



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL TILIRÓSIDO A PARTIR DE LAS SEMILLAS  
DE *HELIOCARPUS TEREBINTHINACEUS* (CUETLA)”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA:  
BERENICE FERNÁNDEZ ROJAS**

**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. NORMA FRANCENIA SANTOS SÁNCHEZ**

**HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA, SEPTIEMBRE 2006**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Agroindustrias de la UTM y ha sido aceptado en el XLI Congreso Mexicano de Química. Los espectros de IR, EM, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos en el departamento de Química del CINVESTAV.

Dedico este trabajo a mi mamá Virginia Rojas Ríos (q.e.d.) que con su ejemplo, cariño, confianza, dedicación, condescendencia y apoyo incondicional logré culminar mis estudios y la presente tesis.

A mi papá Raúl Fernández Chávez por su apoyo, fe, cariño y fortaleza, aún cuando existieron adversidades.

A mi abuelita Margarita Rojas Ríos y a mi hermano Raúl Fernández Rojas por estar conmigo en los momentos más difíciles.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez de la UTM, por su paciencia, apoyo, orientación y buen consejo en la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Angelina Flores Parra del CINVESTAV, por su apoyo en la obtención de los espectros.

A mis compañeros y amigos de generación Melina, Jeanett, Aleyda, Pedro y Fernando por todos los momentos que pasamos juntos.

A todos mis amigos, especialmente a Jesica, BAVAT y a Gaby, por su apoyo y cariño, gracias por su amistad.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	iii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS</b>	4
2.1. Métodos de extracción	8
2.2. Métodos de separación	10
2.3. Elucidación estructural	12
2.3.1. Espectroscopía de Infrarrojo (EIR)	12
2.3.2. Espectrometría de Masa (EM)	13
2.3.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	14
<b>3. MÉTODOS Y MATERIALES</b>	16
3.1. Extracción	16
3.2. Purificación por cromatografía flash	17
3.3. Cromatografía en capa delgada preparativa (CCD-P)	19
3.4. Cristalización	20
3.5. Punto de fusión	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	22
4.1. Tilirósido (M1)	23
4.2. Ftalato (M2)	36
<b>5. CONCLUSIONES</b>	44
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	45
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	46
<b>8. APÉNDICE A (Tablas)</b>	50
<b>9. APÉNDICE B (Diagramas de bloques)</b>	52
<b>10. APÉNDICE C (Lista de eluyentes para CCD)</b>	59

## RESUMEN

Las hojas, semillas y flores de *Heliocarpus terebinthinaceus*, han sido empleadas en la medicina tradicional para tratar paño, acné y gastritis. Estudios recientes demuestran que los extractos polares de acetato de etilo, acetona y metanol de las semillas de éste árbol presentan una actividad antioxidante moderada, por ésta razón se llevó a cabo la purificación y caracterización espectroscópica completa de un antioxidante del extracto de acetato de etilo de las semillas de *H. terebinthinaceus*, así como de un artefacto. Los que fueron identificados como un glicósido del kaempferol y un ftalato respectivamente, el primero comúnmente conocido como tilirósido.

La purificación del extracto de acetato de etilo obtenido, por Soxhlet, se realizó por cromatografía en columna flash, por cromatografía en capa delgada preparativa, y adicionalmente para el glicósido, por cristalización. La elucidación estructural se llevó a cabo por la combinación de datos de los espectros de infrarrojo, de masa de alta resolución y de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones. Los compuestos fueron obtenidos con un rendimiento de 0.59% para el glicósido (1) y con un 0.54% para el ftalato (2), desde el extracto.

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Estructuras de los compuestos encontrados en el extracto de AcOEt de las semillas de <i>H. terebinthinaceus</i> .	2
<b>Figura 2.</b>	Semillas de <i>Heliocarpus terebinthinaceus</i> .	5
<b>Figura 3.</b>	Alcaloide encontrado en <i>Microcos paniculata</i> L. (Tiliaceae) (Bandara <i>et al.</i> , 2000).	5
<b>Figura 4.</b>	Estructura de compuestos encontrados en <i>Tilia argentea</i> (Toker <i>et al.</i> , 2004 -a-).	7
<b>Figura 5.</b>	Equipos de extracción Soxhlet.	17
<b>Figura 6.</b>	Columna, regulador y pinza para la cromatografía flash.	18
<b>Figura 7.</b>	Fusiómetro empleado.	21
<b>Figura 8.</b>	Porcentaje de extracto con AcOEt en las semillas de <i>H. terebinthinaceus</i> .	22
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de compuestos purificados en el extracto de AcOEt de <i>H. terebinthinaceus</i> .	23
<b>Figura 10.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>1</b> a 100 MHz en DMSO- $d_6$ a 30 °C.	24
<b>Figura 11.</b>	Porción de kaempferol de <b>1</b> .	25
<b>Figura 12.</b>	Espectro de IR de <b>1</b> en KBr.	26
<b>Figura 13.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>1</b> a 400 MHz en DMSO- $d_6$ a 30 °C.	27
<b>Figura 14.</b>	Fragmento del espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) de 8.43 a 6.91 ppm en RMN- $^1\text{H}$ de <b>1</b> .	28
<b>Figura 15.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR de 7.23 a 5.89 ppm en RMN- $^1\text{H}$ de <b>1</b> .	28
<b>Figura 16.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR de <b>1</b> .	29
<b>Figura 17.</b>	Porción del ácido <i>p</i> -cumárico de <b>1</b> .	30
<b>Figura 18.</b>	Porción de glucosa en <b>1</b> .	30
<b>Figura 19.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR que muestra la porción de la glucosa de <b>1</b> .	31
<b>Figura 20.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR que muestra la correlación de C7'' en la glucosa con sus dos protones.	32
<b>Figura 21.</b>	Fragmento de la región alifática del espectro de RMN de $^1\text{H}$ en DMSO- $d_6$ + D $_2$ O de <b>1</b> .	32
<b>Figura 22.</b>	Tilirósido encontrado en el extracto de AcOEt de <i>Heliocarpus terebinthinaceus</i> .	33
<b>Figura 23.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de <b>2</b> a 400 MHz en CDCl $_3$ a 21 °C.	37
<b>Figura 24.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR de la región aromática de <b>2</b> .	38
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de <b>2</b> a 100 MHz en CDCl $_3$ a 21 °C.	39
<b>Figura 26.</b>	Fragmento del diagrama HETCOR de la región alifática de <b>2</b> .	40
<b>Figura 27.</b>	Estructura de <b>2</b> .	40
<b>Figura 28.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del bis(2-etilhexil)ftalato $^1$	41

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Datos de RMN de $^{13}\text{C}$ del tilirósido ( <b>1</b> ) en $\text{DMSO-}d_6$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$ .	34
<b>Tabla 2.</b> Datos de RMN de $^1\text{H}$ del tilirósido ( <b>1</b> ) en $\text{DMSO-}d_6$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$ .	35
<b>Tabla 3.</b> Datos de RMN de $^{13}\text{C}$ del ftalato ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$ a $21\text{ }^\circ\text{C}$ .	42
<b>Tabla 4.</b> Datos de RMN de $^1\text{H}$ del ftalato ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$ a $21\text{ }^\circ\text{C}$ .	43
<b>Tabla 5.</b> Materiales, equipos y disolventes utilizados para la extracción de las semillas de <i>H. terebinthinaceus</i> .	50
<b>Tabla 6.</b> Materiales, equipos, reactivos y disolventes utilizados para cromatografía flash.	50
<b>Tabla 7.</b> Materiales, equipos, reactivos y disolventes utilizados para TLC-P.	51
<b>Tabla 8.</b> Materiales, equipos y disolventes utilizados para cristalización.	51



## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Ángstrom
Ác.	Ácido
AcOEt	Acetato de etilo
ASE	Extracción con disolventes acelerados
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
EIR	Espectroscopía de infrarrojo
EM	Espectrometría de masa
<i>Et al.</i>	<i>et alius</i> / y otros
eV	Electronvoltio
CG	Cromatografía de gases
HETCOR	Heteronuclear shift correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
HCO <sub>2</sub> H	Ácido fórmico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k</i>	Coeficiente de partición
KBr	Bromuro de potasio
kG	Kilo Gauss
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M1	Mancha 1
M2	Mancha 2
MHz	Mega Hertz
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa
CP	Cromatografía en papel
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
<i>R<sub>f</sub></i>	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCD-P	Cromatografía en capa delgada preparativa
UV	Ultravioleta
v:v	Volumen:volumen
v:v:v	Volumen:volumen:volumen
δ	Desplazamiento químico
μm	Micrómetro

## 1. INTRODUCCIÓN

El árbol *Heliocarpus terebinthinaceus*, conocido como cuetla, pertenece a la familia Tiliaceae. En esta familia existen especies que presentan propiedades antimicrobianas, insecticidas, antivirales, además de presentar actividad antioxidante, tales como *Tilia tomentosa* (Viola, 2003) y *Triumfetta rhomboidea* (Cos, 2002). Incluso la población de Huajuapán de León consume las partes aéreas de *Heliocarpus terebinthinaceus* en infusión para tratar el paño, acné, gastritis y enfermedades estomacales asociadas a agentes microbianos.

Actualmente se han realizado investigaciones con el fin de obtener antioxidantes naturales, debido a la estrecha relación de los antioxidantes sintéticos con enfermedades como el cáncer (Liangli, 2002).

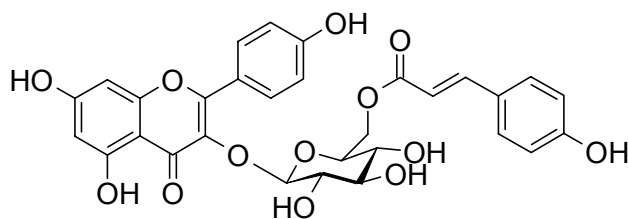
Dentro de esta gran búsqueda es la que se lleva a cabo con *H. terebinthinaceus* y un estudio reciente, demostró que los extractos orgánicos polares de AcOEt, acetona y metanol, de las semillas de cuetla presentan actividad antioxidante moderada (Martínez-Vásquez). Sin embargo no se había determinado la estructura química de los metabolitos secundarios de cada uno de estos extractos. No obstante, con base en lo descrito en la literatura y a la polaridad del extracto, este(os) metabolito(s) antioxidante(s) forma(n) parte del grupo de los fenoles (Tsao *et al.*, 2004).

Con la finalidad de caracterizar los metabolitos secundarios de uno de los extractos orgánicos con mayor actividad antioxidante de *H. terebinthinaceus*, se extrajeron las semillas secas y molidas con disolventes orgánicos en equipos Soxhlet. Los disolventes empleados para la extracción fueron hexano, éter etílico anhidro, CHCl<sub>3</sub> y AcOEt, usados consecutivamente en orden ascendente de polaridad.

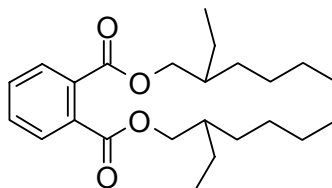
La purificación del extracto de AcOEt de las semillas de *H. terebinthinaceus* se llevó a cabo por cromatografía flash, por cromatografía en capa delgada preparativa (CCD-P) y

por cristalización (M1). De acuerdo al factor de retención ( $R_f$ ) de los compuestos de interés, la mezcla de eluyentes empleada para la cromatografía en columna flash fue hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1, v:v) para M2, compuesto menos polar aislado en este trabajo. Y la mezcla de eluyentes para el compuesto más polar, con respecto a M2, fue AcOEt: $\text{CHCl}_3$  (4:1, v:v), (M1). Específicamente para la purificación de M1 en CCD-P, se eluyó con 3:2:0.2 (v:v:v) acetona: $\text{CHCl}_3$ : $\text{HCO}_2\text{H}$ . Finalmente para el caso de M1 se requirió de una cristalización la cual se llevó a cabo en  $\text{CHCl}_3$ :acetona la cual permitió obtener un antioxidante natural que es un glicósido derivado del kaempferol. El compuesto menos polar, M2, se clasificó como un artefacto, y es un derivado de ftalato.

Los compuestos fueron obtenidos con un rendimiento de 0.59% para el glicósido (**1**) y con un 0.54% para el ftalato (**2**), desde el extracto de AcOEt, **Figura 1**.



3-O-(7''-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucosilkaempferol (tilirósido, **1**)



Bis(2-ethylhexil)ftalato (**2**)

**Figura 1.** Estructuras de los compuestos encontrados en el extracto de AcOEt de las semillas de *H. terebinthinaceus*.

Cabe mencionar que la purificación es muy importante ya que dependiendo de la calidad y cantidad del compuesto, influye en gran manera en el proceso de la elucidación estructural.

Una vez que los compuestos se encontraban puros se caracterizaron por completo mediante el uso combinado de EM, EIR y RMN. Cumpliendo así con el objetivo general de caracterizar un antioxidante presente en el extracto de AcOEt de las semillas de *H. terebinthinaceus*.

## 2. ANÁLISIS DE FUNDAMENTOS

Los aditivos son sustancias que se añaden a los alimentos para modificar y conservar sus características sensoriales y así conservarlas durante un periodo de tiempo prolongado; dentro de estos compuestos se encuentran los antioxidantes.

De acuerdo con la secretaría de salud, un antioxidante es la sustancia, o mezcla de sustancias, que retardan o impiden la oxidación y enranciamiento de los alimentos. Comúnmente se emplean tanto de origen natural como sintéticos, sin embargo los antioxidantes sintéticos se han relacionado con muchas enfermedades como diabetes, hipertensión, cáncer, entre otros (Vinson *et al.*, 2004).

Por esta razón, actualmente existe una búsqueda de antioxidantes de origen natural. No obstante, para que esto suceda es indispensable buscar en los metabolitos secundarios de seres vivos como: frutas, semillas y plantas. Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos derivados de los organismos vivos no esenciales para las funciones metabólicas o fisiológicas primarias. Su papel se asocia con la interacción del organismo con el medio ambiente, p. ej., en funciones de defensa, como desencadenantes o atractivos. Algunas de estas sustancias tienen propiedades farmacológicas o nutritivas, mientras que otras son tóxicas; comúnmente a estos metabolitos se les denomina productos naturales.

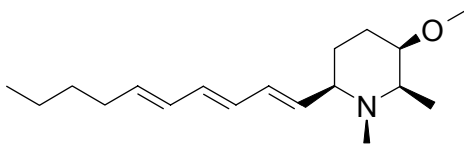
Por lo anterior el presente trabajo de investigación involucró la elucidación estructural de los metabolitos del extracto de AcOEt de las semillas del cuetla, perteneciente al género *Heliocarpus*. Este género no es muy abundante en la naturaleza y actualmente apenas se conocen 20 especies, distribuidas en todo el mundo. Entre ellas se encuentra *H. terebinthinaceus*. (*Tiliaceae*). Este es un árbol que crece en los estados del sureste de México tiene una altura de 2.5 a 6 m, es de hojas grandes y frutos densamente cubiertos con cerdas plumosas de 4 mm de diámetro, de color café oscuro, **Figura 2**.



**Figura 2.** Semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

Se han realizado diversos estudios químicos y biológicos en torno a la familia Tiliaceae y se han hallado propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas (*vide infra*).

Un estudio tanto químico como biológico es el que se realizó a los tallos y corteza de *Microcos paniculata* L. (Tiliaceae), los que se secaron y se extrajeron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y metanol consecutivamente a temperatura ambiente por 24 horas cada uno, estos extractos fueron sometidos a pruebas microbiológicas mostrando una buena actividad insecticida contra la larva *Aedes aegypti*. La purificación se llevó a cabo con cromatografía flash y por CCD-P. La caracterización se realizó con los datos de UV, EIR, EM y RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . El metabolito secundario responsable de esta actividad insecticida, resultó ser un alcaloide nuevo, la *N*-Metil-6- $\beta$ -(deca-1',3',5'-trienil)-3- $\beta$ -metoxi-2- $\beta$ -metilpiperidina (**3**), **Figura 3** (Bandara *et al.*, 2000).

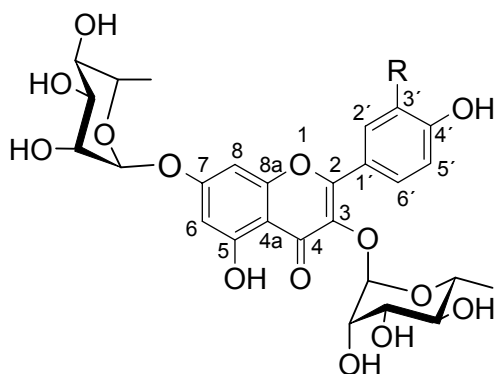


*N*-Metil-6- $\beta$ -(deca-1',3',5'-trienil)-3- $\beta$ -metoxi-2- $\beta$ -metilpiperidina (**3**)

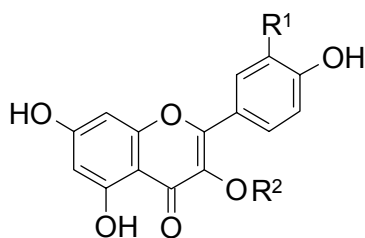
**Figura 3.** Alcaloide encontrado en *Microcos paniculata* L. (Tiliaceae) (Bandara *et al.*, 2000).

Otro estudio químico entorno a la familia Tiliaceae, involucró las partes aéreas de *Triumfetta rhomboidea*, que en África se emplea en la medicina tradicional, posee actividad antibacterial, sedante y terapéutica, dichas partes se secaron a temperatura ambiente y se trituraron antes de la hidrodestilación con un equipo tipo Clevenger (Mevy *et al.*, 2004). La hidrodestilación se llevó a cabo con 300 g de la planta por 2 horas. El análisis cuantitativo de los metabolitos se realizó por CG con un detector de flama ionizada. Los compuestos fueron identificados con CG-EM, por comparación con bases de datos de espectros de masa y confirmados con los índices de retención. Se lograron identificar 71 constituyentes de los cuales el 87% resultaron ser sesquiterpenos entre estos kesano (14%) y el óxido de cariofileno (13%), 4% de monoterpenos y el 2% de constituyentes alifáticos.

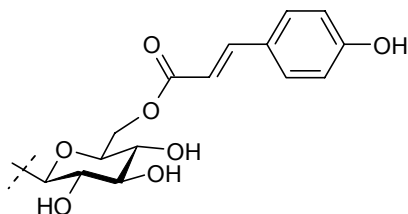
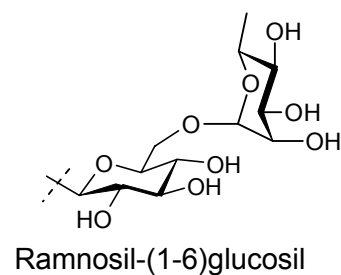
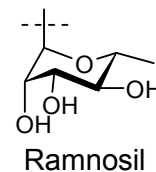
Una planta representativa de esta familia que también ha sido estudiada es *Tilia argentea*, y cuyas hojas son empleadas en Turquía con varios propósitos, tales como sedantes, tranquilizantes, diuréticos, expectorantes para los síntomas de bronquitis, gripa, tos, enfermedades infecciosas y dolor de estómago (Yildirim *et al.*, 2000; Toker *et al.* 2004 -a-). Para el estudio químico, las hojas se secaron y se extrajeron varias veces con etanol al 80%, a temperatura ambiente. El extracto etanólico se evaporó al vacío, y se disolvió en agua, posteriormente se extrajo sucesivamente con disolventes como  $\text{CHCl}_3$  y AcOEt. El extracto de AcOEt se pasó por una columna con gel de sílice (tamaño de partícula 0.2-0.5 mm), se empleó una segunda columna de gel de sílice más fina (tamaño de partícula 0.040-0.063 mm). Las estructuras de los metabolitos secundarios fueron elucidadas con RMN y EM, resultaron ocho compuestos: 3,7-O- $\alpha$ -diramnosilquercetina (**4**), 3,7-O- $\alpha$ -diramnosilkaempferol (**5**), quercetina (**6**), quercitrina (**7**), rutina (**8**), isoquercitrina (**9**), astragalina (**10**) y tilirósido (**1**) **Figura 4** (Toker *et al.*, 2004 -a-, -b-).



R: OH 3,7-O- $\alpha$ -diramnosilquercetina (4)  
 R: H 3,7-O- $\alpha$ -diramnosilkaempferol (5)



Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
Quercetina (6)	OH	H
Quercitrina (7)	OH	Ramnosil
Rutina (8)	OH	Ramnosil-(1-6)glucosil
Isoquercitrina (9)	OH	Glucosil
Astragalina (10)	H	Ramnosil
Tilirósido (1)	H	



**Figura 4.** Estructura de compuestos encontrados en *Tilia argentea* (Toker *et al.*, 2004 -a-).



## 2.1. Métodos de extracción

Existen varios métodos de extracción empleados para la separación de antioxidantes, la mayoría se basa en la extracción con disolventes empleando agua, disolventes orgánicos, gases licuados o la combinación de estos a diversas temperaturas y presiones. Hay algunos otros que se basan en la aplicación de presión a través de una prensa, filtración, destilación o absorción por un sólido.

Para los antioxidantes polares como los ácidos fenólicos, y glicósidos de una gran cantidad de flavonoides, generalmente se utiliza para su extracción agua, alcoholes o una mezcla entre estos. Para los antioxidantes tales como agliconas de varios flavonoides y la mayoría de los carotenoides se usan disolventes no acuosos. Un método de extracción que involucra disolventes de diversa polaridad, es el método por Soxhlet que se describe a continuación.

- Extracción por Soxhlet, emplea un disolvente o mezcla de estos. Esta técnica se basa en el coeficiente de partición, en donde a mayor número de extracciones se obtendrá una mayor concentración de los compuestos de interés. El disolvente hierve en el matraz, así su vapor asciende y posteriormente condensa por el refrigerante. El disolvente gotea continuamente sobre la muestra sólida contenida en el cartucho de celulosa. Cuando el disolvente llena la cámara de extracción, la mezcla sifonea hacia el matraz, repitiéndose hasta extraer completamente a los compuestos. Tiene la gran ventaja de emplearse para todo tipo de polaridad, sin embargo es relativamente tardado.

Además de éste método convencional se encuentran otros (Tsao *et al.*, 2004), como los que se mencionan a continuación:

- Extracción en fase sólida, usa una fase sólida y una fase líquida para aislar a un tipo de analito de la solución. Este método es fácil, rápido y económico comparado a la extracción con disolventes. Sin embargo, es quizá más utilizado para limpiar la

muestra, purificar o preconcentrar que para extraer debido a la selectividad y a la saturación de los absorbentes.

- Extracción asistida por microondas, es una técnica relativamente nueva que combina el uso de disolventes con microondas, es importante que el disolvente tenga una polaridad buena, debido a que los disolventes con polaridad alta pueden absorber más energía de microondas, así se obtiene una mejor extracción. Cuando se usan disolventes con polaridad baja toda la energía de microondas puede ser dirigida a la muestra, la humedad dentro de la estructura celular absorbe la energía rápidamente la cual llega a romper la pared celular, liberando así los fitoquímicos al disolvente que lo rodea. No obstante la técnica MAE tiene varias ventajas al compararlo con el método de extracción con disolventes tradicional como: eficiencia alta en la extracción, menor tiempo y menor cantidad de disolvente.
- Extracción con fluidos supercríticos, ciertos gases pueden ser licuados a estados llamados fluidos supercríticos cuando la temperatura y la presión son las adecuadas. Las características de los fluidos supercríticos son similares tanto en estado gaseoso y líquido. El gas tiene características que ayudan a que los fluidos se difundan en la matriz y accedan a los fitoquímicos y el líquido tiene la característica de tener un buen poder de solvatación. El CO<sub>2</sub> es el gas más empleado ya que es baja su toxicidad y no daña el medio ambiente, sin embargo es una tecnología costosa y se utiliza para compuestos de polaridad baja.
- Extracción con líquidos presurizados o extracción con disolventes acelerados, ha sido usado para la extracción de residuos de pesticidas y otros contaminantes del medio ambiente. Esta tecnología solo ha sido empleada para la extracción de fitoquímicos antioxidantes. Se alcanza una rápida y eficiente extracción.

En el presente trabajo se usó la extracción por Soxhlet de las semillas de *H. terebinthinaceus* debido que ésta fue la técnica empleada por Martínez-Vázquez para la determinación de la actividad antioxidante.

## 2.2. Métodos de separación

Para determinar la estructura química de manera inequívoca, es indispensable que la sustancia se encuentre con el mayor grado de pureza posible, esta purificación se lleva a cabo por métodos físicos.

Generalmente para la separación y purificación de muchos antioxidantes se emplea la cromatografía en papel y de columna empacada. Sin embargo la baja eficiencia en la separación y en la resolución, así como los problemas en cuanto a la detección, cuantificación y sensibilidad de estas técnicas cromatográficas convencionales, como la cromatografía en papel (CP), no son tan empleadas como antes.

Existen otros métodos para realizar esta labor de purificación (Tsao *et al.*, 2004), tales como:

- Cromatografía de gases (CG), a pesar de la alta resolución y sensibilidad, su uso en la separación no es tan común como el HPLC, debido a la ausencia de volatilidad de la mayoría de los antioxidantes derivados de las plantas. La aplicación de la CG también está limitada debido a la dificultad de la separación y purificación a gran escala, generalmente se usa con antioxidantes de aceites esenciales de plantas.
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es el sistema más popular y confiable entre todas las técnicas cromatográficas para la separación de antioxidantes. La versatilidad del HPLC es debida a los diferentes modos de separación y a los métodos de detección, entre estos está el detector de diodo array acoplado con un espectrómetro de masa (MS), sin embargo se requiere de una columna empacada, reactivos de grado HPLC, por lo que es una tecnología relativamente costosa.

- Cromatografía a alta velocidad con contracorriente, se basa en el coeficiente de partición ( $k$ ) de un fitoquímico. La separación se hace con presión y con una fuerza centrífuga. La fuerza produce una mezcla vigorosa entre las dos fases de líquidos inmiscibles y la retención de una fracción de la fase estacionaria. A diferencia de otras técnicas cromatográficas, no emplea un soporte sólido como fase estacionaria, así tiene varias ventajas sobre la cromatografía convencional ya que: elimina la pérdida de muestra debida a la irremediable adsorción de la matriz del soporte sólido, tiene un bajo costo ya que no usa absorbentes caros ni columna y además refleja el perfil de la distribución real del fitoquímico en la muestra.
- Cromatografía de fluidos supercríticos, es una nueva tecnología similar al HPLC, debido al uso de fluidos supercríticos, tiene algunas ventajas sobre este, tal como: reduce significativamente el disolvente gastado, hace más fácil la remoción del disolvente cuando se colectan las fracciones, presenta una resolución alta y un tiempo menor en la separación.
- Electroforesis, al igual que el HPLC, la electroforesis está ganando una gran popularidad. Tiene varias ventajas únicas tales como: requiere un tamaño muy pequeño de muestra, tiene eficiencia alta, un costo bajo, puede o no usar una cantidad pequeña de disolvente orgánico.

En este caso se empleó la cromatografía en columna flash (Still *et al.*, 1978), cromatografía en placa preparativa y cristalización, debido a que son técnicas comúnmente empleadas para la purificación.

### 2.3. Elucidación estructural

Cuando se tienen totalmente puros los compuestos de interés es fundamental determinar la cantidad con la que se cuenta y consecuentemente se realizarán los estudios espectroscópicos y espectrométricos para elucidar la estructura con base en los datos espectrales esenciales en el análisis químico moderno.

Para este análisis se empleó la espectroscopía y la espectrometría, que denotan a un grupo de técnicas instrumentales que obtienen espectros correspondientes a los niveles energéticos de átomos y moléculas. El uso combinado de estos datos espectrales permite encontrar la estructura de los compuestos de estudio.

De esta manera, se describirán brevemente las técnicas para elucidación estructural empleadas en el presente trabajo de investigación.

#### 2.3.1. Espectroscopía de Infrarrojo (EIR)

La espectroscopía en la región del infrarrojo, desde el punto de vista analítico, reagrupa una variedad de métodos no destructivos de identificación y determinación basados en la absorción o la reflexión, por parte de la muestra, de radiaciones electromagnéticas comprendidas entre 1-50  $\mu\text{m}$ . Esta región se divide en IR cercano (1-2.5  $\mu\text{m}$ ) e IR medio (2.5-50  $\mu\text{m}$ ). Cabe mencionar que el IR medio, es el que proporciona información acerca de la estructura de los compuestos, ya que permite registrar una especie <huella digital> (Rouessac, 2003), además de una región con correlación a los grupos funcionales.

La radiación IR es absorbida y convertida por la molécula orgánica a energía vibracional molecular. Esta absorción es cuantizada, el espectro vibracional aparece como bandas porque existe un cambio en la energía vibracional la cual es acompañada por un cambio de energía rotacional. El espectro está representado por el porcentaje de transmitancia o absorbancia contra número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Se ha encontrado una correlación entre las posiciones de los máximos de absorbancia de ciertas bandas y la presencia de ciertos grupos funcionales que conservan su frecuencia de vibración, cualquiera que sea la molécula a la que está unida (Rouessac, 2003).

En otras palabras, la EIR, nos ayuda a determinar los tipos de enlaces que tiene la molécula con determinados grupos funcionales, esta información es muy valiosa, y tiene que concordar con la información tanto de EM como de RMN. En este caso, la EIR se empleó para corroborar los grupos funciones de M1, el glicósido, identificados por RMN.

### 2.3.2. Espectrometría de Masa (EM)

La EM es la técnica más poderosa para medir la relación de la masa y la abundancia de las partículas cargadas, es el resultado de los estudios de desviación, magnética y eléctrica de las partículas formadas en los experimentos de rayos catódicos. Ha sido utilizada para la medida de la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa.

El experimento consiste de introducir la muestra en una columna, posteriormente se vaporiza y es golpeada por electrones, formándose de esta manera iones positivos los cuales son acelerados y cuando pasan por el campo magnético sufren una desviación, esta desviación depende de algunos factores como:

- La masa del ión, mientras más ligero será más desviado.
- La carga del ión, los iones con carga igual o mayor a +2 serán más desviados que aquellos con carga +1.

Estos dos factores dan una relación de masa/carga ( $m/z$ ).

Generalmente, los iones más desviados serán los más ligeros mientras que los más pesados llevan una trayectoria más recta.

Finalmente, se obtiene un espectro donde se muestra la relación, masa/carga ( $m/z$ ) y abundancia relativa.

Diversos autores afirman que EM en combinación con EIR y RMN, forman la base del análisis químico orgánico cualitativo para la identificación de estructuras moleculares de compuestos y mezclas desconocidas (Rubinson, 2001).

Cuando se tiene un espectro de masa de alta resolución, se pueden distinguir entre fórmulas de igual masa, debido a que el espectro muestra hasta cuatro decimales. Así se determinan masas exactas ya que los elementos tienen un peso atómico que permite distinguirlos entre ellos.

La información obtenida en este trabajo fue la relación masa/carga para M1 por espectrometría de alta resolución mediante ionización química la cual utiliza un gas ionizable (gas reactante) como el metano y como la relación del gas presente con la muestra es muy elevada, la ionización se producirá preferente sobre el gas. Posteriormente, debido a la alta presión, y a reacciones ión-molécula se consigue la ionización de la muestra. Así se obtiene una abundante cantidad de iones  $(M + H)^+$ .

### 2.3.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectroscópico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía en la región de radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos, cuando estos son colocados en un campo magnético intenso y de homogeneidad alta.

Los núcleos de todos aquellos isótopos cuyos números de masa y de carga sean pares no tienen espín nuclear y en consecuencia no presentan el fenómeno de resonancia.

Típicamente se emplean campos magnéticos de intensidades entre 10 y 25 kG, y por lo tanto las frecuencias de resonancia de los elementos químicos se localizan en la zona de

radiofrecuencia (entre 1 y 100 MHz). Sin embargo en el instrumental comercial muy complejo se usan campos magnéticos muy elevados, entre 50 y 125 kG, con lo que la observación de hidrógenos se efectúa hasta a 500 MHz (Joseph-Nathan, 1982).

En un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  no se comparan intensidades de las distintas señales, sino áreas bajo el contorno de las señales, ya que las áreas son proporcionales al número de átomos relativos que las originan.

La muestra en análisis, inicialmente se encuentra en el estado de baja energía y en presencia del campo magnético absorbe radiofrecuencia y pasa a un estado de alta energía. Parte de los núcleos en el estado de alta energía pasan al de baja energía emitiendo radiación. La información obtenida, es muy valiosa para recopilar información estructural sobre los compuestos moleculares, la cual es empleada y complementada con los métodos de espectroscopía óptica y de espectrometría de masa, ya que permite precisar la fórmula desarrollada, la estereoquímica y la conformación del compuesto estudiado (Rouessac, 2003). Los núcleos atómicos que comúnmente se miden son:  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , (Rubinson, 2000). Como los compuestos orgánicos motivo del presente estudio están formados por átomos de carbono e hidrógeno se empleó la RMN de los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Existen tablas de desplazamientos químicos característicos descritos en la literatura para núcleos tales como  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Con los cuales se determina la cantidad, tipo y relación de estos a través de los enlaces, de esta manera se tendrá una idea muy clara de la estructura, uniones, cifra y tipos de núcleos.

La utilización de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas empleadas, permitieron determinar la estructura del antioxidante tilirosido y del artefacto derivado de ftalato ya que gracias a éstas se determinó la cantidad de carbonos, hidrógenos, oxígenos (EM), que tipos de grupos funcionales se encontraban presentes (EIR) y la estructura molecular completa (RMN).



### 3. MÉTODOS Y MATERIALES

Los disolventes utilizados fueron grado reactivo. Se empleó acetona al 99.5% Sigma-Aldrich, AcOEt de JT Baker,  $\text{CHCl}_3$  de Chemical Meyer, éter etílico anhidro de EMD y hexano al 95% de Sigma-Aldrich. Los cromatofolios fueron de gel de sílice de 200  $\mu\text{m}$  con un tamaño de partícula de 2-25  $\mu\text{m}$ , poro de 60 Å con soporte de aluminio de la marca Sigma-Aldrich. Las purificaciones cromatográficas en columna se llevaron a cabo por cromatografía flash usando gel de sílice 60 (malla 400 – 230, 40 – 63  $\mu\text{m}$ ) Sigma-Aldrich. La cromatografía en capa delgada preparativa se llevó a cabo en cromatofolios de gel de sílice GF de 20 x 20 cm de 500  $\mu\text{m}$  de grueso con indicador de fluorescencia con UV254 de la marca Analtech. La lámpara manejada de UV fue UVG-54 con longitud de onda de 254 nm. El recirculador de agua fría empleado fue ECO10 de la marca SEV, (Apéndice A).

El espectro de masa se obtuvo en un espectrómetro Agilent TOF LC/MSD; el espectro de IR se obtuvo en un espectrómetro Perkin Elmer Mod Spectrum-Gx en pastilla de KBr. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron a 400 y 100 MHz respectivamente en un espectrómetro JEOL GSX-DELTA 400 usando TMS como referencia interna en  $\text{CDCl}_3$  para M2, a 21 °C y en  $\text{DMSO}-d_6$  para M1 a 30 °C.

El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johns, sin corregir, marca SEV.

#### 3.1. Extracción

La semilla seca, colectada en julio del 2004 y octubre del 2005, se separó de los tallos y se trituró en 2 ocasiones en un molino de tornillo. Se pesaron 81 gramos y se colocaron en 4 cartuchos de celulosa para la extracción por Soxhlet, **Figura 5**. La extracción se llevó a cabo con 180 mL de disolvente (hexano, éter etílico, cloroformo y AcOEt) en orden ascendente de polaridad por un periodo de 5 horas. El disolvente se evaporó en el rotavapor a presión reducida y el residuo café oscuro se guardó en un vial limpio a 5 °C para su uso posterior (Diagrama de bloques 1, Apéndice B).



**Figura 5.** Equipos de extracción Soxhlet.

Antes de purificar el extracto, se llevó a cabo una CCD con el objetivo de encontrar las manchas más intensas, y al mismo tiempo para encontrar la mezcla de disolventes ha utilizar como eluyente (Lista 1, Apéndice C) en la cromatografía por columna flash. El extracto mostró varias manchas y muchas de estas con un  $R_f$  muy parecido, pero se observó una, muy intensa que se lograba separar con una mezcla de AcOEt:CHCl<sub>3</sub> (4:1; v:v), a ésta se le denominó M1 ( $R_f = 0.27$  en AcOEt).

### **3.2. Purificación por cromatografía flash**

La columna se preparó de la siguiente forma: se colocó en el fondo un trozo de algodón, para evitar que la fase estacionaria saliera de la columna. La columna se rellenó con gel de sílice hasta alcanzar una altura de 30 cm. Cuidadosamente, se llenó la columna con hexano y se aplicó al disolvente una presión de aire con ayuda del regulador de flujo, **Figura 6.**

Se repitió esta operación hasta que se liberaron las burbujas de aire atrapadas en el gel de sílice (Diagrama de bloques 2, Apéndice B). El aire y el regulador se ajustaron para que el nivel del disolvente mantuviera una velocidad de aproximadamente 5 cm/min.



**Figura 6.** Columna, regulador y pinza para la cromatografía flash.

Posteriormente se colocaron 0.7 g de extracto de AcOEt disueltos con una cantidad mínima de acetona (2 mL) utilizando una pipeta Pasteur. La columna se eluyó con 300 mL de hexano inicialmente y posteriormente con una mezcla de 100 mL de hexano:CHCl<sub>3</sub> (9:1; v:v) aumentando gradualmente la polaridad (con 20 mL de CHCl<sub>3</sub>). La mancha que se denominó M2, apareció con hexano:CHCl<sub>3</sub> (7:3; v:v) y se recolectaron 10 fracciones de 20 mL cada una. Después de que el eluyente fue exclusivamente CHCl<sub>3</sub>, se agregaron 100 mL de una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (9:1; v:v) aumentando nuevamente la polaridad gradualmente (con 20 mL de AcOEt) hasta la mezcla de CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (1:1; v:v), posteriormente se continuó aumentando la polaridad con 5 mL de AcOEt M1 apareció en

7 fracciones de  $\text{CHCl}_3$ :AcOEt (3:7; v:v), consecuentemente se continuó aumentando la polaridad hasta 100 mL de AcOEt. Finalmente se lavó la columna con acetona.

Las fracciones con las manchas de interés (M1 y M2) se combinaron, evaporaron y se conservaron a 5 °C. Cada una de las manchas contenían aún otros compuestos, por lo que se requirió realizar una segunda purificación y esta fue con placas preparativas.

### 3.3. Cromatografía en capa delgada preparativa (CCD-P)

Se trazó de 5-10 mm del extremo inferior de la placa, con un lápiz, una línea superficial señalando el origen del cromatograma. Las muestras (43 mg) se disolvieron con acetona (1 mL) y mediante un capilar se aplicaron pequeños volúmenes de la muestra hasta aplicarla completamente.

Se preparó la mezcla de 100 mL cada una con los siguientes eluyentes:

- Para M2 se utilizó una mezcla de hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1; v:v)
- Para M1 la mezcla empleada fue acetona: $\text{CHCl}_3$  (3:2; v:v adicionando 40 gotas de  $\text{HCO}_2\text{H}$ ), el ácido fórmico se empleó para que las bandas corrieran uniformes.

La placa se colocó verticalmente en la cámara cromatográfica, la atmósfera se saturó previamente con la mezcla del eluyente correspondiente. Este ascendió por la placa arrastrando los componentes de la muestra, cuando el frente del disolvente se aproximó a unos 2 cm del extremo superior de la placa, se retiró. Se secó la placa, se examinó con la lámpara de UV. Una vez que se identificó la mancha de interés se marcó el contorno con ayuda de un lápiz (Diagrama de bloques 3, Apéndice B). Ésta área fue retirada de la placa con una espátula, el gel de sílice impregnado con la mancha se extrajo con acetona, la cual se filtró y concentró a presión reducida.

La mancha pura (M2), se colocó en un vial limpio y previamente pesado. Se midió la distancia recorrida por cada mancha y la recorrida por el disolvente. El cociente de la primera distancia sobre la segunda nos da el  $R_f$  de la muestra (Ecuación 1).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por el frente del disolvente}} \quad [1]$$

M2 con  $R_f$  0.45 en hexano: $\text{CHCl}_3$  (1:1; v:v)

M1 tiene un  $R_f$  de 0.27 en AcOEt.

El aspecto físico de M2 fue de un líquido muy viscoso de color beige, se obtuvieron 1.1 mg de 42 mg de las fracciones pasadas por la columna flash (0.54%, respecto al extracto).

El residuo de la evaporación de M1, resultó un sólido amorfo café claro del cual se obtuvieron 6.7 mg de 50 mg de las fracciones pasadas por la columna flash. Debido a la coloración del sólido se cristalizó.

### 3.4. Cristalización

Se tomaron 10 mg de M1, obtenidos por CCD-P, se disolvieron en acetona (1 mL) y se concentró calentando hasta ebullición, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó una mezcla de hexano: $\text{CHCl}_3$  (7:3; v: v) hasta que la mezcla se observó turbia. La solución de M1 se tapó, se refrigeró y al término de 12 días se observó un sólido amorfo color amarillo claro, el que se separó por filtración de las aguas madres. A una pequeña porción del sólido puro se le determinó el punto de fusión, y el resto del sólido se guardó en refrigeración en un vial limpio y previamente pesado. Las aguas madres fueron recristalizadas bajo las mismas condiciones antes mencionadas (Diagrama de bloques 4, Apéndice B).

Los papeles filtros empleados con restos de M1 se colocaron en un recipiente con acetona con el fin de extraer M1 para su posterior recristalización.

De 10 mg de M1 pasados por placa preparativa se obtuvieron 4 mg de M1 puros (0.59%, respecto al extracto).

### 3.5. Punto de Fusión

Los sólidos se colocaron entre dos cubreobjetos limpios y se situó en la charola de calentamiento, **Figura 7**, posteriormente se encendió la luz y el calentamiento a temperatura media.

Finalmente se observó el intervalo de temperatura en el que el sólido M1 fundió.

El compuesto de M1 funde de 251-252 °C y posteriormente se descompone.

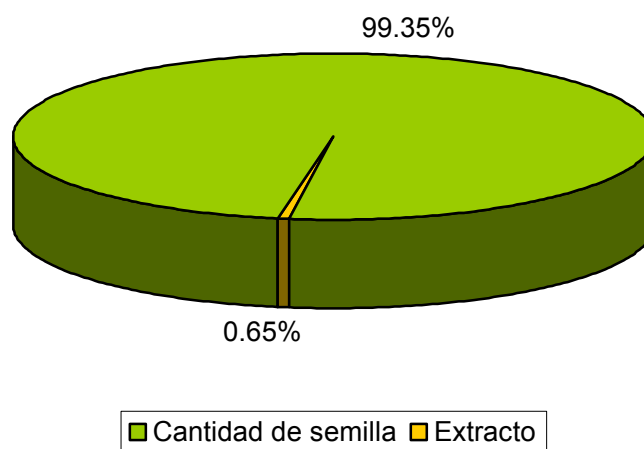


**Figura 7.** Fusiómetro empleado.

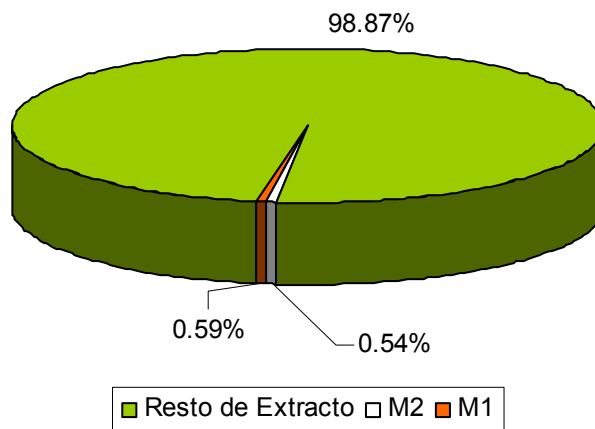
#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las semillas secas de *H. terebinthinaceus* cultivadas en los territorios de la UTM (latitud norte 17° 49'40'', latitud oeste 97° 48'23'', altitud 1790 msnm) en Huajuapán de León Oaxaca, se extrajeron con equipos Soxhlet usando los disolventes siguientes: hexano, éter etílico, cloroformo, y AcOEt en orden ascendente de polaridad.

Después que el extracto obtenido con AcOEt (0.65% de rendimiento desde las semillas), **Figura 8**, se purificó por cromatografía en columna flash, seguido de CCD-P y cristalización, dió un glicosil flavonoide, el 3-O-(7''-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucosilkaempferol (**1**) o mejor conocido como tilirósido (**1**, con 0.59%) (Kaouadji *et al.*, 1993; Lui *et al.*, 1999; Yoshikawa *et al.*, 2006). También se caracterizó un ftalato, el bis(2-etilhexil)ftalato, (**2**, con 0.54%), **Figura 9**. El ftalato aislado **2**, puede ser considerado un artefacto, ya que generalmente este tipo de compuestos no se encuentran como productos naturales.



**Figura 8.** Porcentaje de extracto con AcOEt en las semillas de *H. terebinthinaceus*.



**Figura 9.** Porcentaje de compuestos purificados en el extracto de AcOEt de *H. terebinthaceus*.

Las estructuras de **1** y **2** fueron caracterizadas totalmente por métodos espectroscópicos. Para el compuesto **1** se empleó RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , HETCOR, COSY, EM e IR. En el caso de **2** solamente, RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$ , HETCOR y COSY.

#### 4.1. Tilirósido (M1)

El flavonoide **1** se obtuvo como un sólido amarillo pálido con un p.f. de 251-252 °C. La relación masa/carga de **1** ( $M + \text{H}$ ) $^+$  obtenida fue de 595.1430  $m/z$  (esperado 595.1452) consistente con la fórmula molecular  $[\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13} + \text{H}]$ .

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró un total de 26 señales, 17 de ellas en la región aromática y de los dobles enlaces, **Figura 10**. Con el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  acoplado, se determinó que doce carbonos son cuaternarios, es decir, señales simples; también se encontraron que 13 señales corresponden a carbonos terciarios (CH) y una sola señal para un metileno, que por su desplazamiento químico se trataba de un carbono base de oxígeno.



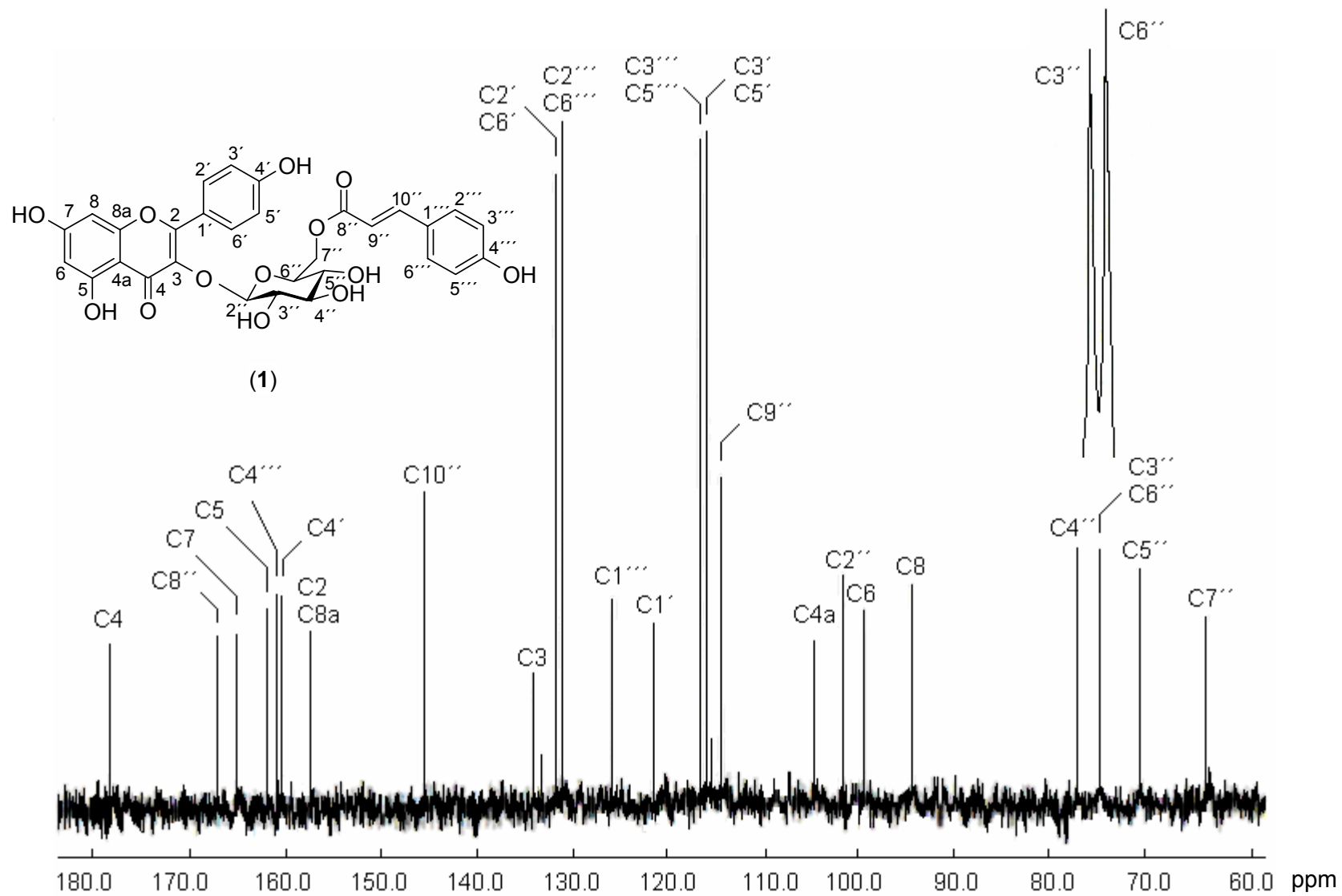
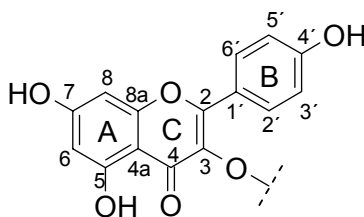


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **1** a 100 MHz en  $\text{DMSO-}d_6$  a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

La porción del flavonoide se estableció para un kaempferol sustituido en el oxígeno del C3, **Figura 11**. La señal cuaternaria con un desplazamiento químico ( $\delta$ ) 178.0 ppm, es característica de un carbonilo y se asignó a C4. Grupo que se corrobora con la banda intensa en  $1685\text{ cm}^{-1}$  del espectro de IR, **Figura 12**.



**Figura 11.** Porción de kaempferol de 1.

Los carbonos cuaternarios, base de OH, en  $\delta$  161.7, 164.8, 160.5 ppm se asignaron a C5, C7 y C4', respectivamente, ya que se encuentran en la región de los aromáticos, unidos a OH. Esto queda comprobado ya que el espectro de IR muestra en  $3537\text{-}2537\text{ cm}^{-1}$  una banda ancha debida al alargamiento y estrechamiento del enlace oxígeno-hidrógeno, **Figura 12**.

Las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\delta$  133.7 y 156.9 ppm se asignaron al doble enlace formado por los carbonos C3 y C2, respectivamente los cuales están unidos a átomos de oxígeno. Este grupo éter se corrobora con la banda intensa en EIR en  $1068\text{ cm}^{-1}$  debida al alargamiento estrechamiento de enlace carbono-oxígeno.

En RMN de  $^1\text{H}$  se halló un sistema AX correspondiente al anillo B del kaempferol, propias para el benceno 1,4-disustituido, las cuales se encuentran en  $\delta$  7.99 y 6.86 ppm para H2'(H6') y para H3'(H5'), respectivamente con una constante de acoplamiento a tres enlaces ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) de 8.6 Hz, **Figura 13**. En el espectro de correlación heteronuclear a un enlace (HETCOR) se observaron correlaciones de estos protones (H2'(H6') y H3'(H5')) con las señales de sus carbonos correspondientes, en  $\delta$  131.4 y en 115.6 ppm, respectivamente **Figuras 14 y 15**.

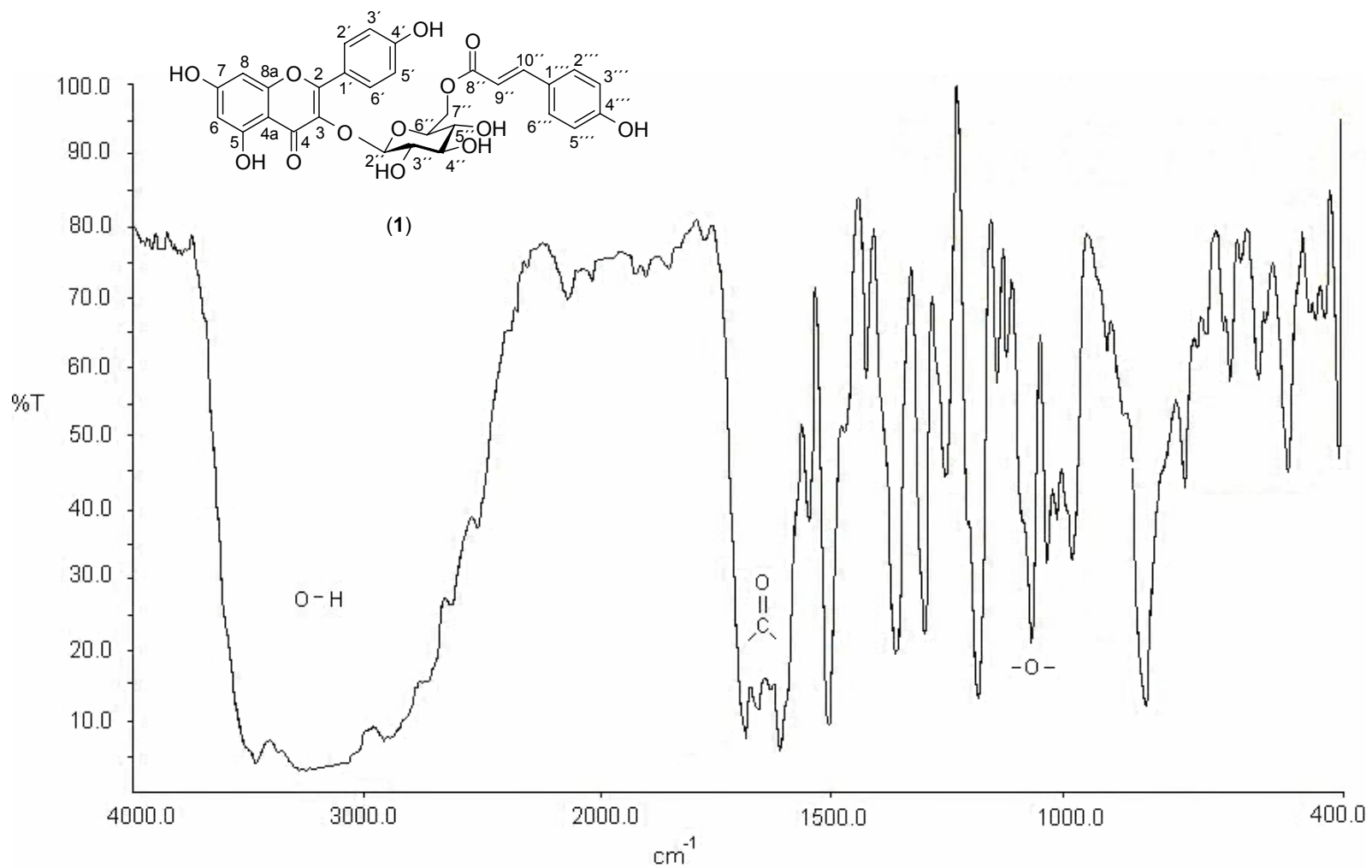


Figura 12. Espectro de IR de 1 en KBr.

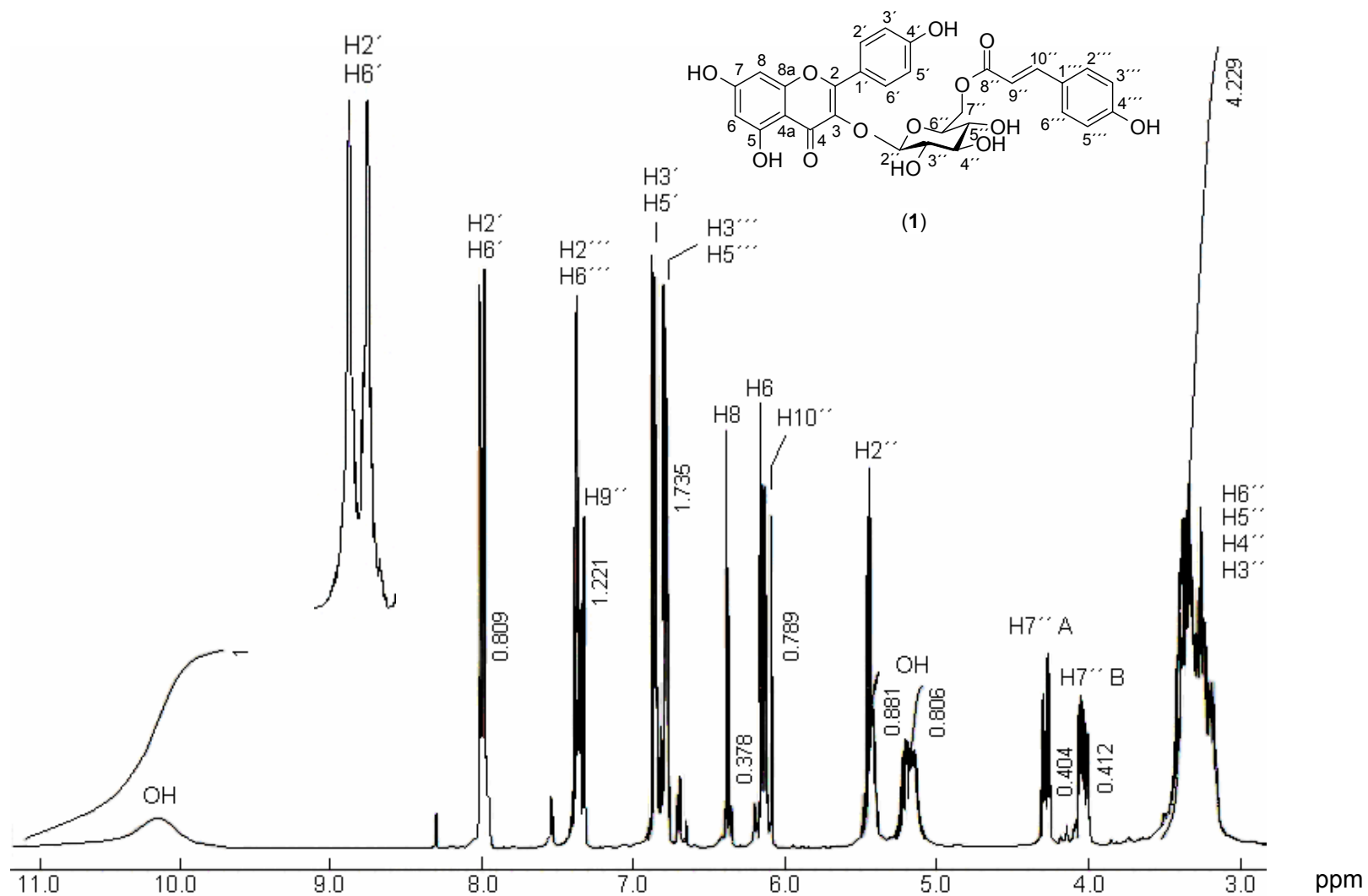
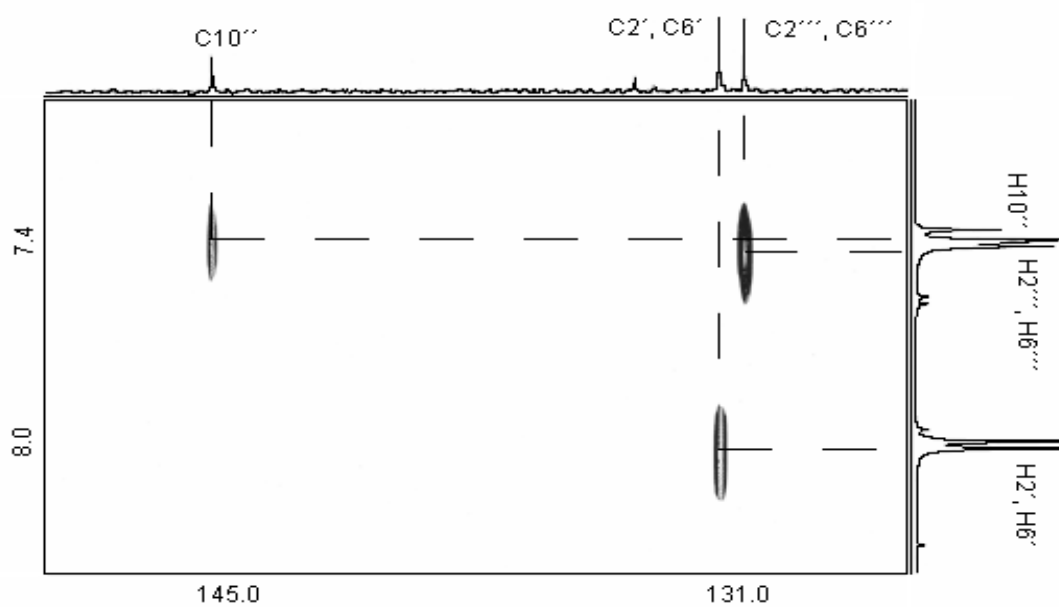
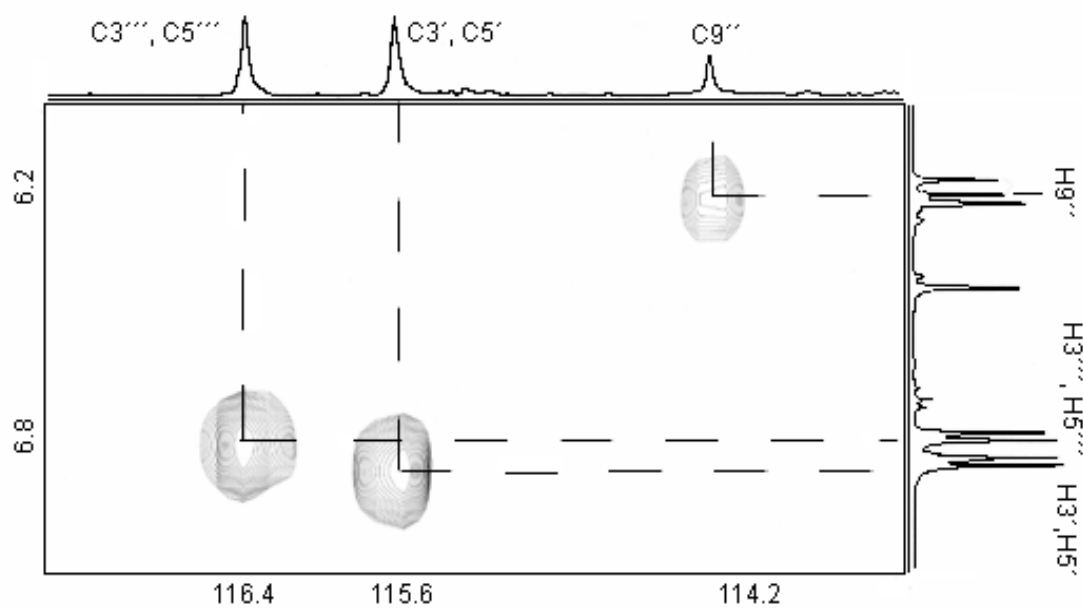


Figura 13. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **1** a 400 MHz en  $\text{DMSO-}d_6$  a 30 °C.

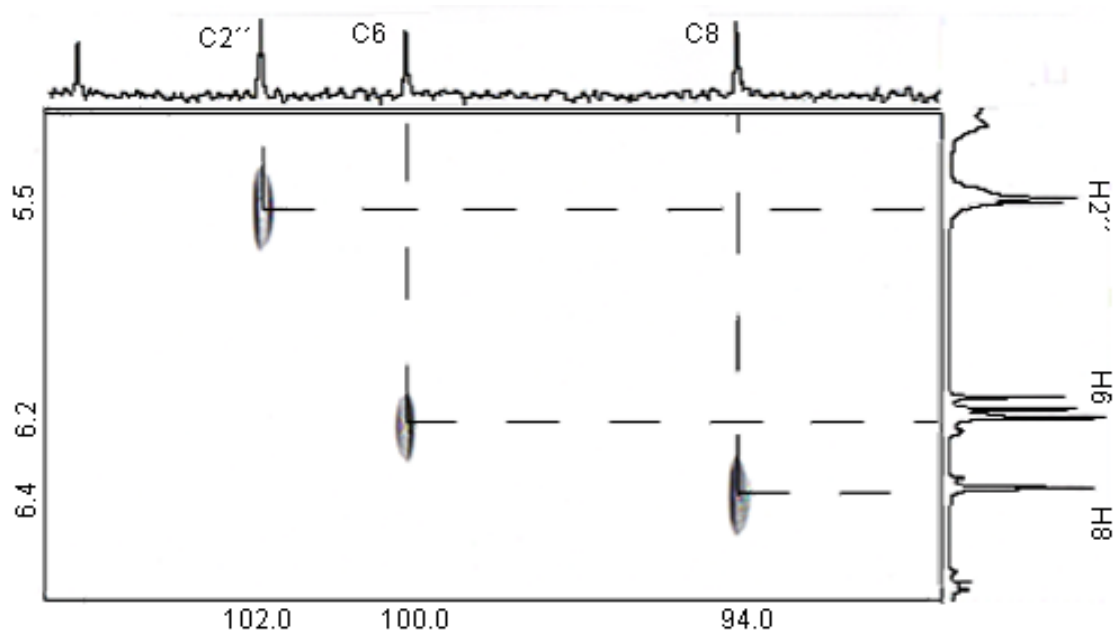


**Figura 14.** Fragmento del espectro de correlación heteronuclear (HETCOR) de 8.43 a 6.91 ppm en RMN- $^1\text{H}$  de **1**.



**Figura 15.** Fragmento del diagrama HETCOR de 7.23 a 5.89 ppm en RMN- $^1\text{H}$  de **1**.

También se observaron correlaciones de las señales en  $\delta$  99.3 y 94.2 ppm con las señales dobles de H6 y H8 ( $^4J_{H-H} = 1.7$  Hz), **Figura 16**. Las señales en  $\delta$  157.0, 121.3 y 104.4 ppm, debido a sus desplazamientos químicos se asignaron a los carbonos C8a, C1' y C4a, respectivamente.

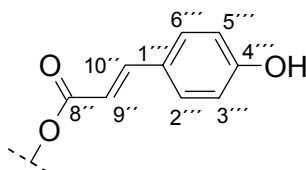


**Figura 16.** Fragmento del diagrama HETCOR de 1.

Con estas señales queda totalmente asignada la porción del kaempferol del compuesto 1. Sin embargo falta por asignar dos señales simples de carbonos cuaternarios (C), 9 dobles (CH) y una señal triple (CH<sub>2</sub>) del espectro de RMN de <sup>13</sup>C acoplado.

Hasta el momento, del espectro de RMN de <sup>13</sup>C de la región aromática, solo resta asignar seis carbonos, además de una señal a frecuencias altas propia de un carbono carbonílico del grupo éster ( $\delta$  166.7 ppm). Por otro lado el espectro de RMN de <sup>1</sup>H mostró otro sistema AX aromático en  $\delta$  7.36 y en 6.79 ppm ( $^3J_{H-H} = 8.6$  Hz) que fue asignado a H2''' (H6''') y H3''' (H5''') que indican la presencia otro benceno *p*-sustituido, estos protones mostraron correlación heteronuclear <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C con los carbonos en  $\delta$  130.7 y en 116.3 ppm, respectivamente **Figuras 14 y 15**. También en  $\delta$  7.34 y en 6.11 ppm se encontraron dos

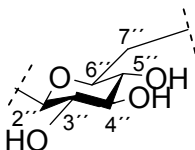
señales dobles asignadas a H9'' y H10'' ( $^3J_{\text{H-H}} = 15.9 \text{ Hz}$ ) que indicaban una porción del éster del ácido *p*-cumárico, **Figura 17**.



**Figura 17.** Porción del ácido *p*-cumárico de **1**.

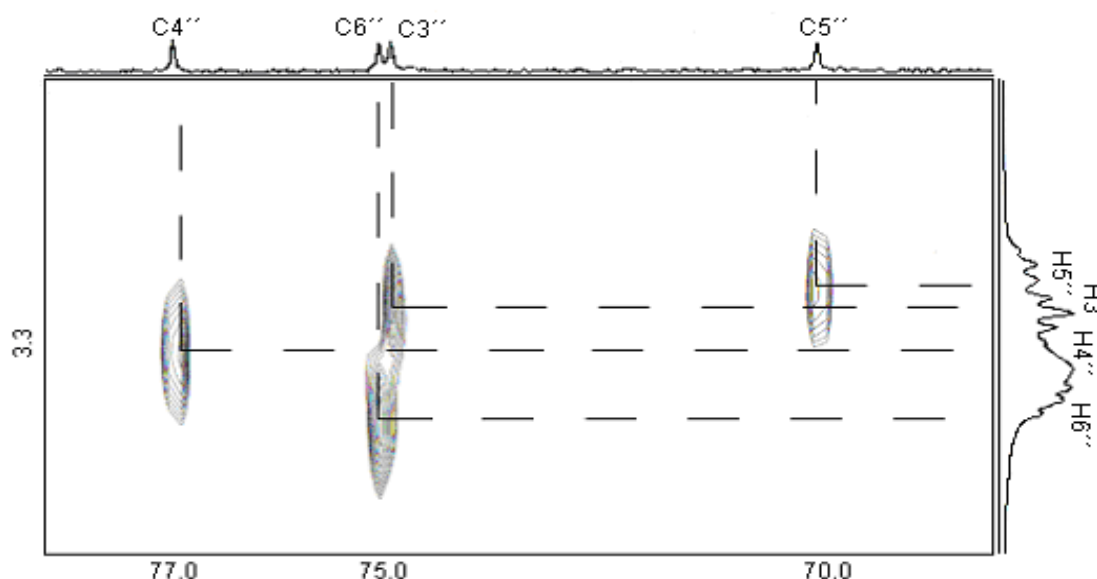
Este fragmento es un éster  $\alpha,\beta$ - insaturado con estereoquímica *E* y unido a un fenol *p*-sustituido. Los protones en  $\delta$  7.34 y en 6.11 ppm mostraron en el espectro HETCOR (**Figuras 14 y 15**) correlación con los carbonos en  $\delta$  145.1 y con 114.2 ppm respectivamente, lo que permitió asignar completamente este fragmento *p*-cumárico por los desplazamientos característicos de los carbonos cuaternarios restantes en  $\delta$  166.7, 160.3 y 125.5 para los carbonos C8'', C4''' y C1''', respectivamente, **Tabla 1**.

Ya asignadas todas las señales de la región aromática, falta por asignar en RMN de  $^{13}\text{C}$  acoplado cinco señales dobles y una triple. Estas 6 señales de la región alifática todas mostraban desplazamientos propios de carbonos unidos a oxígeno, y debido a que generalmente se han encontrado flavonoides unidos a un azúcar (glicósidos) se compararon los desplazamientos químicos con los descritos en la literatura (Vilegas *et al.*, 1999), se encontró que el flavonoide y el ácido cumárico estaban unidos a una glucosa a través del carbono anomérico 2'' y al carbono C7'', respectivamente, **Figura 18**.



**Figura 18.** Porción de glucosa en **1**.

Así la señal encontrada en RMN de  $^{13}\text{C}$  en  $\delta$  101.6 ppm se asignó a  $\text{C}2''$ , el carbono anomérico de la glucosa, que mostró correlación con el protón de 5.45 ppm ( $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$  Hz). El resto de los carbonos con  $\delta$  76.8, 74.8, 74.7 y 70.6 ppm se asignaron a los carbonos  $\text{C}4''$ ,  $\text{C}6''$ ,  $\text{C}3''$ ,  $\text{C}5''$ , respectivamente. Los que mostraron correlación con los protones en  $\delta$  3.25, 3.38, 3.21 y 3.16 ppm, respectivamente, **Figura 19**.

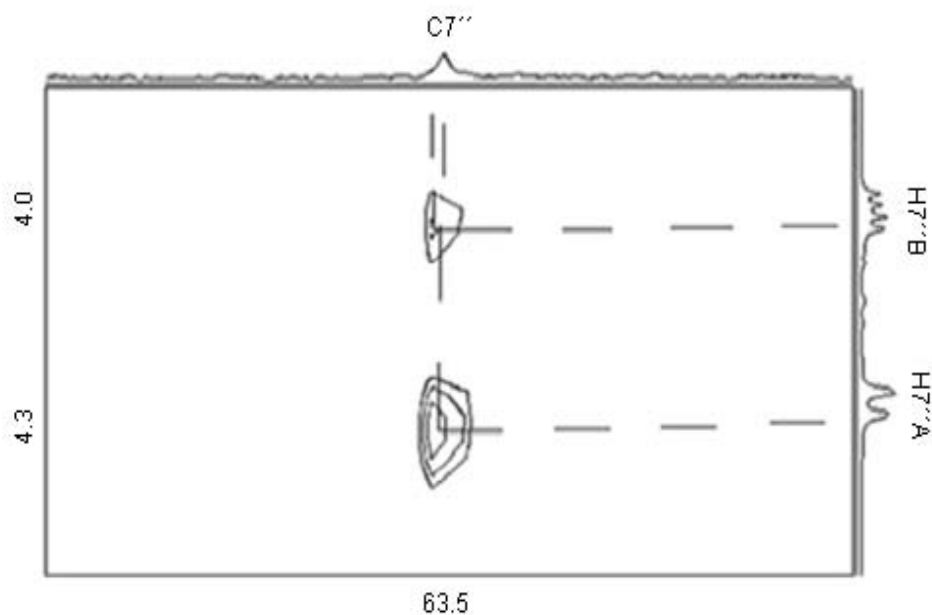


**Figura 19.** Fragmento del diagrama HETCOR que muestra la porción de la glucosa de **1**.

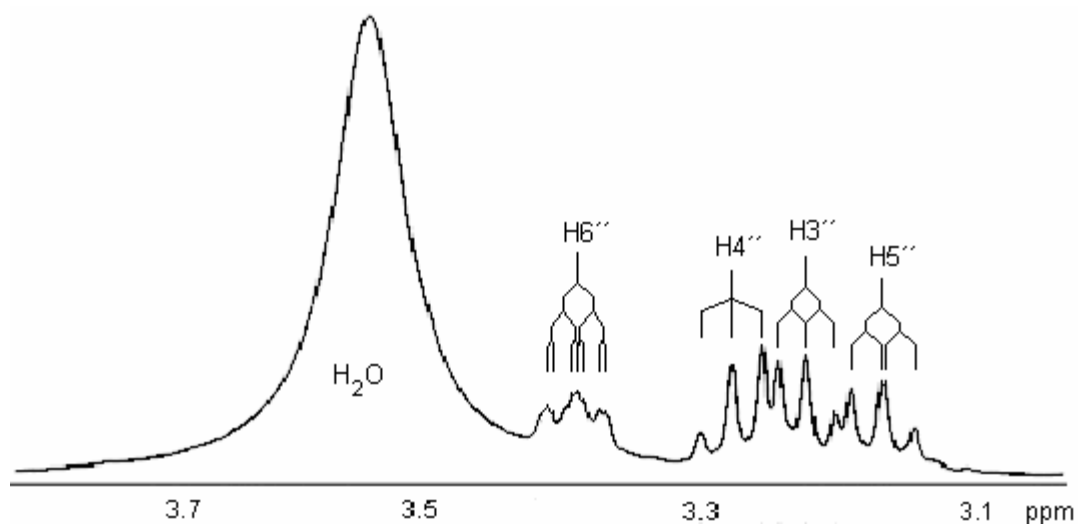
La señal del metileno (señal triple en RMN de  $^{13}\text{C}$  acoplado) de  $\text{C}7''$  ( $\delta$  63.5 ppm) mostró correlación heteronuclear tanto con el doble de dobles en  $\delta$  4.28 ppm ( $^2J_{\text{H-H}} = 11.8$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 1.4$  Hz) como con el de  $\delta$  4.03 ppm ( $^2J_{\text{H-H}} = 11.8$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.5$  Hz), **Figura 20**.

Es importante mencionar que las constantes de acoplamiento del fragmento de la glucosa se leyeron del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO-}d_6$  con unas gotas de  $\text{D}_2\text{O}$ , **Tabla 2**. Esto fue posible debido a que el  $\text{D}_2\text{O}$  permitió el intercambio de los átomos de  $^1\text{H}$  por átomos de  $^2\text{H}$  (deuterio) de los grupos hidroxilos, y esto condujo a que se obtuvieran señales más finas, **Figura 21**.



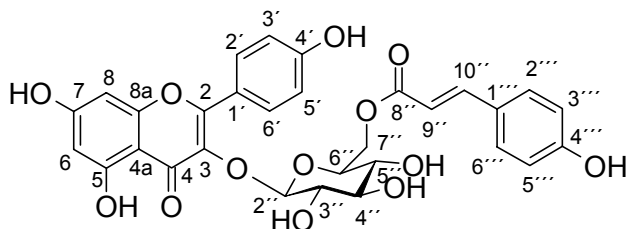


**Figura 20.** Fragmento del diagrama HETCOR que muestra la correlación de C7'' en la glucosa con sus dos protones.



**Figura 21.** Fragmento de la región alifática del espectro de RMN de <sup>1</sup>H en DMSO-*d*<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O de 1.

Todo este conjunto de datos permitió proponer la estructura (Diagrama de bloques 6, Apéndice B) del glucosilflavonoide conocido como tilirósido (1), **Figura 22**.



(1)

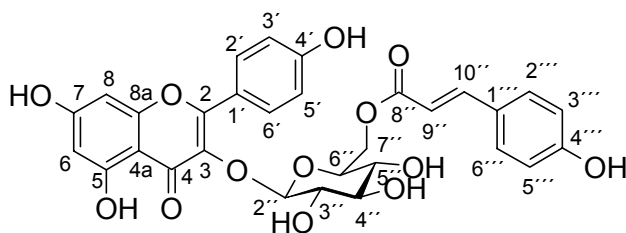
**Figura 22.** Tilirósido encontrado en el extracto de AcOEt de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

El 3-O-(7''-O-*E-p*-cumaroil)- $\beta$ -D-glucosilkaempferol (1), **Figura 22**, también se ha aislado de plantas como: *Magnolia fargessi* (Jung *et al.*, 1998), *Litsea japonica* (Lee *et al.*, 2005) y *Whaltheria indica* (Koteswara *et al.*, 2005).

En la literatura se describen propiedades para el tilirósido tales como antiinflamatorias, antioxidantes (Chicaro *et al.*, 2004) y anticancerígenas (Demetzos *et al.*, 1997). Inhibe la producción de compuestos proinflamatorios como radicales de óxido nítrico (NO $\cdot$ ) los cuales causan daño celular activando el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL-12) (Koteswara *et al.*, 2005). Además, presenta baja actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Panizzi *et al.*, 2002). También presenta una actividad anticomplemento muy potente (Jung *et al.*, 1998).

**Tabla 1.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  del tilirósido (1) en  $\text{DMSO-}d_6$  a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Porción	Carbono	Acoplamiento a un enlace C-H	Desplazamiento químico $\delta$ (ppm)
Kaempferil	C4	C	178.0
	C7	C	164.8
	C5	C	161.7
	C4'	C	160.5
	C8a	C	157.0
	C2	C	156.9
	C3	C	133.7
	C2', C6'	CH	131.4
	C1'	C	121.3
	C3', C5'	CH	115.6
	C4a	C	104.4
	C6	CH	99.3
	C8	CH	94.2
	Cumaril	C8''	C
C4'''		C	160.3
C10''		CH	145.1
C2''', C6'''		CH	130.7
C1'''		C	125.5
C3''', C5'''		CH	116.3
C9''		CH	114.2
Glucosil	C2''	CH	101.6
	C4''	CH	76.8
	C6''	CH	74.8
	C3''	CH	74.7
	C5''	CH	70.6
	C7''	CH <sub>2</sub>	63.5

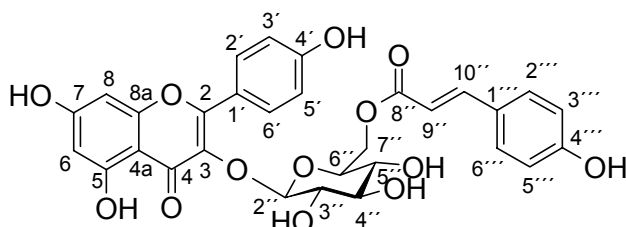


(1)

**Tabla 2.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  del tilirósido (1) en  $\text{DMSO-d}_6$  a 30 °C.

Porción	Protón	Desplazamiento químico $\delta$ (ppm)	Multiplicidad y constantes de acoplamiento $J$ (Hz)
Kaempferil	H2', H6'	7.99	d, 8.6
	H3', H5'	6.86	d, 8.6
	H8	6.38	d, 1.7
	H6	6.15	d, 1.7
Cumaril	H2''', H6'''	7.36	d, 8.6
	H9''	7.34	d, 15.9
	H3''', H5'''	6.79	d, 8.6
	H10''	6.11	d, 15.9
Glucosil	H2''	5.45	d, 7.3
	H7'' A	4.28	dd, 11.8, 1.4
	H7'' B	4.00	dd, 11.8, 6.5
	H6''	3.38	ddd, 9.1, 6.5, 1.4
	H4''	3.25	t, 8.6
	H3''	3.21	dd, 8.6, 7.3
	H5''	3.16	dd, 9.1, 8.6
	OH	5.20	sa
	OH	5.15	sa
	OH	10.2	sa

d = doble, dd = doble de dobles, ddd = doble de doble de dobles, t = triple, sa = señal ancha



(1)

## 4.2. Ftalato (M2)

El compuesto **2**, denominado como M2 el cual fue obtenido durante la cromatografía en columna flash, tenía un aspecto de un líquido viscoso de color beige con polaridad inferior a **1**. El análisis de su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$ , **Figura 23**, mostró en la región aromática dos dobles de dobles en  $\delta$  7.53 y 7.71 ppm ( $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$ ,  $^4J_{\text{H-H}} = 3.4$  Hz) característicos de un benceno 1,2-disustituido con dos grupos iguales. La asignación de dos grupos en las posiciones 1 y 2 origina que la molécula sea totalmente simétrica, con un plano de simetría ( $\sigma$ ). De tal manera que al asignar a un sustituyente, automáticamente se está asignando al otro sustituyente. Estos dos dobles fueron asignados a los protones H4 y H3.

Los protones H4 y H3 muestran correlación con C4 y C3 en  $\delta$  131.0 y 128.9 ppm, **Figura 24**.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró 12 señales, 3 en la región aromática y 8 en la región alifática y una señal a frecuencias altas, **Figura 25**.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  acoplado presentó 2 señales simples, es decir de dos carbonos cuaternarios distintos, una de ellas en la región aromática y otra propia de carbonilos, así como de 3 señales dobles, propias de carbonos con un solo hidrógeno, dos de estas se encuentran en la región aromática. Además de cinco señales triples de metilenos y dos señales cuádruples propias de metilos.

De acuerdo al desplazamiento químico ( $\delta$ ) del carbono cuaternario C1 en  $\delta$  132.6 ppm, se estableció que se trataba de un carbono *ipso* unido al carbonilo de un éster. Y la señal de este carbonilo se encontró en  $\delta$  167.9 ppm y fue asignada a C7.

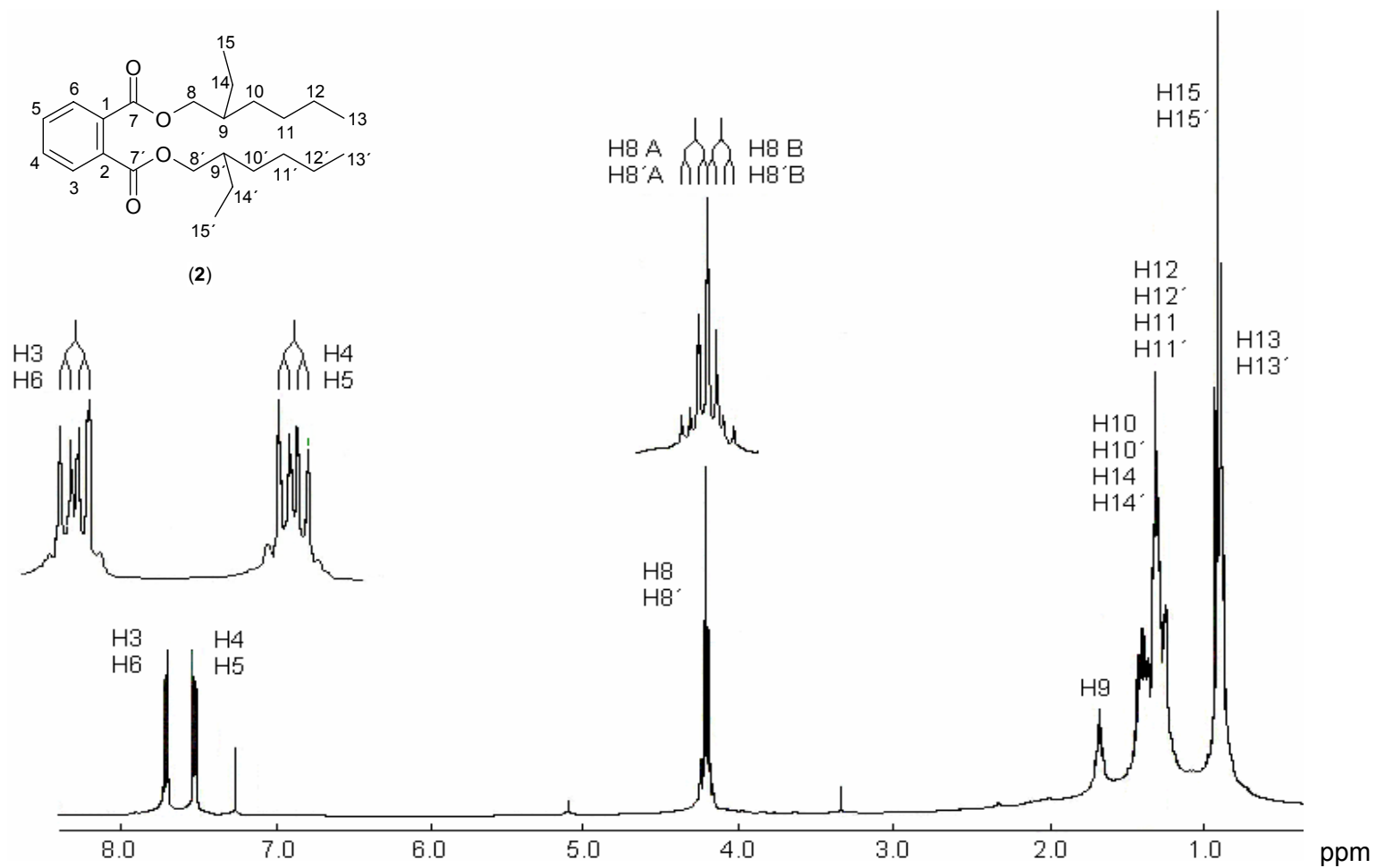
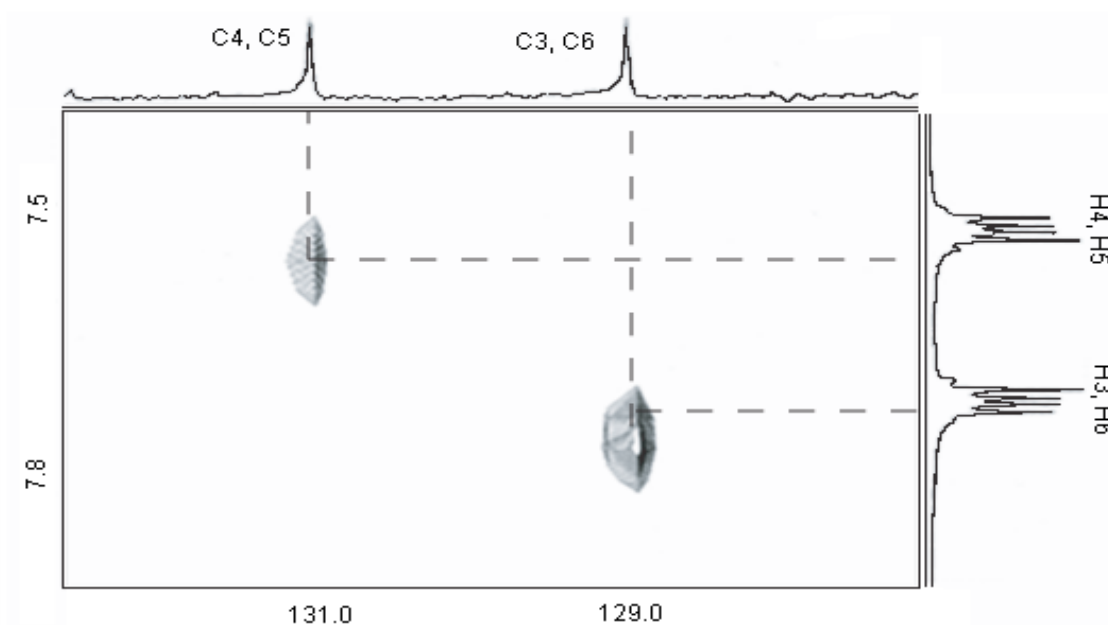


Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **2** a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  a 21  $^\circ\text{C}$ .

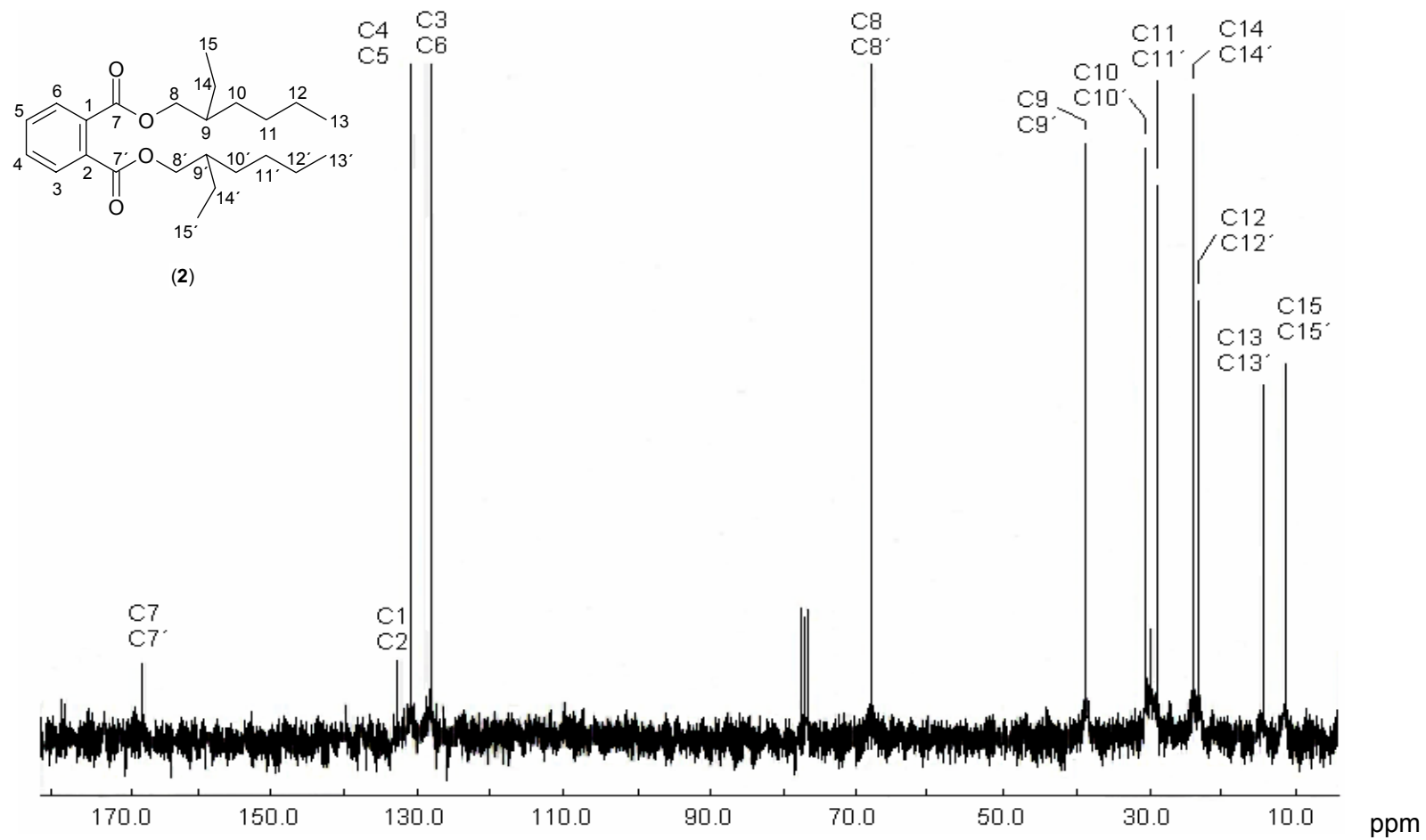


**Figura 24.** Fragmento del diagrama HETCOR de la región aromática de **2**.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , **Figura 23**, mostró dos dobles de dobles adicionales en  $\delta$  4.24 y 4.20 ppm ( $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 5.6$  Hz) y ( $^2J_{\text{H-H}} = 11.0$ ,  $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$  Hz) y se asignaron a H8A y H8B respectivamente, y sus desplazamientos son propios de un metileno unido a oxígeno. Estos dos dobles de dobles son la porción AB de un sistema ABX. Este metileno mostró correlación con el carbono en  $\delta$  68.2 ppm, (C8), que se encuentra unido a un oxígeno de éster y a un metino, (H9).

La señal héptuple centrada en 1.69 ppm ( $^3J_{\text{H-H}} = 6.0$  Hz), mostró correlación heteronuclear con el carbono en 38.8 ppm, **Figura 23**. Esta señal fue asignada al metileno H9 que presentó dos acoplamientos adicionales con dos metilenos.

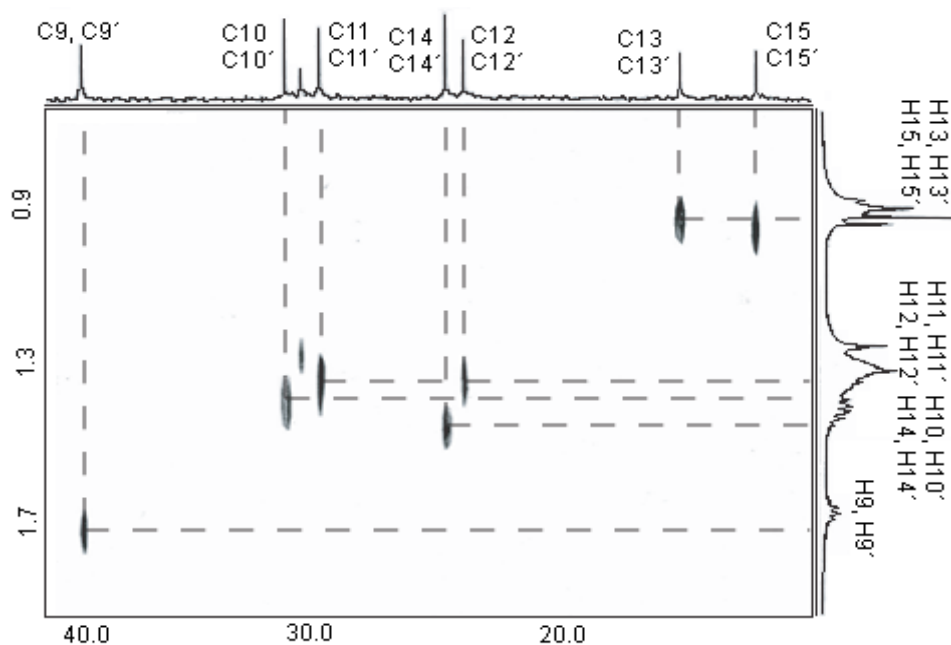
Se observaron dos triples centrados en 0.92 y 0.90 ppm ( $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$  Hz y  $^3J_{\text{H-H}} = 6.9$  Hz) que fueron asignados a los metilenos H15 y H13 respectivamente. El resto de la porción alifática del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostró señales múltiples superpuestas, las cuales no permitieron leer las constantes de acoplamiento correspondientes. En la **Tabla 4** se dan los intervalos de las señales en donde aparecen estos protones.



**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **2** a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  a 21 °C.

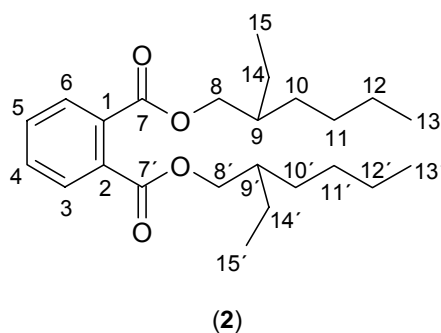


Finalmente, el grupo de señales en RMN de  $^{13}\text{C}$   $\delta$  30.5, 29.8, 23.8, 23.1, 14.2 y 11.1 fueron asignadas a C10, C11, C14, C12, C13 y C15, respectivamente, **Figura 26**.



**Figura 26.** Fragmento del diagrama HETCOR de la región alifática de **2**.

Este conjunto de datos permitió proponer la estructura del bis(2-etilhexil)ftalato (**2**) para M2, **Figura 27** (Diagrama de bloques 7, Apéndice B).

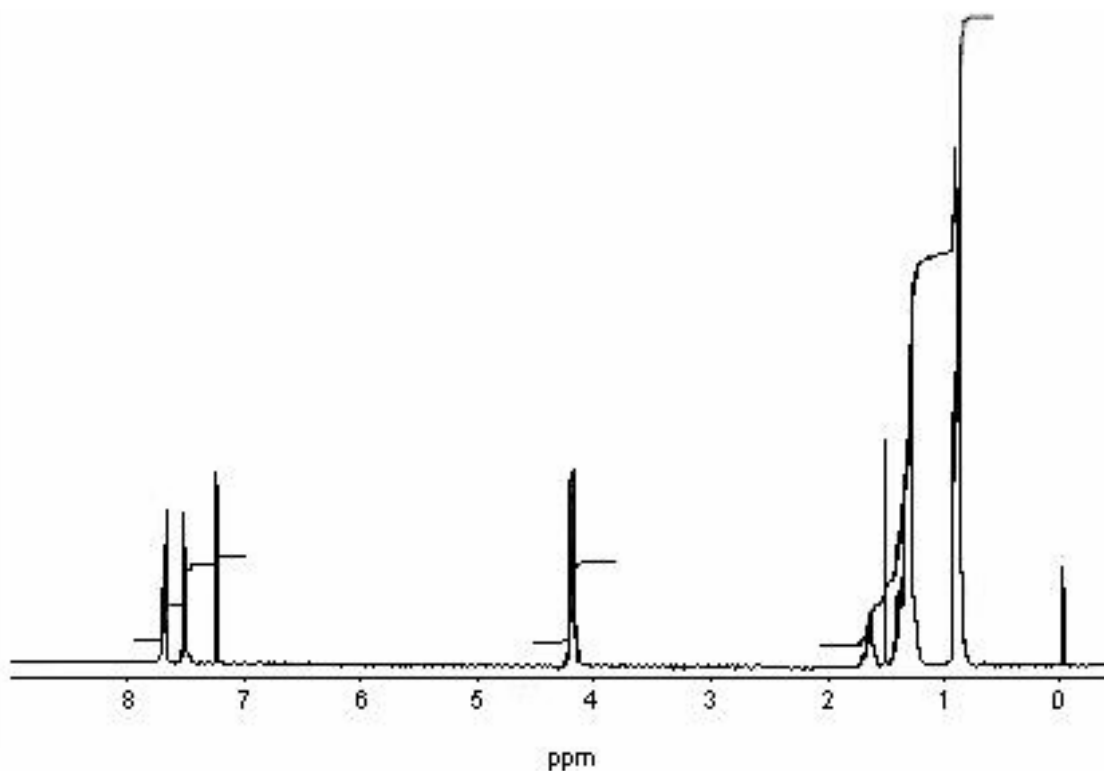


**Figura 27.** Estructura de **2**.

Debido a que este compuesto no se encontraba inicialmente en el extracto y fue obtenido durante la cromatografía en columna flash, se consideró como un artefacto, ya que este tipo de compuestos no son biosintetizados.

El compuesto **2** se emplea en: la industria de plásticos, en lubricantes sintéticos y en fluidos para bombas (Joong *et al.*, 1995).

Cabe aclarar, que la estructura del ftalato se corroboró al comparar los desplazamientos químicos tanto de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$  con los datos espectroscópicos descritos en la literatura (Joong *et al.*, 1995). En la **Figura 28** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 300 MHz en  $\text{CDCl}_3$  de **2**, y se puede observar la similitud del espectro con el obtenido en este trabajo.

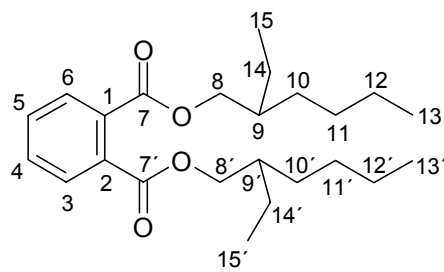


**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del bis(2-etilhexil)ftalato<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> [www://cpf.jrc.it/smt/monomers/pm74640.htm](http://www.cpf.jrc.it/smt/monomers/pm74640.htm)

**Tabla 3.** Datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  del ftalato (**2**) en  $\text{CDCl}_3$  a 21 °C.

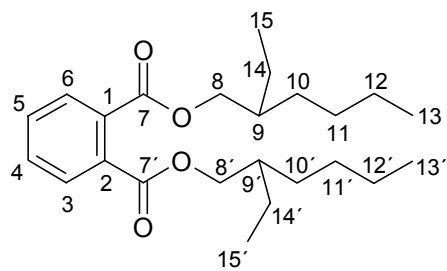
Carbono	Acoplamiento a un enlace C-H	Desplazamiento químico $\delta$ (ppm)
C7, C7'	C	167.9
C1, C2	C	132.6
C4, C5	CH	131.0
C3, C6	CH	128.9
C8, C8'	$\text{CH}_2$	68.2
C9, C9'	CH	38.8
C10, C10'	$\text{CH}_2$	30.5
C11, C11'	$\text{CH}_2$	29.8
C14, C14'	$\text{CH}_2$	23.8
C12, C12'	$\text{CH}_2$	23.1
C13, C13'	$\text{CH}_3$	14.2
C15, C15'	$\text{CH}_3$	11.1

**(2)**

**Tabla 4.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  del ftalato (**2**) en  $\text{CDCl}_3$  a 21 °C.

Protón	Desplazamiento químico $\delta$ (ppm)	Multiplicidad y constantes de acoplamiento $J$ (Hz)
H3, H6	7.71	dd, 5.8, 3.4
H4, H5	7.53	dd, 5.8, 3.4
H8A, H8'A	4.24	dd, 11.0, 5.6
H8B, H8'B	4.20	dd, 11.0, 6.3
H9, H9'	1.69	h, 6.0
H12, H12'	1.27-1.39	m
H10, H10'	1.31-1.45	m
H11, H11'	1.27-1.41	m
H14, H14'	1.39-1.51	m
H15, H15'	0.92	t, 7.5
H13, H13'	0.90	t, 6.9

dd = doble de dobles, h = héptuple, m = múltiple, t = triple

**(2)**

## 5. CONCLUSIONES

Las mezclas de eluyentes empleadas durante la purificación del tilirósido **1** y del ftalato **2**, tanto para la cromatografía en columna flash como en la CCD-P, permitieron la adecuada obtención de estos compuestos puros. Específicamente el uso de ácido fórmico permitió la separación efectiva del tilirósido, ya que éste glicósido es muy polar ( $R_f = 0.27$  en AcOEt). Finalmente, la purificación por cristalización permitió obtener a **1**, con aspecto de un sólido amorfo de color amarillo claro. De tal manera se concluye que los métodos de purificación fueron efectivos.

El derivado de ftalato, de consistencia líquida viscosa color beige, se consideró un artefacto ya que inicialmente no se encontraba en el extracto de AcOEt, y generalmente estos derivados no son productos de biosíntesis.

La RMN tanto de  $^{13}\text{C}$  como de  $^1\text{H}$ , en 1D y 2D, resultaron esenciales para la elucidación estructural de ambos compuestos. Los datos de los espectros de IR, EM, RMN, concuerdan con las estructuras químicas propuestas.

Con base en la combinación de datos de las espectroscopías y espectrometría empleadas, se comprobó que el extracto de AcOEt de las semillas de *Helicarpus terebinthinaceus* contiene al tilirósido, el cual justifica la actividad antioxidante moderada del extracto en el estudio anterior y comprueba la hipótesis planteada, de que el extracto polar de AcOEt contenía compuesto(s) fenólico(s).

## 6. PERSPECTIVAS

En estudios posteriores se puede tratar de purificar y caracterizar las otras manchas de menor intensidad que el glicósido, del kaempferol aislado, presentes en el extracto de AcOEt de las semillas de *H. terebinthinaceus*.

Debido a que los flavonoides se encuentran en los extractos polares, resulta interesante purificar y caracterizar a los metabolitos de los extractos de cloroformo, acetona y metanol de las semillas de *H. terebinthinaceus*.

Generalmente, también se emplean las hojas y flores de este árbol, para tratar acné, de tal manera se podría extraer y purificar los extractos polares tanto de las hojas, como de las flores de cuetla.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Bandara P.K.A.N., Kumar V., Jacobsson U., Molleyres L. "Insecticidal piperidine alkaloid from *Microcos paniculata* stem bark". *Phytochem.* **2000**, *54*, 29-32.
- Chicaro P., Pinto E., Colepicolo P., Callegari L.J.L., Peporine L.N. "Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants". *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 239-243.
- Cos P., Hermans N., De Bruyne T., Apers S., Sindambiwe J.B., Vanden D.B., Pieters L., Vlietinck A.J. "Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities". *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 155-163.
- Demetzos C., Magiatis P., Typas M.A., Dimas K., Sotiriadou R., Perez S., Kokkinopoulos D. "Biotransformation of the flavonoid tiliroside to 7-methylether tiliroside: bioactivity of this metabolite and of its acetylated derivative". *Cell. Mol. Life Sci.* **1997**, *53*, 587-592.
- Joong K.Y., Jonas J. "High pressure <sup>13</sup>C NMR study of the motional dynamics of liquid Bis(2-ethylhexyl) Phthalate". *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 6777-6788.
- Joseph-Nathan P. *Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 y de carbono-13*. Secretaría General de la OEA programa regional de desarrollo científico y tecnológico de Washington, D.C. Segunda edición. **1982**. México, 164 págs.
- Jung K.Y., Oh S.R., Park S.H., Lee I.S., Ahn K.S., Lee J.J., Lee H.K. "Anti-complement activity of tiliroside from the flower buds of *Magnolia fargesii*". *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 1077-1078.

- Kaouadji M., Morand J., García J. "Further acylated kaempferol rhamnosides from *Platanus acerifolia* buds". *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1618-1621.
- Koteswara R.Y., Fang S., Tzeng Y. "Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- $\alpha$  and IL-12 in activated macrophages". *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 912-915.
- Lee S.Y., Min B.S., Kim J.H., Lee J., Kim T.J., Kim C.S., Kim Y.H., Lee H.K. "Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity". *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 273-276.
- Liu H., Orjala J., Sticher O., Rali T. "Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*". *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 70-75.
- Martínez-Vásquez J.B. "Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliolepis terebinthinaceus*". Tesis de Licenciatura UTM (en proceso).
- Mevy J.P., Bessiere J.M., Rabier J., Dherbomez M., Ruzzier M., Millogo J., Viano J. "Composition and antimicrobial activities of the essential oil of *Triumfetta rhomboidea* Jacq.". *Flavour Fragr. J.* **2005**, *21*, 80-83.
- Panizzi L., Caponi C., Catalano S., Cioni P.L., Morelli I. "In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*". *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 165-168.
- Rouessac F., Rouessac A. *Análisis Químico, Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. McGraw Hill. **2003**. España. 441 págs.
- Rubinson K.A., Rubinson J.F. *Análisis Instrumental*. Prentice Hall. **2001**. España. 847 págs.



- Still W.C., Kahn M., Mitra A. "Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution". *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2926.
- Toker G, Memişoğlu M., Yeşilada E., Aslan M. "Main flavonoids of *Tilia argentea* DESF. ex DC. Leaves". *Turk. J. Chem.* **2004**, *28*, 745-749. -a-
- Toker G., Küpeli E., Memişoğlu M., Yesilada E. "Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden)". *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 393-397. -b-
- Tsao R., Deng Z. "Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals". *J. Chromatogr. B.* **2004**, *812*, 85-99.
- Vilegas W., Sonommiya M., Rastrelli L., Pizza C. "Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion". *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 403-406.
- Vinson J.A., Teufel K., Wu N. "Green and black teas inhibit atherosclerosis by lipid, antioxidant, and fibrinolytic mechanisms". *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3661-3665.
- Viola H., Wolfram C., Levi de Stein M., Wasowski C., Pera C., Medina J.H., Paladini A.C. "Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae)". *J. Ethnopharmacol.* **1994**, *44*, 47-53.
- Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara A.A., Algur Ö.F., Bilaloğlu V. "Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camellia sinensis*) extracts". *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5030-5034.

Yoshikawa M., Nishida N., Ninomiya K., Ohgushi T., Kubo M., Morikawa T., Matsuda H. "Inhibitory effects of coumarin and acetylene constituents from the roots of *Angelica furcijuga* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice and on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages". *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 456-463.

Yu L., Haley S., Perret J., Harris M., Wilson J., Qian M. "Free radical scavenging properties of wheat extracts". *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1619-1624.

## 8. APÉNDICE A

**Tabla 5.** Materiales, equipos y disolventes utilizados para la extracción de las semillas de *H. terebinthinaceus*.

Material	Equipo	Disolventes
Probeta graduada 100 mL	Parrilla de calentamiento	Hexano
Espátula	Molino de tornillo	Éter etílico anhidro
Cartuchos de celulosa	Rotavapor	CHCl <sub>3</sub>
Perlas de ebullición	Recirculador de agua	AcOEt
Viales	Balanza analítica	
Pipeta Pasteur	Bomba de vacío	
Bulbo para pipeta Pasteur		
Pinzas de tres dedos		
Soportes Universales		
Equipos Soxhlet		
Algodón		
Tenacillas		

**Tabla 6.** Materiales, equipos, reactivos y disolventes utilizados para cromatografía flash.

Material	Equipo	Reactivos y disolventes
Columna para Cromatografía flash	Rotavapor	Extracto de AcOEt de las semillas
Regulador de flujo de aire	Recirculador de agua	Hexano
Aire a presión	Compresor de aire	CHCl <sub>3</sub>
Pipeta Pasteur	Bomba de vacío	AcOEt
Bulbo para pipeta Pasteur	Lámpara de luz UV 254 nm	Acetona
Viales de 25 mL (100)		Gel de sílice (400–230 mallas, 40–63 μm)
Probeta graduada 100 mL y 10 mL		
Vaso de precipitados		
Algodón		
Soporte universal		
Pinzas de tres dedos		
Cámara para cromatografía		
Cromatofolios		
Regla		
Exacto		
Lápiz		
Capilares		
Tenacillas		

**Tabla 7.** Materiales, equipos, reactivos y disolventes utilizados para TLC-P.

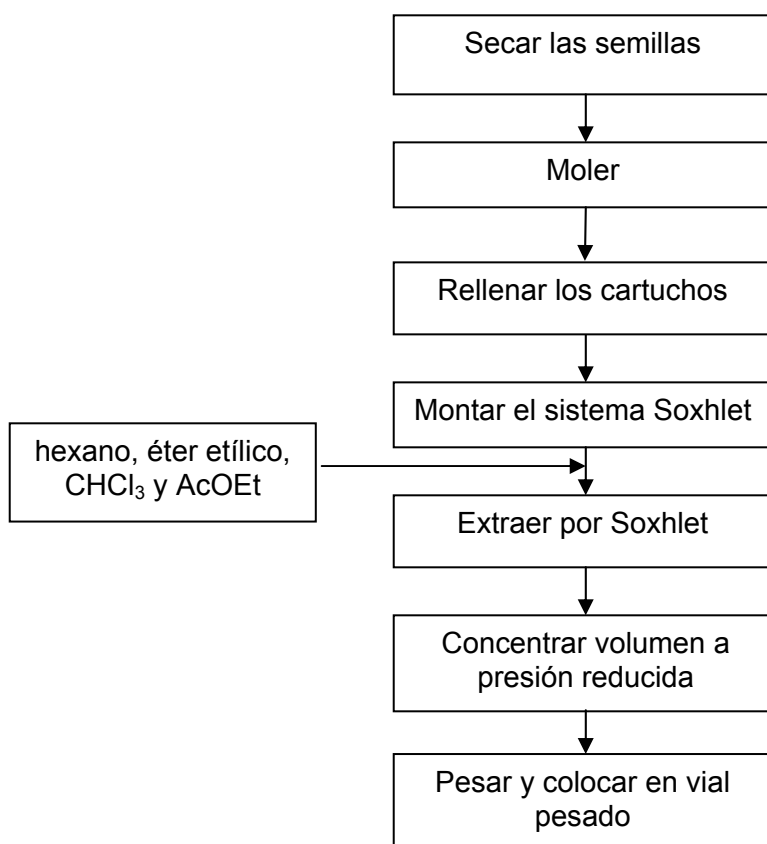
Material	Equipo	Reactivos y disolventes
Placas preparativas	Lámpara UV	Compuestos de interés a purificar
Cámaras para cromatografía	Bomba de vacío	Hexano
Capilares	Recirculador de agua	CHCl <sub>3</sub>
Espátula	Rotavapor	Acetona
Pipeta Pasteur		Ác. fórmico
Bulbo para pipeta Pasteur		
Matraces Erlenmeyer		
Embudos de filtración		
Papel filtro		
Regla		
Lápiz		

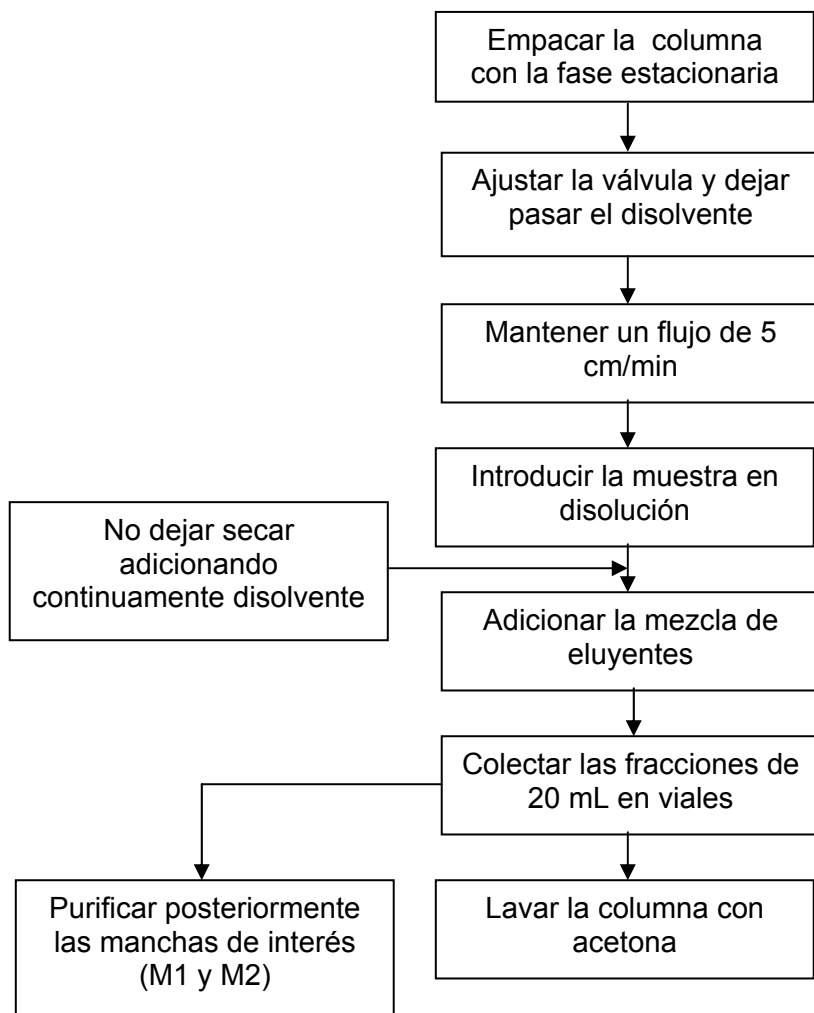
**Tabla 8.** Materiales, equipos y disolventes utilizados para cristalización.

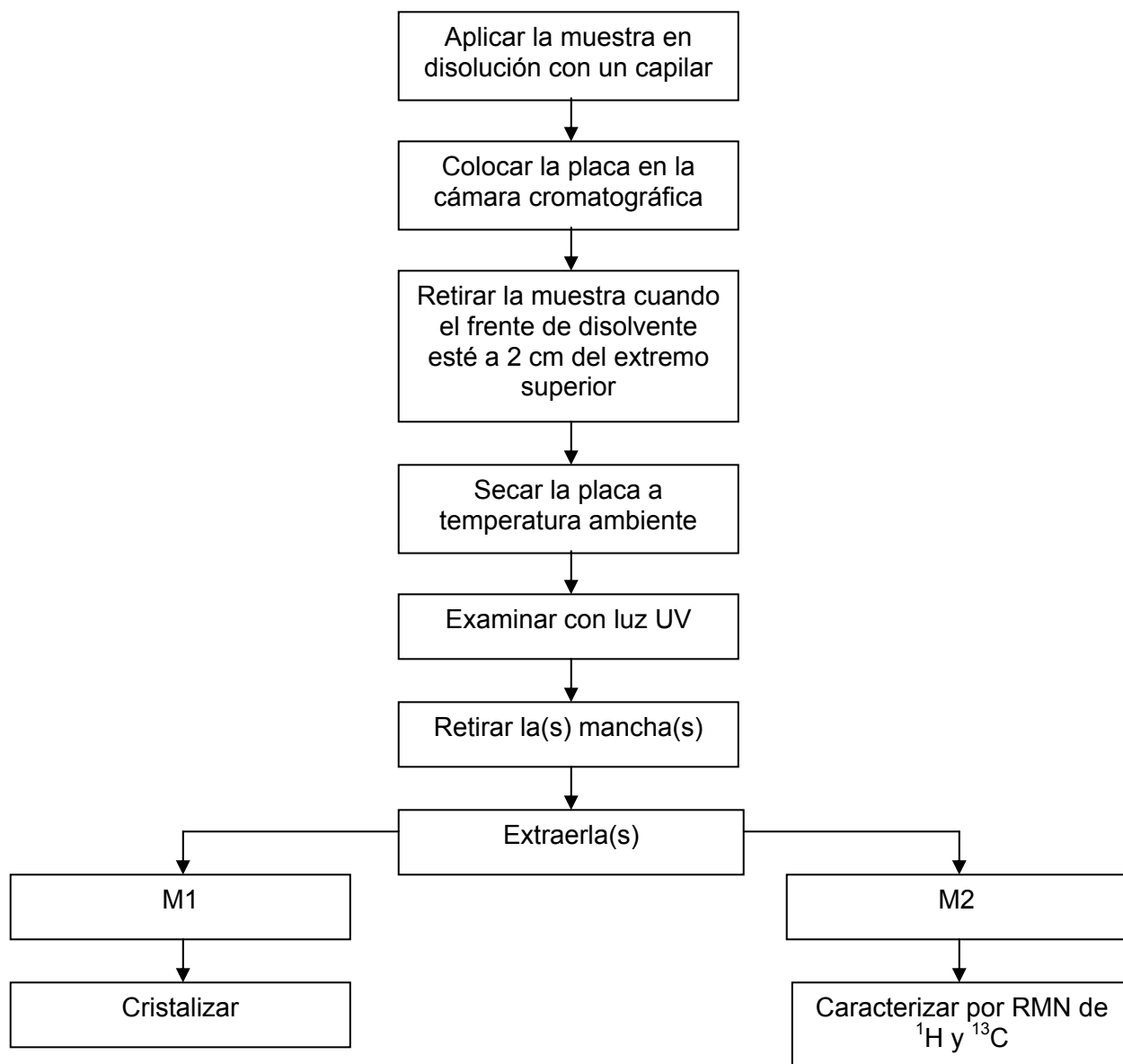
Material	Equipo	Disolventes
Embudo de filtración	Parrilla de calentamiento	Muestra pasada por CCD-P
Matraz de Erlenmeyer	Refrigerador	Hexano
Vasos de precipitado		CHCl <sub>3</sub>
Papel filtro		Acetona
Microespátula		
Pipeta Pasteur		
Bulbo para pipeta Pasteur		

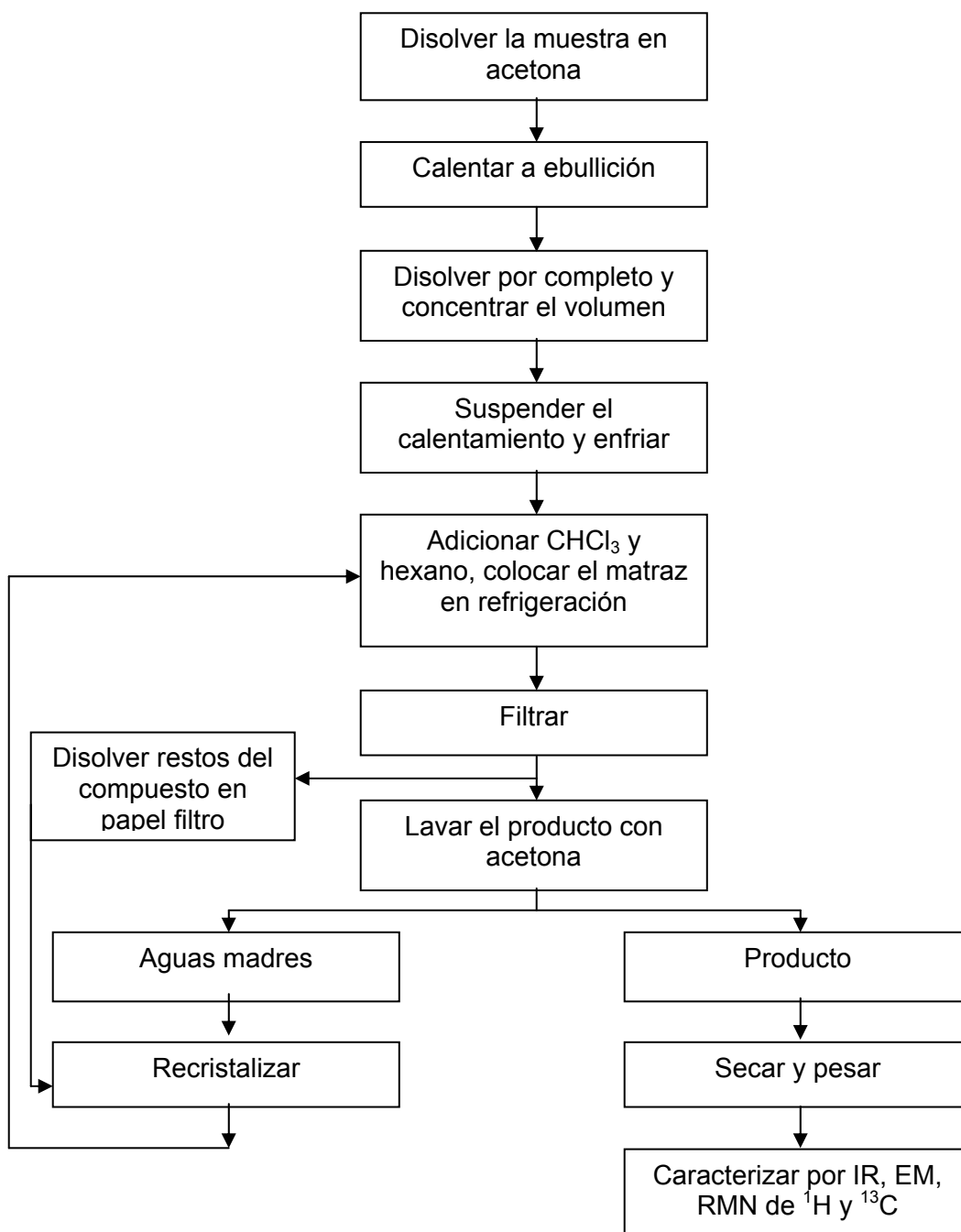
## 9. APÉNDICE B

**Diagrama de bloques 1.** Proceso para la extracción de las semillas de *H. terebinthinaceus*

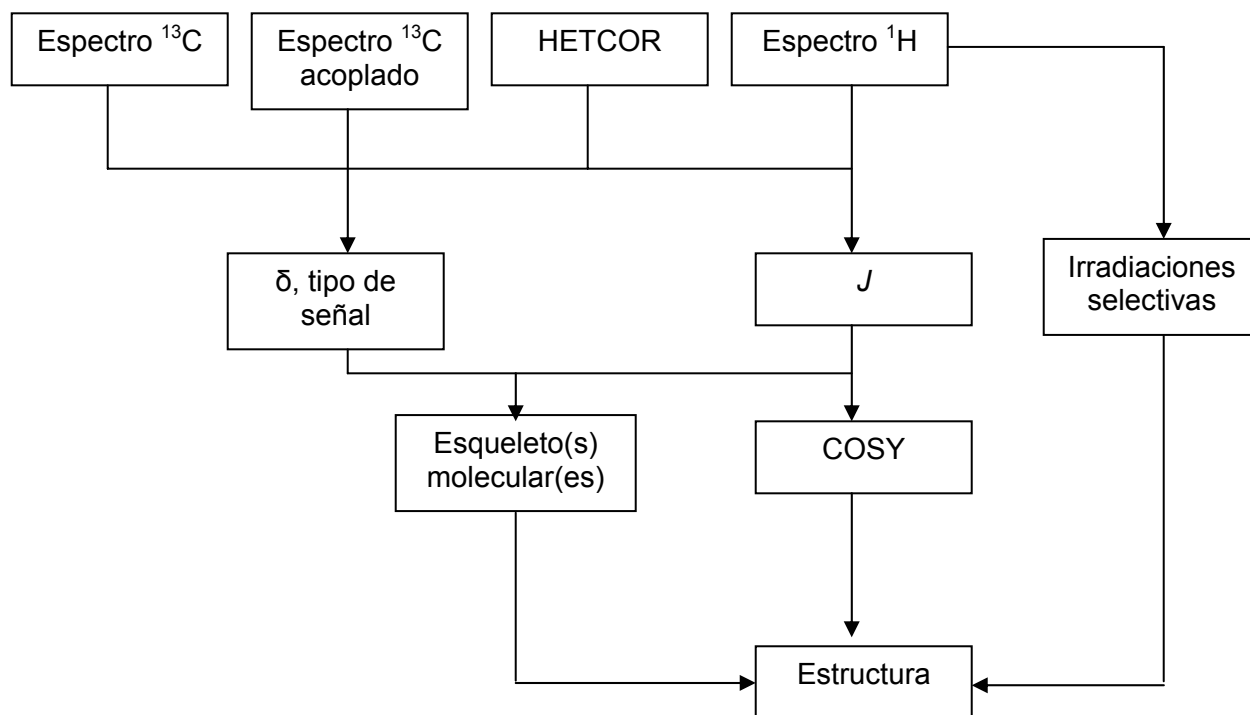


**Diagrama de bloques 2.** Proceso para la purificación por cromatografía por columna flash

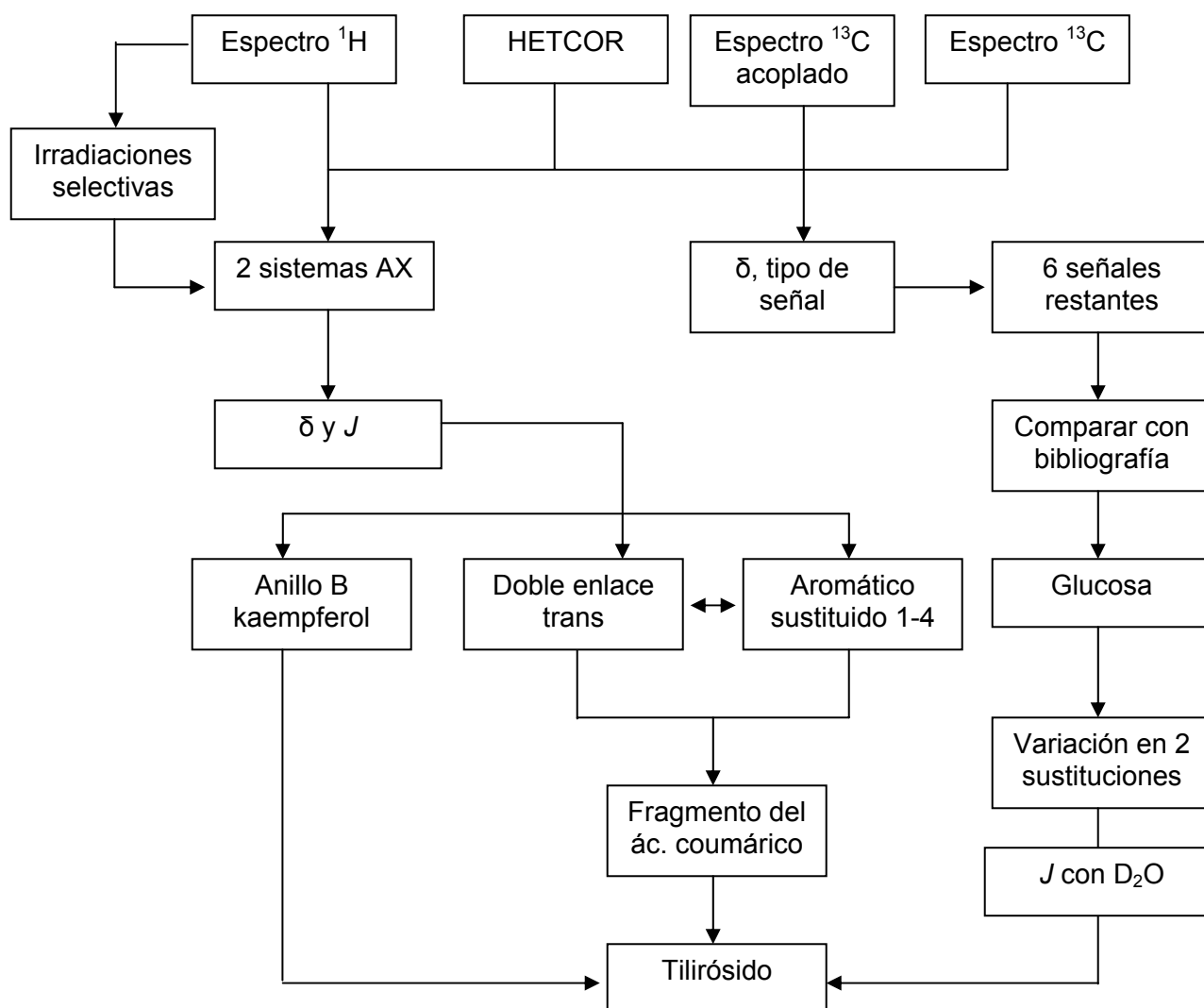
**Diagrama de bloques 3.** Proceso de la purificación por CCD-P

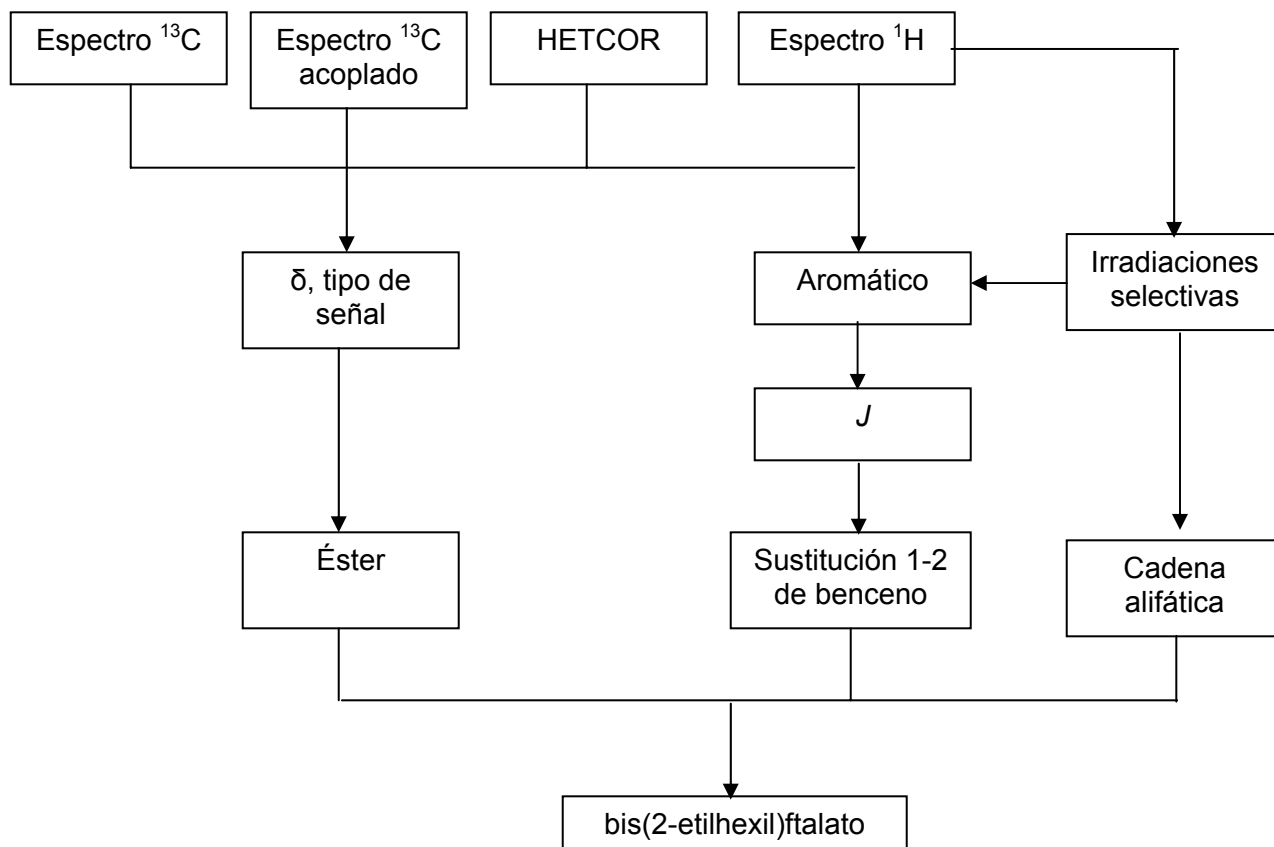
**Diagrama de bloques 4.** Proceso de la cristalización de M1



**Diagrama de bloques 5.** Proceso de elucidación estructural por RMN realizado

**Diagrama de bloques 7.** Proceso de elucidación estructural por RMN del tilirósido



**Diagrama de bloques 8.** Proceso de elucidación estructural por RMN del artefacto

## 10. APÉNDICE C

**Lista 1.** Mezclas de disolventes probados para la mejor separación de los compuestos del AcOEt de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*.

7:3 hexano:AcOEt	8:2 hexano:éter etílico
3:7 hexano:éter etílico	3:7 hexano:CHCl <sub>3</sub>
3:1 hexano:AcOEt	4:1 hexano:AcOEt
1:9 hexano:CHCl <sub>3</sub>	CHCl <sub>3</sub>
7:3 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	7:3 Hexano:CHCl <sub>3</sub>
1:1 hexano:CHCl <sub>3</sub>	1:1 hexano:CHCl <sub>3</sub>
5:2:1 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt:hexano	3:5:1 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt:hexano
7:3 AcOEt:éter etílico	7:4 CHCl <sub>3</sub> :hexano
9:1 AcOEt:éter etílico	7:4 CHCl <sub>3</sub> :éter etílico
3:7 CHCl <sub>3</sub> :éter etílico	1:1 CHCl <sub>3</sub> :éter etílico
7:3:2 CHCl <sub>3</sub> :éter etílico:hexano	6:3:1 CHCl <sub>3</sub> :hexano:AcOEt
5:5:1 CHCl <sub>3</sub> :éter etílico:hexano	4:1 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt
3:2:0.1 AcOEt:CHCl <sub>3</sub> :HCO <sub>2</sub> H	3:2:2:0.2 AcOEt:CHCl <sub>3</sub> :acetona: HCO <sub>2</sub> H
5:2 AcOEt:CHCl <sub>3</sub>	2:5 hexano:CHCl <sub>3</sub>
9:1 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	6:1 CHCl <sub>3</sub> :AcOEt
AcOEt	4:1 AcOEt:CHCl <sub>3</sub>