

**Alcoholes de cadena larga y b-sitosterol DE *Thalictrum hernandezii* Tausch ex. J. Presl.**

ZULETA-PRADA, Holber, CHÁVEZ-SAN-AGUSTIN, Rodrigo, REYES-TREJO, Benito y GUERRA-RAMÍREZ, Diana

H. Zuleta, R. Chávez, B. Reyes y D. Guerra

Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México Texcoco. Texcoco, Estado de México, 56230, México.  
hozuleta\_13@hotmail.com

D. Sepúlveda, R. Salazar, F. Pérez y J. Rocha (eds.) Ciencias Químicas y Matemáticas-©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2015.

## 8 Introducción

México es un país privilegiado por la variabilidad de la vida que existe en su territorio, expresada en la diversidad de ecosistemas, de especies y la variación entre éstas, haciéndolo un país megadiverso, cuenta con más de 26000 especies de plantas ubicándolo en el cuarto lugar a nivel mundial, de éstas alrededor de 10000 son plantas vasculares endémicas (CONABIO, 1998). La existencia de una gran variedad de agroecosistemas, engloba miles de especies conocidas y otras desconocidas resguardadas aún por la naturaleza misma. Se estima que más de 118 especies de plantas han sido domesticadas en nuestro país (Hernández, 1993), algunas de gran importancia alimenticia para el mundo como el maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), motivo de estudio en diferentes centros de investigación agrícola de México y el mundo, para mejorar las técnicas de producción, mejoramiento genético para la creación de nuevas variedades con mejores rendimientos, calidad y resistencia a plagas y enfermedades. Algunas otras son de utilidad en la medicina, por citarse algunas: el barbasco (*Dioscorea mexicana*) planta que revolucionó la industria farmacéutica en la síntesis de fármacos esteroideos, la yerba del sapo (*Eryngium heterophyllum*), el ahuehuate (*Taxodium mucronatum*), la dalia (*Dahlia spp.*), entre otras, éstas dos últimas emblemas nacionales.

Las sociedades prehispánicas (Tuz, 2009) dieron a conocer la utilidad de miles de plantas con diferentes usos. Un ejemplo es la herbolaria, actualmente usada por los médicos indígenas y la sociedad en general, con el peligro de ser eliminada por la deforestación, la erosión, la recolección desmedida, la contaminación, entre otros peligros (Mendoza, 2008). Aunado a esto, el conocimiento tradicional tiende a perderse en la misma medida (Monroy y Ayala, 2003). La investigación actual sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la Etnobotánica; La cual, por su naturaleza interdisciplinaria abarca muchas áreas, incluyendo: Botánica, Química, Medicina, Farmacología, Toxicología, Nutrición, Agronomía, Ecología, Sociología, Antropología, Lingüística, Historia y Arqueología, entre otras; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Bermúdez *et al.*, 2005). Una aplicación es la participación de la Etnobotánica como una metodología indispensable para la selección de plantas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica, y que no han sido sometidas a estudios fitoquímicos y farmacológicos previos, así como también a las especies que únicamente se les han realizado estudios parciales del mismo tipo. Dentro de los estudios fitoquímicos, la caracterización de las estructuras químicas de sus principios activos puede servir de modelo para la fabricación de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Bermúdez, *et al.*, 2005). El interés actual en la herbolaria y la búsqueda de opciones terapéuticas complementarias tiene sus raíces en una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, tanto por su falta de éxito en la cura de algunas enfermedades como por los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrear, entre otros aspectos por las cualidades medicinales que favorecen a la salud humana de manera más natural. También influye el aspecto económico, las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana, ocasionando una revalorización y uso de los saberes étnicos (Monroy y Ayala, 2003). Sin duda alguna las plantas medicinales siguen siendo una fuente de estudio vigente e invaluable para el desarrollo de prototipos de medicamentos en un esquema de aprovechamiento racional y uso sustentable de las especies vegetales.

Ante este panorama y tomando como punto de partida la diversidad del recurso vegetal disponible en el territorio mexicano, el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola, se ha enfocado en fortalecer la investigación en Fitoquímica de plantas que se les atribuya algún uso medicinal, las cuales hayan sido poco estudiadas o principalmente no tengan ningún estudio de este tipo.

Dentro de las numerosas especies que podrían ser consideradas, se visualizó llevar a cabo el aislamiento, purificación y determinación estructural de algunos constituyentes de las partes aéreas de *Thalictrum hernandezii*. Esta planta ha sido utilizada alrededor del mundo y en la medicina tradicional mexicana para aliviar los ojos inflamados, mitigar el calor y el dolor de los riñones (Ortíz, 1993). Sin embargo su estudio fitoquímico ha sido parcial, hasta hace algunos años sólo se describió la presencia en la raíz del alcaloide hernandezina (Padilla y Herrán, 1962). El propósito de este trabajo fue determinar la composición química de los metabolitos del extracto hexánico de las partes aéreas de *Thalictrum hernandezii* Tausch ex. J. Presl.

## **8.1 Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

La colecta del material vegetal tuvo lugar en un área que pertenece al municipio de San Pedro Arriba, Estado de México en la dirección Carretera a Temoaya, en las coordenadas latitud 19° 29.490' norte y longitud 99° 32.907' oeste, a una elevación de 2 798 msnm.

La clasificación de la especie se llevó a cabo en el Herbario-Hortorio “Jorge Hernández Espinoza” del Área de Biología, del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), con la colaboración de la M. C. Ernestina Cedillo Portugal, donde también se resguardó un ejemplar con el N° 25187.

### **Reactivos y disolventes**

Los disolventes: hexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol y acetona, se destilaron por los métodos convencionales. Los reactivos químicos fueron obtenidos de Aldrich y la mayoría fueron utilizados sin purificación adicional.

### **Seguimiento y purificación de productos**

El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo por cromatografía de capa fina, en cromatoplasmas de gel de sílice 60 (ALUGRAM® SIL G/UV<sub>254</sub>), la visualización se realizó con luz ultravioleta en lámpara de UV Mineral Light, también se usó como revelador el ácido fosfomolibdico por calentamiento de las cromatoplasmas. La cromatografía flash por columna para purificación de los compuestos se realizó sobre gel de sílice 60 (0.040-0.063 mm., malla 230-4000 ASTM) como fase estacionaria.

## **Análisis físico y espectroscópico de los productos obtenidos**

Los puntos de fusión fueron medidos con un aparato Fischer-Johns y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrofotómetro de Infrarrojo FT IR tipo ATR marca Cary 630 Agilent. Los espectros Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN) se determinaron mediante un espectrómetro a 400 MHz modelo 400 MR DD2 Agilent y usando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El desplazamiento químico ( $\delta$ ) está dado en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hertz (Hz).

Los espectros de masas (EM) fueron determinados en un espectrofotómetro Jeol JEMAX505HA de baja resolución por la técnica de impacto electrónico, (IE) a 70 eV.

### **Preparación del extracto hexánico**

El material colectado fue secado a la sombra a temperatura ambiente y molido. A una cantidad aproximada de 10 Kg de planta molida se le adicionaron 20 L de hexano, que se dejó macerar por tres días, pasado este lapso, se decantó el hexano para ser evaporado en un evaporador rotatorio esta misma operación se repitió cuatro veces para obtener finalmente el extracto hexánico con un peso de 20.6 g, el cual fue purificado por métodos cromatográficos. El residuo vegetal se almacenó bajo refrigeración a  $5^\circ\text{C}$  para la preparación de otros extractos con diferentes disolventes.

### **Separación por cromatografía en columna**

La cromatografía por columna a gravedad (CCG) o columna flash (CCF) para purificación de los compuestos se realizó sobre gel de sílice 60 (0.040-0.063 mm., malla 230-400 ASTM) como fase estacionaria.

## **8.2 Discusión de resultados**

De las fracciones de columna de menor polaridad, se obtuvo un precipitado de color blanco denominado RCH-1. El compuesto se obtuvo por filtración y posterior purificación por medio de cromatografía de columna Flash (CCF). El compuesto RCH-1 se obtuvo como un sólido blanco (con un peso de 0.0254 g) con un punto de fusión de  $81-82^\circ\text{C}$ .

El espectro IR del compuesto RCH-1, muestra dos bandas anchas en  $3315$  y  $3222\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento (St) del grupo OH, de un alcohol (Smith, 1999). Las señales en  $2914$  y  $2847\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a los estiramientos C-H de  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$  respectivamente, una deformación de  $\text{CH}_2$  a  $1465$  y estiramiento en  $1375$  C-H. El estiramiento C-OH a  $1132$  además de flexiones en  $1030$  de C-OH y la señal en  $721\text{ cm}^{-1}$  atribuida a los estiramientos de  $-(\text{CH}_2)-$  confirman características de un alcohol de cadena larga (Coward, 2010).

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto RCH-1 (Figura 9) muestra los patrones de desplazamiento característicos de un alcohol alifático de cadena larga (Mahadevan, 1978). Se destaca la señal ancha a  $\delta$  3.59 ppm correspondiente al protón de metino en base oxigenado (HO-C-H) (Silverstein *et al.*, 2005). En la región entre  $\delta$  1,47 y  $\delta$  1,26 se observan el cúmulo de protones metilénicos  $-(\text{CH}_2)_n$  y una señal a  $\delta$  0,87 ppm, correspondiente a los protones del metilo ( $-\text{CH}_3$ ) terminal de la cadena. La integración de las señales para un hidrógeno entre  $\delta$  3.56-3.59 ppm (1H, m) sugiere proponer que el grupo hidroxilo se encuentra en una posición no terminal, de lo contrario se observaría una integración para 2 protones ( $\text{CH}_2$ ). Lo anterior se puede confirmar por la señal entre  $\delta$  0.84-0.87 de un triplete poco simétrico que integra para 6 hidrógenos lo que supone claramente la existencia de dos metilos ( $\text{CH}_3$ ) en los extremos de la cadena (Pretsch *et al.*, 2009).

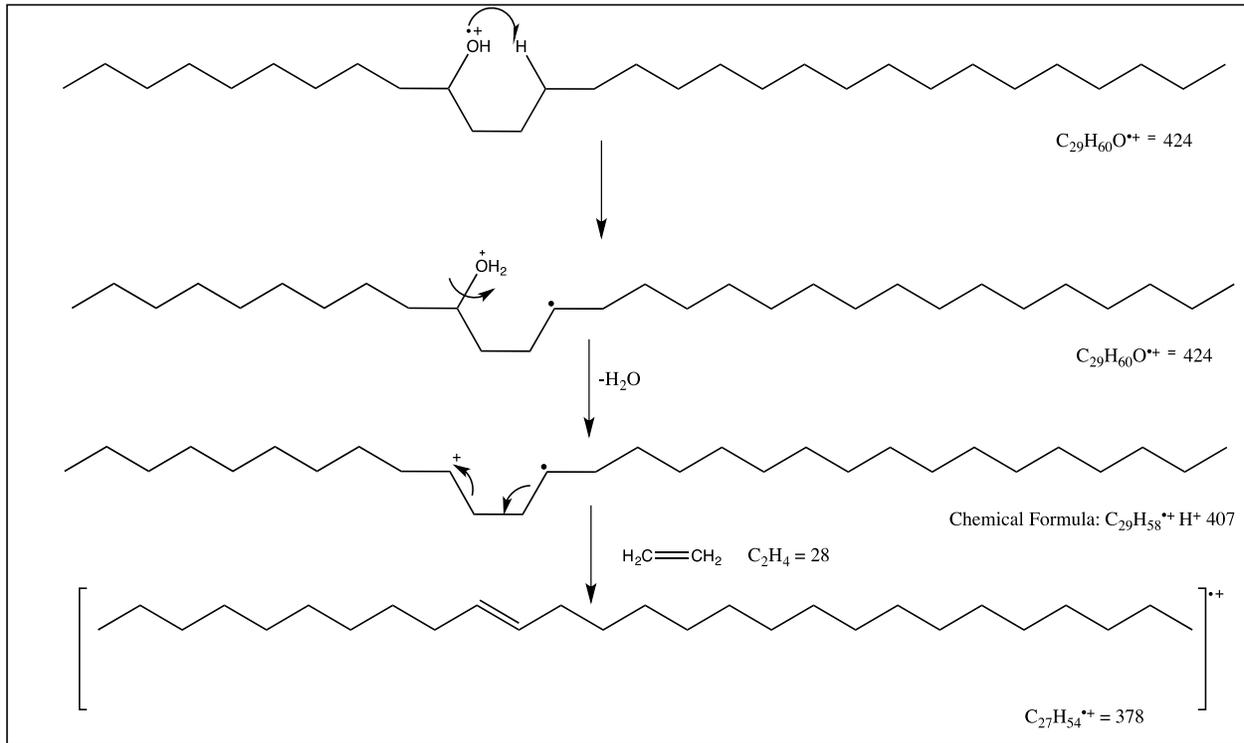
Por otro lado señales comprendidas entre  $\delta$  1,47 y  $\delta$  1,26, integran para una cantidad de protones aproximada a 54H, esto origina información valiosa del número de carbonos  $\text{CH}_2$  posibles, si cada carbono posee 2 hidrógenos, se podría proponer una cadena con 26 a 28 carbonos. Los análisis del espectro de RMN de carbono 13 y de espectrometría de masas (EM) complementan esta información.

El espectro de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), muestra una señal a  $\delta$  72.0 ppm correspondiente al carbono C-H de metino base de oxígeno, una señal a  $\delta$  37.5 indica la presencia de carbono  $\text{CH}_2$  en posición  $\alpha$  al carbono que contiene el alcohol, la señal en  $\delta$  31.9 se asigna al carbono  $\text{CH}_2$  en posición  $\beta$  al carbono que contiene el grupo hidroxilo, en la región entre  $\delta$  22.7 y 29.7 se atribuyen a los  $\text{CH}_2$  restantes de la cadena (Pavia, *et al.*, 2008).

La señal a  $\delta$  14.1 es característica del desplazamiento de los carbonos  $\text{CH}_3$  terminales de cadena. El cúmulo de señales en la región de 29.3 a 29.7 ppm no permite cuantificar con precisión el número de carbonos de la cadena, sin embargo dada la similitud en las señales y de acuerdo a los datos espectroscópicos comparados con la literatura (Theuns, *et al.*, 1984), se sigue planteando una cadena entre 26-29 carbonos para el compuesto RCH-1.

Por otro lado, se pueden apreciar 14 resonancias en la región de 14 a 38 ppm, lo que permite deducir a partir de la observación del ion molecular  $\text{M}^+ = 424$  de su espectro de masas, que la molécula en discusión podría corresponder a la estructura de un alcohol simétrico, entonces las 14 señales observadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en realidad darían cuenta a 28 resonancias y un grupo  $=\text{CH}-\text{OH}$  adicional, sin embargo en el mismo espectro de masas se observan otros fragmentos que no apoyan la hipótesis de la presencia de un alcohol simétrico. El espectro de masas, EI-MS m/e (% abundancia relativa) corroboran las afirmaciones anteriores al mostrar las siguientes señales 424 (4) [ $\text{M}^+$ ] correspondiente al ion molecular, 407 (100) [ $\text{M}-\text{H}_2\text{O}$ ] $^+$  asignada a la pérdida de agua características de los alcoholes y otras señales 391 (30), 379 (8), 351 (0.8), 298(4), 280 (8), 157 (0.5), 111 (0.1) 97 (0.1), 83 (0.1), derivadas de las rupturas y fragmentaciones de iones comunes en los alcoholes de cadena larga. La evidencia de un ion molecular 424 m/z, sugiere que el compuesto RCH-1 es un alcohol de 29 carbonos conocido como: 10-nonaconasol. Para determinar la posición del hidroxilo, es necesario observar las fragmentaciones y así proponer la estructura final. En el esquema 3 se pueden observar los mecanismos propuestos para la fragmentación de este tipo de alcoholes. De acuerdo a la bibliografía (Pretsch, *et al.*, 2009), la señal del ion molecular siempre es difícil observarla, sin embargo en los alcoholes secundarios es posible observar el ión molecular en baja abundancia.

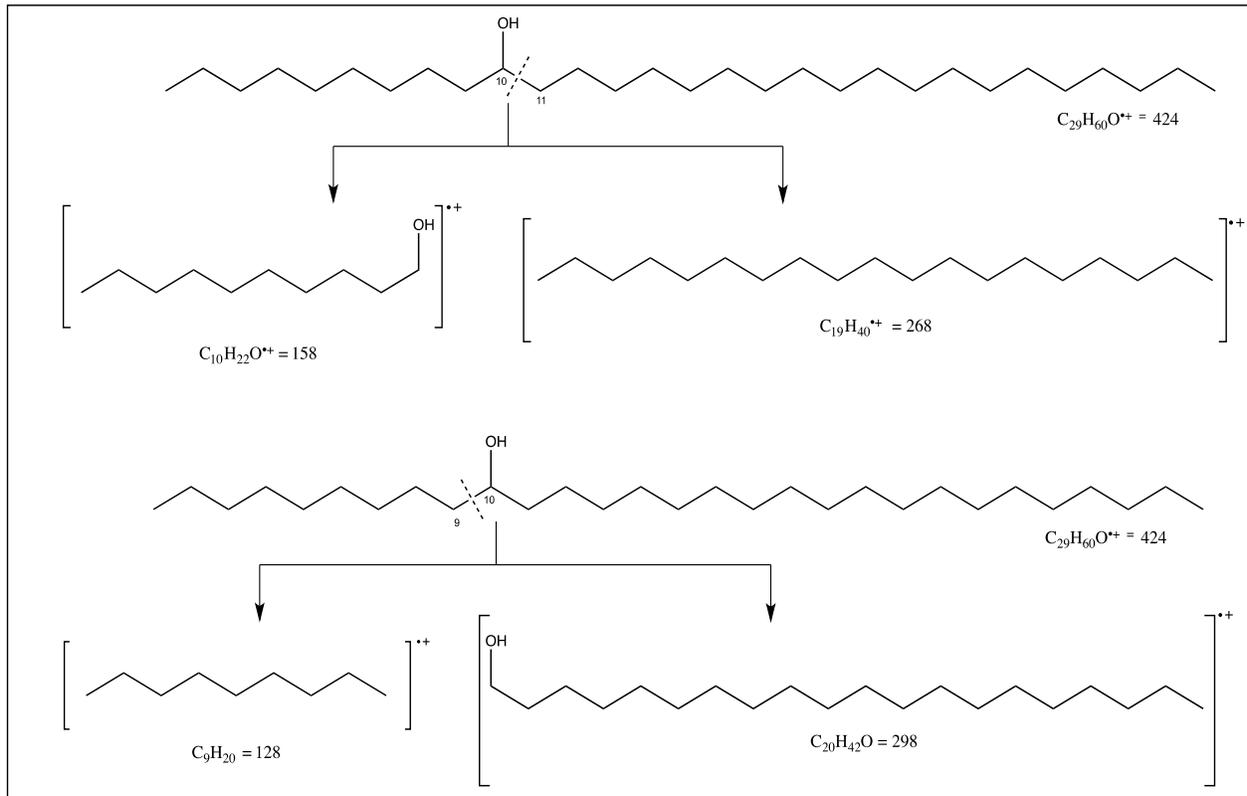
**Figura 8** Mecanismo de fragmentación de H<sub>2</sub>O y etileno para alcoholes alifáticos del compuesto RCH-1



Indirectamente se puede predecir el peso del compuesto, dado que la señal más sobresaliente en los espectros de EM de este tipo de alcoholes, aparecen asociados los fragmentos  $m/z$  de 406-408, y corresponden a la pérdida de una molécula de agua  $[M-H_2O]^+$ , (McLafferty y Turecek, 1993). Otra señal importante es la generada por la pérdida del etileno  $CH_2=CH_2$  (Figura 8).

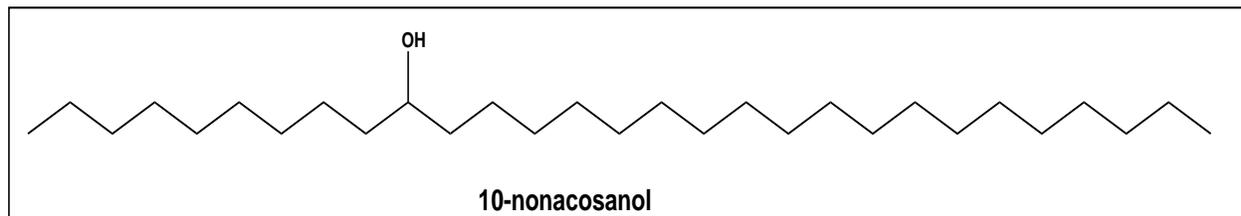
De acuerdo con Kircher (1982), la posición del grupo OH en 10 es muy común, basándonos en esto se analizaron dos rupturas típicas del 10-nonacosanol las fragmentaciones características de estos iones se derivan de la ruptura  $\beta$  del grupo hidroxilo. Cuando la ruptura ocurre entre los carbonos 10 y 11 se generan los iones de 158 y 268, las cuales están presentes en el espectro. La otra ruptura posible ocurre entre los carbonos 9 y 10, en este caso se obtienen los iones de pesos 128 y 298 de igual forma observadas en el espectro. Sucesivas pérdidas de agua o etileno de estos fragmentos generan iones que aparecen en menor abundancia en el espectro. Un ejemplo claro es la pérdida de agua de del fragmento de masa 298, que generaría el ion de 280 también presente en el espectro (Figura 8.1).

**Figura 8.1** Mecanismo de ruptura  $\beta$  del grupo hidroxilo para alcoholes secundarios del compuesto RCH-1



Con todos los datos espectroscópicos analizados y con los ejemplos observados en la literatura (Yao *et al.*, 2012; Wollrab, 1968), se puede proponer sin discusión que el compuesto RCH-1 corresponde a la estructura del 10-nonacosanol (Figura 8.2).

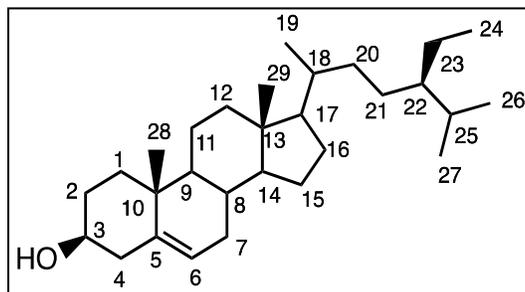
**Figura 8.2** Estructura del compuesto RCH-1 (10-nonacosanol)



De la fracción de polaridad media, se observó un precipitado amorfo de color blanco denominado RCH-3. El compuesto se obtuvo por filtración y posterior purificación por medio de cromatografía de columna Flash (CCF). El compuesto RCH-3 se obtuvo como un sólido blanco (con un peso de 0.0167 g) con un punto de fusión de 135-137 C. De acuerdo a los datos de punto de fusión y  $R_f$  (índice de retención). Se propuso como posible estructura el  $\beta$ -sitosterol (Figura 2). Este compuesto es muy común en los extractos menos polares de la mayoría de las plantas. Sus datos físicos como el punto de fusión son clave para su detección. Normalmente el procedimiento inicial consiste en comparar el sólido obtenido con una muestra pura, por lo que se realizó una CCD comparativa, donde se usó como referencia una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol (marca Sigma-Aldrich).

Como se suponía los valores Rf de las muestras fueron exactamente iguales. La confirmación de la estructura se logró totalmente mediante el análisis espectroscópico de IR,  $^1\text{H}$  RMN Y  $^{13}\text{C}$  RMN.

**Figura 8.3** Estructura del  $\beta$ -sitosterol



A continuación se describen los datos espectroscópicos tomados para el  $\beta$ -sitosterol. Cabe mencionar que no se profundizara en el análisis espectroscópico, dado que ya es una estructura conocida y con muchos estudios de este tipo. El espectro IR (ATR), muestra una banda ancha entre  $3401\text{-}3327\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo (OH), las bandas a  $2931$  y  $2864\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las estiramientos C-H de  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ , CH. A  $1666$  se observa la señal del estiramiento C=C del doble enlace, la señal a  $1050\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al vibración C-O. Otras señales a  $1461$ ,  $1375$ ,  $955$ ,  $8367$ ,  $800$  y  $737$  complementan la serie de estiramientos flexiones y vibraciones que presentan los diversos enlaces de este compuesto.

El espectro de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  RMN ( $400\text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ), muestra a alta frecuencia dos señales importantes: a  $\delta 5.35$  (m, 1H), para un protón vinílico H-6, esta señal es característica de los esteroides, la otra señal relevante es el multiplete a  $\delta 3.52$  (m, 1H), asociado al protón base de carbono oxigenado H-3, de nuevo una señal característica en  $^1\text{H}$  RMN para los esteroides. El resto de señales presentadas entre  $2.32$  y  $1.41$  ppm son asignadas a los protones de los ciclos y los fragmentos de cadena. Una ampliación de la zona de baja frecuencia del espectro permite observar con claridad las señales de 6 metilos ( $\text{CH}_3$ ), las cuales dos aparecen como singuletes a  $\delta 1.00$  (3H, s) y  $0.68$  (3H, s) correspondientes a los protones de los metilos 18 y 19, en  $\delta 0.92$  (3H, d),  $0.83$  (3H, d) y  $0.81$  (3H, d) aparecen los dobletes asociados a los metilos 21, 26 y 27. Finalmente una señal a  $\delta 0.84$  (3H, t) corresponde al metilo ( $\text{CH}_3$ ) 29. Estas asignaciones, están de acuerdo para la estructura del  $\beta$ -sitosterol (Chaturvedula y Prakash, 2012).

El espectro de carbono  $^{13}\text{C}$  RMN ( $100\text{ MHz}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) para el  $\beta$ -sitosterol compuesto RCH-3 muestra dos señales características a  $\delta 140.7$  y  $\delta 121.7$ , las cuales son asignadas a los carbonos 5 y 6 respectivamente del doble enlace (Agrawal *et al.*, 1985). Otra señal familiar aparece en  $\delta 71.7$  correspondiente al carbono 3 (C-H base de oxígeno). El cúmulo de señales en la región de  $\delta 56.7$  a  $11.8$  ppm destaca las señales a  $19.0$  y  $11.8$  ppm correspondientes a los carbonos angulares C19 y C18 respectivamente. Las señales:  $\delta 56.7$ ,  $56.0$ ,  $50.0$ ,  $45.8$ ,  $42.2$ ,  $39.7$ ,  $37.22$ ,  $36.11$ ,  $33.9$ ,  $31.8$ ,  $31.6$ ,  $29.1$ ,  $28.2$ ,  $26.03$ ,  $24.2$ ,  $23.0$ ,  $21.0$ ,  $19.7$ ,  $19.3$ ,  $18.7$  y  $11.9$  completan el total de señales para el compuesto indicado 29 Carbonos lo que coincide con su fórmula molecular de  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ . Las asignaciones precisas de los carbonos se complementan por los análisis de espectros bidimensionales (Friebolin, 1998; Simpson, 2012).

De la fracciones más polares del extracto hexánico, se obtuvo otro sólido de color blanco, el cual se denominó RCH-6. El sólido amorfo se obtuvo por filtración y posterior purificación por medio de cromatografía de columna Flash (CCF). El compuesto RCH-6 se obtuvo como un sólido blanco (0.02387 g) con un punto de fusión de 90-93°C.

El espectro IR, muestra dos bandas anchas en 3315 y 3222  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento (St) del OH, de un alcohol. Las señales en 2914 y 2847  $\text{cm}^{-1}$ , corresponden a los estiramientos de  $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$  respectivamente, una deformación de  $\text{CH}_2$  a 1465 y estiramiento en 1375 C-H. El estiramiento C-OH a 1132 además de flexiones en 1030 de C-OH y la señal de 721 atribuida a los estiramientos de  $-(\text{CH}_2)-$  confirman características de un alcohol de cadena larga. El espectro de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$  RMN, 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto RCH-6, muestra los patrones de desplazamiento característicos de un alcohol alifático de cadena larga. Se destaca la señal ancha a  $\delta$  3.59 correspondiente al protón de metino en base oxigenado (HO-C-H), en este caso al contrario del espectro para el alcohol RCH-1, esta señal integra para 2 hidrógenos; de acuerdo a lo anterior existen 2 posibilidades: la primera opción, podría ser la señal para un metileno  $\text{CH}_2$  de una alcohol primario ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), la segunda opción es la aparición de 2 protones de metilo (HO-C-H) en diferentes posiciones a lo largo de la cadena. La señal que aparece entre 0.96 y 0.92 ppm como un triplete característico de cadena terminal, genera la respuesta para una de las opciones atribuidas al desplazamiento en  $\delta$  3.59 (Breitmaier, 1993). Claramente se observa que la señal entre  $\delta$  0.96 y  $\delta$  0.92 corresponde a los metilos  $\text{CH}_3$ , el par tripletes (recuadro de la Figura 19) cuya integración es para 6 hidrógenos, excluye la posibilidad de que la señal en  $\delta$  3.59 corresponda a los protones  $\text{CH}_2$  de metileno de un alcohol primario ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ). La señal  $\delta$  1.57 es interesante, dado el desplazamiento a mayores frecuencias que los característicos protones de metileno  $\text{CH}_2$ , observando que la integración es para 2 protones y que no se encuentra acoplada (observación de espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC), se asignan a los protones del hidroxilo (O-H).

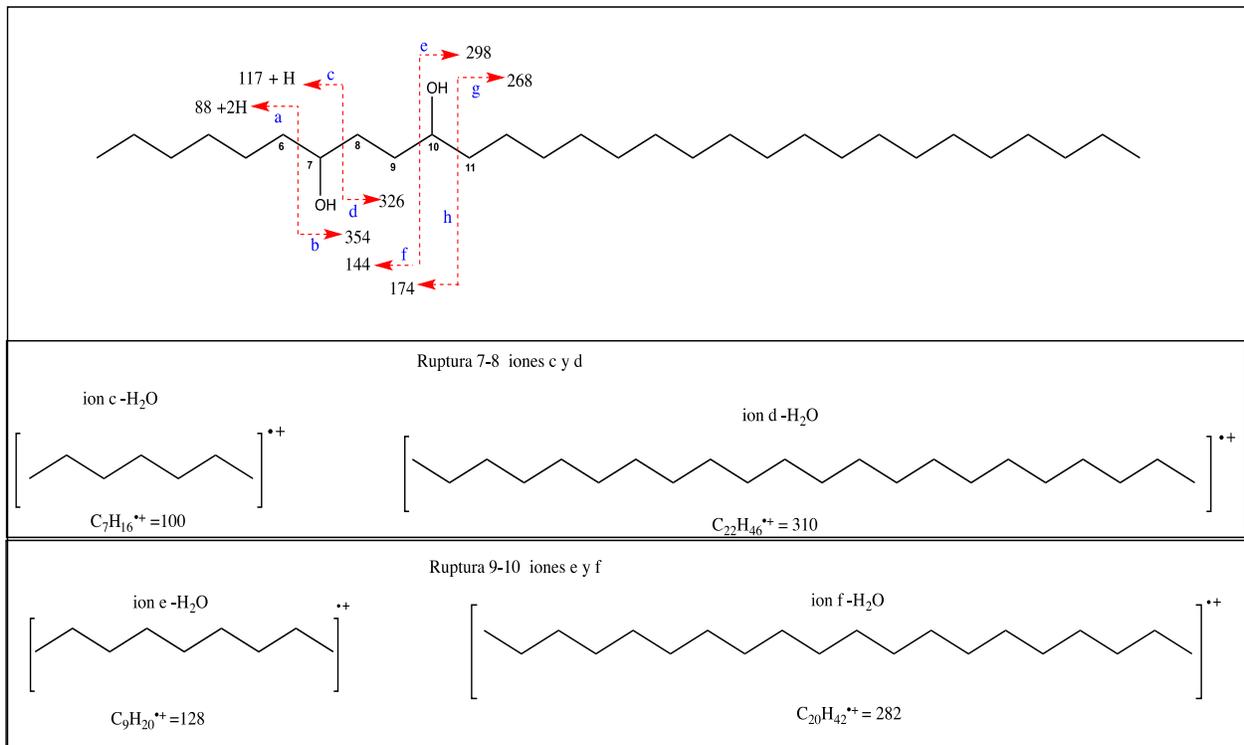
Finalmente en la región del espectro entre  $\delta$  1.42 y  $\delta$  1.25 se observan el cúmulo de protones metilénicos  $-(\text{CH}_2)_n$  que complementan la cadena, la integración de protones es para 50 hidrógenos, lo que indica aproximadamente 24  $\text{CH}_2$  sumados a los otros grupos descritos anteriormente podría proponerse un alcohol de 29 carbonos con dos grupos OH, cuya fórmula sería  $\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{O}_2$ . Los análisis del  $^{13}\text{C}$  RMN y de espectrometría de masas (EM) complementaran esta información.

El espectro de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$  RMN 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), muestra una señal a  $\delta$  71.8 (2C) correspondiente a los carbonos C-H de metino, a  $\delta$  37.5 (1C), 37.3 (2C) y 37.2 (1C), se pueden observar igualmente, las señales típicas de carbono  $\text{CH}_2$  en posición  $\alpha$  al carbono que contiene el alcohol.

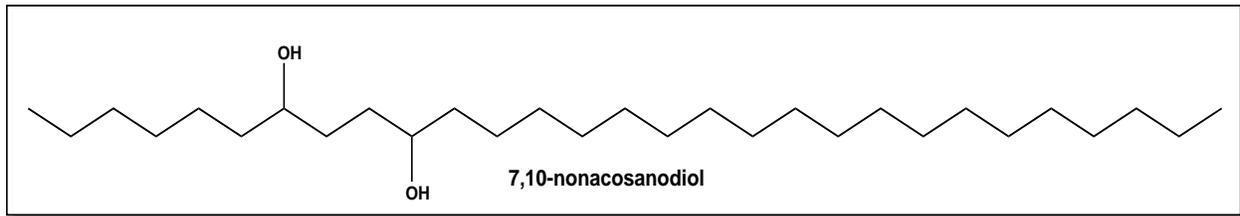
La señal en  $\delta$  31.8 (2C) se asigna al carbono  $\text{CH}_2$  en posición  $\beta$  al carbono que contiene el grupo hidroxilo. Es de llamar la atención esta señal, dado que da información valiosa de la distancia entre los dos grupos hidroxilo, se puede suponer que: la distancia ente los carbonos que contienen los hidroxilos es de solo 4 carbonos ( $\text{COH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COH}$ ), y por ello solo aparece una resonancia equivalente a 2 carbonos y no para 3 o 4 si hubiese una cadena más larga entre los dos carbonos base de hidroxilo. En la región entre  $\delta$  22.7 y 29.7 ppm se encuentran las señales atribuidas a los  $\text{CH}_2$  restantes de la cadena. La señal a  $\delta$  14.1 ppm (2C) característica del desplazamiento de los dos carbonos  $\text{CH}_3$  terminales de cadena complementa el análisis de espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN. El espectro de masas para el compuesto RCH-6, EI-MS m/e (% abundancia relativa) muestra las siguientes señales 440 (20)  $[\text{M}^+]$  correspondientes al ion molecular, 441 (50)  $[\text{M}+1]^+$ .

La señal a 423 (100)  $[M-H_2O]^+$  es asignada a la pérdida de una molécula de agua, adicionalmente se presenta otra señal a 404 (98)  $[M-2H_2O]^+$  correspondiente a la pérdida consecutiva de otra molécula de agua lo que valida la existencia del diol. Los mecanismos de fragmentación para la pérdida de agua son similares a los mostrados en el esquema 3, de igual forma un ion abundante a 377 (25)  $[M-64]^+$ . Indica la pérdida de las dos moléculas de agua más etileno ( $CH_2=CH_2$ ) (Rose y Johnstone, 1982). Para determinar las posiciones que ocupan los hidroxilos, es indispensable observar las fragmentaciones correspondientes a la ruptura  $\beta$  de los grupos hidroxilo (Yang *et al.*, 2009). La señal del fragmento  $m/z$  a 117 en el espectro de masas coincide con una ruptura de este tipo entre el carbono 7 y 8 los iones generados con la pérdida de moléculas de agua de estos fragmentos; también se observan en el espectro en señales  $m/z$  100, 310 etc. La otra ruptura interesante ocurre en el carbono 10, donde se determinó esa posición para el segundo grupo Hidroxilo por el análisis del espectro de carbono en el cual se observó la cercanía entre los alcoholes entre 4 carbonos de distancia. Con lo anterior muchos fragmentos coinciden con los generados por el impacto electrónico del 10-nonacosanol y se observan señales complementarias. La ruptura entre los carbonos 9 y 10 luego de la pérdida de las moléculas de agua y etileno (Figura 8.4) presenta señales que concluyen que la estructura del compuesto RCH-6 corresponde al 7,10-nonacosanodiol (Figura 8.5).

**Figura 8.4** Mecanismo de  $\beta$  ruptura de los grupos secundarios



Con todos los datos espectroscópicos analizados se propone sin discusión que el compuesto RCH-6 corresponde a la estructura del 7,10-nonacosanodiol.

**Figura 8.5** Estructura del compuesto RCH-6 (7,10-nonacosanodiol)

### 8.3 Conclusiones

Se lograron purificar 12 compuestos de los cuales 3 presentaron alta pureza.

Los tres compuestos aislados corresponden a dos alcoholes de cadena larga 10-nanacosanol y 7,10-nonacosanodiol, además de  $\beta$ -sitosterol, el cual es un conocido esteroles constituyente de muchas especies vegetales.

Los autores agradecemos a la Universidad Autónoma Chapingo por su financiamiento a través del Centro de Investigación en Etnobiología y Biodiversidad (CIETBIO). Agradecemos también a la. M. C. Ernestina Cedillo Portugal del área de Biología del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, quien identificó el material vegetal.

### 8.4 Referencias

- Agrawal, P. K., Jain, D. C., Gupta, R. K., and Thakur, R. S. 1985. "Carbon -13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins" *Phytochemistry Res.* (24)11: 2476-2496.
- Bermúdez, A., Olivera, M. M. A. y Velázquez, D. 2005. "La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales". *Interciencia.* 30(8): 453-459.
- Breitmaier, E. 1993. "Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry". A Practical Guide John Wiley and Sons.
- Chaturvedula, V. S. P. and Prakash, I. 2012. "Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*". *International Current Pharmaceutical Journal.* (1)9:239-242.
- CONABIO, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país, 1998. Comisión para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Coward, J. L. 2010. "FTIR spectroscopy of synthesized racemic nonacosan-10-ol: a model compound for plant epicuticular waxes". *Journal of Biological Physics.* (36)4: 405-425.
- Friebolin, F. 1998. Basic One and Two-Dimensional NMR Spectroscopy; 3ª Edición. VCH.

- Hernández, X. E. 1993. Aspects of plant domestication in Mexico: a personal view. En Ramamoorthy, T. P., Bye, R. A., Lot, A., Fa, J. E. (Eds.). *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press. Nueva York. 1993. 733-753 pp
- Kircher, H. W. 1982. "10-nonacosanol, sitosterol and nonacosanediols in *Juniperus pinchotii*". *Phytochemistry*. (21)7: 1816-1818.
- Mahadevan, V. 1978. Fatty alcohols: chemistry and metabolism. *Prog. Chem. Fats Other Lipids*. (15)4: 255-299.
- McLafferty, F. W. y Turecek, F. 1993. *Interpretation of Mass Spectra*. 4<sup>a</sup> Edition. University science Book.
- Mendoza, C. G. 2008. *La Farmacia Viviente, Recursos Fitogenéticos para la Salud y la Agricultura en México*. Ed. Universidad Autónoma Chapingo.
- Monroy, R. y Ayala, I. 2003. Importancia del conocimiento etnobotánico frente al proceso de urbanización. *Etnobiología*. 3: 79-92, 2003.
- Ortíz, M. B. 1993. *Medicina, Salud y Nutrición Aztecas*. Ed. Siglo XXI Editores. 351p.
- Padilla, J. and Herrán J. 1962. "Hernandezine a new alkaloid of the bisbenzylisoquinoline series". *Tetrahedron*. 18: 427-432.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. A. 2008. *Introduction to Spectroscopy*. Second Edition. Harcourt Brace College Publishers, USA.
- Pretsch, M. E., Badertscher, M. and Bühlmann, P. 2009. "Structure Determination of Organic Compounds. Tables of Spectral Fourth Revised and Enlarged Edition". *Elsevier*.
- Rose, M. E. and Johnstone, R. A. W. 1982. *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*. Cambridge U. P.15.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. 2005. *Spectrometric identification of organic compounds*. 7th Ed. John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Smith, B. C.: *Infrared Spectral Interpretation. A systematic approach*. CRC Press, 1999.
- Theuns, H. G., Janssen, R. H. A. M., Biessels, H. W.A., Salemink, C. A. 1984. "Constituents of *Papaver bracteatum*: O-methyl- $\alpha$ -thebaol and 10-n-nonacosanol. Lanthanide-induced chemical shifts in <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR". *Phytochemistry*. (24)1: 163-169.
- Tuz, C. L. H. 2009. *Así es Nuestro Pensamiento. Cosmovisión e Identidad en Los Rituales Agrícolas de los Mayas Peninsulares*. Universidad de Salamanca, Instituto de Iberoamérica. Tesis Doctoral.
- Wollrab, V. 1968. "Secondary alcohols and paraffins in the plant waxes of the family rosaceae". *Phytochemistry*. ( 8): 623-627.

Yang, N. Y., Tao, W. W., Duan, J. A. 2009. "Four new long-chain aliphatics from the feces of *Troglodytes xanthipes*". *Journal of Asian Natural Products Research*. (11)12: 1032-1039.

Yao, H., Wei, C., Song, H., Guo, R. 2012. "Quality Evaluation of Policosanol Film-Coated Tablets by Simultaneous Determination of Eight Ingredients Using GC- FID and GC-MS". *Journal of Analytical Sciences*, (2)1: 24-28.