



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“ESTUDIO QUÍMICO DE ESPECIES DEL GÉNERO
CAESALPINIA DEL ESTADO DE MICHOCÁN Y SU
APLICACIÓN EN BIOCOMBUSTIBLES”**

T E S I S

**Que para obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

M. C. TERESA PAMATZ BOLAÑOS

Directores:

D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

Morelia, Michoacán

Mayo 2018.

DEDICATORIA

Con infinito amor y agradecimiento a mi familia: a mi esposo **Rafael**, y a mis hijos **María Fernanda** y **Maximiliano**. Por su paciencia, gran amor; por qué me han alentado en cada momento y nunca han dejado de creer en mí. ¡Los amo!

A mis padres **Lorenzo** y **Patricia**, gracias por su cariño, comprensión, y apoyo en todo momento.

A mis hermanas y hermanos **Maribel**, **Rosario**, **Juan**, **Raymundo**, **Gonzalo**, **Roberto**, **Leonardo** y **Lorenzo Antonio** por el apoyo y cariño que siempre me han brindado.

A mis suegros **Enrique** y **Concepción** quienes me han apoyado siempre y cuidado con gran amor de mis hijos. ¡Muchas gracias!

AGRADECIMIENTOS

Instituciones

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por haberme formado académicamente y brindarme los medios para culminar este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por darme la oportunidad de pertenecer al programa de Doctorado en Ciencias Químicas.

Al CONACyT por otórgame la beca 219549.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química por la facilitación de las hidrotalcitas así como de las instalaciones y los equipos para llevar a cabo los experimentos catalíticos.

Personales

Al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado** por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su paciencia, asesoría y sus consejos.

A la **D.C. Rosa Elva Norma del Río** por todo lo aprendido, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por su paciencia, sus observaciones y consejos. Pero sobre todo por su amistad y su apoyo incondicional.

A los miembros de mi comité tutorial **D.C. Juan Diego Hernández Hernández, D.Q. Gabriela Rodríguez García, y D.C. Jesús Martín Torres Valencia** por sus aportaciones y correcciones a este trabajo de tesis.

Al **D.C. Horacio González, D.C. José L. Rico** y a la **M.C. Denis Cabrera** por las facilidades para llevar a cabo los experimentos catalíticos.

A mis amigos y compañeros: Julio, Héctor, Viry, Chely, Martin, Rosy, Rouss, Sinuhe, Ode, Eva, Armando, Jessy, Karen, Lireny, Luisja, David, Mony y Miriam. Gracias por su amistad y los ratos amenos en el laboratorio.

Los resultados obtenidos en la tesis doctoral permitieron la generación de la siguiente publicación y participaciones en congresos

1. “Transesterification of *Caesalpinia eriostachys* seed oil using heterogeneous and homogeneous basic catalysts”. Teresa Pamatz-Bolaños, Denis A. Cabrera-Munguia, Horacio González, Rosa E. del Río, José L. Rico, Gabriela Rodríguez-García, Aída Gutiérrez-Alejandre, Francisco Tzompantzi, Mario A. Gómez-Hurtado. *International Journal of de Green Energy*. 2018. Aceptado. DOI: 10.1080/15435075.2018.1473775.
2. “Análisis químico preliminar de los tallos de *Caesalpinia eriostachys*” Teresa Pamatz-Bolaños, Armando Talavera Alemán, Gabriela Rodríguez-García, Juan D. Hernández Hernández, Luisa U. Román Marín, Mario A. Gómez-Hurtado, Rosa E. del Río. Memorias de 49° Congreso Mexicano de Química y 33° Congreso Mexicano de Educación Química. 2014.
3. “Biodiesel de las semillas de *Caesalpinia eriostachys*” Teresa Pamatz-Bolaños, Denis A. Cabrera-Munguia, Horacio González, José L. Rico, Yliana López, Gabriela Rodríguez-García, Mario A. Gómez-Hurtado, Rosa E. del Río. Memorias de 50° Congreso Mexicano de Química y 34° Congreso Mexicano de Educación Química. 2015. Pág 73.
4. “Butenólidas aisladas de las vainas de *Caesalpinia platyloba*”. Teresa Pamatz Bolaños, Armando Talavera Alemán, Lidia Beiza Granados, Hugo A. García-Gutiérrez, Gabriela Rodríguez-García, Rosa E. del Río, Carlos M. Cerda-Gracia-Rojas, Pedro Joshep-Nathan, Mario A. Gómez-Hurtado. Memorias de “30 años diseñando moléculas y formando investigadores Dra. Rosa Santillán”. 2016. Pág 62.
5. “Nuevos cassadienos aislados de *Caesalpinia platyloba*”. Teresa Pamatz-Bolaños, Odessa Magallón-Chávez, Mario A. Gómez-Hurtado, Gabriela Rodríguez-García, José M. Zaragoza-Ríos, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Pedro Joseph-Nathan, Rosa E. del Río. *Revista Latinoamericana Química Suplemento especial*. 2016. 45, 147.

El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D.Q Mario Armando Gómez Hurtado y la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres. Con apoyo económico de la CIC-UMSNH a los Proyectos.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVO	9
Objetivos particulares	9
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	10
CONCLUSIONES	63
PARTE EXPERIMENTAL	66
BIBLIOGRAFÍA	72

SÍMBOLOS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

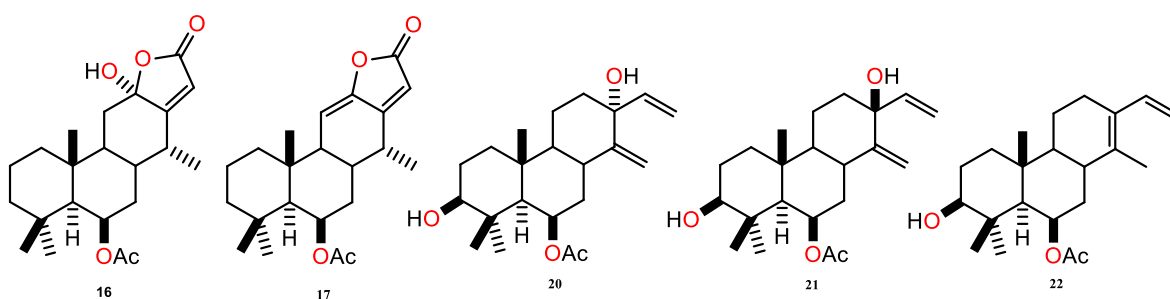
%	Por ciento
$[\alpha]$	Rotación específica
α	Alfa
β	Beta
δ	Desplazamiento químico
°C	Grados Celsius
COSY	CORrelation SpectroscopY
DCV	Dicroismo Circular Vibracional
HETCOR	HETeronuclear CORrelation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
AcO	Acetoxi
AcOEt	Acetato de etilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
cm	Centímetros
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dd	Señal doble de dobles
DRX	Difracción de Rayos X
FAME	Fatty Acid Methyl Ester
g	Gramos
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
h	Horas

Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
m	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Masa carga
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nm	nanómetros
mPa	Mega Pascal
ppm	Partes por millón
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
t	Señal triple
TG	Triglicérido
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Del estudio químico de los extractos hexánicos y CH₂Cl₂ de las semillas de *C. eriostachys* se obtuvieron aceites compuestos principalmente por ésteres de glicerol. Dichos aceites se sometieron a reacciones de transesterificación empleando hidrotalcitas de ZnAl y KOH como catalizadores heterogéneos y homogéneos, respectivamente. Para ambos catalizadores, el producto de reacción correspondió a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y glicerol, con rendimientos entre 79-90%. Los valores calóricos, densidad, viscosidad de FAME se ajustan a la norma EN 14214, por lo que el aceite de semillas de *C. eriostachys* es una materia prima prometedora para la producción de biodiesel. Adicionalmente, el β -sitosterol (**10**), estigmasterol (**11**), y ferulato de miristilo (**13**) fueron aislados de las partes aéreas de ésta especie.

De las vainas de *C. platyloba* se aislaron las butenólidas **16** y **17**; de las hojas a la lactona **17**, y los cassadienos **20-22**. Los cuales fueron identificados y caracterizados mediante métodos físicos y espectroscópicos. De **17-22** no hay reportes en la literatura por lo que se consideran productos naturales novedosos. Mientras que de *C. sclerocarpa* se aisló al lupeol (**12**).

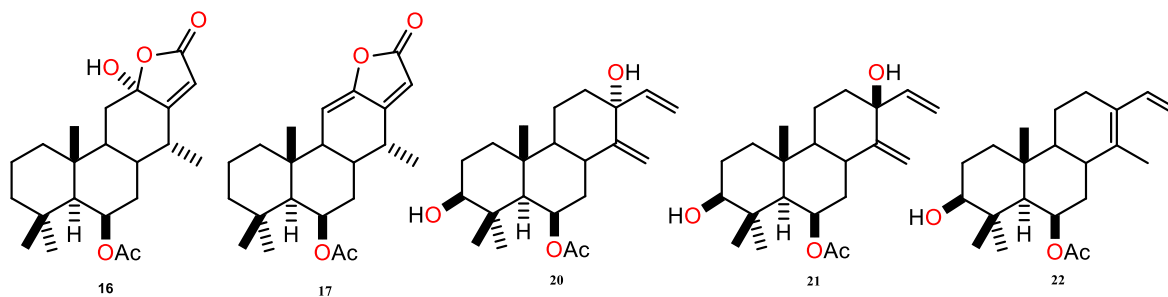


Palabras claves: *Caesalpinia platyloba*, cassano, FAME, biodiesel

ABSTRACT

Chemical studies of hexanic and CH₂Cl₂ extracts from the seeds of *C. eriostachys*, were separately performed, to providing, in both cases, yellowish oil composed by glyceryl esters derivatives. Those seed oils were assayed in transesterification reactions, using ZnAl and KOH as the heterogeneous and homogeneous catalysts, respectively. In each assay, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) and glycerol were produced with yields of 79-90%. Caloric value, density, and viscosity properties of FAME are in concordance with EN 14214; therefore, the *C. eriostachys* seed oil is a promising raw material in the biodiesel production. In addition, β -sitosterol (**10**), estigmasterol (**11**), and myristyl ferulate (**13**) were obtained from this vegetal specie.

On the other hand, the legumes from *C. platyloba* provided the butenolides **16** and **17**, while the leaves yielded **17**, as well as the cassadiene diterpenos **20-22**. All compounds were identified and characterized by physical and spectroscopic data. Compounds **17-22** as novel diterpenos are considered, since to our known, no data were found in literature. The chemical study of *C. sclerocarpa* provided lupeol (**12**).



Keywords: *Caesalpinia platyloba*, cassano, FAME, biodiesel

INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios derivan de metabolitos primarios y ambos grupos comparten rutas metabólicas esenciales como la fotosíntesis, el ciclo de Krebs y la glicólisis. En la biosíntesis de metabolitos secundarios se utilizan como bloques de construcción principales a la acetil coenzima A, el ácido shikímico, ácido mevalónico y algunos aminoácidos. De estos bloques se genera una cantidad importante de productos los cuales pueden tener diversas aplicaciones.¹

Los metabolitos primarios se encuentran ampliamente distribuidos en las especies vegetales son indispensables para el desarrollo fisiológico de la planta. Están constituidos por aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos.

Entre los metabolitos primarios, más abundantes en la naturaleza que se encuentran presentes en grandes cantidades, que son de fácil extracción y su explotación es relativamente barata se destacan en los carbohidratos y lípidos.

Entre los diversos tipos de lípidos podemos encontrar ácidos grasos, ceras triglicéridos, entre otros.² Una de las aplicaciones de los lípidos, específicamente los compuestos de tipo triglicéridos, es su uso como biocombustibles.

Los metabolitos secundarios, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales.³ Aproximadamente el 60% de los fármacos comerciales actuales tuvieron su origen en un producto natural.^{4,5}

Hoy en día, se conoce una diversidad amplia de productos naturales, los cuales están clasificados en tres principales grupos (terpenos, policétidos y alcaloides); de igual manera se conocen los procesos biosintéticos involucrados en la generación de este tipo de moléculas (metabolitos secundarios), así como la exitosa aplicación de estos.^{6,7}

Aunque en los últimos años se ha avanzado de manera importante en el estudio de productos naturales, aún persiste la necesidad de investigar la composición química de especies vegetales con fines de obtener principios activos

y comprobar los efectos terapéuticos atribuidos. La investigación sobre especies medicinales siempre ha permitido contar con sustancias promisorias para el tratamiento de diversas enfermedades.

ANTECEDENTES

México es uno de los países de mayor riqueza florística, ocupa el cuarto lugar mundial en cuanto al número de especies de plantas; en su territorio crecen unas 30,000 especies vegetales, que representan alrededor del 10% de la flora del mundo.⁸ Del total de las especies vegetales que crecen en el País, solo se tiene registro del uso y manejo tradicional de unas 5,000 especies vegetales,⁹ esto tiene una base histórica y es que particularmente los grupos indígenas, campesinos y rurales de México son herederos del legado cultural de nuestros ancestros quienes desarrollaron un amplio conocimiento de la botánica aplicada a la medicina.¹⁰

Entre los Estados más ricos en biodiversidad se encuentra Michoacán que cuenta con una vasta riqueza vegetal, ocupa el cuarto lugar en riqueza florística albergando 4,672 especies nativas, de las cuales predominan aquellas del género *Asteraceae*^{11,12} y *Fabaceae*.¹³

Las especies de la familia *Fabaceae* que crecen en el Estado de Michoacán. Esta familia está constituida por tres subfamilias que presentan distribución cosmopolita (*Fabaceae*, *Caesalpiniaceae* y *Mimosaceae*).¹³ Poseen una gama variada de formas biológicas vegetales, desde enredaderas, herbáceas, hasta arbustos y árboles. Particularmente la familia de las fabáceas ocupa un lugar importante como fuente de recursos vegetales que el hombre ha usado en su desarrollo, como alimento, forraje, medicina, perfumería, madera, entre otros.¹⁴

La familia *Fabaceae* ocupa el segundo lugar en distribución dentro del Estado de Michoacán con 1,800 especies. Las plantas de esta familia son, arbustos o plantas herbáceas.¹⁵ Crecen principalmente en climas tropicales y subtropicales.

Entre las especies vegetales que crecen en regiones tropicales y subtropicales se encuentran las del género *Caesalpinia* (*Fabaceae*), que contiene

más de 500 especies, de las cuales se han estudiado alrededor de 30 respecto a sus propiedades fitoquímicas y/o farmacológicas.¹⁶

Los constituyentes químicos reportados en el género *Caesalpinia* son variados,¹⁷ estos incluyen alcaloides, saponinas, fenoles, flavonoides, aminoácidos, diterpenos, triterpenos, ácidos grasos.

En la especie *Caesalpinia decapetala* de las hojas obtuvieron al cassadieno conocido como Caesaldecan (**1**), el cual se encuentra funcionalizado con un éster en la posición 3 α , un alcohol en la posición 6 β y oxidado en el metilo 18.¹⁸

Dos nuevos diterpenos tipo cassano **2** y **3** (figura 1) fueron aislados de la raíz de *C. decapetala* los cuales mostraron moderada actividad contra la enzima neuraminidasa presente en la envoltura de la cápside del virus de la gripe.¹⁹

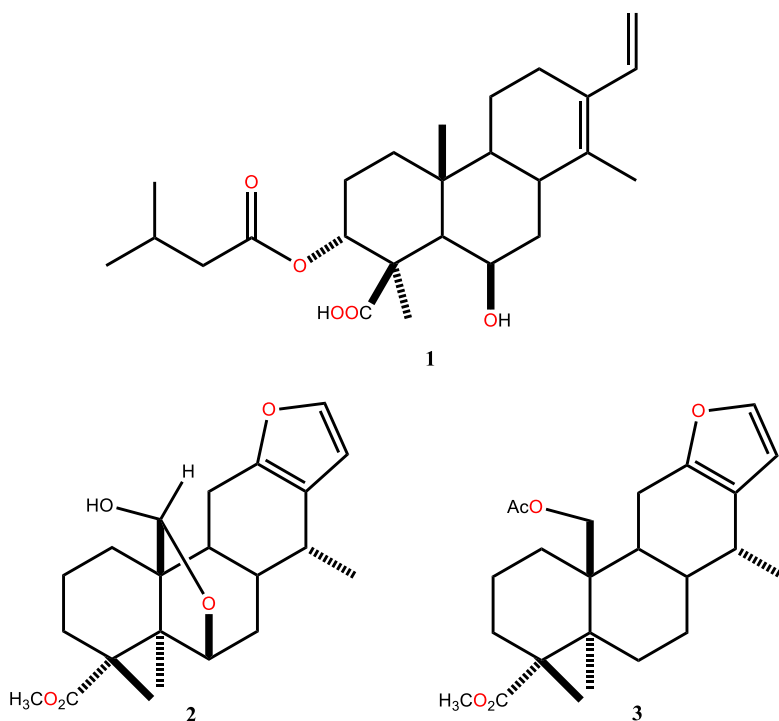


Figura 1. Diterpenos tipo cassanos aislados de *C. decapetala*.

De los pericarpios de *C. bonduc* aislaron los diterpenos tipo cassano **4-6** donde un grupo metilo migró 19(4 $\rightarrow$ 3) del esqueleto cassano (figura 2). Las estructuras fueron elucidadas con base en métodos físicos y espectroscópicos

como: RMN en 1D y 2D, IR, UV y masas.²⁰ El compuesto **6** presentó efecto neuroprotector contra neurotoxicidad inducida en células SH-SY5Y.

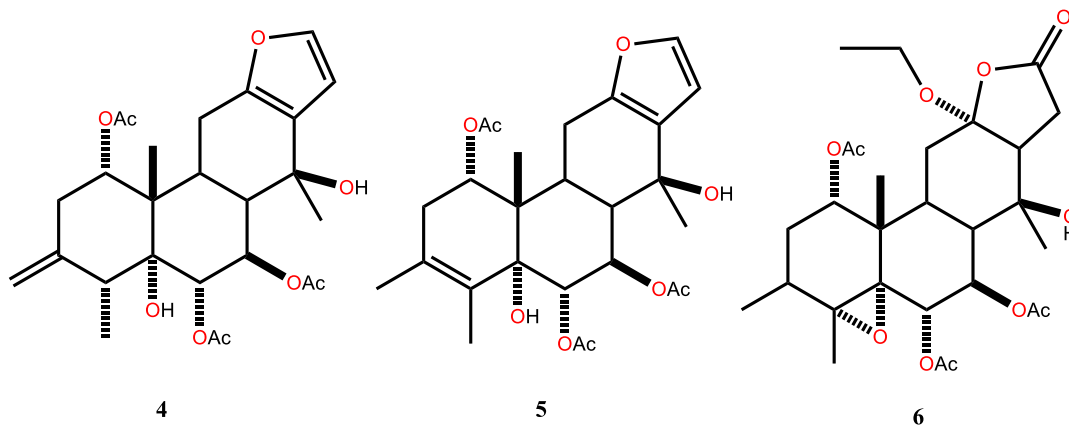


Figura 2. Diterpenos aislados de *C. bonduc*.

De las hojas de *C. platyloba* reportaron el aislamiento de los diterpenos tipo cassanos **7-9** (Figura 3); la configuración absoluta de estos fue asignada mediante Dicroísmo Circular Vibracional (DCV), difracción de rayos X y correlación química.^{21,22}

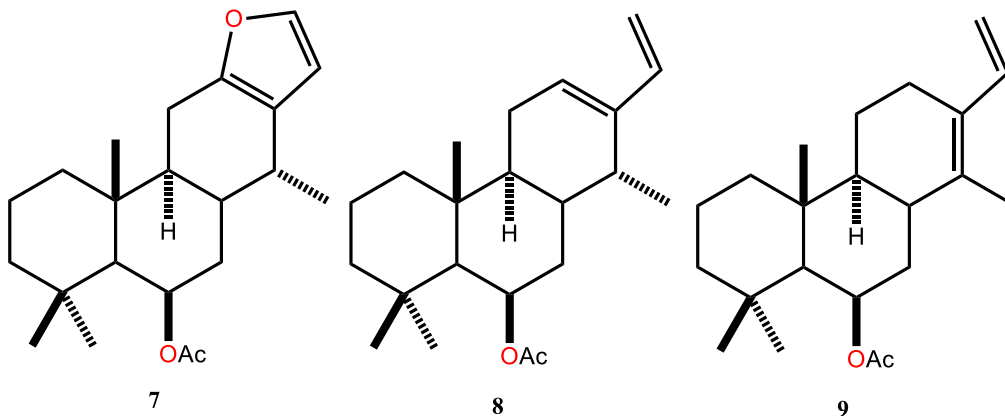


Figura 3. Diterpenos aislados de *C. platyloba*.

Con respecto a las energías sostenibles y alternativas, la investigación sobre biocombustibles es una de los objetivos principales, debido a la reducción de las emisiones de CO₂, SO₂ e hidrocarburos durante combustión, que deriva en beneficios ambientales.²³

El biodiesel, un combustible diesel alternativo, se hacen a partir de fuentes biológicas renovables como los aceites vegetales y las grasas animales. Es biodegradable y no tóxico, tiene bajos perfiles de emisiones de gases.

Recientemente, por causa de los aumentos en los precios del crudo, los recursos limitados de combustibles fósiles y las preocupaciones ambientales ha habido un renovado interés en los aceites vegetales y grasas animales para hacer biodiesel.²⁴

Los aceites vegetales de jatropha, moringa, neem, trisperma e higuera se han propuesto como materia prima potencial para la elaboración de biodiesel.²⁵

Los aceites vegetales son productos comerciales ampliamente utilizados en cocina para freír o guisar alimentos, también son utilizados como aditivos en diversas industrias dedicadas a la elaboración de alimentos, cosméticos, champú, jabones, impermeabilizantes, fármacos, lubricantes y en los últimos años, se ha incrementado su uso como combustible para motores de combustión interna, específicamente motor diesel.

La elaboración de biodiesel consiste en la transesterificación de los aceites vegetales. Las reacciones de transesterificación, se realizan en las moléculas pertenecientes a la familia de los ésteres. La reacción está basada en la sustitución alcohólica de la porción alcóxido presente en el éster, para ello se usa un catalizador que acelere la reacción (Esquema 1). El resultado es el intercambio de fragmentos moleculares, donde un fragmento del alcohol termina siendo parte del éster y el fragmento alcóxido del éster termina siendo parte del alcohol en reacción.²⁶



Esquema 1. Reacción de transesterificación

La ruta más común para la producción de biodiesel es la transesterificación de triglicéridos (TGs), que ocasionalmente se encuentran como los principales

componentes en aceites vegetales. En esta transformación química, los TGs reaccionan comúnmente con metanol en presencia de un catalizador homogéneo o heterogéneo para obtener ésteres metílicos de ácido grasos (FAME), componentes primarios del biodiesel. Hoy en día, algunas fuentes vegetales para la producción de biocombustibles son reconocidas.²⁷ El producto tiene propiedades muy parecidas al diésel. Otras fuentes pueden ser la grasa animal y el aceite vegetal usado.²⁸

Los monoésteres derivados de fuentes vegetales pueden usarse como biocombustibles alternativos al petrodiesel.

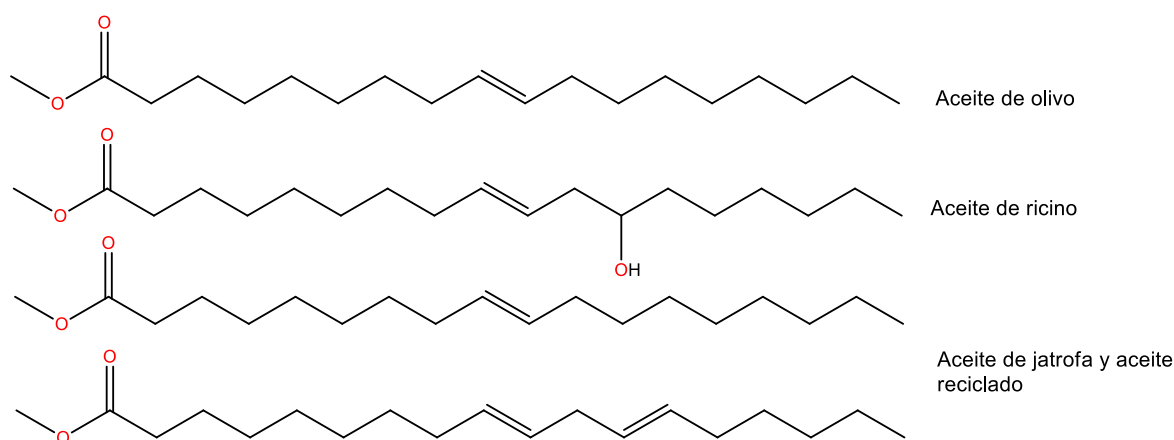


Figura 4. Principales monoésteres del biodiesel producido de aceites de olivo, ricino, *Jatropha* y del aceite reciclado.

La razón por la cual los monoésteres pueden fungir como biocombustibles se debe a la semejanza estructural en el tipo de átomos presentes y en la longitud de cadena hidrocarbonada, con la molécula del cetano. El cetano es un hidrocarburo parafínico de fórmula $C_{16}H_{34}$. Para juzgar el índice de cetano se usa el que no está ramificado y se le da un valor en la escala de 100, la otra molécula de referencia es el 2,2,4,4,6,8,8, heptametil nonano, que tiene un número de cetano de 15. El número de cetano en sí es una medida de la calidad de ignición de un diesel y está basado en el tiempo de encendido de la máquina. Cuanto mayor es el número de cetano, menor es el tiempo que tarda en encender y por ende mejor la calidad de la ignición.²⁸

Adicionalmente el biodiesel es una buena alternativa como combustible ya que tiene características parecidas al petrodiesel. Puede fabricarse a escala y proviene de fuentes renovables.

Al igual que todas las combustiones completas, si el biodiesel es totalmente quemado en la cámara de ignición del motor, también generará CO₂ pero este no se considera contaminante debido a que el gas producido es absorbido por las mismas plantas que proveen la materia prima para la obtención del biodiesel. Entonces, podría decirse que el biodiesel emite 0% de CO₂ contribuyente al efecto invernadero debido al ciclo del carbono.²⁹

Además, el biodiesel no posee compuestos como N₂ ni S. En la combustión estos elementos forman óxidos que viajan a la atmósfera, donde reaccionan con radicales OH formando ácidos de nitrógeno (HNO_x) y ácido sulfúrico (H₂SO₄), provocando así la lluvia ácida.²⁸

Un ecosistema importante para las plantas productoras de petróleo es el bosque caducifolio tropical, donde muchas especies de la familia Fabaceae se encuentran. Las plantas de esta familia se caracterizan por su abundante producción de semillas. Especies del género *Caesalpinia* (Fabaceae), incluida *C. crista*, *C. bonducella* y *C. pulcherrima*, son fuentes potenciales para la producción de biodiesel.³⁰⁻³² *Caesalpinia eriostachys* crece abundantemente como especie nativa en el oeste de México, y como árbol ornamental y forraje es comúnmente utilizado. Las semillas de *C. eriostachys* no se han aprovechado debido a su toxicidad reportada para animales y humano.³³ Sin embargo, la planta podría ser empleado, como materia prima para la producción de biodiesel. Los catalizadores homogéneos se usan con frecuencia para la transesterificación de aceites vegetales; KOH es un apropiado ejemplo de este tipo de catalizadores, debido al buen rendimiento de la reacción de transesterificación y a su porcentaje de FAME. Sin embargo, la separación y purificación del producto de reacción son difíciles y costoso.³⁴ Por el contrario, un catalizador heterogéneo podría ser fácilmente separado de la mezcla de reacción.³⁵ Varios catalizadores básicos heterogéneos se han empleado para la producción de biodiesel, incluidos los óxidos de calcio y magnesio,³⁶ circonatos de sodio y titanatos³⁷ e hidrotalcitas.³⁸ Las hidrotalcitas de

zinc y aluminio en las reacciones de transesterificación, han demostrado tener buena tolerancia al glicerol, ácidos grasos libres y triglicéridos, y se consideran catalizadores relativamente buenos para una producción sostenible y ecológica de biodiesel.³⁹⁻⁴² Además, la activación de estos materiales en la deshidratación las temperaturas (200 °C) promoverán una buena catálisis y estabilidad de transesterificación.⁴¹

Es por estas razones que se pretende realizar un estudio químico en especies vegetales que crecen en el Estado de Michoacán para la búsqueda de sustancias novedosas desde el punto de vista químico y que pudiesen tener aplicación. El aporte en el conocimiento de los componentes químicos de las especies estudiadas permitirá también contribuir con la caracterización quimiotaxonómica del género. Continuando con nuestra investigación sobre la química del género²² y la producción de biodiesel.⁴³

En el Estado de Michoacán dentro de la Selva Baja Caducifolia se ubica el Municipio de la Huacana en las coordenadas 18°58' de latitud norte y 101°48' de longitud oeste, a una altura de 480 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Nuevo Urecho y Ario de Rosales, al este con Turicato, al sur con Churumuco y Arteaga, al oeste con Múgica y Apatzingán; su superficie es de 1,952.60 Km² y representa el 3.3% del total del Estado; su clima es tropical con lluvias en verano, en esta Región se ubican las especies *C. eriostachys*, y *C. sclerocarpa*, las cuales no cuentan con antecedentes de estudios químicos y/o biológicos, y continuar con el estudio de *C. platyloba*.

JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia encontrada en el género *Caesalpinia* surge el interés de realizar un estudio enfocado en el aislamiento e identificación de sustancias de sustancias de utilidad, así como enriquecer el conocimiento quimiotaxonómico de este género vegetal.

Las especies del género *Caesalpinia*: *C. sclerocarpa* *C. eriostachys* y no cuentan a la fecha con ningún estudio fitoquímico y farmacológico, mientras que de la especie *C. platyloba* se ha iniciado su estudio fitoquímico, debido a que no se ha llevado a cabo el estudio químico completo de las parte aéreas de esta especie.

OBJETIVO

Llevar a cabo el estudio químico de especies del género *Caesalpinia* que crecen en el Estado de Michoacán y evaluar su aplicación en la producción de biocombustibles.

Objetivos específicos

- Colectar las especies *C. sclerocarpa*, *C. eriostachys* y *C. platyloba*.
- Preparar los extractos vegetales con distintos disolventes.
- Obtener los metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas y caracterizarlos por medio de métodos físicos, químicos y espectroscópicos.
- Evaluar la aplicación en biocombustibles de los metabolitos mayoritarios obtenidos en las especies de *Caesalpinia*.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las plantas *C. sclerocarpa*, *C. eriostachys* y *C. platyloba* se separaron en sus partes flores, vainas, semillas, hojas y tallos, secadas a la sombra. Para la obtención de los extractos por maceración secuenciada con hexanos, CH₂Cl₂ y metanol. Los rendimientos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *C. eriostachys*, *C. sclerocarpa* y *C. platyloba*.

Especie	Órgano	Materia vegetal*	Extracto Hexánico*	Extracto CH ₂ Cl ₂ *	Extracto MeOH*
<i>C. eriostachys</i>	Flor	400	6.3	4.5	47.7
	Vaina	800	1.7	0.7	45.5
	Semilla	655	30	90	168
	Hoja	250	4.0	3.9	9.7
	Tallo	220	0.5	1.7	16.4
<i>C. sclerocarpa</i>	Hoja	200	12.0	4.1	21.9
	Tallo	250	1.4	1.1	14.0
	Semilla	70	2.25	0.56	1.7
<i>C. platyloba</i>	Hojas	1000	19.5	12.5	21.9

*Peso en gramos

Se determinaron los espectros de RMN de ¹H para conocer la abundancia y naturaleza de los componentes de los extractos obtenidos. En el espectro de RMN de ¹H (figura 5) del extracto hexánico de hojas de *C. sclerocarpa* se observan señales características de ácidos grasos insaturados como componentes mayoritarios; en 5.32 ppm se observa una señal múltiple típica de protones vinílicos, en 1.27 ppm se observa una señal simple ancha característica de los metilenos de una cadena alifática. En 0.82 ppm se muestra una señal triple

perteneciente al metilo terminal de la cadena de ácidos grasos. Los espectros que tienen ácidos grasos insaturados libres son: de *C. eriostachys* los extractos hexánicos de flor, hoja, tallos; CH₂Cl₂ de flor, hoja. Y de *C. sclerocarpa* los extractos hexánico de hoja, CH₂Cl₂ de hoja y tallo.

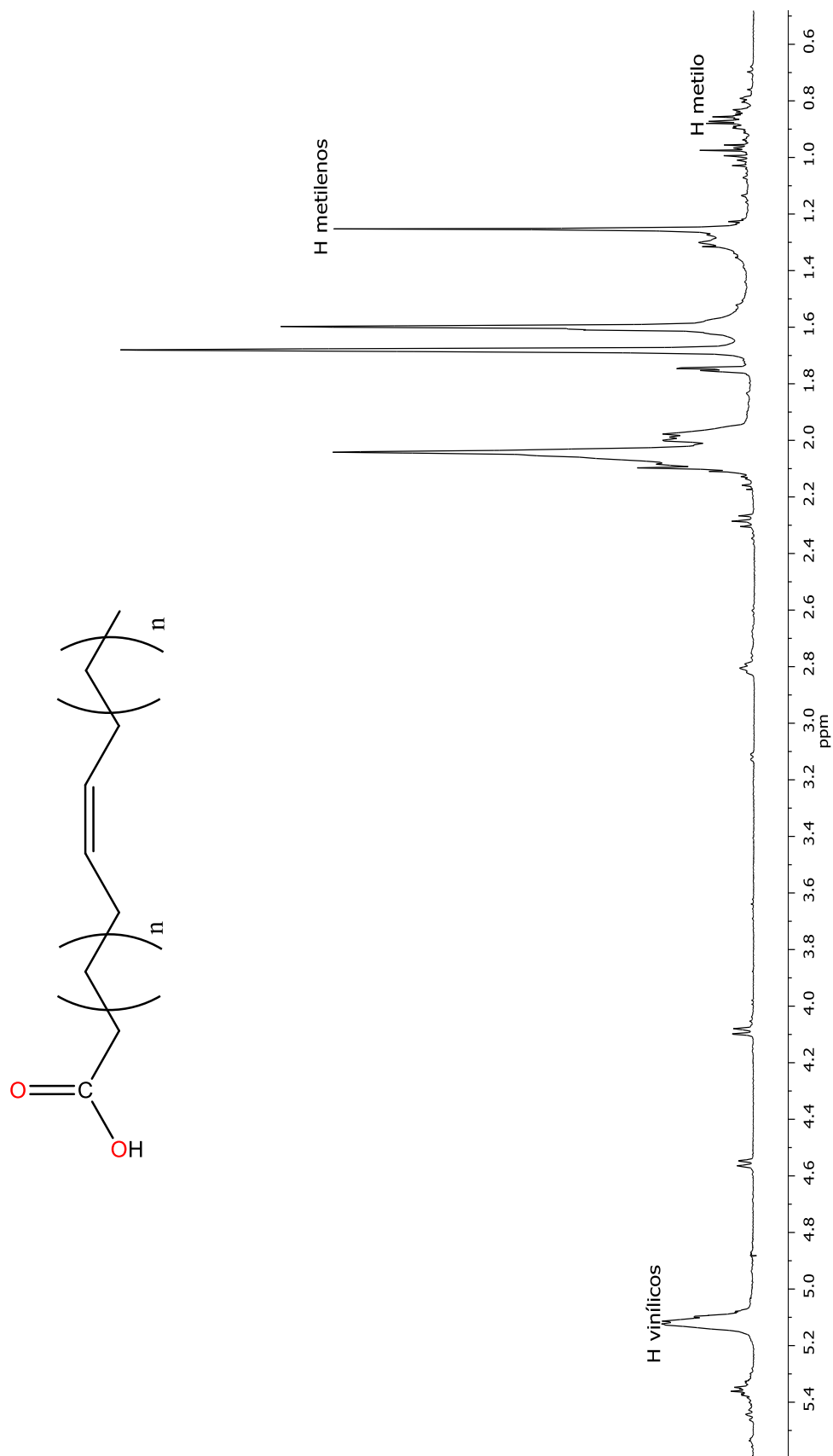


Figura 5. Espectro de RMN de ^1H del extracto hexánico de hoja de *C. sclerocarpa*.

Los extractos hexánicos como CH₂Cl₂ de vaina y semilla de *C. eriostachys*, así como los hexánicos y CH₂Cl₂ de semilla de *C. sclerocarpa* mostraron como componentes mayoritarios, una mezcla de triglicéridos. Por ejemplo en la figura 6 se muestra el espectro de RMN de ¹H del extracto hexánico de semillas de *C. eriostachys*, se observó en 5.36 ppm una señal múltiple perteneciente a hidrógenos vinílicos, en 5.27 ppm una señal múltiple perteneciente al metino H-2' del glicerol, en 4.30 ppm se observó una señal doble de dobles con $J = 12.0$, 4.4 Hz y en 4.15 ppm otra señal dobles de dobles con $J = 12.0$, 6.0 Hz características de los metilenos del glicerol (H-1', H-3'); en 2.79 ppm se pudo apreciar una señal triple con $J = 6.0$ Hz correspondiente al metileno alílico (H-11) y en 2.31 ppm se apreció una señal múltiple típica de hidrógenos α al grupo carbonilo. En 2.05 ppm se observó una señal múltiple que corresponde a los hidrógenos alílicos H-8 y H-14, en 1.61 ppm una señal múltiple perteneciente a H-3 β al carbonilo; en 1.25 ppm se apreció una señal simple ancha característica de los metilenos de la cadena de ácido graso, finalmente, en 0.89 ppm una señal triple típica del metilo terminal de la cadena.

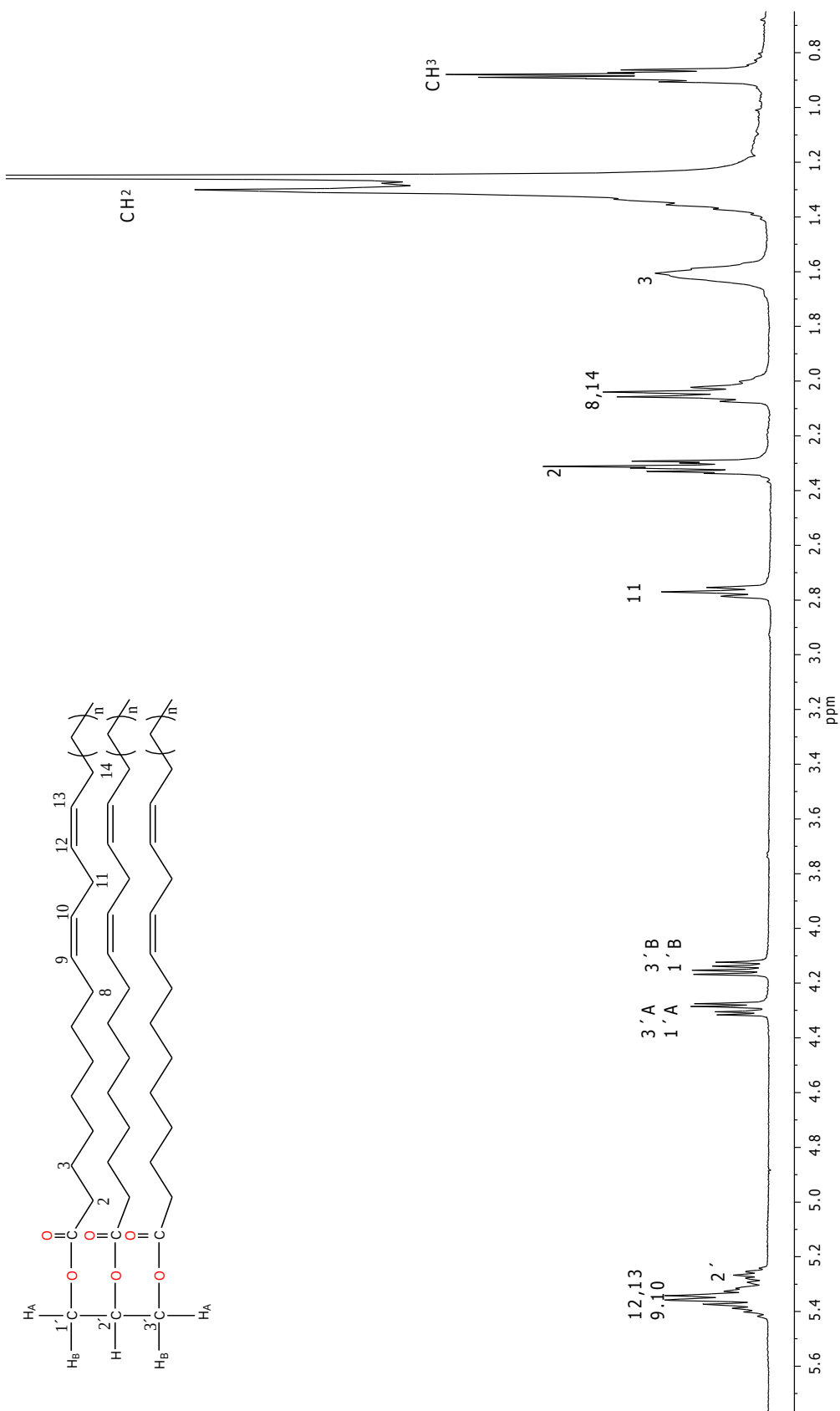


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H del aceite de las semillas de *C. eriostachys*.

Un lote de 14 g del extracto metanólico de tallo de *C. eriostachys* se llevó a separación por columna cromatográfica, utilizando hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluyentes. Del eluato hexanos-AcOEt (7:3) de las fracciones 39-42. Se determinó su espectro de RMN de ^1H (figura 7) donde se observó en 5.35 ppm una señal de doble ancha ($J= 5.1$ Hz) correspondiente al H-6, en 5.15-5.02 ppm se encuentran las señales de los hidrógenos vinílicos H-23 y H-22, respectivamente. En 3.53 ppm se observó una señal múltiple correspondiente al hidrógeno base de alcohol. Entre 1.02-0.68 ppm se encuentran 6 señales simples de los metilos CH_3 -18, CH_3 -19, CH_3 -21, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -29. Al analizar el número de señales simples, correspondientes a los grupos metilo, y a la proporción de los valores de la integral de la señal del H-6 con respecto al de las señales de los H-22 y H-23, se pudo deducir que esta muestra corresponde a una mezcla de β -sitosterol (**10**) y estigmasterol (**11**).

Estos compuestos también se aislaron de extracto MeOH de semillas de *C. eriostachys*.

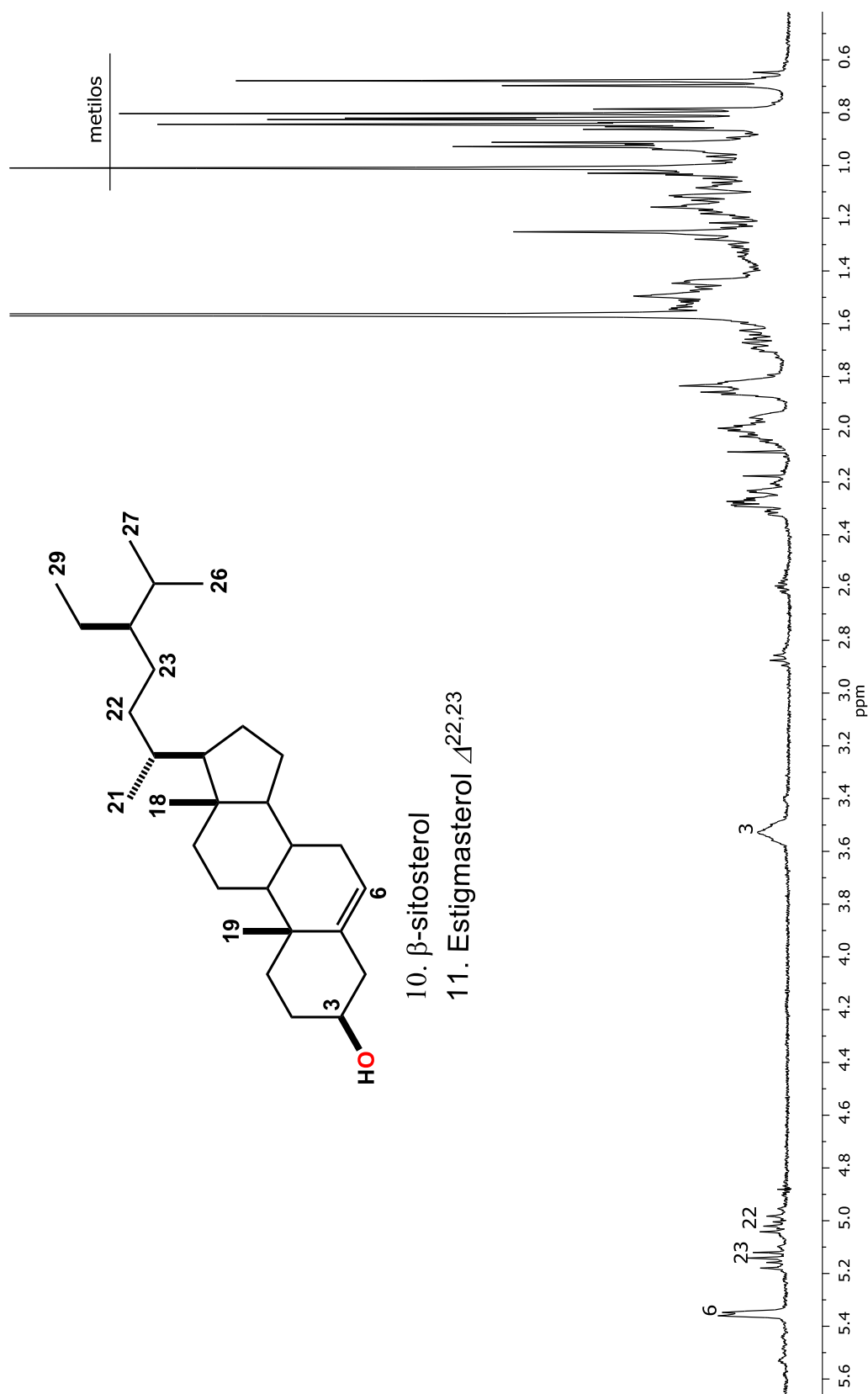


Figura 7. Espectro de RMN ^1H de los esteroides β -sitosterol (**10**) y estigmasterol (**11**).

Continuando con el análisis del extracto del extracto MeOH de tallos de *C. eriostachys* el eluato de las fracciones eluidas en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1) se obtuvieron 200 mg de un polvo blanco. En su espectro de RMN de ^1H se muestran señales de protones vinílicos en 4.70 y 4.56 ppm asignadas a H-29a y H-29b, respectivamente, en 3.18 ppm se observó una señal para el hidrógeno base de alcohol correspondiente a H-3, en 2.38 ppm se observó la señal múltiple del hidrógeno alílico H-19, en 1.69 ppm se apreció una señal simple correspondiente a los protones del metilo alílico CH₃-30. Adicionalmente, en la región de 1.02 a 0.76 ppm se observan 6 señales simples correspondientes a los grupos metilo CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-27 y CH₃-28 de la molécula. Estos datos son concordantes con los reportados en la literatura para el lupeol (figura 8).⁴⁴

Este compuesto se obtuvo también del extracto hexánico de tallos de *C. scleocarpa*.

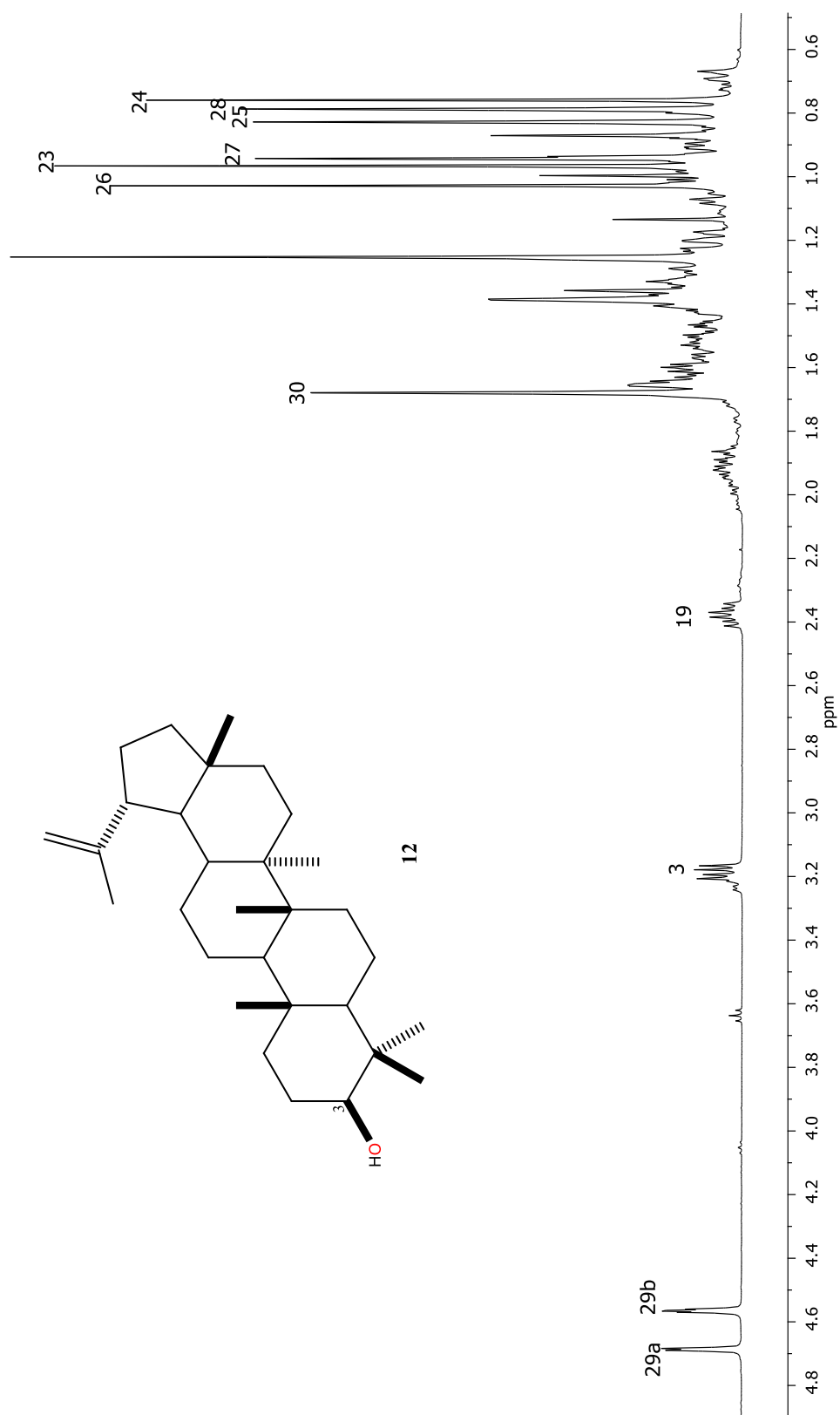


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H del Lupeol (12).

Un lote de 500 mg de extracto de CH₂Cl₂ de tallos de *C. eriostachys* se sometieron a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad; de las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (4:1) se logró aislar un sólido blanco con punto de fusión de 63-65 °C. En su espectro de RMN de ¹H se observa en 7.75 ppm una señal doble con $J = 15.9$ Hz, característica de un protón vinílico con acoplamiento *trans* correspondiente a H-8, este acoplamiento también se observó para la señal doble correspondiente al protón vinílico ubicado en 6.34 ppm H-7, se observaron tres señales de protones aromáticos lo que indicó la presencia de un sistema trisustituido, en 7.14 ppm se observó una señal doble de dobles con $J = 8.2, 1.9$ Hz con a un acoplamiento *orto*, *meta* perteneciente a H-5; en 7.09 ppm se observó una señal doble con acoplamiento *meta* ($J = 1.9$ Hz) correspondiente a H-3, así como la señal doble en 6.97 ppm con $J = 8.2$ Hz típica de un acoplamiento *orto* asignada a H-6. En 4.19 ppm se apreció una señal triple con acoplamiento vecinal ($J = 6.9$ Hz) que integra para dos protones, característica de un metileno base de éster correspondiente a H-1'; en 3.98 ppm se observó una señal simple que integra para tres protones característica de un grupo metoxilo; en 1.25 ppm apareció una señal simple e intensa típica de grupos metilenos que componen una cadena alifática; finalmente, en 0.88 ppm se apreció una señal triple que integra para tres protones, perteneciente al metilo terminal de la cadena alquílica. Los sistemas de señales en la región de los aromáticos, vinílicos y metoxilo indicaron la presencia del grupo ferulato, mientras que la señales en 4.19 y 1.25 ppm sugirieron que este derivado del ácido ferúlico se encuentra esterificado con una cadena alquílica. El espectro de infrarrojo mostró en 1709 cm⁻¹ una banda característica de un carbonilo de éster α,β -insaturado (Figura 9).

Se determinó el tamaño la cadena del alquilferulato por espectrometría de masa, el cual presenta un ion molecular [M]⁺ en m/z 390 consistente con la fórmula molecular C₂₄H₃₈O₄. Correspondiente al ferulato de miristirilo.

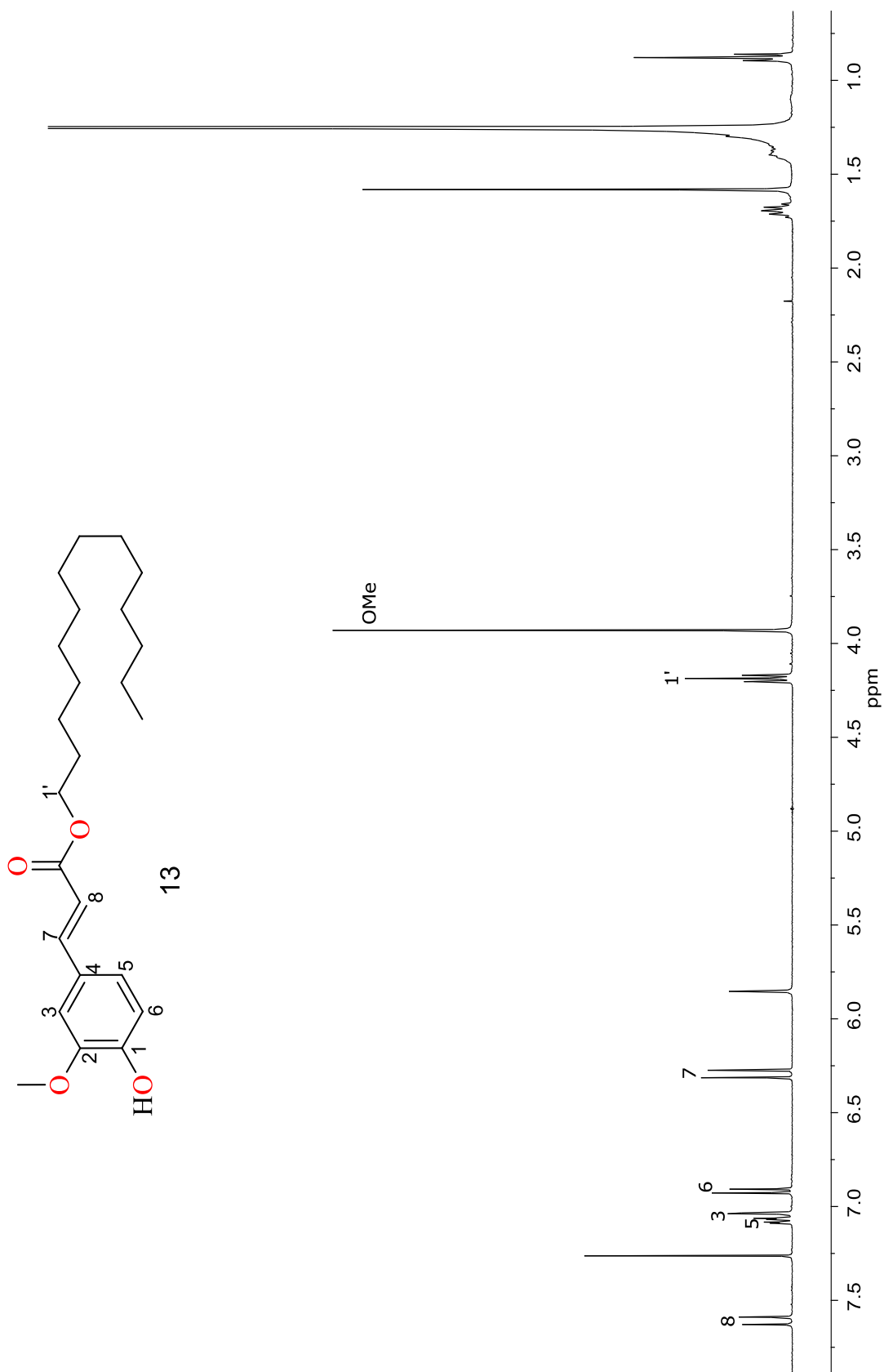
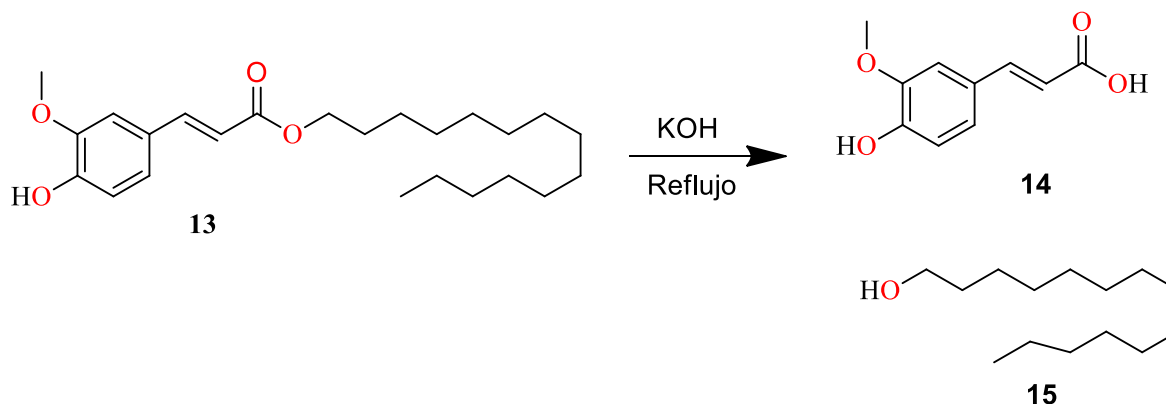


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H del ferulato de miristilo (**13**).

Adicionalmente se realizó la hidrólisis básica del ferulato de miristilo **13** (esquema 2) para comprobar la esterificación de ácido ferúlico. El crudo de reacción fue sometido a una separación cromatográfica en columna para obtener al ácido ferúlico (**14**) y el alcohol mirístico (**15**).



Esquema 2. Hidrólisis básica del ferulato de miristirilo **13**.

En el espectro de RMN de ^1H de la reacción de hidrólisis (Figura 10 trazo superior) se observó el desplazamiento de la señal triple que aparecía en 4.19 ppm a 3.56 ppm, lo que confirmó la presencia del éster de ácido ferúlico y que este se hidrolizó para rendir ácido ferúlico (**14**) y alcohol mirístico (**15**).

Del análisis de los extractos hexánicos y CH_2Cl_2 de las semillas de *C. eriostachys* y *C. sclerocarpa* se puede observar que son ricos en triglicéridos (los cuales se pueden utilizar potencialmente para la obtención de biodiesel), y sus extractos hexánicos y CH_2Cl_2 de flor, vaina, hoja y tallo, presentan ácidos grasos principalmente. De *C. eriostachys* del extracto CH_2Cl_2 se aisló al ferulato de miristilo; así como de los extractos MeOH de semillas y de tallos la mezcla de los estreroles β -sitosterol y estigmasterol, del MeOH de semillas también lupeol y de *C. sclerocarpa* del extracto hexánico de tallos al lupeol.

Debido a que del estudio químico de las especies *C. eriostachys* y *C. sclerocarpa* sus extractos rindieron mayoritariamente ácidos grasos, se decidió continuar con el análisis de *C. platyloba* que es una especie que se ha estado estudiando en nuestro grupo de trabajo y la cual sigue presentando características notables por RMN de señales interesantes. Se decidió iniciar el estudio químico de los extractos de CH_2Cl_2 de vainas y hojas para la obtención de metabolitos detectados en el espectro de RMN de hidrógeno.

Un lote de 14 g del extracto CH_2Cl_2 de vainas de *C. platyloba* impregnado en gel de sílice se llevó a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluyentes. Una porción de 2 g de las fracciones eluídas en la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) fueron recromatografiadas. En la fracción 9-12 de hexanos-AcOEt (9:1) se obtuvieron 68 mg de cristales blancos, con punto de fusión de 110-113 °C. Su espectro de RMN de ^1H (figura 11) mostró una señal simple correspondiente a un protón vinílico en 5.71 ppm asignada a H-15; 5.51 ppm se observó una señal simple ancha correspondiente al protón base de acetilo H-6. En 2.45 ppm apareció una señal doble de dobles con $J = 13.2$ y 3.2 Hz asignada a H-11a. En 2.04 ppm se observó una señal simple que integra para tres protones características del metilo de acetilo. En 1.16 ppm se apreció una señal doble con $J = 7.2$ Hz correspondiente al metilo secundario. CH_3 -17. En 1.10, 1.00 y 0.98 ppm se observaron tres señales simples que integran para tres hidrógenos cada una, correspondientes a metilos terciarios CH_3 -18, CH_3 -19 y CH_3 -20, respectivamente.

En el espectro de RMN de ^{13}C (figura 12) se observaron 21 señales. Se apreciaron dos señales de carbonilo, en 170.9 ppm para el carbonilo de lactona y en 170.6 para el carbonilo de acetilo. En 172.9 y 113.4 ppm se ubicaron señales para carbonos de doble enlace asignadas a C-13 y C-15, respectivamente. En 105.9 ppm la señal para el carbono base de hidroxilo asignada a C-12 y en 69.3 ppm se observó la señal para el carbono C-6 base de acetato. En 55.1 ppm se observó la señal característica de carbono cabeza de puente C-5. Entre 45.0 y 12.7 ppm se observaron las 13 señales correspondientes al resto de la estructura. Este grupo de señales correspondió al compuesto 6 β -acetoxicassa-12-hidroxi-13-en- γ -lactona. El cual ya ha sido reportado en la literatura por Yadav y colaboradores⁴⁵ quienes reportaron los desplazamientos de RMN en Piridina- d_5 .

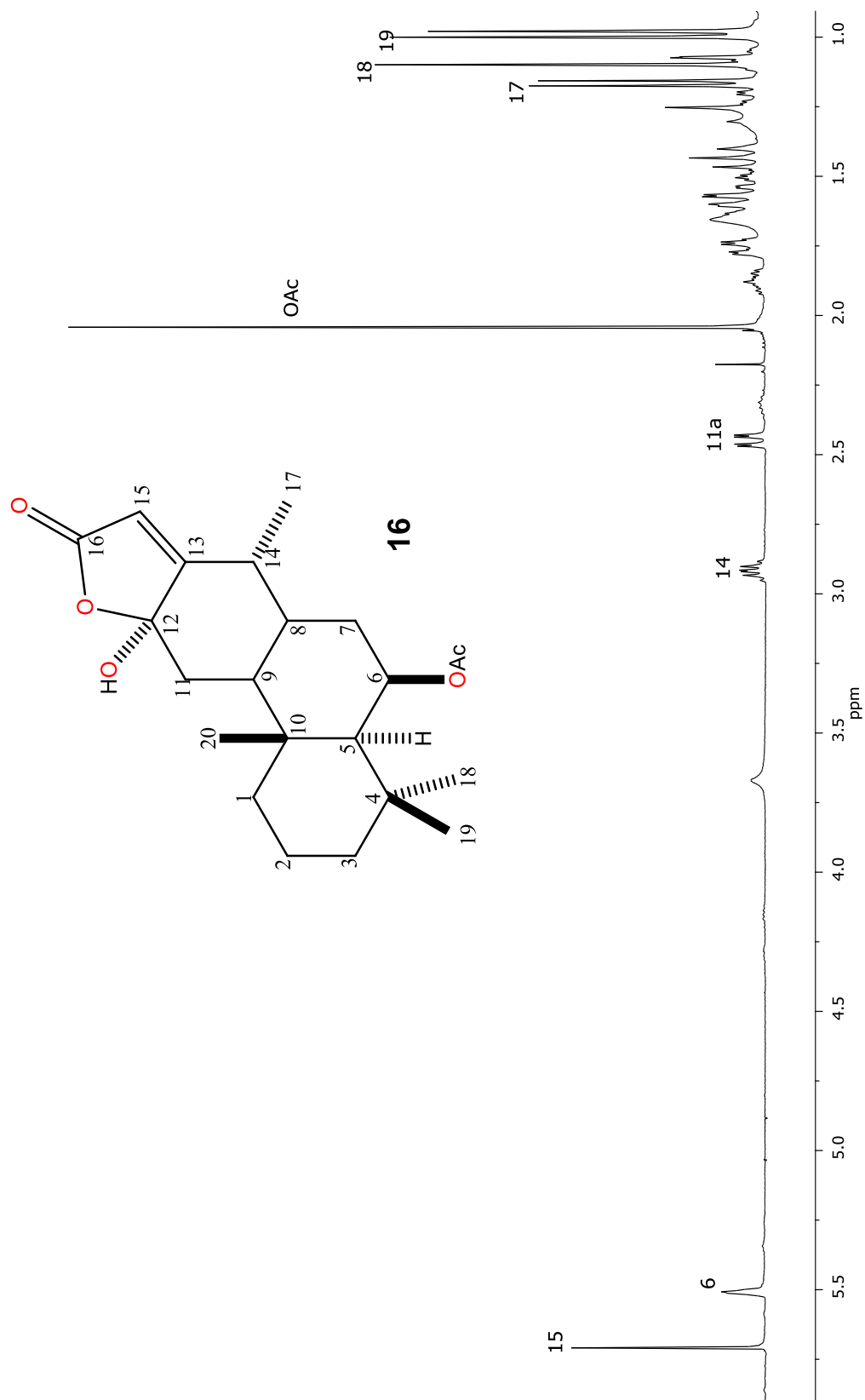


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H de la lactona **16**.

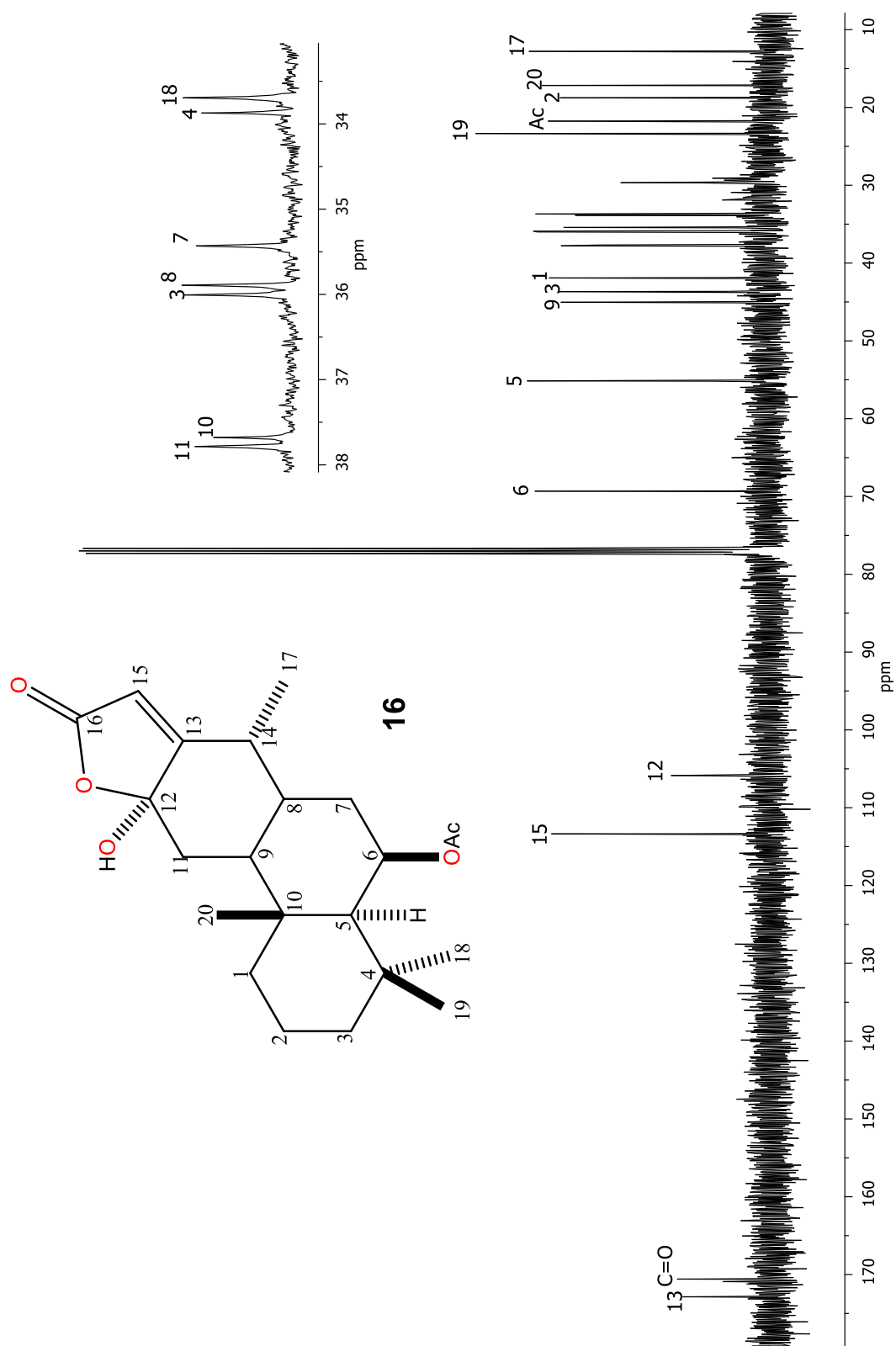
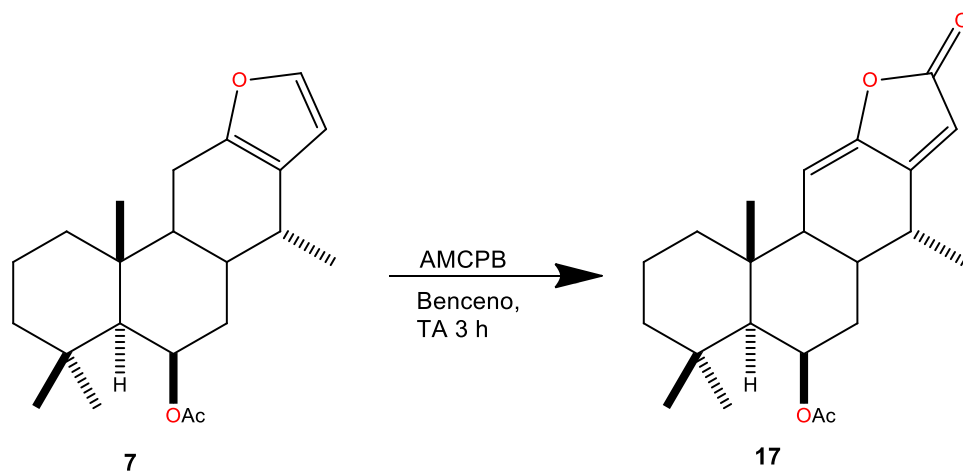


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C de la lactona **16**.

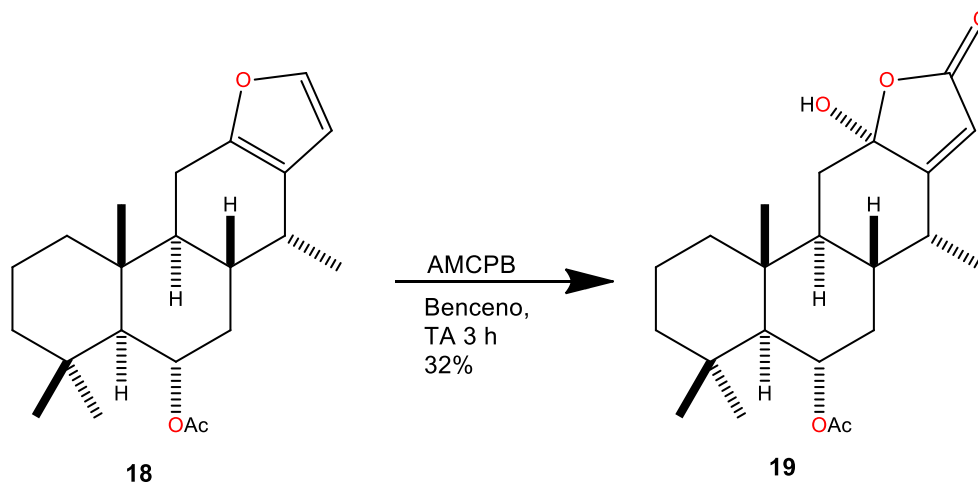
Continuando con el estudio químico de *C. platyloba*, un lote de 14 gramos de extracto de CH₂Cl₂ de vainas de *C. platyloba* se llevó a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt como eluyentes. Se tomó un lote de 1.8 g de las fracciones eluídas en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1) para ser purificado por cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyentes hexanos y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad. En la fracción 6-7 de hexanos-AcOEt (9:1) se obtuvieron 22 mg de cristales blancos, con punto de fusión de 227-230 °C. Su espectro de RMN de ¹H (figura 14) muestra señales de protones vinílicos en 5.84 y en 5.78 ppm asignadas a H-11 y H-15, respectivamente. En 5.53 ppm se observó una señal simple ancha correspondiente al protón base de acetilo H-6. En 2.04 ppm se observó una señal simple que integra para tres protones características del metilo de acetilo. En 1.16, 0.99 y 0.97 ppm se observaron tres señales simples que integran para tres hidrógenos cada una, correspondientes a metilos terciarios Me-20, Me-19 y Me-18, respectivamente. En 1.05 ppm se apreció una señal doble con *J* = 7 Hz correspondiente al metilo secundario Me-17.

En el espectro de RMN de ¹³C (figura 15) se encontraron 21 señales. Se observa dos señales de carbonilo, en 170.3 ppm para el carbonilo de acetilo y en 170.1 ppm apareció la señal asignada al carbonilo de lactona. En 161.2, 150.1 ppm, 111.0, y 110.2 ppm se ubican señales para carbonos de doble enlace las cuales fueron asignadas a C-13, C-12, C-11 y C-15, respectivamente. En 69.1 ppm se observó la señal del carbono C-6 base de acetato. En 55.1 ppm se observó una señal característica al carbono cabeza de puente C-5. Entre 56.6 y 14.1 ppm se observaron 12 señales correspondientes al resto de la estructura. Los datos espectroscópicos obtenidos fueron iguales a los descritos para la lactona **17**, recientemente obtenida como un producto de oxidación del 6 β -acetoxivoucapano (**7**) por nuestro grupo de trabajo⁴⁶ (esquema 3). Una búsqueda bibliográfica reveló que este compuesto no ha sido reportado en otras especies, por lo que es el primer reporte de **17** como producto natural. Este compuesto también fue encontrado en las hojas.



Esquema 3. Oxidación del 6 β -acetoxivoucapano (**7**).

En la literatura ya han sido reportados compuestos con esqueleto tipo cassano que se obtienen por oxidación y de forma natural Yosuke y colaboradores aislaron del extracto metanólico de las semillas de *Bowdichia nitida* al cassano **18** así como a la latona **19**. Cuando el compuesto **18** fue tratado con AMCPB en benceno reportaron como único producto la lactona **19**⁴⁷ (esquema 4).



Esquema 4. Oxidación del cassano **18**, obtenido de *B. nítida*.

Adicionalmente del compuesto **17** se lograron obtener cristales adecuados para su difracción de RX (figura 13) con lo que se confirmó la estructura propuesta.

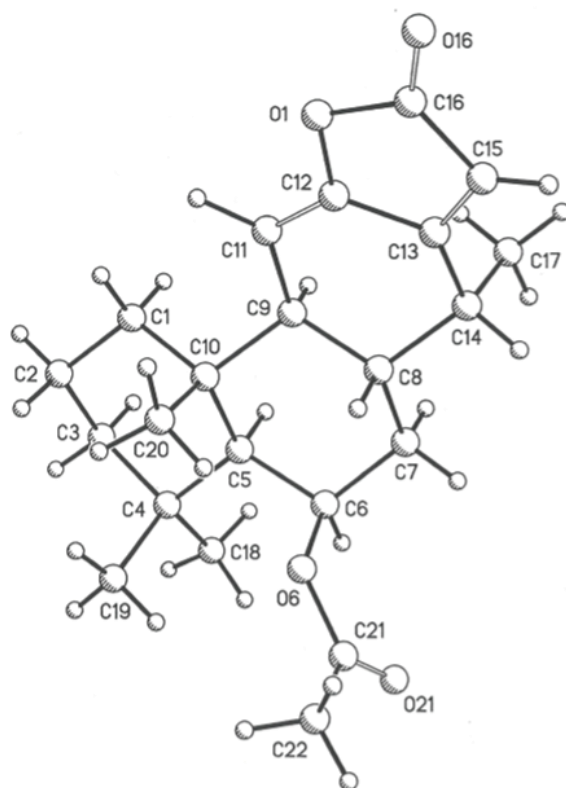


Figura 13. 6 β -acetoxicassa-11,13(15)-dien-16,12- ólida.

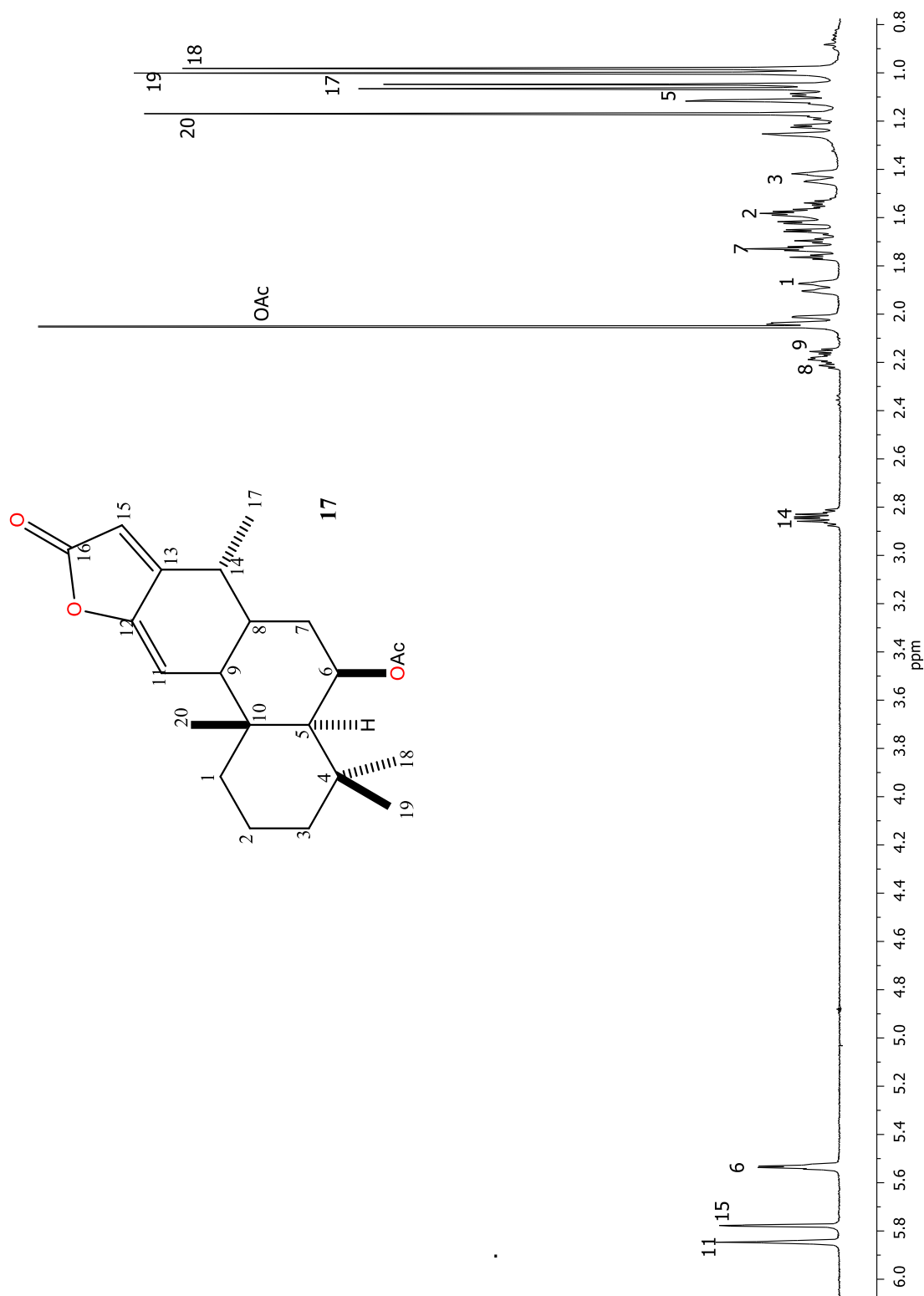


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H de la lactona **17**.

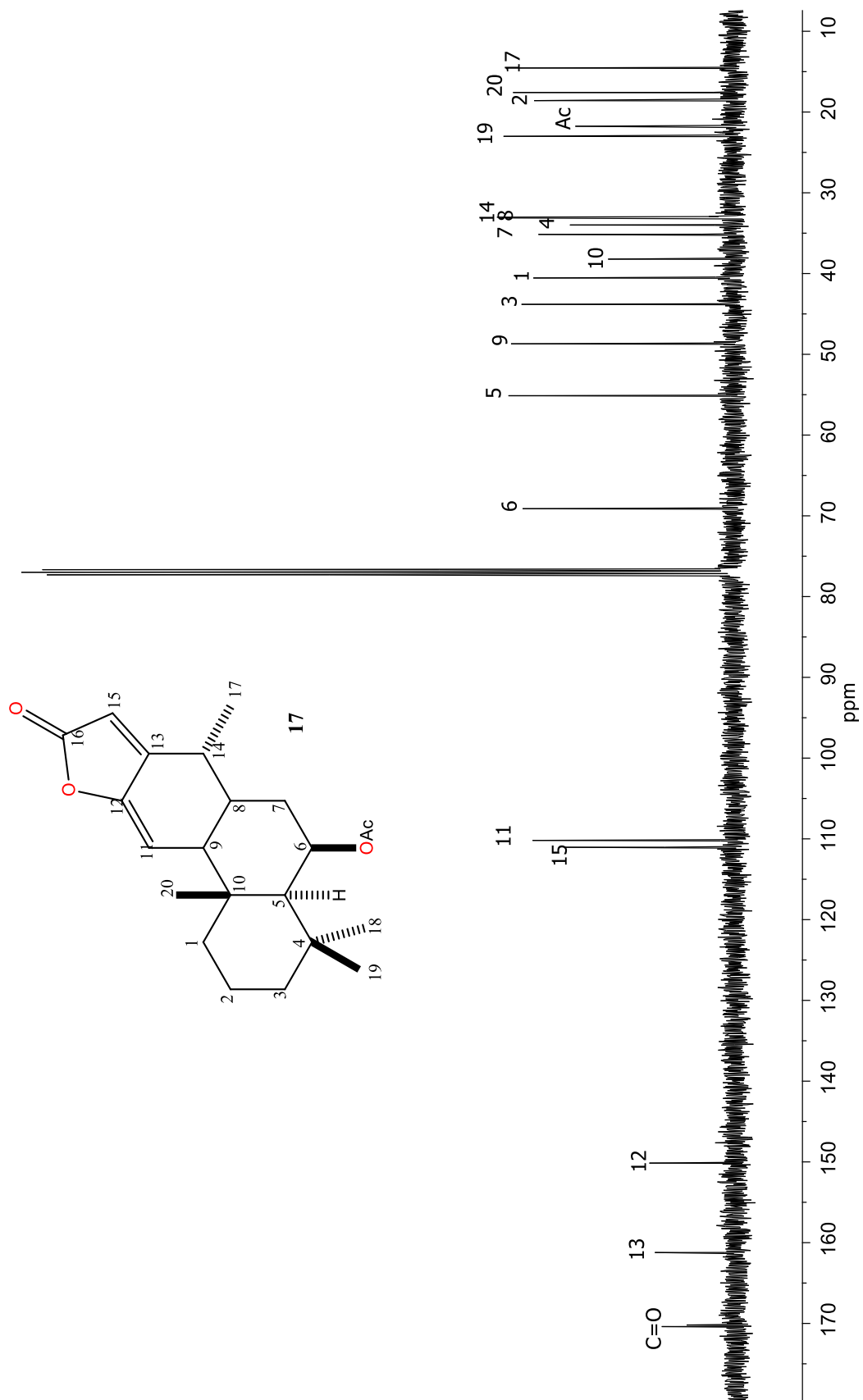


Figura 15. Espectro de RMN de ¹³C de la lactona **17**.

Un lote de 12 gramos del extracto CH_2Cl_2 de hojas de *C. platyloba* se llevó a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad. El eluato hexano-AcOEt (1:1) de la columna cromatográfica de las fracciones 6-11 se sometió a separación cromatográfica en capa fina (CCF) impregnada con nitrato de plata al 20% y AcOEt como eluyente. De este proceso se obtuvieron cristales de un compuesto con punto de fusión de 187-189 °C. En su espectro de RMN de ^1H (figura 16) en 6.10 ppm se apreció una señal doble de dobles con $J_{trans} = 17.4$ y $J_{cis} = 10.4$ Hz señal característica de un protón vinílico H-15; en 5.59 ppm una señal simple ancha perteneciente a protón base de acetilo H-6; en 5.28 ppm se observó una señal doble de dobles con $J_{trans}=17.4$ y $J_{gem}=1.2$ Hz correspondiente a H-16', la señal de H-16 se observó en 5.22 ppm como una señal doble de dobles con $J_{cis}=10.4$ y $J_{gem}=1.2$ Hz, adicionalmente, en la región de los protones vinílicos en 5.25 y 4.83 ppm se observaron dos señales simples anchas correspondientes a protones de un metileno vinílico H-17 y H-17', lo que sugirió la presencia de un doble enlace C-14=C-17; en 3.16 ppm apareció una señal múltiple característica de protones base de hidroxilo, 2.06 ppm una señal simple perteneciente a un metilo de acetilo. En 1.16, 1.07 y 0.97 ppm se distinguen tres señales simples correspondientes a los metilos 18, 19 y 20, respectivamente.

Haciendo una comparación del espectro de RMN de ^1H del diterpeno **20** con los dienos **8** y **9**, se observó la aparición de un nuevo doble enlace desplazado a campo bajo lo que nos sugiere la presencia de un grupo etileno terminal también se observa la desaparición de la señal del metilo 17 y en su lugar se observan señales de protones vinílicos, lo que nos sugiere que el nuevo doble enlace se encuentra entre C-14 y C-17, adicionalmente se observa una señal simple característica de un hidrógeno base de hidroxilo.

En su espectro de RMN de ^{13}C (figura 17)se observaron 21 señales, lo que nos indica la presencia de un diterpeno funcionalizado; en 170.4 ppm se observó la señal de un carbonilo de acetilo; se observaron señales típicas de carbonos vinílicos en 154.8, 142.5, 115.8 y 105.3 ppm, las cuales fueron asignadas a C-14, CH-15, CH-16 y CH_2 -17, respectivamente; en 78.8 y 75.4 ppm se apreciaron señales de carbonos base de hidroxilo asignadas a C-3 y C-13, respectivamente, el C-3 corresponde a un alcohol secundario mientras el C-13 corresponde a un alcohol terciario, esto se confirmó con experimento DEPT y HETCOR; en 69.3 ppm se observó la señal para el carbono base de acetilo CH-6, en 54.26 ppm la señal típica del carbono 5; el resto de las señales se encuentran entre 56.2 y 15.8 ppm.

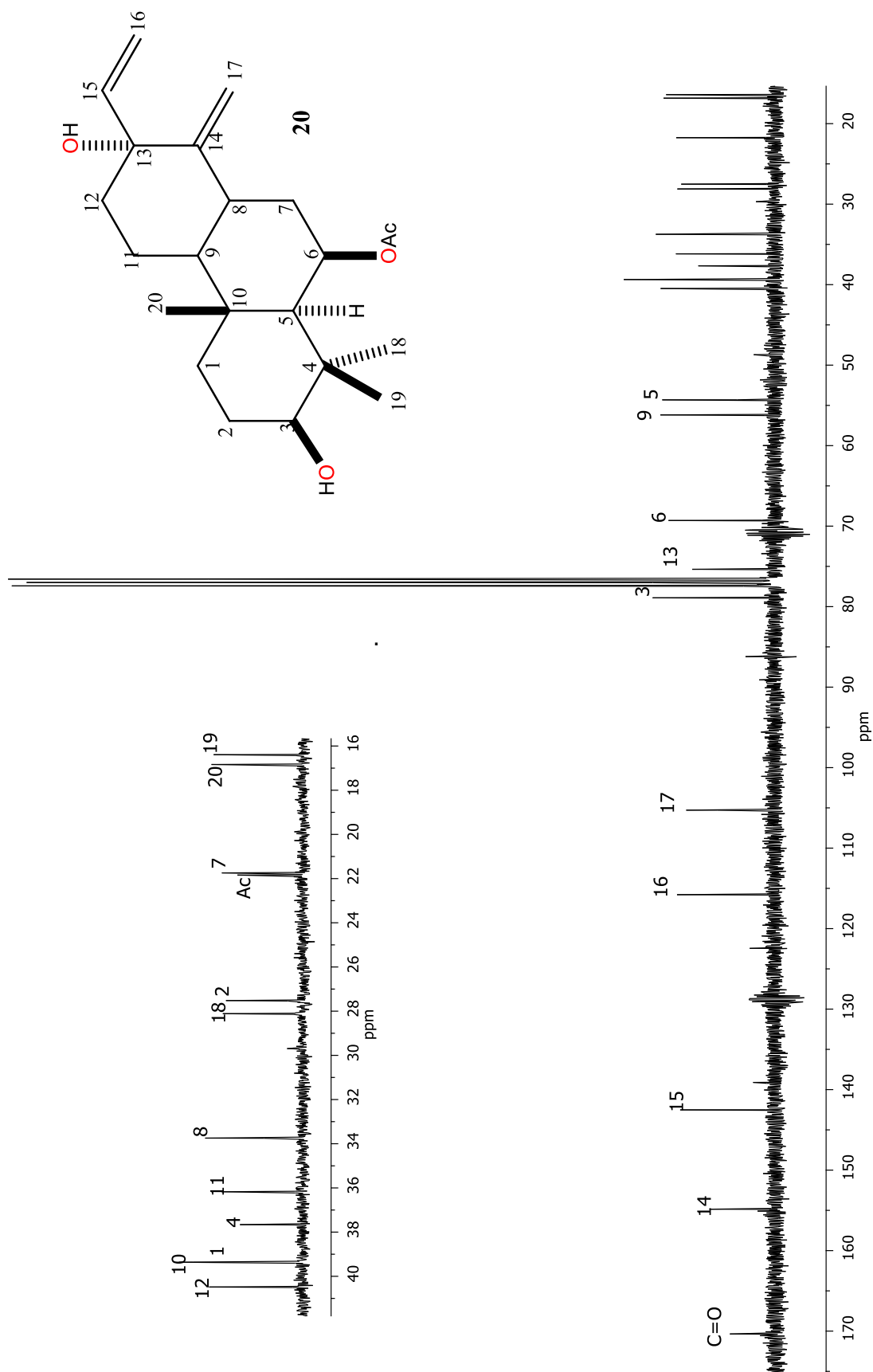


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C de cassadio 20.

En el espectro COSY se observó la correlación entre las señales dobles en 6.10 y 5.28 ppm, lo que confirma el doble enlace H-15/H-16. La señal que se ubicó en 1.52 ppm correspondiente al H-2 correlaciona con la señal múltiple en 3.16 ppm por lo que fue asignada al H-3 base de OH; además se logró distinguir el acoplamiento de la señal simple ancha base de éster en la posición 6 con las señales múltiples es 2.05 y 1.50 ppm correspondientes a los hidrógenos H-7 y H-7', H-6 también se acopló con la señal múltiple en 0.95 ppm correspondiente a H-5, lo que indicó que el éster se encuentra en la posición 6 igual que en los cassanos **7-9** y en las lactonas **16** y **17**.

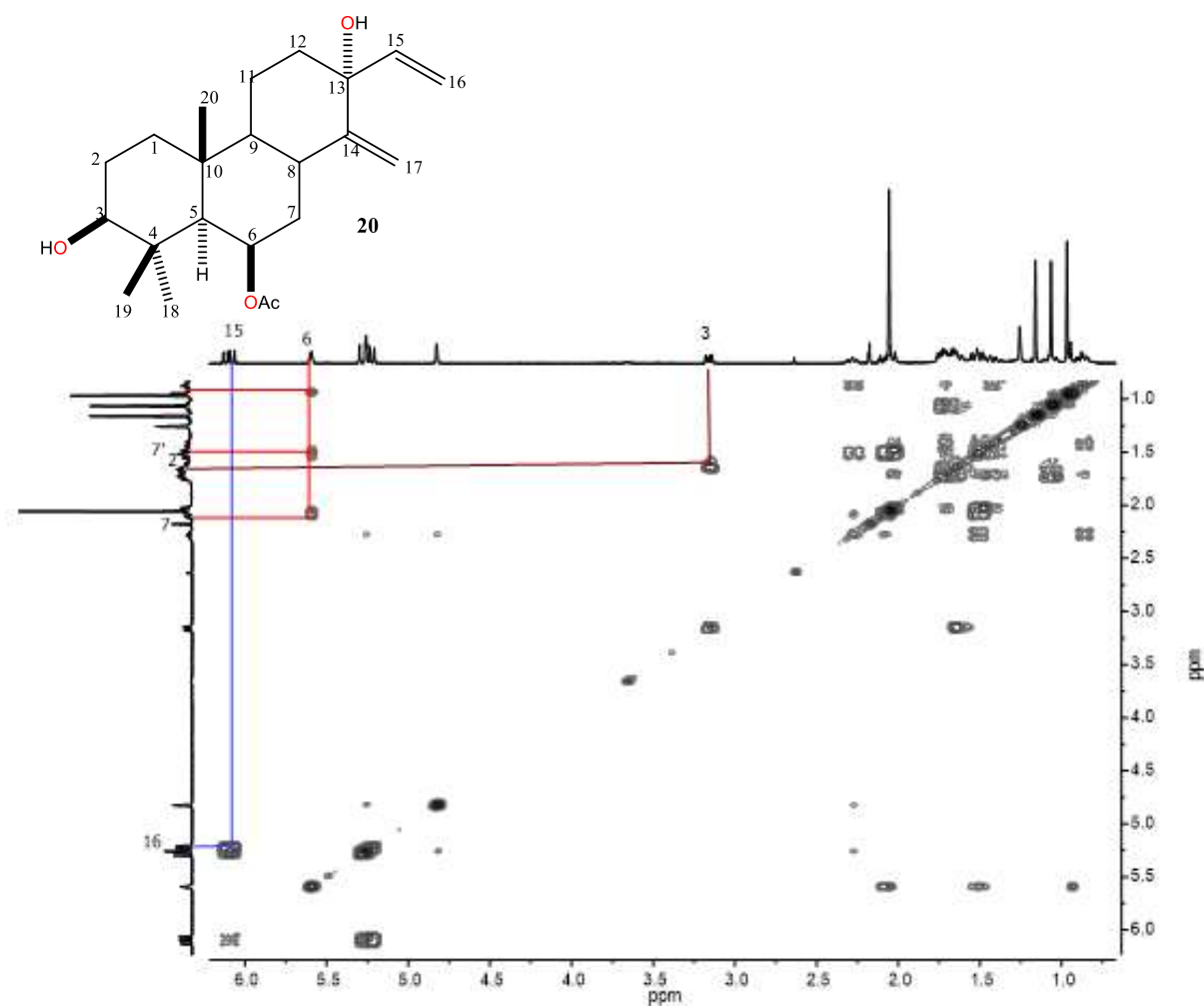


Figura 18. Espectro COSY del cassadieno **20**.

El espectro HETCOR permitió corroborar la asignación para el C-5 ubicado en 54.3 ppm que correlaciona con H-5 ubicado en 0.91, y esto nos permite diferenciar a C-5 de C-9. A C-9 fue asignada la señal que se ubica en 56.1 ppm el cual correlaciona con la señal característica de H-9 que apareció como una señal triple de dobles localizado en 0.85 ppm; también se observó la correlación de H-3 localizado en 3.13 ppm con la señal asignada para C-3 en 78.8 ppm; además fue posible corroborar la ubicación de la señal de los hidrógenos H-17 y H-17' ya que se observó la correlación que tienen con la señal asignada a C-17 en 105.2 ppm; se observó también la correlación entre el C-16 en 115.8 ppm con los hidrógenos vinílicos H-16 y H-16'; así como la correlación entre la señal de los hidrógeno H-15 ubicada en 6.10 ppm con la señal asignada para C-15 en 142.4 ppm; además se apreció también la correlación de la señal simple en 2.07 ppm en la escala de hidrógeno característica de del metilo de acetato con la señal en 21.9 ppm en la escala de carbono.

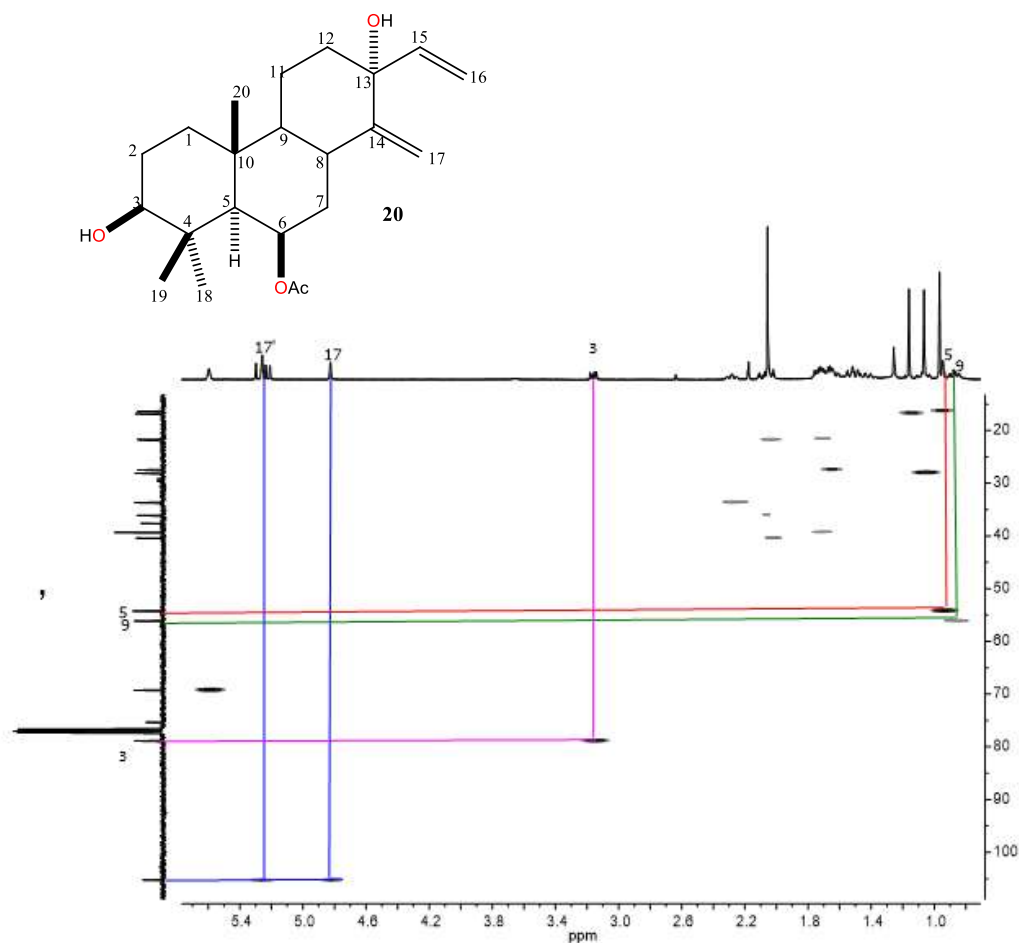


Figura 19. Espectro HETCOR del cassadieno 20.

En el experimento HMBC (figura 20) nos ayudó a asignar la posición del hidroxilo secundario en el C-3 ya que se observó la correlación de la señal en 3.15 ppm característica de hidrógeno base de hidroxilo con las señales en 16.3 y 28.0 ppm asignadas para los metilos CH₃-19 y CH₃-18, respectivamente; este experimento también fue de utilidad para la asignación de los metilos. se observó que la señal del metilo CH₃-20 en 1.16 ppm muestra correlación con las señales en 39.3, 54.3 y 56.2 ppm correspondientes a C-1, C-9 y C-5, respectivamente; la señal del CH₃-18 en 1.07 ppm correlaciona con las señales en 16.3, 37.3, 39.3, 54.5 y 78.6 ppm correspondientes a C-19, C-4, C-10, C-5 y C-3, respectivamente

de igual manera se logró apreciar la correlación de la señal en la escala de hidrógeno en 0.97 ppm correspondiente al metilo CH₃-19 con las señales en 28.1, 37.6, 39.3, 54.5 y 78.9 ppm correspondientes a C-18, C-4, C-1, C-5 y C-3 respectivamente. De igual manera se logró apreciar la correlación de la señal en la escala de hidrógeno en 0.97 ppm correspondiente al metilo CH₃-19 con las señales en 28.1, 37.6, 39.3, 54.5 y 78.9 ppm correspondientes a C-18, C-4, C-1, C-5 y C-3, respectivamente.

Con base en los datos anteriores se propuso la estructura del cassadieno **20**, el cual presenta en su estructura una fracción de dieno no conjugado, y dos grupos hidroxilo. Realizando una búsqueda en la literatura no se encontró un compuesto igual, por lo que el cassadieno **20** se considera un producto natural novedoso.

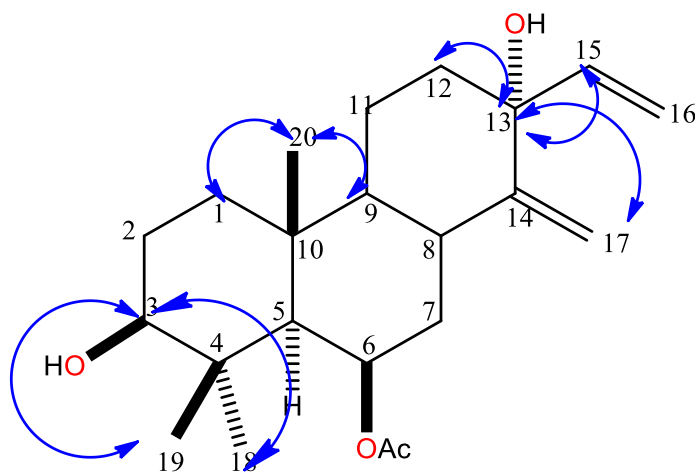


Figura 20. Correlaciones observadas en el espectro HMBC del 3 β ,13 α -dihidroxi-6 β -acetoxicassan-14(17),15-dieno (**20**).

Continuando con el análisis del extracto de CH₂Cl₂ de las hojas de *C. platyloba*, un lote de 500 mg de extracto impregnado en gel de sílice se sometió a columna cromatográfica utilizando hexanos-AcOEt (19:1) en las fracciones 1-4 se observan señales características de compuestos dienílicos, por lo que se recromatografian en placa preparativa con polaridad hexanos-AcOEt (19:1) se

obtienen 3 manchas, la mancha 2 con $R_f = 0.49$, en su espectro de RMN de ^1H se aprecia en 6.04 ppm una señal doble de dobles con $J_{trans} = 17.6$ y $J_{cis} = 11.2$ Hz característica de un protón vinílico H-15; en 5.60 ppm aparece una señal simple ancha perteneciente al protón base de acetilo H-6; en 5.39 ppm se observa una señal doble de dobles con $J_{trans} = 14.4$ y $J_{gem} = 1.2$ Hz correspondiente al H-16', la señal de H-16 se observó en 5.35 ppm como una señal doble de dobles $J_{cis} = 9.2$ y $J_{gem} = 1.6$ Hz. En 5.09 y 4.91 ppm se observan dos señales simples anchas correspondientes a protones de un metileno vinílico exocíclico; en 3.16 ppm apareció una señal característica de protón base de hidroxilo, 2.06 ppm una señal simple perteneciente a un metilo de acetilo. En 1.25, 1.08 y 0.99 ppm se distinguen tres señales simples correspondientes a los metilos 20, 18 y 19, respectivamente.

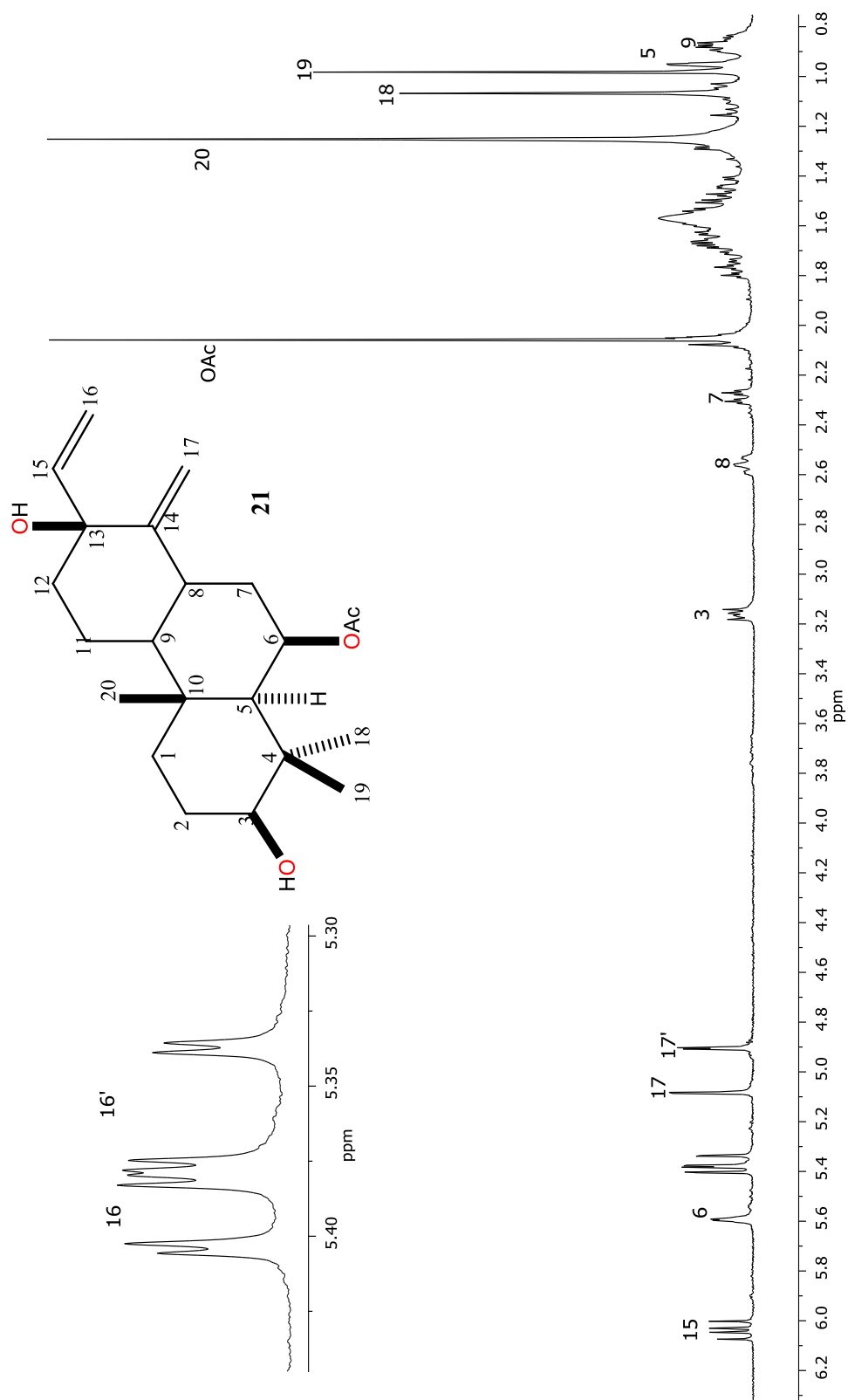


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C del cassadieno **21**.

En el espectro COSY se observó la correlación entre las señales dobles en 6.04 y 5.43 ppm, lo que confirmó el doble enlace H-15/H-16. La señal que se ubicó en 2.57 ppm correspondiente a H-8 correlacionó con las señales en 2.08 y 1.43 ppm de los hidrógenos H-7 y H-7'. En 5.59 ppm la señal simple ancha base de éster de la posición 6 con las señales múltiples en 2.08 y 1.43 correspondientes a los hidrógenos H-7 y H-7', H-6 también se acopla con la señal múltiple en 0.94 ppm correspondiente a H-5 lo que indicó que el éster se encuentra en la posición 6 igual que en el cassadieno **20**.

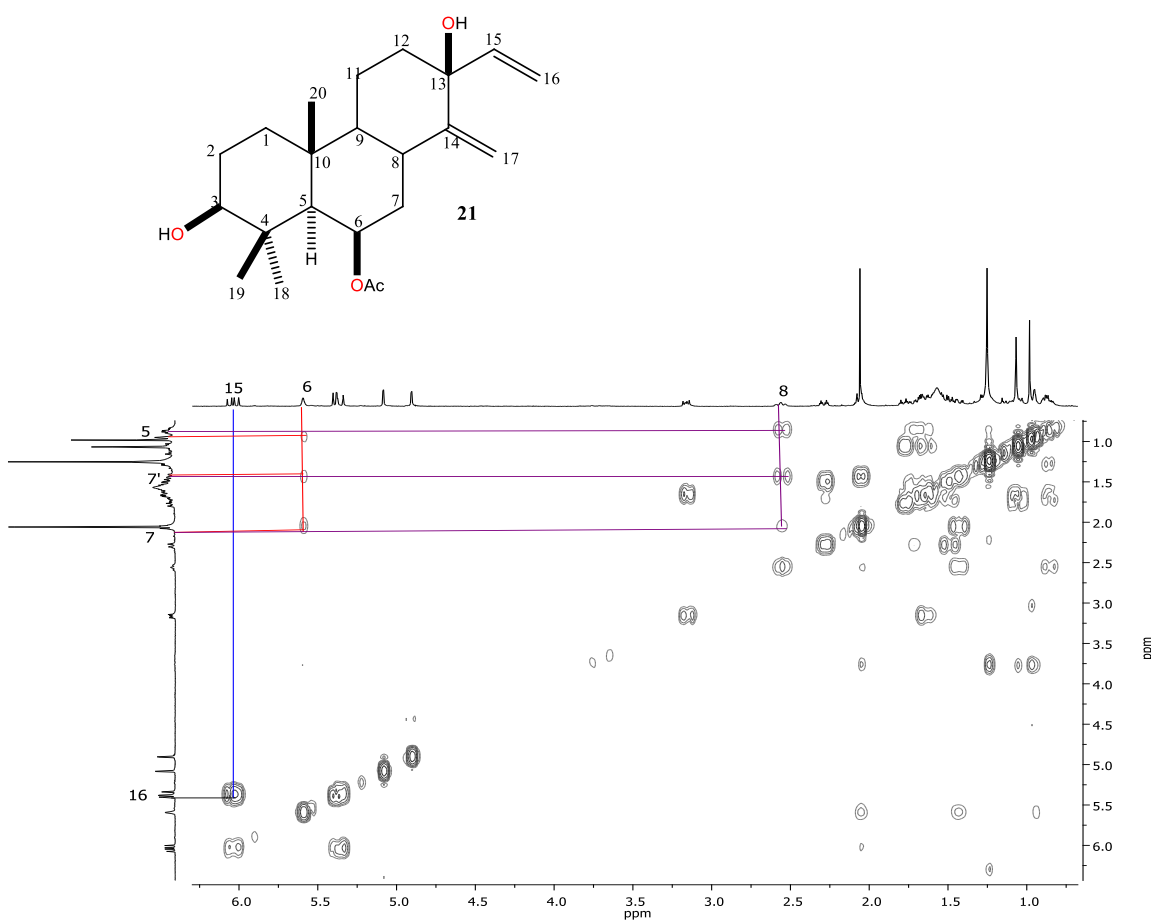


Figura 22. Espectro COSY del cassadieno **21**.

En su espectro de RMN de ^{13}C se observaron 22 señales, lo que nos indicó la presencia de un diterpeno funcionalizado; en 170.4 ppm se observa la señal de un carbonilo de acetilo; se observan señales típicas de carbonos vinílicos en

150.7, 139.2, 116.3 y 112.5 ppm, las cuales fueron asignadas a C-14, CH-15, CH-16 y CH₂-17, respectivamente; en 86.0 y 79.0 ppm se aprecian señales de carbonos base de hidroxilo asignadas a C-13 y C-3, respectivamente, el C-3 corresponde a un alcohol secundario mientras el C-13 corresponde a un alcohol terciario; en 69.4 ppm se observó la señal para el carbono base de acetilo CH-6, en 54.6 ppm la señal típica del carbono 5; el resto de las señales se encuentran entre 39.8 y 15.8 ppm.

Haciendo una comparación del espectro de RMN de ¹H y de ¹³C de este compuesto **21** con el cassadieno **20**, se observa que son muy similares excepto en la región vinílica donde el desplazamiento de las señales es distinto aunque conserva la misma multiplicidad con *J* distintas. En el espectro de ¹³C también se puede apreciar distintos desplazamientos para los carbonos vinílicos así como para los carbonos base de hidroxilo lo que nos sugiere que el cassadieno **20** y el cassadieno **21** son epímeros en la posición 13.

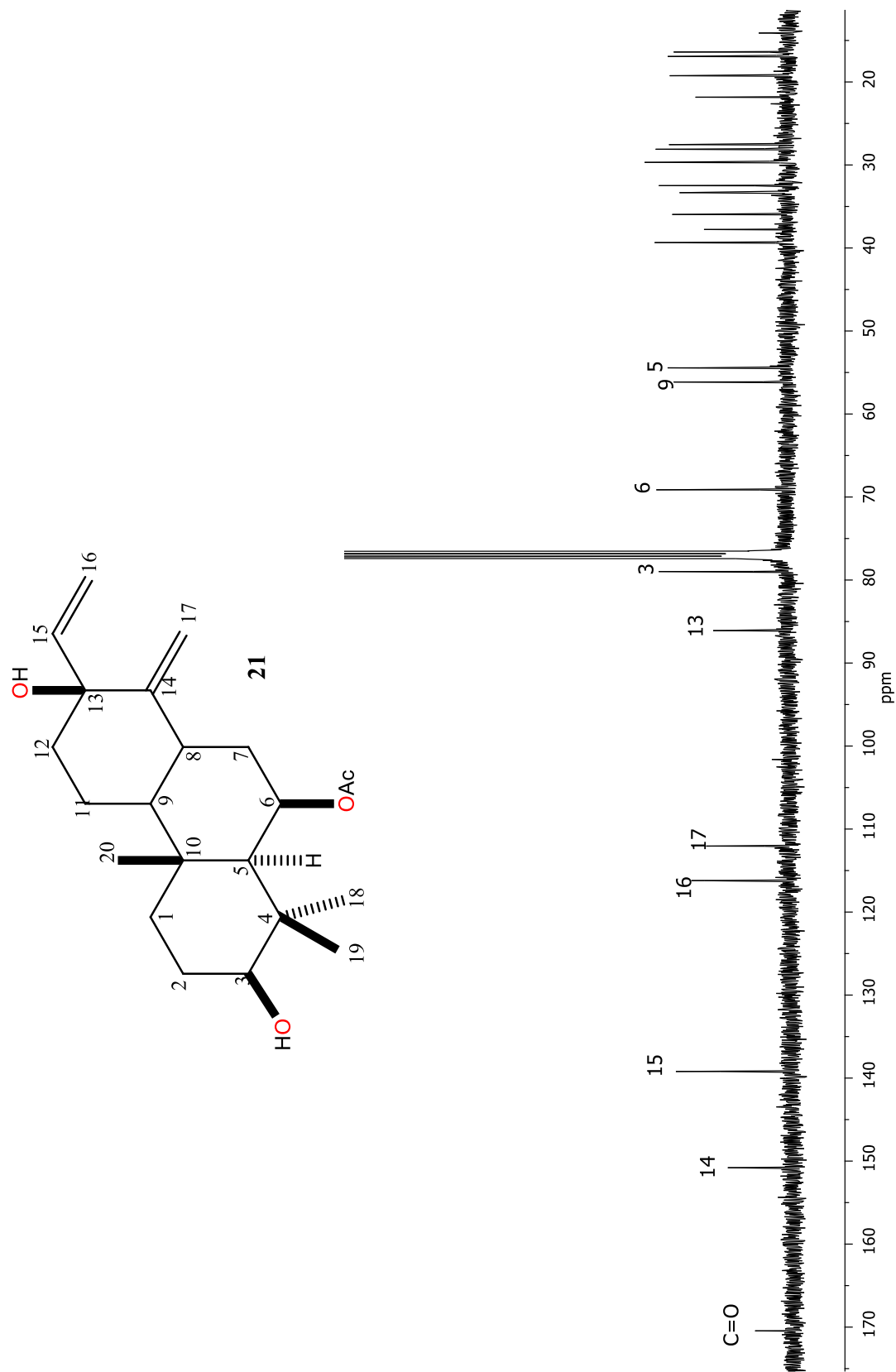


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C del cassadieno 21.

Continuando con el análisis del extracto de CH_2Cl_2 de las hojas de *C. platyloba*, el eluato hexanos-AcOEt (3:7) se impregnado en gel de sílice, se sometió a recromatografía, en el eluato CH_2Cl_2 -AcOEt (19:1), se obtuvo una miel café. En su espectro de RMN de ^1H se aprecia en 6.79 ppm una señal doble de dobles con $J_{trans} = 17.2$ y $J_{cis} = 10.9$ Hz característica de un protón vinílico H-15; en 5.54 ppm aparece una señal simple ancha perteneciente al protón base de acetilo H-6; en 5.12 y 4.97 ppm se observaron dos señales dobles con $J=17.2$ y $J=10.9$ Hz, respectivamente correspondientes a los hidrógenos vinílicos a H-16' y H-16. En 3.17 ppm apareció una señal característica de protón base de hidroxilo, 2.07 ppm una señal simple perteneciente a un metilo de acetilo. En 1.70 ppm apareció una señal simple ancha que indicó la presencia de un metilo vinílico CH_3 -17. En 1.04, 1.07 y 0.97 ppm se distinguen tres señales simples correspondientes a los metilos 20, 19 y 18, respectivamente.

Haciendo una comparación del espectro de RMN de ^1H de este compuesto **22** con los cassadienos **20** y **21**, y los dienos **8** y **9** se observó que ahora se tiene un doble enlace conjugado, pues se conserva la señal simple característica de un hidrógeno base de hidroxilo y adicionalmente aparece una señal para el metilo vinílico 17.

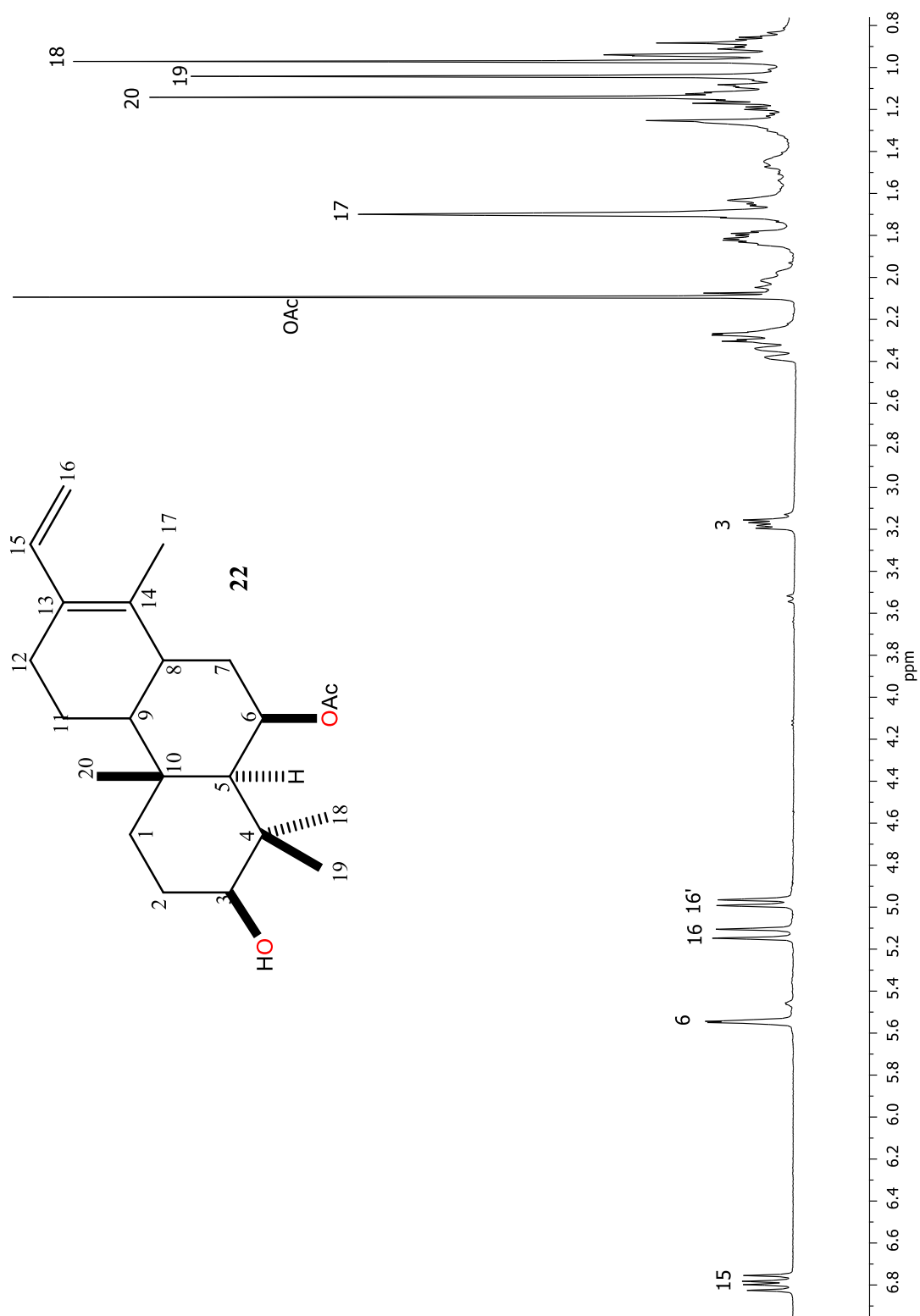


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H del cassadieno **22**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (figura 25) se observaron 22 señales lo cual indicó la presencia de un diterpeno funcionalizado; en 170.4 ppm se observó la señal correspondiente al carbonilo de acetato, en 135.2 ppm apareció la señal para el carbono vinílico C-15. En 135.4 y 129.4 ppm se aprecian dos señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-14 y C-13, respectivamente; en 111.1 ppm se ubicó la señal del carbono vinílico C-16; en 79.0 ppm se observó la señal para el carbono base de hidroxilo C-3; en 70.1 ppm se localizó la señal correspondiente al carbono base de acetilo, el resto de las señales se encuentran entre 55.0 y 15.0 ppm. Este compuesto resultó muy inestable, por lo que hasta el momento no se ha podido continuar con su caracterización.

Realizando una búsqueda en la literatura se encontró un compuesto similar el dieno **9**²² la única diferencia es el hidroxilo en la posición 3, haciendo una comparación de sus RMN de ^{13}C se observan desplazamientos similares para la fracción dienólica adicionalmente aparece 79.0 ppm una señal de carbono base de hidroxilo las demás señales son similares para el resto de la estructura, por lo que el cassadieno, **22** corresponde a un nuevo compuesto.

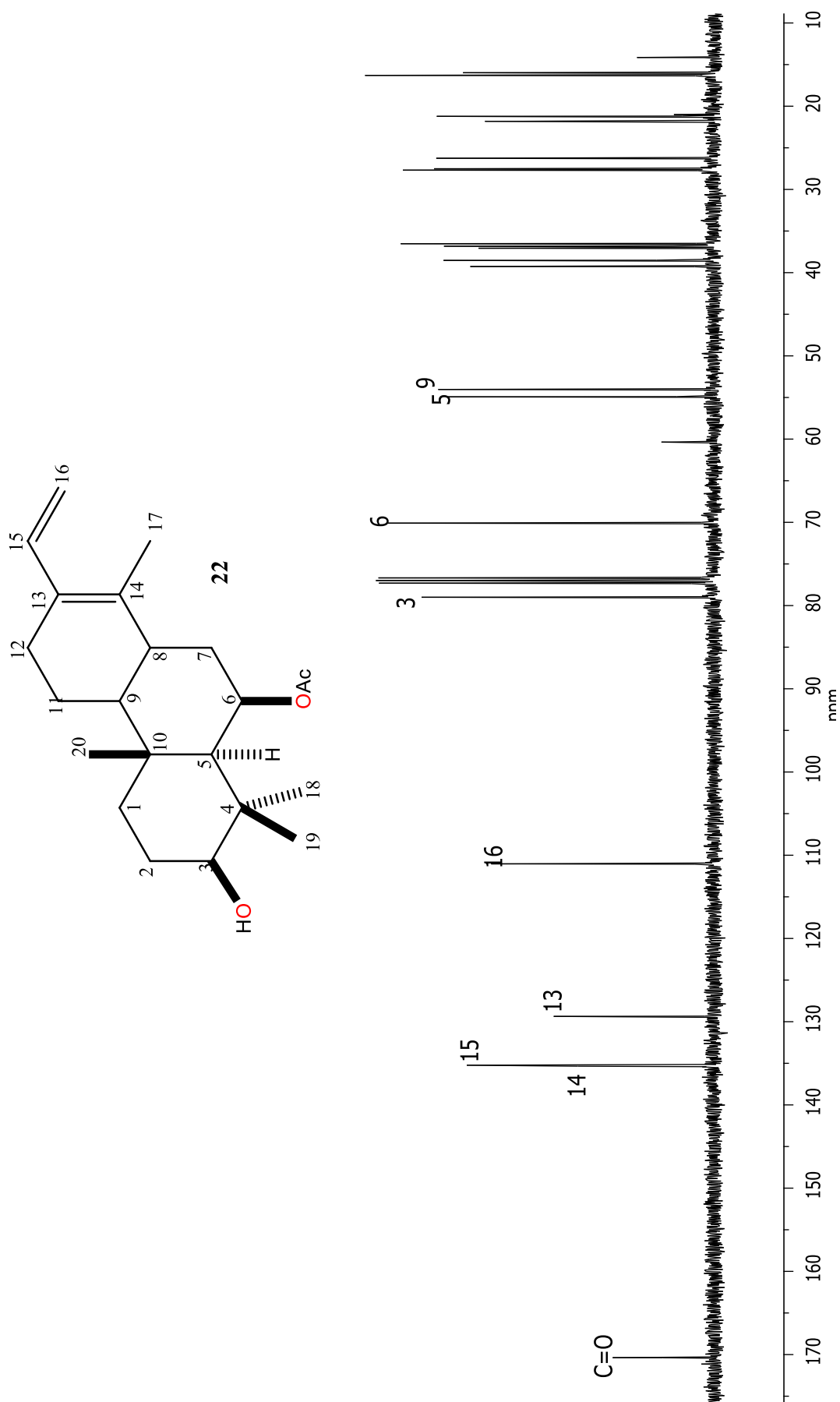


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C del cassadieno 22.

Realizando una búsqueda en la literatura se encontró que Torres y colaboradores aislaron de las hojas de *Myrospermum frutescens* un compuesto tipo cassadieno **23**,⁴⁸ pero con diferente posición para el grupo acetato y sin hidroxilo en posición 3, haciendo una comparación de sus RMN de ¹³C del dieno **20** con **23** se observan desplazamientos similares para la fracción dienílica no así para el resto de la estructura.

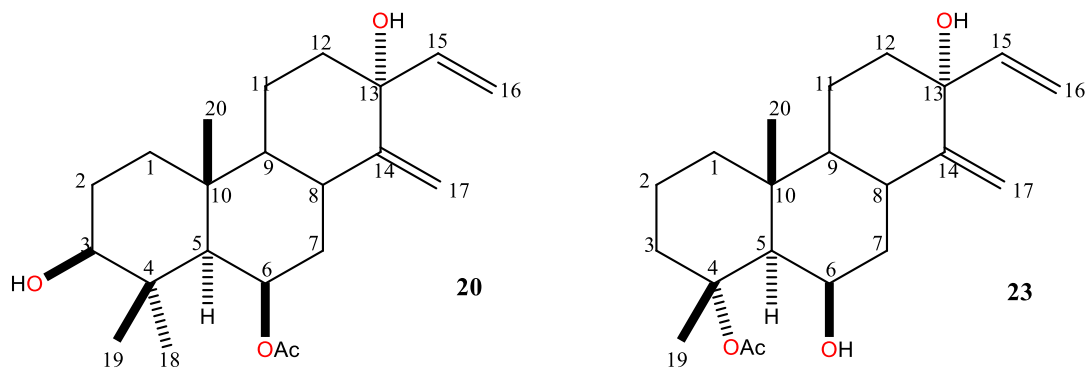


Figura 26. Cassadienos **20** y **23**.

De las semillas de *Caesalpinia eriostachys*

El espectro de RMN de ^1H del extracto CH_2Cl_2 semillas de *C. eriostachys*, mostró como componentes mayoritarios, una mezcla de triglicéridos.(figura 5) Se observaron hidrógenos vinílicos de ácidos grasos insaturados en 5.36-5.28 ppm, la fracción del glicerol en 5.27 ppm como una señal múltiple, así como señales dobles de dobles en 4.30 ppm ($J = 12.0, 4.4$ Hz) y en 4.15 ppm ($J = 12.0, 6.0$ Hz).La señal para el hidrógeno doble alílico apareció en 2.79 ppm y los hidrógenos alílicos se observaron en. 2.05 ppm. Los hidrógenos α fueron observados en 2.31 ppm mientras los hidrógenos β 1.61 ppm. Los metilenos alifáticos de cadena alquílica se observan como una señal ancha en 1.25 ppm, el grupo metilo terminal apareció en 0.89 ppm.

Todas estas señales indicaron la presencia de Triglicéridos (TG) con ácidos grasos saturados e insaturados. Un lote del extracto crudo (90 g) fueron purificados por columna cromatográfica rindiendo 78% de aceite TG purificados (fracción A), 9% de una mezcla de TG y ácidos grasos libres (fracción B) y 13% de una mezcla de ácidos grasos (fracción C). (figura 27).

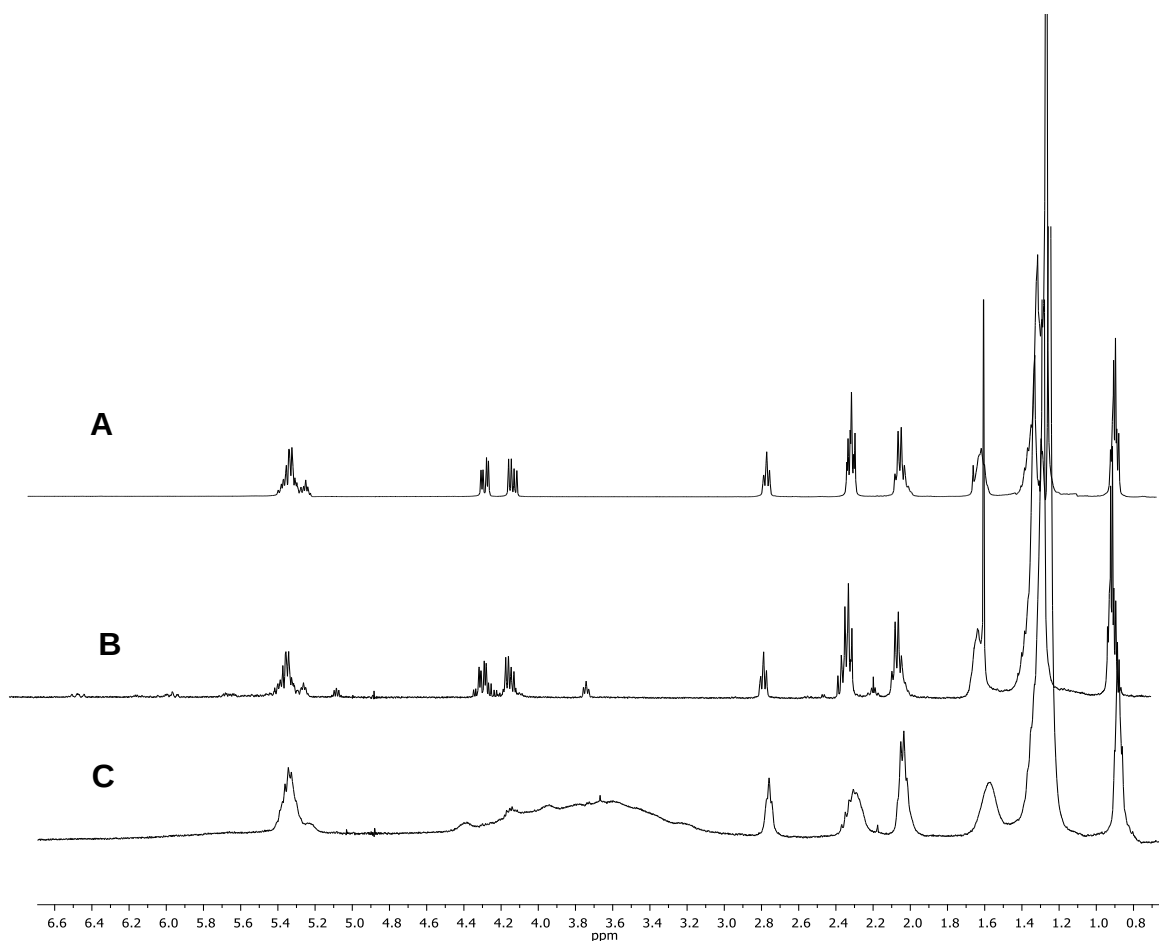


Figura 27. Fracciones de la purificación del aceite de semilla de *C. eriostachys*. **A)** TG purificados, **B)** Mezcla de TG y ácidos grasos libres, **C)** Ácidos grasos libres

El perfil de ácidos grasos de la fracción A se realizó usando GC-MS. La Tabla 1 enlista la composición de ácidos evidenciando esqueletos C16: 0, C18: 0, C18: 1 y C18: 2 como los componentes principales; mientras que C20: 0 y ácidos grasos más pequeños que C16: 0, también se detectaron componentes menores.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos del aceite refinado de *C. eriostachys*.

ÁCIDO GRASO	%
CAPRÍLICO (C8:0)	0.01
MIRÍSTICO (C14:0)	0.04
PANTODECÍLICO (C15:0)	0.02
PALMÍTICO (C16:0)	15.98
PALMITOLÉICO (C16:1)	0.35
MARGÁRICO (C17:0)	0.14
HEPTADECENÓICO (C17:1)	0.06
ESTEÁRICO (C18:0)	24.20
OLÉICO (C18:1 cis)	8.28
LINOLÉICO Ω 6 (C18:2 cis)	45.17
ARAQUÍDICO (C20:0)	3.62
γ -LINOLÉNICO (C18:3)	0.23
EICOSENÓICO (C20:1 cis)	0.03
α -LINOLÉNICO (C18:3)	0.02
HENEICOSANOICO (C21:0)	0.04
EICOSADIENÓICO (C20:2 cis)	0.92
EICOSATRIENÓICO (C20:3)	0.08
DOCOSADIENÓICO (C22:2)	0.82

Las estructuras correspondientes a los principales ácidos grasos presentes en el aceite se muestran en la figura 28. También se observaron ácidos grasos más pequeños que se detectaron como componentes menores y un buen equilibrio entre las concentraciones de ácidos grasos saturados (44.05% en peso) e insaturados (55.95% en peso). El índice de cetano, el punto de enturbiamiento y la viscosidad sugieren propiedades deseables para la producción de biodiesel.⁴⁹

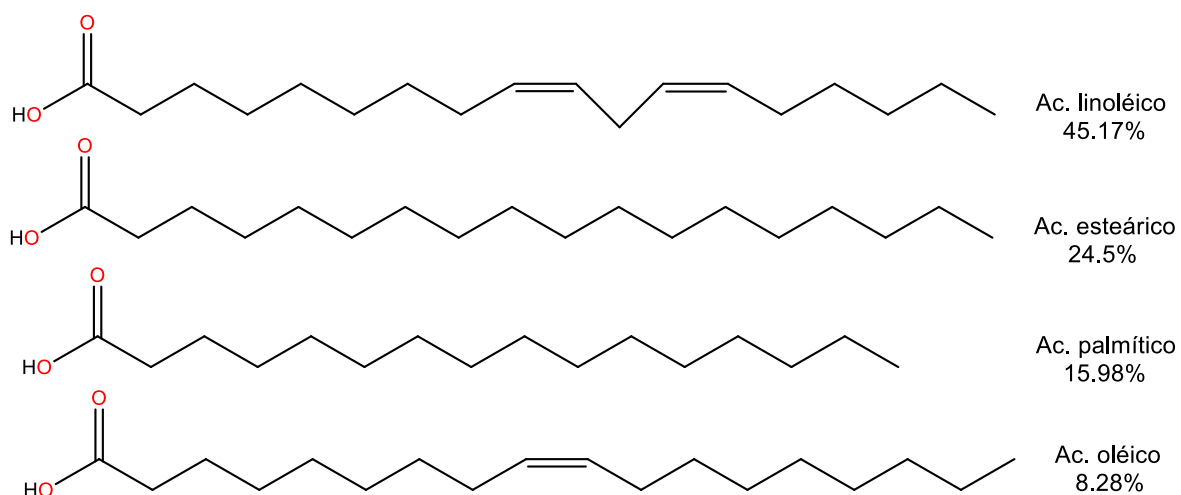


Figura 28. Principales ácidos grasos presentes en los triglicéridos del aceite de *C. eriostachys*.

Las propiedades fisicoquímicas del aceite purificado fueron similares a las de otros aceites vegetales,^{27 y 50} y se enumeran en la Tabla 2. El peso molecular determinado del aceite (874.8 g/mol) y su densidad (0.9286 g/cm³) son comparables a los reportados para el aceite de *Jatropha*. La viscosidad dinámica (28.4644 mPa.s) y la viscosidad cinemática (30.8948 mm²/s) del aceite de semilla de *C. eriostachys* son similares a las descritas para el aceite de *Salvia lerifolia*⁵¹ pero el número de saponificación (166.9 mg KOH/g aceite) fue mayor para el aceite de semilla de *C. eriostachys*.

Tabla 2. Comparación de las propiedades fisicoquímicas del aceite de las semillas de *C. eriostachys* con otras especies vegetales productoras de aceite.

Propiedad	<i>C. eriostachys</i>	Nourozak*	<i>Jatropha</i> *	Canola*	Palma*
Peso	874.8	930.0	845.3	896.0	833.8
Molecular del aceite, g/mol					
Densidad a 15°C, g/cm ³	0.9286	0.9046	0.9200	0.9030	0.9160
Viscosidad dinámica a 25°C, mPa.s	28.4644	28.435	34.1	33.026	31.8
Viscosidad cinemática, a 25°C, mm ² /s	30.8955	31.433	40.4	36.573	40.96
Ácidos grasos libres, %	2.12	0.71	19.28	0.77	0.63
Número de ácido, mg KOH/g l	4.20	1.41	38.20	1.53	1.25
Número de saponificación, mg KOH/g aceite	166.9	160.2	195.0	187.8	188.0

*Datos tomados de la referencia (50)

Los patrones de difracción de los catalizadores ZnAl (X) sintetizados y sus precursores se muestran en la figura 29. Los patrones XRD de los materiales ZnAl (X) (figura. 29A) exhiben las señales típicas de hidrotalcitas a 11.6°, 23.3°, 34.4°, 39.1°, 46.7°, 60.1° y 61.6° 2θ.⁵² La figura 29B representa los patrones de difracción para los precursores de zinc y aluminio que permitieron su identificación como Zn₅(CO₃)₂(OH)₆ (hidrozincita)⁵³ y AlO(OH) (pseudoboehmita).⁵⁴

El difractograma de los catalizadores ZnAl (X) activados a 200 °C (figura 30A) indica que el patrón típico de hidrotalcitas aún permanece en los catalizadores de ZnAl(X), que son más evidentes con una relación molar Zn/Al = 4, probablemente por el mayor concentración de precursor de Zn empleado en el proceso de síntesis. Además, también se confirma la presencia de zincita e hidrozincita con las señales en $2\theta = 31.8^\circ$, 36.5° y 56.6° , y las señales a $2\theta = 34.5^\circ$ y 39.1° , respectivamente. En otros reportes, estas dos fases cristalinas se han asociado con una alta actividad catalítica por estos tipos de materiales.⁵⁵⁻⁵⁶ El análisis del patrón DRX de los precursores (figura 30B) mostró solo un pequeño cambio en la estructura cristalina del precursor de zinc (hidrozincita), donde-el calentamiento a 200 °C promovió la aparición de señales típicas de mineral de zincita.

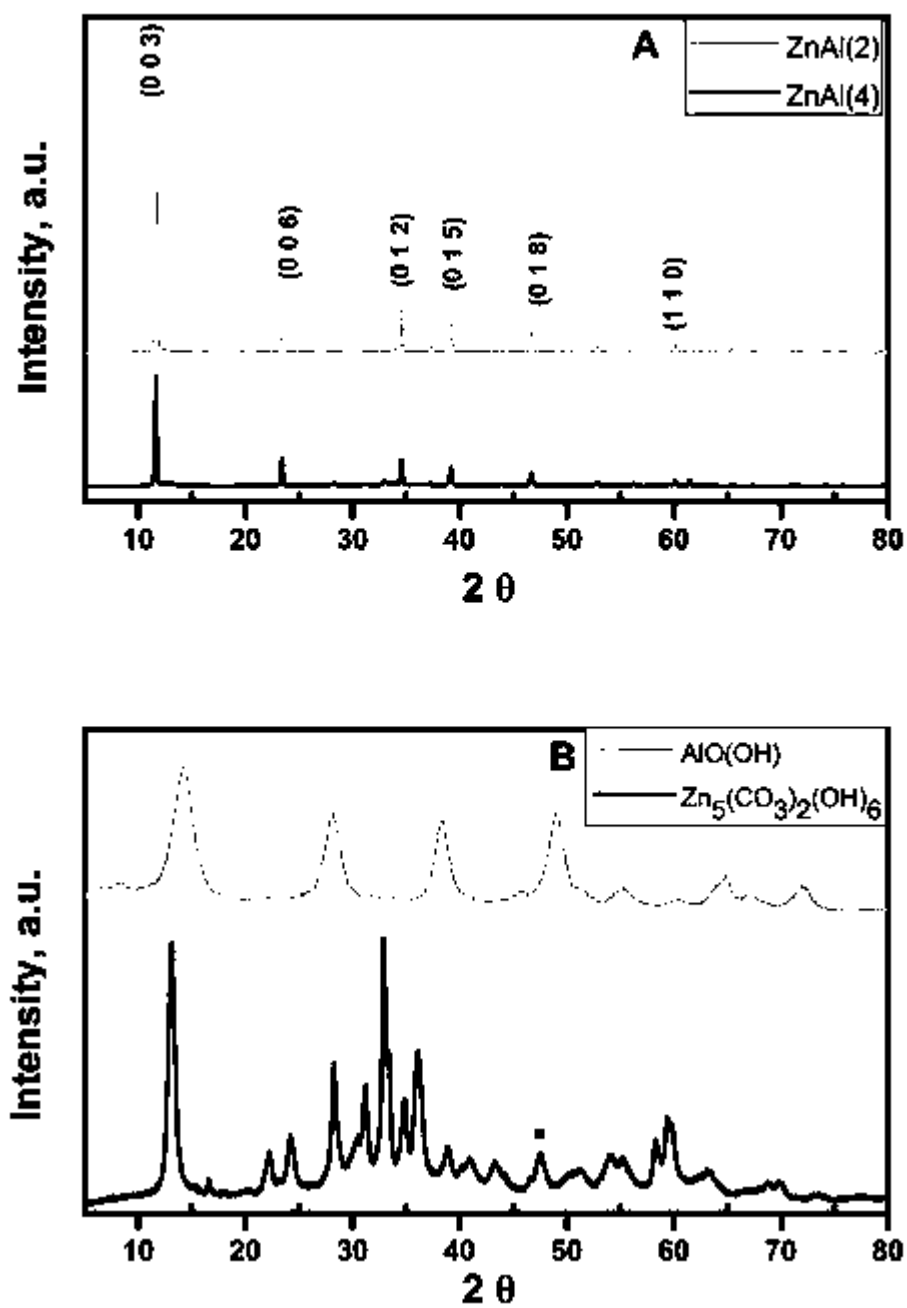


Figura 29. A) patrones DRX de los materiales sintetizados ZnAl(X) y B) sus precursores. Especies identificadas: ■ Zincita (ZnO).

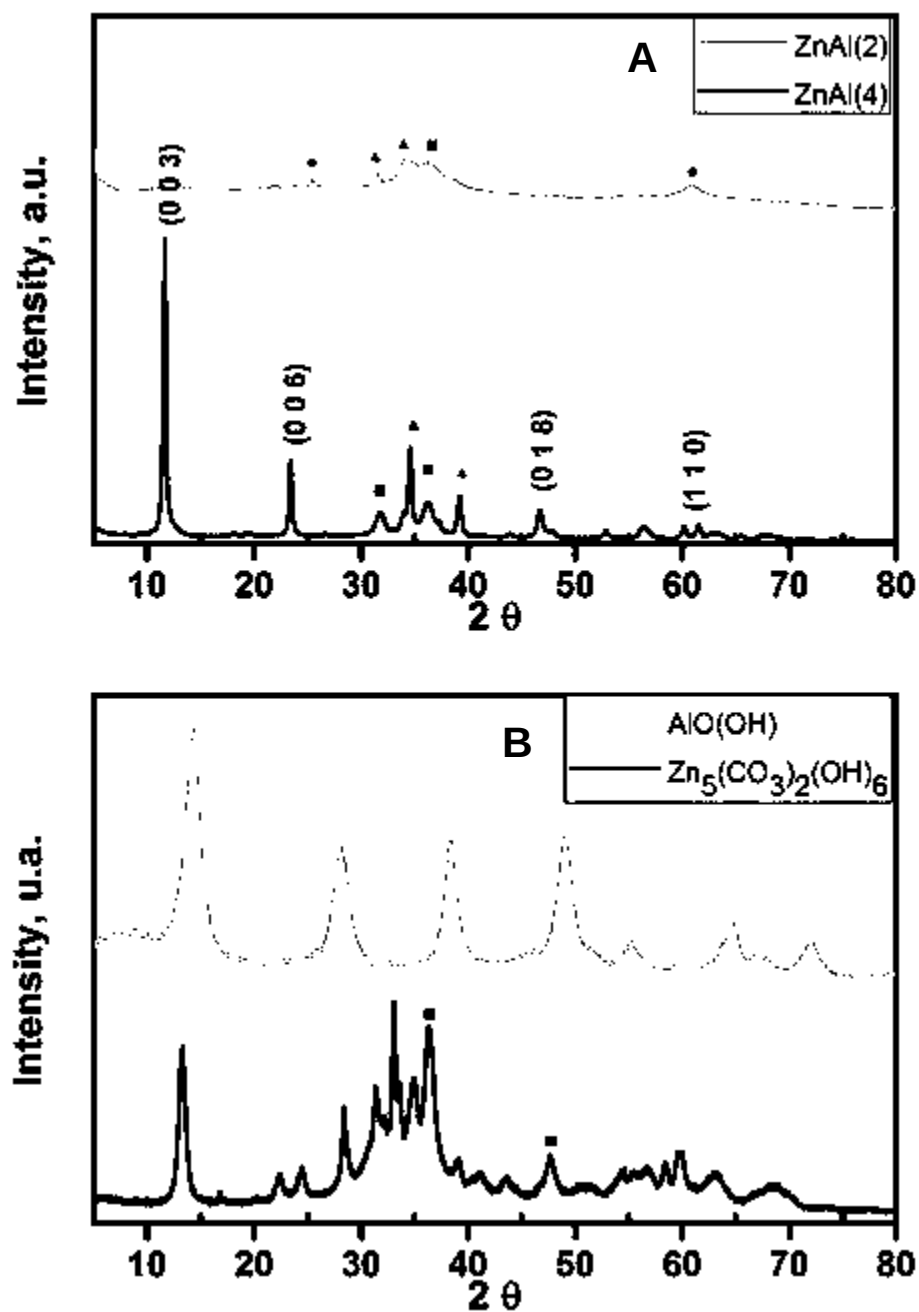


Figura 30. A) Patrones DRX de los materiales ZnAl(X) deshidratados y **B)** patrones DRX de sus precursores precipitados. Especies identificadas: ■ ZnO (zincita), ▲ Zn₅(CO₃)₂(OH)₆ (hidrozincita), ● ZnCO₃.

Las áreas superficiales específicas y el diámetro de poro medio de los catalizadores de ZnAl (X) y sus precursores se enumeran en la tabla 3. El ZnAl (4) y el precursor de zinc poseen una superficie específica similar y un diámetro de poro medio. Este resultado podría atribuirse a la mayor relación molar M^{+2}/M^{+3} empleada en la síntesis. En este caso, una gran cantidad de Zn^{+2} promueve propiedades de textura similares en comparación con el precursor de zinc; mientras que el material ZnAl (2) muestra un área de superficie específica menor en comparación con el catalizador de ZnAl (4) y sus precursores, lo que está de acuerdo con los datos informados por Jiang y colaboradores.⁵⁷ Además, los precursores de aluminio tienen una gran área superficial (330 m²/g) pero el diámetro de poro más bajo, similar al reportado por Yang y colaboradores.⁵⁷

Tabla 3. Propiedades de textura de las muestras de ZnAl (X) y sus precursores.

Catalizador	S_{BET} , m ² /g	D_{BJH} , nm
AlO(OH)	330	5
ZnAl(2)	30.1	14.9
ZnAl(4)	228.6	7.9
Zn ₅ (CO ₃) ₂ (OH) ₆	223	18

La basicidad total y la basicidad lixiviable de las muestras de ZnAl (X) y sus precursores se enumeran en la tabla 4. La pseudobohemita posee sitios básicos con menor resistencia que los del precursor de hidrozincita y los materiales de ZnAl (X); por lo tanto, era catalíticamente inactiva para la transesterificación del aceite. Aunque el precursor de hidrozincita tiene la mayor resistencia de base, su rendimiento de transesterificación (54%) fue menor en comparación con el observado para ZnAl (2) (59%) y ZnAl (4) (79%), lo que indica que la estructura tipo brucita en los materiales ZnAl (X) activados promueve la formación de una mezcla de fases cristalinas de hidrotalcita, hidrozincita y zincita, que están

asociadas con la actividad catalítica. La basicidad total de ZnAl(X) aumenta directamente proporcional al contenido de Zn en el catalizador; por lo tanto, la actividad catalítica también mejora, como se informó para los catalizadores de hidrotalcita.³⁸ Se observó el mejor rendimiento de transesterificación (79% $\pm$ 3) para ZnAl (4), y podría estar relacionado con las mayores cantidades de fases de zincita e hidrozincita en comparación con las muestras de ZnAl (2) (figura 3A). Como se ve, estos catalizadores heterogéneos proporcionaron rendimientos de transesterificación inferiores a moderados, y pueden atribuirse a limitaciones de transferencia de masa;⁵⁹ sin embargo, el proceso de síntesis fácil, las propiedades de basicidad y el rendimiento catalítico similar según lo reportado son notables.⁵⁹

Tabla 4. Basicidad de los materiales ZnAl (X) y sus precursores.

Catalizador	Basicidad				Base
	Total	Basicidad de lixiviación, mmol/g			
		Azul de			
		Fenolftaleina	bromotimol	Total	
Fuerza					
Zn ₅ (CO ₃) ₂ (OH) ₆	2.2484	0.0072	0.0405	0.0477	11.1<pK<15
ZnAl(4)	0.3079	0.0229	0.0100	0.0329	11.1<pK<15
ZnAl(2)	0.1854	0.0000	0.0178	0.0178	11.1<pK<15
AlO(OH)	0.6799	0.0056	0.4494	0.4550	8.2<pK<11.1

La reacción de transesterificación heterogénea se llevó a cabo utilizando catalizadores ZnAl(4), con una relación másica metanol/aceite 1:1, 4% en peso de catalizador con respecto al peso del aceite, a una temperatura de 200 °C durante 3 horas. La reacción de transesterificación se efectuó en un reactor por lotes de acero inoxidable marca Parr 5000 (45 mL). El reactor fue presurizado a aproximadamente 2 MPa con N₂ y calentado a 200 °C; al alcanzarse la temperatura se comenzó con la agitación a 650 rpm, este punto se consideró como el inicio de la reacción. Transcurrido el tiempo de reacción, el reactor fue

enfriado en un baño de hielo, despresurizado y descargado. El catalizador fue recuperado mediante centrifugación y el metanol en exceso fue separado mediante una evaporación a 70 °C, formándose 2 fases en la mezcla de reacción, que fueron colocadas en un embudo de separación, desechándose la fase inferior que correspondió al glicerol y recuperando el biodiesel contenido en la fase superior. Al biodiesel obtenido se le añadió Na_2SO_4 y se filtró.

La reacción de transesterificación empleando KOH (1% en peso) se llevó a cabo a reflujo durante 2h, concluido el tiempo se le hacen lavados con agua caliente, y se seca sobre sulfato de sodio anhidro, la cual proporcionó un rendimiento del 90% observándose un resultado similar en comparación con la literatura, cuando se utilizaron otras fuentes de aceite vegetal.⁶⁰⁻⁶² Aquí, observamos las desventajas típicas para la purificación de la reacción del producto. No obstante, se presenta la viabilidad de la transesterificación de las semillas oleaginosas de *C. eristachys* con este catalizador común homogéneo empleado para la producción de biocombustibles. Estos resultados también permiten determinar que el origen y/o la composición del aceite de semilla de *C. eristachys* no están relacionados con el desempeño de catalizadores heterogéneos

El rendimiento de la reacción de transesterificación heterogénea del mejor catalizador en este reportado aquí [ZnAl (4)] fue de 79% $\pm$ 3. Su espectro de RMN ^1H mostró las señales típicas atribuidas a FAME saturados e insaturados (figura 31), destacando las señales de los hidrógenos vinílicos de cadena alquílica insaturada a 5.42-5.27 ppm, la señal singulete en 3.67 ppm reveló la presencia del grupo metil éster, y en 1.25 ppm se observó la señal de cadenas alquílicas saturadas. Este patrón de señales es consistente con los datos reportados en la literatura.⁶³ No se detectaron remanentes de glicerol o triglicéridos en la medición de RMN.

El valor de densidad de los FAME fue de 0.887 g/cm³ determinado a 15 °C, el cual está de acuerdo con el rango de 0.86 a 0.90 g/cm³ estipulado para el biodiesel (EN 14214). Además su viscosidad cinemática determinada a 40 °C fue de 4.77 mm²/s, el cual está dentro del intervalo de 3.5 a 5.0 mm²/s (EN 14214). El

valor calorífico 37.8 MJ/kg) fue superior al del biodiesel del aceite de Karanja, semillas de caucho, salvado de arroz y *Terminalia catappa*.⁶⁴ Del análisis GC la presencia de esteres metílicos.

El análisis FAME del análisis GC-MS indicó la presencia de ésteres metílicos palmíticos, linoleicos, oleicos y esteáricos como los principales componentes (Tabla 5). Esto está en concordancia con la composición del aceite de semilla de *C. eristachys* (Tabla 1). Se observaron derivados de ésteres metílicos menores manteniendo su proporción como en la materia prima; sin embargo, no se detectaron FAMEs de cadena larga esperada (C20: 0, C21: 0 y C22: 0) así como el éster metílico pentadecanoico, probablemente por su degradación durante el proceso de reacción.

El espectro de RMN de ¹H típico de saturados e insaturados se observó para los FAME obtenido usando KOH como catalizador. Su valor calórico fue ligeramente mayor (38.1 MJ/kg) que los obtenidos con nuestro catalizador heterogéneo. Se midió el valor de densidad de 0,874 g/cm³ y la viscosidad cinemática de 4,66 mm²/s, lo que está de acuerdo con la EN 14214. Los FAME por GCMS reveló los ésteres metílicos C16: 1, C18: 0, C18: 1 y C18: 2 como los componentes principales. No se detectaron los FAME C8: 0, C15: 0, C17: 0, C20: 0, C21: 0 y C22: 0 esperados, ya que los respectivos ácidos grasos se detectaron como componentes de aceite de semilla (Tabla 5).

Se observó que los rendimientos de FAME difieren significativamente cuando se emplean catalizadores heterogéneos u homogéneos, además de los valores más bajos que los requeridos en EN 14214, pero el FAME conserva las propiedades fisicoquímicas similares. No obstante, podría considerarse el aceite de semilla de *C. eristachys* como una materia prima prometedora para la producción de biodiesel, dado que los catalizadores de transesterificación mostraron el rendimiento típico, de acuerdo con la literatura.

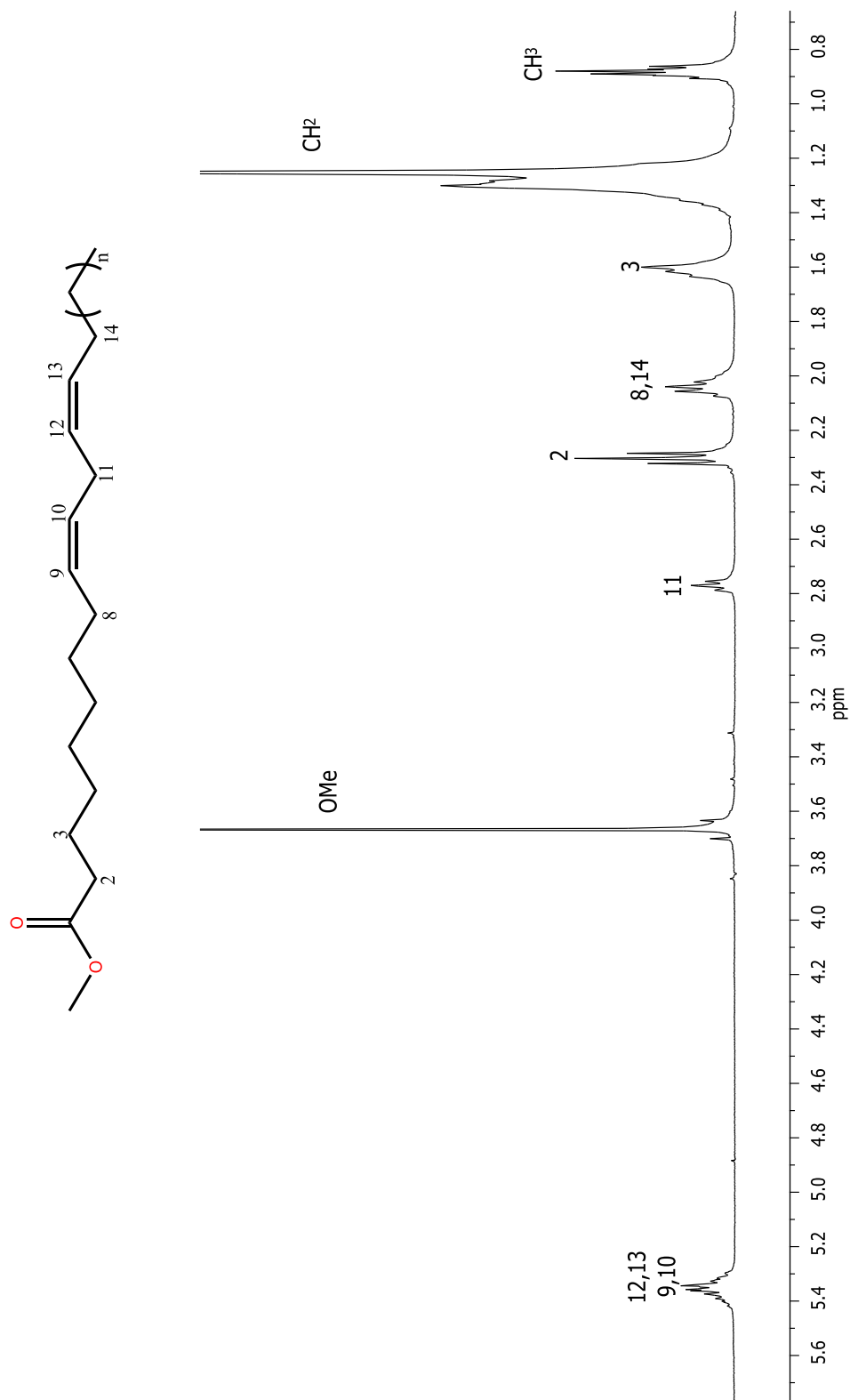


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H de biodiesel de las semillas de *C. eriostachys*.

Tabla 5. Composición FAME de la reacción de transesterificación del aceite de las semillas de *C. eriostachys*, usando ZnAl(4) y KOH como catalizadores.

FAME	GC-MS (%)	
	ZnAl(4)	KOH
Caprílico (C8:0)	0.03	--
Mirístico (C14:0)	0.05	0.05
Palmitoleico (C16:1)	0.47	0.41
Palmítico (C16:0)	16.16	14.79
Margárico (C17:0)	0.06	0.17
α -linolenico (C18:3)	0.23	3.43
Linoleico (C18:2)	46.94	46.45
Oleico (C18:1)	9.45	9.34
Esteárico (C18:0)	22.78	25.36
Araquidónico (C:20)	3.83	--

Se puede observar que los rendimientos de FAME difieren significativamente cuando se emplean catalizadores heterogéneos u homogéneos, además de valores más bajos que los requeridos en EN 14214, pero el FAME conserva propiedades fisicoquímicas similares que aquí han sido evaluadas. No obstante, podría considerarse el aceite de semilla de *C. eriostachys* como materia prima prometedora para la producción de biodiesel, dado que los catalizadores de transesterificación mostraron el rendimiento típico, de acuerdo con la literatura.

CONCLUSIONES

De las semillas de *C. eriostachys* se obtuvieron como componente principal triglicéridos en un rendimiento cercano al 20%; se llevó a cabo la reacción de transesterificación en presencia de catalizadores homogéneos y heterogéneos con buenos rendimientos, por lo que se propone esta especie como una nueva fuente para la obtención de biocombustibles.

Del estudio químico de las especies de *Caesalpinia* se lograron aislar y caracterizar diferentes compuestos como: De las semillas *C. sclerocarpa* y *C. eriostachys* al lupeol. De *C. eriostachys* de tallos y semillas al β -sitosterol y estigmasterol; así como de sus tallos al ferulato de miristilo.

De *C. platyloba* de las vainas a las butenólidas 6 β -acetoxicassa-12-hidroxi-13-en- γ -lactona (**16**) reportada en la literatura y a 6 β -acetoxicassa-11,13-dien- γ -lactona (**17**); de sus hojas a la lactona natural (**17**), y tres compuestos minoritarios tipo cassadieno al 3 β ,13 α -dihidroxi-6 β -acetoxicassa-14(17),15-dieno (**20**), al 3 β ,13 β -dihidroxi-6 β -acetoxicassa-14(17),15-dieno (**21**) y al 3 β -hidroxi-6 β -acetoxicassa-13,15 dieno (**22**) de los cuales no hay reportes en la literatura por lo que se consideran productos naturales novedosos.

PARTE EXPERIMENTAL

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury-Plus-400 empleando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. Los experimentos HMBC se determinaron en un espectrómetro Varian Mercury 300.

Los espectros de masa de baja resolución se midieron en un equipo Varian Saturn 2000 mediante impacto electrónico.

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

El análisis de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de $\text{Cu K}\alpha$.

El perfil de ácidos grasos del aceite purificado de las semillas de *C. eriostachys* y el perfil FAME fueron obtenidos por los métodos Ce 1-62 (AOCS,

2005) y SPME (fibra PDMS/DVB/CAR), respectivamente, usando un cromatógrafo de gases tecnología Agilent 7890A, equipado con una columna (60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) y acoplado 5975C Agilent Technologies cuadrupolar, operado en modo de ionización de impacto electrónico (70 eV). La comparación de los espectros de masa fue hecha con la base de datos de la librería NIST/EPA/NIH (Identificación positiva 80%). Los tiempos de retención FAME fueron comparados con los obtenidos para los químicos estándar (mezcla de 37 componentes FAME Supelco) inyectados dentro del cromatógrafo de gas bajo las mismas condiciones experimentales. El valor de pácido y el número de saponificación de *C. eriostachys* fue determinado de acuerdo al método descrito por Hajinezhad (2015).⁵⁰ Las densidades del aceite de las semillas de *C. eriostachys* y FAME fueron determinadas en un medidor de velocidad de densidad y sonido DSA 5000M Anton Paar a 15 °C. La viscosidad dinámica fue medida en un viscosímetro AMVn Anton Paar a 25 °C para el aceite de las semillas y a 40 °C para los FAME. El valor calorífico de FAME *C. eriostachys* fue obtenido a través de la combustión de 0.5 g de la muestra con oxígeno en un calorímetro Parr modelo 6772.

Síntesis y caracterización de ZnAl (X) hidrotalcitas y sus precursores (Las hidrotalcitas fueron proporcionadas por la división de estudios de posgrado de la facultad de ingeniería química, así como los equipos para realizar los experimentos catalíticos). Las hidrotalcitas de ZnAl (X) se sintetizaron mediante el método de coprecipitación, empleando las cantidades apropiadas de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ para obtener relaciones molares de Zn/Al de 2 y 4 (X). Las sales se disolvieron en agua y se valoraron con una solución acuosa de NaOH- Na_2CO_3 para alcanzar un pH = 8-9. La suspensión se envejeció a reflujo durante 36h a 90 °C, se lavó con agua desionizada y se filtró. La torta obtenida se secó a 80 °C durante 12 h, y finalmente se activó a 200 °C durante 6 h, después de una velocidad de calentamiento de 0,5 °C / min. Por separado, cada precursor se trató bajo el mismo método de síntesis, denominado en lo sucesivo precursores de zinc y aluminio.

El análisis de DRX de catalizadores deshidratados se realizó con un equipo Bruker D2 PHASER utilizando radiación de Cu K α (λ = 1.5406 Å). Los patrones de

rayos X se tomaron de 5° a 80° 2θ. Las áreas de superficie y la distribución del tamaño de poro se determinaron mediante el modelo BET y el método BJH, respectivamente. Los experimentos de fisisorción se realizaron en un instrumento Micromeritics TriStar. Para esta caracterización, aproximadamente 0.2g de muestra se desgasificaron previamente al vacío durante 12h a 200 °C en un sistema de desgasificación Micromeritics VacPrep 061. La basicidad total y la basicidad de lixiviación de ZnAl (X) y sus precursores de zinc y aluminio se determinaron por titulación con ácido benzoico como se describe por Fraile y colaboradores.⁶⁵ La resistencia de la base de los catalizadores se determinó mediante titulación de Hammet.³⁹

Material vegetal.

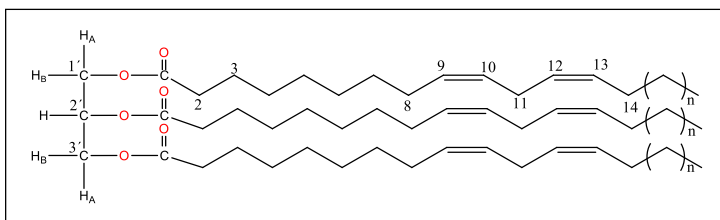
Las especie *C. eriostachys* y *C. sclerocarpa* fueron colectadas en el municipio de la Huacana, Michoacán el 18 de Octubre 2013. La especie *C. platyloba* se colectó en la localidad de los Charcos municipio de Buenavista Tomatlán, Michoacán, en marzo del 2014. Las especies vegetales fueron identificadas taxonómicamente por el M.C. Xavier Madrigal Sánchez, conservando un ejemplar en el Herbario EBUM de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Con número de registro para *C. eriostachys*: 2452 y para *C. platyloba* 2401. Las plantas *C. sclerocarpa*, *C. eriostachys* y *C. platyloba* se separaron en sus partes flores, vainas, semillas, hojas y tallos, secadas a la sombra. Para la obtención de los extractos de *C. eriostachys* se pesaron 400 g de flores, 800 g de vainas, 200 g de semillas, 250 g de hojas, 220 g de tallos. De *C. sclerocarpa* se pesaron 200 g de hojas, 250 g de tallos y 70 g de semillas. De *C. platyloba* 1 kg de hojas. Cada una de las partes de la plantas se colocó por separado en recipientes de vidrio y se sometieron al procedimiento por maceración secuenciada con hexanos, CH₂Cl₂ y metanol

Obtención del aceite de las semillas y purificación.

Un lote de 655 g de semillas de *C. eriostachys* se sometieron a reflujo con CH₂Cl₂, durante cuatro horas. Transcurrido este tiempo, se filtró y evaporó en

rotavapor, con lo que se obtuvieron 90 g de extracto como un aceite amarillo obscuro, el extracto crudo fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice (230-240 mesh) Merck y CH₂Cl₂ como eluyente. Las fracciones colectadas rindieron cerca de 70 g (78%). De triglicéridos como un aceite amarillo. El resto del extracto corresponde a una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos.

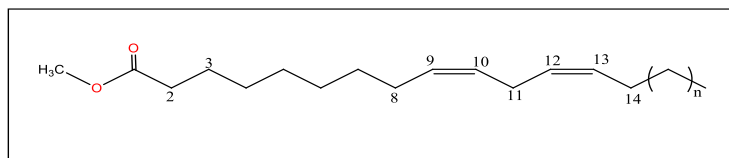
Triglicéridos



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) δ: 5.36 (1H, m, H-12), 5.36 (1H, m, H-13), 5.36 (1H, m, H-9), 5.36 (1H, m, H-10),

5.27 (1H, m, H-2'), 4.30 (1H, dd, J = 12.0 y 4.4, H-1'), 4.15 (1H, dd, J = 12.0 y 6.0, H-3'), 2.79 (1H, t, J = 6.0, H-11), 2.31 (1H, m, H-2), 2.05 (1H, m, H-8), 2.05 (1H, m, H-14), 1.61 (1H, m, H-3), 1.25 (nH, s, CH₂), 0.89 (3H, t, CH₃).

Biodiesel.



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) δ: 5.36 (1H, m, H-12), 5.36 (1H, m, H-13), 5.36

(1H, m, H-9), 5.36 (1H, m, H-10), 5.27 (1H, m, H-2'), 3.67 (3H, s, OMe), 2.79 (1H, t, J = 6.0, H-11), 2.31 (1H, m, H-2), 2.05 (1H, m, H-8), 2.05 (1H, m, H-14), 1.61 (1H, m, H-3), 1.25 (nH, s, CH₂), 0.89 (3H, t, CH₃).

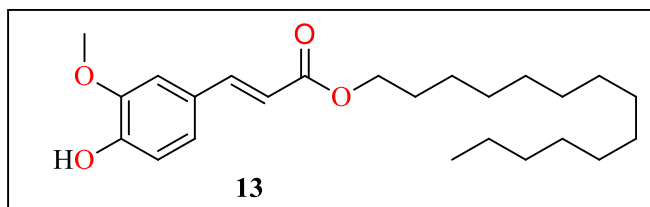
Experimentos catalíticos.

Los experimentos de reacción catalítica heterogénea se llevaron a cabo en un reactor Parr-5000 de acero inoxidable a 200 ° C, durante 3 h, al 5% en peso del catalizador, y a una relación molar de aceite/metanol a 1:30. Inicialmente, se cargaron en el reactor aceite de semillas de *C. eriostachys* purificado, metanol y catalizador. El aire en el reactor se purgó con nitrógeno durante 5 minutos y se presurizó a 20 bares para mantener el metanol en la fase líquida. La temperatura

se aumentó rápidamente a 200 ° C, y posteriormente, la velocidad de agitación se ajustó a 650 rpm. Al final del experimento, el reactor se enfrió en un baño de hielo y se despresurizó. El catalizador se eliminó de la mezcla de reacción mediante centrifugación y el metanol restante se eliminó por evaporación a 70 °C. Se formaron dos fases; la capa superior contenía FAME, y se obtuvo una pequeña cantidad de glicerol en el fondo, y se separó por decantación. Después, el producto de reacción se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se analizó mediante RMN de ¹H y CG-MS. El rendimiento de la reacción se determinó según Elkady (2015)⁵⁹. Las reacciones catalíticas homogéneas se llevaron a cabo en un matraz bola de vidrio, empleando KOH 1% en peso como catalizador, y una relación molar aceite / metanol 1:6, a reflujo a 60°C, durante 2 h.⁴⁵⁻⁴⁷ Después de la reacción, FAME se separó del glicerol, se lavó con agua caliente, se secó sobre Na₂SO₄ y se analizó por RMN de ¹H y CG-MS.

Aislamiento y extracción del ferulato de miristilo (13).

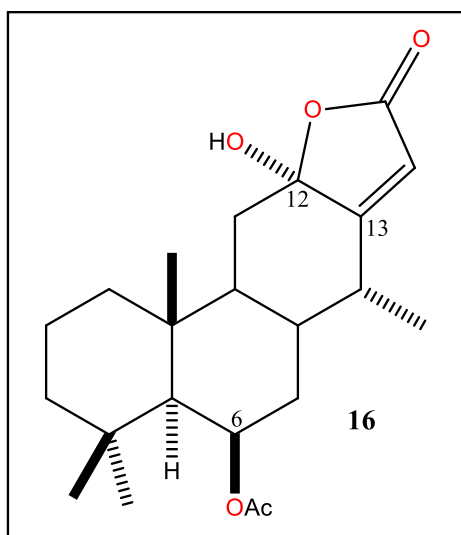
Tallos secos (220 g) de *C. eriostachys* fueron extraídos con *n*-hexano (1L x 3) a temperatura ambiente por 3 días el mismo proceso fue realizado con CH₂Cl₂ (1L x 3). La filtración y evaporación del extracto CH₂Cl₂ rindió un sólido verde oscuro (1.7 g); un lote de 500 mg fue sometido a columna cromatográfica eluída con mezclas de hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad. En las fracciones 13-16 eluídas con hexano-AcOEt (4:1) se identificó al alquil ferulato (**13**), como un sólido blanco con un punto de fusión de 63-65°C.



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, *J* en Hz) δ: 7.75 (1H, d, *J*=15.9, H'), 7.14 (1H, dd, *J*=8.2 y 1.9, H-5), 7.09 (1H, d, *J*=1.9, H-3), 6.97 (1H, d, *J*=8.2, H-6), 6.34 (1H, d, *J*=15.9, H-2'), 4.19 (2H, t, *J*= 6.9, H-1'), 3.98 (3H, s, H-4'), 1.25 (nH, s, CH₂'), 0.88 (3H, t, *J*= 7.0, CH₃'). IR 1709 cm⁻¹ (CO).

Aislamiento y extracción del 6 β -acetoxicassa-12-hidroxi-13-en- γ -lactona (16).

Un lote de 14 g del extracto de CH₂Cl₂ de vainas de *C. platyloba* impregnado en gel de sílice se llevó a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluyentes. Un lote de 2 g de las fracciones eluídas en la polaridad hexanos-AcOEt (1:1) fueron recromatografiadas, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyentes se utilizó hexanos y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad. En la fracción 9-12 de hexanos-AcOEt (9:1) se obtuvo 68 mg de cristales blancos de **16**, con punto de fusión de 110-113 °C.

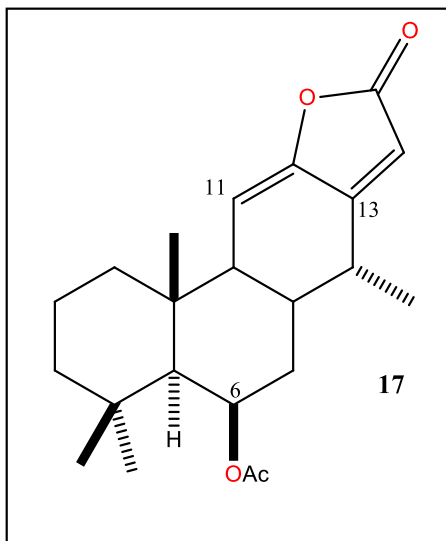


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) δ: 5.71 (1H, s, H-15), 5.51 (1H, sa, H-6), 2.91 (1H, m, H-14), 2.45 (1H, dd, 13.2 y 3.2, H-11a), 2.04 (3H, s, OAc), 1.16 (3H, d, J = 7.2, CH₃-17), 1.10 (3H, s, CH₃-18), 1.08 (1H, s, H-5), 1.00 (1H, s, CH₃-19), 0.98 (3H, s, CH₃-20). RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ: 171.8 (C, C-13), 171.3 (CO, Ac), 170.6 (CO-16) 113.3 (C, C-15), 105.8 (C, C-12), 69.3 (CH, C-6) 55.15 (CH, C-5), 45.0 (CH, C-9), 43.6 (CH₂, C-3), 41.9 (CH₂, C-1), 37.7 (CH₂, C-11), 37.6 (C, C-10), 36.0 (CH, C-14), 35.8 (CH, C-8), 35.4 (CH₂, C-7), 33.8 (C, C-4), 33.6 (CH₃, C-18), 29.6 (CH₃, C-19), 23.3 (CH₃, OAc), 21.7 (CH₂, C-2), 18.7 (CH₃, C-20), 12.8 (CH₃, C-17).

Aislamiento y extracción del 6 β -acetoxicassa-11,13-dien- γ -lactona (17).

Un lote de 14 gramos de extracto de CH₂Cl₂ de vainas de *C. platyloba* se llevó a separación por columna cromatográfica empleando gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad como eluyentes. Un lote de 1.8 g de las fracciones eluídas en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1) fueron purificadas por recromatografías sucesivas, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como eluyentes se utilizó mezclas de hexanos-AcOEt en orden creciente de polaridad. En la fracción hexanos-AcOEt (9:1) se obtuvieron 22 mg de cristales

blancos correspondientes a **17**, con punto de fusión de 227-230 °C. Cuya rotación específica fue de $[\alpha]_D = -26.4$ (c 0.42, CHCl₃), su espectro de masa de alta resolución exhibe un ion molecular $[M]^+$ en m/z 358.2144 el cual coincide con la fórmula molecular C₂₂H₃₀O₄, el espectro de IR se muestran en 1729 1753 cm⁻¹ dos bandas característica de grupos carbonilo. Absorción UV λ_{max} en 277 nm.

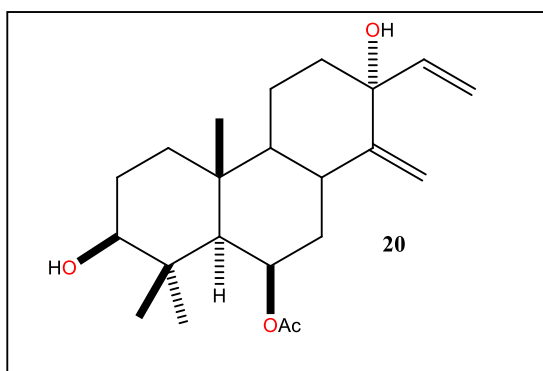


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) δ : 5.84 (1H, s, H-11), 5.78 (1H, s, H-15), 5.53 (1H, sa, H-6), 2.83 (1H, m, H-14), 2.18 (1H, m, H-8), 2.02 (1H, m, H-9), 2.04 (3H, s, OAc), 1.88 y 1.09 (2H, m, H-1), 1.72 y 1.62 (2H, m, H-7), 1.67 y 1.54 (2H, m, H-2), 1.42 y 1.21 (2H, m, H-3), 1.16 (3H, s, CH₃-20), 1.11 (1H, s, H-5), 1.05 (3H, d, J = 7.0, CH₃-17), 0.99 (3H, s, CH₃-19), 0.97 (3H, s, CH₃-18).

RMN de ¹³C (400 MHz, CDCl₃) δ : 170.3 (CO-16), 161.2 (C, C13), 150.0 (C, C-12), 111.0 (CH, C-15) 110.2 (CH, C-11), 69.1 (CH, C-6), 55.1 (CH, C-5), 48.7 (CH, C-9), 43.8 (CH₂, C-3), 40.6 (CH₂, C-1), 38.2 (C, C-10), 35.2 (CH₂, C-7), 33.9 (C, C-4), 33.1 (CH, C-8), 33.0 (CH₂, C-14), 23.0 (CH₃, C-19), 21.8 (CH₃, OAc), 18.6 (CH₂, C-2), 17.6 (CH₃, C-20), 14.6 (CH₃, C-17).

Aislamiento y extracción del 3 β ,13 α -dihidroxi-6-acetoxicassa-14(17),15(16)-dieno (20).

Un lote de 500 mg de extracto impregnado en gel de sílice se sometió a columna cromatográfica utilizando hexanos-AcOEt (19:1), Mediante cromatografías sucesivas se obtuvieron 15 mg de **20**.

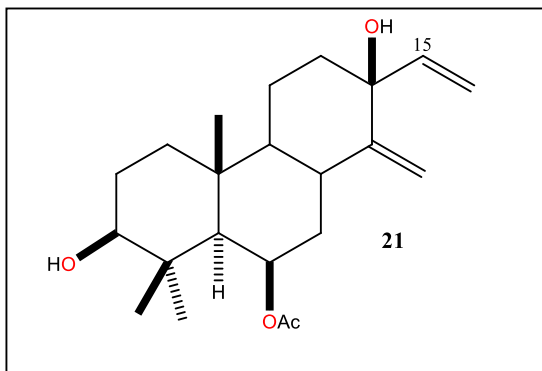


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃, J en Hz) δ ppm: 6.10 (1H, dd, J = 17.4, 10.4, H-15), 5.29 (1H, sa, H-6), 5.28 (1H, d, J = 17.6, 1.2 H-16'), 5.25 (1H, s, H-17'), 5.22 (1H, dd, J = 10.4, 1.2, H-16), 4.83 (1H, s, H-17), 3.16 (1H, m, H-3), 2.27 (1H, m, H-8), 2.11 (1H, m, H-11), 2.06 (3H, s, OAc), 1.52 (2H,

m, H-7), 1.52 (2H, m, H-2), 1.4 (2H, m, H-3), 1.25 (1H, m, H-9), 1.16 (3H s, Me-20), 1.07 (3H, s, Me-18), 0.97 (3H, s, Me-19). RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) δ : 170.3 (CO-Ac), 154.8 (C, C14), 142.5 (CH, C-15), 115.8 (CH, C-16), 106.3 (CH_2 , C-17), 78.9 (CH, C-3), 75.3 (C, C-13), 69.3 (CH, C-6), 56.1 (CH, C-9), 54.3 (CH, C-5), 40.4 (CH_2 , C-12), 39.3 (C, C-10), 39.3 (CH_2 , C-1), 37.6 (C, C-4), 36.3 (CH_2 , C-11), 33.7 (CH, C-8), 28.1 (CH_3 , C-18), 27.5 (CH_2 , C-2), 21.8 (CH_3 , Ac), 21.7 (CH_2 , C-7), 16.8 (CH_3 , C-20), 16.4 (CH_3 , C-19).

Aislamiento y extracción del 3 β ,13 β -dihidroxi-6-acetoxicassa-14(17),15(16)-dieno (21).

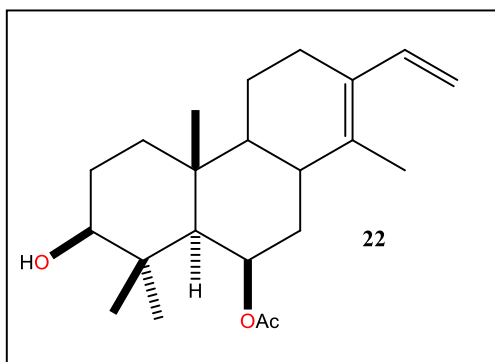
El eluato hexanos-AcOEt (1:1) de la columna cromatográfica de las fracciones 6-11 se sometió a separación cromatográfica en capa fina (CCF) impregnada en nitrato de plata. Donde se obtuvieron cristales incoloros, con punto de fusión 187-189 °C.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , J en Hz) δ ppm: 6.04 (1H, dd, $J = 17.4, 11.2$, H-15), 5.60 (1H, sa, H-6), 5.39 (1H, d, $J = 14.4$, 1.2 H-16'), 5.35 (1H, dd, $J = 9.2, 1.6$, H-16), 5.09 (1H, s, H-17), 4.90 (1H, s, H-1), 3.16 (1H, m, H-3), 2.57 (1H, m, H-8), 2.06

(3H, s, OAc), 1.25 (3H s, Me-20), 1.08 (3H, s, Me-18), 0.99 (3H, s, Me-19).

Aislamiento y extracción de 3 β -hidroxi-6 β -acetoxicassa-13,15-dieno (22). Un lote de 14.8 g de extracto de hojas de *C. platyloba* se sometió a separación cromatográfica las fracciones eluídas con la polaridad hexanos-AcOEt 3:7 fueron purificadas por una cromatografía en columna en las fracciones eluídas con la polaridad CH_2Cl_2 -AcOEt 95:5 se obtuvieron 120 mg una miel color café correspondiente al compuesto **22**.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 , J en Hz) δ ppm 6.79 (1H, dd, $J = 17.2, 10.9$, H-15), 5.4 (m, 1H, H-6), 5.12 (1H, d, $J = 17.2$, H-16'), 4.97 (d, $J = 10.9$), 3.17 (1H, m, H-3), 2.09 (s, 3H, OAc), 1.14 (s, 3H, H-20), 1.00 (s, 3H, H-19), 0.94 (s, 3H, H-18).

BIBLIOGRAFÍA

1. Dewick, M. Paul. 3er Edición. Ed. Wiley. **2009**, United Kingdom.
2. Avalos, G, A., Perez-Urria, C, E. Serie Fisiología Vegetal. **2009**, 2: 119-145.
3. Zhu, Yi, Zhun., Tan, Benny, K.H., Boon, Huat, Bay., Chang, Hong, Liu. "Ed World Scientific Publishing. **2007**, United States of America.
4. Newman, D. J., Cragg, G. Gordon. *Journal Natural Products*. **2016**, 79: 629-661.
5. Dias, D. A., Urban S., Roessner, U.A. *Metabolites*. **2012**, 2:303-333.
6. Chapman, A.D. Australian Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts, **2009**, 2da. Ed. Canberra, AU.
7. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z. *Medicinal Plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization*, **1985**, 63: 965-981.
8. Villaseñor, J.L. *Interciencia*, **2003**, 28: 1-9.
9. Toledo, V.M., "New paradigms of a new ethnobotany: Reflexions on the case of Mexico" 75-92, en "Schultes R.E., Von Reis S.; "Ethnobotany: Evolution and discipline" **1995**, Dioscorides Press, Portland, OR; USA.
10. Gómez, Espinoza, J. A., Gómez, González, G., Ra, Ximhai. *Revista Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. **2006**, 2: 97-126.
11. Heinrich, M., Robles, M., West, J., Ortiz, de Montellano, B., Rodriguez, E. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **1998**, 38: 539-565.
12. Cué, Bär, E., Villaseñor, J.L., Arredondo, Amezcua, L., Cornejo, Tenorio, G., Ibarra, Manríquez, G. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **2006**, 78: 47-81.
13. Villaseñor, J.L, Espinoza, G.F.J. *Diversity and Distribution*. **2004**, 10: 113-123.
14. Rzedowski, G.C., Rzedowski, J. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. **2005**, Pátzcuaro, Michoacán, México.
15. Rzedowski, J., Calderón, G. **1997**, Fascículo 51: 1-111.

16. Baldim Zanin, J. L., de Carvalho, B. A., Salles Martineli, P., Dos Santos, M. H., Lago J. H. G., Sartorelli P., Viegas Jr. C., Soares M.G. *Molecules*, **2012**, 17: 7887-7902.
17. Viglierchio, M., Toribio, M., Alonso, G., Bruni, M., Fernández, M., Ferreyra, M., Toso, R. Anuario de la Facultad de Ciencias Veterinarias. **2000**, Universidad Nacional de la Pampa. 34-46.
18. Kiem Phan Van PV, Minh Chau Van CV, Huong Hoang Thanh HT, Lee Jung Joon JJ, Kim Young Ho YH. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2005**, 53: 428-430.
19. Kamikawa, S., Oshimo, S., Ohta, E., Nehira, T., Omura, H., Ohta, S. *Phytochemistry*. **2016**, 121: 50-57.
20. Panpan, Z., Chunping, T., Sheng, T., Changqiang, K., Ge, L., Hui-Ming, H., Yang, Y. *Journal of Natural Products*. **2016**, 79: 24-29.
21. Álvarez-Esquivel F.E. Estereoquímica y configuración absoluta de diterpenos del género *Caesalpinia*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas. **2012**, Presentada en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
22. Gómez-Hurtado, M. A., Álvarez-Esquivel, F. E., Rodríguez-García G., Martínez-Pacheco, M. M., Espinoza-Madrigal, R. M., Pamatz-Bolaños, T., Salvador-Hernández, J. L., García-Gutiérrez H. A., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., del Río, R. E. *Phytochemistry*. **2013**, 96: 397-403.
23. Shahid, E. M., Jamal, Y. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2011**, 15:4732-4745.
24. Shay, E.G. *Biomass and Bioenergy*. 1993, 4, 227-242
25. Martin, Carlos., Moure, Andres., Martin, Galdo., Carrillo, Eugenio., Domínguez Herminia, Parajó, Juan C. *Biomass and Bioenergy*. **2010**, 34:533-538.
26. Morrison, T, R., Boyd, N, R. Química Orgánica 5a Edición. Ed: Pearson Education, **1998**.
27. Leung, D. Y. C., Wu, X., Leung, M. K. H. *Applied Energy*. **2010**, 87:1083-1095.

- 28.Shifter, I. Lopez, A, E. Usos y abusos de las gasolinas. Fondo de Cultura Economica, **1998**.
- 29.Vargas, G, M. Dirección de Ahorro de Energía en el Transporte. CONAE, **2005**.
- 30.Adewuyi, A., Oderinde R. A. *International Journal of Food Science*. **2014**, 2014:1-6.
- 31.Kulkarni, D. K., Bhagat R. B., Joshi, V. N. *Indian Journal of Tropical Biodiversity*. **2008**,16:93-96.
- 32.Razia, S., S. Rubina., S. Nighat., A. Farhana.,Tahsin, G. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2012**, 89:1021-1027.
- 33.Stewart, J. L., Dunsdon, A. J., Hellin, J. J., Hughes, C. E. University of Oxford, U.K. **1992**, 83 pp.
- 34.Atadashi, I. M., Aroua, M. K., Abdul, A. R., Sulaiman, N. M. N. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. **2013**,19:14-26.
- 35.Zabeti, M., Wan Daud, W. M. A., Aroua, M. K. *Fuel Processing Technology*. **2009**, 90:770-777.
- 36.Borugadda, V. B., Goud, V. V. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. **2012**, 16:4763-84.
- 37.Hernández-Hipólito, P., García-Castillejos, M., Martínez-Klimova, E., Juárez-Flores, N., Gómez-Cortes, A., Klimova, T. *Catalysis Today*. **2014**, 220-222:4-11.
- 38.Wang, Y. B., Jehng, J. M. *Chemical Engineering Journal*. **2011**, 175:548-554.
- 39.Chelladurai, K., Rajamanickam, M. *Journal of Catalysts*. **2014**, 2014:1-6.
- 40.Jiang, W., Lu, H. F., Qi. T., Yan, S. L., Liang, B. *Biotechnology Advances*. **2010**, 28:620-627.
- 41.Liu, Q., Wang, B., Wang, C., Tian Z., Qu, W., Ma, H., et al. *Green Chemistry*, **2014**, 16:2604-2613.
- 42.Morales, P., Severino, A., de Figueiredo, M., de Oliveira, C., Asumpção, C. *Energy*. **2014**, 75:453-462.

43. Cabrera-Munguía, D., González, H., Gutiérrez-Alejandre, A., Rico, J. L., Huirache-Acuña, R., Maya-Yescas, R., del Río, R. E. *Catalysis Today*. **2017**, 282; 2:195-203.
44. Burns D., Reynolds W.F., Buchanan G., Reese P.B., Enriquez R. **2000**. Magnetic Resonance in Chemistry, 38: 458-439.
45. Yadav, P.P., Maurya, R., Sarkar, J., Arora, A., Kanojiya, S., Sinha, S., Sristava, M.N., Raghubir, R. **2009**. *Phytochemistry* 70, 256-261
46. Talavera-Aleman A. **2015**. Tesis doctoral.
47. Yosueke, M., Jun, D., Yusueke, H., Kuinio, O., Hiroo, T., Chieko, H., Wiwied, E., Aty. W., Cholies, Z.N., Hiroshi, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2008**, 18, 3774-3777.
48. Torres, M, D., Urueña, G, L. D., Ortega, B, E., Capson, T, L., Cubilla, R, L. **2003**. *Journal of Natural Products*, 66, 928-932.
49. Demirbas, A. Biodiesel: A Realistic Fuel Alternative for Diesel Engines. Londres, Inglaterra: Springer. **2008**.
50. Silitonga, A. S., Masjuki, H. H., Mahlia, T. M. I., Ong, H. C., Atabani, A. E., Chong, W. T. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2013**, 24: 514-533.
51. Hajinezhad, A., Abedi, S., Ghobadian, B., Noorollahi, Y. *Energy Conversion and Management*. **2015**, 99:132-140.
52. Liu, Q., Wang, B., Wang, C., Tian, Z., Qu, W., Ma. H., et al. *Green Chemistry*, **2014**, 16:2604-2613.
53. Kowalik, P., Konkol, M., Antoniak-Jurak, K., Próchniack, W., Wiercioch, P., Rawski, M., et al. *Materials Research Bulletin*. **2015**, 65:149-156.
54. Souza-Santos, P., Vieira-Coelho, A. C., Souza-Santos, H., Kunihiro-Kiyohara, P. *Materials Research*. **2009**, 12:437-445.
55. Moraes, P., Severino, A., de Figueiredo, M., de Oliveira, C., Asumpção, C. *Energy*. **2014**, 75:453-462.
56. Jiang, W., Lu, H. F., Qi, T., Yan, S. L., Liang, B. *Biotechnology Advances*. **2010**, 28:620-627.

57. Yang, F., Wang, Q., Yan, J., Fang J., Zhao, J., Shen, W. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **2012**, 51:15386-15392.
58. Scott Fogler, H. *Elements of Chemical Reaction Engineering*. New Jersey. **1978**, 4:th ed, Pearson International Edition.
59. de Lima, A. L., Ronconi, C. M., Mota, C. J. A. *Catalysis Science & Technology*. **2016**, 6:2877-2891.
60. Elkady, M. F., Zaatout, A., Balbaa, *Journal of Chemistry*. **2015**, 2015: 1-9.
61. Ikwuagwu, O. E., Ononogbu, I. C., Njoku, O. U. *Industrial Crops and Products*, **2000**, 12:57-62.
62. Demirbas, A. *International Journal of Green Chemistry*. **2007**, 4: 15-26.
63. Mello, V. M., Oliveira, F. C. C., Fraga, W. G., do Nascimento, C. J., Suareza, P. A. Z. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2008**, 46:1051-1054.
64. Bhuiya, M. M. K., Rasul, M. G., Khan, M. M. K., Ashwath, N., Azad, A. K., Hazrat, M. A. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. **2016**, 55:1129-46.
65. Fraile, J. M., García, N., Mayoral, J. A., Pires, E., Roldán, L. *Applied Catalysis A: General*. **2010**, 387:67-74.