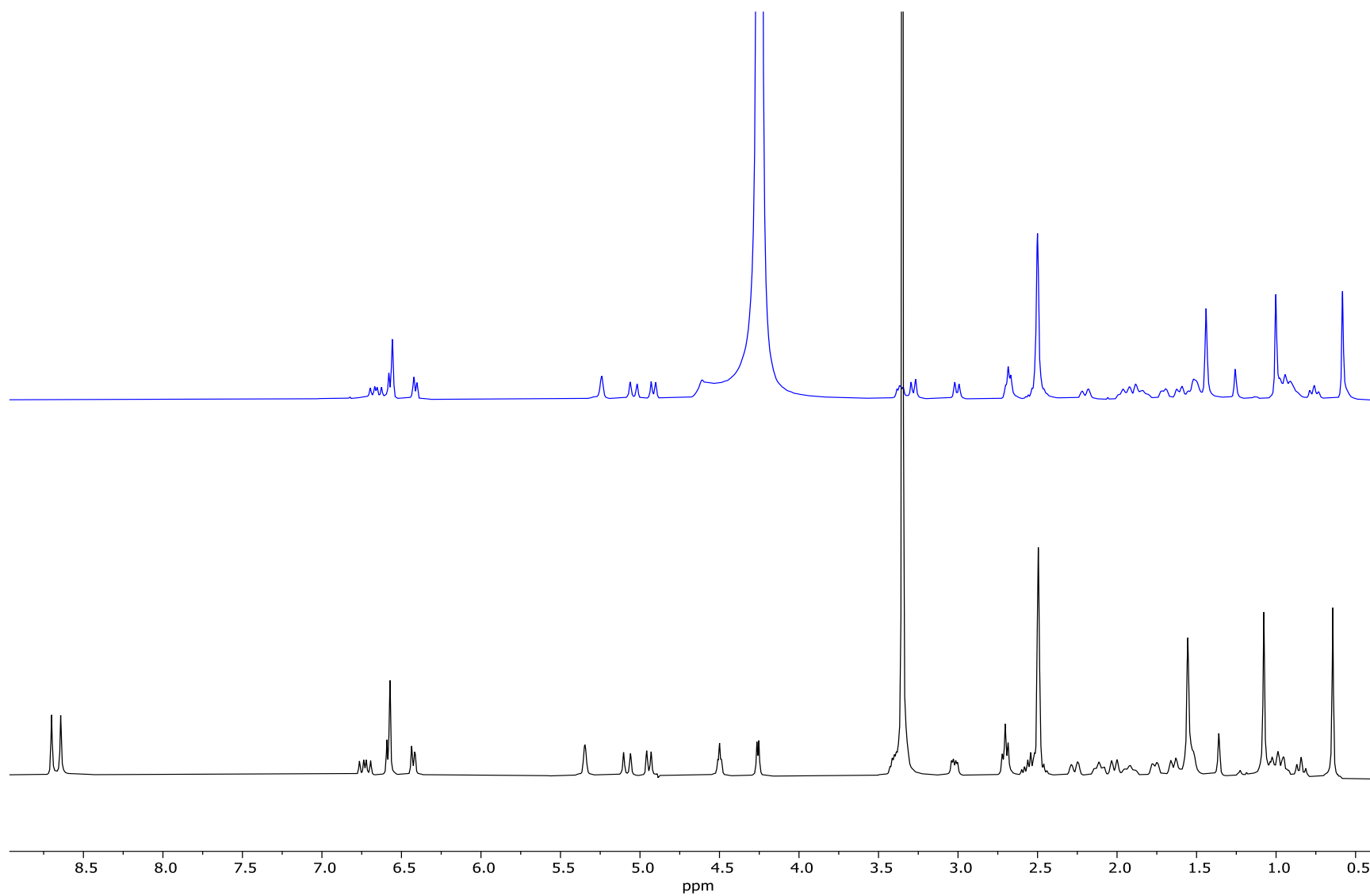


Figura 23 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **73** trazo inferior. Trazo superior + D_2O .

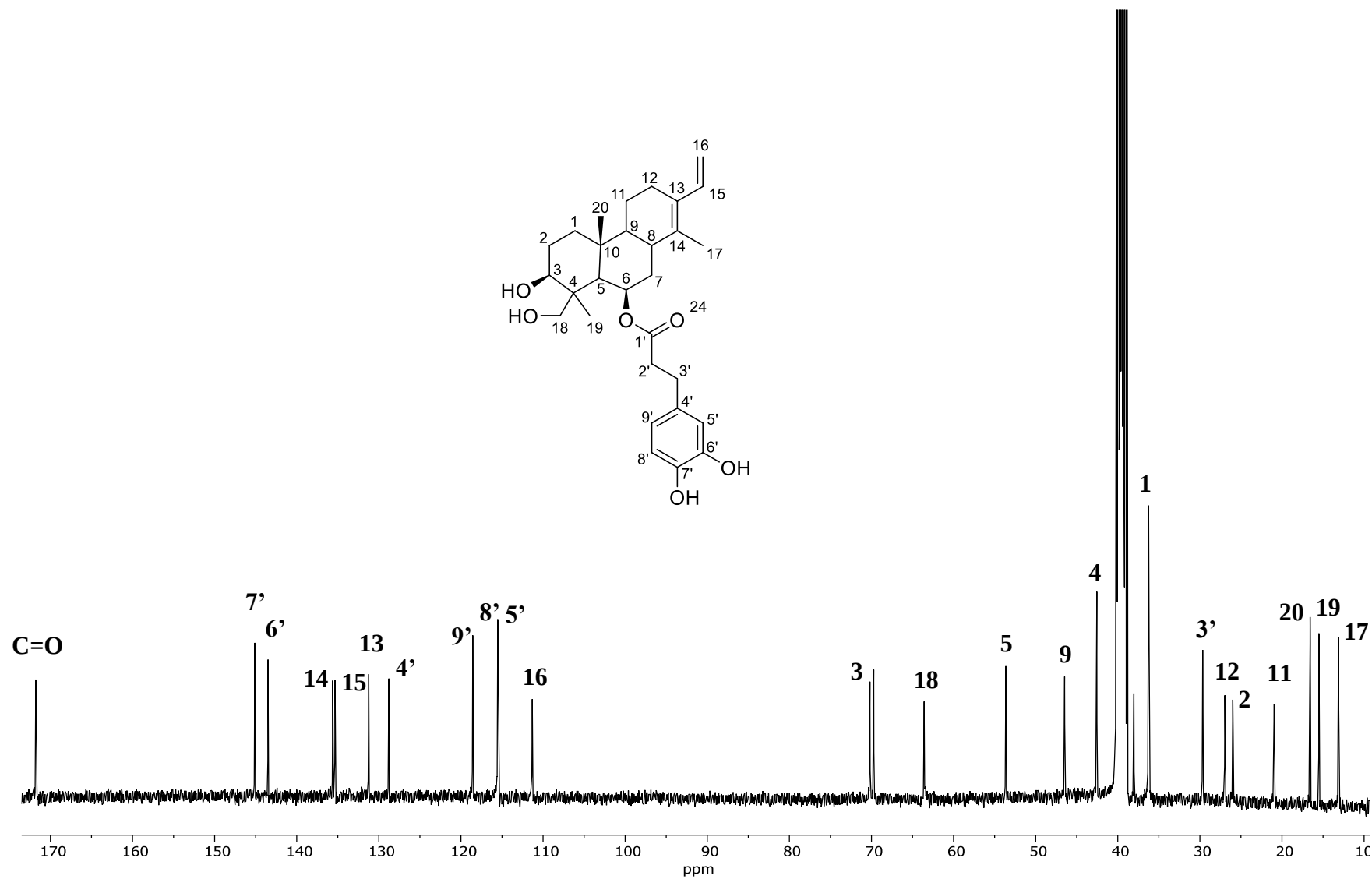


Figura 24 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del cassano **73** en $\text{DMSO}-d_6$.

Con los datos analizados hasta el momento se propone la presencia del (13*E*)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (**73**) el cual corresponde a un derivado novedoso (**Figura 25**).

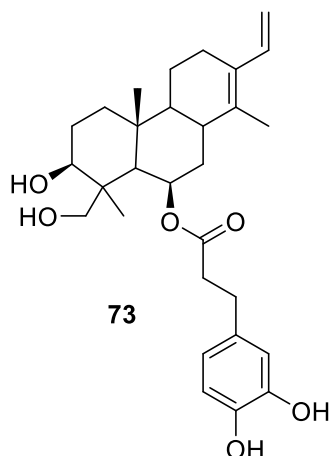


Figura 25 Estructura del (13*E*)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno.

Purificación de 6β-acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (11).

Las fracciones 17 a 60 de la columna de la porción metanólica del extracto de diclorometano de hojas se sometieron a una recromatografía utilizando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos:AcOEt en polaridades ascendentes. Se inicio la columna con una mezcla con proporción 3:7 hexanos:AcOEt y en las fracciones 17-25 se obtuvieron 17 mg de cristales incoloros con forma de agujas con un punto de fusión de 204-205 °C. Los cristales fueron lavados con cloroformo y una vez limpios se analizaron por RMN.

El espectro de RMN de ¹H (**Figura 27**) mostró una señal simple en 5.75 ppm correspondiente al protón vinílico H-15, señal que integró para un protón, lo que indicó la presencia de un doble enlace trisustituido, en 5.38 ppm apareció otra señal simple ancha característica del protón base de éster H-6, la cual concuerda con los datos reportados previamente por el grupo de trabajo para cassanos esterificados con un grupo acetato en esta posición (Gómez-Hurtado et al., 2013), también se observó en 1.96 ppm la señal simple intensa característica del metilo de un grupo acetato, comprobando la presencia de este

sustituyente. Por último, en 1.17, 1.03, 0.93 y 0.91. ppm se encontraron cuatro señales simples de los metilos CH₃-17, CH₃-20, CH₃-19 y CH₃-18 respectivamente.

En el análisis de RMN de ¹³C (**Figura 28**) se observaron 4 señales de carbonos *sp*², de las cuales en 176.86 y 111.84 ppm aparecieron las señales correspondientes al doble enlace de una hidroxilactona α,β -insaturada (Kinoshita, 2000; Kinoshita et al., 2005; Ma, Yuan, et al., 2012), en 169.80 y 169.61 se observaron las señales de un carbonilo de acetilo y un carbonilo de lactona. En 105.39 ppm se observó el C-12 base de la lactona y del OH, en 72.43 y 68.50 ppm aparecieron las señales de dos carbonos base de oxígeno C-14 y C-6 respectivamente; entre 54.01 y 16.91 ppm se encontraron las señales de 15 carbonos alifáticos. Un experimento DEPT reveló la presencia de cinco metilos, cinco metilenos, cinco metinos y siete carbonos cuaternarios. El análisis de los espectros de RMN de 1D y 2D confirmaron las asignaciones.

Los datos analizados permitieron proponer la presencia de 6 β -acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (**11**). Yadav y colaboradores en el 2007 reportaron el aislamiento de dos lactonas **11** y **12** de *C. bonduc* (**Figura 26**) estableciendo la presencia y configuración de estos epímeros mediante el experimento ROESY del derivado acetilado; sin embargo, los datos de resonancia magnética nuclear fueron determinados en piridina deuterada, por lo que fue necesario determinar los datos espectroscópicos con ese disolvente para poder establecer la estructura de **11**, así como establecer la configuración de los C-12 y C-14. Algunos autores han postulado que este tipo de compuestos tipo butenólida se forman por peroxidación del furano y su posterior isomerización. Estos derivados han sido evaluados en cuanto a su actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, presentando actividad frente a la forma extracelular (Torres-Mendoza et al., 2004), lo que deja como perspectiva determinar la actividad anti tripanosoma para el derivado aislado.

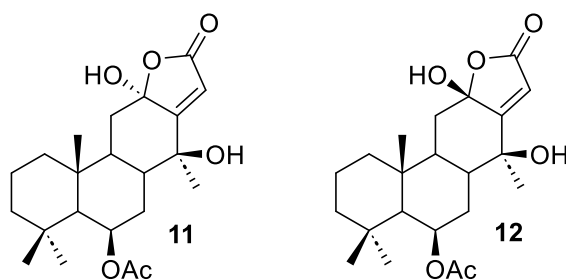


Figura 26 Estructuras de derivados aislados de *C. bonduc*.

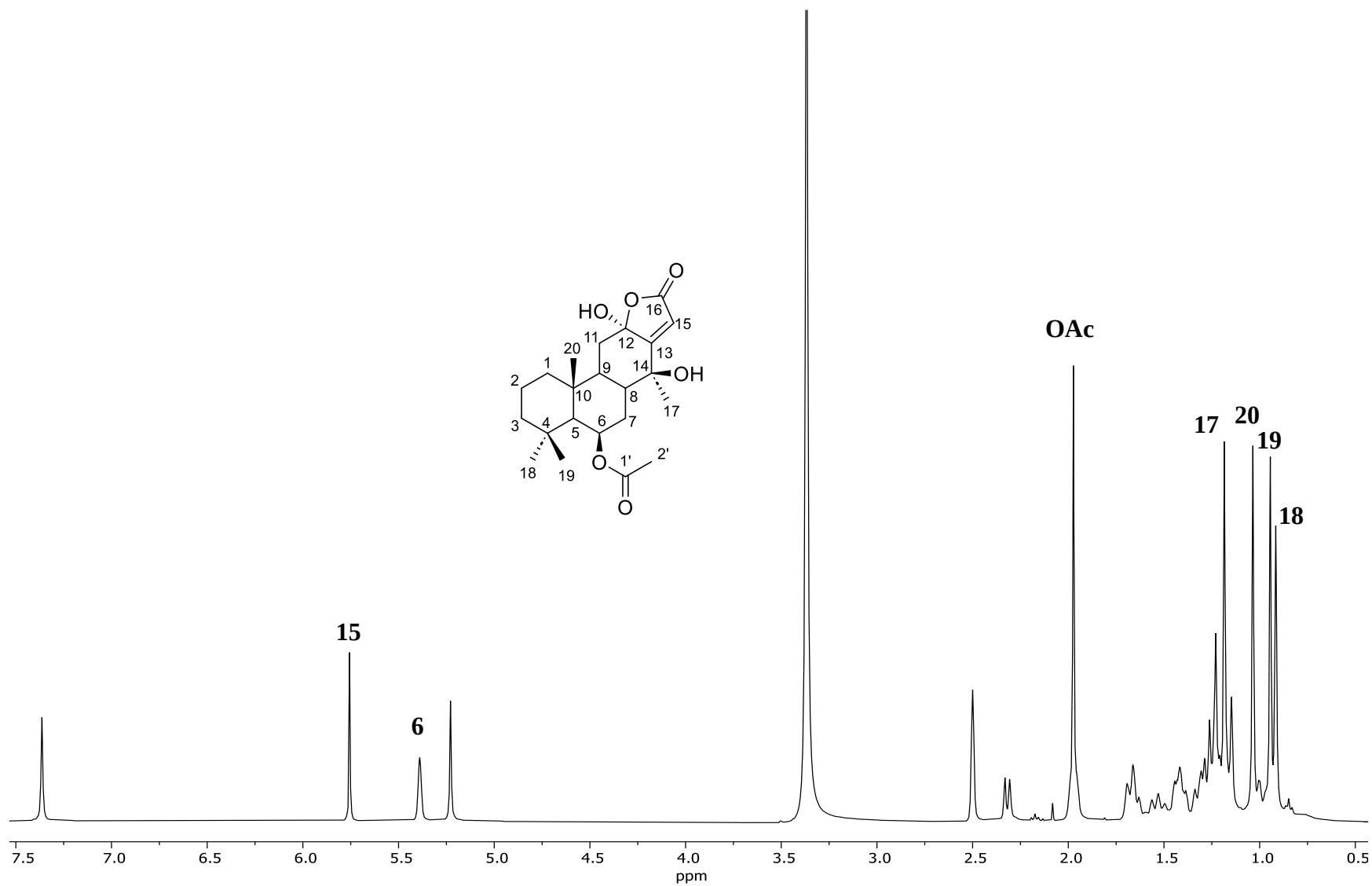


Figura 27 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **11** en $\text{DMSO}-d_6$.

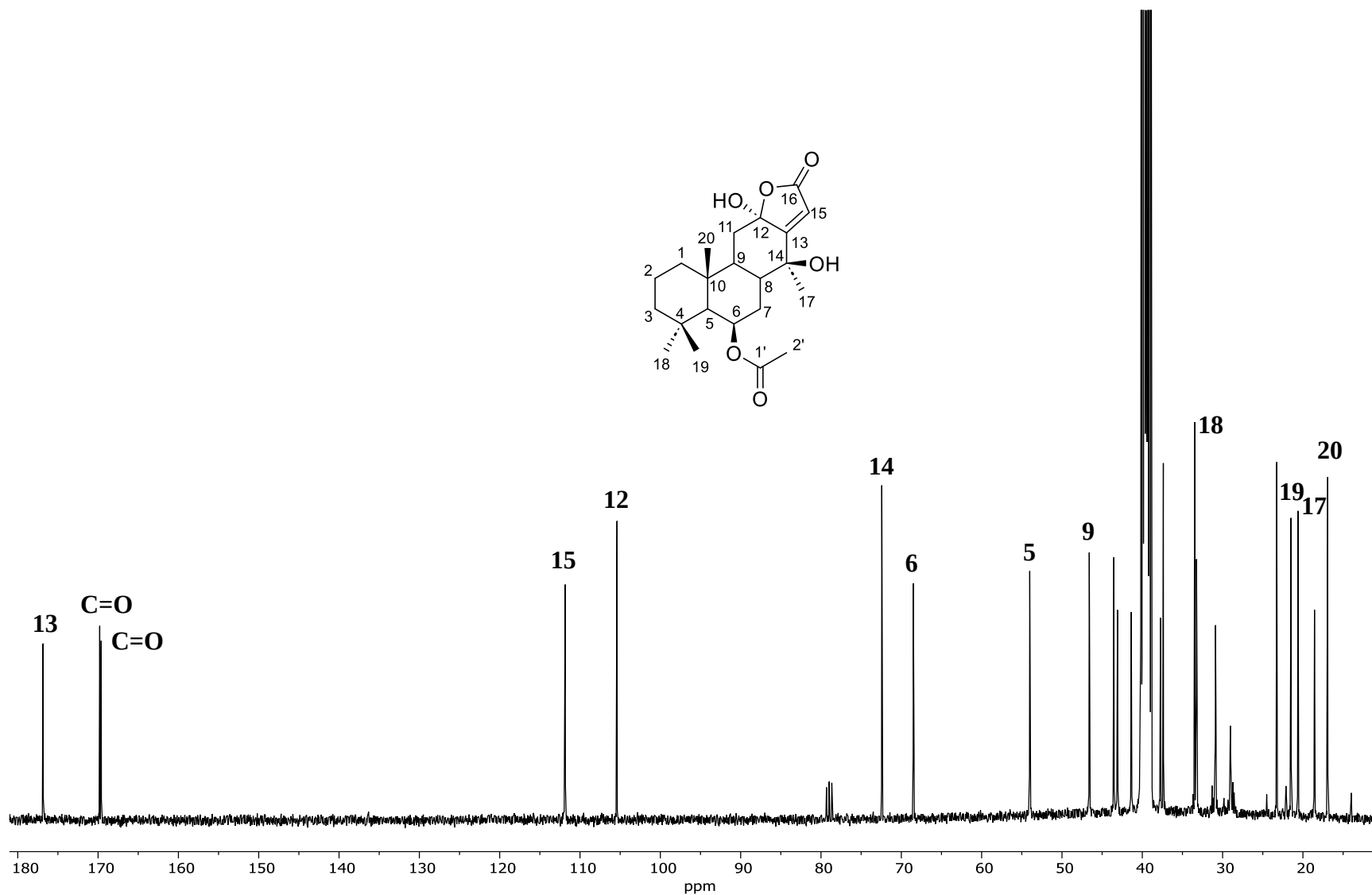


Figura 28 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **11** en $\text{DMSO}-d_6$.

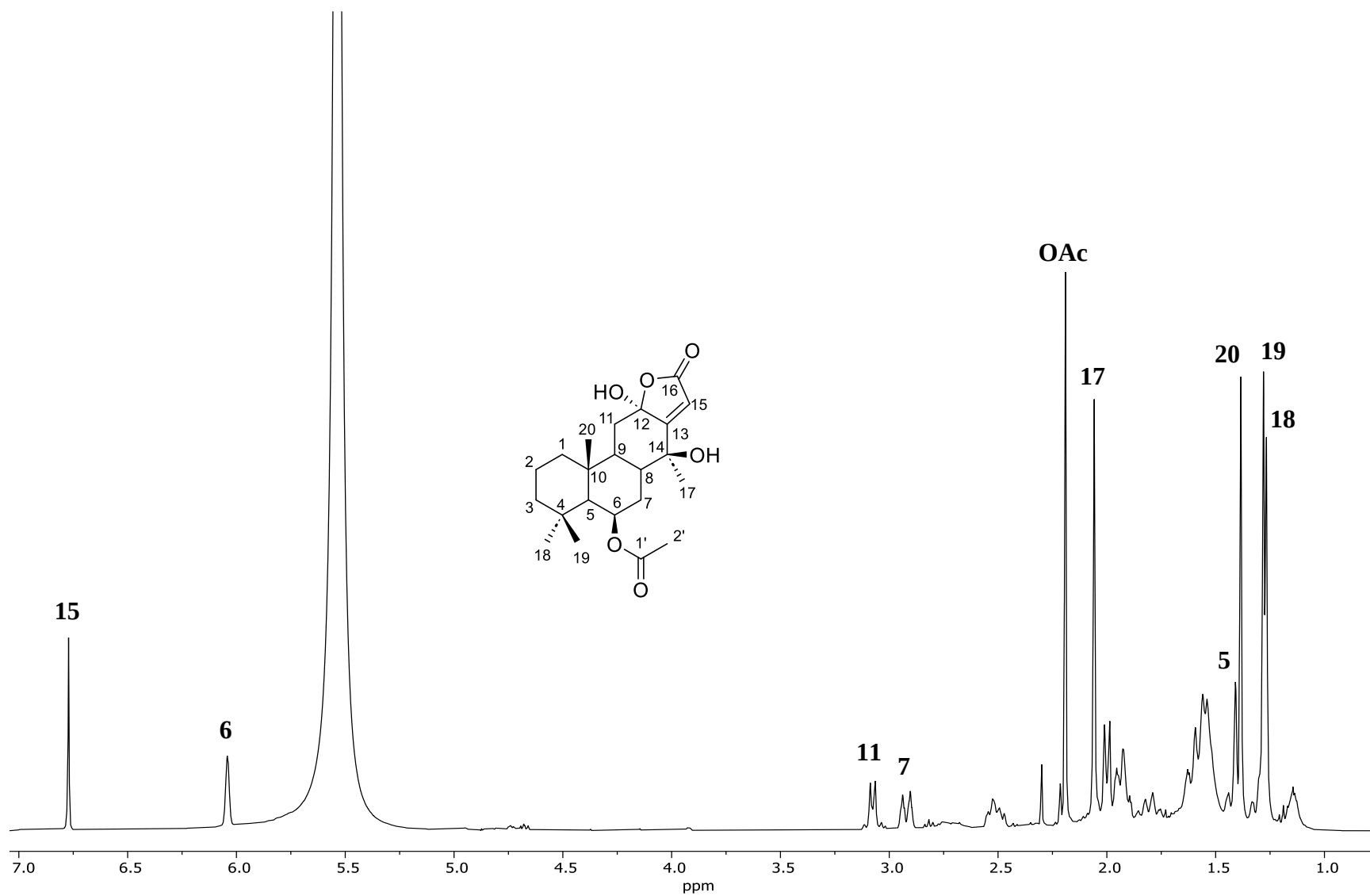


Figura 29 Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del compuesto **11** en Piridina- d_5 .

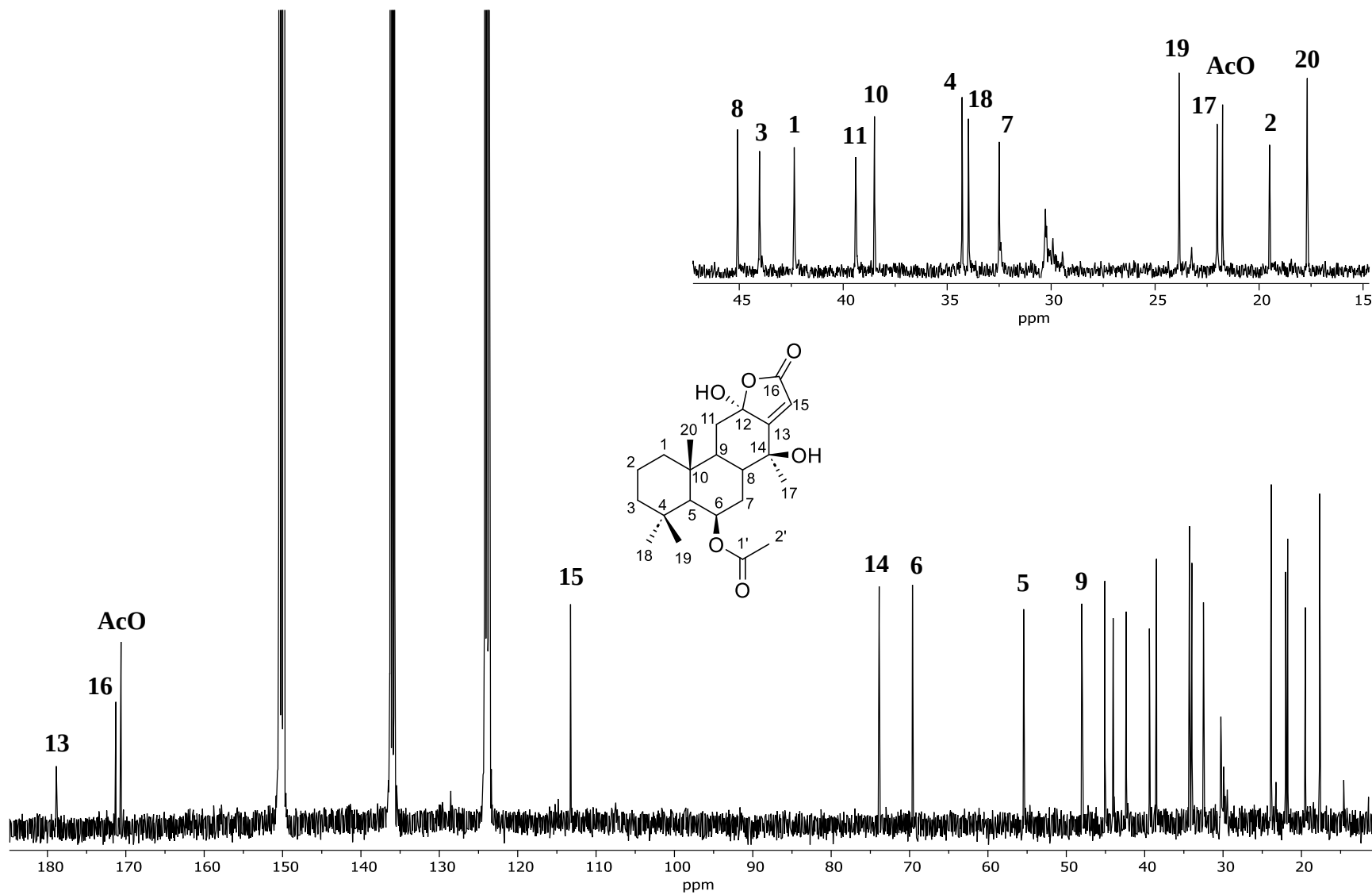


Figura 30 Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del compuesto **11** en Piridina- d_5 .

En la **Tabla 1** se muestra la comparación de los datos reportados (Yadav et al., 2007) para **11** y **12** y los obtenidos experimentalmente, para los protones más representativos.

Tabla 1 Comparación de desplazamientos de RMN ^1H en piridina del compuesto **11**, δ en ppm, multiplicidad y (J) en Hz.

Número de <i>H</i>	Experimental 11 400 MHz	Literatura 11 500 MHz	Literatura 12 500 MHz
5	1.11 s	1.15 sa	1.03 sa
6	5.74 sa	5.77 sa	5.81 sa
7a	2.62 dt(14.5, 3.2)	2.65 dt(14.4, 3.0 Hz)	2.25 dt(14.4, 3.0 Hz)
7b	1.67	1.66	2.09 dt(14.4,3.0 Hz)
8	2.22 ta(11.0)	2.25 ta(11.4 Hz)	1.72 dta(11.4,3.0 Hz)
11a	2.77 dd (20.1,11.4 Hz)	2.80 dd, (20.1, 11.5 Hz)	2.80 dd(13.2, 2.4 Hz)
15	6.47 s	6.48 s	6.09 s
CH ₃ -17	1.76 s	1.78 s	1.50 s
CH ₃ -18	0.97	1.00 s	0.95 s
CH ₃ -19	0.98	1.02 s	1.02 s
CH ₃ -20	1.09	1.12 s	1.12 s
CH ₃ -2'	1.90 s	1.91 s	2.14 s

Es importante mencionar que en el análisis del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **11** determinado en piridina (**Figura 30**) no se observa la señal del C-12 reportado en la literatura en la región 107.00 ppm (Yadav et al., 2007); sin embargo, en el espectro determinado en DMSO (**Figura 28**) sí se encuentran los dos señales para los carbonos C-12 y C-15. Este tipo de fenómenos se ha detectado en derivados de cassanos obtenidos por el grupo de trabajo, en donde se aprecia la casi desaparición de la señal en el espectro de RMN de ^{13}C (Servín-García, 2020). En la **Figura 31** se muestra el comparativo de esta región del espectro.

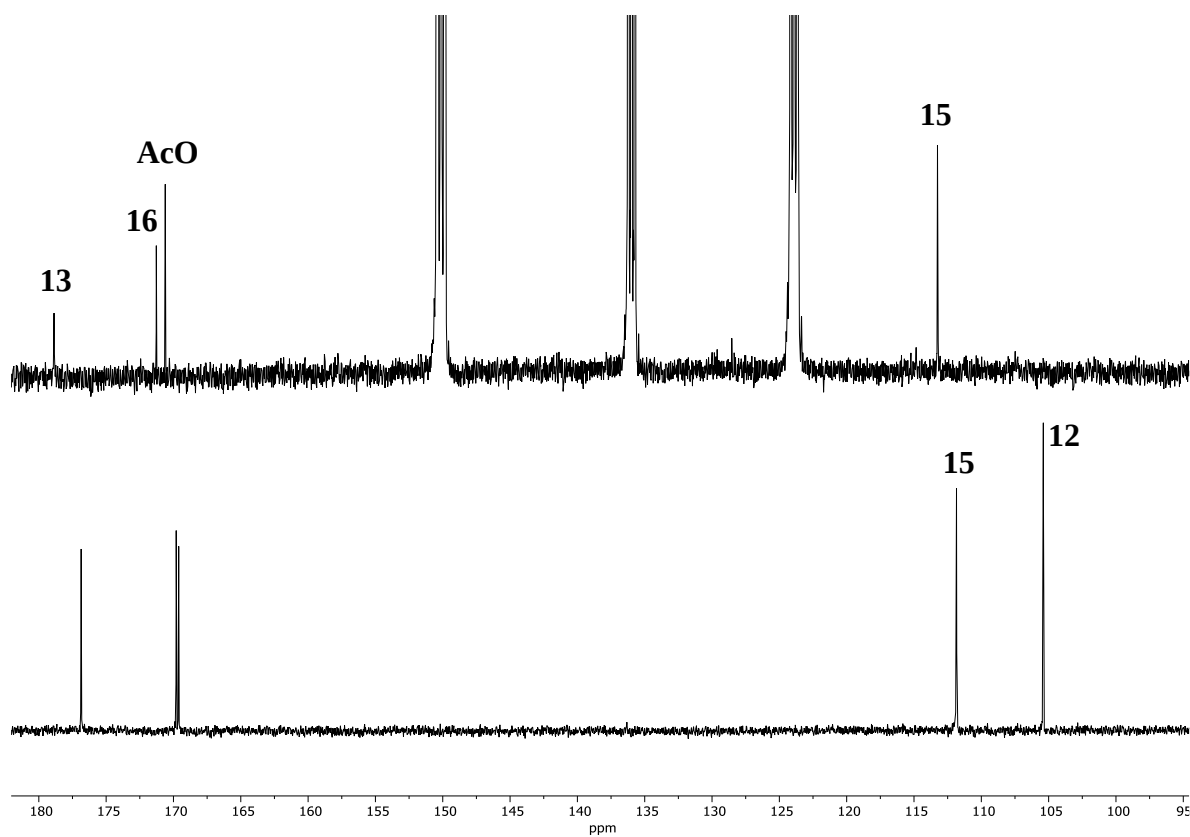


Figura 31 Trazo superior: espectro en Piridina, trazo inferior: espectro en DMSO.

CONCLUSIÓN.

El estudio químico del extracto de diclorometano de hojas de *Caesalpinia platyloba* permitió aislar dos cassanos, obtenidos como componentes minoritarios.

El cassadieno (13*E*)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (**73**), del que no se encuentran reportes en la literatura, por lo que se trata de un compuesto novedoso. Además, cassanos funcionalizado con un éster del tipo dihidrocaféico solo han sido reportados, hasta la fecha, en la especie *Caesalpinia echinata*. Y la lactona 6β-acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (**11**) que ya ha sido reportada en la literatura.

Las cantidades tan pequeñas en que se obtuvieron los compuestos no permitió la caracterización completa de los cassanos, por lo que la perspectiva es continuar con la obtención de derivados, en futuras investigaciones. Tampoco fue posible aislar los cassanos reportados por Pamatz-Bolaños en 2018, lo que sugiere realizar colectas de la especie de *C. platyloba* en otras localidades de Michoacán.

PARTE EXPERIMENTAL.

Generalidades.

La purificación de los compuestos se realizó por medio de columnas cromatográficas usando gel de sílice de la marca MERCK con tamaño de poro 230-400 como fase estacionaria. Los disolventes fueron destilados antes de su uso.

Los puntos de fusión fueron determinados con el equipo Fisher Scientific y no están corregidos.

El análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se realizó en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400, utilizando CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$, Piridina- d_5 y TMS como referencia interna o el disolvente. Los espectros obtenidos se procesaron mediante el programa MestReNova 14.

Material vegetal.

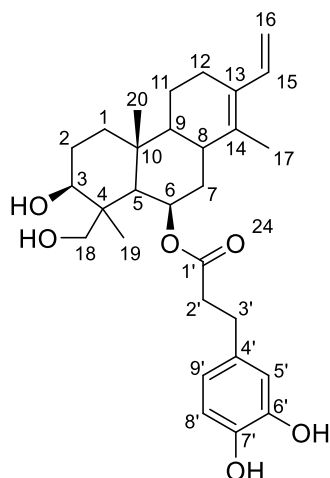
Las hojas de la especie vegetal *C. platyloba* se colectaron en la localidad de los Charcos municipio de Buenavista Tomatlán, Michoacán, se dejaron secar a la sombra, para su posterior tratamiento.

Obtencion de extractos.

Un lote de 2 kg de las hojas secas se molió y se colocaron en maceración, utilizando hexanos como disolvente, durante tres días a temperatura ambiente, posteriormente, se filtró el macerado y se concentró en rotavapor. El mismo proceso se realizó tres veces utilizando CH_2Cl_2 para obtener los respectivos extractos totales.

Obtención de (13E)-3,18-dihidroxi-6-(2',3'-dihidrocafeoxi)cassa-13,15-dieno (73).

El extracto de CH_2Cl_2 se fraccionó en columna cromatográfica usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos:AcOEt en polaridades ascendentes, posteriormente se realizó un barrido con metanol. El barrido metanólico se sometió a recromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil polaridades ascendentes de hexanos:AcOEt. De las fracciones 63-78, obtenidas con la mezcla 2:3 se obtuvieron 11 mg de un sólido blanco con un punto de fusión de 118-120 °C.



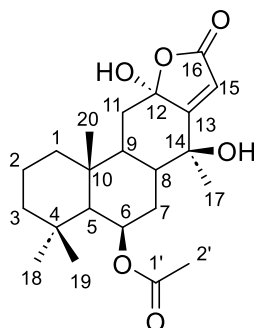
RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ppm 8.71 (1H, s, OH-7'), 8.65 (1H, s, OH-6'), 6.74 (1H, dd, $J = 17.3, 11.0$ Hz, H-15), 6.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-8'), 6.58 (1H, d, $J = 2.1$ Hz H-5'), 6.43 (1H, dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, H-9'), 5.36 (1H, s, H-6), 5.09 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, 16a), 4.95 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, 16b), 4.51 (1H, t, $J = 4.9$ Hz, OH-18), 4.27 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, OH-3), 3.42 (1H, m, H-3), 3.33 (1H, m, 18a), 3.03 (1H, dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, 18b), 2.71 (2H, t, $J = 7.4$ Hz,), 2.57 (1H, dt, $J = 16.5, 8.2$ Hz,), 2.28 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 2.12 (1H, t, $J = 13.1$ Hz), 2.03 (1H, d, $J = 13.7$ Hz), 1.93 (4H, m), 1.77 (1H, d, $J = 12.3$ Hz), 1.65 (1H, d, $J = 13.2$ Hz), 1.56 (3H, s, CH₃-17), 1.37 (1H, s, H-5), 1.09 (3H, s, CH₃-19), 1.01 (3H, m), 0.85 (1H, t, $J = 11.3$ Hz), 0.65 (3H, s, CH₃-20)

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ ppm 171.79 (C, C=O), 145.00 (C, C-7'), 143.39 (C, C-6'), 135.51 (C, C-14), 135.23 (C, C-15), 131.12 (C, C-13), 128.68 (C, C-4'), 118.46 (C, C-9'), 115.41 (C, C-8'), 115.35 (C, C-5'), 111.21 (C, C-16), 70.08 (C, C-3), 69.62 (C, C-18), 63.48, 53.53 (C, C-5), 46.37 (C, C-9), 42.45 (C, C-4), 39.86, 37.93 (C, C-8), 36.14 (C, C-1), 36.11, 36.07, 29.55 (C, C-3'), 26.85 (C, C-12), 25.88 (C, C-2), 20.85 (C, C-11), 16.47 (C, C-20), 15.40 (C, C-19), 13.01 (C, C-17).

Obtención de 6β-acetoxi-12,14-dihidroxicassa-(13)15-en-16,12-olida (11).

El extracto de CH₂Cl₂ se fraccionó en columna cromatográfica usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos:AcOEt en polaridades ascendentes, posteriormente se realizó un barrido con metanol. El barrido metanólico se sometió a recromatografía en columna usando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil polaridades ascendentes de hexanos:AcOEt. De las fracciones 17-25, eluidas con

la mezcla 3:7, se obtuvieron 17 mg de cristales incoloros con forma de agujas con un punto de fusión de 204-205 °C.



RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ ppm 7.36 (1H, s), 5.76 (1H, s, H-15), 5.39 (1H, s, H-6), 5.23 (1H, s), 2.32 (1H, d, $J = 10.0$ Hz), 1.97 (3H, s, OAc), 1.97 (1H, m), 1.66 (2H, t, $J = 12.1$ Hz), 1.53 (1H, t, $J = 13.6$ Hz), 1.42 (2H, td, $J = 10.2, 6.6$ Hz), 1.31 (1H, dd, $J = 11.7, 8.2$ Hz), 1.18 (3H, s, CH₃-17), 1.04 (3H, s, CH₃-20), 1.00 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 0.94 (3H, s, CH₃-19), 0.92 (3H, s, CH₃-18)

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ ppm 176.85 (C-13), 169.80 (C-16), 169.61 (C-1'), 111.84 (C-15), 105.40 (C-12), 72.43 (C-14), 68.50 (C-6), 54.01 (C-5), 46.60 (C-9), 43.54 (C-8), 43.09 (C-3), 41.37 (C-1), 37.74 (C-11), 37.38 (C-10), 33.47 (C-4), 30.88 (C-7), 29.03 (C-18), 23.26 (C-19), 21.48 (C-17), 20.61 (C-2'), 18.56 (C-2), 16.92 (C-20)

RMN de ^1H (Piridina- d_5 , 400 MHz) δ ppm 6.47 (1H, s, H-15), 5.74 (1H, sa, H-6), 2.77 (1H, dd, $J = 20.1, 11.4$ Hz, H-11a), 2.62 (1H, dt, $J = 14.5, 3.2$ Hz, H-7a), 2.22 (1H, ta, $J = 10.3$ Hz, H-8), 1.90 (3H, s, OAc), 1.76 (3H, s, CH₃-17), 1.73 (2H, m, H-9, H-11b), 1.67 (2H, m, H-1a, H-7b), 1.54 (1H, m, H-2a), 1.36 (1H, m, H-2b), 1.29 (1H, m, H-3a), 1.11 (1H, s, H-5), 1.14 (1H, m, H-3b), 1.09 (3H, s, CH₃-20), 1.04 (1H, s, H-1b), 0.98 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, s, CH₃-18).

RMN de ^{13}C (Piridina- d_5 , 100 MHz) δ ppm 178.79 (C-13), 171.20 (C-16), 170.52 (C=O AcO), 113.18 (C-15), No detectado (C-12), 73.77 (C-14), 69.59 (C-6), 55.37 (C-5), 47.96 (C-9), 45.02 (C-8), 43.96 (C-3), 42.29 (C-1), 39.34 (C-11), 38.43 (C-10), 34.22 (C-4), 33.92 (C-18), 32.44 (C-7), 23.79 (C-19), 21.96 (C-17), 21.69 (CH₃-AcO), 19.43 (C-2), 17.62 (C-20).

REFERENCIAS

- Abdallah, I. I., & Quax, W. J. (2017). A Glimpse into the Biosynthesis of Terpenoids. *KnE Life Sciences*, 81-98. <https://doi.org/10.18502/kls.v3i5.981>
- Cota, B. B., de Oliveira, D. M., de Siqueira, E. P., Souza-Fagundes, E. M., Pimenta, A. M., Santos, D. M., Rabello, A., & Zani, C. L. (2011). New cassane diterpenes from *Caesalpinia echinata*. *Fitoterapia*, 82(7), 969-975. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.05.014>
- Cox, P. A., & King, S. (2013). Bioprospecting. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 588-599). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00350-6>
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The Natural Functions of Secondary Metabolites. In A. Fiechter (Ed.), *History of modern biotechnology I* (Vol. 69, pp. 1-39). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3rd Edition ed.). John Wiley & Sons.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution*, 18(4), 586-608. <https://doi.org/10.2307/2406212>
- Gagnon, E., Bruneau, A., Hughes, C. E., de Queiroz, L. P., & Lewis, G. P. (2016). A new generic system for the pantropical *Caesalpinia* group (Leguminosae). *PhytoKeys*, 71, 1-160. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.71.9203>
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408-414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>
- Gilani, S. M. U., Ahmed, S., Baig, S. G., & Hasan, M. M. (2019). Ethnopharmacognosy, phytochemistry and pharmacology of genus *Caesalpinia*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4), 2222-2229.
- Gómez-Hurtado, M. A., Álvarez-Esquivel, F. E., Rodríguez-García, G., Martínez-Pacheco, M. M., Espinoza-Madrigal, R. M., Pamatz-Bolaños, T., Salvador-Hernández, J. L., García-Gutiérrez, H. A., Cerda-García-Rojas, C. M., & Joseph-Nathan, P. (2013). Cassane diterpenes from *Caesalpinia platyloba*. *Phytochemistry*, 96, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.028>

- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K.-M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050968>
- Jing, W., Zhang, X., Zhou, H., Wang, Y., Yang, M., Long, L., & Gao, H. (2019). Naturally occurring cassane diterpenoids (CAs) of *Caesalpinia*: A systematic review of its biosynthesis, chemistry and pharmacology. *Fitoterapia*, 134, 226-249.
- Kalauni, S. K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Linn, T. Z., Asih, P. B. S., Syafruddin, D., & Kadota, S. (2006). Antimalarial activity of cassane-and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure–activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(5), 1050-1052. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1050>
- Kalauni, S. K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Linn, T. Z., & Kadota, S. (2004). Cassane-and Norcassane-Type Diterpenes of *Caesalpinia crista* from Myanmar. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1859-1863. <https://doi.org/10.1021/np049742m>
- Kalauni, S. K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Linn, T. Z., & Kadota, S. (2005). New cassane-type diterpenes of *Caesalpinia crista* from Myanmar. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(2), 214-218. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.214>
- Karen, K. (2022). Chapter-9 Overview of Important Plant Secondary Metabolites and Their Therapeutic Applications. *Chief Editor Dr. RK Naresh*, 132.
- Kiem, P. V., Minh, C. V., Huong, H. T., Lee, J. J., & Kim, Y. H. (2005). Caesaldecane, a cassane diterpenoid from the leaves of *Caesalpinia decapetala*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 53(4), 428-430. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.428>
- Kinoshita, T. (2000). Chemical Studies on the Philippine Crude Drug Calumbibit (Seeds of *Caesalpinia bonduc*: The Isolation of New Cassane Diterpenes Fused with α , β -Butenolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(9), 1375-1377. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1375>
- Kinoshita, T., Haga, Y., Narimatsu, S., Shimada, M., & Goda, Y. (2005). The isolation and structure elucidation of new cassane diterpene-acids from *Caesalpinia crista* L.(Fabaceae), and review on the nomenclature of some *Caesalpinia* species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(6), 717-720. <https://doi.org/10.1248/cpb.53.717>

- Kitagawa, I., Simanjuntak, P., Watano, T., Shibuya, H., Fujii, S., Yamagata, Y., & Kobayashi, M. (1994). Indonesian medicinal plants. XI. Chemical structures of caesaldekariins a and b, two new cassane-type furanoditerpenes from the roots of *Caesalpinia major* (Fabaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 42(9), 1798-1802. <https://doi.org/10.1248/cpb.42.1798>
- Kroymann, J. (2011). Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.021>
- Li, C.-H., Zhang, J.-Y., Tuong, T. M. L., Liu, Y., Hoang, X. N., & Gao, J.-M. (2020). Cassane diterpenoids from the aerial parts of *Caesalpinia pulcherrima* and their antifeedant and insecticidal activities against *Mythimna separate* and *Plutella xylostella*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(14), 4227-4236. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00853>
- Linn, T. Z., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Kalauni, S. K., Attamimi, F., Ueda, J.-y., Asih, P. B. S., Syafruddin, D., & Tanaka, K. (2005). Cassane-and Norcassane-Type Diterpenes from *Caesalpinia crista* of Indonesia and Their Antimalarial Activity against the Growth of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Natural Products*, 68(5), 706-710. <https://doi.org/10.1021/np0401720>
- Lyder, D. L., Peter, S. R., Tinto, W. F., Bissada, S. M., McLean, S., & Reynolds, W. F. (1998). Minor cassane diterpenoids of *Caesalpinia bonduc*. *Journal of Natural Products*, 61(12), 1462-1465. <https://doi.org/10.1021/np980198p>
- Ma, G.-X., Xu, X.-D., Cao, L., Yuan, J.-Q., Yang, J.-S., & Ma, L.-Y. (2012). Cassane-type diterpenes from the seeds of *Caesalpinia minax* with their antineoplastic activity. *Planta medica*, 78(12), 1363-1369. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1314976>
- Ma, G.-X., Yuan, J.-Q., Cao, L., Yang, J.-S., & Xu, X.-D. (2012). The new cassane-type diterpenes from *Caesalpinia minax*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(6), 759-763. <https://doi.org/10.1248/cpb.60.759>
- Ma, R. J., Hu, J. M., Yang, X. Y., & Wang, L. Q. (2014). Three New Cassane-Type Diterpenes from *Caesalpinia minax*. *Helvetica Chimica Acta*, 97(7), 1009-1013. <https://doi.org/10.1002/hlca.201300401>

- Maurya, R., Ravi, M., Singh, S., & Yadav, P. P. (2012). A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. *Fitoterapia*, 83(2), 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.12.007>
- Pamatz-Bolaños, T. (2018). Estudio químico de especies del género *Caesalpinia* del Estado de Michoacán y su aplicación en Biocombustibles [Tesis de Doctorado]. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH*.
- Peter, S., Tinto, W. F., McLean, S., Reynolds, W. F., & Yu, M. (1998). Cassane diterpenes from *Caesalpinia bonducella*. *Phytochemistry*, 47(6), 1153-1155. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)80090-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)80090-3)
- Pournaghi, N., Khalighi-Sigaroodi, F., Safari, E., & Hajiaghaee, R. (2020). A review of the genus *Caesalpinia* L.: emphasis on the cassane and norcassane compounds and cytotoxicity effects. *Journal of Medicinal Plants*, 19(76), 1-20. <https://doi.org/10.29252/jmp.19.76.1>
- Pranithanchai, W., Karalai, C., Ponglimanont, C., Subhadhirasakul, S., & Chantrapromma, K. (2009). Cassane diterpenoids from the stem of *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry*, 70(2), 300-304. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.006>
- Qaderi, M. M., Martel, A. B., & Strugnell, C. A. (2023). Environmental Factors Regulate Plant Secondary Metabolites. *Plants*, 12(3), 447. <https://doi.org/10.3390/plants12030447>
- Ravelo, Á. G., & Braun, A. E. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Rev. Real Acad. Cienc. Exactas Físicas Nat*, 103, 409-420.
- Ringuelet, J. A., & Viña, S. Z. (2013). *Productos naturales vegetales*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/27885>
- Roengsumran, S., Limsuwankesorn, S., Ngamrojnavanich, N., Petsom, A., Chaichantipyuth, C., & Ishikawa, T. (2000). Cassane diterpenoid from *Caesalpinia major*. *Phytochemistry*, 53(8), 841-844. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00434-3)
- Servín-García, G. (2020). Evaluación de la reactividad y preparación de derivados nitrogenados a partir del 6 β -acetoxivouacapano [Tesis de Maestría]. *Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH*.

- Teklić, T., Paradiković, N., Špoljarević, M., Zeljković, S., Lončarić, Z., & Lisjak, M. (2021). Linking abiotic stress, plant metabolites, biostimulants and functional food. *Annals of Applied Biology*, 178(2), 169-191. <https://doi.org/10.1111/aab.12651>
- Tissier, A., Ziegler, J., & Vogt, T. (2014). Specialized plant metabolites: diversity and biosynthesis. *Ecological biochemistry: environmental and interspecies interactions*, 14-37. <https://doi.org/10.1002/9783527686063.ch2>
- Tong, Z., Cheng, L., Song, J., Wang, M., Yuan, J., Li, X., Gao, H., & Wu, Z. (2018). Therapeutic effects of *Caesalpinia minax* Hance on complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis and the anti-inflammatory activity of cassane diterpenes as main active components. *Journal of Ethnopharmacology*, 226, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.011>
- Torres-Mendoza, D., Ureña-González, L. D., Ortega-Barría, E., Capson, T. L., & Cubilla-Rios, L. (2003). Five New Cassane Diterpenes from *Myrospermum frutescens* with Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Natural Products*, 66(7), 928-932. <https://doi.org/10.1021/np030010o>
- Torres-Mendoza, D., Ureña-González, L. D., Ortega-Barría, E., Coley, P. D., Kursar, T. A., Capson, T. L., McPhail, K., & Cubilla-Rios, L. (2004). Novel Cassane and Cleistanthane Diterpenes from *Myrospermum frutescens*: Absolute Stereochemistry of the Cassane Diterpene Series. *Journal of Natural Products*, 67(10), 1711-1715. <https://doi.org/10.1021/np049890c>
- Vij, T., Anil, P. P., Shams, R., Dash, K. K., Kalsi, R., Pandey, V. K., Harsányi, E., Kovács, B., & Shaikh, A. M. (2023). A Comprehensive review on bioactive compounds found in *Caesalpinia sappan*. *Molecules*, 28(17), 6247. <https://doi.org/10.3390/molecules28176247>
- Wang, M., Zhang, X., Qi, M., Guo, D., Wang, Y., & Gao, H. (2021). New cassane- and norcassane-type diterpenoids from the seed kernels of *Caesalpinia sinensis* and their anti-inflammatory activity in vitro. *Fitoterapia*, 153, 104978. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104978>
- Wang, M., Zhu, T., Yu, S., Liu, T., Zhou, B., & Gao, H. (2022). Four new cassane-type diterpenoids from the seed kernels of *Caesalpinia cucullata* Roxb. *Natural Product Research*, 36(19), 5032-5038. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1919107>

- Watson, S. (1886). Contributions to American botany. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 21, 414-468. <https://doi.org/10.2307/25138775>
- Wu, S., Wu, Z., Fu, C., Wu, C., Yuan, J., Xian, X., & Gao, H. (2015). Simultaneous identification and analysis of cassane diterpenoids in *Caesalpinia minax* Hance by high-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of separation science*, 38(23), 4000-4013. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500868>
- Xu, J., Cao, X., Liu, F., Ma, J., Liu, X., Tong, L., Su, G., Ohizumi, Y., Lee, D., & Wang, L. (2016). Characterization of diterpenoids from *Caesalpinia decapetala* and their anti-TMV activities. *Fitoterapia*, 113, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.017>
- Yadav, P. P., Arora, A., Bid, H. K., Konwar, R. R., & Kanojiya, S. (2007). New cassane butenolide hemiketal diterpenes from the marine creeper *Caesalpinia bonduc* and their antiproliferative activity. *Tetrahedron Letters*, 48(40), 7194-7198. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.07.206>
- Yadav, P. P., Maurya, R., Sarkar, J., Arora, A., Kanojiya, S., Sinha, S., Srivastava, M., & Raghubir, R. (2009). Cassane diterpenes from *Caesalpinia bonduc*. *Phytochemistry*, 70(2), 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.008>
- Yin, Y., Ma, L., & Hu, L. H. (2008). Cassane-Type Diterpenoids from the Seeds of *Caesalpinia magnifoliolata*. *Helvetica Chimica Acta*, 91(5), 972-977. <https://doi.org/10.1002/hlca.200890104>
- Zanin, J. L., de Carvalho, B. A., Martineli, P. S., dos Santos, M. H., Lago, J. H., Sartorelli, P., Viegas, C., Jr., & Soares, M. G. (2012). The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, 17(7), 7887-7902. <https://doi.org/10.3390/molecules17077887>