

13
26
g.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

T E S I S

CONSTITUYENTES DE LA *Cigarrilla mexicana*,
Parte II.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D. F.

1988

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Página
LISTA DE TABLAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vii
LISTA DE ESQUEMAS -----	ix
LISTA DE ABREVIACIONES -----	x
LISTA DE ESPECTROS -----	xi
INTRODUCCION -----	1
Antecedentes -----	1
Generalidades sobre cucurbitacinas -----	7
OBJETIVOS -----	35
Objetivo general -----	35
Objetivos específicos -----	35
PARTE EXPERIMENTAL -----	37
1.1 Materiales y métodos -----	37
1.1.1 Material vegetal -----	37
1.1.3 Análisis cromatográficos -----	37
1.1.4 Aislamiento y purificación de los compuestos ----	39
a) Aislamiento de la 2-β-D-glucocucurbitacina B (43) -----	39

	Página
b) Aislamiento de la 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) -----	39
c) Aislamiento de (45) -----	40
1.1.5 Caracterización de los compuestos aislados -----	46
- Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	46
- Prueba de Molisch para carbohidratos -----	46
- Hidrólisis enzimática con celulasa de los compuestos 43 y 44 -----	47
- Determinación de azúcares en los productos de hidrólisis enzimática de los compuestos 43 y 44 -----	47
- Hidrólisis enzimática de 43 y 44 con β -glucosidasa -----	48
- Obtención de 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (46) -----	48
- Obtención de la 23,24-dihidrocucurbitacina F-25-acetato (46a) -----	51
- Preparación de derivados acetilados -----	51
- Reducción de 43 con NaBH ₄ -----	52
- Determinación de la actividad fasciolicida <i>in vitro</i> del extracto metanólico de la <i>Cigarrilla mexicana</i> y de los compuestos 2- β -D-glucocucurbitacina B (43) y de la 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) -----	53

	Página
RESULTADOS Y DISCUSION -----	56
RESUMEN Y CONCLUSIONES -----	91
BIBLIOGRAFIA -----	93
APENDICE -----	98

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto metanólico de la <i>Cigarrilla mexicana</i> (Camacho C. y Ríos P., 1987) -----	5
Tabla 2. Ejemplos de cucurbitacinas aisladas de diversas fuentes naturales -----	11
Tabla 3. Glicocucurbitacinas naturales -----	13
Tabla 4. Propiedades físicas de algunas cucurbitacinas --	21
Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN^1H de algunas cucurbitacinas -----	24
Tabla 6. Valores de las constantes de acoplamiento ----	25
Tabla 7. Desplazamientos químicos de protones de grupos metilo y acetato -----	26
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN^1H en CDCl_3 de algunas cucurbitacinas -----	27
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN^{13}C para algunas cucurbitacinas -----	30
Tabla 10. Fragmentos característicos en Espectrometría de masas de algunas cucurbitacinas -----	31

	Página
Tabla 11. Sistema de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	32
Tabla 12. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 759-787 de la columna original -----	41
Tabla 13. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 613-638 de la Tabla 12 -----	43
Tabla 14. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 788-861 de la columna original (Tabla 1) -----	44
Tabla 15. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 862-904 de la columna original (Tabla 1) -----	45
Tabla 16. Hidrólisis enzimática con celulasa de los compuestos <u>43</u> , <u>44</u> y <u>46</u> -----	49
Tabla 17. Derivados acetilados de los compuestos obtenidos -----	50
Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2- β -D-gluco-cucurbitacina F-25-acetato (<u>44</u>) y de su derivado acetilado (<u>44b</u>) -----	58
Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina F-25-acetato (<u>44a</u>) y de su derivado acetilado (<u>44c</u>) -----	66

	Página
Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (<u>46a</u>) y su derivado acetilado (<u>46b</u>) -----	73
Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2- β -D-glucó-cucurbitacina B (<u>43</u>) y de su derivado acetilado (<u>43b</u>) -----	81
Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina B (<u>43a</u>) y de su derivado aceti- lado (<u>43c</u>) -----	87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de la <i>Cigarrilla mexicana</i> (Camacho C. y Rios P., 1987) -----	4
Figura 2. Esqueleto base de las cucurbitacinas -----	7
Figura 3. Estructuras de las cucurbitacinas A (<u>9</u>) y B (<u>10</u>) -----	8
Figura 4. Estructuras de los Momordicosidos A (<u>11</u>) y B (<u>12</u>) -----	9
Figura 5. Obtención de la cucurbitacina S (<u>13</u>) -----	16
Figura 6. Estructuras de cucurbitacinas -----	17
Figura 7. Agliconas tipo de las Glicocucurbitacinas --	18
Figura 8. Biosíntesis de las cucurbitacinas -----	20
Figura 9. Estructuras adicionales de cucurbitacinas --	28
Figura 10. Comparación de los desplazamientos de los carbonos cuaternarios (Parte A) y de los metilos (Parte B) de algunas cucurbitacinas -	32
Figura 11. Mecanismo de acción de efecto citotóxico de las cucurbitacinas (Kupchan, et al., 1972) --	34

	Página
Figura 12. Espectro de RMN^1H de <u>44</u> en Py-d_5 -----	61
Figura 13. Región olefínica y de protones unidos a funciones oxigenadas del espectro de RMN^1H del derivado acetilado <u>44b</u> -----	64
Figura 14. Fragmentos más importantes del espectro de masas de <u>44a</u> -----	67
Figura 15. Estructura de la cadena lateral del compuesto <u>44</u> -----	68
Figura 16. Región de los protones base de éster de la aglicona del compuesto <u>44</u> -----	70
Figura 17. Protones base de éster del triacetato de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato ---	72
Figura 18. Patrón de fragmentación de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato -----	76
Figura 19. Experimento de desacoplamiento para <u>44b</u> y <u>43b</u> -----	79
Figura 20. Región de protones base de éster de la aglicona del compuesto <u>43</u> -----	86
Figura 21. Región asignada a H-2 tanto para el glicósido acetilado (<u>43b</u>) como para la aglicona acetilada (<u>43c</u>) -----	88

LISTA DE ESQUEMAS

Página

Esquema 1. Extracción de *Cigarrilla mexicana* ----- 3

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro E-1. Espectro de IR de la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) -----	98
Espectro E-2. Espectro de RMN ¹³ C de la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) -----	99
Espectro E-3. Espectro de IR del derivado acetilado de la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44b) -----	100
Espectro E-4. Espectro de RMN ¹ H del derivado acetilado de la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44b) -----	101
Espectro E-5. Espectro de masas de la cucurbitacina F-25-acetato (44a) -----	102
Espectro E-6. Espectro de RMN ¹ H del derivado acetilado de la cucurbitacina F-25-acetato (44c) --	103
Espectro E-7. Espectro de IR de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) -----	104
Espectro E-8. Espectro de RMN ¹ H de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) -----	105
Espectro E-9. Espectro de RMN ¹³ C de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) -----	106

	Página
Espectro E-10. Espectro de RMN^1H del derivado acetilado de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46b) -----	107
Espectro E-11. Espectro de IR de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43) -----	108
Espectro E-12. Espectro de RMN^1H de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43) -----	109
Espectro E-13. Espectro de RMN^{13}C de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43) -----	110
Espectro E-14. Espectro de IR del derivado acetilado de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43b)-----	111
Espectro E-15. Espectro de RMN^1H del derivado acetilado de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43b) -	112
Espectro E-16. Espectro de masas de la cucurbitacina B (43a) -----	113
Espectro E-17. Espectro de RMN^1H del derivado acetilado de la cucurbitacina B (43c) -----	114

LISTA DE ABREVIACIONES

- Ac: Acetato
- CDCl_3 : Cloroformo deuterado
- d: doblete
- dd: doble de dobles
- D_2O : Agua deuterada
- DMSO-d_6 : Dimetilsulfóxido hexadeuterado
- EMIE: Espectro de masas obtenido por impacto electrónico.
- EMIQ: Espectro de masas obtenido por ionización química.
- Fig: Figura
- Hz: Hertz
- IR: Infrarrojo
- J: Constante de acoplamiento
- MHz: Mega hertz
- pf: punto de fusión
- ppm: partes por millón
- Py-d_5 : Piridina pentadeuterada
- RMN^1H : Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
- RMN^{13}C : Resonancia magnética nuclear de carbono
- s: singulete
- t: triplete
- TMS: Tetrametilsilano
- UV: Ultravioleta
- δ : ppm

INTRODUCCION

1. Antecedentes.

La *Cigarrilla mexicana* (Zucc et Martius ex DC) Aiello, conocida popularmente como cigarro, cigarrilla y cacaloxochilt, es una planta de la familia Rubiaceae, endémica de México. Tiene la particularidad de ser la única especie del género, y se encuentra distribuida principalmente en los Estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León.

Sus hojas y cortezas son extramadamente amargas, y se emplean medicinalmente en diversas regiones del país, por ejemplo, en Hidalgo se usa como emético (Aiello, 1979) y en Veracruz como antiambiano (Lorence, 1986).

En un estudio fitoquímico previo a este trabajo (Camacho C. y Ríos, P., 1987) se aislaron de esta especie tres ácidos triterpénicos, tres cucurbitacinas y el polialcohol manitol, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.

Dos de los ácidos triterpénicos fueron caracterizados como el ácido ursólico (1) y el ácido oleanólico (2), los cuales se obtuvieron en mezcla de las fracciones 223-256 de la columna de la Tabla 1.

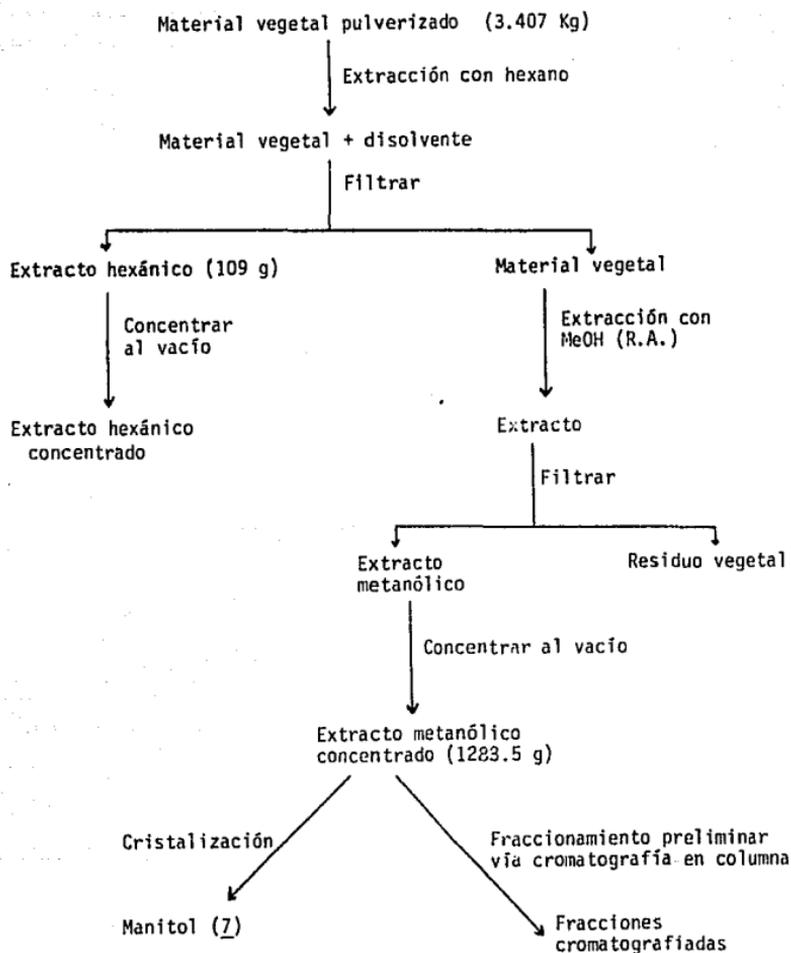
El ácido oleanólico se separó del ursólico mediante la formación de la bromolactona oleanólica y posterior cromatografía en columna.

El otro ácido triterpénico aislado fue el ácido 3 β -23-dihidro-

urs-12-en-28-oico (3) (representando este un nuevo producto natural). Los cucurbitanos fueron identificados como la cucurbitacina E (4), la isocucurbitacina B (5) y la epi-isocucurbitacina B (6); todos ellos se aislaron de las fracciones 457- 586 de la columna original (Tabla 1), obteniéndose la última en mezcla con la isocucurbitacina B.

Por último, el polialcohol manitol (7), se obtuvo por cristalización espontánea del extracto metanólico, tal como se indica en el Esquema 1.

En el Esquema 1 se resume la obtención del extracto metanólico del estudio previo y en la Tabla 1 se resume el fraccionamiento vía cromatografía en columna de dicho extracto, los eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y observaciones adicionales.



Esquema 1. Extracción de *Cigarrilla mexicana*.

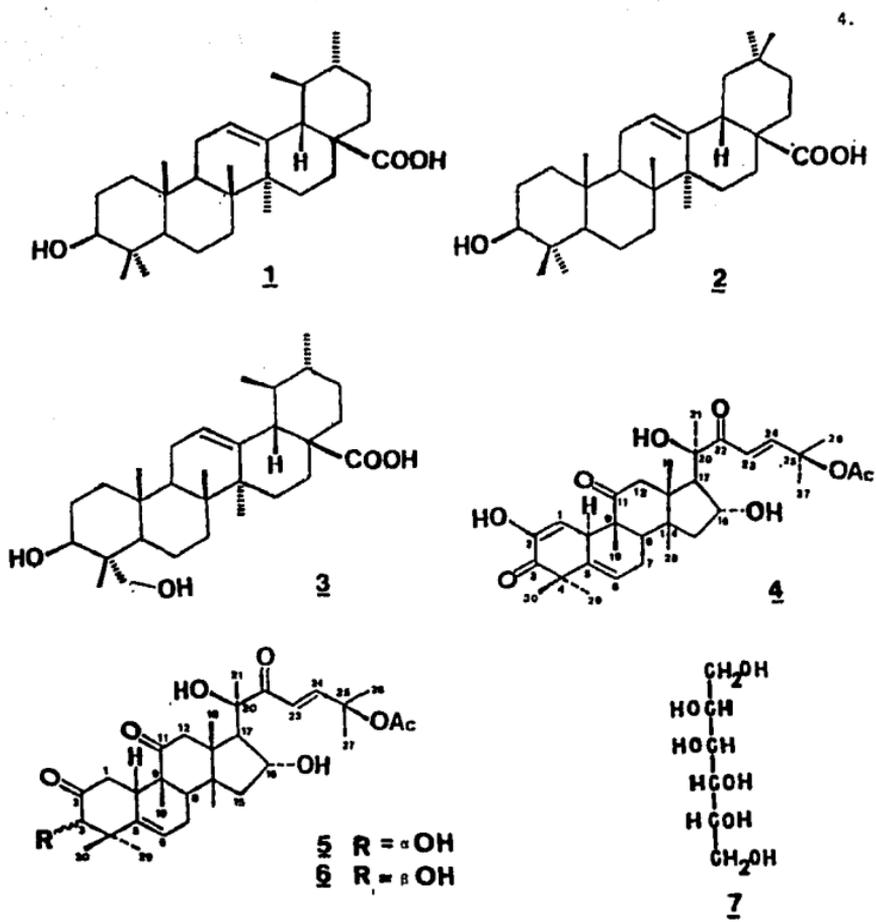


Figura 1. Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de la *Cigarrilla mexicana* (Camacho C. y Ríos P., 1987).

Tabla 1. Resumen del fraccionamiento vfa cromatografía en columna del extracto metanólico de la *Cynanchum mexicanum*. (Camacho C. y Ríos P., 1987).

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fraciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor
Hexano:cloroformo	9:1	1- 70	4- 23	sólido	blanco verdoso	parafina
			24- 34	aceitoso		
			35- 46			
			47- 54			
			55- 71			
	8:2	71- 91	72- 92	sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina
	5:5	92-106	93-100			
Cloroformo	100	107-159	101-104	sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina
			105-108	sólido aceitoso amorfo	blanco verdoso	parafina
Cloroformo:AcOEt	9:1	127-140 160-419	141-165	sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina
			166-170			
			171-175	sólido aceitoso	blanco verdoso	parafina
			176-181	sólido quebradizo	blanco verdoso	no
			182-183	sólido quebradizo	blanco verdoso	no
			184-199	sólido quebradizo	verdoso	no
			200-222	sólido quebradizo	verdoso	no
			223-230	sólido amorfo	blanco verdoso	no
			231-245	sólido amorfo	blanco amarillo	no
			246-267	sólido amorfo	amarillo canario	no
			268-285	sólido amorfo	amarillo canario	no
			286-296	sólido amorfo	amarillo canario	no
			297-312	sólido amorfo	amarillo canario	no
313-347	sólido amorfo	amarillo canario	no			
348-397	sólido amorfo	amarillo verdoso	no			

Tabla 1. Resumen del fraccionamiento *via* cromatografía en columna del extracto metanólico de la *Cigarilla mexicana*. (Camacho y Ríos, 1987). (Continuación).

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Tipo de residuo	Color	Sabor	
Cloroformo-AcOEt	8:2	420-476	398-456	sólido amorfo	amarillo verdoso	no	
		477-500	457-472	sólido amorfo	blanco verdoso	amargo	
		501-519	473-510	sólido amorfo	amarillo verdoso	amargo	
	7.5:2.5	511-536	511-536	sólido amorfo	amarillo verdoso	amargo	
		527-543	527-543	sólido amorfo	amarillo verdoso	amargo	
		544-556	544-556	sólido amorfo	amarillo tenue	amargo	
	7:3	557-586	557-586	sólido amorfo	amarillo canario	amargo	
		587-614	587-614	sólido amorfo	amarillo canario	amargo	
		615-691	615-691	sólido amorfo	blanco verdoso	amargo	
	6:4	692-711	692-711	sólido amorfo	blanco verdoso	amargo	
		712-738	712-738	sólido amorfo	blanco verdoso	amargo	
		723-753	723-753	sólido amorfo	blanco verdoso	amargo	
	5:5	739-758	739-758	sólido cristalino	blanco verdoso	amargo	
754-869		754-869	sólido cristalino	amarillo canario	amargo		
759-787		759-787	espumoso				
AcOEt:MeOH	4:6	788-813	788-813	sólido espumoso	amarillo canario	amargo	
		814-841	814-841	sólido espumoso	verde	amargo	
		842-861	842-861	sólido espumoso	verde	amargo	
	3:7	862-900	862-900	sólido espumoso	verde	amargo	
		901-904	901-904	sólido amorfo	ambar	amargo	
		905-939	905-939	sólido amorfo	ambar	amargo	
	2:8	906-939					
1:9	906-939						
9:1	906-939						

2. Generalidades sobre cucurbitacinas.

2.1 Variación estructural y distribución en la naturaleza.

Las cucurbitacinas son un grupo de triterpenos tetracíclicos que tienen como núcleo base el del cucurbitano [19-(10+9 β)-abeo-10 α -lanost-5-eno], cuya estructura se indica en la Figura 2 (8).

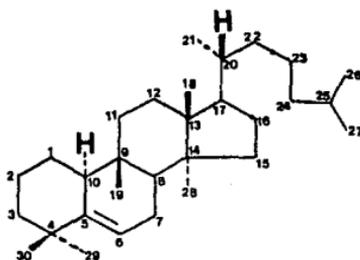
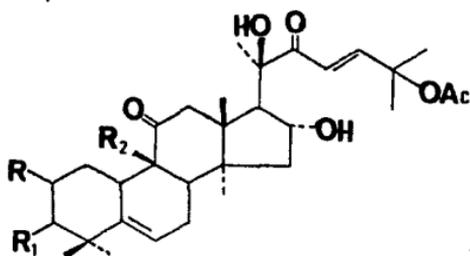


Figura 2. Esqueleto base de las cucurbitacinas.

Las cucurbitacinas como muchos triterpenos se pueden encontrar en la naturaleza en forma libre o formando combinaciones glicosídicas.

En general, la parte tetracíclica de estos compuestos posee funciones oxigenadas en C-2, C-3, C-11 y en C-16, como se puede observar en las cucurbitacinas E (4), la isocucurbitacina B (5) y la epi-isocucurbitacina B (6) de la Figura 1. En raras ocasiones, el metilo en C-19 se encuentra oxigenado, como en los casos de las cucurbitacinas A (9) y C (10) (Figura 3). Cabe hacer notar

que se conocen cucurbitacinas no oxigenadas en C-11 y en C-2; como ejemplos se pueden citar los Momordicósidos A (11) y B (12) (Figura 4) y la cucurbitacina C (10) respectivamente.



<u>9</u>	R=OH	R ₁ =ceto	R ₂ =CH ₂ OH
<u>10</u>	R=H	R ₁ =OH	R ₂ =CH ₂ OH

Figura 3. Estructuras de las cucurbitacinas A (9) y C (10).

La función oxigenada en C-16 es siempre un hidroxilo y la de C-11 es siempre un grupo ceto; en tanto que las mismas en C-3 y C-2 pueden ser las correspondientes a un alcohol secundario ó a una cetona (ver estructuras 5 y 6 de la Figura 1).

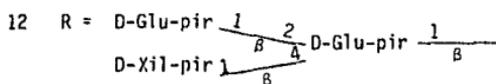
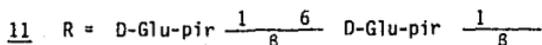
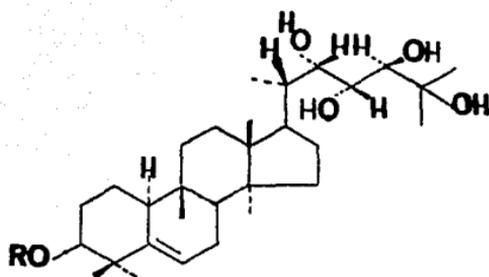


Figura 4. Estructuras de los Momordicosidos A (11) y B (12).

En todas las cucurbitacinas el sistema tetracíclico contiene un doble enlace entre C-5 y C-6. También existen algunas con doble enlace entre C-1 y C-2, y este casi siempre forma parte de un sistema diosfenol, como por ejemplo en la cucurbitacina E (4).

En lo que respecta a la cadena lateral, esta se encuentra invariablemente oxigenada en C-20, C-22 y C-25, en donde generalmente C-22 es un grupo ceto, con excepción de los Momordicosidos A y B (11 y 12, Figura 4). Así mismo, esta cadena puede ser saturada o insaturada. En el segundo caso la insaturación está siempre presente entre C-23 y C-24.

Es de hacer notar, que se conocen cucurbitacinas como la S (13), que poseen uno o dos anillos de naturaleza heterocíclica. Muy posiblemente estos compuestos son artefactos y se originan por la adición conjugada del hidroxilo en C-16 a la doble ligadura de la cadena lateral, tal como se indica en la Figura 5. Hasta la fecha estos compuestos solo han sido aislados de la *Brionia dioica* Jack (Hylands, et al, 1982).

Las cucurbitacinas en forma libre han sido aisladas de diversas fuentes naturales, principalmente de la familia Cucurbitaceae. También se les encuentra en Elaeocarpaceae (Bittner, et al, 1972), Liliaceae (Kupchan, et al, 1977), Polimoniaceae (Arisawa, et al, 1982), Rubiaceae (Reguero, et al, 1987), Thymelaceae (Schun, et al, 1985), Sterculiaceae (Bean, et al, 1985) y Scrophulariaceae (Bauer, 1983). Ejemplos de estos compuestos, así como sus fuentes naturales se indican en la Tabla 2 y sus estructuras correspondientes se ilustran en la Figura 6.

Los glicósidos de las cucurbitacinas son más escasos, y presentan una distribución más restringida. La porción azucarada es variable, encontrándose así desde un simple monosacárido (siendo el más común la β -D-Glucosa) hasta trisacáridos. Esta porción se encuentra unida generalmente a la aglicona en C-2 o bien en C-3, con las excepciones del Datiscósido (33) (Kupchan, 1971), dos glicósidos aislados de *Brionia dioica* Jacq (32) (Panosyan, 1979) y de los momordicósidos K y L (36) (Okabe, 1980), en los que la unión glicosídica se establece a través de C-15, C-25 y C-7 res-

Tabla 2. Ejemplos de cucurbitacinas aisladas de diversas fuentes naturales.

Cucurbitaceae	Cucurbitacina A (9)	Cucurbitacina B (14)	Dihidro-B (15)	Iso-B (5)	Epi-Iso-B (6)	Cucurbitacina C (10)	Cucurbitacina D (16)	22-Deoxo-D (17)	22-Iso-deoxo-D (18)	Cucurbitacina E (4)	Cucurbitacina F (19)	Dihidro-F (20)	Dihidro-F-25-acetato (21)	Cucurbitacina G (22)	Cucurbitacina H (23)	Cucurbitacina I (24)	Tetrahidro I (25)	Cucurbitacina J (26)	Cucurbitacina K (27)	Cucurbitacina L (28)	Cucurbitacina O (29)	Cucurbitacina P (30)	Cucurbitacina Q (31)	Cucurbitacina S (33)	Referencias
<u>Acanthosicyos horrida</u> Welw. ex Hook f.	X	X												X	X										Hylands, et al, 1985
<u>Benincasa hispida</u>									X																Silapa, 1982
<u>Brandegea bigelovii</u> Cogn.								X																	Kupchan, et al, 1970
<u>Brionia alba</u>		X															X								Panosyan, 1984
<u>Brionia dioica</u> Jacq.		X				X			X					X	X										Hylands, et al, 1975
<u>Citrullus colocynthis</u>		X							X					X	X										Murty, et al, 1970
<u>Citrullus vulgaris</u>		X							X					X											Silapa, 1982
<u>Cumumis leptodemis</u>																					X	X			Lawie, et al, 1971
<u>Cucumis melo</u> L.	X					X			X						X										Silapa, H.R. Shang, 1982
<u>Cucumis prophetarum</u>		X				X			X					X	X								X		Rao, et al, 1968
<u>Cucumis sativus</u> var. <u>Hanzli</u>		X				X																			Vigar, et al, 1973
<u>Ecballium elaterium</u>		X				X	X		X	X				X	X	X				X					González, et al, 1968
<u>Echinocystis fabacea</u>		X												X	X										Kupchan, et al, 1972
<u>Lagenaria siceraria</u>		X				X	X	X																	Toshihiro, 1980
<u>Luffa acutangula</u>		X				X																			Enslin, et al, 1967
<u>Luffa echinata</u>		X							X																Silapa, et al, 1982
<u>Luffa operculata</u>		X				X																			Murty, et al, 1970
<u>Marah peregana</u> H.		X	X							X															Bauer, 1983
<u>Trichosanthes cucumerina</u>		X																							Kupchan, et al, 1967, 1977
<u>Tropaeum majus</u>		X				X			X																Silapa, et al, 1981
																									Wojciechowska, 1983

*El número en paréntesis corresponde al número de estructura.

Tabla 2. Ejemplos de cucurbitacinas aisladas de diversas fuentes naturales. (Continuación).

Elaeocarpaceae	* Cucurbitacina A (9)	Cucurbitacina B (14)	Dihidro-B (15)	Iso-B (5)	Epi-Iso-B (6)	Cucurbitacina C (10)	Cucurbitacina D (16)	22-Deoxo-D (7)	22-Iso-deoxo-D (18)	Cucurbitacina E (4)	Cucurbitacina F (19)	Dihidro-F (20)	Dihidro-F-25-acetato (21)	Cucurbitacina G (22)	Cucurbitacina H (23)	Cucurbitacina I (24)	Tetrahidro I (25)	Cucurbitacina J (26)	Cucurbitacina K (27)	Cucurbitacina L (28)	Cucurbitacina O (29)	Cucurbitacina P (30)	Cucurbitacina q (31)	Cucurbitacina S (13)	Referencia	
<u>Crinodendron hookerianum</u> Gray							X				X	X														Bittner, <i>et al.</i> , 1972
<u>Elaeocarpus dolichostylus</u> Schltr.											X	X														Xinde, <i>et al.</i> , 1984
Liliaceae																										
<u>Phoridium fenax</u> Fast							X									X										Kupchan, <i>et al.</i> , 1977
Polmoniferae																										
<u>Ipomopsis aggregata</u> (Pursh) V. Grant		X		X	X																					Arisawa, <i>et al.</i> , 1984
Rubiaceae																										
<u>Cigarrilla mexicana</u> Aiello					X	X				X																Mata, <i>et al.</i> , 1987
<u>Hintonia latiflora</u>											X	X														Reguero, <i>et al.</i> , 1987
Thymelacaeae																										
<u>Gyrlorus walla</u>																X										Schun-Yen, 1985
Sterculiaceae																										
<u>Helicteres isora</u>		X																								Bean, 1985
Scrophulariaceae																										
<u>Gratiola officinalis</u>									X							X										Bauer, 1983

*[El número en paréntesis corresponde al número de estructura.

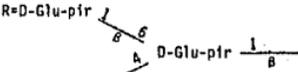
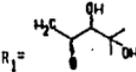
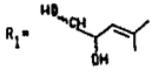
Tabla 3. Glucocucurbitacinas Naturales.

Fuente natural y Glicósido	Esq. base	Grupos funcionales	Azúcar	Hidrólisis	Referencia
<u>Anagallis arvensis</u> (Primulaceae)					
-Arvenina I	32	R ₁ =OAc	R=2-β-D-Glu	Ácida (H ₂ SO ₄ 0.5N)	Yamada, <i>et al.</i> , 1978
-Arvenina II		R ₁ =OAc, 23,24-dihidro			
-Arvenina III		R ₁ =H			
-Arvenina IV		R ₁ =H 23,24-dihidro			
<u>Brionia dioica</u> Jacq. (Cucurbitaceae)					
-Briomaride		Δ ² , R ₁ =H, 23, 24-dihidro	R=2-β-D-Glu	Enzimática (β-Glicosidasa)	Hylands, <i>et al.</i> , 1976
-Glicósido I		R=H 23,24-dihidro	R ₁ =25-β-D-Glu		Panosyan, <i>et al.</i> , 1979
-Glicósido II		23,24-dihidro	R=R ₁ =25-β-D-Glu		
<u>Cayaponia tavyua</u> (Cucurbitaceae) Vell Cong.					
-Arvenina I		R ₁ =OAc	R=2-β-D-Glu	Enzimática (Celulasa)	Bauer, <i>et al.</i> , 1984
-Arvenina II		R ₁ =OAc, 23,24-dihidro			
-Arvenina IV		R ₁ =H, 23,24-dihidro			
<u>Citrullus lanatus</u> (Cucurbitaceae)					
-Glicósido I		Δ ² , R ₁ =OAc	R=2-β-D-Glu	Enzimática (β-Glicosidasa)	Ripperger, <i>et al.</i> , 1975
-Glicósido II					

Tabla 3. Glicocucurbitacinas Naturales. (Continuación).

Fuente natural y Glicósido	Esq. base	Grupos funcionales	Azúcar	Hidrólisis	Referencia
<u>Cucurbita pepo</u> (Cucurbitaceae) -Glicósido I		Δ^2 , $R_1=OAc$	R-2- β -D-Glu	Enzimática (β -Glucosidasa)	Hutt, 1986
<u>Datisca glomerata</u> (Cucurbitaceae) Baill -Datiscósido	<u>33</u>		C-15,2'-O-acetil-6'- dioxi- α -L-Gluco-he- xos-3'-ulo-piranosido	Ácida (H_2SO_4 2N)	Kupchan, et al., 1971, 1973
<u>Ecballium elaterium</u> (Cucurbitaceae) -Glicósido I -Glicósido II	<u>32</u>	$R_1=H$ $R_1=OAc$	R-2- β -D-Glu	Enzimática (β -Glucosidasa)	Seiffert, et al., 1977
<u>Hymenoclea amabilis</u> (Cucurbitaceae) -Glicósido I	<u>32</u>	23,24-dihidro 26-hidroxi-25-Me	R-2- β -D-Glu	Enzimática (β -Glucosidasa)	Rui, et al., 1984
<u>Momordica charantia</u> L (Cucurbitaceae) -Momordicósido A	<u>11</u>		R-D-Glu-pir $\frac{1}{\beta}$ $\frac{6}{\beta}$ D-Glu-pir $\frac{1}{\beta}$	Enzimática (Celulasa)	Okabe, et al., 1980-1987

Tabla 3. Glicocucurbitacinas Naturales. (Continuación).

Fuente natural y Glicósido	Esq. base	Grupos funcionales	Azúcar	Hidrólisis	Referencia
<u>Momordica charantia</u> L (Cucurbitaceae)					Okabe, et al, 1980, 1987
-Momordicósido B	<u>12</u>		R=D-Glu-pir		
					
-Momordicósido C	<u>34</u>		D-Xil-pir	R=β-gentiobiosil	Enzimática (Hesperidínasa)
-Momordicósido D					
-Momordicósido E		R ₁ =CHO	R=20(α)β-gentiobiosil		
-Momordicósido F ₁	<u>35</u>	R ₁ =Me	R=Glucopiranosil		
-Momordicósido F ₂		R ₁ =H	R=D-Alopiranosido		
-Momordicósido G		R ₁ =Me			
-Momordicósido I		R ₁ =H	R=Glucopiranosil		
-Momordicósido K	<u>36</u>	R ₁ =Me	R=α-D-Glucopiranosil		
-Momordicósido L		R ₁ =H			
<u>Picrorhiza kurroa</u>					
R & B	<u>32</u>	R ₁ =OAc	R=Glucosiloxil	Enzimática (Naringinasa)	Laurie, et al, 1985

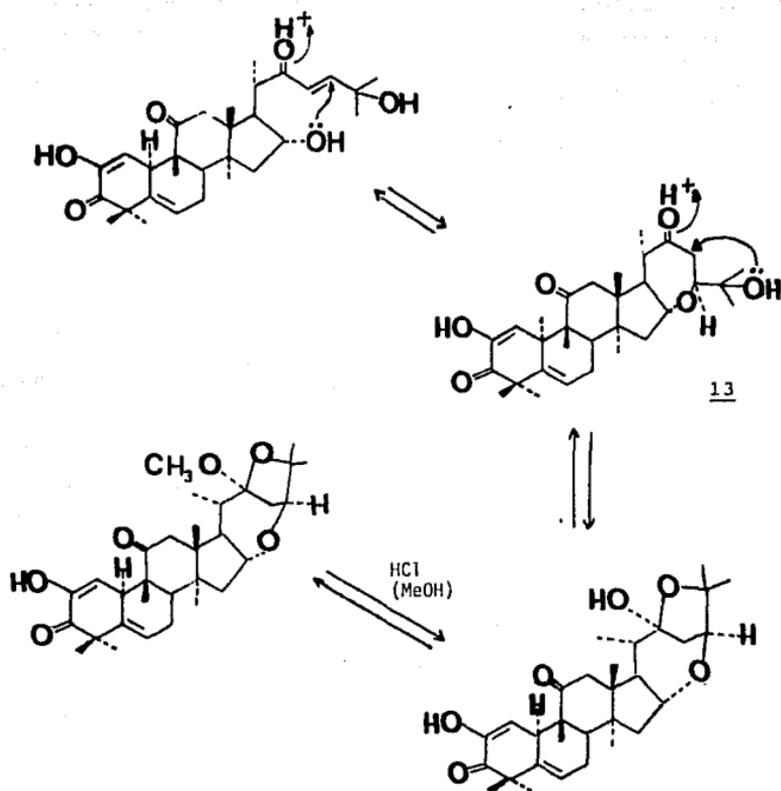
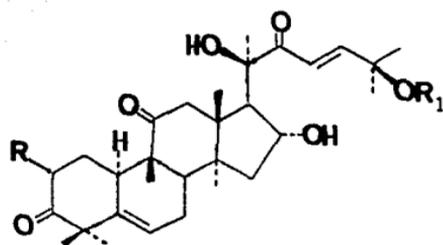
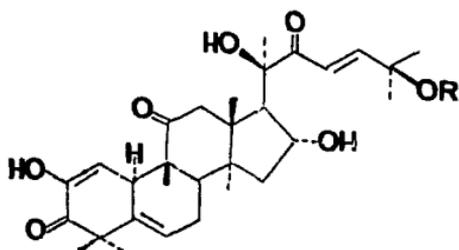


Figura 5. Obtención de la Cucurbitacina 3 (13).

(14) R=H R₁=AC(15) R=H R₁=Ac 23,24-dihidro(16) R=R₁=H

(17) 22=deoxo

(18) 1-ceto, 2-hidroxi, 22-deoxo

(22) R=R₁=H 23,24-dihidro 24-hidroxi(23) R=R₁=H 23,24-dihidro 24-hidroxi

(24) R=H

(25) R=H 1,2 y 23,24-tetrahidro

(28) R=H 23,24-dihidro

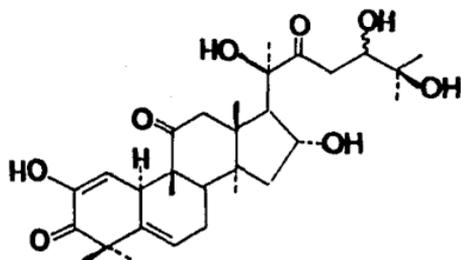
(26) 24- α -hidroxi(27) 24- β -hidroxi

Figura 6. Estructura de cucurbitacinas.

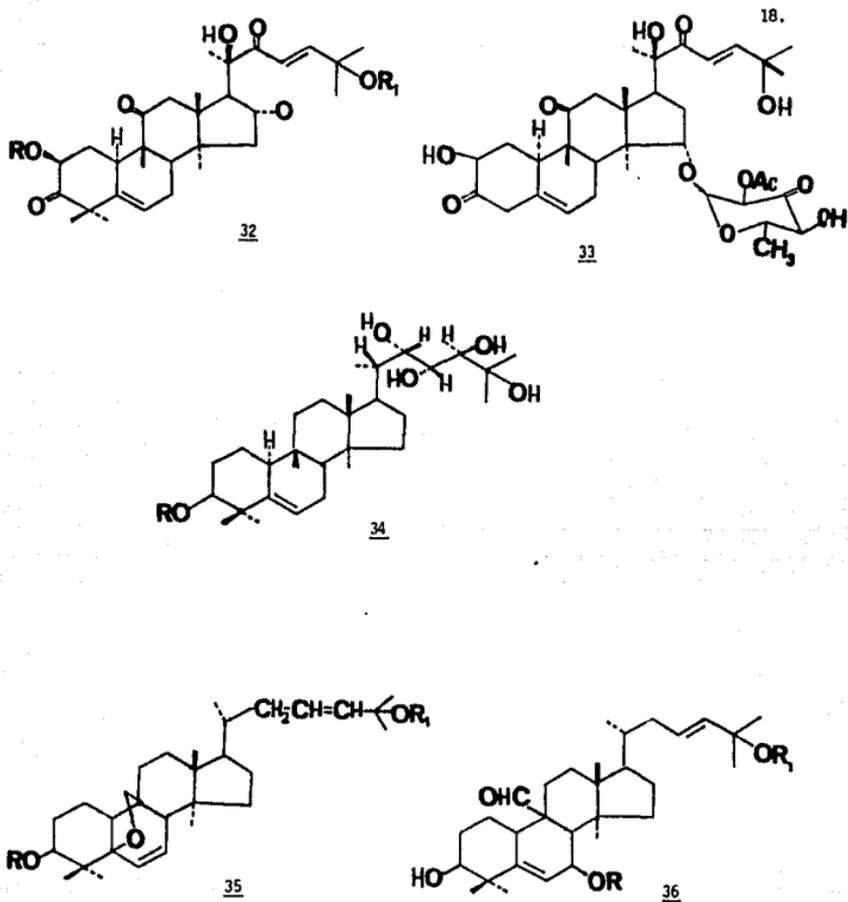


Figura 7. Agliconas de las glicocucurbitacinas.

pectivamente.

En la Tabla 3 se señalan ejemplos de estos glicósidos, condiciones de hidrólisis, sus esqueletos base y las referencias correspondientes. En la Figura 7 se ilustran las estructuras de los glicósidos de las cucurbitacinas resumidas en la Tabla 3.

2.2 Biosíntesis.

En relación a la biogénesis de estos compuestos son escasos los estudios realizados. Como la mayoría de los triterpenos son metabolitos resultantes de la ruta del acetato-mevalonato, formándose a partir del epoxi-escualeno como se indica en la Figura 8.

2.3 Propiedades físicas.

Son sólidos cristalinos, de sabor amargo, ópticamente activos; tanto las agliconas como los glicósidos son solubles en disolventes de mediana y alta polaridad; sus puntos de fusión son muy variables. En la Tabla 4 se indican el punto de fusión y la rotación óptica de algunas cucurbitacinas.

2.4 Determinación estructural.

Para la elucidación estructural de las cucurbitacinas, se han utilizado tanto métodos químicos como físicos (espectroscópicos, espectrométricos y difracción de rayos X).

Los métodos químicos se utilizaron casi exclusivamente en la década de los sesentas y a principio de los setentas. Dos excelentes revisiones acerca de métodos químicos para la elucidación estructural de cucurbitacinas han sido publicados (Lavie, *et al*,

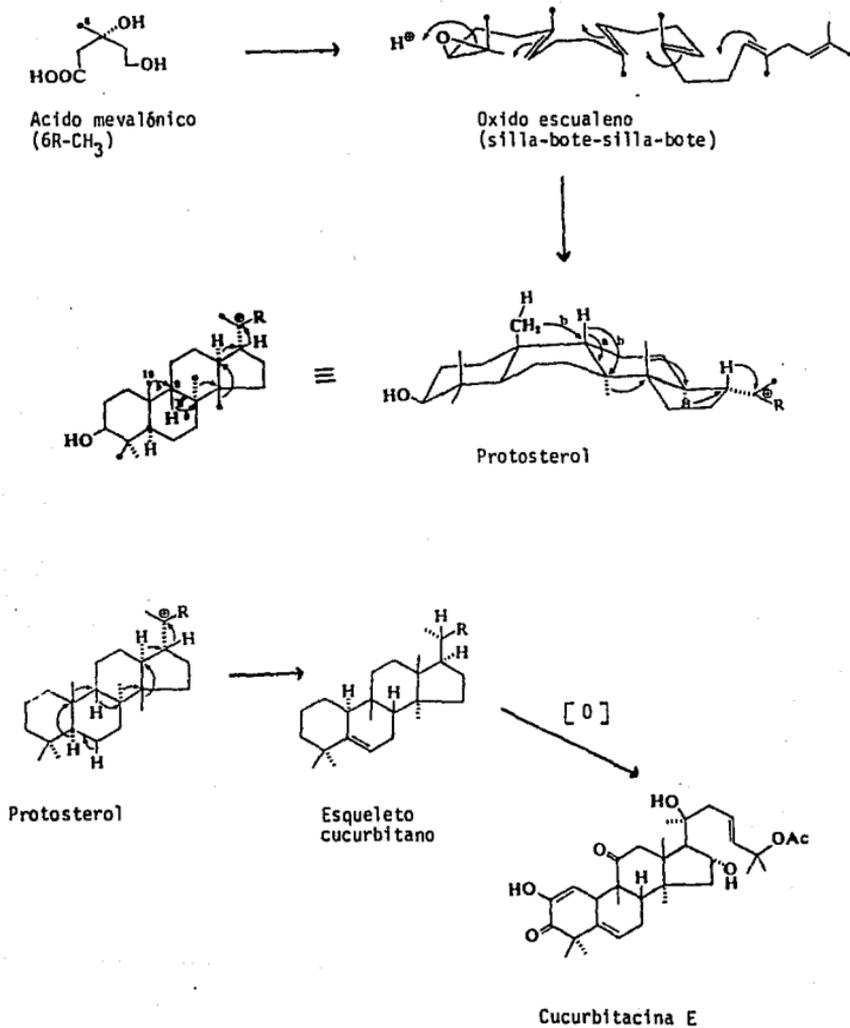


Figura 8. Biosntesis de las Cucurbitacinas.

Tabla 4. Propiedades físicas de algunas cucurbitacinas.

Cucurbitacina	Número de estructura	p. f. °C (solvente)	[α] (solvente)
A	<u>9</u>	207-209 (AcOEt)	+97.3 (EtOH)
B	<u>14</u>	184-186 (EtOH abs)	+87.5 (EtOH)
Dihidro-B	<u>15</u>	163-164 (Acet-Hex)	+53 (CHCl ₃) +57 (CHCl ₃)
Iso-B	<u>5</u>	229-231 (MeOH)	+43 (CHCl ₃)
C	<u>10</u>	207-207.5 (AcOEt)	+95.2 (EtOH)
D	<u>16</u>	151-152 (EtOH abs)	+52 (EtOH)
22-Deoxo-D	<u>17</u>	no cristalino	+103 (CHCl ₃)
22-Deoxo-iso-D	<u>18</u>	no cristalino	+76 (CHCl ₃)
E	<u>4</u>	232-233 (MeOH)	-59 (CHCl ₃)
F	<u>19</u>	244-245 (CHCl ₃)	+38 (EtOH)
G	<u>22</u>	150-152 (MeOH aq)	+84 (CHCl ₃)
H	<u>23</u>	no cristalino	+57 (CHCl ₃)
I	<u>24</u>	148-148.5 (MeOH aq)	-52 (CHCl ₃)
Tetrahidro-I	<u>25</u>	117-126	+56.4 (CHCl ₃)
J	<u>26</u>	200-202 (EtOH)	-25 (MeOH) -36 (CHCl ₃)
K	<u>27</u>	193 (MeOH aq)	-74 (CHCl ₃)
L	<u>28</u>	140 (MeOH aq)	—
O	<u>29</u>	247-248 (AcOEt)	—
P	<u>30</u>	211-212 (AcOEt)	—
Q	<u>31</u>	118-135	—

1970 y Nakanishi, *et al*, 1974).

En relación a los métodos físicos son muy pocas las revisiones publicadas. Audier en 1966 describió los patrones de fragmentación característicos de algunas cucurbitacinas. Por lo que respecta a RMN¹H y RMN¹³C se han descrito algunas revisiones (Lavie, 1964, 1983; Farnsworth, 1985). Con respecto al UV, IR, ORD y CD no se conocen revisiones, sino más bien los datos se encuentran reportados en forma aislada. Finalmente cabe hacer notar que sólo se han reportado difracción de rayos X para muy pocas cucurbitacinas (Kupchan, *et al*, 1971).

2.4.1 Espectroscopía UV e IR.

En general los espectros de UV e IR son característicos para los cromóforos presentes en las moléculas y por lo tanto, su mayor utilidad en la elucidación estructural de las cucurbitacinas ha sido por la detección de los mismos. Por ejemplo la presencia de un sistente diosfenol, como en el caso de la cucurbitacina E (4), es generalmente evidenciado *a priori*, por los máximos de absorción observados al UV ($\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ 233, 267) y por las frecuencias de absorción observadas al IR (ν_{\max}^{KBr} 1664 cm⁻¹) (Kupchan, *et al*, 1967).

2.4.2 Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de RMN¹H para las cucurbitacinas presentan un perfil característico y como ya se indicó previamente se han realizado dos estudios comparativos en relación al tóxico (Fransworth,

et al, 1985 y Vande, *et al*, 1982). En las Tablas 5, 6 y 7 se resumen los datos de RMN^1H de 11 cucurbitacinas (Farnsworth, *et al*, 1985); estos datos son el resultado de un estudio de alta resolución en piridina. En la Tabla 8, se resumen datos espectroscópicos de 8 cucurbitacinas adicionales (Vande, *et al*, 1982) en $CDCl_3$, cuyas estructuras se muestran en la Figura 9.

Datos espectroscópicos de $RMN^{13}C$ para ocho cucurbitacinas representativas han sido analizadas en dos estudios (Bull, *et al*, 1979 y Velde, *et al*, 1932). En la Tabla 9 se indican los desplazamientos químicos de los carbonos en $CDCl_3$ de estos compuestos.

En la Figura 10 se muestra el desplazamiento comparativo de los carbonos cuaternarios (Parte A) y de los metilo (Parte B) de las cucurbitacinas mencionadas.

2.4.3 Espectrometría de masas.

Los patrones de fragmentación de los espectros de masas de las cucurbitacinas son característicos y por lo tanto, de gran utilidad para la elucidación estructural de estos compuestos (Audier, 1966). Fragmentos de masa, característicos para algunas cucurbitacinas se resumen en la Tabla 10.

2.4 Actividad Biológica.

Quizás las cucurbitacinas incluyen una de las categorías de compuestos naturales más versátiles en cuanto a actividad biológica se refiere. La mayoría de los estudios descritos se refieren a la actividad citotóxica y antitumoral de estos compuestos

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN¹H de algunas cucurbitacinas.

Protones	9	14	10	18	4	19	37	21	38	24	28
H-1a	2.83,ddd	2.65,ddd	*	2.67,ddd		2.45,ddd	2.30,ddd	2.45,ddd	2.30,ddd		
H-1a	1.59	1.62	*	1.37	6.31	1.54	1.50	*	*	6.34,d	6.34,d
H-2	4.86	4.87,dd	*	5.00	-	4.14,m	5.49,ddd	4.14,m	5.47,ddd	-	-
H-3	-	-	3.46,dt	-	-	3.43,dd	5.05,d	3.43,dd	5.05,d	-	-
H-6	5.77,brd	5.67,d	5.80,d	5.04,brd	5.68,brd	5.72,d	5.70,d	5.72,brd	5.70,brd	5.67,brs	5.67,brs
H-7a	2.58,dm	2.25,dm	2.62,m	2.27,dm	2.23,dm	2.33,dm	2.28,m	2.34,m	2.24,m	2.25,dm	2.22,m
H-7b	2.03,dd	1.95,m	2.0	1.99,dd	*	1.90,m	1.78,dd	1.90,m	1.77,dd	*	*
H-8	3.29,d	1.95,d	3.27,d	1.92,d	2.01,d	1.93,d	1.88,d	1.93,d	1.88,d	2.00,d	2.01,d
H-10	3.20,brd	3.09,brd	*	3.00,brd	3.76,brs	2.71,brd	2.70,brd	2.72,brd	2.70,brd	3.75,brs	3.77,brs
H-12a	3.38,d	3.37,d	3.34,d	3.16,d	3.37,d	3.16,d	2.93,d	3.23,d	2.99,d	3.24,d	3.20,d
H-12b	2.97,d	2.98,d	2.93,d	2.81,d	2.94,d	2.78,d	2.64,d	2.78,d	2.66,d	2.89,d	2.88,d
H-15a	2.10,dd	1.95,m	2.0	*	1.95,dd	*	*	*	*	1.92,dd	1.91,dd
H-15b	1.81,d	1.73,d	1.83,d	1.68,d	1.76,d	1.71,d	1.44,d	1.69,d	1.50,d	1.73,d	1.72,d
H-16	5.12,m	5.10,dd	5.12,m	5.00,m	5.11,dd	4.99,m	5.81,dd	4.90,m	5.88,dd	5.03,dd	4.9
H-17	3.05,d	3.01,d	3.07,d	2.97,d	3.01,d	2.99,d	2.96,d	2.97,d	3.01,d	2.99,d	2.96,d
H-19a	3.45,d	-	3.54,dd	-	-	-	-	-	-	-	-
H-19b	4.77,d	-	4.84,dd	-	-	-	-	-	-	-	-
H-23a	7.36,d	7.34,d	7.36,d	7.48,d	7.35,d	7.48,d	7.42,d	3.29,m	3.22,m	7.48,d	3.32,m
H-23b	-	-	-	-	-	-	-	3.50,m	3.32,m	-	3.50,m
H-24a	7.41,d	7.40,d	7.40,d	7.55,d	7.40,d	7.56,d	7.54,d	2.23,m	*	7.58,d	2.21,m
H-24b	-	-	-	-	-	-	-	2.23,m	*	-	2.21,m
2-OH	6.26,d	6.28,d	-	6.30,brs	*	6.18,d	-	6.18,d	-	*	*
3-OH	-	-	6.07,d	-	-	6.37,d	-	6.38,d	-	-	*
16-OH	6.13,d	6.18,d	6.08,d	6.32,d	6.22,d	6.26,d	-	6.46,d	-	6.40,brs	6.55,d
19-OH	6.58,brs	-	6.43,t	-	-	-	-	-	-	-	-
20-OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25-OH	6.34,s	6.38,s	6.24,s	5.95,s	6.37,s	5.90,s	6.14,s	5.65,s	6.33,s	5.98,brs	5.83,s
	-	-	-	6.75,s	-	6.73,s	6.76,s	5.76,s	5.75,s	6.72,brs	5.62,s

Espectros medidos en piridina-d₅ a 360MHz; los desplazamientos químicos están expresados en ppm. La multiplicidad está asignada como sigue: s, singulete; d, doblete; dd, doble de dobles; dt, doblete de tripletes; dm, doblete de multipletes; ddd, doble de doble de dobles; m, multiplete; br, ancho.

*Señal totalmente oscurecida por otra señal.

Tabla 6. Valores de las constantes de acoplamiento.

Constante de acoplamiento	Cucurbitacinas										
	<u>9</u>	<u>14</u>	<u>10</u>	<u>18</u>	<u>4</u>	<u>19</u>	<u>37</u>	<u>21</u>	<u>38</u>	<u>24</u>	<u>28</u>
J _{1α,1β}	12.1	12.2	*	12.4	-	12.1	12.2	12.4	11.8	-	-
J _{1α,2}	5.5	5.5	*	5.6	-	3.8	4.1	3.5	4.0	-	-
J _{1α,10}	3.2	3.6	*	3.6	2.7	3.9	4.0	3.5	4.0	2.6	2.7
J _{1β,2}	12.5	12.1	*	*	-	10.0	10.9	*	10.4	-	-
J _{1β,10}	13.0	12.3		13.0	-	12.5	12.6	11.2	10.0	-	-
J _{2,3}	-	-	6.4	-	-	9.1	10.5	9.3	10.4	-	-
J _{2,OH}	4.1	5.0	-	*	-	5.0	-	3.9	-	*	*
J _{3,OH}	-	-	4.9	-	-	4.7	-	4.4	-	-	-
J _{6,7β}	5.7	5.4	5.6	7.4	*	5.4	5.5	5.5	4.8	*	*
J _{7α,7β}	20.2	*	*	18.8	*	*	19.4	19.0	19.3	*	*
J _{7α,8}	8.1	7.6	7.6	7.5	8.5	8.2	8.2	7.7	7.9	8.1	8.4
J _{12,12}	14.8	14.6	14.8	14.6	14.6	14.6	14.8	14.7	14.6	14.5	14.7
J _{15α,15β}	13.3	12.8	12.8	12.8	12.4	12.8	12.0	14.4	14.6	13.0	12.7
J _{15α,16}	10.2	11.8	*	7.1	10.7	7.0	7.8	8.0	7.8	8.0	8.6
J _{16,17}	6.8	7.3	7.3	7.0	7.2	7.0	7.8	7.1	7.4	7.3	7.1
J _{16,OH}	4.3	4.7	5.3	4.6	4.7	4.8	-	4.7	-	-	4.3
J _{19,19}	9.8	-	10.3	-	-	-	-	-	-	-	-
J _{19,OH}	*	-	4.9	-	-	-	-	-	-	-	-
J _{23,24}	16.0	15.8	14.1	15.2	15.8	15.3	15.2	-	-	15.2	-

Las constantes de acoplamiento están medidas en piridina-d₅; los valores de J están expresados en Hz.

*Valores de J no estimados.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de protones de grupos metilo y acetato.

Cucurbitacinas										
<u>9</u>	<u>14</u>	<u>10</u>	<u>18</u>	<u>4</u>	<u>19</u>	<u>37</u>	<u>21</u>	<u>38</u>	<u>24</u>	<u>28</u>
1.30	1.11	1.26	1.10	1.12	1.21	1.12	1.21	1.12	1.12	1.13
1.42	1.19	1.44	1.19	1.21	1.23	1.14	1.24	1.12	1.21	1.22
1.50	1.27	1.50	1.30	1.30	1.29	1.16	1.31	1.16	1.32	1.35
1.53	1.42	1.53	1.43	1.45	1.43	1.21	1.37	1.22	1.43	1.38
1.54	1.50	1.56	1.43	1.51	1.45	1.22	1.37	1.23	1.45	1.38
1.67	1.54	1.66	1.46	1.54	1.46	1.50	1.47	1.41	1.46	1.46
1.69	1.57	1.71	1.51	1.60	1.50	1.51	1.52	1.41	1.54	1.56
1.88 ^a	1.69	1.87 ^a	1.58	1.71	1.60	1.54	1.58	1.53	1.62	1.60
	1.89 ^a			1.89 ^a		1.98 ^a		1.97 ^a		
						2.08 ^a		2.13 ^a		
						2.13 ^a		2.15 ^a		

Los desplazamientos químicos están medidos en piridina-d₅ a 360 MHz

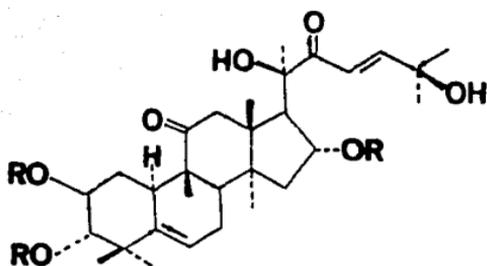
Todas las señales fueron observadas como singuletes

^aSeñal de acetato.

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN^1H en CDCl_3 de algunas cucurbitacinas.

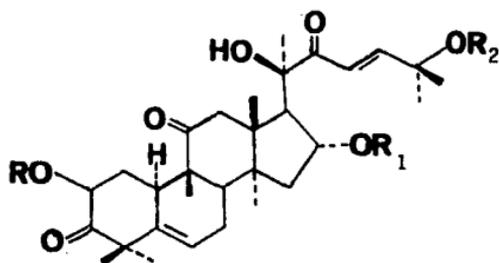
Protones	<u>18</u>	<u>39</u>	<u>40</u>	<u>24</u>	<u>4</u>	<u>41</u>	<u>42</u>	<u>28</u>
1	-	-	-	5.97 (d 3)	5.90 (d 3)	6.35 (d 3)	6.34 (d 3)	5.96 (d 3)
2	4.44 (dd 12,6)	5.48 (dd 13,6)	4.42 (dd 12,6)	-	-	-	-	-
6	5.78 (m 10)	5.77 (m 12)	5.79 (m 12)	5.76 (m 10)	5.77 (m 10)	5.79 (m 10)	5.80 (m 10)	5.77 (m 10)
10	-	-	-	3.55 (m 7)	3.51 (m 7)	3.53 (m 7)	3.54 (m 7)	3.51 (m 7)
12 α	3.30 (bd 14)	3.24 (bd 15)	3.25 (bd 15)	3.28 (bd 15)	3.20 (bd 15)	3.21 (bd 15)	3.22 (bd 15)	3.23 (bd 15)
12 β	2.70 (d 14)	2.74 (d 15)	2.68 (d 15)	2.73 (d 15)	2.66 (d 15)	2.78 (d 15)	2.79 (d 15)	2.73 (d 15)
16	4.34 (bt 7)	5.17 (bt 7)	4.31 (bt 7)	4.38 (bt 7)	4.39 (bt 7)	5.19 (bt 7)	5.21 (bt 7)	4.35 (bt 7)
17	2.54 (d 7)	2.74 (d 7)	2.61 (d 7)	2.54 (d 7)	2.49 (d 7)	2.68 (d 7)	2.73 (d 7)	2.61 (d 7)
23	6.62 (d 15)	6.67 (d 15)	-	6.62 (d 15)	6.54 (d 15)	6.66 (d 15)	6.41 (d 15)	-
24	7.14 (d 15)	7.13 (d 15)	-	7.13 (d 15)	7.03 (d 15)	7.12 (d 15)	7.14 (d 15)	-
Metilos								
18	0.98	1.03	0.97	1.00	0.97	1.05	1.04	1.00
19	1.40	1.43	1.43	1.40	1.42	1.43	1.42	1.44
21	1.36	1.30	1.37	1.36	1.34	1.30	1.30	1.37
26	1.34	1.41	1.22	1.36	1.55	1.41	1.57	1.23
27	1.36	1.39	1.25	1.36	1.55	1.39	1.58	1.26
28	1.34	1.31	1.34	1.38	1.38	1.33	1.34	1.41
29	1.30	1.28	1.28	1.26	1.25	1.29	1.29	1.26
30	1.09	1.10	1.08	1.04	1.02	1.05	1.04	1.04
2-OAc	-	2.14	-	-	-	2.20	2.20	-
16-OAc	-	1.82	-	-	-	1.82	1.82	-
25-OAc	-	-	-	-	2.01	-	2.02	-

Los desplazamientos químicos están en ppm; las constantes de acoplamiento (en Hz) y la multiplicidad están indicados en paréntesis.



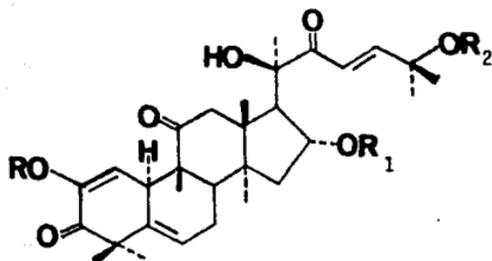
37 R=Ac

38 R=Ac 23,24-dihidro



39 R=R₁=Ac R₂=H

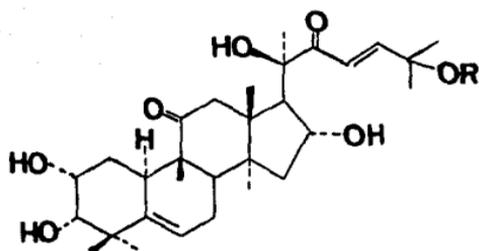
40 R=R₁=R₂=H 23,24-dihidro



41 R=R₁=Ac R₂=H

42 R=R₁=R₂=Ac

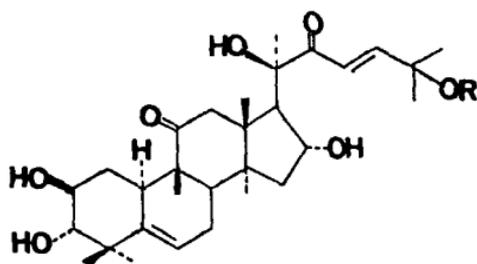
Figura 9. Estructuras adicionales de cucurbitacinas.



(29) R=H

(30) R=H 23,24-dihidro

(31) R=Ac



(19) R=H

(20) R=H 23,24-dihidro

(21) R=Ac 23,24-dihidro

Figura 9. Estructuras de cucurbitacinas. (Continuación).

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN¹³C para algunas cucurbitacinas.

Carbonos	Cucurbitacinas							
	18	39	40	24	4	41	42	28
1	36.0	32.0	36.0	115.0	115.2	131.7	131.5	115.0
2	71.7	73.3	71.6	144.6	144.8	143.4	143.3	144.7
3	212.4	205.7	212.4	198.7	198.9	195.0	194.9	198.7
4	50.3	48.4	50.3	47.6	47.7	48.1	48.0	47.6
5	140.6	139.8	140.5	137.0	136.6	136.2	136.1	136.9
6	120.3	120.4	120.4	120.7	120.6	121.4	121.3	120.7
7	24.0	23.7	23.9	23.6	23.5	23.5	23.7	23.6
8	42.5	42.1	42.4	41.6	41.6	41.3	41.2	41.6
9	48.4	48.1	48.4	48.8	48.9	48.4	48.4	48.8
10	33.8	34.3	33.8	34.7	34.6	35.8	35.7	34.7
11	213.1	211.9	213.1	212.9	214.0	212.6	212.4	213.0
12	48.8	48.6	48.7	48.8	48.6	48.9	48.8	48.8
13	48.3	50.0	48.4	48.3	48.0	49.9	49.8	48.3
14	50.9	51.3	50.8	50.8	50.4	51.4	51.4	50.8
15	45.6	43.1	45.4	45.7	45.3	43.4	43.3	45.6
16	71.5	73.7	70.9	71.6	70.8	73.7	73.5	71.0
17	57.3	54.0	57.8	57.4	58.0	54.2	54.2	57.8
18	20.1	19.8	19.8	20.0	19.8	19.8	19.7	19.8
19	19.3	18.9	18.9	18.6	17.6	18.3	18.1	18.3
20	78.2	77.7	79.2	78.1	78.5	77.7	77.7	79.2
21	24.0	23.6	24.5	24.0	23.8	23.7	23.5	24.5
22	202.7	201.3	215.6	202.7	203.1	201.3	200.9	215.4
23	119.1	118.5	30.9	119.0	120.6	118.6	119.3	30.9
24	156.0	155.5	37.0	155.9	151.3	155.7	152.7	37.0
25	71.2	71.3	70.3	71.2	79.6	71.2	79.1	70.3
26	28.9	29.5	29.0	29.0	26.0	29.6	26.6	28.7
27	29.6	29.7	29.9	29.6	26.0	29.7	26.3	29.9
28	21.3	21.3	21.3	20.1	19.7	20.3	20.2	20.2
29	29.4	28.6	29.3	27.9	27.8	27.2	27.2	27.9
30	20.1	20.0	20.0	20.1	20.0	20.2	20.2	20.1
2-OAc	-	20.7	-	-	-	20.3	20.6	-
	-	170.1	-	-	-	169.0	168.9	-
16-OAc	-	20.7	-	-	-	20.7	20.6	-
	-	170.1	-	-	-	170.1	169.6	-
25-OAc	-	-	-	-	21.7	-	21.8	-
	-	-	-	-	171.6	-	170.3	-

Los desplazamientos químicos están en ppm, utilizado CDCl₃ como disolvente y TMS como referencia interna.

Cucurbitacina

Parte A

Parte B

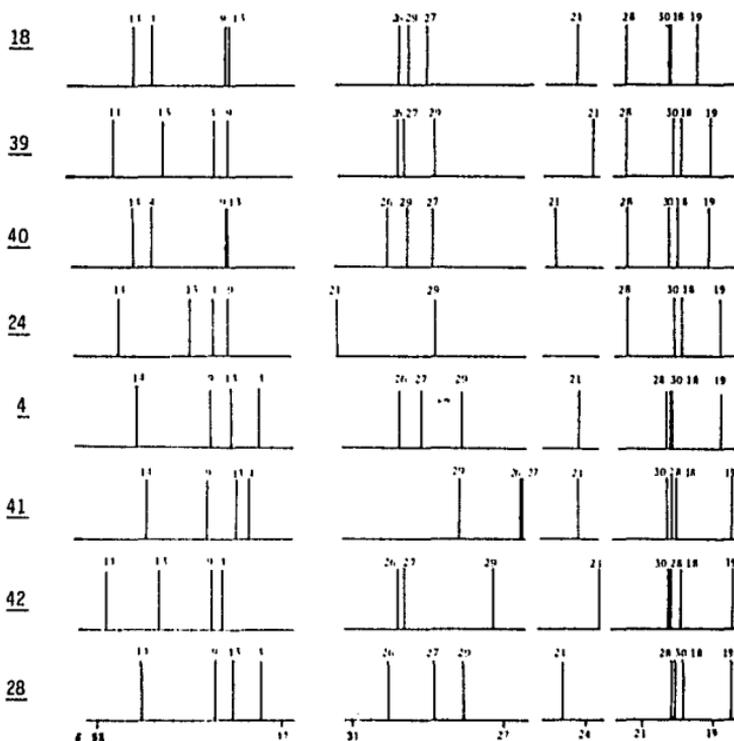


Figura 10. Comparación de los desplazamientos de los carbonos cuaternarios (Parte A) y de los metilos (Parte B) de algunas cucurbitacinas.

Tabla 10. Fragmentos característicos en Espectrometría de Masas de algunas cucurbitacinas.

	A		B		C		D		E		I	Epl-Iso-B		Iso-B		L	
	% abundancia	m/e		%	m/e	%	m/e	%									
41	25	43	29	41	21	41	15	43	96	41	25	96	100	96	100	113	28
43	96	55	10	43	100	43	59	67	8	43	100	101	13	97	10	142	26
45	21	57	13	45	42	55	14	87	12	55	21	111	8	109	8	164	100
67	17	87	12	55	14	67	10	96	100	69	23	112	11	111	8	401	14
87	16	96	100	60	22	69	14	111	13	87	30	113	7	112	9	480	13
91	18	105	8	69	12	87	18	112	12	91	22	115	22	113	6		
95	21	111	12	95	13	96	100	113	22	96	67	147	5	135	3		
96	100	112	8	96	27	111	22	121	10	111	26	159	6	137	3		
111	22	113	10	111	95	112	19	136	6	112	20	173	25	164	4		
113	21	149	8	113	10	113	18	164	26	146	32	175	11	203	2		

Espectrometría de masas por impacto electrónico a 70 eV.

Cucurbitacinas	m/e
A	514 (M ⁺) 496 484
B	498 (M ⁺ - 60) 485 403
C	500 (M ⁺ - 60) 482 470
D	516 (M ⁺) 403 385
E	556 (M ⁺) 514 (M ⁺)

Cucurbitacinas	m/e
Epl-Iso-B	498 (M ⁺ -60) 385
Iso-B	498 (M ⁺ -60) 386
L	516 (M ⁺) 498 (M ⁺ -18)

(Bean, 1985; Hylands, *et al*, 1975; Kupchan, *et al*, 1971, 1973; Schun, *et al*, 1985; Silapa, *et al*, 1985; Xinde, *et al*, 1984; *inter alia*)

Estas evaluaciones se han realizado principalmente en carcinoma nasofaríngeo y en cultivo de células KB. Se ha demostrado (Kupchan, *et al*, 1972), la importancia de sistemas conjugados altamente electrofílicos en relación a la toxicidad de diversas clases de terpenoides. La saturación del doble enlace conjugado $\Delta^{23,24}$ en las cucurbitacinas está acompañada por una disminución en la toxicidad. Consecuentemente las reacciones de la cetona conjugada de la cadena lateral con macromoléculas biológicas pueden jugar un importante papel en el mecanismo por el cual las cucurbitacinas ejercen sus efectos citotóxicos. También la marcada disminución en la citotoxicidad al acetilar el grupo hidroxilo de C-16 de la cucurbitacina B, sugiere que un grupo hidroxilo libre puede ser importante para la reactividad de la cetona conjugada. Entonces la interacción entre el grupo hidroxilo de C-16 y la cetona de C-22 puede activar la cetona α,β -insaturada hacia el ataque nucleofílico por la macromolécula biológica como se muestra en la Figura 11. Finalmente, Vigar, *et al* proporcionaron evidencias de que el grupo COCH_3 en C-25 es importante para dicha actividad (Vigar, *et al*, 1973).

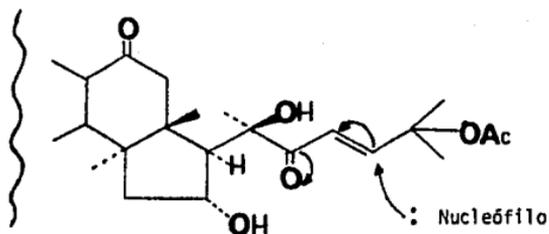


Figura 11. Mecanismo de acción del efecto citotóxico de las cucurbitacinas (Kupchan, *et al*, 1972).

También se ha demostrado que las cucurbitacinas incrementan la permeabilidad capilar en ratas (Lavie, *et al*, 1971), que poseen efectos anticonceptivos en ratones hembra (Shohat, *et al*, 1972), y que tienen una acción preventiva contra la hepatitis y la cirrosis inducidas en ratas (Han, *et al*, 1980); se ha encontrado también que ejercen una actividad antigiberelina en semillas de arroz (Sen, *et al*, 1973), y que tienen efectos anti-alimentarios para los insectos (Nielsen, *et al*, 1977).

OBJETIVOS

1. Objetivo general.

Continuar el estudio fitoquímico de las fracciones de mayor polaridad obtenidas en el estudio preliminar (Camacho y Ríos, 1987), como parte de un estudio sistemático de Rubiaceas mexicanas, usadas en medicina tradicional.

Las consideraciones generales tomadas en cuenta para establecer dicho objetivo fueron las siguientes:

- a) El sabor extremadamente amargo en las fracciones de mayor polaridad, sugiera la presencia de cucurbitacinas adicionales.
- b) El uso de la planta como agente antiamebiano.

2. Objetivos específicos.

- 2.1 Separar y purificar algunos de los constituyentes de algunas de las fracciones de mayor polaridad.
- 2.2 Identificar mediante métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos las sustancias aisladas.
- 2.3 Efectuar algún estudio biológico del extracto metanólico, así como de los compuestos aislados.
- 2.4 Proporcionar los compuestos caracterizados a la IOCD para su evaluación como agentes antiamebianos y antimaláricos.

2.5 Correlacionar los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a:

a) Composición química de la especie estudiada con aquellos taxonómicamente relacionados.

b) Actividad biológica del extracto metanólico, de las sustancias aisladas y su posible relación con las propiedades medicinales de la planta.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Estudio fitoquímico.

1.1 Materiales y métodos.

1.1.1 Material vegetal. La planta (partes aéreas) fué colectada en la barranca de Tolantongo, Hidalgo, el 23 de abril de 1986 y fué identificada por el Dr. David Lorence del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra se depositó en el Herbario Nacional (Voucher DL5040). El material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y se cortó en trozos pequeños, posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos Modelo Wiley 4.

1.1.2 Extracción y fraccionamiento preliminar.

(Ver Esquema 1 y Tabla 1).

1.1.3 Análisis cromatográficos. Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de sílice (sílica gel GF₂₅₄, Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromogénicos. Los sistemas de eluyentes y reactivos reveladores empleados se encuentran resumidos en la Tabla 11.

Tabla 11. Sistema de eluyentes y agentes cromogénicos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistemas de eluyentes	Composición	Proporción	Referencia
I	Hexano/AcOEt	Diversas proporciones	—
II	CHCl ₃ /MeOH	" "	—
III	AcOEt/MeOH	" "	—
IV	AcOEt/CHCl ₃	" "	—
V	AcOEt/MeOH/H ₂ O	10:1:3	Yamada, 1978
VI	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	13:2:1	"
VII	IsopOH/AcOEt/H ₂ O	83:11:6	Stahl, 1969
VIII	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	64:50:10	Bauer, 1984

Reactivo	Agentes cromogénicos* Composición	Referencia
Acido sulfúrico (A)	H ₂ SO ₄ 20%	Yamada, 1978
Sulfato cérico (B)	12 g sulfato cérico 22.2 ml H ₂ SO ₄ conc. 350 g hielo picado	Stahl, 1969
Anisaldehydo (C)	0.5 ml anisaldehydo 9 ml etanol 0.5 ml H ₂ SO ₄ conc. 1 ml ácido acético	Stahl, 1969

*Para el desarrollo de color era necesario calentar por 2 minutos aproximadamente a 110°C.

1.1.4 Aislamiento y purificación de los compuestos.

a) Aislamiento de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43).

Las fracciones 759-787 (6.0 g) de la columna original eluidas con AcOEt/MeOH (9:1) (Tabla 1), se recromatografiaron en una columna empacada con 395 g de gel de sílice (desactivada aproximadamente al 10%); la elución se inició con CHCl_3 al 100%, prosiguiendo con una mezcla de CHCl_3 /MeOH, aumentando progresivamente la cantidad de MeOH. Se recogieron un total de 821 fracciones de 100 ml cada una; cada fracción fue analizada por c.c.d. combinando aquellas cromatográficamente similares. En la Tabla 12 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas. De las fracciones 555-561 eluidas con CHCl_3 /MeOH (95:5), se obtuvo un sólido cristalino ligeramente amarillo de sabor amargo, soluble en AcOEt y MeOH, con p.f. 137-140°C. El rendimiento de 43 fué de 1.743 g.

b) Aislamiento de la 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44).

De las fracciones 613-638 eluidas con CHCl_3 /MeOH (93:7) se obtuvieron 0.950 g de un sólido ligeramente amarillo de sabor amargo; al analizarlo cromatográficamente, utilizando el sistema II de la Tabla 11, y de eluir cinco veces se observaron cuatro compuestos.

0.745 g de este polvo se recromatografiaron en 42 g de sílice en seco, empleando como eluyente una mezcla de AcOEt/MeOH/ H_2O 80:1:3 (Yamada, *et al*, 1978); se recogieron un total de 114 fracciones de 10 ml cada una; cada fracción fue analizada por c.c.d.

combinándose aquellas cromatográficamente similares; en la Tabla 13 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas de cada uno de ellos y las fracciones combinadas. De las fracciones 29-49 de esta columna, se obtuvo un sólido amorfo de color blanco y de sabor amargo, soluble en AcOEt y MeOH con p.f. 122-127°C. El rendimiento de 44 fué de 492 mg.

c) Aislamiento de (45).

Las fracciones 788-861 (33.1285 g) de la columna original (Tabla 1), se purificaron con carbón activado, obteniéndose un líquido denso, aceitoso, de color amarillo, extremadamente amargo; este se recromatografió en una columna empacada con 134.71 g de gel de sílice (desactivada aproximadamente al 30%), la elución se hizo con CHCl_3 -MeOH en diferentes proporciones (Tabla 14); se recogieron un total de 182 fracciones de 50 ml cada una, combinando aquellas cromatográficamente similares; de las fracciones 64-105, eluidas con CHCl_3 -MeOH 85:15, se obtuvo un sólido cristalino de sabor dulce, soluble en MeOH y H_2O , de p.f. 90-97°C. El rendimiento de 45 fué de 4.3567 g. Por otra parte, las fracciones 862-904 (210 g) de la columna original (Tabla 1) se recromatografiaron en una columna empacada con 394.24 g de sílice (montada en seco); la elución se inició con CHCl_3 100%, prosiguiendo con la mezcla de CHCl_3 /MeOH, aumentando progresivamente la cantidad de MeOH; se recogieron un total de 422 fracciones de 100 ml cada una; cada fracción fué analizada por c.c.d. combinando aquellas cromatográficamente simila-

Tabla 12. Fraccionamiento vfa cromatografía en columna de las fracciones 759-787 de la columna original.

Eluyente	Proporción	No. Fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones adicionales
CHCl ₃	100%	1- 73	1- 17	-	-
			18- 22	-	-
			23- 73	-	-
CHCl ₃ /MeOH	99.5:0.5	74-106	74-106	-	-
CHCl ₃ /MeOH	99:1	107-143	107-143	-	-
CHCl ₃ /MeOH	98:2	144-161	144-161	-	-
CHCl ₃ /MeOH	87:3	162-229	162-229	-	-
CHCl ₃ /MeOH	96:4	230-489	230-489	-	-
CHCl ₃ /MeOH	95:5	490-561	490-569	<u>43</u>	Sólido cristalino ligeramente amarillo de sabor amargo
CHCl ₃ /MeOH	94:6	562-612	570-577	-	-
			578-584	-	-
			585-598	-	-
			599-605	-	-
			606-612	-	-
CHCl ₃ /MeOH	93:7	613-752	613-638	Mezcla de 4 productos	Sólido cristalino ligeramente amarillo de sabor amargo
			639-657	-	-

Tabla 12. Fraccionamiento vfa cromatografía en columna de las fracciones 759-787 de la columna original. (Continuación)

Eluyente	Proporción	No Fracciones	Fraciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones adicionales
			658-666	-	-
			667-711	-	-
			712-752	-	-
CHCl ₃ /MeOH	90:10	753-787	753-787	-	-
CHCl ₃ /MeOH	85:15	788-799	788-788	-	-
CHCl ₃ /MeOH	70:30	800-821	800-821	-	-

Tabla 13. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 613-638 de la Tabla 12.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones
AcOEt/MeOH/H ₂ O	80:1:3	1- 21	-	-
		22- 25	-	-
		26- 28	-	-
		29- 49	<u>44</u>	Sólido amorfo blanco, de sabor amargo
		50- 70	-	-
		71- 84	-	-
		85-114	-	-

Tabla 14. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 788-861 de la columna original (Tabla 1).

Eluyente	Proporción	No. Fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones
CHCl ₃ /MeOH	9:1	3- 85	3- 6	-	-
			7- 11	-	-
			12- 30	-	-
			31- 38	-	-
			39- 59	-	-
			60- 63	-	-
CHCl ₃ /MeOH	85:15	89- 98	64-105	<u>45</u>	Sólido cristalino, de sabor dulce
CHCl ₃ /MeOH	80:20	99-110			
			105-110	-	
CHCl ₃ /MeOH	70:30	111-153	111-153	-	
CHCl ₃ /MeOH	60:40	154-173	154-173	-	
MeOH	100	174-182	174-182	-	

Tabla 15. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 862-904 de la columna original (Tabla 1).

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fraciones combinadas	Compuestos aislados	Observaciones
CHCl ₃	100%	1- 54	1- 46	-	-
			47- 54	-	-
CHCl ₃ /MeOH	95:5	55- 96	55- 96	-	-
			97-103	-	-
	90:10	97-317	104-170	-	-
			171-191	-	-
			192-219	-	-
			220-275	-	-
			276-357	<u>45</u>	Sólido cristalino, de sabor dulce
			358-400	-	-
	70:30	380-391	401-409	-	-
	60:40	392-409		-	-
1:1	410-420	410-420	-	-	
MeOH	100%	421-425	421-425	-	-

lares. En la Tabla 15 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.

De las fracciones 276-357 se obtuvieron 6.5756 g adicionales del producto 45. El rendimiento total de 45 fué de 10.9323 g.

1.1.5 Caracterización de los compuestos aislados.

- Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Jhones y no están corregidos. Los espectros de IR fueron registrados en un instrumento Nicolet FT-IR 5X de un sólo haz, en pastilla de KBr por el señor Alejandro Correa de la Compañía Negromex. Los espectros de RMN^1H y de RMN^{13}C se determinaron en un espectrómetro FT80 Varian utilizando como disolvente CDCl_3 y piridina- d_5 y como referencia interna TMS.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi-Perkin Elmer RMVGD.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241.

- Prueba de Molisch para carbohidratos.

A una pequeña cantidad de los compuestos, 43, 44 y 45 se disolvieron en 3 ml de agua destilada, se les adicionó 1 ml de solución reactivo de α -naftol (10% en etanol); seguidamente se agregaron por las paredes del tubo 2 gotas de H_2SO_4 concentrado, observándose para cada uno de ellos una coloración violeta en la interfase

de los líquidos. La coloración observada era indicativa de una prueba positiva para carbohidratos.

- Hidrólisis enzimática con celulasa de los compuestos 43 y 44.

A 100 mg de 43 y 44, por separado se adicionaron 10 ml de agua destilada y 200 mg de celulasa (Sigma, tipo I). La mezcla se dejó a 36°C durante 72 horas. Al cabo de este tiempo cada una de las mezclas fué sujeta a extracción convencional con CHCl_3 , para rendir las agliconas correspondientes. Posteriormente cada una de ellas se purificó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada sobre sílice utilizando el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2). Es de hacer notar que el término de la hidrólisis fué verificada cromatográficamente utilizando el sistema II y el agente cromogénico A de la Tabla 11.

En la Tabla 16 se indican los compuestos sometidos a hidrólisis enzimática, el rendimiento de los compuestos obtenidos y sus puntos de fusión.

- Determinación de azúcares en los productos de la hidrólisis enzimática de los compuestos 43 y 44.

La fase acuosa se pasó por una columna con resina intercambiadora de aniones (Yamada, *et al*, 1978) utilizando agua como eluyente.

La presencia de glucosa en ambos compuestos fué determinada en el eluato obtenido anteriormente, por medio de c.c.d. en sílice utilizando los sistemas VII y VIII y el agente cromogénico C

de la Tabla 11. Como patrones de referencia se utilizaron arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, manitol, sacarosa, sorbitol, sorbosa y xilosa.

- Hidrólisis enzimática de 43 y 44 con β -glicosidasa.

5 mg de 43 y 44 se agregaron en 1 ml de agua destilada con 5 mg de β -glicosidasa (Sigma, Tipo II); se incubaron a 36°C durante 72 horas. El término de la hidrólisis fué verificada cromatográficamente utilizando el sistema II y el agente cromogénico A de la Tabla 11, rindiendo las agliconas correspondientes.

- Obtención de 2 β -D-gluco-23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46).

280 mg de catalizador Pd-C (10% Pd, Merck), se pre-hidrogenaron durante 45 minutos a una presión aproximada de 1 Kg/cm^2 . Al cabo de este tipo se agregaron 200 mg de 44 disueltos en 120 ml de AcOEt/EtOH (1:1) (Bauer, *et al*, 1985); la mezcla se hidrogenó durante 48 horas en las mismas condiciones antes indicadas. El término de la reacción fué verificada cromatográficamente utilizando el sistema V y el agente cromogénico A (Tabla 11).

El crudo de la reacción se filtró a través de una pequeña cantidad de celita; el filtrado obtenido resultó una mezcla de 44 y del producto hidrogenado 46. La mezcla anterior se resolvió en sus componentes, vía una cromatografía preparativa en capa delgada de sílice, empleando el sistema V (Tabla 11) como eluyente. Luego de eluir cinco veces y procesar la placa de la manera habitual se obtuvieron 40 mg de un sólido amorfo, 46, de color blanco, de sabor amargo con p.f. 115-119°C.

Tabla 16. Hidrólisis enzimática con celulasa de los compuestos 43, 44 y 46.

Compuesto	Peso del compuesto	Producto (aglicona)	Peso del producto hidrolizado	Punto de fusión °C
2-β-D-Glucocucurbitacina B (<u>43</u>)	100 mg	<u>43a</u>	12 mg	215-220
2-β-D-Glucocucurbitacina F-25-acetato (<u>44</u>)	100 mg	<u>44a</u>	14 mg	205-210
2-β-D-Gluco-23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (<u>46</u>)	40 mg	<u>46a</u>	12 mg	192-197

Tabla 17. Derivados acetilados de los productos obtenidos.

Compuesto	Peso del compuesto	Derivado acetilado	Peso del producto acetilado	Punto de fusión °C
<u>43</u>	50 mg	<u>43b</u>	48 mg	104-106
<u>43a</u>	10 mg	<u>43c</u>	9 mg	90- 94
<u>44</u>	60 mg	<u>44b</u>	47 mg	107-110
<u>44a</u>	10 mg	<u>44c</u>	10 mg	97-102
<u>45</u>	50 mg	<u>45a</u>	50 mg	87- 92

- Obtención de la 23,24-dihidrocucurbitacina F-25 acetato (46a).

40 mg de 46 se agregaron en 1 ml de agua destilada con 5 mg de celulasa (Sigma, tipo I), se incubó a 36°C durante 72 horas. El término de la reacción fué verificada cromatográficamente utilizando el sistema II y el agente cromogénico A de la Tabla 11, rindiendo 12 mg de 46a, como sólido amorfo, blanco, de sabor amargo, con p.f. 230-235 (ver Tabla 16).

- Preparación de derivados acetilados.

Para formar los derivados acetilados, se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de muestra. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó durante 24 horas a temperatura ambiente; pasado este tiempo, a la mezcla de reacción se le adicionó hielo (con el fin de hidrolizar el exceso de anhídrido acético). Posteriormente se extrajo con AcOEt (2 veces) y la fase orgánica obtenida se lavó primero con HCl 1N, luego con una solución de NaHCO₃ al 10%, y por último con agua destilada. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad obteniéndose así los productos acetilados.

En la Tabla 17, se indican los compuestos y sus derivados acetilados, el rendimiento de los productos obtenidos y sus puntos de fusión.

Reducción de 43 con NaBH_4

A una solución de 30 mg de NaBH_4 en 5 ml de etanol absoluto, se le adicionaron 50 mg de 43 y 10 ml de etanol. Se dejaron reaccionar con agitación durante 40 minutos, verificando cromatográficamente el final de la reacción utilizando el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8:2 y el agente cromogénico B de la Tabla 11.

Posteriormente se agregaron 5 ml de agua y se neutralizó con HCl al 5%; se hicieron varias extracciones con AcOEt a la mezcla de reacción, la fase orgánica se lavó con agua, se seco con sulfato de sodio anhidro y se concentró, obteniéndose 10 mg de 44.

Determinación de la actividad fasciolicida *in vitro* del extracto metanólico de la *Cicarya ílla mexicana* Aiello y de los compuestos 2-β-D-Glucocucurbitacina B (43) y la 2-ε-D-Glucocucurbitacina F-25-acetato (44).

Paralelamente al estudio fitoquímico se efectuó una evaluación *in vitro*, de la actividad fasciolicida del extracto metanólico de la planta y de los glicósidos 43 y 44.

Estas evaluaciones fueron realizadas con la Bióloga Bertha Sánchez del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, quien conjuntamente con Ibarra, ha desarrollado una metodología adecuada para este tipo de evaluaciones (Ibarra, 1984, Sánchez, 1986).

1. Preparación de las sustancias objeto de evaluación.

A 5 mg del extracto metanólico y de cada uno de los productos 43 y 44, se les agregó 0.1 ml de etanol puro. Las soluciones anteriores se llevaron a un volumen final de 10 ml con agua destilada. Los dos compuestos se evaluaron por triplicado a concentraciones de 50 y 10 µg/ml; el extracto metanólico se evaluó también por triplicado a concentraciones de 50 y 1%.

2. Preparación del patrón de referencia.

A 5 mg de un patrón de referencia (Diamfenetida acetilado) se agregó 0.1 ml de etanol puro y se llevó a un volumen final de 10 ml con agua destilada, utilizándose concentraciones de 50 y 10 µg/ml.

3. Como blanco, se utilizó etanol puro al 50 y al 10%.

4. Preparación del medio de cultivo RMP1 1640.

Este medio se encontraba ya preparado; está constituido de: 50% v/v de suero de ternera, 2% v/v de eritrocitos de conejo, 50 u/ml de penprocilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

5. Preparación del medio de activación.

Se preparó burbujeando CO₂ puro durante 5 minutos a través de 10 ml de agua destilada fría.

6. Preparación del medio de emergencia.

Se prepara con 6% v/v de bilis de bovino y 94% v/v de solución salina de Hanks en pH de 7.4.

7. Obtención de las metacercarias recién desenquistadas.

Las metacercarias de F. hepática recién desenquistadas, se obtuvieron colocando quistes en un frasco que contenga previamente el medio de activación. Después de incubar a 37°C durante 1 1/2 horas, por sedimentación se lavan los quistes 2 veces con aproximadamente 2 ml de agua destilada y se añaden 5 ml del medio de emergencia pre calentado, incubándose nuevamente durante 2 1/2 horas a 37°C. Al cabo de este tiempo la mayoría de las metacercarias han desenquistado y están listas para ser utilizadas en las pruebas.

7. Evaluación.

Las pruebas se realizaron en una campana de flujo laminar, bajo las mayores condiciones posibles de esterilidad. Las duelas recién desenquistadas se desinfectaron durante 1 1/2 horas, colocándolas para tal efecto en el medio de cultivo con 50 u/ml en penprocilina

y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina. Posteriormente se trasladaron con una micropipeta a cajas multicámaras para cultivo de tejidos con capacidad de 3 ml por pozo, los que previamente contenían 70% de medio de cultivo a base de suero de ternera y medio RPMI (1:1) con antibióticos (50 u/ml de penprocilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina), 10% de eritrocitos de conejo al 2%, 10% del medio donde se encontraban las fasciolas (con 10 duelas por pozo) y 10% de la substancia a evaluar, dando un volumen final de 2 ml por pozo. Enseguida se incubaron durante cuatro días a 37°C con 5% de CO_2 .

Al cabo de este tiempo, se evaluó el efecto de cada producto, realizando las observaciones con ayuda de un microscopio invertido. La evaluación final consistió en apreciar en el medio de cultivo las diferentes alteraciones sufridas por las duelas, en base a la motilidad que presentaron los parásitos de los lotes experimentales, en relación con los parásitos de los lotes testigo.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las fracciones de mayor polaridad obtenidas del extracto metanólico de las partes aéreas de la *Cigarrilla mexicana* Aiello se obtuvieron dos Glucocucurbitacinas, las cuales fueron caracterizadas mediante métodos químicos y espectroscópicos como: la 2-β-D-glucocucurbitacina B (43) y la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) representando esta última un nuevo producto natural.

La discusión de la elucidación estructural de ambos compuestos será el objetivo fundamental de la presente sección.

La evaluación de las dos Glucocucurbitacinas anteriores como posibles agentes fasciolicidas de acuerdo al método descrito por Ibarra, *et al.*, (Sánchez, 1984), no proporcionó resultados alentadores. Sin embargo, el extracto metanólico de la planta a concentraciones de 50 y 1% resultó ser activo.

Es de hacer notar que la evaluación biológica como fasciolicida del extracto metanólico de la planta y de las glucocucurbitacinas aisladas, no se efectuó siguiendo como criterio el uso popular de la *Cigarrilla*, sino más bien debido a que paralelamente al estudio fitoquímico la Bióloga Bertha Sánchez gentilmente brindó la oportunidad para efectuar dicha evaluación.

4.1 Identificación de la 2-β-D-Glucocucurbitacina F-25-acetato (44).

El compuesto 44 se aisló al recromatografiar las fracciones 613-638 de la Tabla 12. Se obtuvo como un sólido amorfo, de color blanco, de sabor extramadamente amargo, con p.f. 122-127°C, óptica-

mente activo, soluble en AcOEt y MeOH. El rendimiento total de este compuesto fué del 0.0316% (en base al peso de planta seca).

Su fórmula molecular se estableció como $C_{38}H_{58}O_{13}$ (análisis elemental y RMN de ^{13}C) que permite un índice de insaturación de 10. Sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 18.

La solubilidad de 44 en disolventes de alta polaridad, así como el resultado positivo de una prueba de Molisch sugirieron su naturaleza glicosídica. La hidrólisis enzimática de una pequeña cantidad del producto natural con celulasa y β -glucosidasa, confirmó lo anterior ya que al analizar cromatográficamente los productos de la reacción, se detectó a la glucosa como único azúcar presente y a una sustancia de menor polaridad que la materia prima.

Por tratamiento con piridina y anhídrido acético, en las condiciones habituales, se obtuvo el derivado heptaacetilado (44b).

El espectro IR de 44 (Espectro E-1) mostró bandas características para grupos hidroxilo (3425 cm^{-1}), carbonilo de éster (1721 cm^{-1}), cetona conjugada (1691 cm^{-1}) y doble ligadura conjugada (1630 cm^{-1}).

Como se puede apreciar en la Figura 12, el espectro de RMN 1H en Py- d_5 permitió detectar tan sólo en forma clara, la presencia en la molécula de un grupo acetato ($\delta=1.88$) y de varios metilos terciarios.

Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) y su derivado acetilado (44b).

44

p. f. 122-127°C

$[\alpha]_D$ + 5.5 (MeOH)

IR KBr cm^{-1} max 3438, 2974, 2929, 2879, 1733, 1689, 1630, 1462, 1372, 1264, 1127, 1080, 1058, 1024, 990

RMN¹H (80MHz, Py-d₅, δ) 0.99 (s, 3H, Me-), 1.06 (s, 3H, Me-), 1.12 (s, 3H, Me-), 1.30 (s, 3H, Me-), 1.38 (s, 3H, Me-), 1.46 (s, 6H, Me-), 1.52 (s, 3H, Me-), 1.88 (s, 3H Ac-), 2.67 (d, J=12Hz, 1H, H-12), 2.70 (d, J=7Hz, 1H, H-17), 3.04 (d, J=12Hz, 1H, H-12), 3.23 (m, 2H H-6), 3.43-5.25 (m), 5.62 (m, 1H, H-6), 6.00 (d, J=16Hz, 1H H-23), 7.15 (d, J=16Hz, 1H, H-24)

RMN¹³C (80MHz, Py-d₅, δ) 213 (s, C-11), 204.09 (s, C-22), 169.76 (s, C-Ac), 149 (d, C-24), 141.74 (s, C-5), 122.49 (d, C-23), 119 (d, C-6), 106.2 (d, C-1'), 83.16 (d, C-2), 80.53 (d, C-3), 79.81 (s, C-20), 79.65 (s, C-25), 78.39 (d, C-3'), 78.2 (d, C-5'), 75.79 (d, C-2'), 71.57 (d, C-4'), 70.84 (d, C-16), 62.71 (t, C-6')

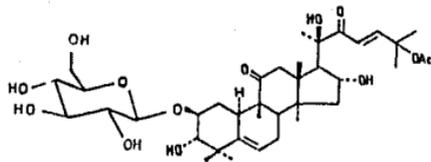


Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2-β-D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) y su derivado acetilado (44b). (Continuación).

44

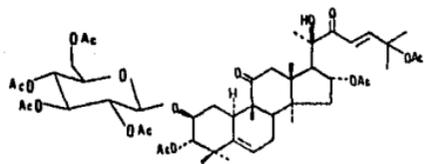
59.5 (d, C-17), 51.03 (s, C-14), 49.11 (s, C-13), 48.87 (t, C-12), 48.54 (s, C-9), 46.27 (t, C-15), 42.51 (s, C-4), 34.31 (t, C-1), 33.22 (d, C-8), 29.93 (c, C-29), 26.64 (c, C-26), 26.18 (c, C-27), 22.31 (c, C-21), 24.20 (t, C-7), 22.21 (c, C-Ac), 21.74 (c, C-28), 20.35 (c, C-30), 20.28 (c, C-18), 19.04 (c, C-19), 43.24 (c, C-10).

Análisis elemental

$C_{38}H_{58}O_{13}$

Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2-β-D-Gluco-cucurbitacina F-25-acetato (44) y su derivado acetilado (44b).

44b



p. f.

107-110°C

IR KBr cm^{-1}
max

3452, 2976, 2939, 1742, 1695, 1630, 1433, 1371, 1241, 1176,
1129, 1040, 983

RMN¹H
(80MHz, CDCl_3 , δ)

0.97 (s, 6H, H-18 y H-30), 1.09 (s, 3H, H-29), 1.20 (s, 3H, H-28), 1.25 (s, 3H, H-21), 1.39 (s, 3H, H-19), 1.55 (s, 6H, H-26 y H-27), 1.84 (s, 3H, H-Ac), 1.95 (s, 3H, H-Ac), 2.03 (s, 3H, H, Ac), 2.67 (d, $J=7\text{Hz}$, 1H, H-17), 2.65 (d, 1H, $J=14\text{Hz}$, H-12 β), 3.20 (d, $J=14\text{Hz}$, 1H, H-12 α), 4.20 (m, 2H, H-6'), 4.60 (d, $J=7\text{Hz}$, H-1'), 4.61 (d, $J=10\text{Hz}$, 1H, H-3), 5.67 (m, 1H, H-6), 6.35 (d, $J=16\text{Hz}$, 1H, H-23), 7.12 (d, $J=16\text{Hz}$, 1H, H-24), 2.00 (s, 6H), 2.10 (s, 3H), 2.11 (s, 3H).

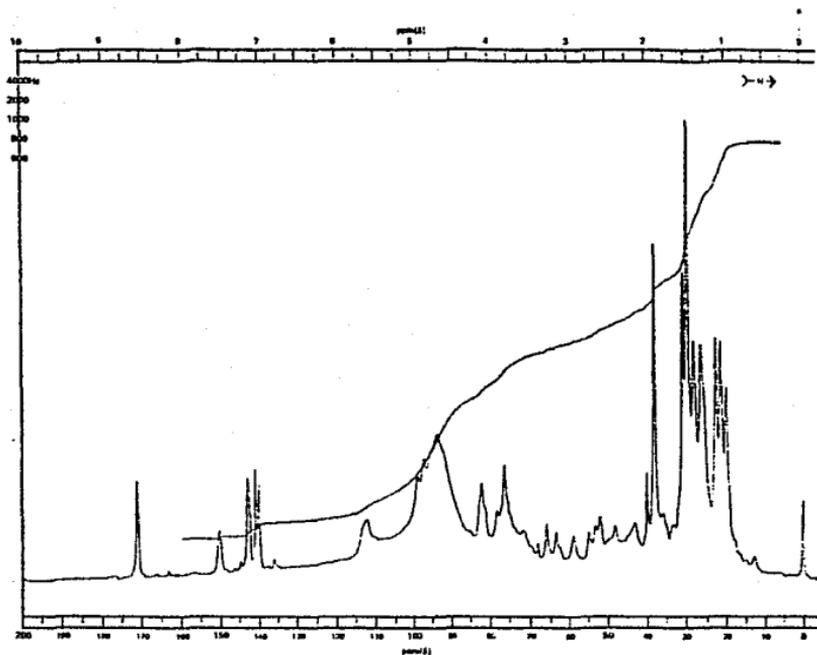


Figura 12. Espectro de RMN^1H de 44 en Py-d_5 .

El espectro de RMN^{13}C (Espectro E-2) mostró resonancias para 38 carbonos, y permitió por una parte confirmar la naturaleza glucosídica del compuesto y por la otra, establecer que el producto natural era el acetato de una sustancia, altamente oxigenada, que poseía además una doble ligadura disustituída y otra trisustituída.

Las observaciones que permitieron concluir lo anterior fueron

las siguientes:

- a) Las resonancias a δ 106.2, 78.39, 78.20, 75.79, 71.57 y 62.71, eran fácilmente asignables a la β -D-glucosa, de acuerdo a la comparación con modelos previamente descritos en la literatura (Laurie, 1985, Yamada, 1978).
- b) A δ 169.76 y δ 22.21, se observaron las señales características de un grupo acetato.
- c) A campo alto se observaron señales para ocho metilos (δ 29.93, 26.64, 26.18, 25.31, 21.74, 20.35, 20.28 y 19.04).
- d) En la zona donde resuenan los carbonos unidos a oxígeno, además de las señales correspondientes a la glucosa, se observaron señales para cinco carbonos base de oxígeno: tres de ellos (δ 83.16, 80.53 y 70.84) de acuerdo a la multiplicidad observada debían corresponder a funciones oxigenadas secundarias y los otros dos a carbonos oxigenados terciarios (δ 79.81 y 79.65).
- e) En la región de los carbonos olefínicos se observaron tres dobletes a δ 149.97, 122.49 y 119.00, así como un singulete a δ 141.40.
Estas señales correspondían en concordancia con la multiplicidad y el desplazamiento químico a una doble ligadura disustituída α, β -insaturada (δ 149.97 y 122.49) y a una doble ligadura trisustituída (δ 141.40 y 119.00).
- f) Por arriba de δ 200 se observaron dos singuletes característicos del carbonilo de una cetona α, β -insaturada en un caso (δ 204.09) y de una cetona en anillo de 6 miembros en el otro (δ 213.00).

g) Las restantes 11 señales correspondían a singuletes, dobletes y tripletes atribuibles a carbonos cuaternarios, metinos y metilénos respectivamente.

Como se mencionó previamente la fórmula molecular establecida permitía un índice de insaturación de 10 y requería 13 oxígenos. De la información estructural obtenida del espectro de RMN¹³C se satisfacían 6 de las 10 insaturaciones permitidas. Por otra parte, de los trece oxígenos, dos correspondían a funciones cetónicas, dos a un grupo acetato, cinco al azúcar, uno al enlace O glicosídico y dos a funciones carbinólicas secundarias de acuerdo a los resultados de la acetilación, restando tan sólo un oxígeno por asignar.

Las cuatro insaturaciones y el oxígeno faltante, podían entonces corresponder a una estructura tetracíclica y a un alcohol terciario, respectivamente. La estructura tetracíclica en cuestión, debido al alto número de metilos y al número de carbonos de la parte aglicona, encajaba perfectamente con la de un triterpeno tetracíclico.

El análisis del espectro de RMN¹H del derivado heptaacetilado 44b (Espectro E-4), cuyas constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 18, verificó por una parte, la presencia en la molécula de una sola unidad de glucosa y de dos funciones carbinólicas secundarias, ya que se observaron siete señales para grupo acetato a δ 1.84, 1.95, 2.00, 2.03, 2.10 y 2.11. Cuatro de estas señales correspondían al azúcar acetilado, dos a las funciones carbinólicas secundarias, y la última se encontraba ya en la molé-

cula original.

Por otra parte, se reconfirmó la presencia de la doble ligadura trisustituída ya que a δ 5.67 se observó un multiplete atribuible a un protón vinílico y se determinó inequívocamente que la doble ligadura disustituída era *trans*, ya que a δ 6.35 y 7.12 se observaron dos dobletes ($J=16\text{Hz}$) característicos de un sistema AB de una doble ligadura *trans* disustituída (Ver Figura 13).

Este espectro mostró también varias señales para metilos y las señales correspondientes a los protones base de los acetatos. De estas últimas sólo eran fácilmente distinguibles el multiplete característico del metileno (H-6') del azúcar, que aparecía a δ 4.20. Finalmente se observó un doblete ($J=7\text{Hz}$) a δ 4.60 atribuible al protón anomérico. Tanto la zona olefínica como la región de protones base de funciones oxigenadas se ilustran en la Figura 13.

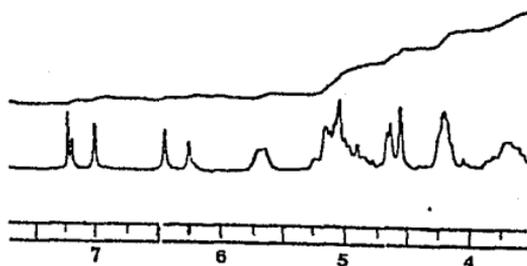


Figura 13. Región olefínica y de protones unidos a funciones oxigenadas del espectro de RMN^1H del derivado acetilado 44b.

A fin de determinar la naturaleza de la aglicona del compuesto 44, se hicieron varios intentos de hidrólisis ácidas bajo diferentes condiciones (Kupchan, 1971-1973; Yamada, 1978); sin embargo, en ninguno de los casos se logró separar producto alguno, ya que aparentemente bajo las condiciones de hidrólisis el producto se descomponía.

En vista de los resultados anteriores se procedió a efectuar una hidrólisis enzimática con celulasa de una mayor cantidad del producto 44 tal como se describió en la parte experimental. Esta hidrólisis permitió la separación de la aglicona 44a cuyas características se indican en la Tabla 19, y de la glucosa. El azúcar fué caracterizado cromatográficamente utilizando los sistemas cromatográficos VII y VIII, y como agente revelador "C" (Ver Tabla 11).

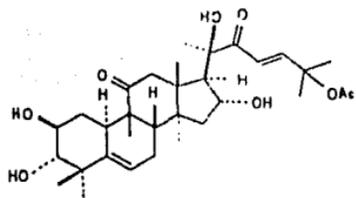
El análisis de los espectros de masas de la aglicona (Espectro E-5) y de RMN^{1H} (Espectro E-6) de su derivado acetilado (44c), permitió concluir que el esqueleto base de 44a era el de un triterpeno del tipo cucurbitano.

La información del espectro de masas de 44a que sustentó la conclusión anterior se resume en la Figura 14 y los aspectos más importantes fueron los siguientes:

a) La presencia de un ión a m/z 96 (C_6H_8O , pico base), que resulta de la ruptura del enlace 20-22 con la simultánea migración de un protón del hidroxilo en C-20 y pérdida del sustituyente en C-25.

Este fragmento es característico de cucurbitacinas que presentan una doble ligadura entre 23 y 24 y resulta de gran utilidad pa-

Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la Cucurbitacina F-25-acetato (44a) y su derivado acetilado (44c).



p.f.

205-210°C

KR^{KBr}
max cm⁻¹

3220, 2980, 2932, 1725, 1690, 1650, 1450, 1371, 1262, 1190,
1125, 1055, 1030

EMIE
m/z (%)

500 (M-60, 1.2), 482 (0.8), 457 (0.7), 405 (1.3), 387 (12),
369 (11), 113 (18.4), 112 (13), 111.1 (19.1), 96.1 (100),
43.1 (38.1)

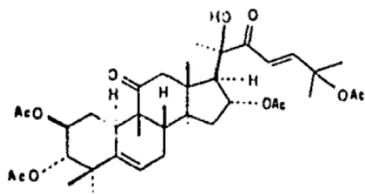
44c

RN¹H
(90MHz, CDCl₃, δ)

0.99 (s, 3H, H-18), 1.04 (s, 3H, H-30), 1.08 (s, 3H, H-29), 1.21
(s, 3H, H-28), 1.24 (s, 3H, H-21), 1.40 (s, 3H, H-19), 1.56 (s,
H-Ac), 1.84 (s, 3H, H-Ac), 1.97 (s, 3H, H-Ac), 2.02 (s, 3H,
H-Ac), 2.04 (s, 3H, H-Ac), 2.5-2.75 (m), 3.20 (d, 1H, J=14Hz,
H-12), 4.24 (s, 1H, OH), 4.66 (d, 1H, J=10Hz, H-3), 4.93 (dd,
1H, J=10.5Hz, H-2), 5.15 (t, J=7Hz, H-16), 5.73 (m, 1H, H-6),
6.43 (d, J=15Hz, H-23), 7.14 (d, 1H, J=15Hz, H-24)

EMIE
m/z (%)

627 (M-60+1, 11), 567 (50), 507 (81.4), 447 (100), 133 (56.4)



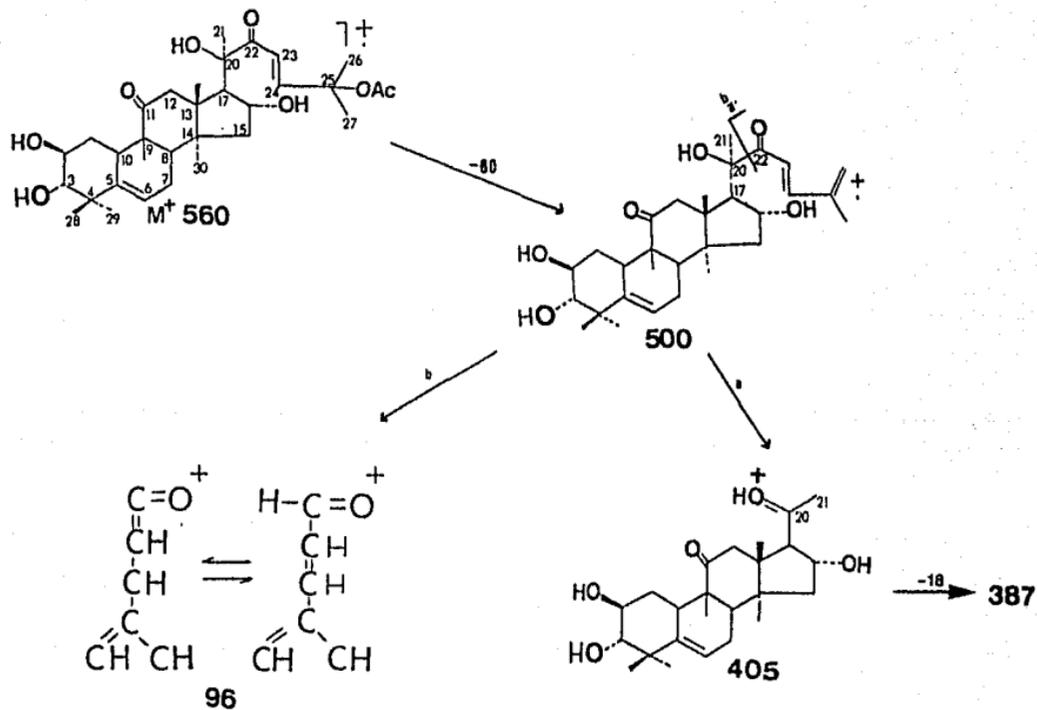


Figura 14. Fragmentos más importantes del espectro de masas de 44a.

ra determinar finalmente la estructura de la cadena lateral de un cucurbitano.

En el caso específico de la aglicona 44a debía corresponder a la de la estructura parcial que se indica en la Figura 15.

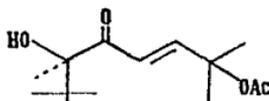


Figura 15. Estructura de la cadena lateral del compuesto 44.

- b) El ión a m/z 405 [$(M-155)$, $C_{24}H_{37}O_5$], resultante también de un rompimiento entre el enlace C-20 y C-22, pero sin transferencia de hidrógeno, permitió concluir que en C-25 se encontraba un acetato terciario y en C-20 un hidroxilo terciario. La ubicación de un hidroxilo terciario en C-20 confirmaba inequívocamente la información proporcionada por el espectro de $RMN^{13}C$ del glicósido en relación a la naturaleza de los diferentes carbonos base de oxígeno. Por otra parte, la pérdida consecutiva de dos moléculas de agua a partir del ión a m/z 405 para originar los fragmentos a m/z 387 ($C_{24}H_{35}O_4$) y 369 ($C_{24}H_{35}O_3$) es característico de los espectros de masas de varias cucurbitacinas trihidroxiladas en la parte tetracíclica de la molécula (Kupchan, *et al*, 1970).

c) Finalmente, otro pico diagnóticamente importante se observó a m/z 111 ($C_7H_{11}O$). El origen de este ión no es claro y puede originarse por la migración del metilo en C-20 a C-22 con la consecuente fusión del enlace 20-22 y la pérdida del sustituyente en C-25. (Kupchan, *et al.*, 1970; Rice, *et al.*, 1981; Duncan, *et al.*, 1968).

En relación al espectro de RMN^1H (Espectro E-6) cabe hacer notar que este fué un tanto similar al del glicósido acetilado 44b, difiriendo en la ausencia de las señales del azúcar, y por lo tanto permitía obtener una información más clara acerca de la aglicona. Los aspectos más importantes de este espectro fueron los siguientes:

- a) A campo alto se observaron señales para ocho metilos a δ 0.99, 1.04, 1.08, 1.21, 1.24, 1.40 y 1.56.
- b) A δ 1.84, 1.97, 2.02 y 2.04 se observaron cuatro señales para acetato, es decir tres menos que para el glicósido.
- c) A δ 2.65 se encontraba el doblete ($J=7Hz$) característico para el H-17 de la estructura tipo.
- d) A δ 3.20 se encontraba una de las señales dobles ($J=12Hz$) del sistema AB que conforman los protones H-12 y H-12'; estos protones de acuerdo al desplazamiento químico y en base a consideraciones biogenéticas debían ser vecinales a un grupo ceto ubicado en C-11.
- e) A δ 4.24 se observó una señal simple que integraba para un protón y que desaparecía al registrar el espectro con D_2O .

f) A δ 4.66, δ 4.93 y δ 5.15 se encontraban una señal doble ($J=10\text{Hz}$), otra doble de doble ($J=10,5\text{Hz}$) y un triplete respectivamente, asignables a tres protones base de ésteres secundarios. El valor de J de 7Hz para el triplete centrado en δ 5.15, sugirió que este debía corresponder a H-16. También el patrón de acoplamiento observado para las otras dos señales permitió inferir que estos protones estaban mutuamente acoplados y que por lo tanto eran vecinales.

Las únicas posiciones factibles para la ubicación de estos dos protones vecinales eran la 2 y la 3, con una estereoquímica α y β respectivamente. Esta región del espectro se ilustra en la figura 16.

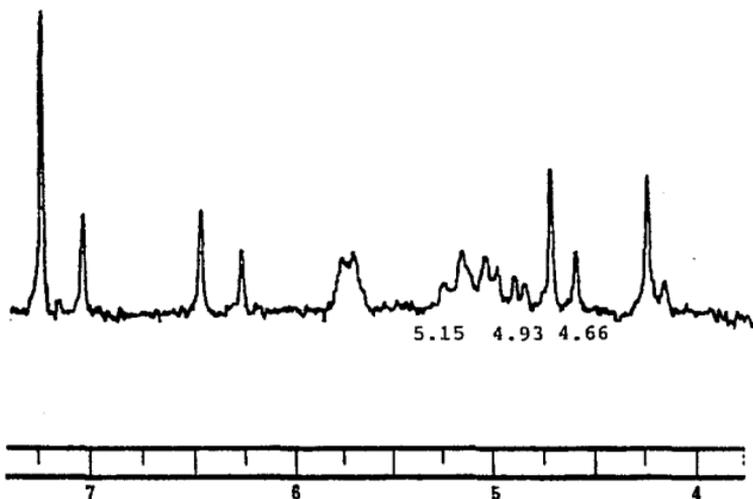


Figura 16. Región de los protones base de éster de la aglicona del compuesto 44.

- g) A δ 5.73 se observó el multiplete del protón vinflico trisustituido que de acuerdo a la comparación con modelos adecuados es atribuible a H-6.
- h) Finalmente, se observó el sistema AB característico de los protones H-23 y 24 a δ 6.43 (d, J=15Hz) y δ 7.14 (d, J=15Hz).

La presencia en el espectro de cuatro señales para metilo de acetato y tan solo tres protones base del éster indicaba en congruencia con los resultados del espectro de masas que uno de los acetatos era terciario. Así mismo el singulete a δ 4.24 intercambiable con D₂O confirmaba la asignación del hidroxilo terciario en C-20.

Resumiendo entonces la aglicona era un triterpeno de tipo cucurbitano, con una cadena lateral como la indicada en la Figura 15, una doble ligadura entre C-5 y C-6, un grupo ceto en C-11 y con tres funciones carbinólicas secundarias, una de ellas en la posición 16 y las otras dos en las posiciones 2 y 3.

En base a la información anterior la estructura de la aglicona correspondía a la de la Cucurbitacina F-25-acetato. La comprobación inequívoca de que este era el caso, se logró al comparar el producto obtenido de la hidrólisis del dihidro derivado del glicósido 44, con una muestra auténtica de la 23,24-dihidrocucurbitacina F-25-acetato. Tanto el producto de hidrólisis del glicósido reducido, así como su derivado acetilado (46b) resultaron idénticos en todos sus aspectos a la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato y a su derivado acetilado respectivamente.

En la Tabla 20 se resumen las características físicas y espectroscópicas de ambos compuestos (46a y 46b).

Como se puede apreciar en el espectro de RMN¹H del derivado acetilado 46b, era casi idéntico al de la aglicona acetilada 44a, difiriendo fundamentalmente en la ausencia de las señales para el sistema AB de la doble ligadura de la cadena lateral. Como se puede apreciar en la Figura 17 la región de los protones base del éster de 46b, era prácticamente igual a la de 44 acetilada.

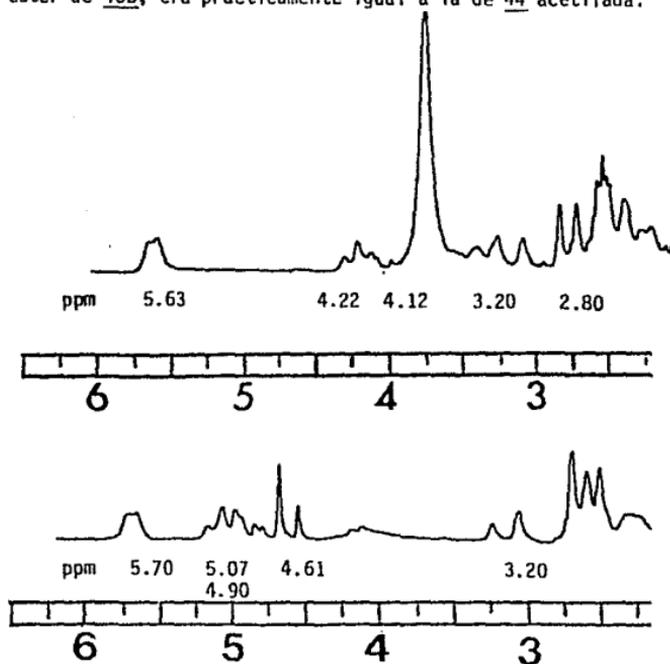
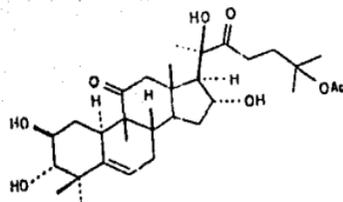


Figura 17. Región de protones base de funciones oxigenadas de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato.

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) y su derivado acetilado (46b).



		<u>46a</u>
p. f.		231-232°C
$[\alpha]_D$		= + 47 (MeOH)
UV $\overset{\text{MeOH}}{\text{max}}$	nm (log)	206 (3.769), 228 (2.684), 284 (2.431)
IR $\overset{\text{KBr}}{\text{max}}$	cm^{-1}	3562, 3451, 3409, 2983, 1708, 1694, 1452, 1372, 1280, 1022
RMN ¹ H		
(CDCl ₃ -DMSO-d ₆ , δ)		0.85 (s, 3H, H-18), 0.90 (s, 3H, H-30), 1.01 (s, 3H, H-29), 1.12 (s, 3H, H-28), 1.24 (s, 3H, H-21), 1.34 (s, 3H, H-19), 1.40 (s, 6H, H-26 y H-27), 1.90 (s, 3H, H-Ac), 2.77 (d, J=7Hz, 1H, H-17), 3.09 (d, J=15Hz, 1H, H-12), 3.30 (d, J=15Hz, 1H, H-12'), 3.50 (m, H-3), 3.75 (bs, OH), 4.12 (m, H-2), 4.22 (dd, J=7Hz, 1H, H-16), 5.63 (bd, J=5.5Hz, 1H, H-6)
RMN ¹³ C		
(CDCl ₃ -MeOD, δ)		214.10 (s, C-22), 213.00 (s, C-11), 170.71 (s, C-Ac), 140.80 (s, C-5), 118.70 (d, C-6), 81.60 (s, C-25), 80.43 (s, C-20), 79.06 (d, C-3), 70.33 (d, C-16), 70.12 (d, C-2), 57.60 (d, C-17), 50.36 (d, C-14), 48.45 (t, C-12), 48.29 (s, C-9), 47.87

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) y su derivado acetilado (46b). (Continuación).

46a

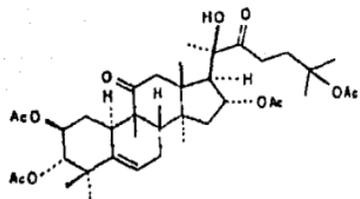
(s, C-13), 45.15 (t, C-15), 42.58 (d, C-8), 41.69 (s, C-4),
 34.55 (t, C-24), 33.65 (d, C-10), 32.86 (t, C-1), 30.74
 (t, C-23), 25.57 (c, C-27), 25.36 (c, C-26), 24.19 (c, C-21),
 23.40 (t, C-7), 21.71 (c, C-Ac), 21.13 (c, C-28), 19.65, (c,
 C-30), 19.28 (c, C-18), 18.53 (c, C-19)

EMIE
 m/z (%)

502 (2, M-60), 484 (6, M-60-18), 405 (32), 387 (40), 369
 (28), 351 (10), 157 (20), 113 (65.6), 87 (100), 69 (68.4),
 43 (78.8)

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato (46a) y su derivado acetilado (46b). (Continuación).

46b



IR KBr
max cm^{-1}

3430, 2975, 1739, 1698, 1369, 1249, 1627

RMN^1H
(CDCl_3 , δ)

0.85 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.05 (s, 3H), 1.20 (s, 6H), 1.37 (s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.90 (s, 3H, H-Ac), 1.95 (s, 6H, H-Ac), 2.02 (s, 3H, H-Ac), 2.65 (d, $J=7\text{Hz}$, H-17), 2.60 (d, $J=15\text{Hz}$, H-12), 3.20 (d, $J=15\text{Hz}$, H-12'), 4.2 (s, 1H, OH-20), 4.61 (d, $J=10\text{Hz}$, H-3), 4.90 (dd, $J=10,6\text{Hz}$, H-2), 5.07 (dd, $J=7\text{Hz}$, H-16), 5.76 (bd, $J=5.5\text{Hz}$, H-6).

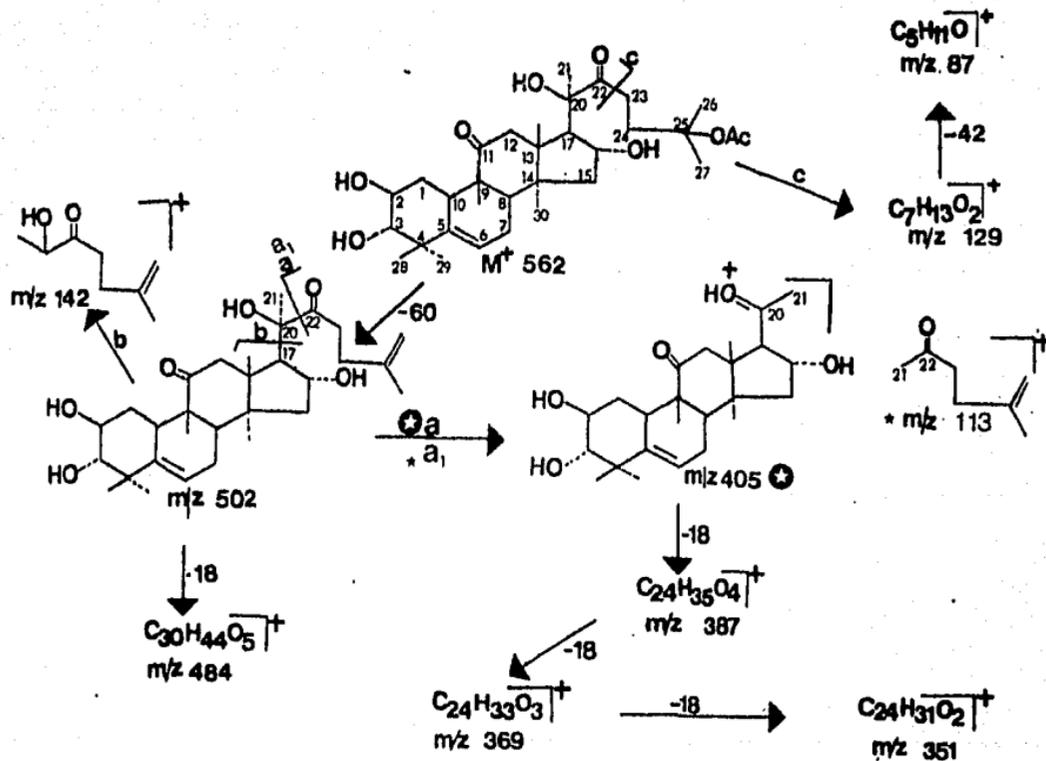


Figura 18. Patrón de fragmentación de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F-25-acetato.

El espectro de masas de 46a era también similar al de 44b y difería básicamente en la ausencia del pico a m/z 96, y en la presencia de iones intensos a m/z 113 y 87. En la Figura 18 se ilustra el patrón de fragmentación de la 23,24-dihidrocucurbitacina F-25 acetato.

A este punto de la discusión tan sólo restaba por establecer la posición de unión de la β -D-Glucosa a la Cucurbitacina F-25-acetato. La unión glicosídica podía ser en cualquiera de las tres funciones carbinólicas secundarias de la aglicona (OH en C-16, en C-2 o en C-3).

En principio la unión con el hidroxilo de C-3 se descartó debido a que el desplazamiento químico observado para el doblete correspondiente a H-3 era casi igual en el glicósido acetilado y en la aglicona acetilada δ H3 (aglicona) 4.66 y δ H3 (glicósido) 4.61. Para discernir entre las posiciones 16 y 2, se realizaron experimentos de desacoplamiento en el glicósido y el razonamiento perseguido era, por una parte, irradiar la zona donde se ubicaba H-17 (δ 2.5-2.75), y observar alguna modificación entre 4.75 y 5.25, donde debía aparecer H-16, si la unión glicosídica no se establecía con el hidroxilo en 16. Por la otra, irradiar entre 3.75 y 4.0 (donde debía resonar el protón base del O glicósido) y observar en la zona comprendida entre δ 4.5 y 5.25, donde resonaban los restantes protones base de funciones oxigenadas de la parte aglicona.

En el primer caso, es decir al irradiar en δ 2.67 se observó que el multiplete entre 4.75 y 5.25 se modificaba, lo cual sugería que posiblemente la unión glicosídica no era con el OH en 16.

En el segundo caso, al irradiar entre δ 3.75 y 4.0 se observó que la señal doble asignada al H-3 se simplificaba, observándose claramente el doblete para el protón anomérico. Este experimento claramente indicó que la unión glicosídica debía ser con el hidroxilo en 2. Los experimentos de desacoplamiento se ilustran en la Figura 19.

La reducción con NaBH_4 de la Arvenina I (43) glicósido obteni do también en este estudio, permitió obtener un compuesto idéntico a 44 en todos sus aspectos, confirmando inequívocamente que la unión glicosídica se establecía a través del hidroxilo en 2.

En base a la discusión anterior se concluyó que el compuesto 44 era la 2- β -D-glucocurbitacina F-25-acetato, el cual no ha sido previamente descrito, y por lo tanto es un nuevo producto natural. Este compuesto no presentó actividad fasciolicida a concentraciones de 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al ser evaluado como se indicó en la sección experimental.

4.2 Identificación de la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43).

El compuesto 43, se aisló al recromatografiar las fracciones 759-787 de la columna original, según se indicó en la sección experimental. Se obtuvo como un sólido cristalino, ligeramente amarillo, de sabor extremadamente amargo, con p.f. 137-140°C, ópticamente activo, soluble en AcOEt y MeOH . El rendimiento total de este compuesto fué de 0.1120% (en base al peso de planta seca).

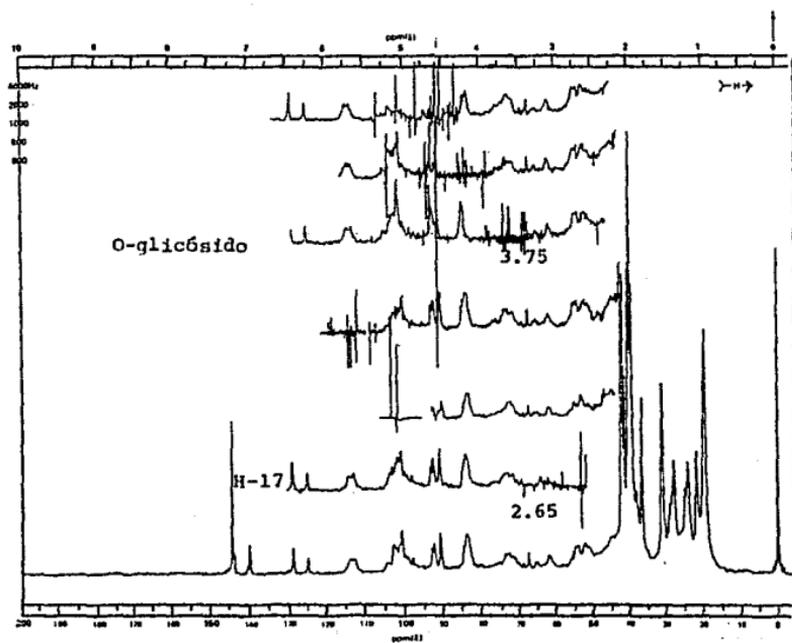
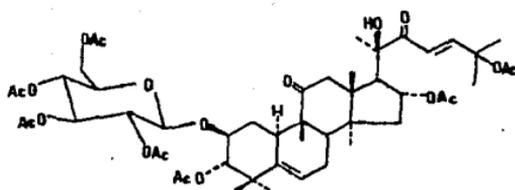


Figura 19. Experimento de desacoplamiento para 44b y 43b.

Su fórmula molecular se estableció como $C_{38}H_{60}O_{13}$, que permite un índice de insaturación de 10.

Las constantes físicas y espectroscópicas de 43 se resumen en la Tabla 21.

El sabor extramadamente amargo, una prueba positiva de Molisch, la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática y la similitud de los parámetros espectroscópicos con aquellos del 44, permitieron inferir *a priori* que también el compuesto 43 era un glicocucurbitano.

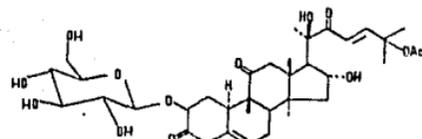
El Espectro de IR (Espectro E-11) mostró las mismas bandas de absorción que el del compuesto 44. Igualmente el espectro de RMN^1H en $Py-d_5$ (Espectro E-12) era semejante, observándose también señales para ocho metilos y una señal para acetato.

El espectro de $RMN^{13}C$ (Espectro E-13) mostró resonancias para 38 carbonos y también indicó claramente la presencia de glucosa (δ 104.08, 78.3, 78.00, 75.70, 71.4, 62.6), de una doble ligadura trisustituida (δ 140.8 y 120.50) y de otra disustituida (δ 150.1 y 122.52), de un acetato (δ 170 y 20.28) y finalmente de tres grupos cetónicos (δ 212.7, 211.2 y 204.2).

Este espectro difería fundamentalmente con respecto al del compuesto 44 en lo siguiente:

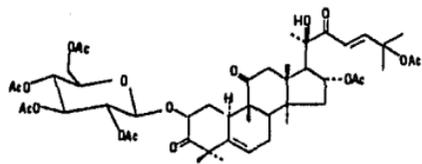
- a) A campo bajo (δ 211.2) se observó una señal adicional correspondiente a un grupo carbonilo de cetona.
- b) En la zona donde absorben los carbonos unidos a oxígeno se observó una señal menos que para el compuesto 44. La resonancia faltante era para un carbono secundario.

Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2-β-D-glucocucurbitacina B (43) y su derivado acetilado (43b).



	43
p.f.	137-140°C
IR $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1}	3425, 2977, 2925, 1721, 1691, 1630, 1464, 1372, 1263, 1127, 1079, 989
RMN^1H (80 MHz, Py-d_5 , δ)	(Ver Espectro 12)
RMN^{13}C (80MHz, Py-d_5 , δ)	212.7 (s, C-11), 211.2 (s, C-3), 204.2 (s, C-22), 170 (s, C-Ac), 150.1 (d, C-24), 140.8 (s, C-5), 122.52 (d, C-23), 120.50 (d, C-6), 104.08 (t, C-1'), 79.8 (s, C-20), 79.7 (s, C-25), 78.50 (d, C-2), 78.3 (d, C-3'), 78.00 (d, C-5'), 75.70 (d, C-2'), 71.4 (d, C-4'), 70.7 (d, C-16), 62.6 (t, C-6'), 59.70 (d, C-17), 51.5 (s, C-14), 50.9 (s, C-13), 49.1 (t, C-12), 48.8 (s, C-9), 48.5 (s, C-4), 46.32 (t, C-15), 42.9 (d, C-10), 35.17 (d, C-8), 34.3 (d, C-1), 28.68 (c, C-29), 26.6 (c, C-27), 26.75 (c, C-26), 25.47 (c, C-28), 24.20 (t, C-7), 21.7 (c, C-18), 20.4 (t, C-19), 20.28 (s, C-Ac), 19.90 (c, C-21), 18.86 (c, C-30)
Análisis elemental	$\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{13}$

Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2- β -D-gluco-cucurbitacina B (43) y su derivado acetilado (43b). (Continuación).



43b

p. f.

104-106°C

IR $\frac{\text{KBr}}{\text{max}}$ cm^{-1}

3460, 3417, 2980, 2932, 1759, 1695, 1630, 1464, 1371, 1226, 1176, 1129, 1102, 1040, 982

RMN^1H
(80 MHz, CDCl_3 , δ)

1.04 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-30), 1.26 (s, 3H, H-29), 1.30 (s, 6H, H-21 y H-28), 1.42 (s, 3H, H-19), 1.54 (s, 6H, H-26 y H-27), 1.88 (s, 3H, Ac-16), 2.05 (s, 9H, Ac), 2.12 (s, 3H, Ac), 2.67 (d, $J=12\text{Hz}$, 1H, H-12), 2.77 (d, $J=7\text{Hz}$, 1H, H-17), 3.27 (d, $J=12\text{Hz}$, 1H, H-12'), 3.65 (m, 1H, H-5'), 4.16 (m, 2H, H-6'), 4.51 (dd, $J=12,6\text{Hz}$, 1H, H-2), 4.67 (d, $J=7\text{Hz}$, 1H, H-1'), 4.85-5.35 (m, H-16, H-2', H-3', H-4'), 5.67 (m, 1H, H-6), 6.32 (d, $J=16\text{Hz}$, 1H, H-23), 7.02 (d, $J=16\text{Hz}$, 1H, H-24).

La acetilación de 43 en condiciones habituales permitió obtener el derivado hexaacetilado (43b), cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 21. La obtención de este derivado, aunado a la presencia de una señal adicional en la región de los carbonilos y a la ausencia de una señal para un carbono secundario unido a oxígeno en el espectro de RMN¹³C de 43, en comparación con el espectro de 44, sugirieron que uno de los hidroxilos de 44 se encontraba como grupo ceto en 43. A juzgar por los desplazamientos químicos de los singuletes δ 28.68 y δ 18.86 el grupo ceto debía estar en la posición número tres del esqueleto base.

El espectro de RMN¹H del derivado acetilado 43b (Espectro E-15) confirmó también como en el caso del compuesto 44 la presencia de:

- a) Una sola unidad de glucosa ya que se observaron tres señales que integraban para los 15 protones correspondientes a sus grupos acetato (δ 1.88, 2.05 y 2.12): cuatro correspondían al azúcar, uno a una función carbinólica secundaria y el último que se encontraba ya en la molécula original.
- b) Una doble ligadura trisustituída (δ 5.67).
- c) Una doble ligadura conjugada *trans* disustituída (δ 6.23 y 7.02, J=16Hz).

A diferencia del compuesto 44 y como se puede observar en la Figura 19, la zona entre δ 4.5 y 5.25 era menos compleja, observándose claramente a δ 4.51 una señal doble de dobles (J=10,5Hz) fácilmente asignable a H-2. Así mismo a δ 4.51 se encontraba la señal

correspondiente al protón anomérico.

La hidrólisis enzimática con celulasa y β -glucosidasa confirmaron la naturaleza β -glucosídica de 43; al igual que en el caso anterior los diferentes intentos de obtener la aglicona mediante una hidrólisis ácida no fueron satisfactorios. Al analizar cromatográficamente los productos de la hidrólisis enzimática, se pudo detectar a la D-glucosa como único azúcar presente y a la aglicona correspondiente. Esta última se separó del crudo de la reacción tal como se indicó en la sección experimental. Se obtuvo como un sólido cristalino de p.f. 215-220°C; sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 22.

El análisis del espectro de masas (Espectro E-16) de la aglicona confirmó inequívocamente que su estructura base era la de un cucurbitano, ya que se observaron fragmentos a m/z 96 (pico base), 111 y 113 como en el caso de la aglicona de 44.

Otros iones importantes se observaron a m/z 403 [$C_{24}H_{35}O_5$ (0.6)] y m/z 385 [$C_{24}H_{33}O_4$, 403-H₂O (0.5)]. El fragmento a 403 al igual que el fragmento observado a m/z 405 para 44, resulta de la pérdida de la cadena lateral, por ruptura entre C-20 y C-22. Las dos unidades de masa menos es consistente con la presencia de un grupo ceto, en lugar de uno de los hidroxilos de la aglicona 44a.

Cabe hacer notar que la información proporcionada por el espectro de masas era indicativa de una cadena lateral idéntica a la de 44.

Por tratamiento con anhídrido acético y piridina de la aglico-

na 43a, se obtuvo el derivado triacetilado (43c), cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 22. El espectro RMN¹H (Espectro E-17) resultó similar al de la aglicona 44a, difiriendo en los siguientes aspectos:

- a) A campo alto se observaron señales para ocho metilos a δ 1.01, 1.09, 1.24, 1.30, 1.41 y 1.56, en tanto que para 44 se observaron a δ 0.99, 1.04, 1.08, 1.21, 1.24, 1.40 y 1.56.
- b) A δ 1.85, 2.01 y 2.13 se observaron tres señales para acetato, una menos que para 44a.
- c) En la zona donde resuenan los protones de ésteres solo se observó el triplete ($J=7\text{Hz}$) característico para H-16 y un doble de dobles a δ 4.51, consistente con la ubicación en C-3 de un grupo ceto. Esta zona se ilustra en la Figura 20.

En base a la información anterior se concluyó que la aglicona era la cucurbitacina B.

Para establecer la posición de unión de azúcar, la comparación de los espectros de RMN del glicósido acetilado y de la aglicona acetilada fué de gran ayuda. Como se puede observar en la Figura 21 la señal atribuible a H-2 apareció en el glicósido acetilado a δ 4.51 en tanto que en la aglicona acetilada se observó en δ 5.45.

Este efecto paramagnético observado para la señal H-2 era consistente con la unión del azúcar en la posición 2 de la aglicona.

En base a la evidencia anterior se identificó al compuesto 43 como la 2- β -D-Glucocucurbitacina B (Arvenina 1), la cual había sido previamente aislada de la *Anagallis arvensis*, Primulaceae (Yamada,

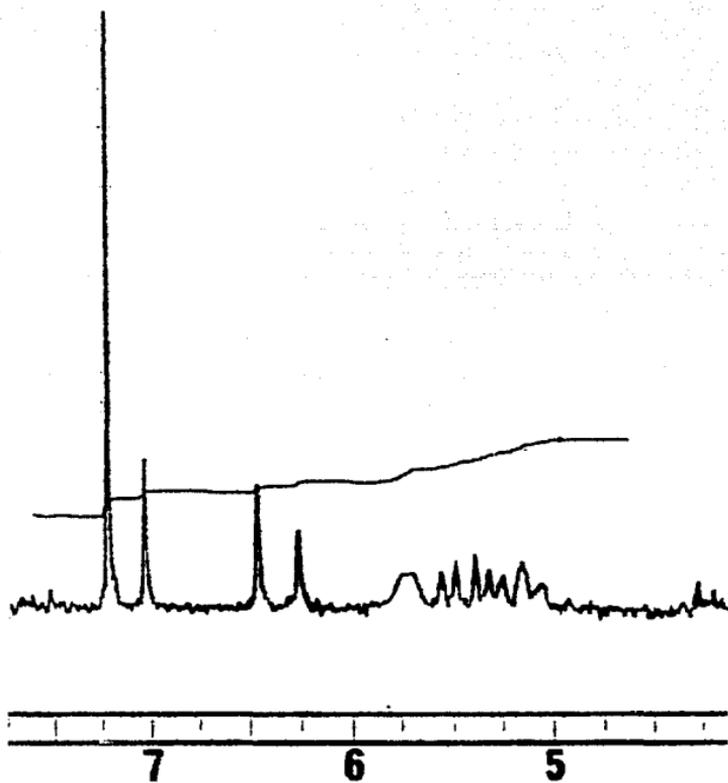
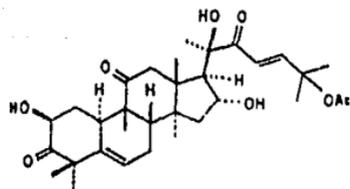


Figura 20. Región de protones base de éster de la aglicona del compuesto 43.

Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina B (43a) y su derivado acetilado (43c).



p. f.

IR KBr max cm^{-1}

3446, 3411, 3222, 2976, 2926, 1719, 1628, 1459, 1257, 1195, 1126, 1091, 1056, 1022, 986

EMIE
m/z (%)

498 (M-60, 1.4), 455.3 (0.6), 385 (0.5), 369 (0.4), 367 (0.4), 113 (10), 112 (14.1), 111.2 (15.6), 96 (100), 43 (22.9)

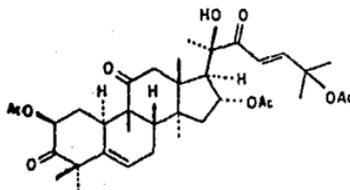
43c

RMN^1H
(80MHz, CDCl_3 , δ)

1.01 (s, 3H, H-18), 1.09 (s, 3H, H-30), 1.24 (s, 3H, H-29), 1.30 (s, 6H, H-21 y H-28), 1.41 (s, 3H, H-19), 1.56 (s, 6H, H-27 y H-26), 1.85 (s, 3H, H-Ac-16), 2.01 (s, 3H, H-Ac-25), 2.13 (s, 3H, H-Ac-2), 2.67 (d, J=12Hz, 1H, H-12), 2.77 (d, 1H, H-17), 3.25 (d, 1H, J=12Hz, H-12'), 5.15 (t, J=7Hz, 1H, H-16), 5.45 (dd, J=10,6Hz, 1H, H-2), 5.75 (m, 1H, H-6), 6.37 (d, J=16Hz, 1H, H-23), 7.12 (d, J=16Hz, 1H, H-24)

EMIE
(m/z %)

582 (M-60, 1), 487 (4), 427 (5), 385 (2), 367 (4), 291 (25), 189 (6), 177 (6), 159 (4), 137 (4), 111 (12), 96 (100).



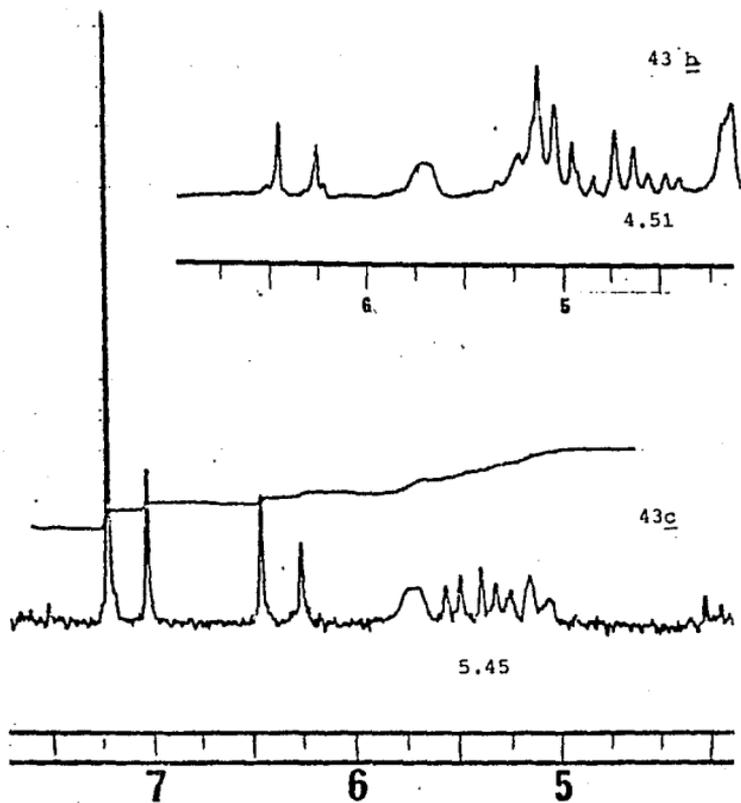


Figura 21. Región asignada a H-2 tanto para el glicósido acetilado (43b) como para la aglicona acetilada (43c).

1978). Es de hacer notar que los parámetros físicos y espectroscópicos del compuesto 43 coincidieron con los previamente descritos por Yamada, *et al.* Sin embargo, los experimentos de descopiamiento realizados en el compuesto 43 indicaron que la asignación del multiplete centrado a δ 3.64 como H-10 del esqueleto base no es correcto; de acuerdo a los estudios ilustrados en la Figura 19, esa señal parece corresponder al H-5' del azúcar, ya que al irradiar el multiplete centrado a δ 4.16 (H-6') la señal en δ 3.64 se simplifico; por el contrario, al irradiar en δ 3.64 se modifico el multiplete correspondiente a H-6'.

Al igual que en el caso anterior, este compuesto no presentó actividad fasciolicida a concentraciones de 50 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ al ser evaluado, como se indico en la sección experimental.

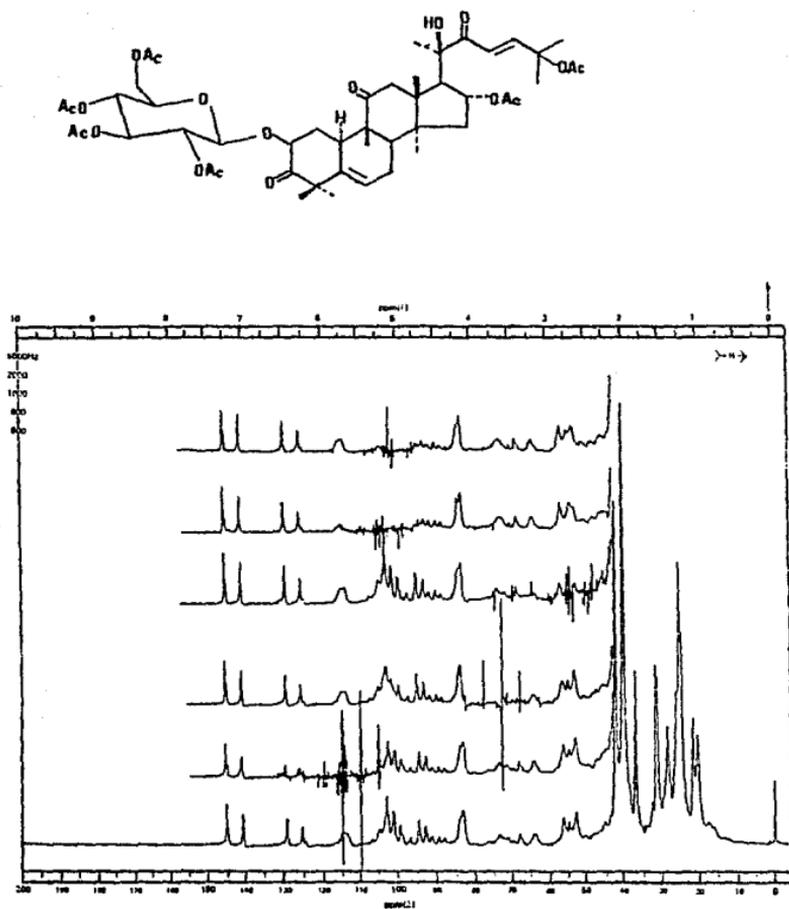


Figura 19. Experimento de desacoplamiento para 44b y 43b. (Continuación).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico de las fracciones más polares obtenidas del extracto metanólico, puso de manifiesto la presencia de dos glucocucurbitacinas, las cuales fueron caracterizadas por métodos químicos y espectroscópicos, como: la 2- β -D-glucocucurbitacina F-25-acetato (44) y la 2- β -D-glucocucurbitacina B (43).

Es de hacer notar que es la primera vez que se describe el aislamiento del glicósido de la cucurbitacina F-25-acetato como producto natural.

Por lo que respecta al compuesto 43, ya había sido descrito por Yamada, *et al.*, 1978, como constituyente de la *Anagallis arvensis*.

2. Este trabajo constituye el primer reporte de glucocucurbitacinas en Rubiaceae.
3. La presencia de cucurbitacinas en la *Cigarrilla mexicana*, (hasta el momento se han identificado cinco) es de importancia quimio-taxonómica, ya que estos parecen ser metabolitos característicos de algunas especies de Rubiaceae estrechamente relacionados con *Hintonia* y que se caracterizan por poseer cortezas extremadamente amargas.
4. La evaluación del extracto metanólico como potencial agente

fasciolicida arrojó resultados positivos a concentraciones de 50 y 1%, mientras que para los compuestos 43 y 44 se obtuvieron resultados poco alentadores a concentraciones de 50 y 10 $\mu\text{g/ml}$. La evaluación se realizó en base a la motilidad que presentaron los parásitos de los lotes testigos (Sánchez, 1984).

5. Finalmente, la continuación del estudio fitoquímico de la *Cigarrilla mexicana* representa una contribución adicional al conocimiento de la flora medicinal mexicana.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Arisawa, J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn, G.A. Cordell y N.R. Farnsworth, J. Pharm. Sci., **74**, (3) 411 (1984).
2. H.E. Audier y B.C. Das, Tetrahedron Letters, **20**, 2205 (1966).
3. S.I. Balboa, A.Y. Zaki, S.M. El-Zalabani, J. Pharm. Sci., **20**, (1-4) 221 (1982).
4. R. Bauer, H. Wagner, Dtsch. Apoth. Ztg., **123**, (7) 1313 (1983).
5. R. Bauer, L.H. Berganza, O. Seligmann y H. Wagner, Phytochemistry, **24**, (7) 1587 (1985).
6. M.E. Bean, N. Antoun, D. Abramson, Ch. Chang, J.L. McLaughlin y J.M. Cassidy, J. Nat. Prod., **48**, (3) 500 (1985).
7. M. Bittner, K.A. Poyser, J.P. Poyser, M. Silva, E. Weltdt y P.G. Sammes, Phytochemistry, **12**, 1427 (1973).
8. J.R. Bull, A.A. Chalmers y P.C. Coleman, Chem. Abstr., **92**, 181419m (1980).
9. L. Cattel, O. Caputo, L. Delprino y G. Biglino, Gazzetta Chimica Italiana, **108** (1978).
10. O.L. Champliss y C.M. Jones, Chem. Abstr., **66**, 92490y (1967).
11. C. Che., X. Fang, C.H. Proebe Jr., A.D. Kinghorn y N.R. Farnsworth, J. Nat. Prod., **48**, (3) 429 (1985).
12. Camacho C. y Rios P., Estudio Fitoquímico de la *Cigarrilla mexicana*, Tesis, UNAM, 1987.

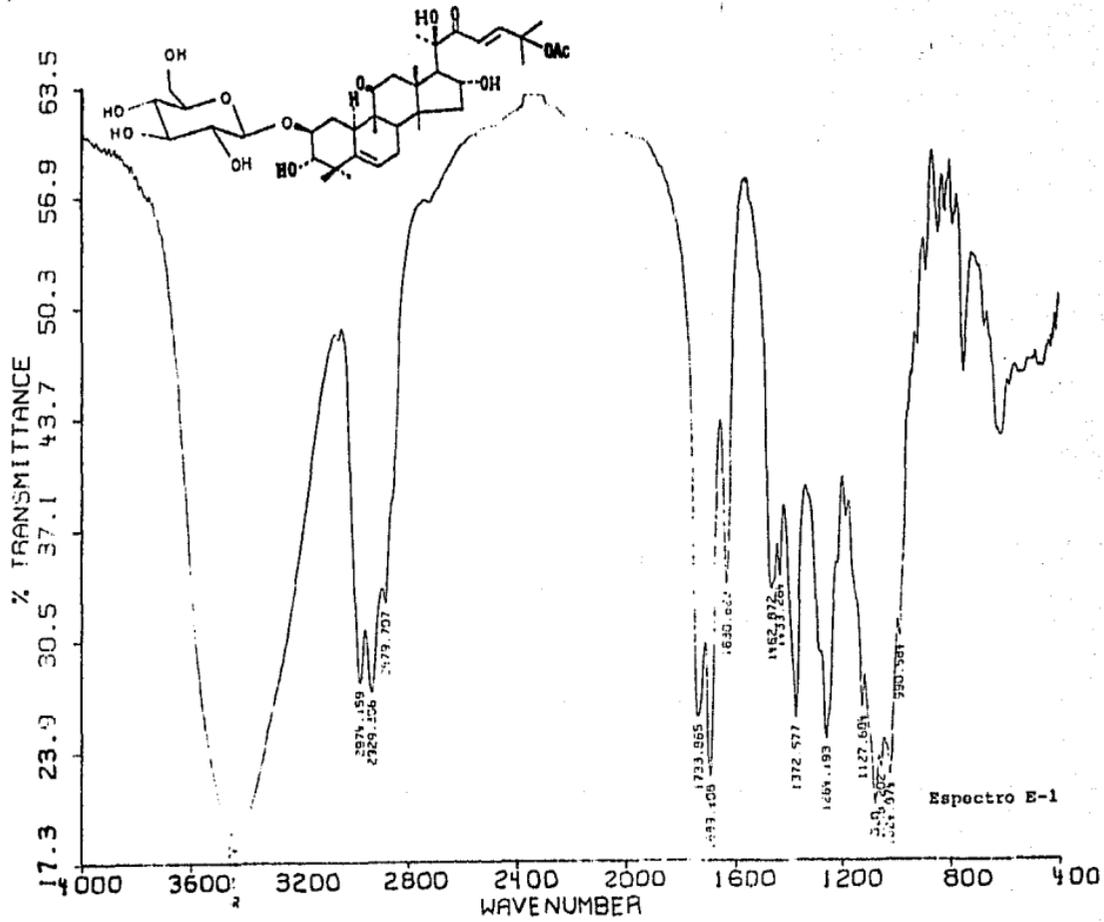
13. M.A. Dayadan y A.G. Panosyan, Chem. Abstr., 105, 91297c (1986).
14. G.R. Duncan, D.D. Levy y R. Pyttel, Planta Med. Heft., 2, 224 (1968).
15. P.R. Enslin, C.W. Holzapfel y K.B. Norton, J. Chem. Soc. (c) 964 (1967).
16. X. Fang, C.H. Phoebe Jr., J.M. Pezzuto, H.S. Fong y N.R. Farnsworth, J. Nat. Prod., 47, (6) 988 (1984).
17. P.M. Goiski, A. Jawoiski, S. Shannon y R.W. Robinson, Chem. Abstr., 105, 149085a (1986).
18. R. Hu, Y Peng, B. Chen, Y Chen y X. Hou, Chem. Abstr., 98, 166801k (1983).
19. T.F. Hutt y M.F. Hemington, J. Sci. Food Agr., 36, (11), 1107 (1985).
20. P.J. Hylands y A.M. Salama, Phytochemistry, 15, 559 (1976).
21. P.J. Hylands y E.S. Mansour, Phytochemistry, 21, (11), 2703 (1982).
22. V.F. Ibarra and V.C. Jenkins, Z. Parasitenkd., 70: 655-661 (1984).
23. T. Itoh, T. Tamura, T.M. Jeang, T. Tamura y T. Matsumoto, Chem. Abstr., 92, 194512m (1980).
24. J. Kanopa, A. Matuszkiewicz, M. Hrabowska y K Onoszka, Chem. Abstr., 82, 118985w (1975).

25. S.M. Kupchan, A.H. Gray y M.D. Grove, J. Med. Chem., 10, 337 (1967).
26. S.M. Kupchan, R.M. Smith, Y Aynehchi y M. Maruyama, J. Org. Chem., 35 (9), 2891 (1970).
27. S.M. Kupchan, C.W. Sigel, L.J. Guttman, R.J. Restivo y R.F. Bryan, J. Am. Chem. Soc., 94, (4) 1353 (1972).
28. S.M. Kupchan y G. Tsou, J. Org. Chem., 38 (5), 1055 (1973).
29. S.M. Kupchan. G. Tsou y C.W. Sigel, J. Org. Chem., 38, (7), 1420 (1973).
30. S.M. Kupchan, H. Meshulam y A.T. Sneden, Phytochemistry, 17, 767 (1978).
31. W.A. Laurie, D. McHale y J.B. Sheridan, Phytochemistry, 24, (11) 2659 (1985).
32. D. Lavie y E. Glotter, Chem. Org. Nat., 29, 307 (1971).
33. C.X. Liu, Z. Zhang, G. Ye y Q. Wen, Chem. Abstr., 104, 61606q (1986).
34. M. Luckner, Secondary metabolismo in microorganisms, plants and animals. Academic Press. New York (1984).
35. M. Madhosudana, H. Meshulam y D. Lavie, J.C.S. Perkin, I, 2552 (1974).
36. R. Mata y T. Reguero y G. Delgado, J. Nat. Prod., 50: 315 (1987).

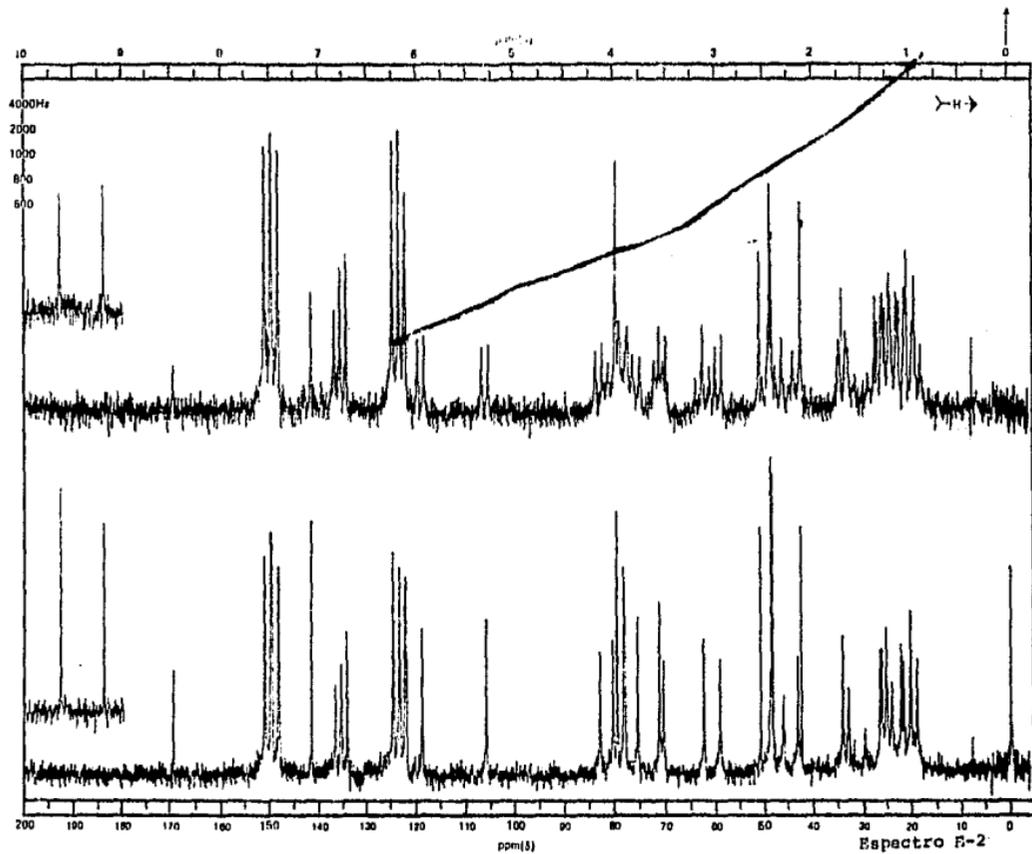
37. A. Melera, W. Schlegel y C.R. Noiler, Notes, 291 (1959).
38. X. Meng, Y. Chen, R. Nie y J. Zhou, Chem. Abstr., 104, 17642z (1986).
39. B.S. Murty, T.N. Vasudera y M.L. Khouruna, Chem. Abstr., 72, 136486g (1970).
40. K.H. Overton, *et al*, Terpenoids and steroids. Specialist Periodical Reports. The Chemical Society. Vol. 1-11 (1969-1980).
41. H. Okabe, Y. Miyahara, T. Yamauchi, K. Mihayara y T. Kawasaki, Chem. Pharm. Bull., 28, (9) 2753 (1980).
42. H. Okaba, Y. Miyahara y T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull., 29 (8) 1561 (1981).
43. H. Okabe, Y. Miyahara y T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull., 24, (11) 3977 (1982).
44. H. Okabe, Y. Miyahara, T. Yamauchi, Tetrahedron Letters, 23, (1) 77, (1982).
45. A.G. Panosyan y G.M. Avetisyan, Chem. Abstr., 104, 65821d (1986).
46. A. Rahman, V.U. Ahmed, M.A. Khan y F. Zehra, Phytochemistry, 17, 767 (1978).
47. M.G. Rao y L.K. Row, Chem. Abstr., 69, 96910v (1968).
48. C.A. Rice, K.S. Rymal, O.L. Chambliss y F.A. Jhonson, J. Agr. Food Chem., 29, 196 (1981).

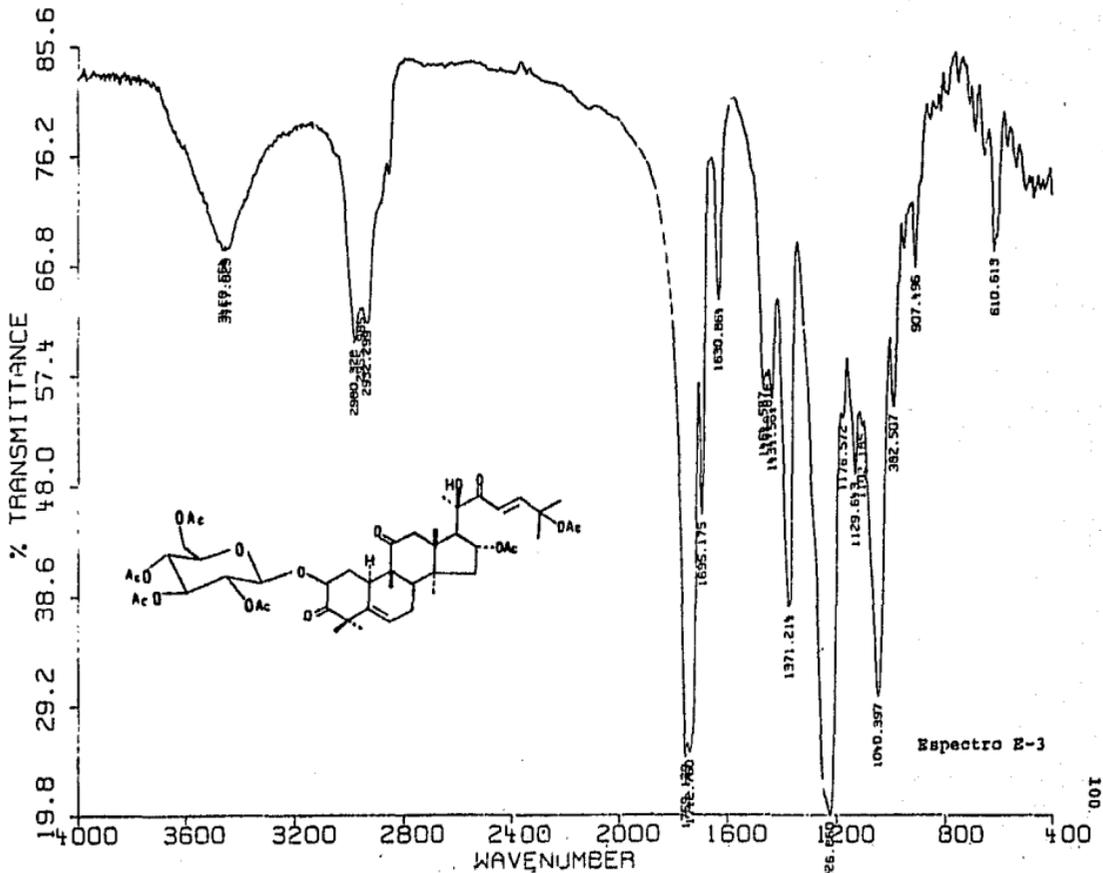
49. B. Rodríguez y F.M. Panizo, Chem. Abstr., **68**, 6124v (1968).
50. H. Rui, Q. Yu, Q. He, L. Gan, Y. Chen, M. Yuan y X. Ye, Chem. Abstr., **101**, 51668k (1984).
51. E. Sánchez, Evaluación in vitro de la eficacia antihelmíntica de algunos compuestos químicos y naturales contra los estadios inmaduros y maduros de *Fasciola hepática*. Tesis. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. (1986).
52. Y. Schun y G.A. Cordell, J. Nat. Prod., **48**, (4) 684 (1985).
53. W. Silapa y P. Picha, Chem. Abstr., **96**, 65720m (1982).
54. K.B.G. Torrsell, Natural Product Chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism.
55. V.V. Velde y D. Lavie, Tetrahedron, **39**, 317 (1983).
56. B. Wojciechowska y L. Wizner, Chem. Abstr., **101**, 51668k (1984).
57. C.N. Wong y H.W. Jeung, Chem. Abstr., **103**, 189562u (1985).
58. Y. Yamada, K. Hagiwara, K. Iguchi, Y. Takahashi y S. Suzuki, Chemistry Letters, 319 (1978).
59. Y. Yamada, K. Hagiwara, K. Iguchi, S. Suzuki y H.Y. Hsu, Chem. Pharm. Bull., **26** (10) 3107 (1978).
60. M. Yasuda, M. Twamoto, H. Okabe y T. Yamauchi, Chem. Pharm. Bull., **32**, (5) 2044 (1984).

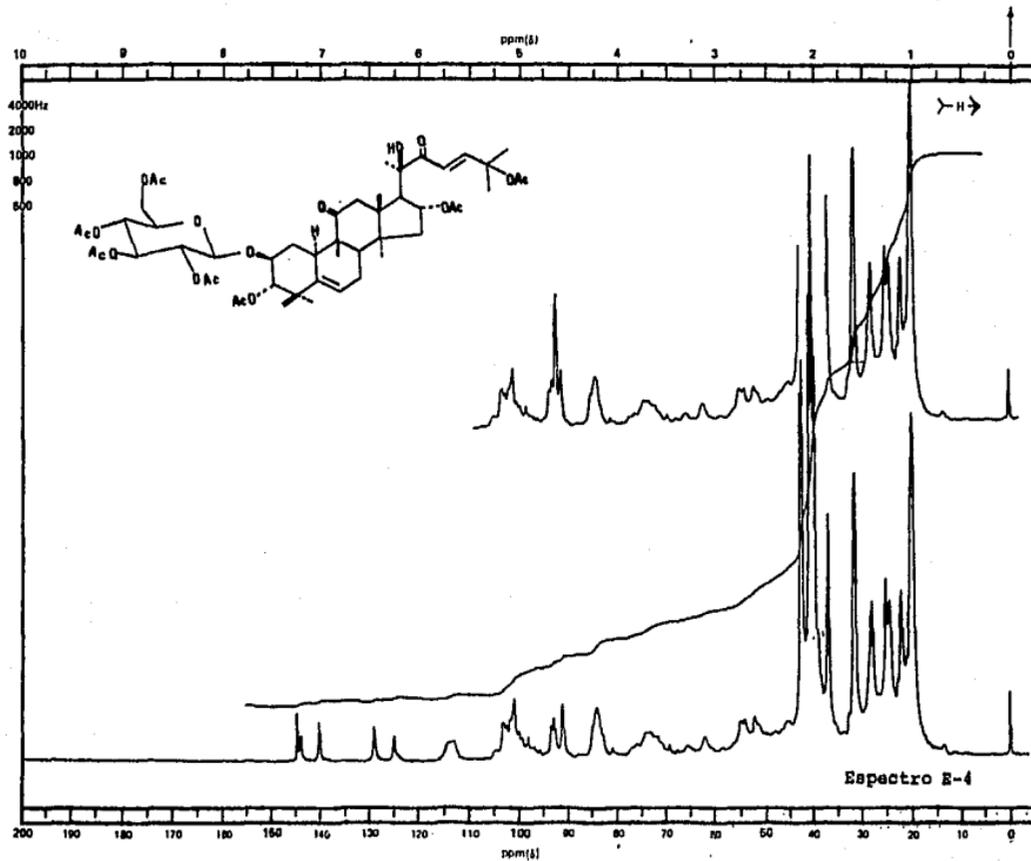
APENDICE

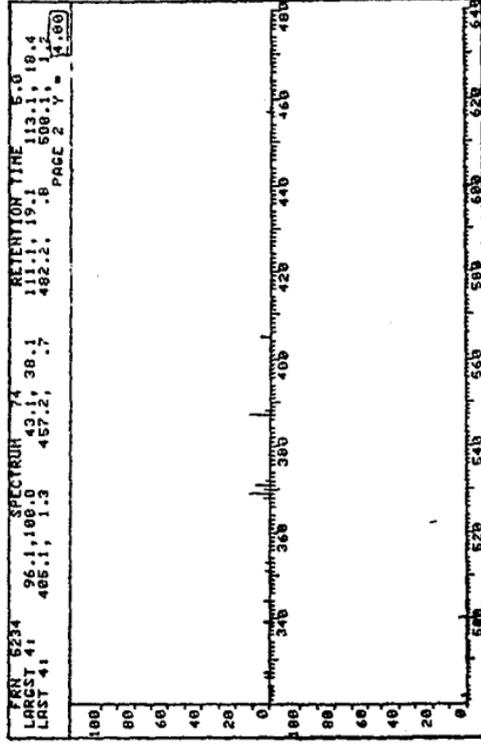
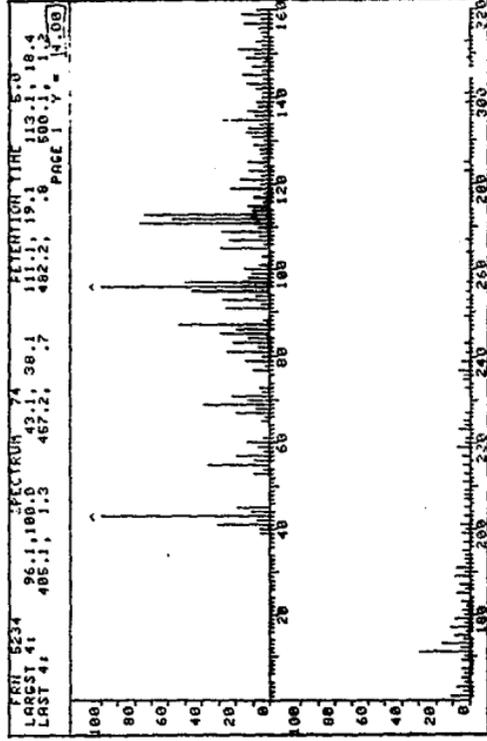


Espectro E-1

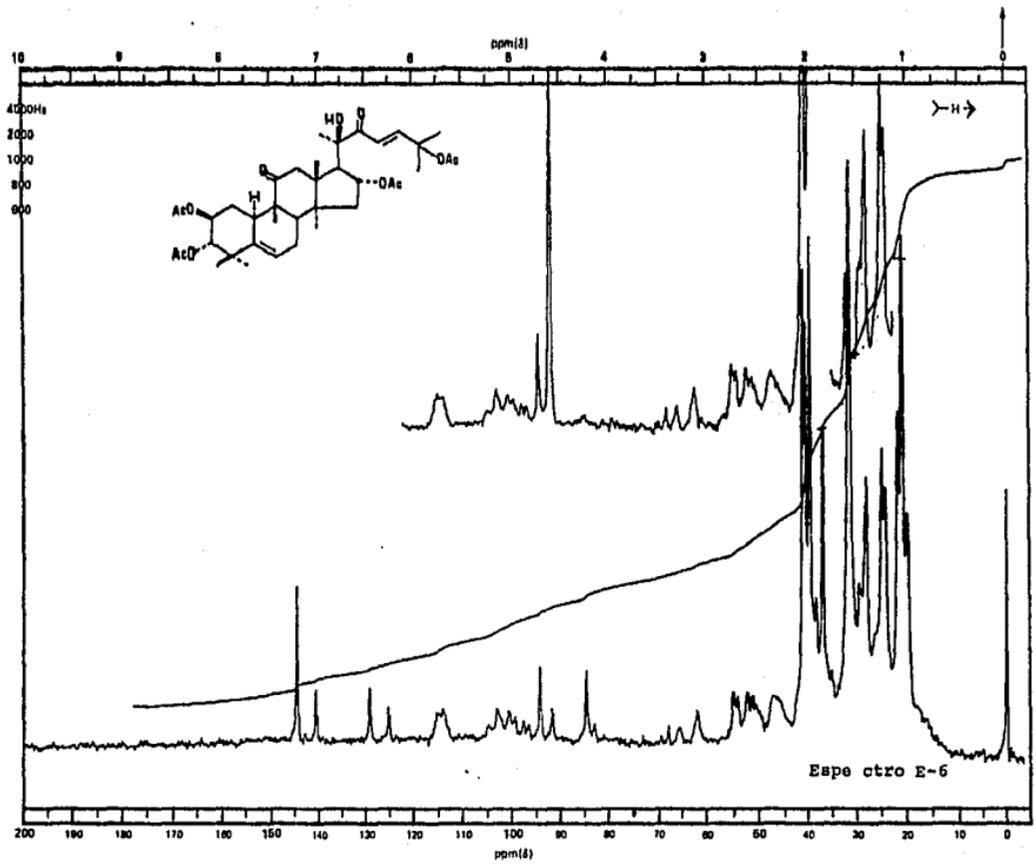


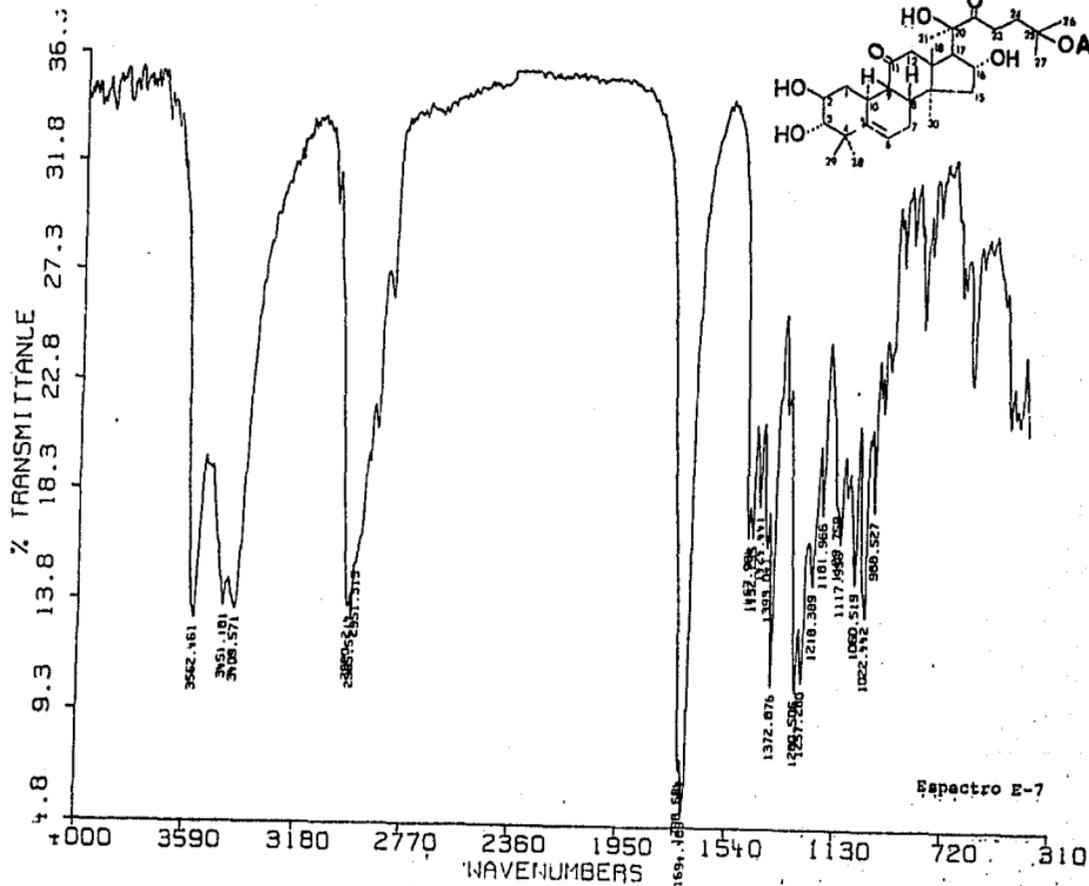




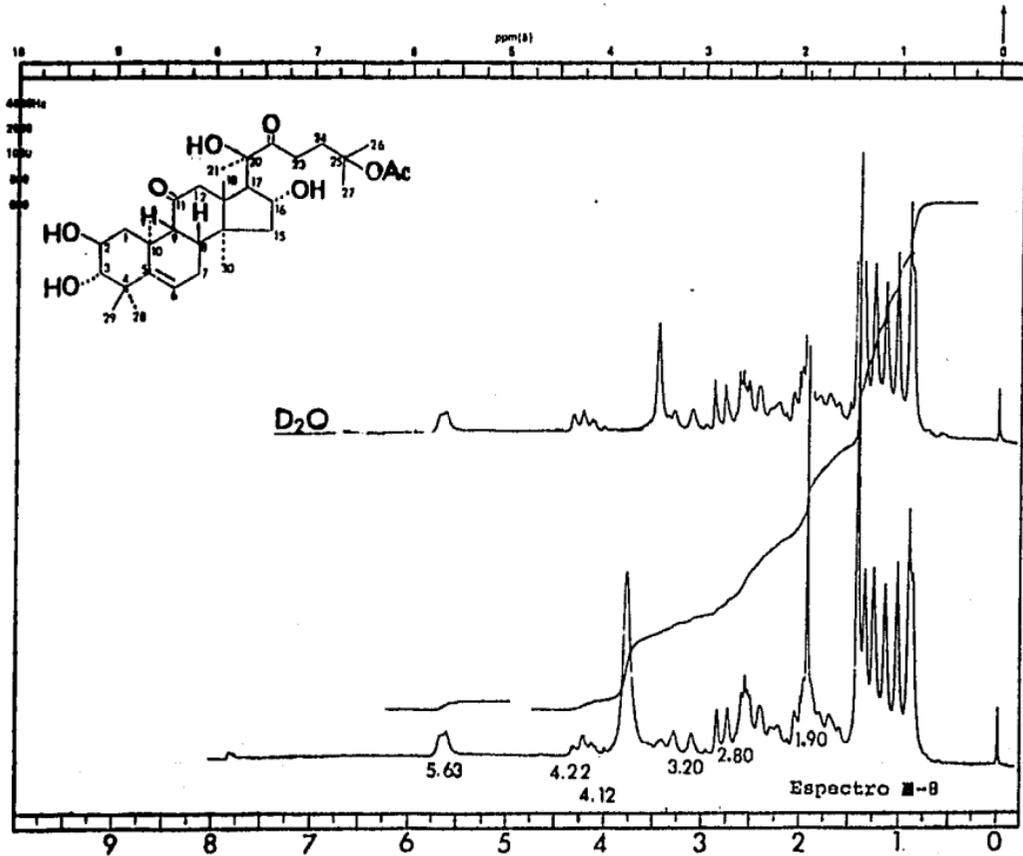


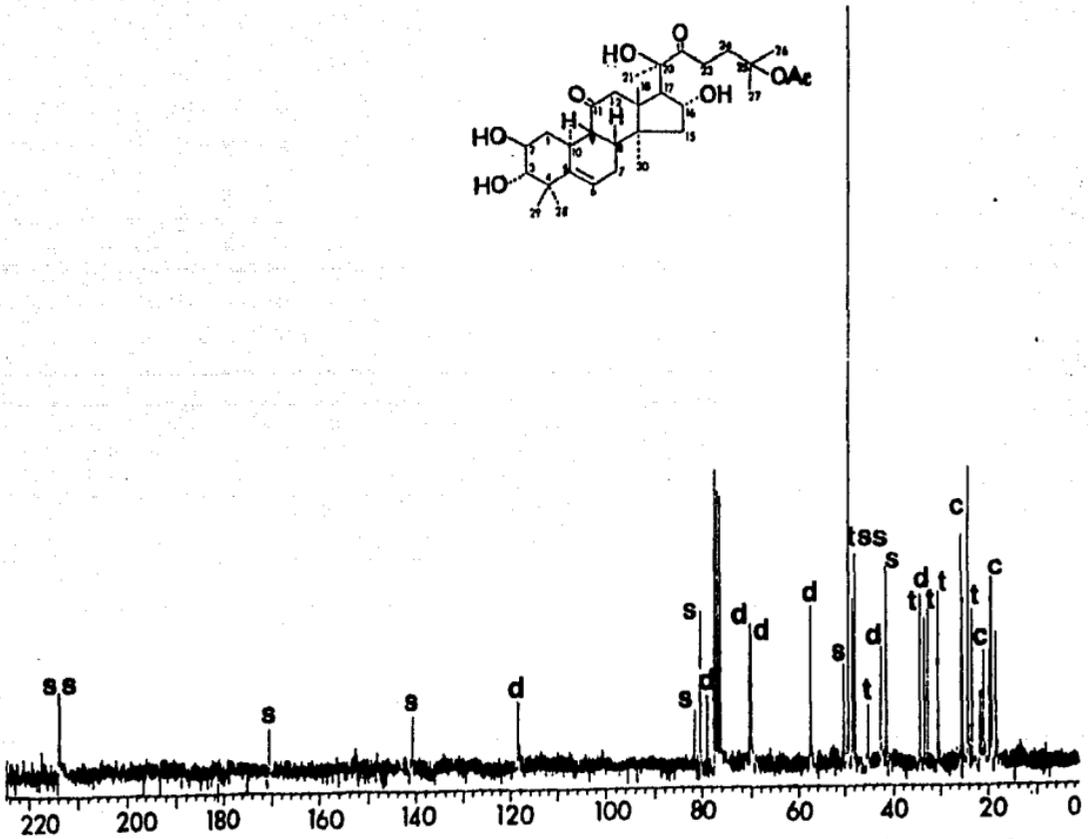
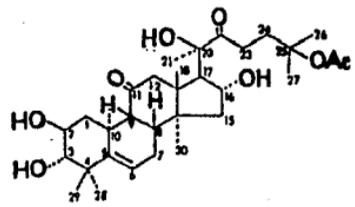
Espectro E-5



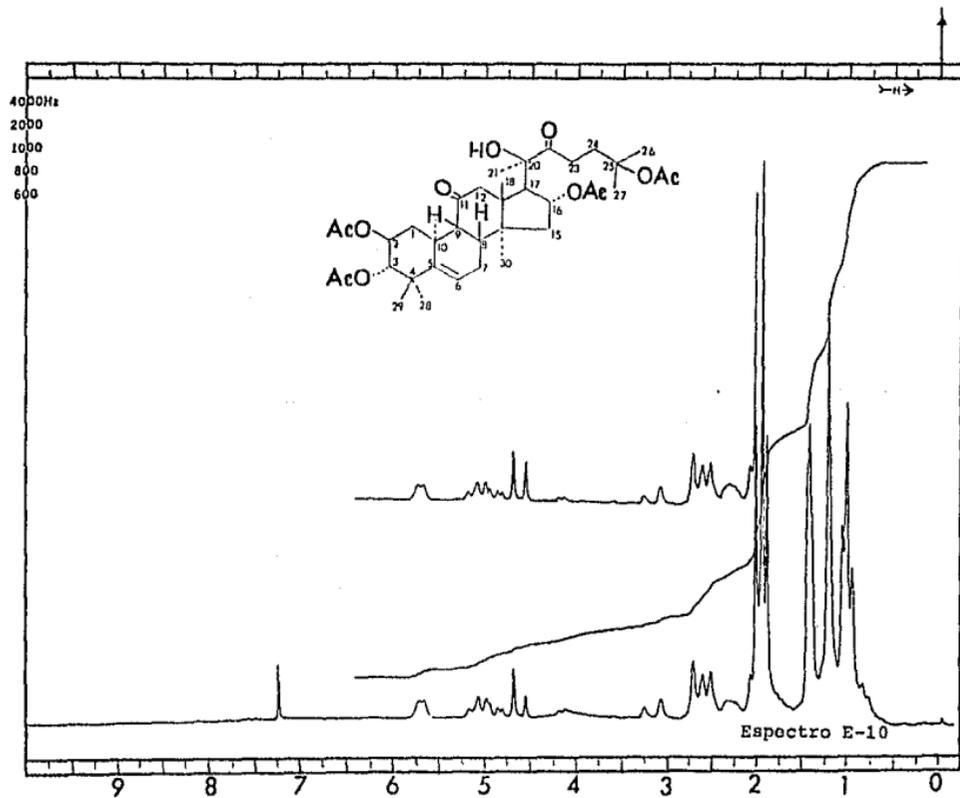


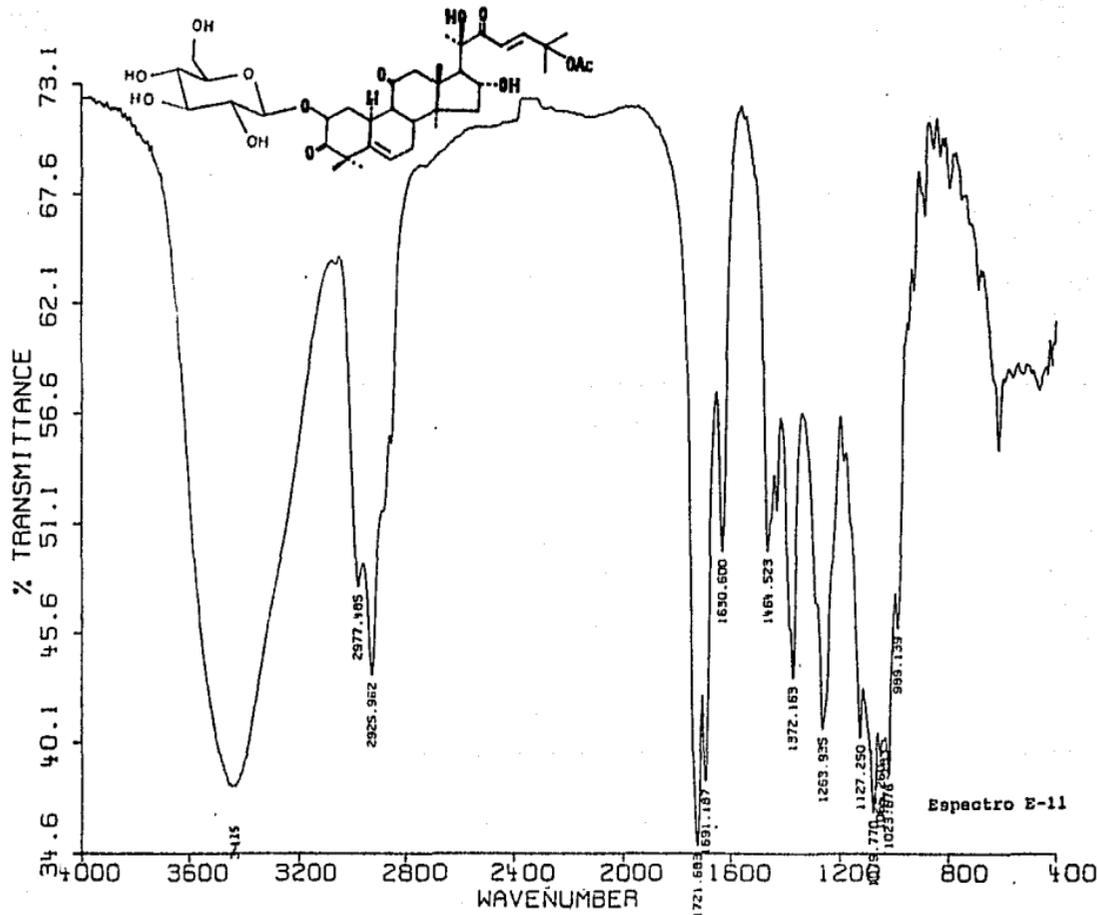
Espectro E-7



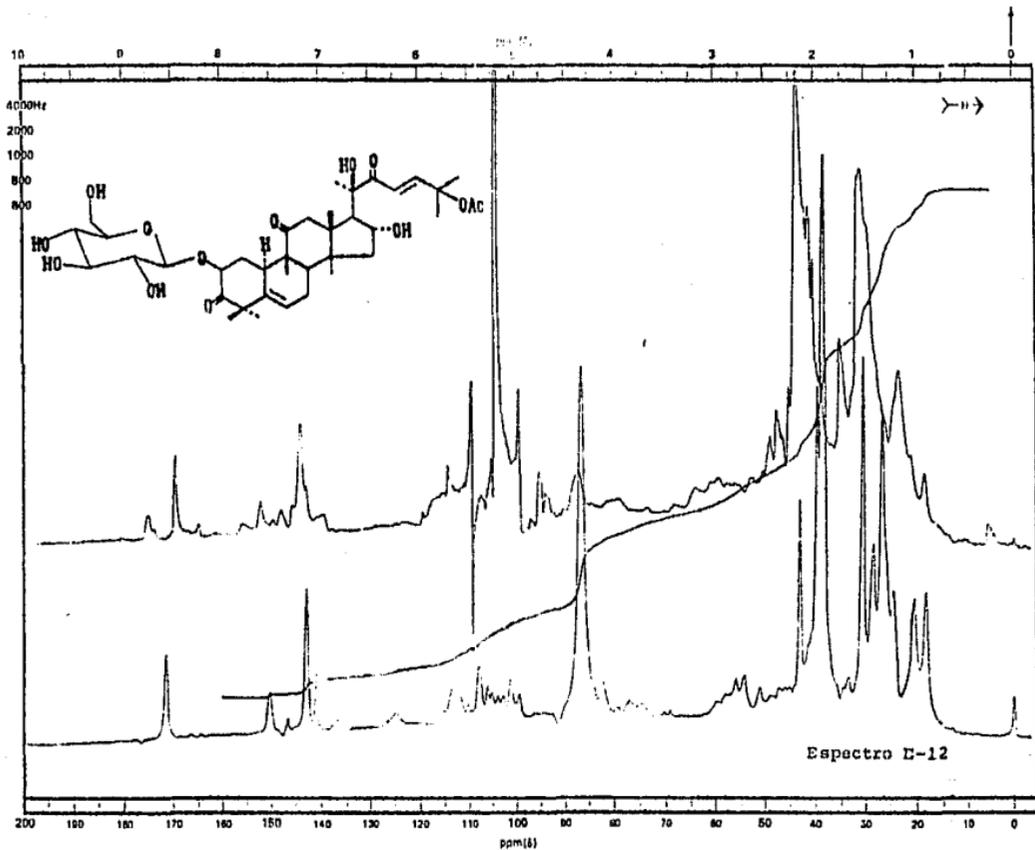


Espectro E-9

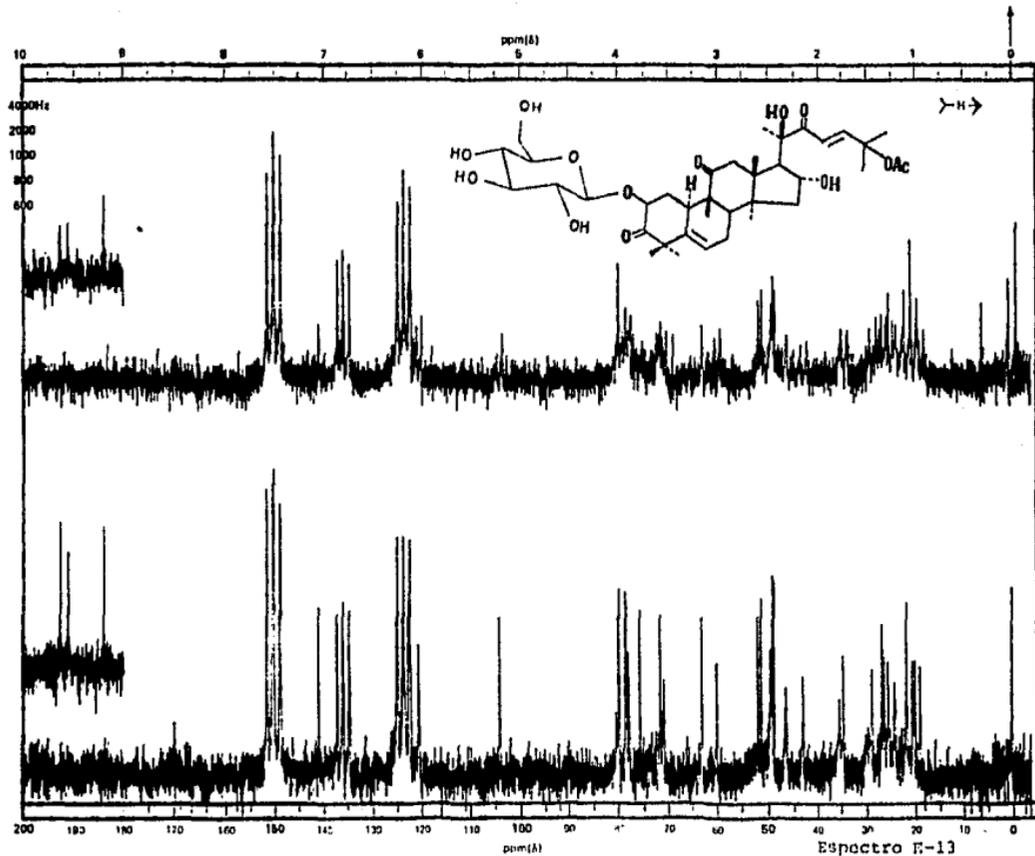


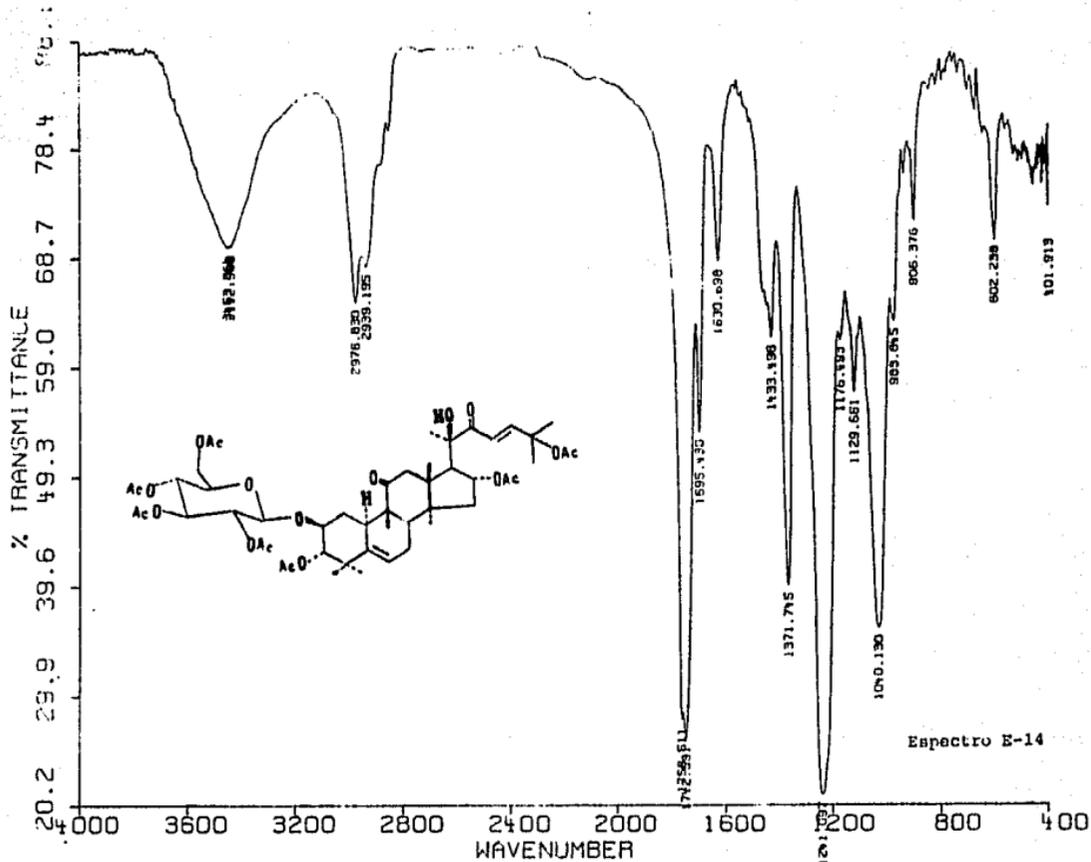


Espectro E-11

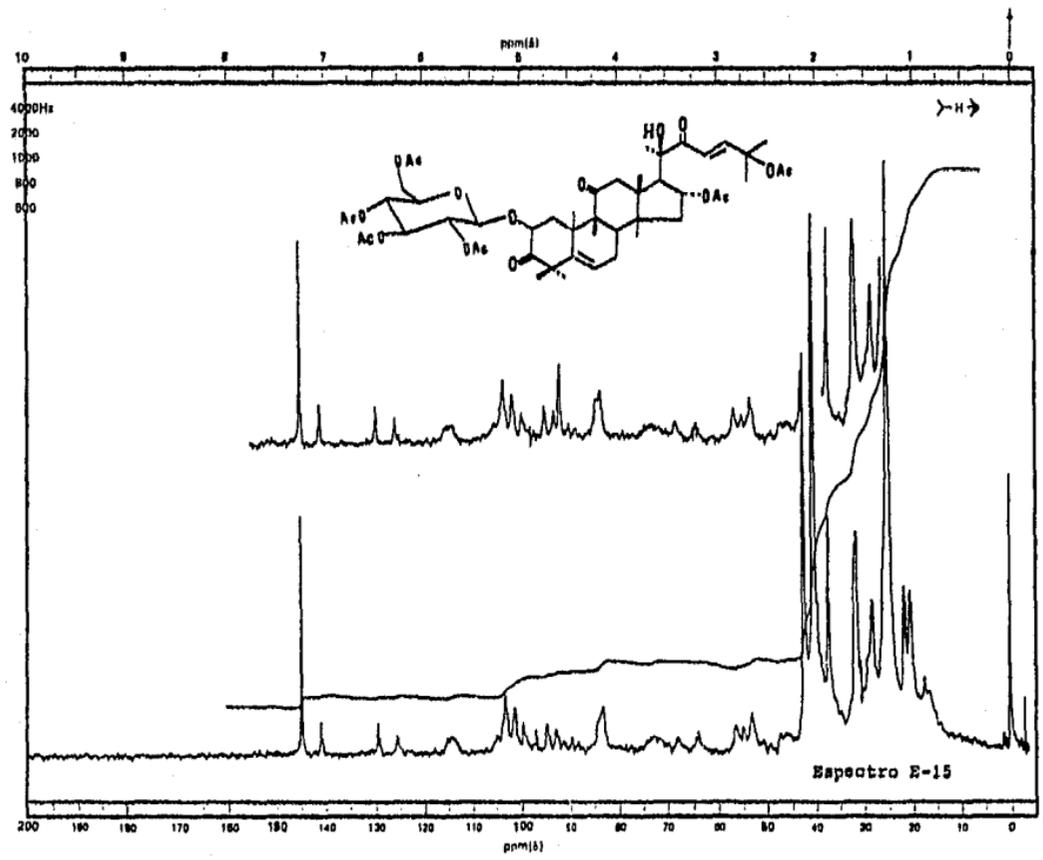


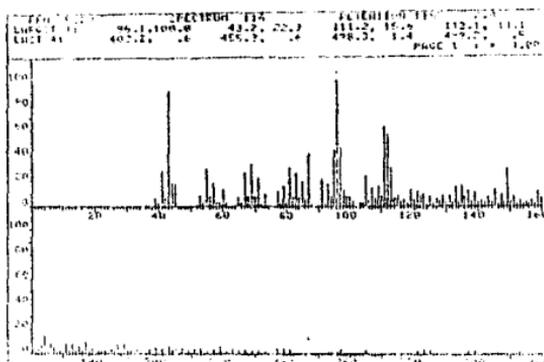
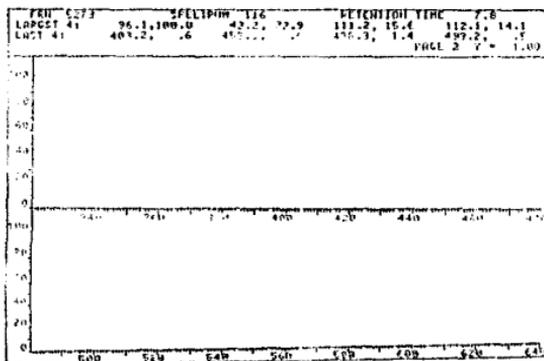
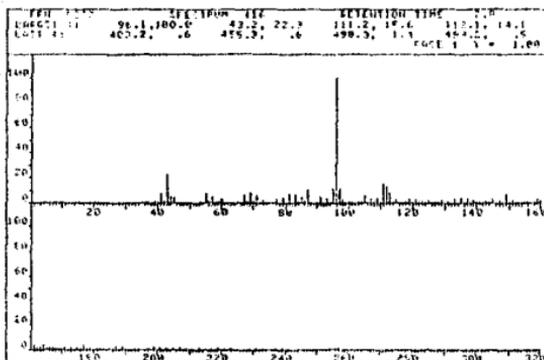
Espectro E-12





Espectro E-14





Espectro E-16

