



00570
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO ¹rej

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UN NUEVO
ENT-LABDANO DE LA *Dodonaea viscosa* (L.)
Jacq. (Sapindaceae)
ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE *Celaenodendron*
mexicanum Standl (Euphorbiaceae)

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A :
PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ



MEXICO, D. F.

1991



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 CUADROS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	v
LISTA DE ESPECTROS -----	vi
LISTA DE ESQUEMAS -----	ix
LISTA DE GRAFICAS -----	ix
LISTA DE ABREVIATURAS -----	x
INTRODUCCION -----	1
CAPITULO I. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UN NUEVO <u>ENT-</u> LARDANO DE LA <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq (Sapindaceae)	
1.1 ANTECEDENTES SOBRE LA <i>Dodonaea viscosa</i> (L.) Jacq -----	3
1.2 OBJETIVOS -----	10
1.3 PARTE EXPERIMENTAL -----	11
1.3.1 Material vegetal -----	11
1.3.2 Extracción y fraccionamiento preliminar -----	11
1.3.3 Análisis cromatográficos -----	12
1.3.4 Aislamiento y purificación de <u>27</u> -----	12
1.3.5 Caracterización del compuesto aislado -----	14
1.3.5.1 Determinación de constantes físicas y espectros - cópicas -----	14
1.3.5.2 Obtención del derivado acetilado de <u>27</u> -----	14
1.3.5.3 Oxidación de <u>27</u> con reactivo de Collins -----	14
1.3.6 Determinación de la toxicidad para <u>Artesia salina</u> -	
1.3.6.1 Preparación de las muestras -----	15
1.3.6.2 Bioensayo -----	15

	11
1.3.7 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana -----	16
1.3.7.1 Microorganismos de prueba -----	16
1.3.7.2 Preparación de las muestras a evaluar y de los testigos -----	16
1.3.7.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba -----	16
1.3.7.4 Siembras de microorganismos -----	17
1.3.7.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana -----	17
1.4 RESULTADOS -----	19
1.5 DISCUSION -----	48
1.6 CONCLUSIONES -----	55

CAPITULO II: ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae).

2.1 GENERALIDADES DE <i>Celaenodendron mexicanum</i> -----	56
2.2 OBJETIVOS -----	60
2.3 PARTE EXPERIMENTAL -----	61
2.3.1 Materiales y métodos -----	61
2.3.1.1 Material vegetal -----	61
2.3.1.2 Análisis cromatográficos -----	61
2.3.1.3 Métodos de extracción y fraccionamiento -----	61
2.3.2 Aislamiento y purificación de los compuestos -----	66
2.3.2.1 Aislamiento de la friedelina (28) -----	66
2.3.2.2 Aislamiento de la maytensifolina B (29), del 3 β -hidroxi-16-oxo-D α friedelano (30) y del β -sitosterol (31) -----	66
2.3.2.3 Aislamiento de la ginkgetina (32), la bilobetina -----	66

	111
(33) y la amentoflavona (34) -----	67
2.3.3 Caracterización de los compuestos aislados -----	67
2.3.3.1 Determinación de las constantes físicas y especcó- treoscópicas -----	67
2.3.3.2 Obtención de los derivados metilados de 32, 33 y 34 -----	67
2.3.3.3 Oxidación de 30 con reactivo de Collins -----	68
2.3.3.4 Determinación de la actividad del extracto total y de los compuestos aislados contra hongos fitopatógenos	68
2.3.3.5 Determinación de la actividad potencial alelopá- tica del extracto total y de los compuestos aislados ----	69
2.4 RESULTADOS -----	70
2.5 DISCUSION -----	128
2.5.1 Identificación de los triterpenoides -----	128
2.5.5.1 Identificación de la maytensifolina B (29) y del 3 β -hidroxi-16-oxo-D:A friedelano (30). -----	128
2.5.5.2 Identificación de la friedelina (28) -----	137
2.5.2 Identificación del β -sitosterol (31) -----	137
2.5.3 Identificación de las biflavonas -----	137
2.6 CONCLUSIONES -----	146
BIBLIOGRAFIA -----	147

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 98-123 obtenidas de la columna original.-----	13
Cuadro 2. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>27</u> .	21
Cuadro 3. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acetilado <u>27a</u> .-----	32
Cuadro 4. Constantes físicas y espectroscópicas de la cetona <u>27b</u> .-----	38
Cuadro 5. Potencial antimicrobiano del extracto total y del <u>ent-labdanol</u> .-----	47
Cuadro 6. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C de los compuestos <u>27</u> , <u>27a</u> y <u>27b</u> .-----	52
Cuadro 7. Perfil químico de la familia Euphorbiaceae.	58
Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de <u>Celaenodendron mexicanum</u> .-----	64
Cuadro 9. Rendimiento de los compuestos aislados del extracto cloroformo-metanólico de <u>Celaenodendron mexicanum</u> -----	72
Cuadro 10. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>28</u>	73
Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>29</u>	78
Cuadro 12. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>30</u>	85
Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>32</u>	91
Cuadro 14. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>33</u>	99
Cuadro 15. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>34</u>	108
Cuadro 16. Constantes físicas y espectroscópicas de <u>35</u>	117

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Constituyentes químicos de <u>Dodonaea viscosa</u>	7
Figura 2. Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas del compuesto <u>27</u> .-----	49
Figura 3. Desplazamiento químico observado para C-23 en varios friedelanos descritos previamente	130
Figura 4. Fragmentos observados para el compuesto <u>29</u>	132
Figura 5. Comparación de los desplazamientos químicos de los anillos D y E.-----	133
Figura 6. Correlación química de los productos <u>29</u> y <u>30</u> .	135
Figura 7. Comparación de modelos para la determinación de la estereoquímica del hidroxilo en C-3.---	136
Figura 8. Región aromática del compuesto <u>34</u> .-----	139
Figura 9. Posibilidades de unión de los monómeros I y II. -----	141
Figura 10. Región aromática de los compuestos <u>32</u> , <u>33</u> y <u>34</u> .-----	144

LISTA DE ESPECTROS

vi

	Página
Espectro 1. Espectro de UV de <u>27</u> .-----	23
Espectro 2. Espectro de IR de <u>27</u> .-----	24
Espectro 3. Espectro de RMN ¹ H de <u>27</u> .-----	25
Espectro 4. Espectro de EMIE de <u>27</u> .-----	26
Espectro 5. Espectro de RMN ¹³ C de <u>27</u> .-----	27
Espectro 6. Espectro de APT de <u>27</u> .-----	28
Espectro 7. Espectro de COSY de <u>27</u> .-----	29
Espectro 8. Espectro de HETCOR de <u>27</u> .-----	30
Espectro 9. Espectro de DEPT de <u>27</u> .-----	31
Espectro 10. Espectro de IR de <u>27a</u> .-----	33
Espectro 11. Espectro de RMN ¹ H de <u>27a</u> .-----	34
Espectro 12. Espectro de EMIE de <u>27a</u> .-----	34
Espectro 13. Espectro de RMN ¹³ C de <u>27a</u> .-----	35
Espectro 14. Espectro de APT de <u>27a</u> .-----	36
Espectro 15. Espectro de COSY de <u>27a</u> .-----	37
Espectro 16. Espectro de IR de <u>27b</u> .-----	40
Espectro 17. Espectro de RMN ¹ H de <u>27b</u> .-----	41
Espectro 18. Espectro de EMIE de <u>27b</u> .-----	42
Espectro 19. Espectro de CD de <u>27b</u> .-----	43
Espectro 20. Espectro de RMN ¹³ C de <u>27b</u> .-----	44
Espectro 21. Espectro de APT de <u>27b</u> .-----	45
Espectro 22. Espectro de COSY de <u>27b</u> .-----	46
Espectro 23. Espectro de IR de <u>28</u> .-----	74
Espectro 24. Espectro de RMN ¹ H de <u>28</u> .-----	75

Espectro 25. Espectro de RMN ¹³ C de 28 -----	76
Espectro 26. Espectro de APT de 28 -----	77
Espectro 27. Espectro de IR de 29 -----	79
Espectro 28. Espectro de RMN ¹ H de 29 -----	80
Espectro 29. Espectro de RMN ¹³ C de 29 -----	81
Espectro 30. Espectro de APT de 29 -----	82
Espectro 31. Espectro de COSY de 29 -----	83
Espectro 32. Espectro de EMIE de 29 -----	84
Espectro 33. Espectro de IR de 30 -----	86
Espectro 34. Espectro de RMN ¹ H de 30 -----	87
Espectro 35. Espectro de RMN ¹³ C de 30 -----	88
Espectro 36. Espectro de APT de 30 -----	88
Espectro 37. Espectro de COSY de 30 -----	89
Espectro 38. Espectro de EMIE de 30 -----	90
Espectro 39. Espectro de UV de 32 -----	93
Espectro 40. Espectro de IR de 32 -----	94
Espectro 41. Espectro de RMN ¹ H de 32 -----	95
Espectro 42. Espectro de RMN ¹ H + D ₂ O de 32 -----	96
Espectro 43. Espectro de RMN ¹³ C de 32 -----	97
Espectro 44. Espectro de COSY de 32 -----	98
Espectro 45. Espectro de UV de 33 -----	101
Espectro 46. Espectro de IR de 33 -----	102
Espectro 47. Espectro de RMN ¹ H de 33 -----	103
Espectro 48. Espectro de RMN ¹ H + D ₂ O de 33 -----	104
Espectro 49. Espectro de RMN ¹³ C de 33 -----	105
Espectro 50. Espectro de APT de 33 -----	106
Espectro 51. Espectro de COSY de 33 -----	107

Espectro 52. Espectro de UV de <u>34</u> -----	110
Espectro 53. Espectro de IR de <u>34</u> -----	111
Espectro 54. Espectro de RMN ¹ H DE <u>34</u> -----	112
Espectro 55. Espectro de RMN ¹ H + D ₂ O de <u>34</u> -----	113
Espectro 56. Espectro de RMN ¹³ C de <u>34</u> -----	114
Espectro 57. Espectro de APT de <u>34</u> -----	115
Espectro 58. Espectro de COSY de <u>34</u> -----	116
Espectro 59. Espectro de IR de <u>35</u> -----	117
Espectro 60. Espectro de RMN ¹ H de <u>35</u> -----	119
Espectro 61. Espectro de RMN ¹³ C de <u>35</u> -----	120

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Preparación del extracto cloroformo-metanolico de las partes aéreas de <u>C. mexicanum</u> . -----	63

LISTA DE GRAFICAS

	Página
Gráfica 1. Efecto del lixiviado acuoso de <u>C. Mexicanum</u> sobre <u>Amaranthus</u> y <u>Echinochloa</u> -----	121
Gráfica 2. Efecto del extracto orgánico de <u>C. Mexicanum</u> sobre <u>Amaranthus</u> y <u>Echinochloa</u> ----	122
Gráfica 3. Efecto de los compuestos aislados de <u>C. mexicanum</u> sobre <u>Amaranthus</u> y <u>Echinochloa</u>	123
Gráfica 4. Efecto del extracto orgánico de <u>C. mexicanum</u> sobre <u>Helminthosporium</u> (8 y 3 días) -----	124
Gráfica 5. Efecto del extracto orgánico de <u>C. mexicanum</u> sobre <u>Alternaria</u> (8 y 3 días) ---	125
Gráfica 6. Efecto del extracto orgánico de <u>C. mexicanum</u> sobre <u>Fusarium</u> (8 y 3 días) ----	126
Gráfica 7. Efecto de los compuestos aislados de <u>C. mexicanum</u> sobre <u>Helminthosporium</u> , <u>Alternaria</u> y <u>Fusarium</u> (3 días) -----	127

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcOEt : acetato de etilo
CHCl₃ : cloroformo
MeOH : metanol
CDCl₃ : cloroformo deuterado
d : doblete
D₂O : agua deuterada
EMIE : espectro de masas por impacto electrónico
Hz : hertz
IR : infrarrojo
J : constante de acoplamiento
m : multiplete
MHz : mega hertz
m/z : masa - carga
p.f. : punto de fusión
RMN¹H : resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN¹³C : resonancia magnética nuclear de carbono 13
UV : ultravioleta
s : singulete
TMS : tetrametilsilano
δ : delta
ppm : partes por millón

Las plantas son de gran importancia para el hombre, ya que estas constituyen fuentes primordiales de alimentos, materiales para construcción, fibras (papel, algodón, etc.) y productos químicos (insecticidas, antioxidantes, feromonas, pigmentos, enzimas, saborizantes, fragancias y fármacos, entre otros). Por lo tanto, no es sorprendente que desde tiempos prehistóricos hasta nuestros días el hombre ha tratado siempre de encontrar beneficios de las mismas, principalmente de aquellas que gozan de prestigio como agentes terapéuticos en la medicina alopática y en la medicina tradicional (Verpoorte, R., 1989).

Es importante enfatizar la importancia de las plantas desde el punto de vista de la medicina tradicional, ya que estas proporcionan un medio para atenuar numerosos problemas de salud de los países en vías de desarrollo, principalmente en las zonas rurales, donde el acceso a la medicina oficial es prácticamente inexistente. Adicionalmente, la potencialidad de las plantas medicinales de uso folclórico como fuentes importantes de sustancias bioactivas es un hecho bien documentado (Farnsworth, 1977; Farkas, 1989; Fairbairn, 1980; Salemink, 1980; inter alia).

En México, existen 58 grupos étnicos distribuidos en el territorio nacional, y la mayoría de estos grupos hacen uso de los abundantes recursos naturales a su alcance para la cura de sus enfermedades, según sus necesidades, conocimientos y tecnologías. Es entonces evidente que las plantas medicinales constituyen una alternativa viable para resolver los problemas de salud en

México, de manera complementaria con la medicina oficial.

Sin embargo, en México el estudio de las plantas medicinales tiene poco desarrollo y tradición. Se estima que hay aproximadamente unas 3000 especies medicinales registradas, y que tan sólo el 10% ha sido objeto de investigación científica.

En consecuencia, el estudio de las plantas medicinales, bien sea orientado a la búsqueda de principios bioactivos o a la validación farmacológica del uso popular de las mismas, constituye un área de investigación fértil en nuestro país.

Con base en los señalamientos anteriores, el presente trabajo tiene como propósito el estudio químico y biológico de las especies Dodonaea viscosa (L.) Jacq (Sapindaceae) y Celaenodendron mexicanum Standl (Euphorbiaceae). Ambas plantas son utilizadas en la medicina popular mexicana como agentes anti-infectivos. Cabe hacer notar que el estudio de ambas plantas forman parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas utilizadas en medicina tradicional, cuyos objetivos generales son: (i) obtener en lo posible principios activos de la flora medicinal nacional y (ii) contribuir al conocimiento de la composición química de la flora medicinal mexicana (García, 1987; Calzada, 1988; Camacho, 1989; Rojas, 1990; Cruz, 1991; inter alia).

Cabe mencionar que en el caso de obtener sustancias activas, este proyecto podría constituir una aportación valiosa para la validación científica de la medicina tradicional y en consecuencia para la resolución de problemas de salud pública nacional.

CAPITULO I

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE UN NUEVO ENT-LABDANO DE
LA *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq (Sapindaceae)

1.1 ANTECEDENTES SOBRE LA *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq.

El género *Dodonaea* (L.) pertenece a la familia Sapindaceae y comprende más de 150 especies, la mayoría de las cuales se encuentran distribuidas en Australia. La única especie descrita en México es la *Dodonaea viscosa* (L.) Jacq (Rzedowski, et al., 1965).

Desde el punto de vista fitoquímico algunas especies del género han sido investigadas. Estos estudios han permitido el aislamiento y caracterización de numerosos diterpenoides (Dawson, et al., 1966; Hsu, et al., 1971; Jefferies, et al., 1973; Payne, et al., 1973), flavonoides (Dawson, et al., 1966; Dreyer, et al., 1978; Nair, et al., 1975; Payne, et al., 1973; Rene, et al., 1970; Sachdev, et al., 1962, 1963; Sastry, et al., 1966; Trotin, et al., 1972), cumarinas (El-Tawil, et al., 1963), triterpenoides (Dimbi, et al., 1965; El Tawil, et al., 1973; Ghisalberti, et al., 1973; Venkateswara, et al., 1962), saponinas (Dimbi, et al., 1965; Wagner, et al., 1967), taninos (Sarin, et al., 1963; Trotin, et al., 1972) y varios aceites esenciales (Subbarao, et al., 1965).

Algunas especies de *Dodonaea* son usadas en la medicina tradicional en diversas regiones del mundo como agentes

antiespasmódicos, antiinfectivos, sedantes, hipotensivos, antirreumáticos, antipiréticos, diaforéticos y antigotosos (Dominguez, et al., 1980; Trotin, et al., 1982; Sukkawala, et al., 1982; Wagner, et al., 1987).

La Dodonaea viscosa (L.) Jacq es un arbusto de 1 a 5 m de altura, de flores amarillas y frutos capsulares; se encuentra ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales del globo terrestre (Rzedowski, et al., 1985). En México la D. viscosa se conoce popularmente con los nombres de chapuliztle, cuerno de cabra, granadina, hierba de la cucaracha, jarilla, jirimú, ocotillo y varal. Numerosas propiedades curativas se le atribuyen a la D. viscosa en la medicina popular mexicana, como son sus bondades antipiréticas, antiespasmódicas, antisépticas, astringentes, antigotosos y para el tratamiento de malestares venéreos.

Desde el punto de vista biológico, se ha demostrado que los extractos metanólicos de la D. viscosa inducen la fagocitosis y presentan actividades molusquicida y antiexudativa (Wagner, et al., 1987). Finalmente, cabe hacer mención que Subbarao y colaboradores (1985) demostraron que el aceite esencial de la planta posee propiedades antibacterianas.

Los diversos estudios químicos realizados sobre esta especie medicinal han resultado en el aislamiento y caracterización de varios flavanoles y flavanonas (Sastri, et al., 1966; Nair, et al., 1975; Dreyer, et al., 1978;

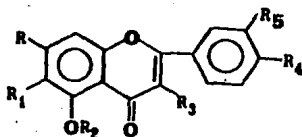
Sachdev, et al., 1983), dos diterpenoides del tipo clerodano (Hsu, et al., 1971), cuatro triterpenoides derivados de la β -amirina (Dimbi, et al., 1985; Wagner, et al., 1987) y dos esteroides (Venkateswara, et al., 1962).

Una investigación preliminar del contenido metabólico de D. viscosa, mismo que constituye un antecedente experimental al presente trabajo, condujo al aislamiento de dos flavonoides adicionales, el ácido hatriwaico, dos esteroides y un éster derivado del ácido cinámico. Los flavonoides se identificaron como la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-flavanona (23) y la 5,6,4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (24). Los esteroides correspondieron al β -sitosterol (21) y el β -glucositolsterol (22). Los compuestos (21) y (22) habían sido previamente descritos en la planta (Hsu, et al., 1971; Venkateswara, et al., 1962), en tanto que los flavonoides (23) y (24) representan nuevos constituyentes de la especie.

La estructura del éster derivado del ácido cinámico se caracterizó como el 1-para-cumaril, 5-O-metil, 6-acetil-L-myo-inositol (26), el cual representó un nuevo producto natural. El aislamiento de este producto constituye una contribución importante al conocimiento de la química del género Dodonaea y de la familia Sapindaceae, ya que previamente no se habían descrito este tipo de compuestos en la familia. Las estructuras de los constituyentes previamente aislados de la Dodonaea viscosa se ilustran en la Figura 1.

Adicionalmente, se detectó en las fracciones

cromatográficas de mediana polaridad un compuesto aparentemente inestable, de acuerdo a su comportamiento cromatográfico (el análisis mediante ccd realizado en varias oportunidades, demostró la inestabilidad del compuesto); este producto tenía la particularidad de originar un cromóforo de color café en las cromatoplasmas de gel de sílice, cuando se utilizaba como agente cromógeno un solución ácida de sulfato cérico (Crisanto, 1990; Contreras, 1990).



- 1 R = R₁ = R₃ = R₄ = OCH₃ R₂ = R₅ = H
- 2 R = R₁ = R₃ = OCH₃ R₂ = R₅ = H R₄ = OH
- 3 R = R₁ = R₃ = OCH₃ R₂ = H R₄ = OH R₅ = CH₂CH₂CH(CH₃)CH₂OH
- 4 R = OH R₁ = R₃ = R₄ = OCH₃ R₂ = R₅ = H
- 5 R = OH R₁ = R₃ = OCH₃ R₂ = R₅ = H R₄ = OH
- 6 R = OH R₁ = R₃ = OCH₃ R₂ = H R₄ = OH R₅ = CH₂CH₂CH(CH₃)CH₂OH
- 7 R = OH R₁ = R₃ = R₄ = OCH₃ R₂ = H R₅ = CH₂CH₂CH(CH₃)CH₂OH
- 8 R = R₁ = R₃ = R₄ = OCH₃ R₂ = CH₃ R₅ = CH₂CH₂CH(CH₃)CH₂OH
- 9 R = R₃ = OCH₃ R₁ = R₂ = R₄ = R₅ = H
- 10 R = R₃ = R₄ = OCH₃ R₁ = R₂ = R₅ = H
- 11 R = OH R₂ = R₄ = H R₃ = O-rutinosil R₅ = OCH₃
- 12 R = R₄ = R₅ = OH R₁ = R₂ = H R₃ = O-galactosil
- 13 R = R₄ = R₅ = OH R₁ = R₂ = H R₃ = O-rutinosil
- 14 R = R₁ = R₄ = R₅ = OH R₂ = R₃ = H
- 15 R = OH R₁ = R₂ = R₄ = R₅ = H R₃ = 2H

Figura 1. Constituyentes químicos de Dodonaea viscosa.

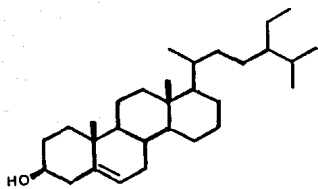
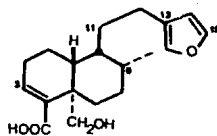
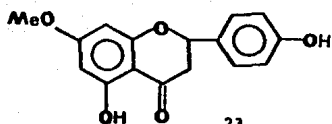
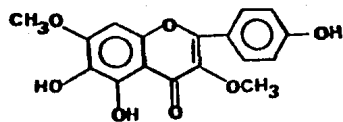
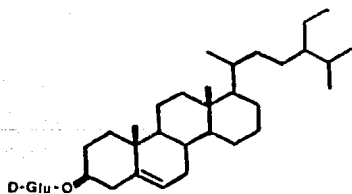
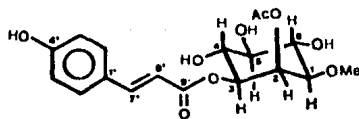
212223242526

Figura 1. Constituyentes químicos de D. viscosa (continuación).

1.2 OBJETIVOS.

Los objetivos planteados para el presente estudio son los siguientes:

1.2.1 Separar mediante métodos fitoquímicos convencionales el cromóforo inestable detectado en las fracciones de mediana polaridad del extracto cloroformo-metanólico de Dodonaea viscosa.

1.2.2 Determinar la estructura molecular del producto utilizando métodos químicos y espectroscópicos.

1.2.3 Determinar la actividad antimicrobiana potencial del extracto total, de las fracciones de mediana polaridad y del compuesto aislado.

1.3 PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 Material vegetal.

El material vegetal (hojas y tallo de D. viscosa) se recolectó en Oaxaca en el kilómetro 18.7 de la carretera a Jayacatlán y fué identificado por el Biólogo Alejandro Cisneros de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de la misma Universidad (Voucher: Cisneros 368).

La planta fué secada a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino de cuchillas, modelo Wiley 4.

1.3.2 Extracción y fraccionamiento preliminar.

El material vegetal (3 Kg) se extrajo vía maceración, utilizando 7.5 litros de una mezcla CHCl_3 -MeOH (1:1), siete veces por periodos de dos días en cada ocasión; después de concentrar in vacuo se obtuvieron 157 g de extracto.

El extracto cloroformo-metanólico se fraccionó mediante cromatografía en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (1.5 Kg sílica gel Merck 60, gránulos de 0.2-0.5 mm) desactivada al 10% con agua destilada. El proceso de elución se efectuó con hexano, y mezclas de hexano-cloroformo, cloroformo-acetona, y acetona-metanol en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 286 fracciones de 1 litro cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. Las proporciones de eluyentes utilizados fueron

las siguientes: hexano, hexano-cloroformo (80:20, 60:40, 50:50, 40:60 y 20:80), cloroformo, cloroformo-acetona (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 y 30:70), acetona y acetona-metanol (50:50).

1.3.3 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄, Merck); como agente revelador se empleó sulfato cérico (Stahl, 1969).

1.3.4 Aislamiento y purificación de 27.

Las fracciones 98-123 (28.0 g) de la columna original eluidas con hexano-cloroformo 40:60 se recromatografiaron en una columna empacada con 285 g de gel de sílice (desactivada al 10% con agua destilada). La elución se efectuó con hexano, y mezclas de hexano-cloroformo y cloroformo-acetato de etilo y acetato de etilo en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 307 fracciones de 200 ml cada una: cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinando aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 1 se resumen los sistemas de eluyentes empleados y el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos.

El conjunto de las fracciones 181-266 (Cuadro 1) se trataron con carbón activado. La mezcla anterior se resolvió

en sus componentes, mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, empleando el sistema hexano-acetato de etilo 40:60. Se utilizaron 15 cromatoplasmas de gel de sílice y sobre cada una se sembraron 30 mg de la muestra. Luego de eluir las placas, éstas se procesaron de la manera habitual. De esta manera, se obtuvieron 405 mg de un aceite de color amarillo (27), soluble en CHCl_3 .

Cuadro 1. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna de los eluatos 98-123, obtenidos de la columna original.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Observaciones
Hexano	100	1-39	Desechada
Hexano-cloroforno	90:10	40-65	Desechada
Hexano-cloroforno	80:20	66-86	Desechada
Hexano-cloroforno	70:30	87-102	Desechada
Hexano-cloroforno	60:40	103-124	Desechada
Hexano-cloroforno	50:50	125-141	Desechada
Hexano-cloroforno	40:60	142-222	Recromatografía
Hexano-cloroforno	30:70	223-240	de las fracciones
Hexano-cloroforno	20:80	241-271	181-288
Cloroforno	100	272-289	Desechada
Cloroforno-AcDEt	95:5	290-306	Desechada
AcDEt	100	307	Desechada

1.3.5 Caracterización del compuesto aislado.

1.3.5.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

Los espectros de UV fueron registrados en un instrumento Beckman DU-7; los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer 599B; los espectros de RMN fueron registrados en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente $CDCl_3$ y como referencia interna TMS.

La rotación óptica fue medida con un polarímetro digital JASCO DIP 360; los espectros de masas fueron determinados en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B. El espectro de dicroísmo circular fue obtenido en el Departamento de Farmacognosia, Universidad de Illinois, Chicago, USA.

1.3.5.2 Obtención del derivado acetilado de 27.

Para formar el derivado acetilado de 27 se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. La mezcla de reacción se dejó por 12 horas a temperatura ambiente y al cabo del tiempo señalado se procesó de manera adecuada. Se acetilaron 85 mg de 27, obteniéndose 76 mg del derivado como un líquido aceitoso, el cual se purificó mediante cromatografía en capa delgada.

1.3.5.3 Oxidación de 27 con Reactivo de Collins.

106 mg del compuesto 27 en 1.5 ml de piridina, se

trataron con una solución de CrO_3 (112 mg de CrO_3 en 1.5 ml de piridina) a temperatura ambiente, con agitación durante 18 horas. Al cabo de este tiempo, el crudo de la reacción, se procesó de la manera convencional. El producto oxidado se purificó por c.c.d., obteniéndose 31.5 mg de un sólido amorfo (27b), soluble en CHCl_3 .

1.3.6 Determinación de la toxicidad para Artemia salina Leach.

1.3.6.1 Preparación de las muestras.

A 20 mg de las muestras (extracto total, fracción combinada 181-268 y el compuesto 27) se le adicionan 2 ml de CHCl_3 . Posteriormente, se transfieren a frascos viales 5, 50 y 500 μl de esta solución, cada una por triplicado, dejando evaporar el disolvente en cada vial. Finalmente se afora a 5 ml con medio salino artificial, para obtener concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm respectivamente.

1.3.6.2 Bioensayo.

Los huevos de A. salina previamente desarrollados en un medio salino artificial durante 48 horas, son transferidos 10 de ellos a cada uno de los viales conteniendo la muestra a evaluar. Transcurridas 24 horas se procede a realizar la cuenta de organismos sobrevivientes. El resultado final se expresa en por ciento de mortalidad de los crustáceos o bien se

calcula la DL_{50} .

1.3.7 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

1.3.7.1 Microorganismos de prueba.

Para la evaluación biológica se emplearon bacterias Gram positivo, Gram negativo y una levadura. A continuación se enlistan los microorganismos de prueba utilizados; indicando además las cepas correspondientes.

gram positivas: Staphylococcus aureus (ATCC 15006)

Bacillus subtilis (ATCC 6633)

gram negativas: Pseudomona aeruginosa (ATCC 14207)

Escherichia coli (ATCC 25922)

levadura: Candida albicans (ATCC 1023)

1.3.7.2 Preparación de las muestras de prueba.

El extracto total se evaluó como una suspensión al 10% en agua-Tween 80, a una concentración de 20 mg/ml.

El compuesto 27 se evaluó a una concentración de 1 mg/ml.

Como controles positivos, se prepararon soluciones de estreptomycin (1 mg/ml) para las bacterias y de nistatina (3 mg/ml) para la levadura.

1.3.7.3 Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba.

Las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo (Merck) y se incubaron durante un periodo de 24 horas a 37°C.

La levadura se sembró en caldo glucosa 2% Sabourand

(Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C.

Una vez desarrollados los microorganismos, fué necesario estandarizar su número a una concentración aproximada de 1.5×10^6 células/ml empleando los patrones de turbidez de McFarland (Barley, 1986), mediante la disolución de caldo nutritivo, inoculando una solución salina isotónica.

1.3.7.4 Siembra de microorganismos.

Con el fin de lograr una mejor distribución de los microorganismos, se eligió el método de vertido en placa, en el cual se colocó en cajas de Petri estériles 1 ml de las soluciones estandarizadas de microorganismos (aproximadamente 1.5×10^6 células). Posteriormente se agregó a cada caja de prueba, 20 ml de agar fundido, homogeneizando con una agitación cuidadosa. El agar empleado para las bacterias fué el agar No. 1 para antibióticos de Merck y en el caso de la levadura se utilizó agar-glucosa 4% Sabourand (Merck). Una vez solidificado el agar, se procedió a hacer 3 horadaciones convenientemente distribuidas en cada placa, utilizando un horador cilíndrico de 10 mm de diámetro. Posteriormente, se adicionan a cada pozo 100 y 50 μ l de la solución problema y 100 μ l del control positivo. Finalmente, se incubaron las placas por 24 horas a 37° en el caso de las bacterias y 48 horas en 28° en el caso de la levadura.

1.3.7.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Al cabo del tiempo de incubación se evaluó la actividad

antimicrobiana de la fracción y el compuesto 27, midiendo el diámetro la zona de inhibición.

Las pruebas se realizaron por duplicado y todo el procedimiento se efectuó en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

1.4 RESULTADOS

El extracto cloroformo-metanólico de la Dodonaea viscosa se sometió a un fraccionamiento cromatográfico mediante la técnica de columna abierta utilizando gel de sílice como fase estacionaria. El conjunto de fracciones combinadas 98-123 obtenidas por este procedimiento fueron recromatografiadas en una columna de gel de sílice, originando las fracciones secundarias indicadas en el Cuadro 1 (sección experimental). El tratamiento con carbón activado y posterior purificación mediante cromatografía en capa delgada de las fracciones secundarias 181-266 (Cuadro 1), permitió el aislamiento del producto 27, el cual se obtuvo como un aceite de color amarillo, ópticamente activo, soluble en cloroformo.

El producto natural fué sometido a varias reacciones químicas durante su proceso de caracterización y los resultados fueron los siguientes:

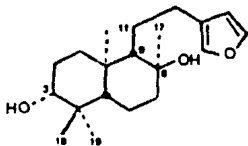
- a) El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y píridina originó el derivado monoacetilado 27a.
- b) El tratamiento de 27 con reactivo de Collins permitió la obtención de la cetona 27b.

En los Cuadros 2, 3 y 4 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de 27, 27a y 27b respectivamente.

El extracto original, las fracciones primarias combinadas 98-123 y el producto natural 27 fueron evaluados biológicamente. Los ensayos realizados fueron la determinación de la toxicidad para Artemia salina (Meyer, et

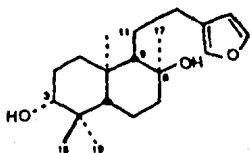
al., 1982) y la actividad antimicrobiana cualitativa mediante el método de difusión en agar (Hufford, et al., 1975). Los resultados obtenidos se indican en el Cuadro E.

Cuadro 2. Constantes físicas y espectroscópicas de 27.



Fórmula molecular	$C_{20}H_{32}O_3$
$[\alpha]_D$	-4.16 (MeOH)
UV (MeOH) nm (Espectro 1)	282
IR (KBr) cm^{-1} (Espectro 2)	3460, 2950, 2875, 1500, 1460, 1385, 1260, 1160, 1110, 1050, 1020, 1000, 930, 875, 790
RMN ¹ H ppm ($CDCl_3$, 300 MHz) (Espectro 3)	0.76. (s, H-19), 0.82 (s, H-20), 0.93. (m, H-5), 0.99 (s, H-18), 1.09 (m, H-9), 1.15 (m, H-1ax), 1.16 (s, H-17), 1.37 m, H-6ax), 1.42 (m, H-7ax), 1.53 (m, H-11), 1.64 (m, H-2), 1.70 (m, H-8eq), 1.75 (m, H-7eq), 2.52 (t, H-12), 3.29 (dd, J=11,5, H, H-3), 6.36, 7.29 (s, H-14, H-16), 7.40 (t, J=1.8Hz, H-15)

Cuadro 2. Constantes física y espectroscópicas de 27.
(Continuación).



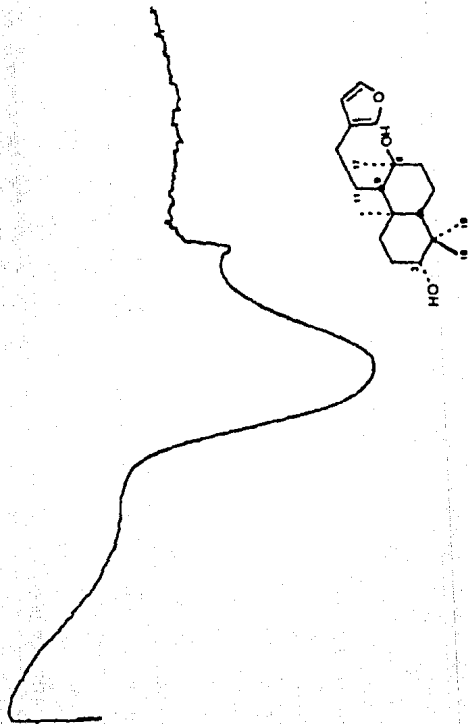
EMIE m/z
(Espectro 4)

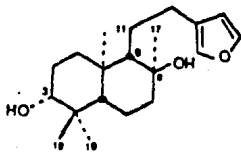
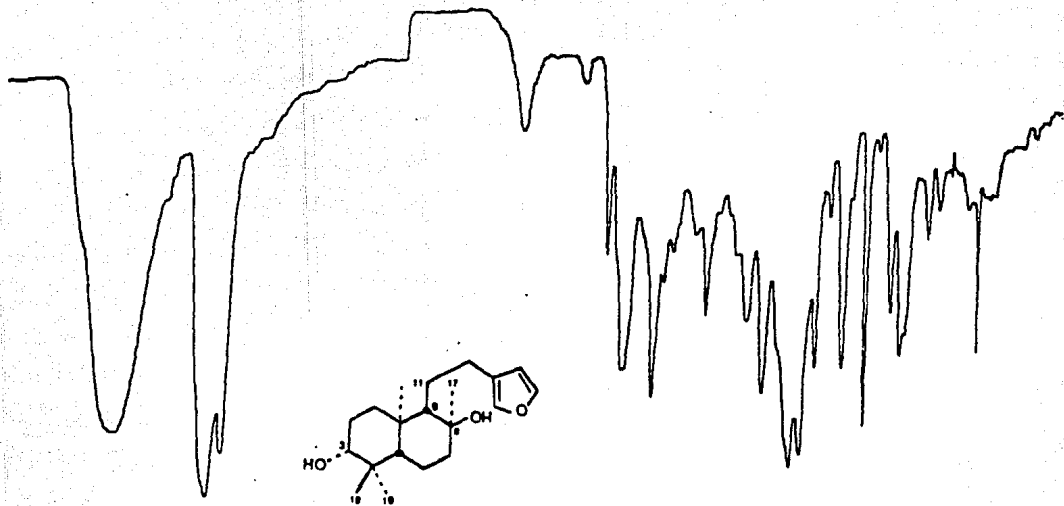
320 [M⁺(0.4)], 302 [M-H₂O (8.1)],
287. [M-HO-15. (3.7)], 289 [M-2H₂O
(1.5) 208 (18.57), 207 (11), 190
(25), 175 (40), 147 (30), 135 (20), 95
(42), 94 (58), 81 (100), 71 (41.6)

RMN¹³ ppm
(CDCl₃, 300MHz)
(Espectro 5)

142.62 (C-15, d), 138.57 (C-16, d),
125.44 (C-13, s), 110.95 (C-14, d), 78.6,
(C-3, d), 73.85 (C-8, s), 61 (C-9, d),
54.9 (C-5, d), 44.33 (C-7, t), 38.74
(C-10, s), 38.74 (C-4, s), 37.85 (C-1, t),
28.04 (C-18, q), 27.9 (C-12, t), 26.96
(C-2, t), 23.73 (C-17), q), 25.97,
C-11, t), 20.14 (C-6, t), 15.48 (C-20,
q), 15.30 (C-19, q).

190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370





4000

3000

2000

1600

1400

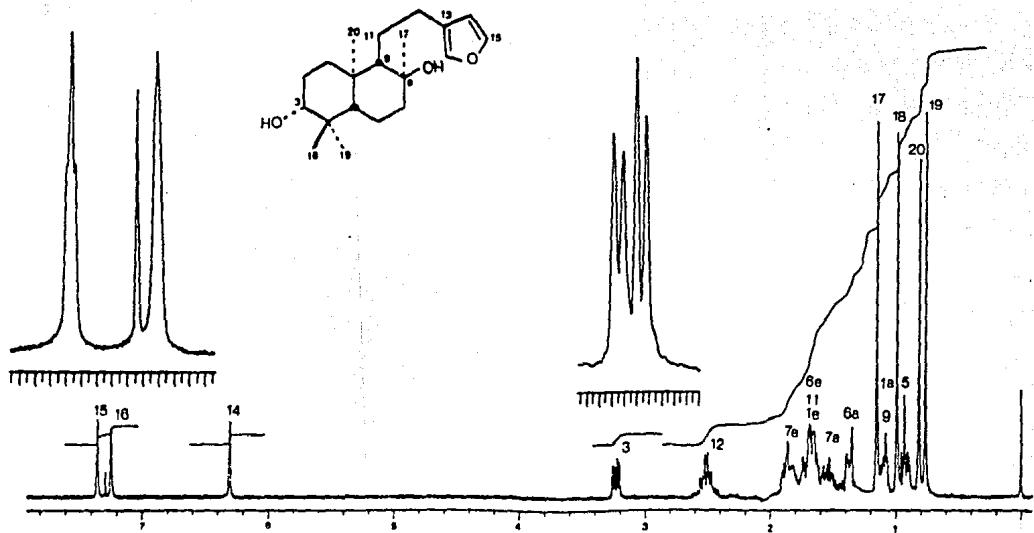
1000

800

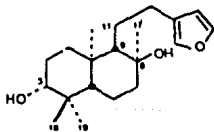
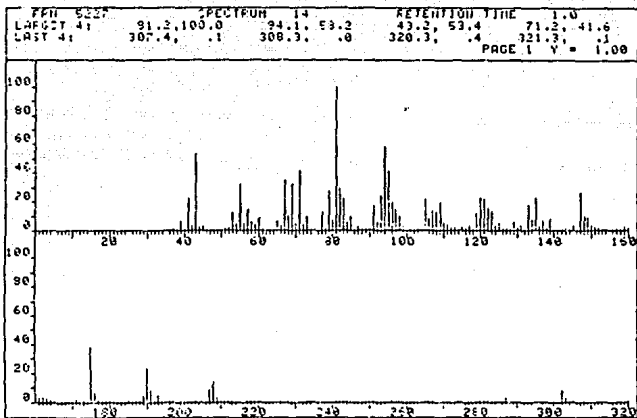
600

Espectro 2

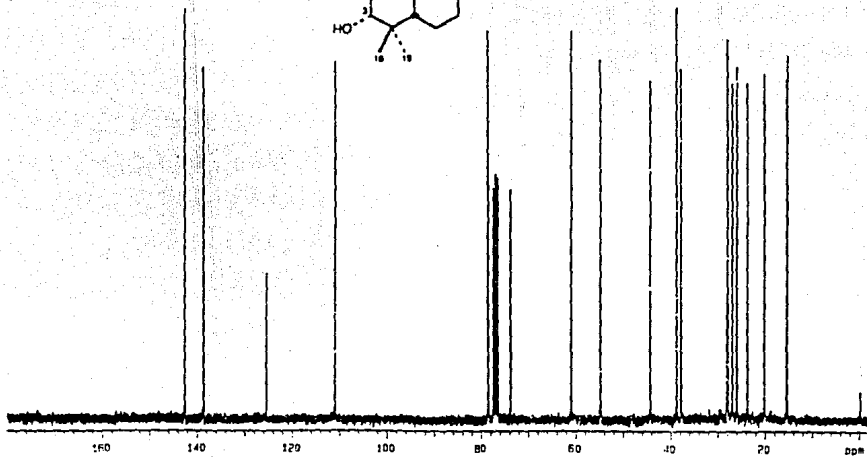
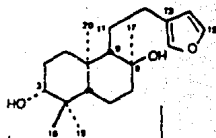
24



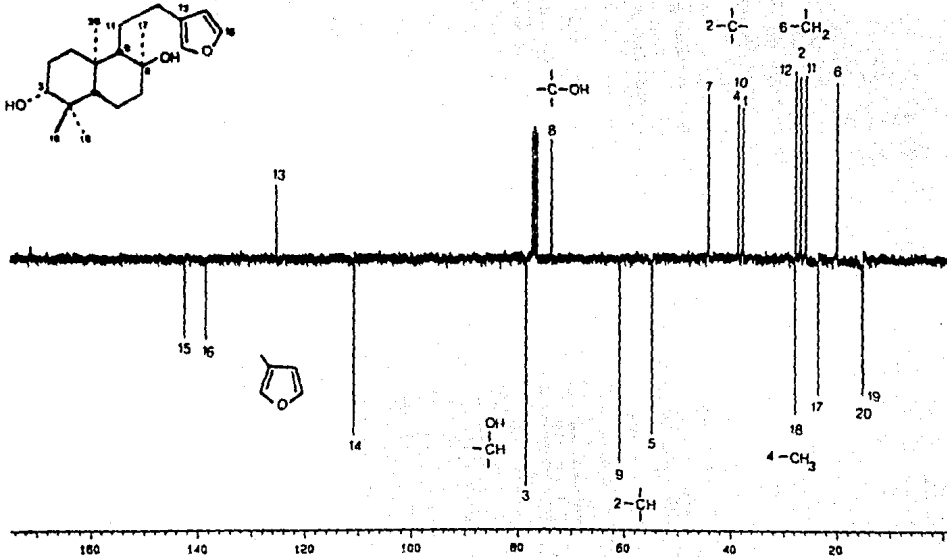
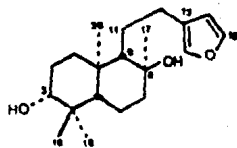
Espectro 3



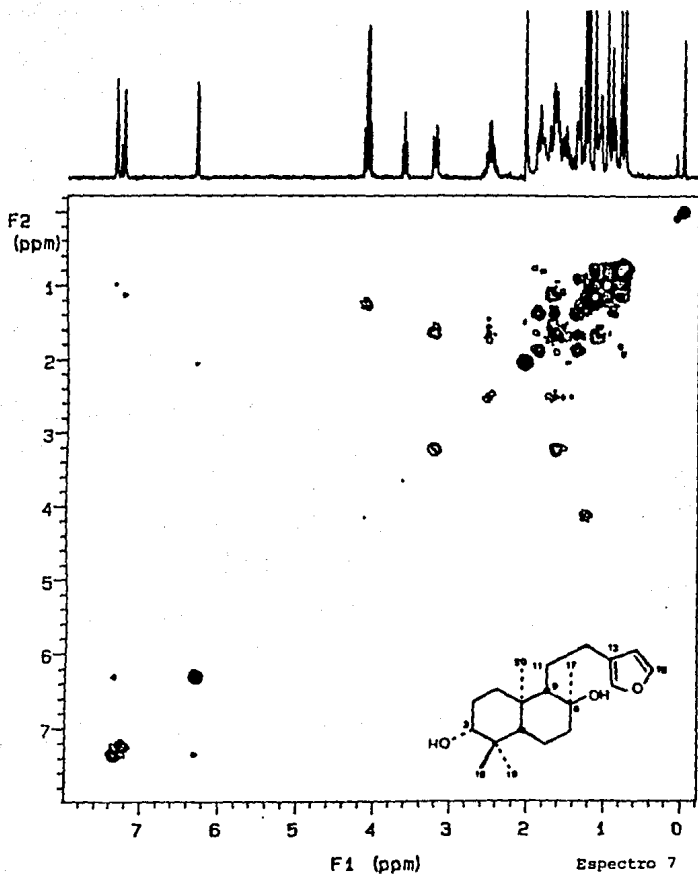
Espectro 4

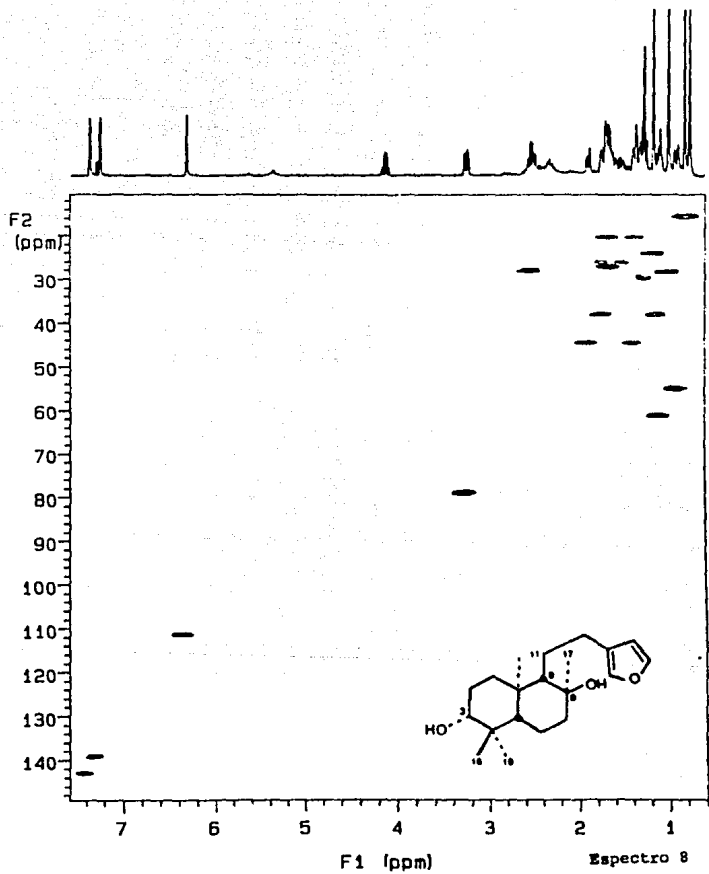


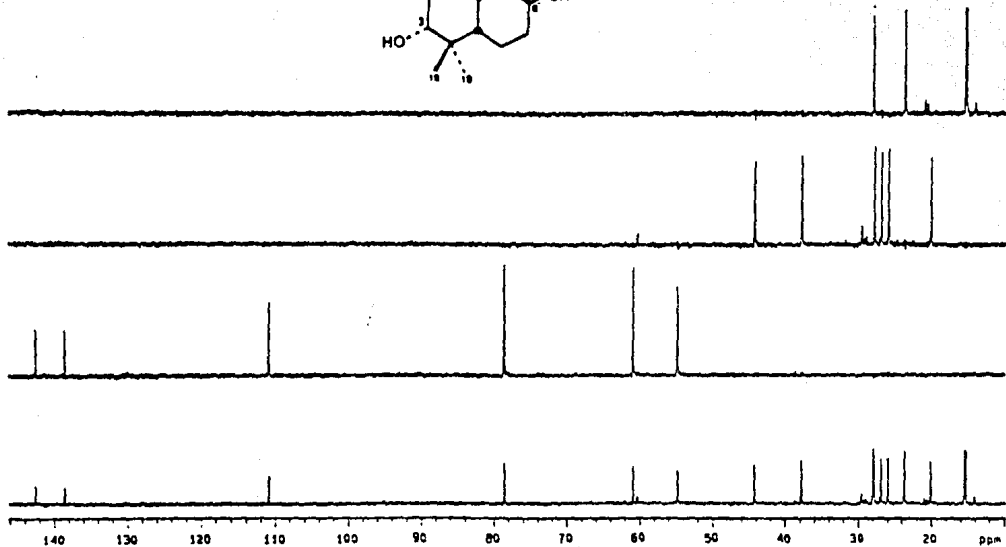
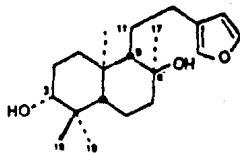
Espectro 5



Espectro 6

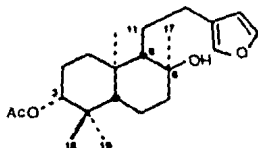






Espectro 9

Cuadro 3. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acilado 27a.

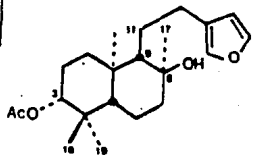
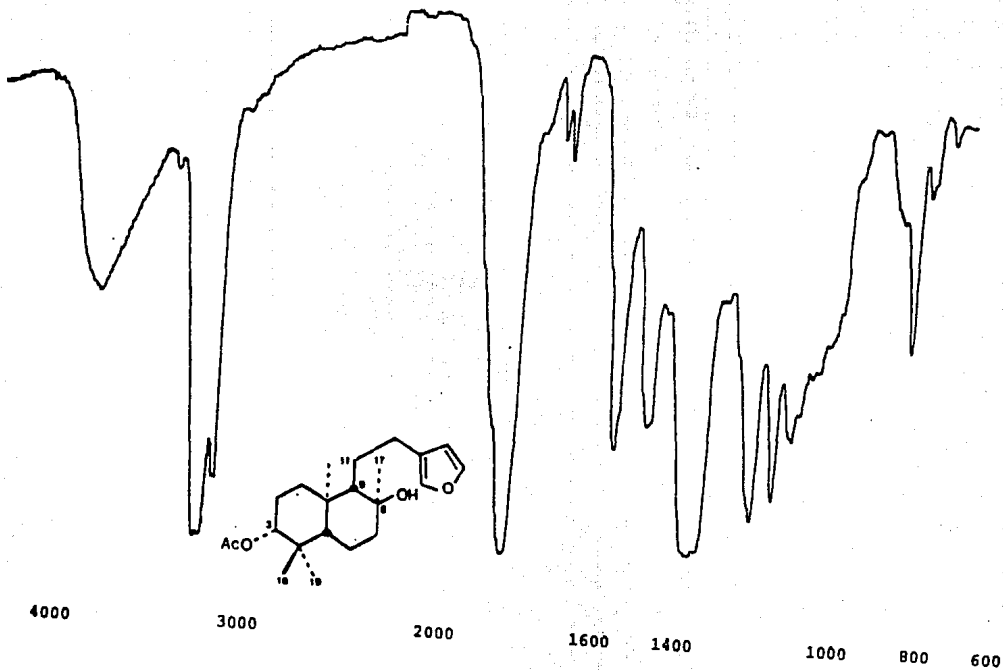


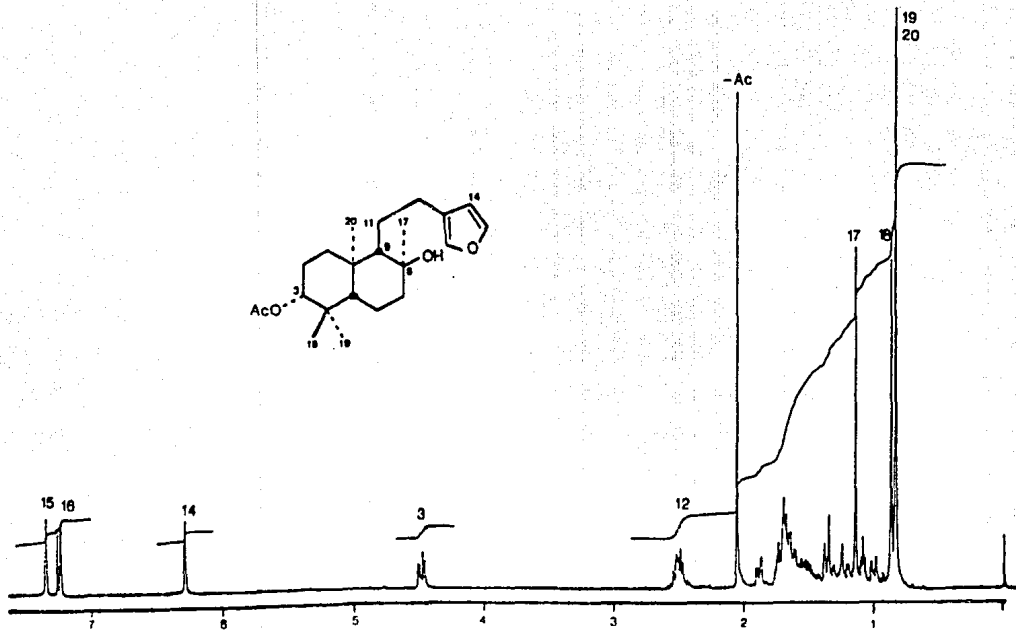
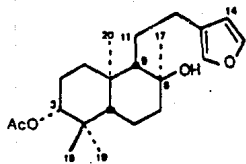
IR (KBr cm^{-1})
(Espectro 10) 3430, 2950, 2870, 1720, 1450, 1370, 1260, 1115, 1060, 1010, 735

RMN^1H ppm
(CDCl_3 , 300MHz)
(Espectro 10) 0.84 (6H, s, H-19 y H-20), 0.89 (s, H-18), 1.15 (s, H-17), 2.04 (s, $\text{CH}_3\text{-CO-}$)
4.84 (d, $J=11$, 4.5 H-2, H-3), 6.29, 7.23, (brs, H-14 y H-16), 7.35 (t, $J=1.6\text{H}$, H-15)

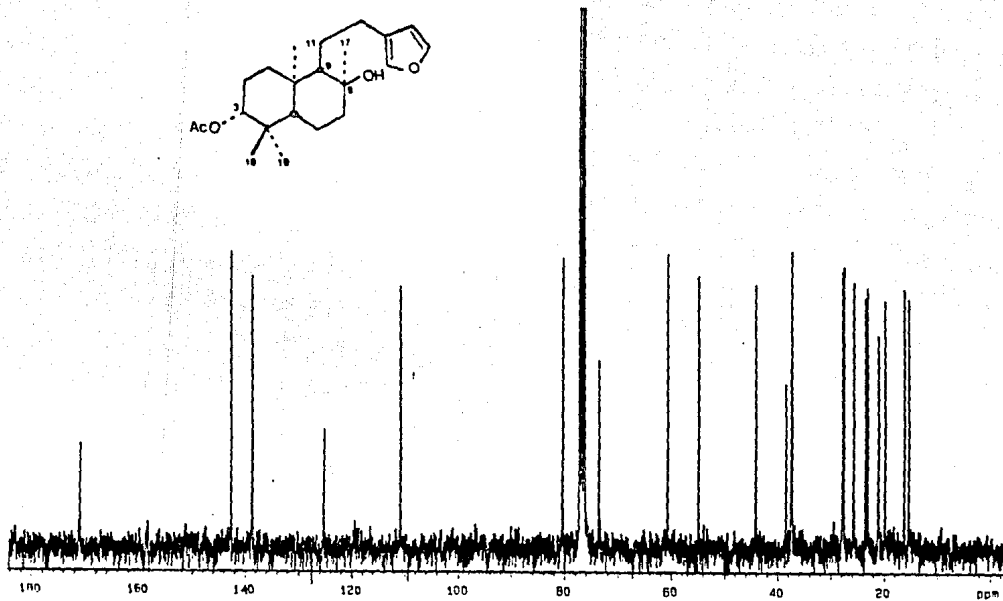
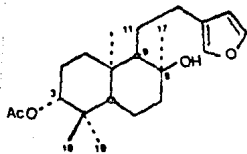
EMIE m/z
(Espectro 12) 382 [M^+ , (1)], 300 [M-80 (5)], 285 (1), 95 (40), 94 (35), 81 (70), 43 (100)

RMN^{13}C ppm
(CDCl_3 , 300MHz)
(Espectro 13) 142.75 (C-15, d), 138.81 (C-16, d), 125.36 (C-13, s), 110.99 (C-14, d), 80.57 (C-3, d), 73.79 (C-8, s), 80.89 (C-9, d), 55.07 (C-5, d), 44.35 (C-7, t), 39.70 (C-10, s), 37.71 (C-4, s), 37.58 (C-1, t), 29.03 (C-18, q), 27.81 (C-12, t), 25.94 (C-11, t), 23.75 (C-17, q), 23.35 (C-2, t), 20.06 (C-6, t), 16.44 (C-19, q), 15.62 (C-20, q).

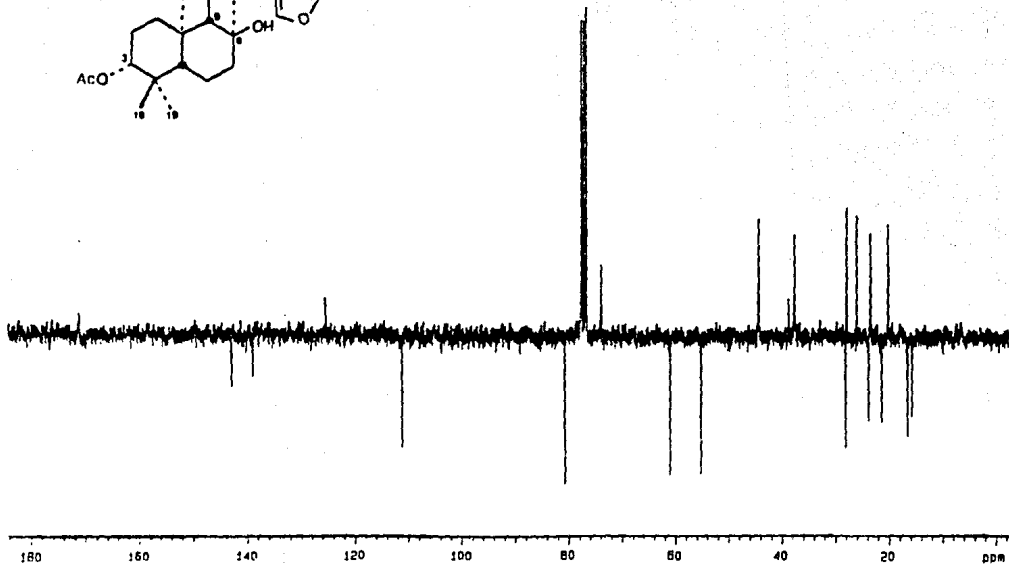
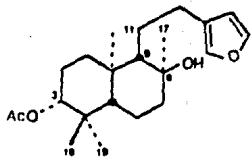




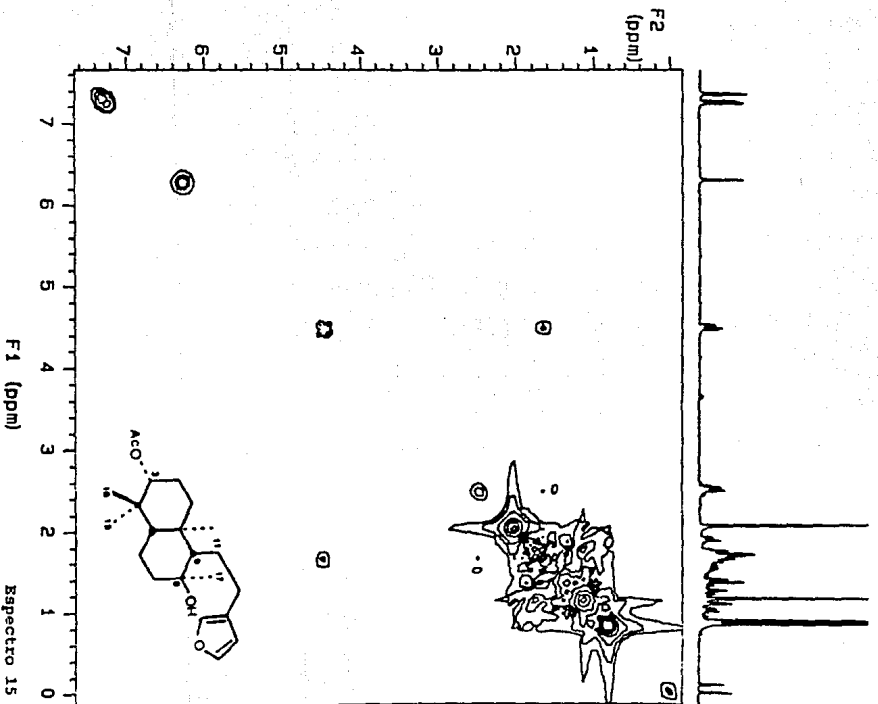
Espectro 11



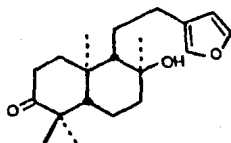
Espectro 13



Espectro 14



Cuadro 4. Constantes físicas y espectroscópicas de la cetona 27b.



IR (KBr) cm^{-1}
(CDCl_3)
(Espectro 16)

3460, 2935, 2858, 1703, 1501, 1455, 1385,
1287, 1123, 1079, 1022, 925, 873, 789

RMN¹H ppm
(CDCl_3 , 300MHz)
(Espectro 17)

0.96 (s, H-20), 1.02 (s, H-19), 1.10 (s,
H-17), 1.22 (s, H-18), 6.30, 7.24 y 7.36
(brs, H-14, H-16 y H-15 respectivamente)

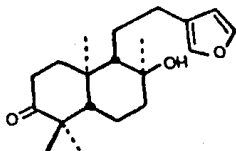
EMIE m/z
(Espectro 18)

318 [M^+ (0.5)], 303 [$\text{M}-15$, (1)], 300
[$\text{M}-\text{H}_2\text{O}$, (3)], 285 (2), 206 (10), 205
(11), 1.39 (30), 98 (55), 95 (46), 94
(100), 81 (97), 43 (67)

CD $\Delta\epsilon$ nm
(c 0.05, MeOH)
(Espectro 19)

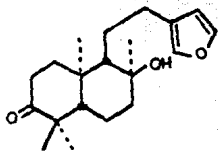
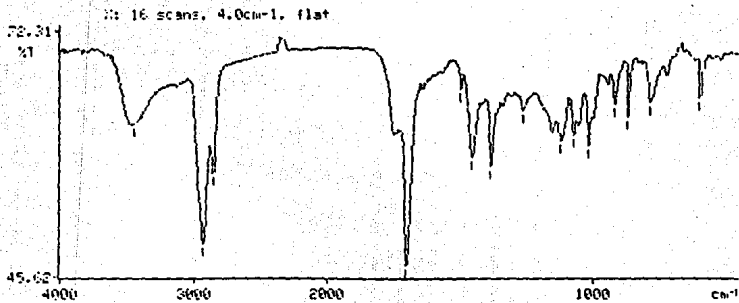
0.06 (260), -0.168 (270), -0.271 (280),
-0.310 (287), -0.1810 (300) ó 308, +0.06
(320), +0.02 (310)

Cuadro 4. Constantes físicas y espectroscópicas de la colona 27b. (Continuación).

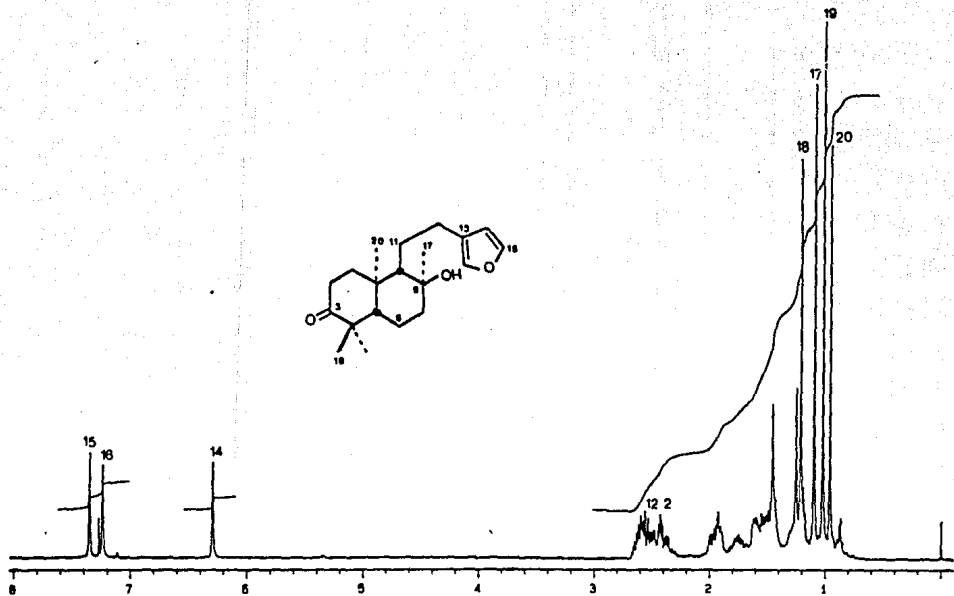


RMN¹³C ppm
 (CDCl₃, 300MHz)
 (Espectro 20)

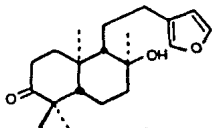
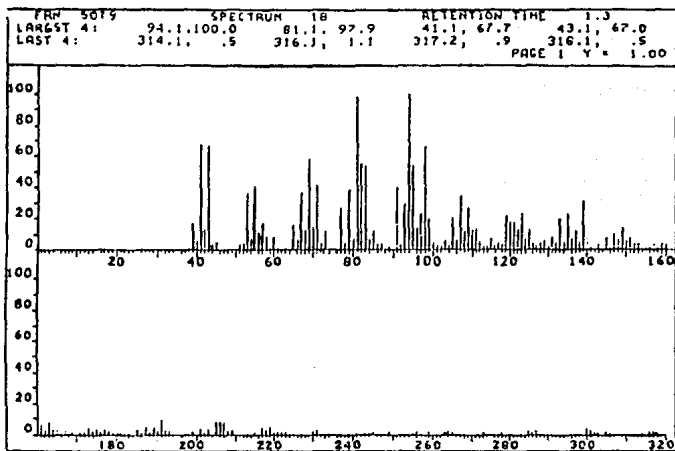
216.5 (C-3, s), 142.75 (C-15, d), 138.78
 (C-16, d), 125.25 (C-13, s), 110.94
 (C-14, d), 73.72 (C-8, s), 60.02 (C-9,
 d), 54.06 (C-5, d), 47.43 (C-4, s), 43.87
 (C-7, t), 38.28 (C-10, s), 38.51 (C-1,
 t), 33.85 (C-2, t), 27.71 (C-12, q),
 26.27 (C-18, q), 26.20 (C-11, t), 23.65
 (C-17, q), 21.30 (C-6, t), 21.30 (C-19,
 q), 14.87 (C-20, q).



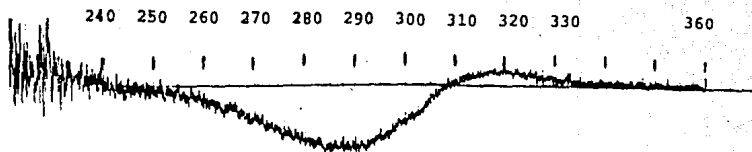
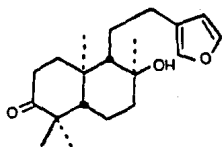
Espectro 16



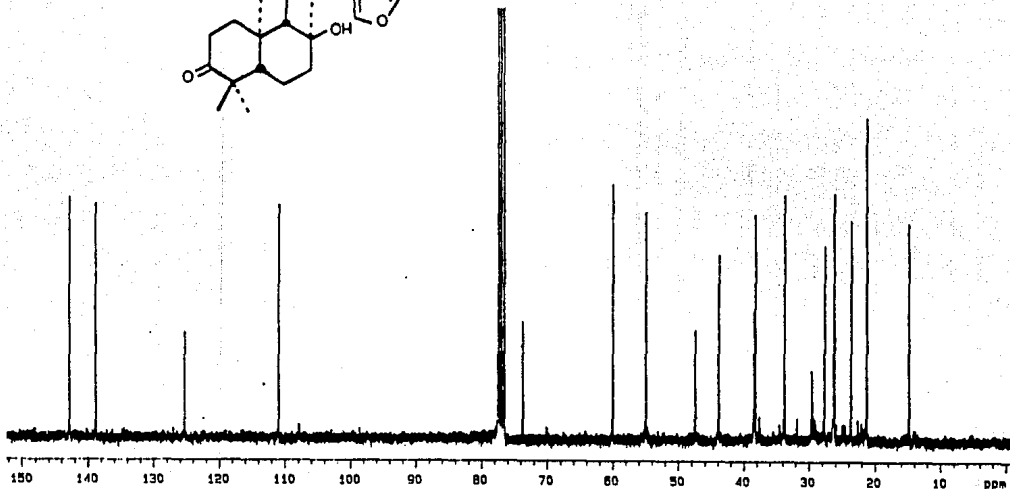
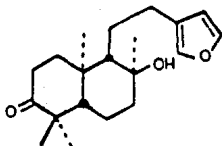
Espectro 17



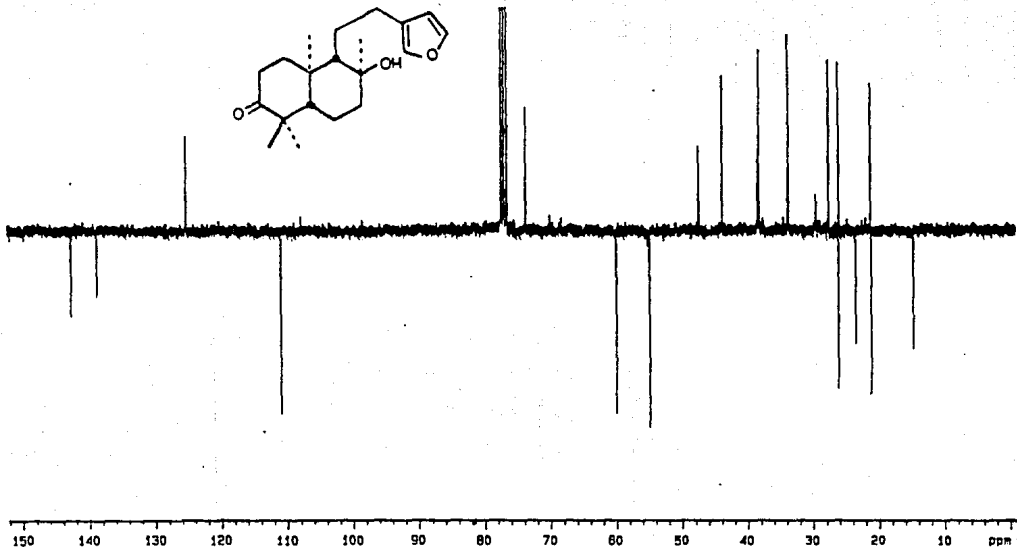
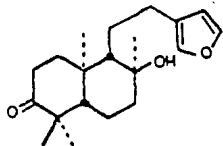
Espectro 18



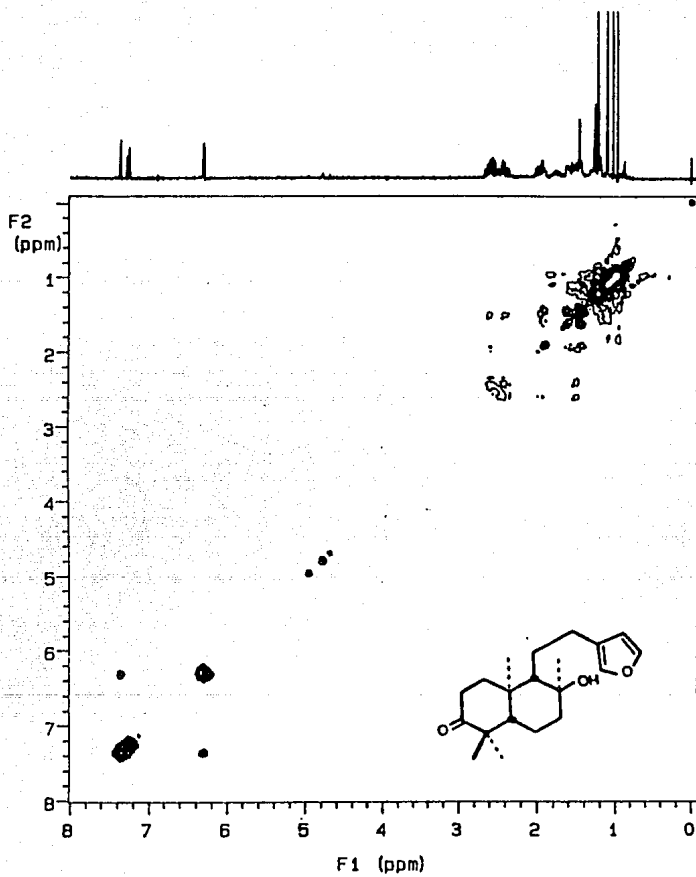
Espectro 19



Espectro 20



Espectro 21



Cuadro 5. Potencial antimicrobiano del extracto total y del ent-labdano.

	DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)				
	Bacillus subtilis	Staphylococcus aureus	Escherichia coli	Pseudomona aeruginosa	Candida albicans
Estreptomocina					
100 µg	7	12	9	7	--
Extracto total					
100 µg	8.5	6.5	--	5	--
50 µg	7.5	6	--	3.5	--
<u>ent</u>-labdano					
500 µg	--	6.5	--	--	--
250 µg	--	3.5	--	--	--
Nistatina					
100 µg	--	--	--	--	9
Extracto total					
100 µg	--	--	--	--	5
50 µg	--	--	--	--	3
<u>ent</u>-labdano					
500 µg	--	--	--	--	7
250 µg	--	--	--	--	--

1.5 DISCUSION

El análisis de las evidencias químicas y espectroscópicas que permitieron determinar la estructura del nuevo producto natural obtenido del extracto de cloroformo-metanol de D. viscosa se discute a continuación.

El producto 27 se aisló como un aceite de color amarillo soluble en cloroformo, ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como $C_{20}H_{32}O_3$ por espectrometría de masas. El espectro de IR (Cuadro 2, Espectro 2), presentó bandas de absorción características para hidroxilo (3450 cm^{-1}), C-H (2950 y 2875 cm^{-1}), gem-dimetilo (1385 cm^{-1}) y para anillo furánico (875 cm^{-1}) (Savona, et al., 1977). La presencia de este núcleo aromático se obtuvo también por los espectros de UV (Espectro 1) y de masas (Espectro 4). En el primero se observó un máximo de absorción a λ 282 nm (Kaplan, R., et al., 1968) y en el segundo fragmentos de masa a m/z 81,94 y 95; el origen de estos fragmentos se detalla en la Figura 2 (Savona, G., et al., 1977).

Por tratamiento con anhídrido acético y piridina se obtuvo el derivado monoacetilado 27a, y por tratamiento con CrO_3 la cetona 27b. De esta manera, se confirmó químicamente la presencia de un alcohol secundario en la molécula.

En los espectros de IR de ambos derivados 27a y 27b se apreciaron las bandas características para acetato (1720 cm^{-1} , Espectro 10) y cetona (1703 cm^{-1} , Espectro 16) respectivamente. Cabe señalar que en ambos espectros

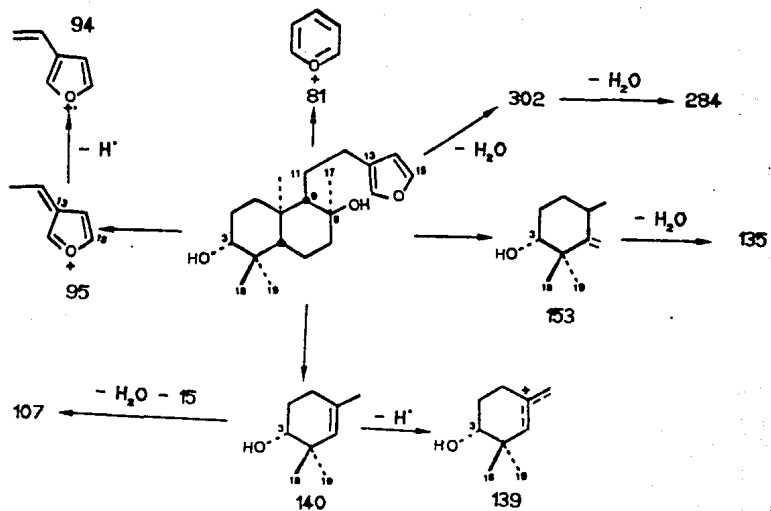


Figura 2. Fragmentos más importantes observados en el espectro de 27.

persistió la absorción para el grupo hidroxilo, lo cual sugería en primera instancia la presencia de un alcohol terciario en las moléculas de 27a y 27b.

Los datos de la RMN para 27 y sus derivados, permitieron establecer que el producto natural era un diol diterpénico del tipo labdano, con un anillo furánico β -sustituido. Los espectros de RMN¹H para el producto natural y sus derivados (Espectros 4, 10 y 16) fueron muy similares. En todos los casos se observaron señales atribuibles a un anillo furánico β -sustituido (Cuadro 6) y para cuatro grupos metilo unidos a centros cuaternarios (Cuadro 6). El desplazamiento paramagnético observado para uno de los metilos (δ 1.15 en 27 y δ 1.15 en 27a) era consistente con la presencia de un metilo geminal a una función carbinólica terciaria. De manera adicional, el espectro del compuesto 27 (Espectro 3) presentó un doblete de dobletes (δ 3.20, J=11,5 Hz), asignable a un hidrógeno en un anillo de seis miembros, geminal a un grupo hidroxilo en disposición axial. Esta señal como era de esperarse, se desplazó paramagnéticamente en el derivado 27a (δ 4.48, J=11, 4.5 Hz, Espectro 11) y desapareció en la cetona 27b (Espectro 17). Por último, el espectro de 27a mostró además el singulete típico de un metilo de acetato a δ 2.04.

El análisis detallado de los espectros de RMN¹³C de 27, 27a y 27b, y la comparación con modelos adecuados previamente descritos en la literatura (Fernández, *et al.*, 1986; Savona,

et al. 1977), confirmaron inequívocamente el esqueleto base del diterpenoide. En todos los casos, se observaron señales para cuatro metilos unidos a cuatro centros cuaternarios (ver Cuadro 6), un anillo furánico, tres carbonos cuaternarios (uno de los cuales estaba unido una función oxigenada), seis metilenos y tres metinos, en 27b una de estas señales se encontraba sustituida por una absorción para cetona en anillo de 6 miembros a δ 218.5.

Al igual que en el caso de los espectros de RMN¹H, el desplazamiento observado para uno de los grupos metilo en δ 23.73 en 27, δ 23.75 en 27a y δ 23.65 en 27b indicaron la presencia de un hidroxilo terciario en C-8.

Las diferencias más importantes entre los espectros de RMN¹³C de 27 y sus derivados fueron los siguientes.

La variación observada en la magnitud de los desplazamientos químicos para los metilos en C-4 (Cuadro 6), era consistente con la presencia de la función carbinólica secundaria en C-3 en el producto natural 27. Las diferencias de los desplazamientos químicos de los metilos en C-4 de los compuestos, fueron del mismo orden de magnitud que los descritos previamente para varios terpenoides con estructuras similares en el anillo A (Fernández C., et al., 1986).

b) Las resonancias de C-2 y C-4 se encontraban desplazadas paramagnéticamente en los compuestos 27a y 27b (ver Cuadro 6). Los desplazamientos paramagnéticos α y β causados por la acetilación en 27a y la oxidación en 27b

Cuadro 5. Datos espectroscópicos de RMN¹³C de los compuestos 27, 27a y 27b.

Carbono	7	7a	Δ7-7a	7b	Δ7-7b
1	37.85(+)	37.58(+)	- 0.27	38.51(+)	+0.66
2	26.96(+)	23.35(+)	-3.61	33.85(+)	+6.89
3	78.60(-)	80.57(-)	+1.64	216.5 (+)	+137.9
4	38.74(+)	37.71(+)	-1.03	47.43(+)	+8.69
5	54.90(-)	55.07(-)	+0.17	54.98(-)	+0.08
6	20.14(+)	20.08(+)	-0.06	21.30(+)	+1.16
7	44.33(+)	44.35(+)	+0.02	43.87(+)	-0.46
8	73.85(+)	73.79(+)	-0.06	73.72(+)	-0.13
9	61.00(-)	60.89(-)	-0.11	60.02(-)	-0.98
10	38.74(+)	38.70(+)	-0.04	38.28(+)	-0.46
11	25.97(+)	25.94(+)	-0.03	26.20(+)	+0.23
12	27.90(+)	27.81(+)	-0.09	27.71(+)	-0.19
13	125.44(-)	125.36(-)	-0.08	125.25(-)	-0.19
14	110.95(-)	110.99(-)	+0.04	110.94(-)	-0.01
15	142.62(-)	142.75(-)	+0.13	142.75(-)	+0.13
16	138.57(-)	138.81(-)	+0.24	138.78(-)	+0.21
17	26.73(-)	23.75(-)	-2.98	23.65(-)	-3.08
18	29.04(-)	28.03(-)	-0.01	26.27(-)	-1.77
19	15.30(-)	16.44(-)	+1.14	21.30(-)	+6
20	15.48(-)	15.62(-)	+0.14	14.87(-)	-0.61

El signo entre paréntesis indica resonancia (+) ó (-) en los espectros APT

proporcionaron una evidencia adicional para la ubicación del hidroxilo secundario en C-3.

Cabe señalar que las asignaciones de las señales en los espectros de RMN¹³C se confirmaron con el análisis de los espectros APT, HETCOR y DEPT. (Espectros 6, 8 y 9 respectivamente). Específicamente, el espectro HETCOR permitió comprobar que las asignaciones previamente realizadas por Savona y colaboradores para C-11 y C-12 de varios compuestos similares eran incorrectas. Los autores antes mencionados asignaron en todos los casos el triplete que aparecía en el rango comprendido entre 6 18.2 y 21 a C-12, y el triplete observado entre 6 28.2 y 32.4 lo atribuían a C-11. El espectro de HETCOR del producto natural 27, indica claramente que las asignaciones de Savona y colaboradores deben invertirse.

Los espectros de masas de 27, 27a y 27b presentaron iones moleculares a m/z 320, 362 y 318, respectivamente, mismos que son congruentes con las fórmulas moleculares. Además de los fragmentos observados para el anillo furánico (m/z 81, 94 y 95), el espectro de 27 mostró fragmentos consistentes con la ubicación del hidroxilo en C-3 a m/z 153, 140, 139 y 135 (ver Figura 2).

Finalmente, con el objetivo de determinar la configuración absoluta del labdano, se determinó el espectro de dicroísmo circular del derivado 27b (Espectro 19). El efecto Cotton negativo ($\Delta\epsilon_{287} = -0.31$) indicó la naturaleza ent-labdánica para el derivado oxigenado 27b (Witz, et al, 1963).

Con base en las evidencias presentadas, la estructura del

producto natural 27 se estableció como el ent-15,16-epoxi-9 α H-labda-13(16),14-dien-3 β ,8 α -diol (27), el cual constituye un nuevo metabolito secundario.

Los resultados de las evaluaciones biológicas indicaron que el extracto total, las fracciones 98-123 y el labdano no eran tóxicos para el crustáceo Artemia salina.

La potencialidad antimicrobiana del extracto de D. viscosa quedó demostrado contra Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus. Sin embargo el ent-labdano resultó inactivo como posible agente antimicrobiano.

1.6. CONCLUSIONES.

1.6.1 El estudio realizado de las fracciones de mediana polaridad del extracto cloroformo-metanólico de la Dodonaea viscosa (L.) Jacq, permitió el aislamiento de un nuevo diterpenoide. Este constituyente se caracterizó como ent-15,16-epoxi-9 α H-labda-13-(16),14-dien-3 β ,8 α -diol (27). El compuesto representa el primer labdano sustituido en C-3 aislado del género Dodonaea.

1.6.2 El extracto, la fracción 98-123 y el compuesto 27 no presentaron toxicidad para el crustáceo A. salina (LC₅₀ > 1000 ppm).

1.6.3 El extracto de D. viscosa presentó moderada actividad antimicrobiana contra B. subtilis y S. aureus, en tanto que el ent-labdano resultó inactivo como agente antimicrobiano. La actividad antimicrobiana obtenida para el extracto permite validar el uso popular que como agente anti-infectivo se le atribuye a la planta.

CAPITULO II

ESTUDIO QUIMICO Y BIOLOGICO DE *Celaenodendron mexicanum*
Standl (Euphorbiaceae)2.1 GENERALIDADES DE *Celaenodendron mexicanum*.

El género *Celaenodendron* pertenece a la familia Euphorbiaceae (Subfamilia Oldfieldioideae, Tribu Hyaenancheae, Subtribu Paivaousinae) (Webster, 1975) y es endémico de México. Este género fue descrito por Standley en 1927 con base en un material colectado en el estado de Sinaloa y su nombre es una traducción al griego del nombre mexicano palo prieto. El género está representado en el herbario Kew por una sola especie *Celaenodendron mexicanum* Standl (Jury, 1987), que se encuentra distribuida en los estados de Sinaloa y Jalisco (Martínez, 1987).

Esta especie monotípica se conoce popularmente con el nombre de palo prieto, y la corteza es utilizada principalmente para la construcción de casas, debido a su alta resistencia que ofrece al ataque de insectos y microorganismos. La planta además tiene la particularidad de crecer en selvas caducifolias, formando bosques, y en su habitat no se observa el crecimiento de otras especies (Martijena, comunicación personal, 1990).

Desde el punto de vista químico y biológico, esta planta no ha sido objeto de estudios previos.

Según una revisión reciente acerca de la química de la familia (Rizk, 1987), los metabolitos secundarios más característicos de la familia Euphorbiaceae, incluyen sustancias

terpenoides, compuestos aromáticos, esteroides, ácidos grasos, poliacetilenos, polialquenos, alcaloides, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. En el Cuadro 7 se resume el perfil químico de la familia.

Cuadro 7. Perfil Químico de la Familia Euphorbiaceae. .

TERPENOIDES

1. Triterpenoides (oleananos, ursanos, lupanos, cicloartanos, dammaranos, eufanos, friedelanos, hopanos y taraxanos).
2. Diterpenoides (pimaranos e isopimaranos).
3. Sesquiterpenoides (cariofilanos, elemanos, farnesanos, germacranos, humulanos, copanos, cadinanos y guayanos).
4. Monoterpenoides (pinaños, tujanos, bornanos, linalol, derivados del geraniol, etc.).

COMPUESTOS AROMATICOS

1. Flavonoides (flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, chalconas, antocianidinas)
2. Cumarinas.
3. Lignanós.
4. Taninos.
5. Quinonas.
6. Fenantrenos.
7. Compuestos aromáticos simples (C_8-C_1 , C_6-C_2 y C_8-C_3)

ESTEROLES

1. Sitosteroles simples.
2. Glucósidos cardiotónicos.

Cuadro 7. Perfil Químico de la Familia Euphorbiaceae.
(Continuación).

ACIDOS GRASOS, POLIACETILENOS Y POLIALQUENOS

ALCALOIDES

1. Imidazoles.
2. Piridinas y pirimidinas.
3. Pirrolizidinas y piperidinas.
4. Quinazolidinas.
5. Isoquinolinas (Aporfinas y pro-aporfinas).
6. Morfinanos.
7. Indoles.
8. Otros (alquilaminas, etc.)

GLUCOSIDOS CIANOGENETICOS Y GLUCOSINOLATOS

2.2 OBJETIVOS.

Con base en los antecedentes descritos, los objetivos planteados para el estudio de esta planta son los siguientes:

2.2.1 Separar mediante métodos fitoquímicos convencionales el mayor número de constituyentes del extracto obtenido de las partes aéreas de Celaenodendron mexicanum Standl.

2.2.2 Determinar la estructura molecular de los productos, utilizando métodos químicos y espectroscópicos.

2.2.3 Determinar la actividad antimicrobiana y alelopática potencial del extracto total y de los compuestos aislados.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL.

2.3.1 Materiales y métodos.

2.3.1.1 Material Vegetal.

El material vegetal (partes aéreas) utilizado en este estudio fué recolectado en el Km. 50 de la carretera Barra de Navidad-Puerto Vallarta, Municipio La Huerta, Jalisco, por la Bióloga Nora Martijena en enero de 1990.

Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente se molieron en un molino de cuchillas, Modelo Wiley 4.

2.3.1.2 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron de la misma manera especificada en el inciso 1.3.3 (Capítulo I).

2.3.1.3 Métodos de extracción y fraccionamiento.

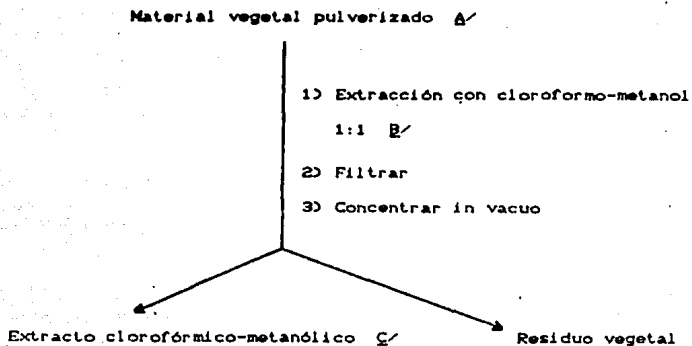
El material vegetal (4.1292 Kg) se trató según el procedimiento mostrado en el Esquema 1.

Una parte del extracto (210 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna usando como adsorbente gel de sílice (1300 g de sílica gel G-60 Merck, 0.2-0.5 mm de tamaño de partícula).

El proceso de elución se efectuó con hexano.

hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones; se obtuvieron un total de 706 fracciones de 500 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares.

En el Cuadro 9 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos y las fracciones combinadas.



A/ Cantidad de material vegetal 4.1202 Kg

B/ Extracción via maceración (5 veces por periodos de 48 hs. cada vez con un volumen aproximado de 20 litros)

C/ Cantidad de extracto total 307.0 g

Esquema 1. Preparación del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de Celaenodendron mexicanum.

Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de Celaenodendron mexicanum.

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano	100	1- 71	1-6, 7-59
Hexano-cloroformo	90:10	72- 93	60-93, 94-100
Hexano-cloroformo	80:20	94-142	101-112, 113-130,
	70:30	143-304	140-152, 153-223,
			224-301
Hexano-cloroformo	60:40	305-318	302-316
Hexano-cloroformo	50:50	319-461	317-354, 355-364
			365-384, 385-443
			444-451
Hexano-cloroformo	25:75	462-509	452-483, 484-510
Cloroformo	100	510-533	511-524
Cloroformo-metanol	99:1	534-545	525-551
Cloroformo-metanol	95:5	546-590	552-568
Cloroformo-metanol	90:10	591-607	569-580, 581-590
			591-592, 593-606
Cloroformo-metanol	80:20	608-623	607-614, 615-629
Cloroformo-metanol	70:30	624-640	630-644
Cloroformo-metanol	60:40	641-662	645-648, 649-654
			655-668

Cuadro B. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de C. mexicanum. (Continuación).

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Cloroformo-metanol	50:50	663-692	669-671, 672-682 683-688, 689-698
Metanol	100	693-706	699-700, 701-706

2.3.2 Aislamiento y purificación de los compuestos.

2.3.2.1 Aislamiento de la friedelina (29).

De las fracciones 119-131, de la columna original (Cuadro 8) se obtuvieron 285 mg de un sólido blanco, amorfo, cromatográficamente puro, con un p.f. 243-246°C.

2.3.2.2 Aislamiento de la maytensifolina B (29), del 3 β -hidroxi-16-oxo-D:A friedelano (30) y del β -sitosterol (31).

De las fracciones 224-288, eluidas con hexano-cloroformo 70:30, se obtuvieron 2.6594 g de una mezcla constituida por tres compuestos. La mezcla anterior se resolvió en sus componentes individuales, mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice, empleando como eluyente AcOEt-CHCl₃ en una proporción 90:10. Se realizaron 18 placas preparativas con 25 mg de muestra cada una. Luego de eluir y procesar las placas de la manera habitual se obtuvieron:

a) 103 mg de 29, como un sólido blanco, amorfo, soluble en cloroformo, con un p.f. >280°C.

b) 80 mg de 30, como un sólido amorfo, blanco, soluble en cloroformo, con un p.f. 112-115°C.

c) 52 mg de 31, como un sólido amorfo, blanco, soluble en cloroformo, con un p.f. 122-125°C.

2.3.2.3 Aislamiento de la ginkgetina (32), la bilobetina (33)

y la amentoflavona (34).

De las fracciones 551-590 eluidas con cloroformo-metanol 95:5, se obtuvieron 3.260 g de un sólido amarillo, amorfo, constituido también por tres componentes. Dicha mezcla se separó mediante cromatografía de capa delgada de gel de sílice, empleando como eluyente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ en una proporción 8:2. Se realizaron 26 placas preparativas con 30 mg de muestra cada una. Luego de eluir y procesar las placas se obtuvieron:

a) 313 mg de 32, como un sólido amarillo, amorfo, soluble en CHCl_3 y acetona, con p.f. 198-200°C.

b) 210 mg de 33, como un sólido amarillo, amorfo, soluble en acetona, con p.f. 213-215°C.

c) 183 mg de 34, como un sólido amarillo, amorfo, soluble en acetona y metanol, con p.f. 223-224°C.

2.3.3 Caracterización de los compuestos aislados.

2.3.3.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Se utilizaron los mismos instrumentos que en el Capítulo I (sección 1.3.5.1).

2.3.3.2 Obtención de los derivados metilados de 32, 33 y 34.

Para obtener los derivados metilados, se utilizó una solución etérea de diazometano, el cual se generó con una

solución de KOH (5 g en 7.5 ml de H₂O), 25 ml de MeOH, 15 ml de éter etílico y 21.5 g de N-metil-N-nitroso-p-toluidil sulfonamida, por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua a una temperatura de 5°C; transcurridos 5 minutos el diazometano etéreo se destiló utilizando un baño maría (58-60°C), y se recolectó en un baño de hielo. Por último se adicionaron los productos a metilar disueltos en metanol ó éter. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 hs.

2.3.3.3 Oxidación de 30 con reactivo de Collins.

10 mg del compuesto 30 en 0.2 ml de piridina, se trataron con una solución de CrO₃ (12 mg de CrO₃ en 0.2 ml de piridina) a temperatura ambiente, con agitación durante 18 hs. Al cabo de este tiempo, se procesó el crudo de la reacción, obteniéndose 3.5 mg de un sólido amorfo, soluble en CHCl₃.

2.3.3.4 Determinación de la actividad del extracto total y de los compuestos aislados contra hongos fitopatógenos.

La determinación de la actividad contra hongos fitopatógenos del extracto total y de los compuestos aislados, se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, utilizando la misma metodología que se describió en el Capítulo I, sección 1.3.7.

Las cepas empleadas para dicha evaluación biológica, fueron las siguientes: Alternaria, Fusarium y Helminthosporum.

2.3.3.5 Determinación de la actividad potencial alelopática de el extracto total y de los compuestos aislados.

Procedimiento general de los bioensayos.

El potencial alelopático de C. mexicanum y de los compuestos aislados fué probado sobre el crecimiento radicular de Amaranthus leucocarpus y Echinochloa crusgalli; en el caso del material vegetal se probaron lixiviados acuosos y los extractos orgánicos.

Estos ensayos biológicos fueron realizados por la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La metodología seguida es la descrita por Anaya y Colaboradores (1990) para este tipo de evaluaciones.

2.4 RESULTADOS.

El extracto cloroformo metanólico de las partes aéreas de Celaenodendron mexicanum Standl. fué sometido a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, obteniéndose un total de 705 fracciones. Las fracciones combinadas especificadas en el Cuadro 9 (sección experimental 2.3.1.3) fueron sometidas a diferentes procesos cromatográficos y, como resultado global se aislaron siete metabolitos secundarios: la friedelina (28), la maytensifolina B (29), 3 β -hidroxi-16-oxo-D:A friedelano (30), el β -sitosterol (31), la amentoflavona (32), la bilobetina (33) y la ginkgetina (34).

En el cuadro 9 se indican las fracciones de la columna original de donde fueron obtenidos los compuestos antes mencionados, tipo de proceso empleado para su aislamiento y sus rendimientos correspondientes.

De manera general, los compuestos fueron caracterizados mediante métodos químicos y espectroscópicos. En los Cuadros 10, 11, 12, 13, 14 y 15 se especifican los datos físicos y espectroscópicos utilizados para la caracterización de los mismos.

Durante el proceso de caracterización de los tres flavonoides (32, 33 y 34), fueron sometidos a una reacción de metilación por tratamiento prolongado con diazometano, obteniéndose en todos los casos el mismo derivado permetilado (35), cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen

en el Cuadro 18.

En la identificación del compuesto (20), la única reacción química utilizada fué una oxidación, y para ello el producto natural fué tratado con el reactivo de Collins y el derivado obtenido resultó idéntico en todos sus aspectos al producto natural (20).

En relación con los ensayos biológicos, el extracto total y los compuestos aislados fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos sobre las especies Amaranthus leucocarpus y Echinochloa crusgalli. Los resultados obtenidos se resumen en las gráficas 1-3.

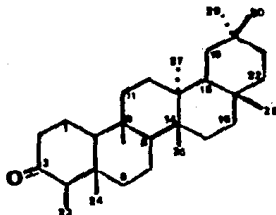
También se evaluaron como agentes antimicóticos sobre especies de los géneros Helminthosporium, Alternaria y Fusarium. Los resultados se ilustran en las gráficas 4-7.

Finalmente se determinó la toxicidad de los extractos y de los compuestos aislados para Artemia salina (Meyer, et al. 1982). En todos los casos la DL_{50} calculada mediante el método estadístico PROBIT fueron mayores a 1000 ppm.

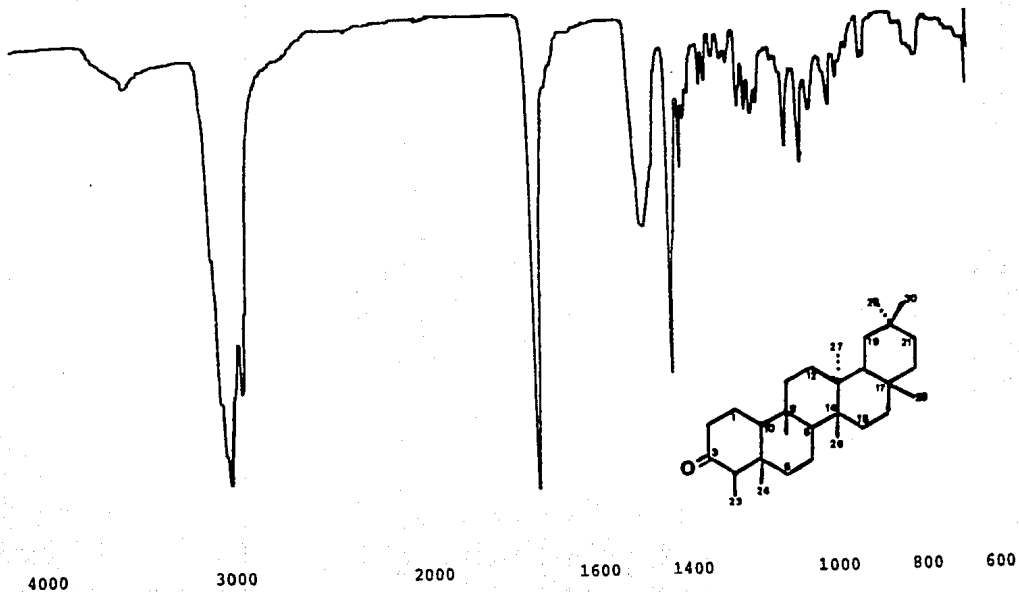
Cuadro 9. Rendimientos de los compuestos aislados del extracto cloroformo-metanólico de C. mexicanum.

Fracciones combinadas	Proceso cromatográfico	Compuesto	Rendimiento (%)
101-131	c. c.	<u>28</u>	0.0060
224-286	ccd	<u>29</u>	0.0025
224-286	ccd	<u>30</u>	0.002
224-286	ccd	<u>31</u>	0.0012
551-590	ccd	<u>32</u>	0.0075
551-590	ccd	<u>33</u>	0.005
551-590	ccd	<u>34</u>	0.0044

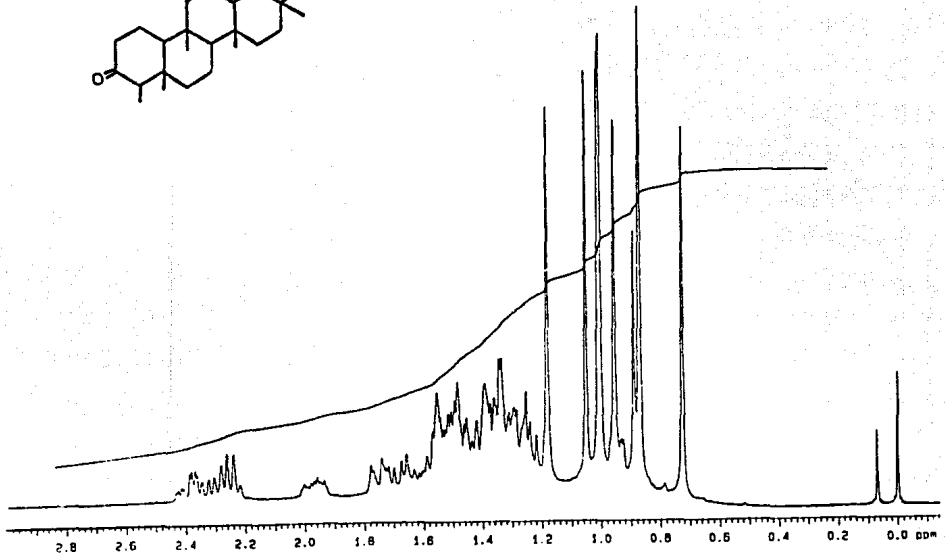
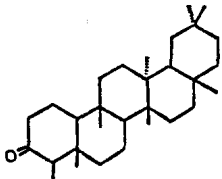
Cuadro 10. Constantes físicas y espectroscópicas de 28.



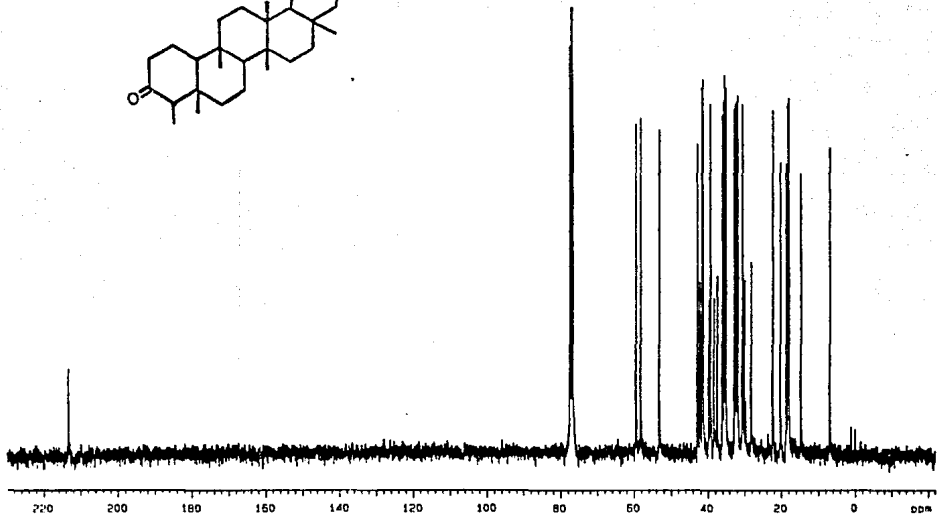
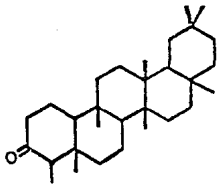
Fórmula molecular	$C_{30}H_{50}O$
PF.	243-246°C
IR (KBr) cm^{-1} (Espectro 23)	2940, 2880, 1720, 1460, 1390
RMN ¹ H ppm CDCl ₃ (Espectros 24)	0.72 (s, 3H), 0.86 (d, 3H, H-23), 0.87 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.99 (s, 6H), 1.04 (s, 3H), 1.17 (s, 3H), 2.19 (m, 3H)
RMN ¹³ C ppm CDCl ₃ (Espectros 25, 26)	213.1 (s, C-3), 59.46 (d, C-10), 58.21 (s, C-4), 53.1 (d, C-8), 42.7 (d, C-18), 42.15 (s, C-5), 41.53 (t, C-2), 41.29 (t, C-6), 39.7 (s, C-14), 39.26 (t, C-22), 38.3 (s, C-13), 37.4 (s, C-9), 36.01 (t, C-16), 35.63 (t, C-11), 35.34 (t, C-19), 35.04 (q, C-30), 32.78 (t, C-21), 32.42 (t, C-12), 32.1 (q, C-28), 31.7 (q, C-29), 30.52 (t, C-15), 30.0 (s, C-17), 28.18 (s, C-20), 22.3 (t, C-1), 20.2 (q, C-27), 18.69 (q, C-26), 18.26 (t, C-7), 17.96 (q, C-25), 14.67 (q, C-24), 6.86 (q, C-23)



Espectro 23

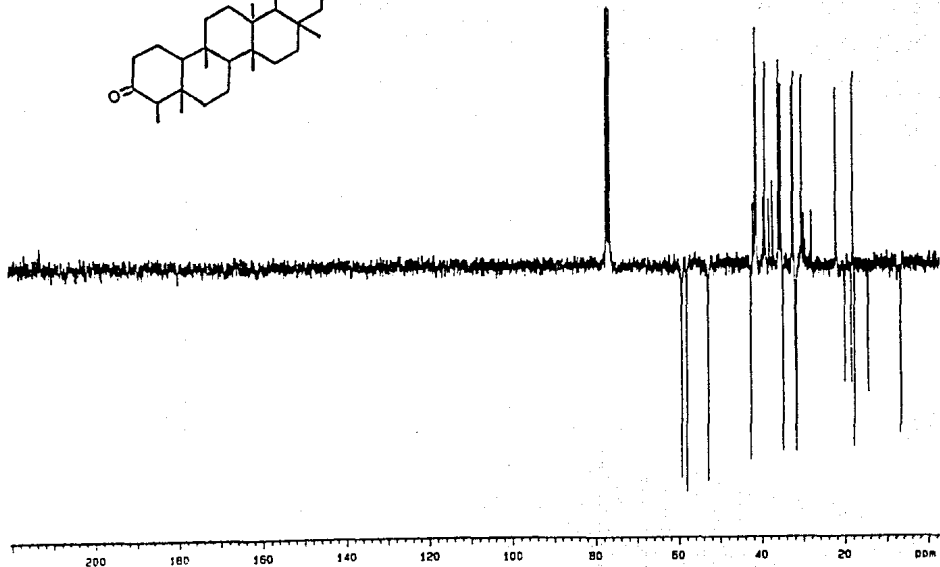
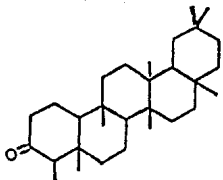


Espectro 24



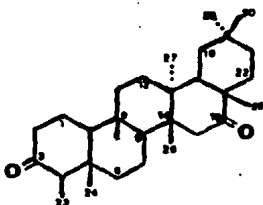
Espectro 25

76

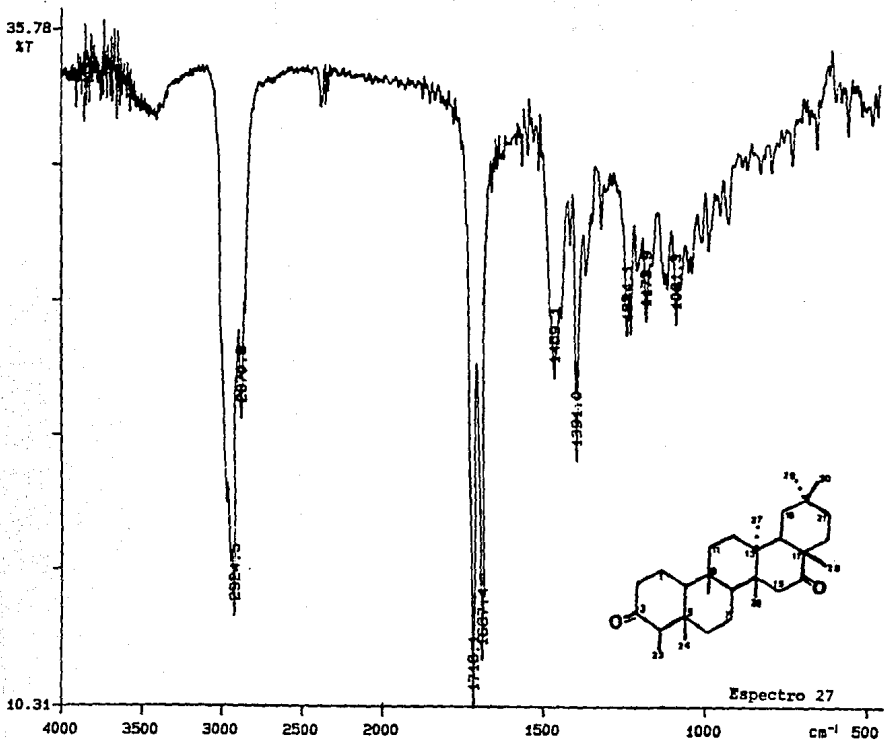


Espectro 26

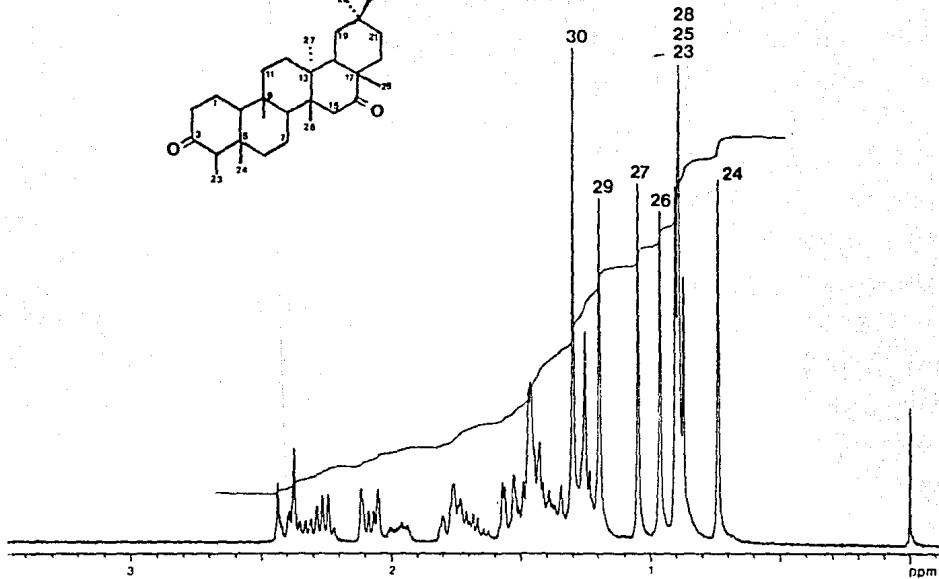
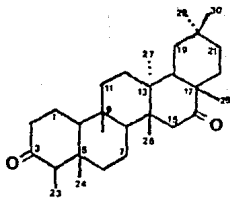
Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas de 20.



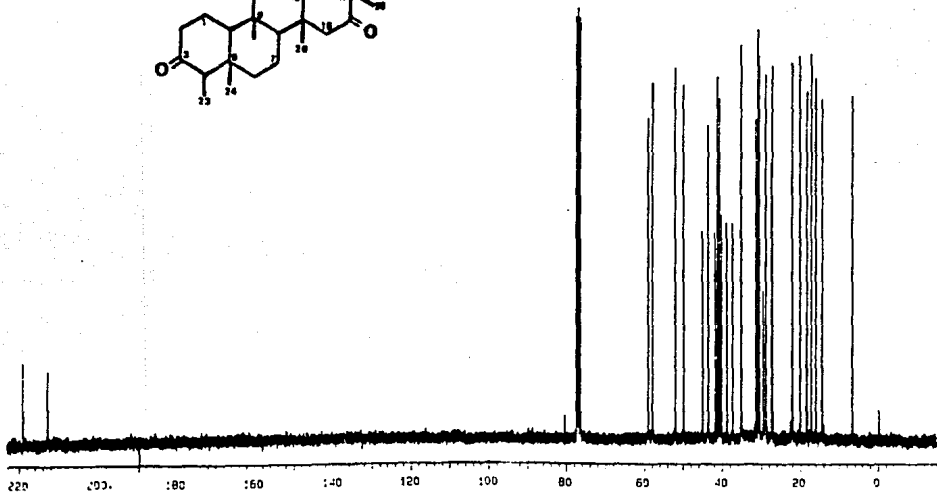
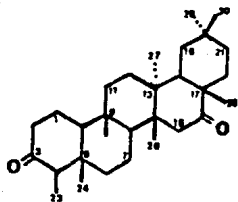
Fórmula molecular	$C_{30}H_{48}O_2$
PF.	>280°C
IR ^{KBr} _{max} cm ⁻¹	2920, 2860, 1700, 1680, 1440, 1380, 1210,
(Espectro 27)	1170, 1100, 970
[α] _D	-21.7 (CHCl ₃)
RMN ¹ H ppm (CDCl ₃)	0.73 (s, C-24), 0.88 (d, H-23), 0.89 (s, H-25), 0.90 (s, H-28), 0.96 (s, H-26),
(Espectro 28)	1.04 (s, H-27), 1.19 (s, H-29), 1.29 (s, H-30), 1.4-2.5 (m)
RMN ¹³ C ppm (CDCl ₃)	219.1 (s, C-16), 212.8 (s, C-3), 59.1 (d, C-10), 58.01 (d, C-4), 52.2 (d, C-8),
(Espectros 29, 30)	50.06 (t, C-15), 45.1 (s, C-17), 43.7 (d, C-18), 42.0 (s, C-5), 41.3 (t, C-2), 40.8 (t, C-6), 40.3 (s, C-14), 38.9 (s, C-13), 37.5 (s, C-9), 35.3 (t, C-11), 35.2 (q, C-30), 35.17 (t, C-19), 31.46 (t, C-21), 30.97 (t, C-22), 30.53 (t, C-12), 28.95 (q, C-29), 27.49 (s, C-20), 27.26 (q, C-28), 22.13 (t, C-1), 20.17 (q, C-25), 18.49 (t, C-7), 17.26 (q, C-25), 16.11 (q, C-27), 14.5 (q, C-24), 6.74 (q, C-23)
EMIE m/z (%) (Espectro 32)	440 [M ⁺ , (20)], 425 [M-15 (31)], 355 (17), 273 (6), 124 (29), 81 (62), 55 (100), 41 (64).



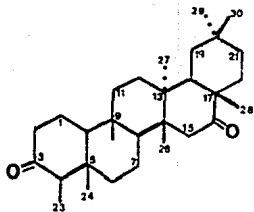
ESTA TESIS
 SALIÓ DE LA
 BIBLIOTECA
 NO DEBE



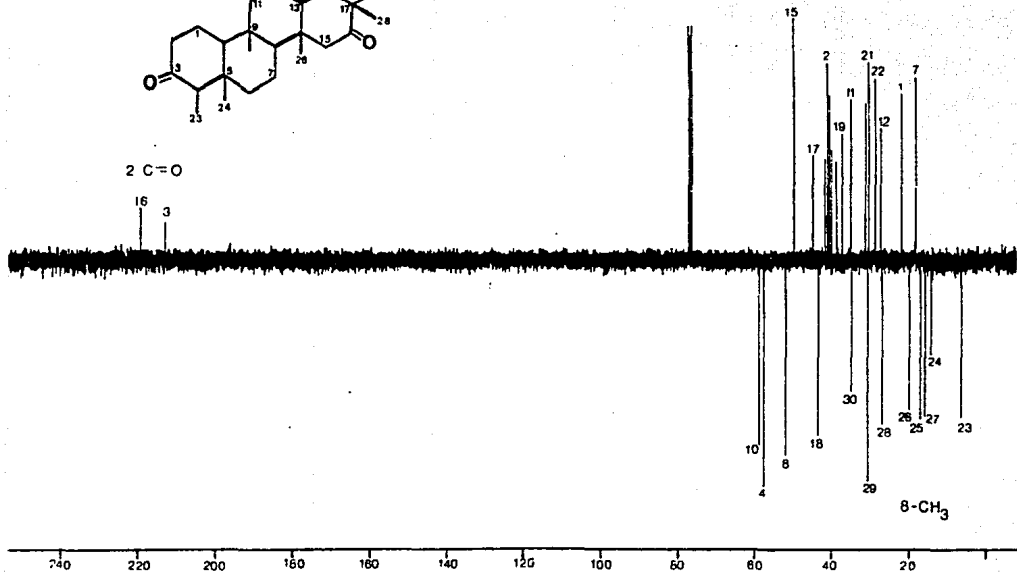
Espectro 28



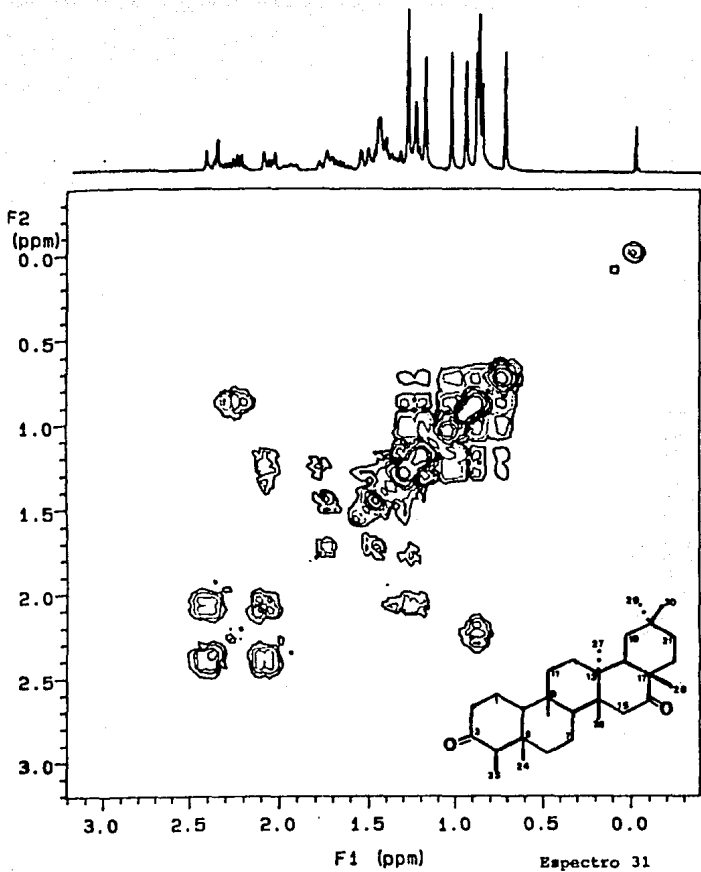
Espectro 29

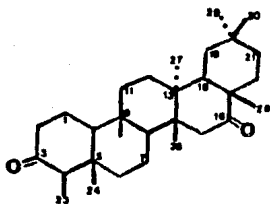
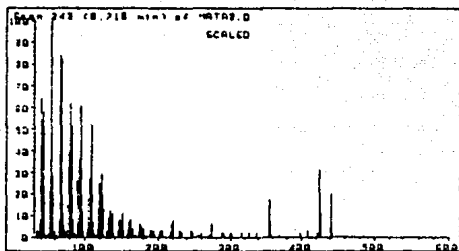


2 C=O



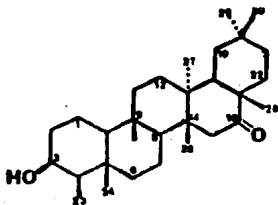
Espectro 30



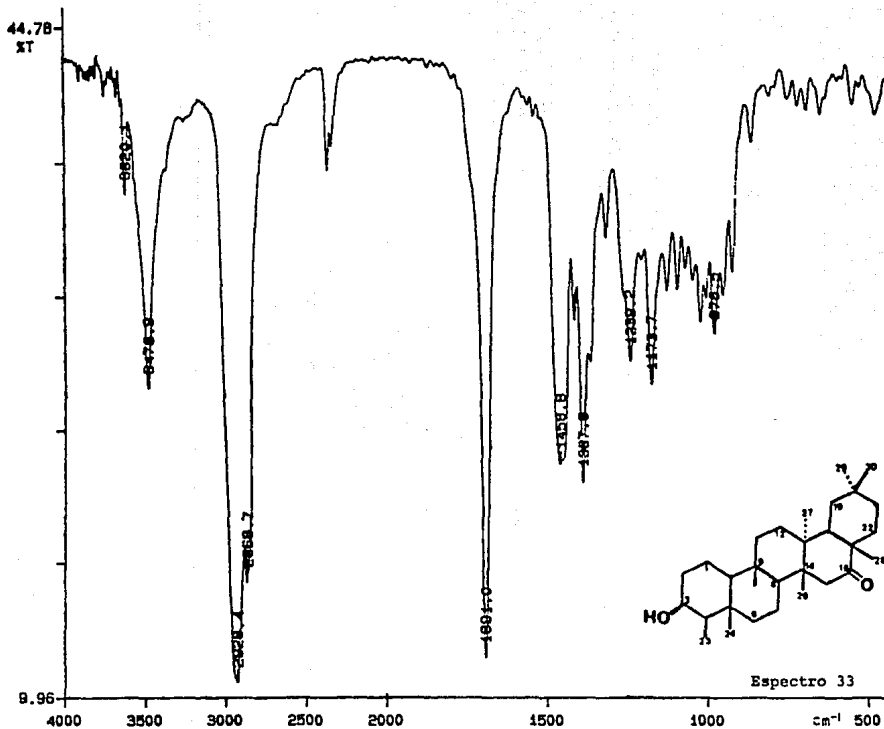


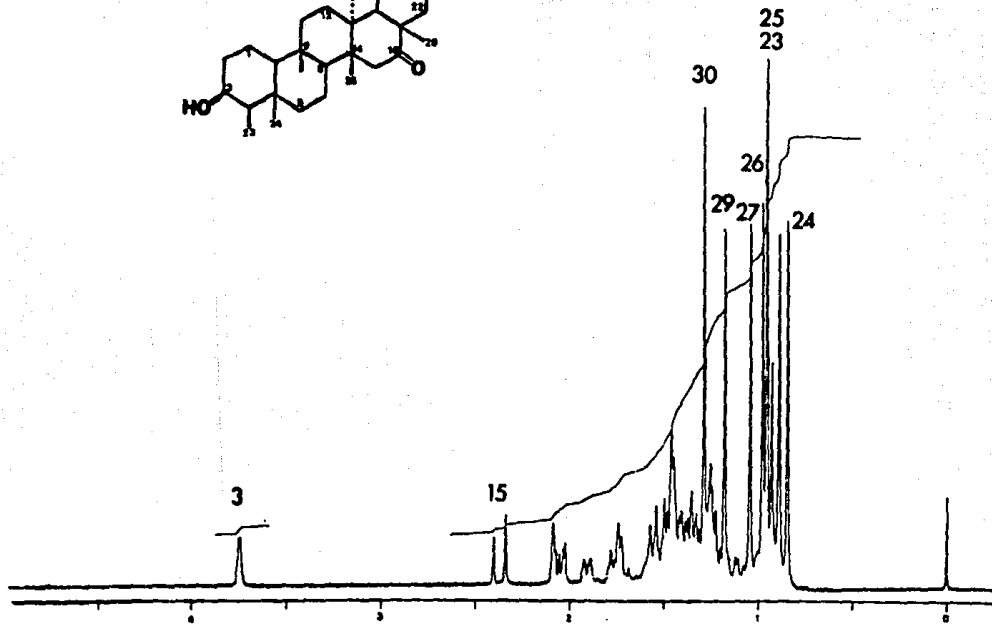
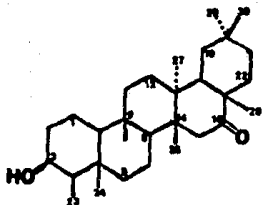
Espectro 32

Cuadro 12. Constantes físicas y espectroscópicas de 30.

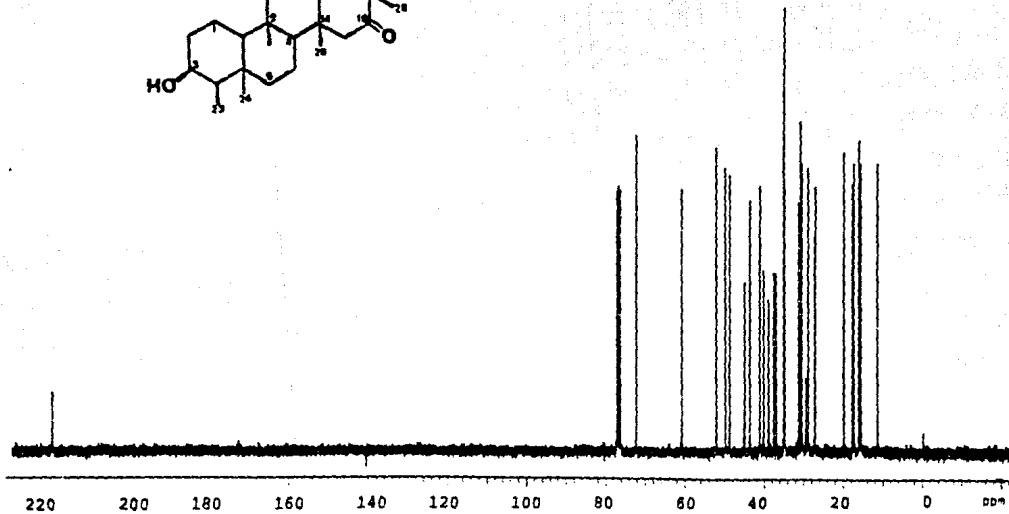
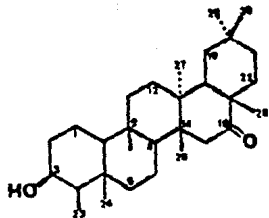


Fórmula molecular	$C_{30}H_{50}O_2$
PF.	112-115°C
IR _{max} ^{KBr} cm^{-1}	3460, 2920, 2860, 1660, 1440, 1380, 1230,
(Espectro 39)	1190
$[\alpha]_D$	+10.9 (CHCl ₃)
RMN ¹ H ppm (CDCl ₃)	0.84 (s, H-24), 0.88 (s, H-25), 0.92 (s, H-28), 0.96 (d, H-23), 1.04 (s, H-26),
(Espectros 34)	1.17 (s, H-27), 1.25 (s, H-29), 1.28 (s, H-30), 1.3-2.4 (m), 3.74 (m, H-3).
RMN ¹³ C ppm (CDCl ₃)	219.3 (s, C-16), 72.5 (d, C-3), 61.0 (d, C-4), 52.3 (d, C-8), 50.07 (t, C-15),
(Espectros 35, 36)	49.03 (d, C-10), 45.2 (s, C-17), 43.8 (d, C-18), 41.3 (s, C-5), 40.3 (t, C-2), 39.1 (t, C-6), 37.8 (s, C-14), 37.2 (s, C-13), 35.3 (s, C-9), 35.2 (t, C-11), 35.08 (q, C-30), 31.5 (t, C-19), 31.04 (t, C-21), 30.7 (s, C-22), 29.6 (t, C-12), 29.14 (q, C-29), 27.5 (s, C-20), 27.3 (q, C-28), 20.1 (q, C-26), 17.89 (t, C-7), 17.6 (t, C-1), 16.3 (q, C-25), 16.1 (q, C-27), 15.8 (q, C-24), 11.6 (q, C-23)
EMIE m/z (Espectro 38)	440 [M ⁺ (20)], 425 [M-15 (31)], 355 (17), 273 (6), 124 (29), 81 (64), 55 (100), 39 (83).

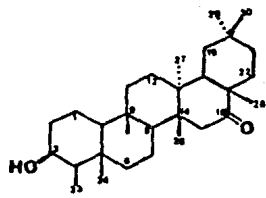
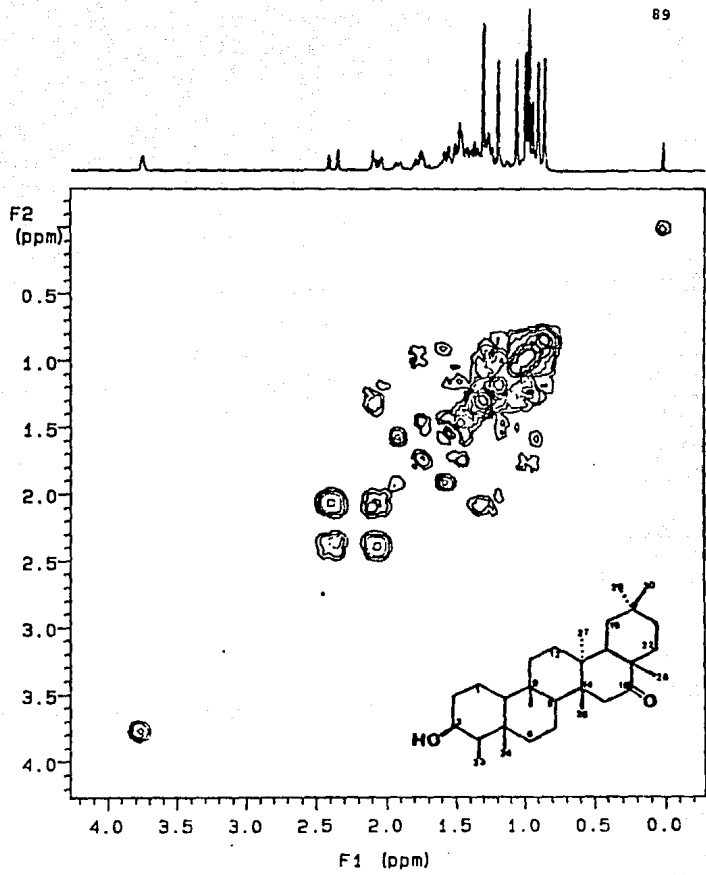


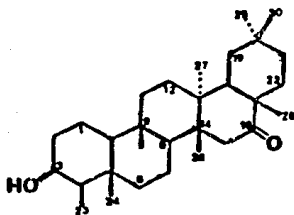
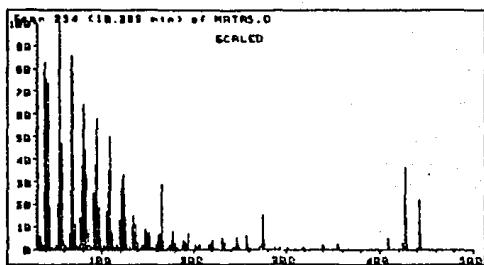


Espectro 34



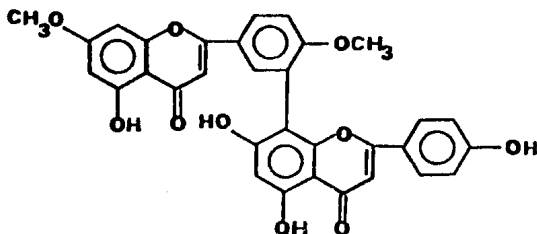
Espectro 35





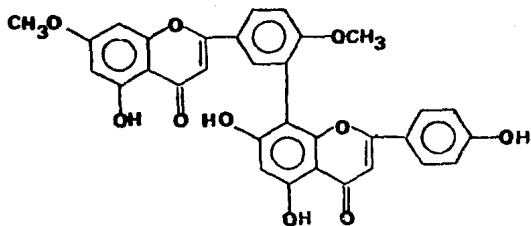
Espectro 38

Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de 32.



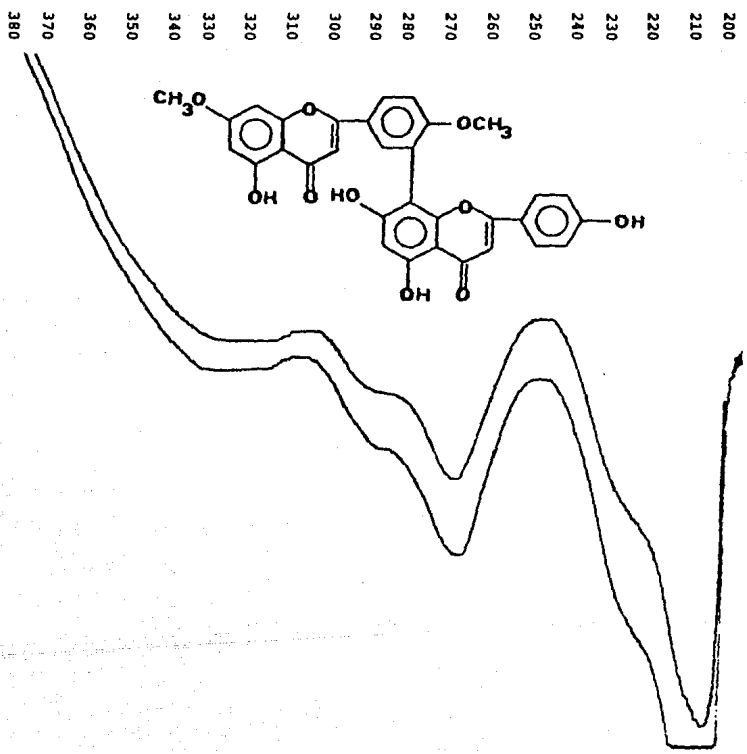
Fórmula molecular	$C_{32}H_{22}O_{10}$
PF.	198-200°
$[\alpha]_D$	+31.0 (CHCl ₃)
UV (MeOH) nm (Espectro 39)	271
IR (KBr) cm ⁻¹ (Espectro 41)	3200, 1680, 1610, 1580, 1480, 1420, 1340, 1280, 1220, 1140, 800
RMN ¹ H ppm (CDCl ₃) (Espectros 41, 42)	3.75 (s, 3H, OCH ₃), 3.82 (s, 3H, OCH ₃), 6.34 (d, H-6, I), 6.42 (s, H-6, II), 6.75 (d, H-8, I), 6.89 (s, H-3, I), 6.91 (s, H-3, II), 6.92 (d, H-3',5', II), 7.16 (d, H-5', I), 7.67 (d, H-2',6', II), 8.03 (s, H-6', I), 8.06 (s, H-2', I), 10.3 (m, 2H, OH), 12.06 (s, OH-5, I), 13.07 (s, OH-5, II)

Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de 32.
(Continuación).

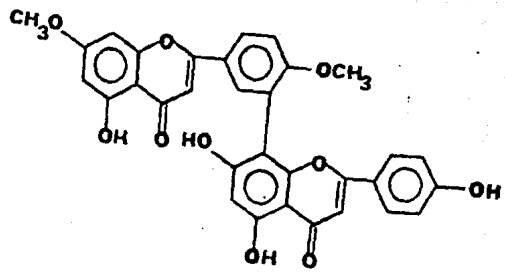
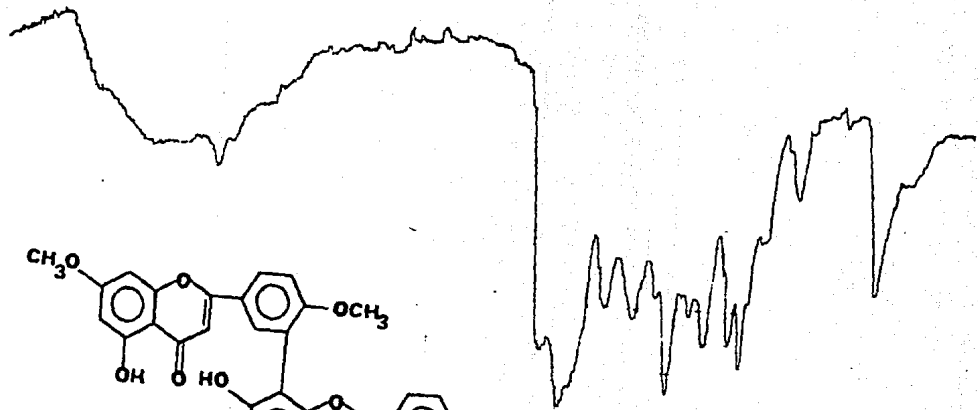


RMN¹³C ppm
(CDCl₃)
(Espectros 43)

182.04 (s, C-4, II), 181.83 (s, C-4, I),
165.01 (s, C-2, I), 163.96 (s, C-7, I),
163.09 (s, C-2, II), 162.12 (s, C-7, II),
161.03 (s, C-5, I), 161.03 (s, C-4', II),
160.48 (s, C-5, II), 159.66 (s, C-4', I),
157.21 (s, C-9, I), 154.46 (s, C-9, II),
131.34 (d, C-5', II), 127.9 (d, C-2', I),
127.9 (d, C-2', I), 127.9 (d, C-6', II),
122.89 (s, C-3', I), 120.78 (s, C-1', I),
119.99 (s, C-1', II), 116.17 (s, C-5', I),
114.43 (d, C-8', I), 114.43 (d, C-3', II),
103.6 (s, C-8, II), 103.19 (s, C-10, I),
103.19 (s, C-10, II), 103.09 (d, C-3, I),
103.09 (d, C-3, II), 98.67 (d, C-6, I),
98.01 (d, C-8, II), 92.61 (d, C-8, I),
56.01 (s, 3H, OCH₃), 55.49 (s, 3H, OCH₃).



Espectro 39



4000

2500

2000

1800

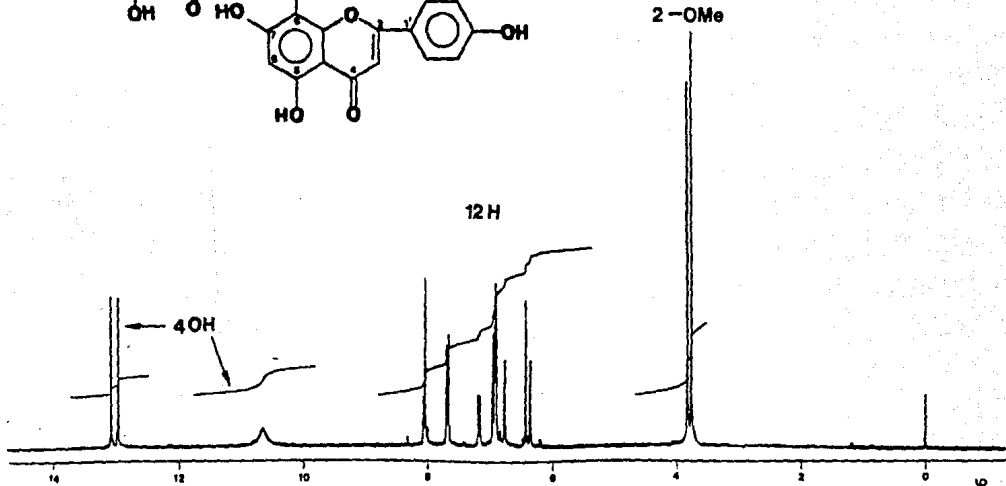
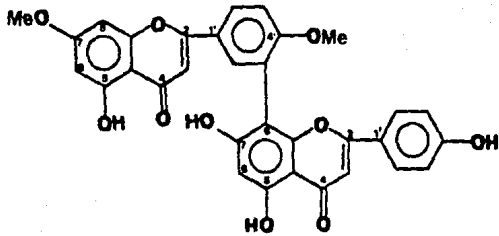
1600

1400

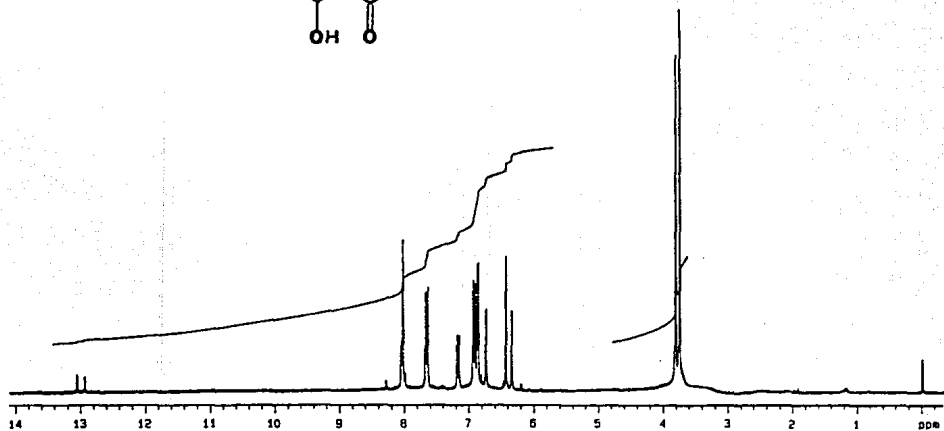
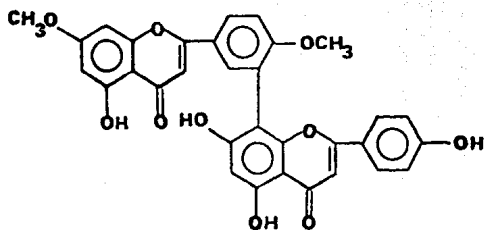
800

600

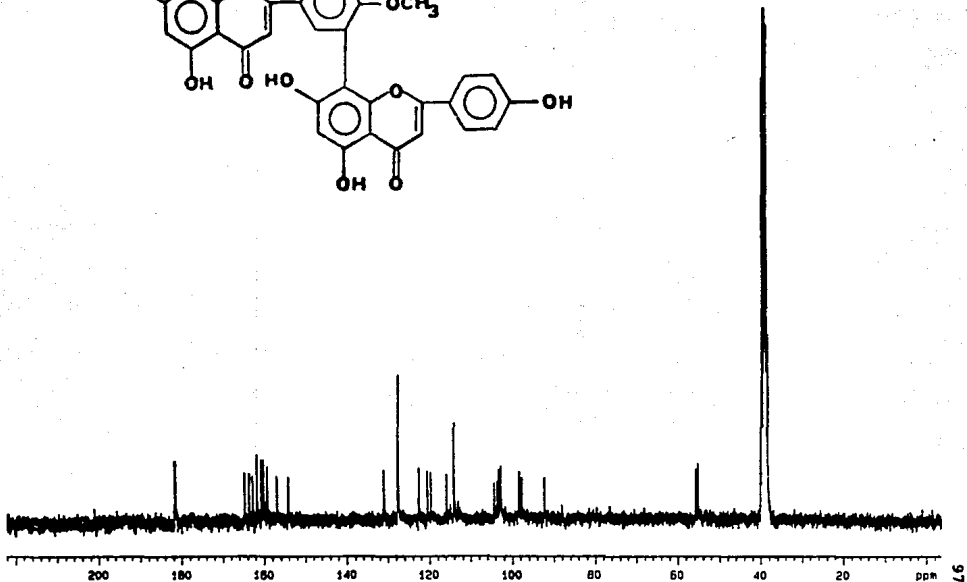
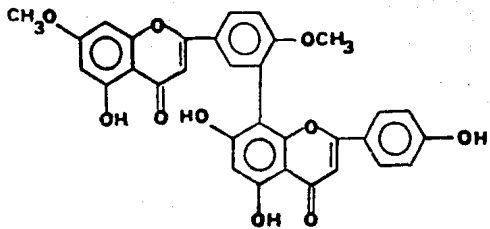
Espectro 40



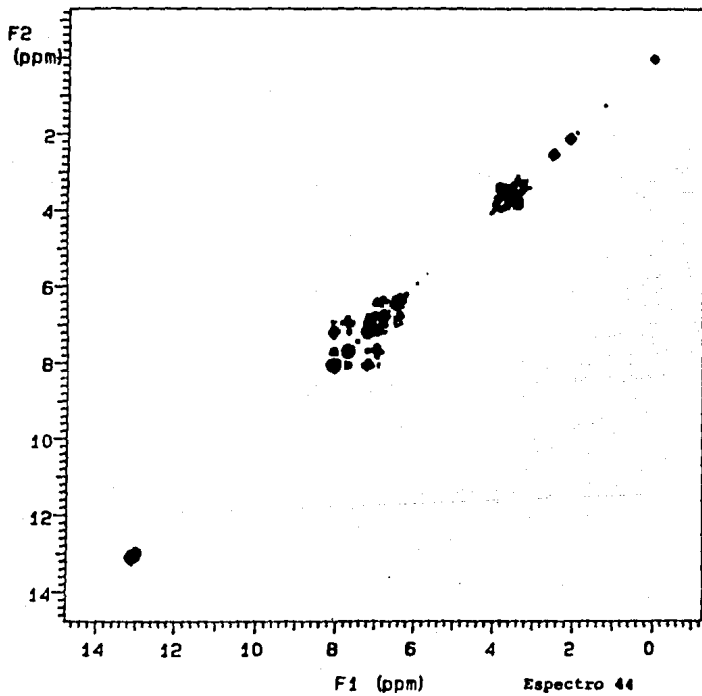
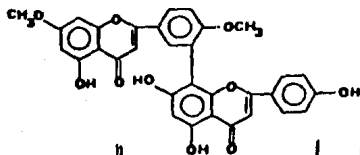
Espectro 41



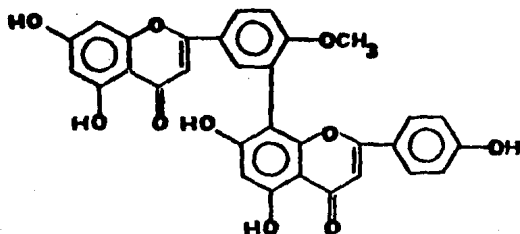
Espectro 42



Espectro 43



Cuadro 14. Constantes físicas y espectroscópicas de 33.



Fórmula molecular

 $C_{31}H_{20}O_{10}$

PF.

213-215°C

 $[\alpha]_D$

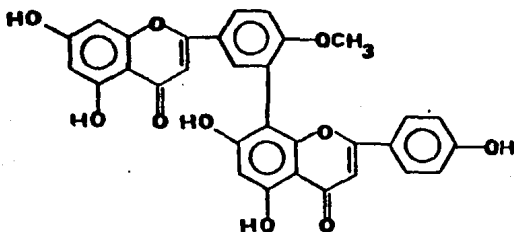
-3.0) (acetona)

UV (MeOH) nm
(Espectro 45)

271

IR (KBr) cm^{-1}
(Espectro 46)3150, 1640, 1600, 1490, 1420, 1350, 1270,
1220, 1150, 1020, 820RMN¹Hppm
(CDCl₃)
(Espectros 47, 48)3.76 (s, OCH₃, 4'-I), 6.2 (d, H-6, I),
6.43 (s, H-6, II), 6.46 (d, H-8, I), 6.84
(s, H-3, I), 6.89 (s, H-3, II), 6.93 (d,
H-3',5', II), 7.17 (d, H-5', I), 7.68 (d,
H-2',6', II), 8.01 (s, H-6', I), 8.03 (s,
H-2', I), 10.35 (m, 3H, OH), 12.99 (s,
H-5, I), 13.09 (s, H-5, II).

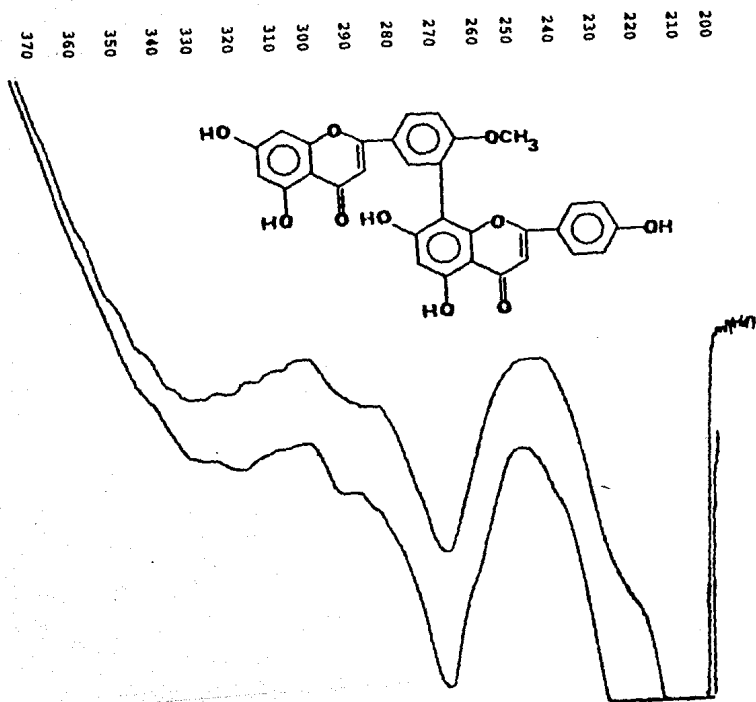
Cuadro 14. Constantes físicas y espectroscópicas de 23.
(Continuación).



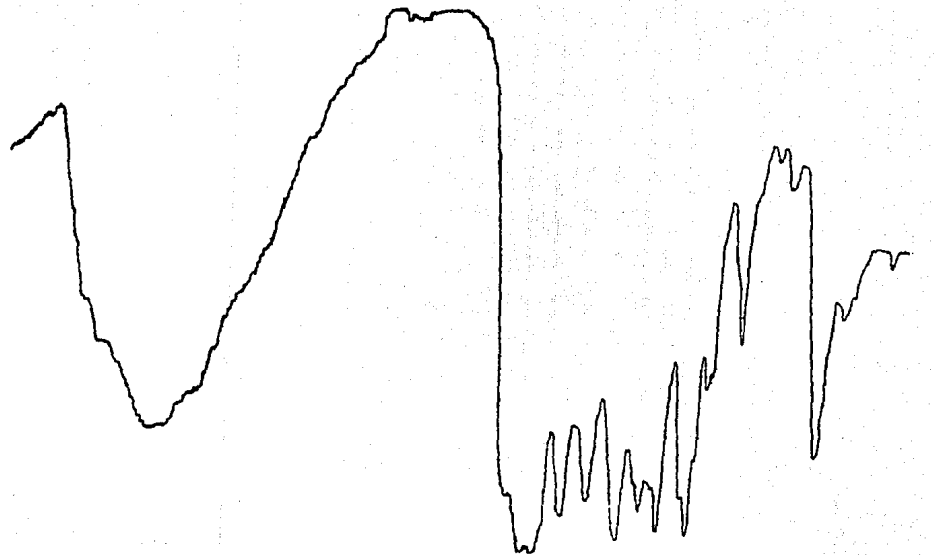
RMN¹³C ppm
(CDCl₃)

(Espectros 49, 50)

182.04 (s, C-4, II), 181.64 (s, C-4, I),
164 (s, C-2, I), 163.69 (s, C-2, II),
163.1 (s, C-7, I), 162.08 (s, C-7), II),
161.93 (s, C-5, I), 161.35 (s, C-4', II),
160.45 (s, C-5, II), 159.45 (s, C-4', I),
157.27 (s, C-9, I), 154.43 (s, C-9, II),
131.29 (d, C-6', I), 127.87 (d, C-2', I,
II), 127.74 (d, C-6', II), 122.88 (s,
C-3', I), 120.91 (s, C-1', I), 119.89 (s,
C-1', II), 116.09 (d, C-5', I), 116.09
(d, C-3', II), 114.37 (d, C-5', II),
103.91 (s, C-8, I), 103.82 (s, C-10, II),
103.60 (s, C-10, I), 103.13 (d, C-3, I),
102.92 (d, C-3, II), 98.73 (d, C-6, I),
98.61 (d, C-6, II), 93.93 (d, C-8, I),
55.4 (q, OCH₃).



Espectro 45



4000

2500

2000

1800

1600

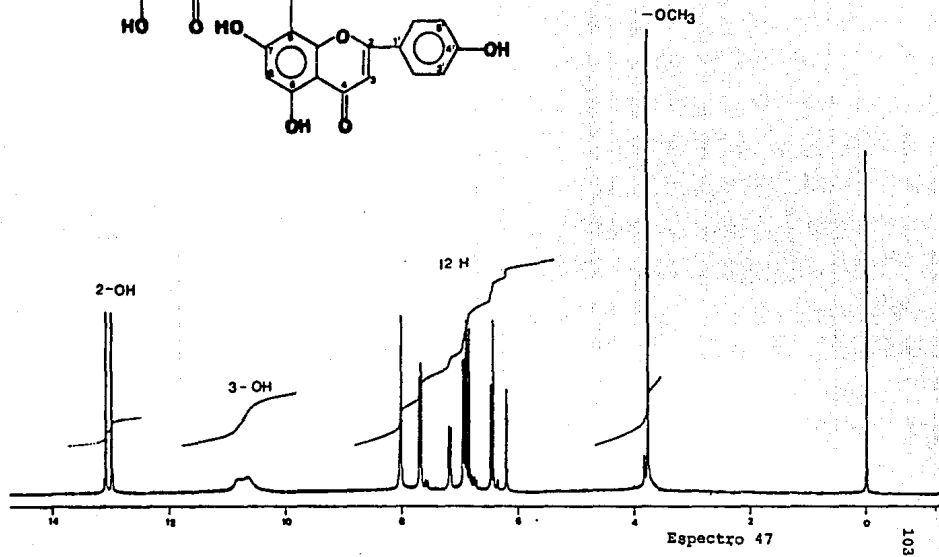
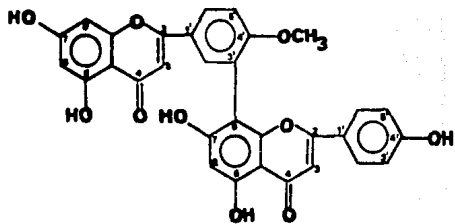
1400

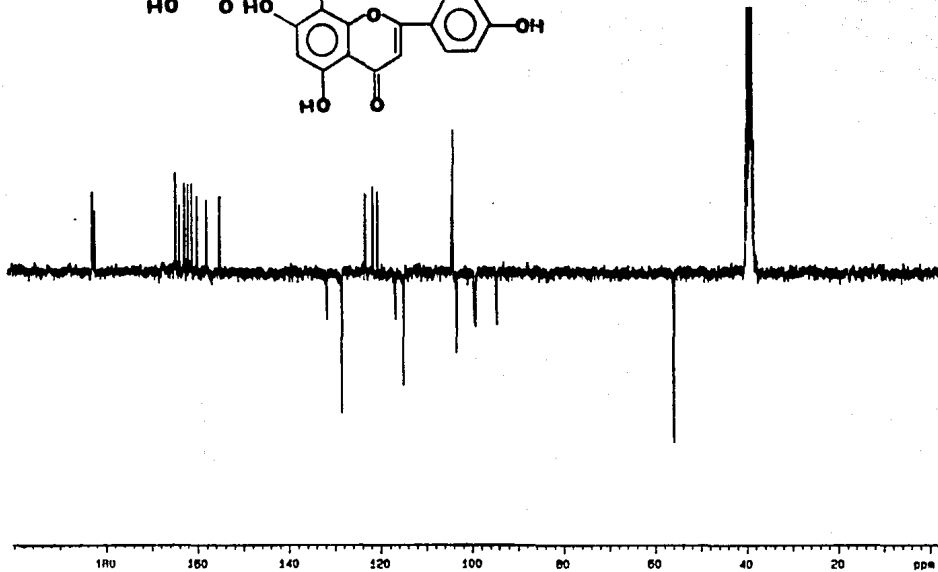
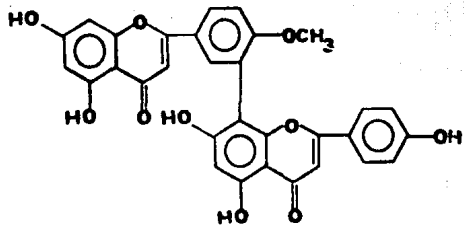
Espectro 46

800

600

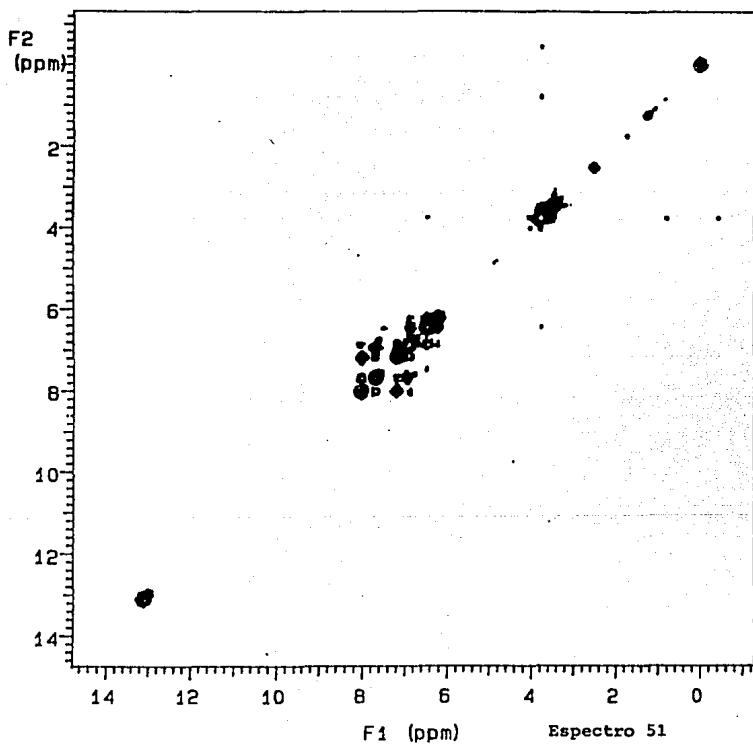
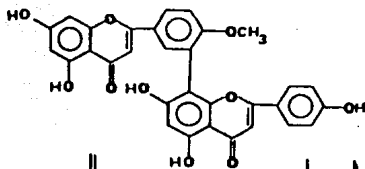
102



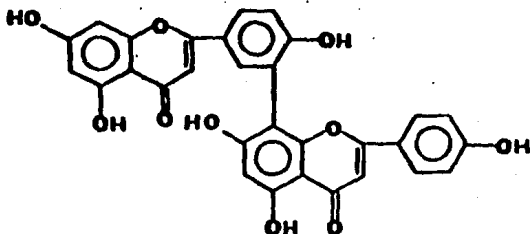


Espectro 50

106



Cuadro 15. Constantes físicas y espectroscópicas de 34.



Fórmula molecular

 $C_{30}H_{18}O_{10}$

PF.

223-224°C

 $[\alpha]_D$

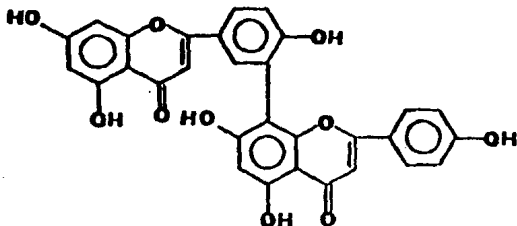
+11.0 (MeOH)

UV (MeOH) nm
(Espectro 52)

271

IR (KBr) cm^{-1}
(Espectro 53)3200, 1660, 1620, 1560, 1480, 1420, 1340,
1270, 1220, 1140, 800RMN'H ppm
($CDCl_3$)
(Espectros 54, 55)6.20 (d, H-6, I), 6.39 (s, H-6, II),
6.47 (d, H-8, I), 6.72 (d, H-3',5', II),
6.8 (s, H-3, I), 6.85 (s, H-3, II), 7.14
d, H-5', I), 7.6 (d, H-2',6', II), 8.02
d, H-6', I), 8.05 (d, H-2', I), 10.6
cm, 4H, OH), 13.0 (s, OH-5, I), 13.1 (s,
OH-5, II)

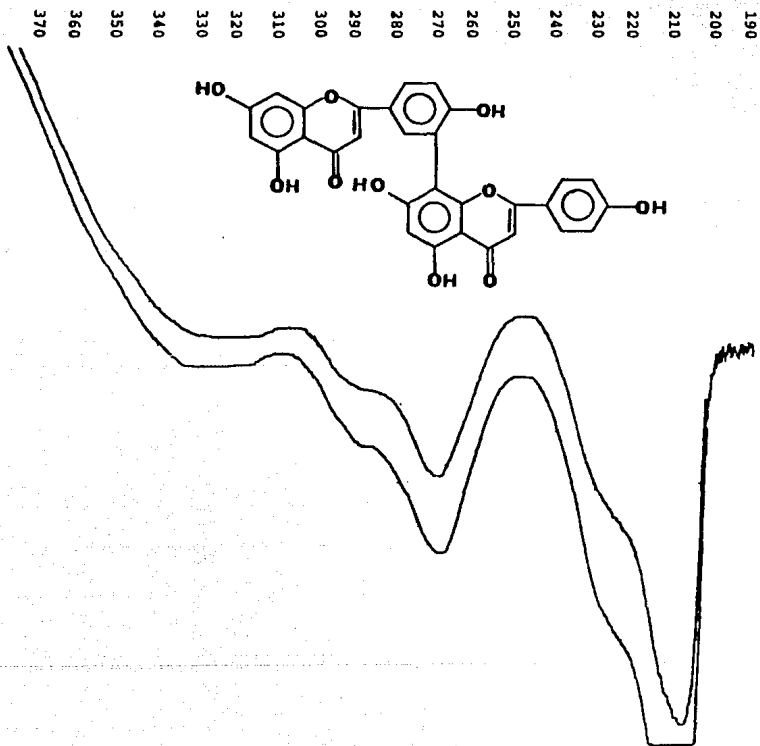
Cuadro 15. Constantes físicas y espectroscópicas de 34.
(Continuación).



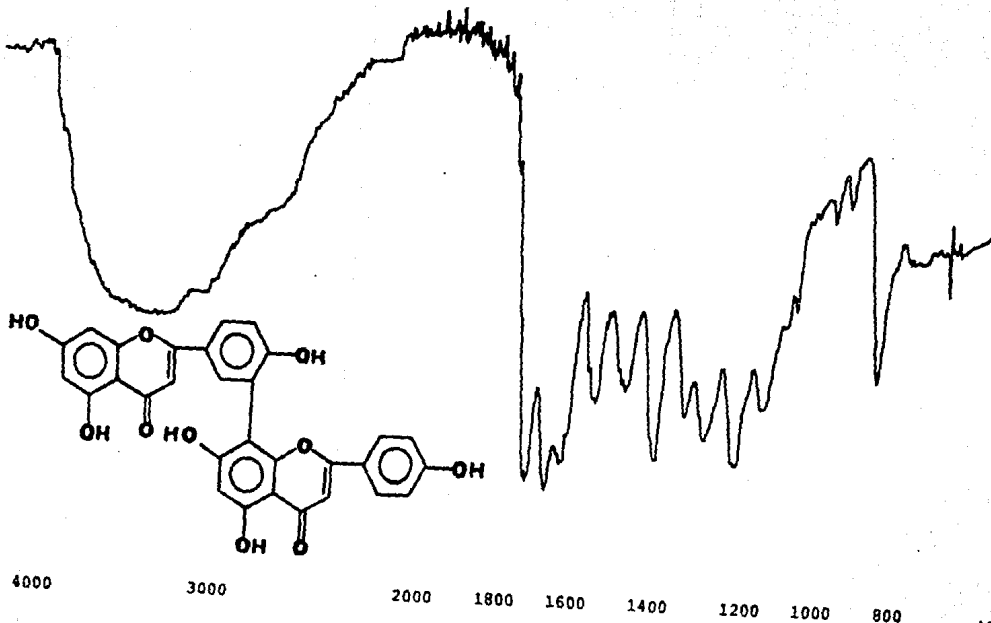
RMN^{13}C ppm
(CDCl_3)

(Espectros 56, 57)

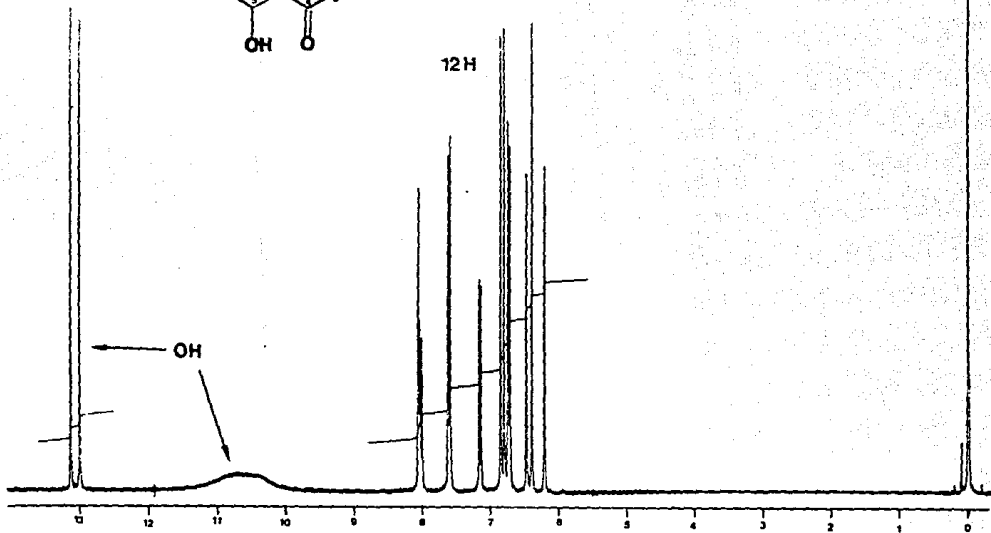
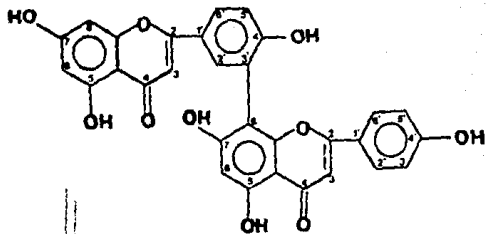
182.01 (s, C-4, II),	181.6 (s, C-4, I),
164.06 (s, C-2, I),	163.8 (s, C-7, I),
163.55 (s, C-2, II),	162.6 (s, C-7, II),
161.3 (s, C-5, I),	160.9 (s, C-4', II),
160.4 (s, C-5, II),	159.9 (s, C-4', I),
157.3 (s, C-9, I),	154.4 (s, C-9, II),
131.3 (d, C-6', I),	128.1 (d, C-6', II),
127.6 (d, C-2', I, II),	121.4 (s, C-3', I),
120.6 (s, C-1', I),	120.2 (s, C-1', II),
118.4 (d, C-3', II),	115.7 (d, C-8' I, II),
104.2 (s, C-8, II),	103.6 (s, C-10, I),
103.4 (s, C-10, II),	102.8 (d, C-3, II),
102.5 (d, C-3, I),	98.8 (d, C-6, II),
98.83 (d, C-6, I),	94.01 (d, C-8, I),



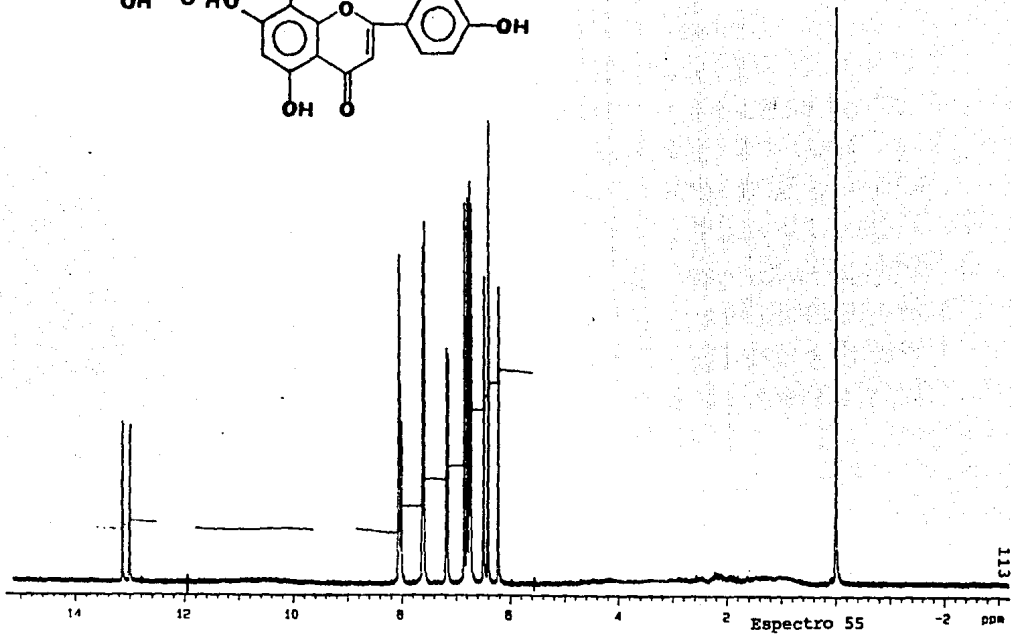
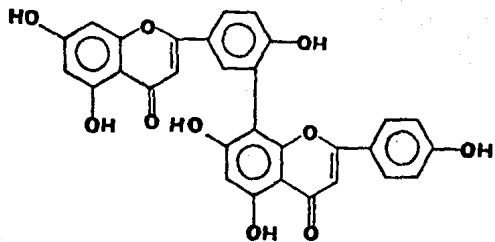
Espectro 52

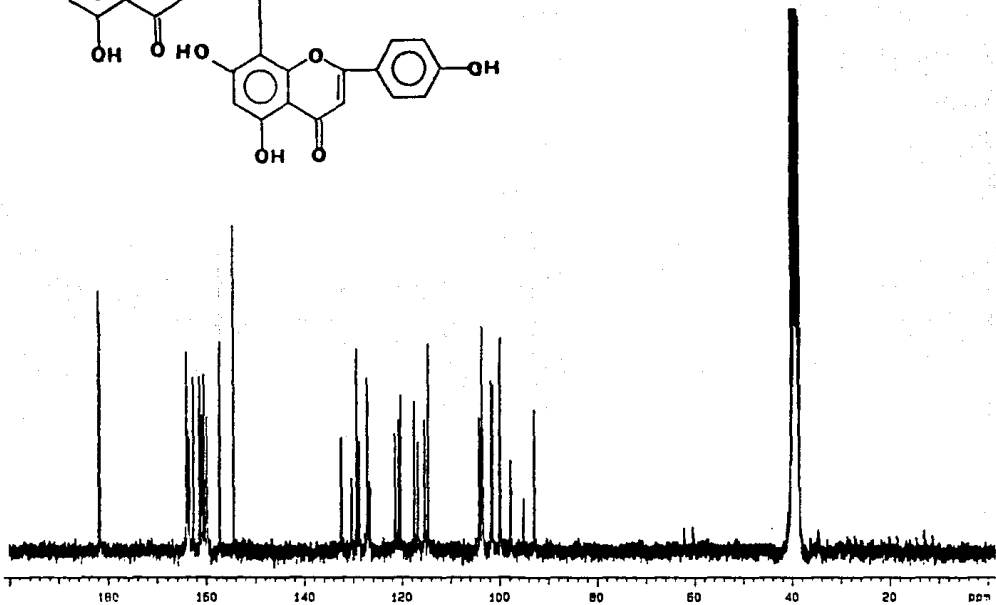
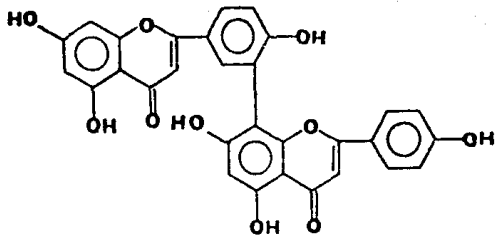


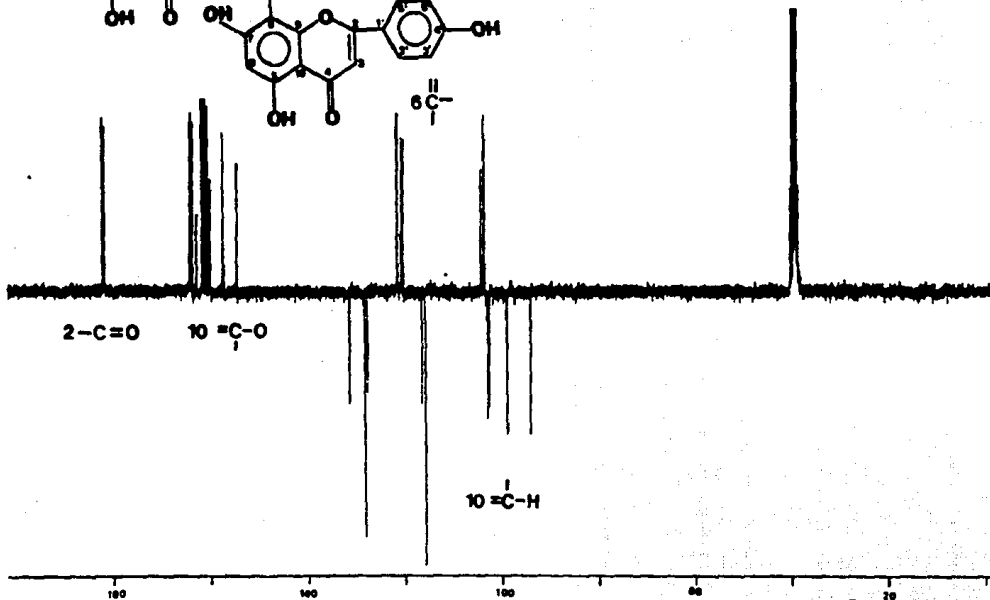
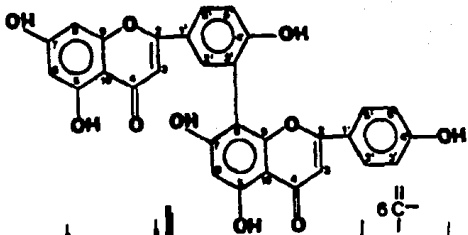
Espectro 53



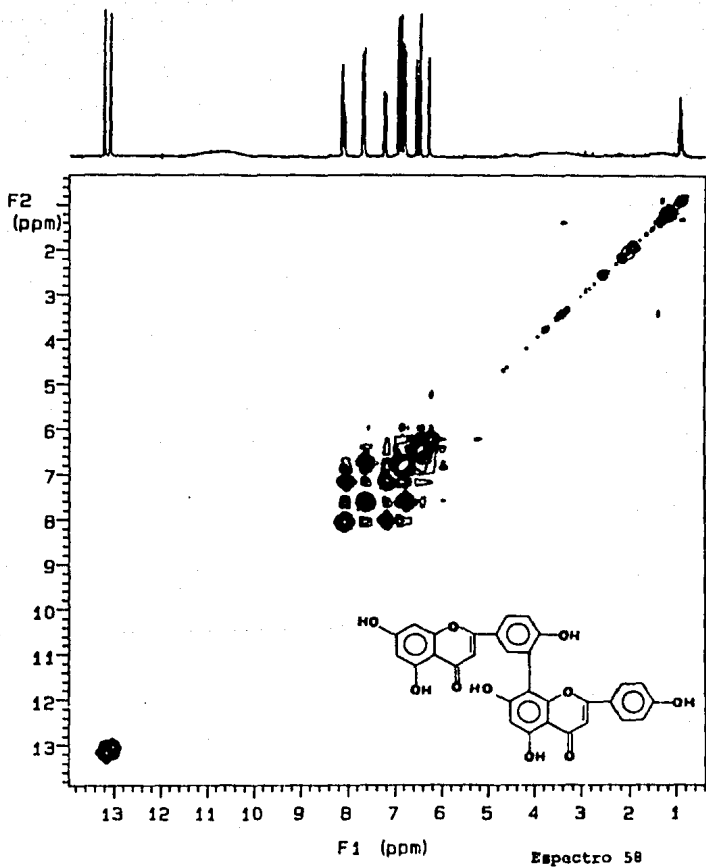
Espectro 54



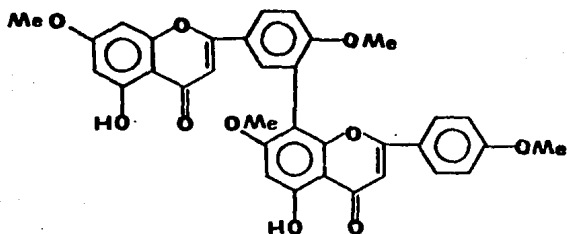




Espectro 57



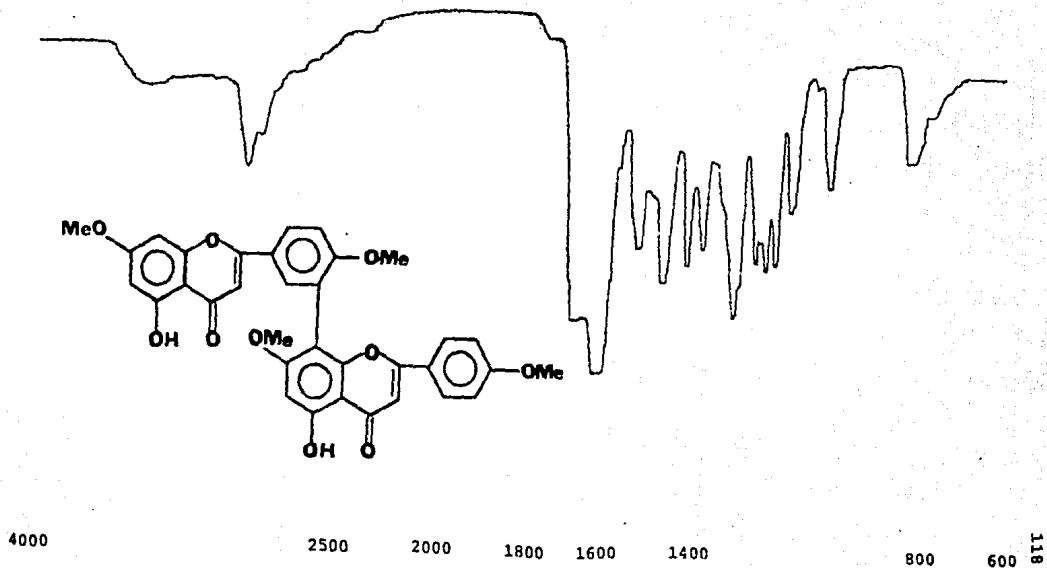
Cuadro 18. Constantes físicas y espectroscópicas de 35.



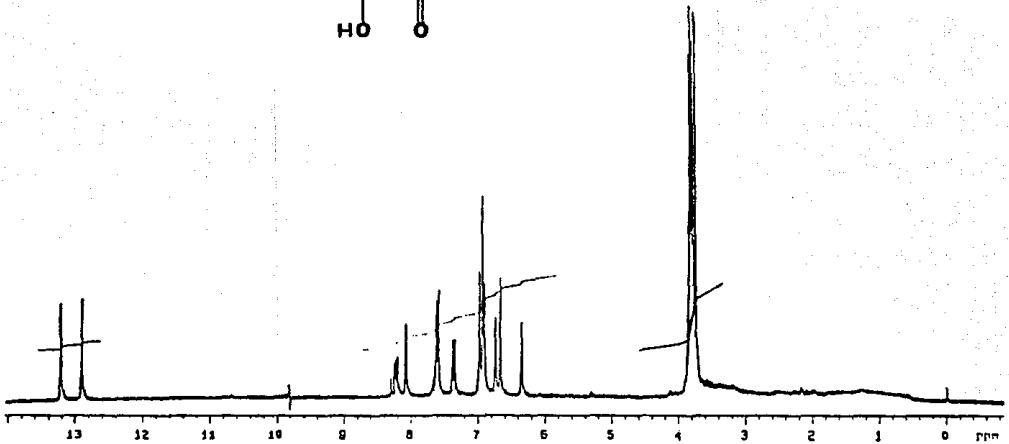
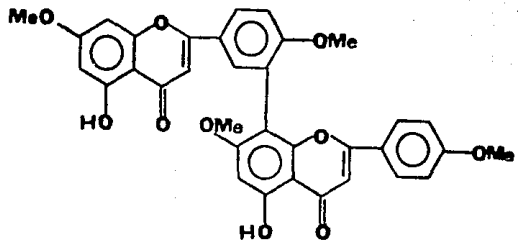
PF:

> 275°C

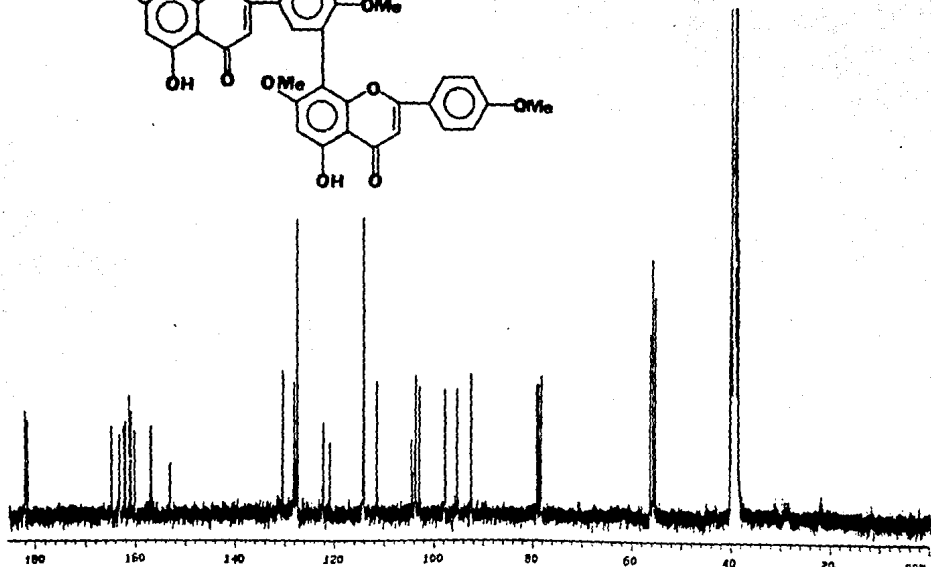
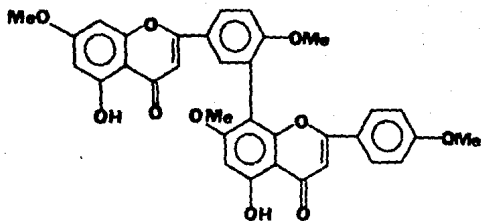
IR (KBr) cm^{-1}
(Espectro 59)3400, 2920, 1660, 1600, 1500, 1430, 1370,
1330, 1250, 1200, 1180, 1160, 1120, 1020RMN¹H ppm
(CDCl_3)
(Espectro 60)3.74 (s, OCH_2), 3.78 (s, OCH_3), 3.81 (s,
 OCH_3), 3.82 (s, OCH_3), 6.3 (d, H-8, I),
6.65 (s, H-8, II), 6.70 (d, H-8, I), 6.9
(d, H-3',5', II), 6.92 (s, H-3, I,II),
7.36 (d, H-5', I), 7.5 (d, H-2',6', II),
8.01 (s, H-6', I), 8.1 (s, H-2', I), 12.8
(s, OH-5, I), 13.1 (s, OH-5, II)RMN¹³C ppm
(CDCl_3)
(Espectro 61)182.18 (s, C-4, II), 181.83 (s, C-4, I),
165.03 (s, C-2, I), 163.42 (s, C-2, II),
163.33 (s, C-7, I), 162.48 (s, C-7, II),
162.18 (s, C-5, I), 161.42 (s, C-4', II),
161.08 (s, C-5, II), 160.33 (s, C-4', I),
157.21 (s, C-9, I), 153.38 (s, C-9, II),
130.67 (d, C-8', I), 128.34 (d, C-2',
I,II), 127.78 (d, C-8', II), 122.62 (s,
C-3', I), 122.43 (s, C-1', I), 121.19 (s,
C-1', II), 114.41 (d, C-5', I), 111.68
(d, C-3', II), 104.72 (d, C-5', II),
104.51 (s, C-8, II), 104.06 (s, C-10,
II), 103.85 (s, C-10, I), 103.12 (d, C-3,
I,II), 97.08 (d, C-6, I), 95.44 (d, C-6,
II), 92.58 (d, C-8, I), 56.41 (q, OCH_3),
55.93 (q, OCH_3), 55.91 (q, OCH_3), 55.42
(q, OCH_3).



Espectro 59

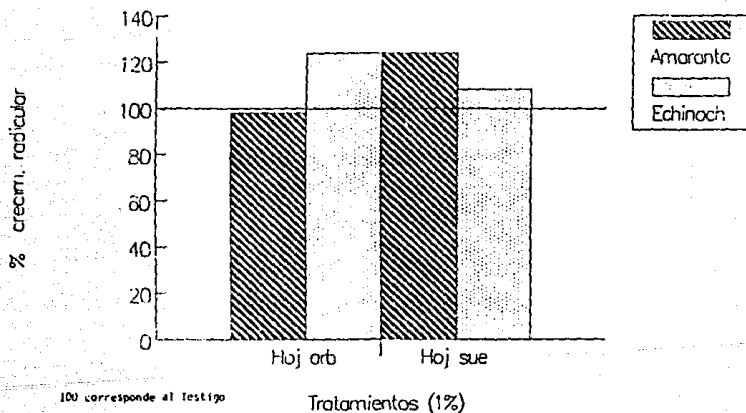


Espectro 60



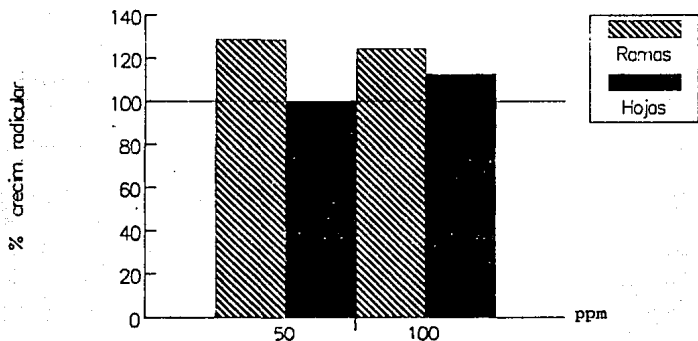
Espectro 61

Lixi acuo de *Celaenodendron* (H. secas) sobre *Amaranto* y *Echinochloa*

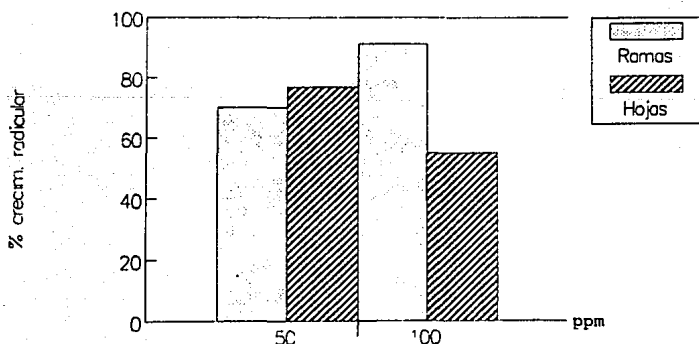


Gráfica 1. Efecto del lixiviado acuoso de *C. mexicana* sobre *Amaranthus* y *Echinochloa*.

Extractos clorof-met de Celaenodendron sobre Echinochloa

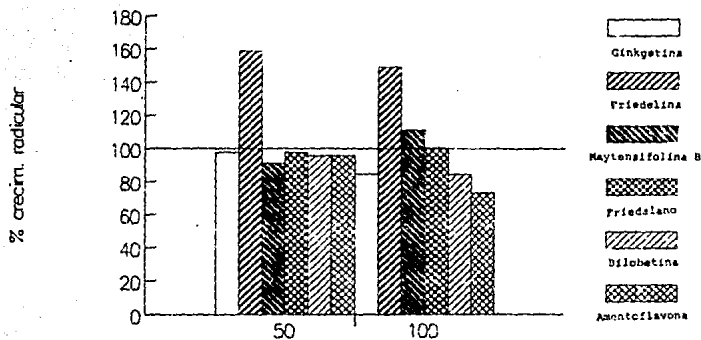


Extractos clorof-met de Celaenodendron sobre Amarantho

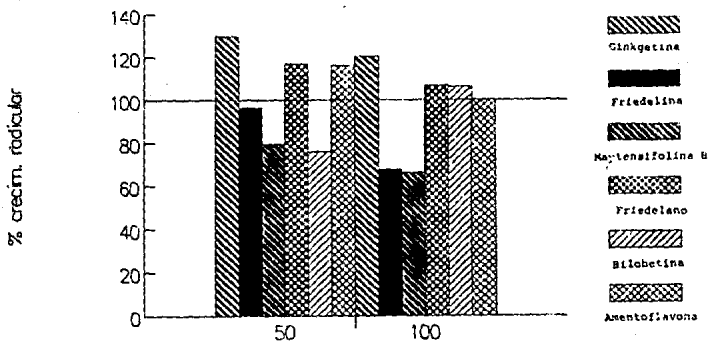


Gráfica 2. Efecto del extracto orgánico de *C. mexicanum* sobre *Amaranthus* y *Echinochloa*.

Compuestos de Celaenodendron sobre Amarantho

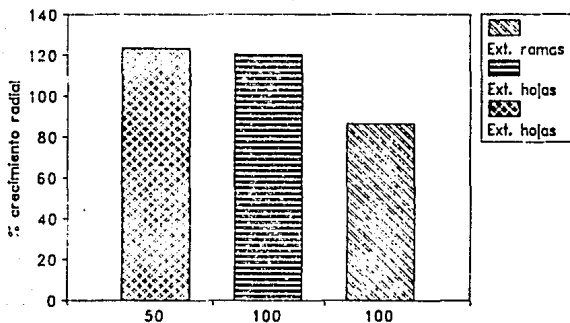


Compuestos de Celaenodendron sobre Echinochloa

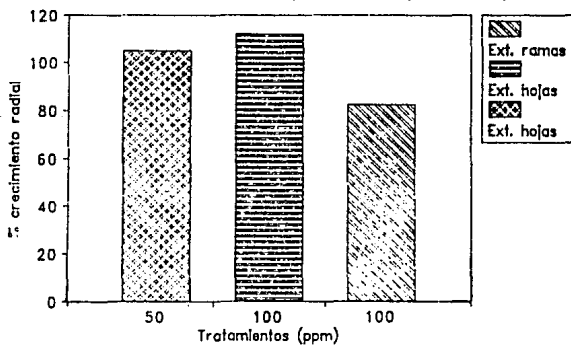


Gráfica 3. Efecto de los compuestos aislados de *C. mexicanum*

Ext. clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Helminthosporium* (3 días)

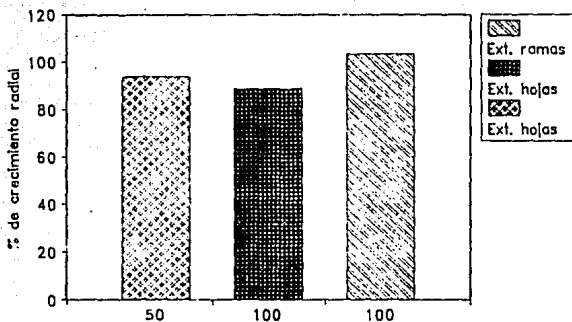


Ext. clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Helminthosporium* (8 días)

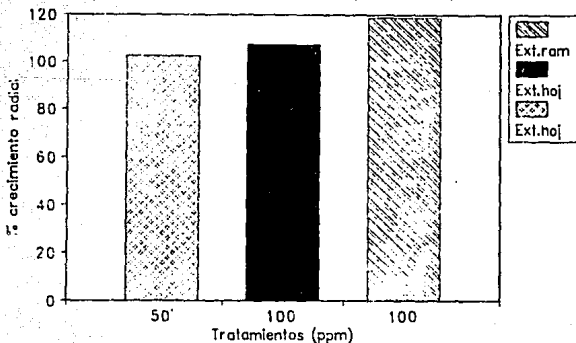


Gráfica 4. Efecto del extracto orgánico de *C. mexicana* sobre *Helminthosporium* (3 y 8 días).

Ext. Clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Alternaria* (8 días)

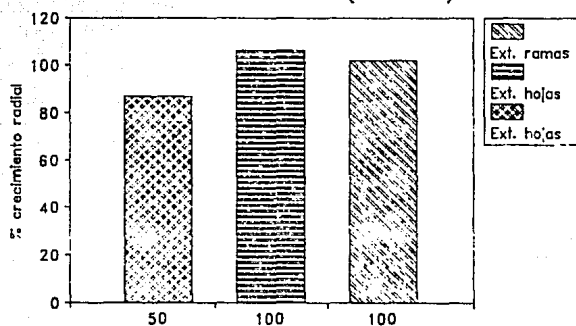


Ext. clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Alternaria* (3 días)

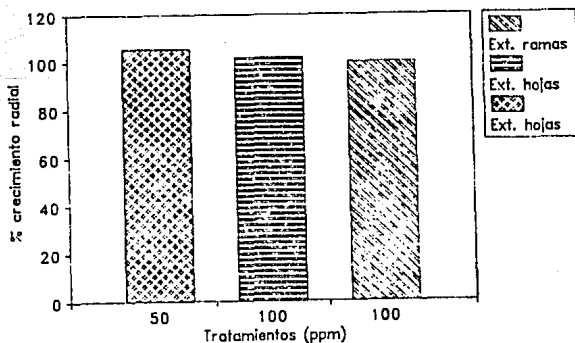


Gráfica 5. Efecto del extracto orgánico de *C. mexicanum* sobre *Alternaria* (8 y 3 días).

Ext. clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Fusarium* (3 días)

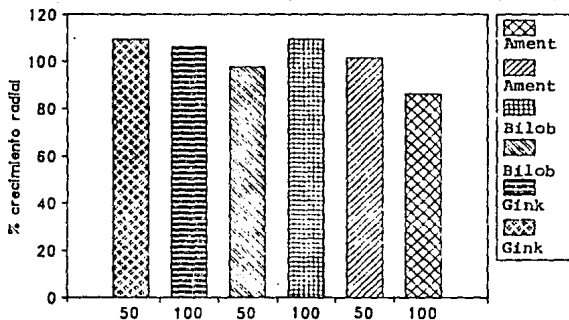


Ext. clor-met de *Celaenodendron*
sobre *Fusarium* (8 días)

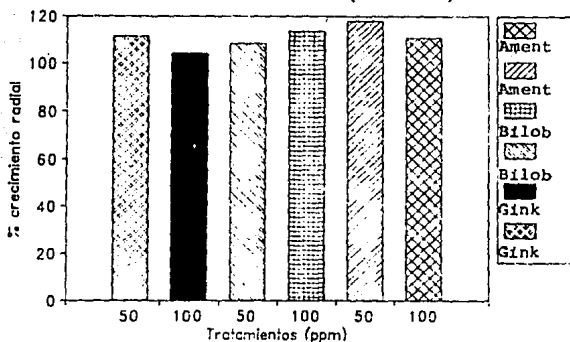


Gráfica 6. Efecto del extracto orgánico de *C. mexicanum* sobre *Fusarium* (3 y 8 días).

Compuestos de Celaenodendron sobre Helminthosporium (3 días)



Compuestos de Celaenodendron sobre Alternaria (3 días)



Gráfica 7. Efecto de los compuestos aislados de *C. mexicanum* sobre *Alternaria* (8 y 3 días).

Sucesivas cromatografías en columna y en capa delgada del extracto cloroformo-metanólico obtenido de las partes aéreas de Celaenodendron mexicanum Standl. permitieron el aislamiento de tres triterpenoides, uno de los cuales representó un nuevo producto natural, tres biflavonas y el común β -sitosterol.

La discusión de la elucidación estructural de estos compuestos será el objetivo principal de esta sección.

2.5.1 Identificación de los triterpenoides.

2.5.1.1 Identificación de la maytensifolina B (29) y del 3 β -hidroxil-16-oxo-D:A friedelano (30).

El producto (29), se aisló como un sólido blanco, amorfo, con p.f. $>280^{\circ}\text{C}$, ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$ por análisis elemental y espectrometría de masas.

El espectro de IR (Cuadro 11, Espectro 27) presentó bandas de absorción características para C-H ($2920, 2860\text{ cm}^{-1}$) y carbonilo ($1700, 1680\text{ cm}^{-1}$) de cetona.

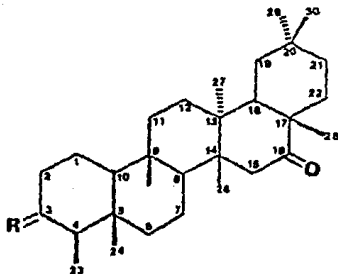
Los espectros de RMN presentaron el perfil típico de un triterpenoide del tipo friedelano (Patra, et al., 1987; Nozaki, et al., 1986; Gunatilaka, et al., 1979, 1983; Betancor, et al., 1980; Sengupta, et al., 1968; Kikuchi, et al., 1973). En el espectro de RMN'H (Espectro 28), se observaron señales entre 0.5 y 2.5 ppm; en ese rango destacaban claramente

señales para ocho metilos (6 0.73, 0.88, 0.89, 0.90, 0.96, 1.04, 1.19 y 1.29), uno de los cuales debido a su multiplicidad (6 0.88, d (J=7.5 Hz) era fácilmente asignable al metilo en C-4 del esqueleto base. Adicionalmente, la presencia de varios multipletes entre 6 1.5 y 2.5 eran consistentes con la presencia de metilenos vecinales a grupos carbonilos, los cuales habían sido ya claramente evidenciados en el espectro de IR.

El espectro de RMN^{13}C (Espectros 29 y 30) presentó señales para 30 átomos de carbono, en congruencia con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. De esas 30 señales las dos a campo más bajo (6 219.1 y 212.8) se asignaron a dos grupos carbonilos. De las 12 señales negativas observadas en el espectro de APT (Espectro 30) ocho (6 35.2, 28.95, 27.26, 20.17, 17.26, 16.11, 14.5 y 8.74) se asignaron a los grupos metilos ya establecidos por RMN^1H , y las otras cuatro a grupos metinos (6 59.1, 58.01, 52.2 y 43.7). Finalmente, a fin de satisfacer los requerimientos de la fórmula molecular, las 16 señales restantes eran atribuibles a diez grupos metilenos (6 50.06, 41.3, 40.8, 35.3, 35.17, 31.46, 30.97, 30.63, 22.13 y 18.49) y a seis carbonos cuaternarios (6 45.1, 42.0, 40.3, 38.9, 37.5 y 27.49).

Los datos espectroscópicos analizados hasta el momento, eran consistentes con los de una dicetona de un triterpenoide del tipo friedelano. El desplazamiento químico observado en el espectro de RMN^{13}C (Espectro 29) para el metilo en 6

6.47, indicaba claramente que uno de los grupos ceto se encontraba en C-3. En este sentido, cabe hacer notar que según varios modelos descritos en la literatura (Gunatilaka, L., *et al.*, 1983; (Patra, A., *et al.*, 1987), cuando un friedelano presenta sustituyente en C-3, el metilo en C-4 se desplaza diamagnéticamente. En cambio que cuando en C-3 no existe sustituyente o es de otra naturaleza, el desplazamiento para C-23, se observa a campo más bajo. En la Figura 3, se proporcionan ejemplos específicos que ilustran lo antes mencionado.



	R= O	R= H ₂	R= O	R= H ₂	R= O
C-23	6.8	13.8	7.0	13.6	6.8

Figura 3. Desplazamiento químico observado para C-23 en varios Friedelanos descritos previamente.

La presencia en el espectro de masas de los fragmentos a m/z 355 y 273 generados por las rupturas A y B ilustradas en la Figura 4, eran consistentes con la presencia de uno de los grupos ceto en C-3 y con la ausencia del segundo carbonilo en los anillos B ó C respectivamente. Adicionalmente la ausencia en el espectro de un ión a m/z 139 (atribuible al fragmento I indicado en la Figura 4) descrito para varios friedelanos con un grupo ceto en el anillo E, (Courtney, J.L., *et al.*, 1963; Hirota, H., *et al.*, 1975; Shannon, J.S., *et al.*, 1963) indicaba a priori que la segunda cetona debía encontrarse en el anillo D, en C-15 ó C-16. Para determinar la disposición del carbonilo, la comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de los anillos D y E observados para el producto natural con los valores calculados para compuestos presentando el grupo ceto en C-15 y C-16 fué de gran utilidad. Como se puede apreciar en la Figura 8, los valores experimentales guardaban bastante similitud con los valores calculados para el compuesto con un grupo ceto en C-16. En consecuencia el segundo carbonilo se ubicó en C-16.

Con base en la discusión anterior el producto natural fué identificado como la maytensifolina-B, la cual había sido previamente aislada de Maytenus diversifolia por Nosaki y colaboradores en 1986.

El producto 30 fué aislado como un sólido blanco, amorfo, con p.f. 250-254°C. Su fórmula molecular se estableció como $C_{30}H_{50}O_2$ mediante espectrometría de masas y

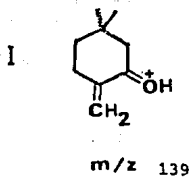
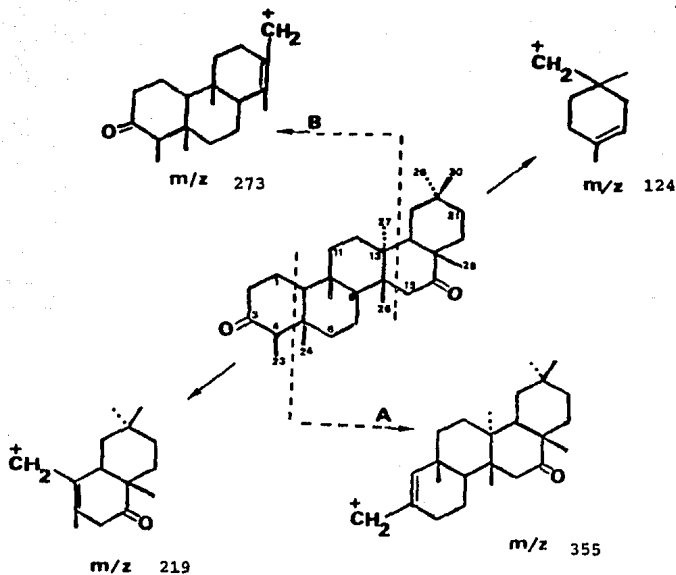
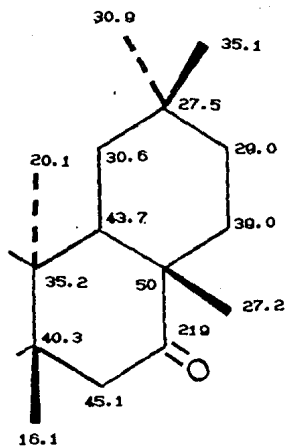
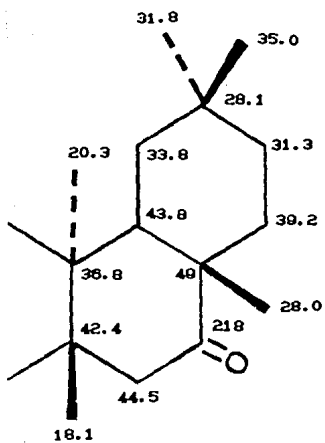


Figura 4. Fragmentos de masas observados para 29.



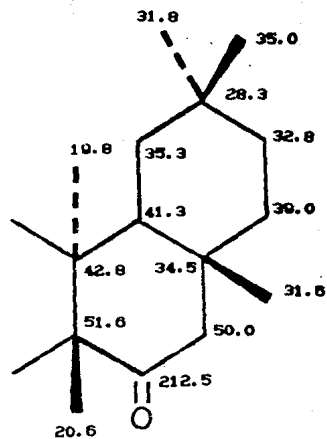
PRODUCTO NATURAL

VALORES OBSERVADOS



CETO 16

VALORES CALCULADOS



CETO 15

Figura 5. Comparación de los desplazamientos químicos de los anillos D y E.

análisis elemental.

Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de este producto fueron muy similares a las del compuesto (29), diferenciándose fundamentalmente en los siguientes aspectos:

i) el espectro de RMN¹H (Espectro 34) presentó una señal atribuible al hidrógeno geminal de un grupo hidroxilo secundario (δ 3.74) y en la zona entre δ 2.0 y 2.5, era menor la complejidad que en el espectro del compuesto (29).

ii) En el espectro de RMN¹³C (Espectros 36 y 37) se observó solamente una señal para grupo carbonilo en δ 219.3. La señal a δ 212.8 observada en el espectro del compuesto 29, se encontraba ausente y en su lugar, aparecía un metino asignable al carbono base de un alcohol secundario (δ 72.5). Finalmente, en la zona donde resuenan los metilos no se observó la resonancia a δ 8.73, y en su lugar se observaba una señal atribuible a un grupo metilo en δ 11.7. Esta última diferencia indicaba en primera instancia que el grupo ceto en C-3 del compuesto 29 se encontraba sustituido por un grupo hidroxilo en el compuesto 30.

iii) El espectro de masas (Espectro 38) mostró el ión molecular a m/z 440, y presentó un fragmento M-18. El resto de los picos presentes fueron idénticos a los del compuesto previamente descrito (29).

Las diferencias y similitudes antes mencionadas, indicaron que este producto difería del primero en el estado

de oxidación de C-3, es decir el grupo ceto en C-3 del compuesto 29, se encontraba sustituido por un hidroxilo en 30. Para comprobar esta hipótesis se decidió correlacionar químicamente ambos compuestos mediante el tratamiento del producto 30 con piridina y trióxido de cromo (Figura 6).

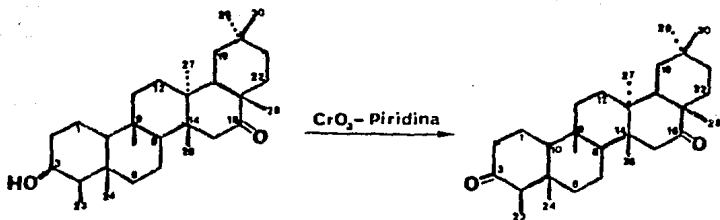
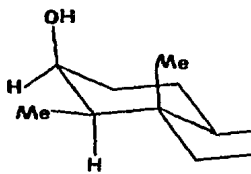


Figura 6. Correlación química de los productos (29) y (30).

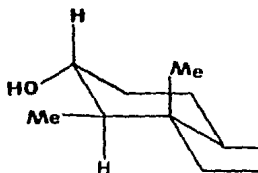
Como el producto de oxidación fué idéntico al primer producto natural descrito, se pudo comprobar inequívocamente que el grupo hidroxilo se encontraba en la posición 3 del esqueleto

base.

Una vez ubicada la disposición del hidroxilo en C-3, el análisis de la multiplicidad de la señal centrada en 3.74 ppm y la comparación con modelos descritos en la literatura (Kikuchi, T., *et al.*, 1973), permitieron establecer que la estereoquímica del hidroxilo era β . (Figura 7).



β 3.74 ppm



α 3.20 ppm

Figura 7. Comparación de modelos para la determinación de la estereoquímica del hidroxilo en C-3 (Kikuchi, *et al.*, (1973).

Con base en las evidencias presentadas, se identificó al compuesto como el 3 β -hidroxi-16-oxo-D:A friedelano, el cual constituye un nuevo producto natural.

2.5.1.2 Identificación de la Friedelina (29).

El producto 29, fue aislado como un sólido blanco, amorfo de p.f. 243-246°C y se caracterizó como la friedelina por comparación con una muestra auténtica.

2.5.2 Identificación de β -sitosterol (31).

El producto 31, fue aislado como un sólido blanco, amorfo, de p.f. 122-125°C. La comparación directa de este compuesto con una muestra auténtica permitió identificar al compuesto aislado como el β -sitosterol.

2.5.3 Identificación de las biflavonas.

Identificación de la ginkgetina (32), bilobetina (33) y amentoflavona (34). Los productos 32, 33 y 34 fueron aislados como sólidos amarillos, amorfos. Las constantes físicas y espectroscópicas de estos compuestos fueron muy similares (Cuadros 14, 15 y 16).

Para una mayor facilidad en el seguimiento de la discusión relacionada con la elucidación estructural de estos compuestos, se analizará en primer lugar la caracterización de la amentoflavona (34).

El espectro de UV (Espectro 52) mostró un máximo de absorción a 271 nm y el Espectro de IR (espectro 53) mostró bandas características para grupo hidroxilo (3200 cm^{-1}) y carbonilo (1660 cm^{-1}). Estas características espectroscópicas, así como el comportamiento cromatográfico del producto natural, indicaron la naturaleza flavonoide del

mismo.

Los espectros RMN¹H (Espectro 54 y 55) mostraron señales para 12 hidrógenos en la zona comprendida entre δ 6.2 y δ 8.05 y para 6 grupos hidroxilo, dos de los cuales debían estar quelatados con un grupo C=O, de acuerdo a los desplazamientos químicos observados (δ 13.0 y 13.1).

Las 12 resonancias observadas en la región aromática (Figura 8) se discriminaron de la siguiente manera:

- los singuletes a δ 6.8 y δ 6.85 eran asignables al H-3 de los monómeros de una biflavona (Varshney *et al.*, 1973; Peeter, *et al.*, 1971; Konoshima, *et al.*, 1969).
- Los dos dobletes (J=8.9 Hz) que integraban cada uno para 2 hidrógenos, centrados en δ 6.72 y 8.02, eran atribuibles a un sistema A₂B₂ de un anillo aromático p-sustituido.
- Los dos dobletes (J=2.01 Hz) en δ 6.20 y 6.47 correspondientes a un sistema AB, se asignaron a un anillo aromático tetrasustituido.
- El singulete a δ 6.39 correspondía a un hidrógeno aromático aislado.
- Finalmente, las restantes señales (δ 7.14 (J=8.5 Hz), δ 6.02 (J=8.7 Hz) y δ 6.05 (J=2.01 Hz)) conformaban el sistema ABX de un anillo aromático trisustituido.

Los espectros de RMN¹³C (Espectros 58 y 57) mostraron señales para 28 átomos de carbono, lo cual indicaba la presencia de dos pares de señales equivalentes y presentó la apariencia típica de una biflavona (Chari, *et al.*, 1977).

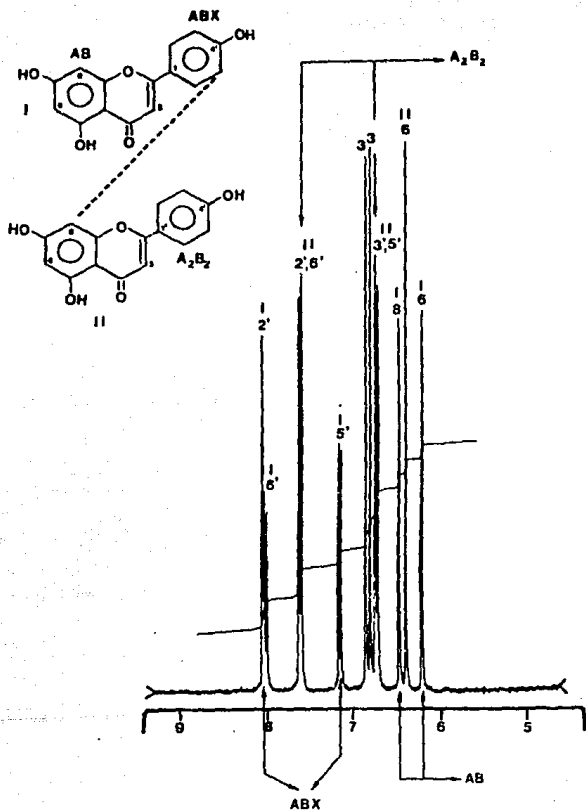


Figura 8. Región aromática del compuesto 34

De las 28 resonancias, las dos desplazadas a campo más bajo (ó 182.01 y 181.6), correspondían a los grupos carbonilo de la porción γ -pirona de cada uno de los monómeros de una biflavona; las siguientes 10 señales (Cuadro 15), a carbonos cuaternarios unidos a oxígeno, y las 10 restantes a carbonos cuaternarios no oxigenados.

De la información proporcionada por ambos espectros, era evidente que la molécula era una biflavona, cuyos monómeros tenían como estructura fundamental a la flavona apigenina.

La presencia en el espectro de RMN¹H de un sistema ABX, un sistema A₂B₂, un sistema AB y de un hidrógeno aromático aislado, indicaban claramente que los dos monómeros se unían entre sí a través de un enlace C-C, que involucraba el anillo B de una unidad y el anillo B del segundo monómero. en este sentido, eran factibles cuatro diferentes posibilidades (A-D) de unión entre los dos monómeros, mismas que se pueden apreciar en la Figura 9.

Para discernir entre estas cuatro posibilidades, la comparación de los desplazamientos químicos observados para los carbonos de los anillo A y B de los dos monómeros en el espectro de RMN¹³C fué de gran utilidad:

1) La presencia de un singulete a ó 121.6 era congruente con la participación de C-3' ó C-5' de una de las unidades en el enlace C-C. Si los carbonos C-2' ó C-6' de uno de los monómeros hubiesen estado involucrados, esta señal se hubiese observado a campo más bajo (Chari, M., et al., 1977). Este

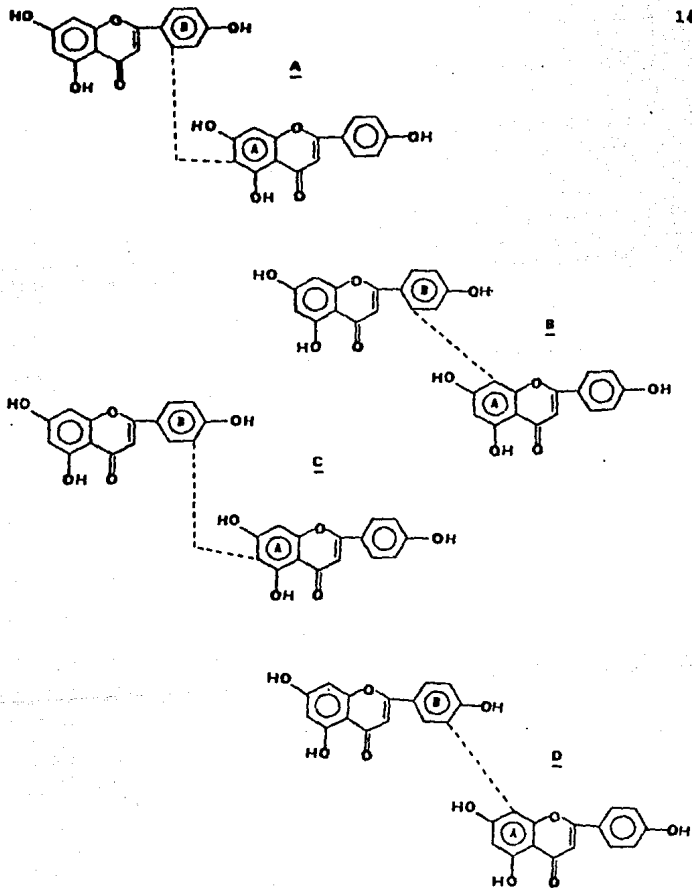


Figura 9. Posibilidades de unión de los monómeros I y II.

razonamiento permitió entonces descartar las estructuras A y B de la Figura 9.

ii) Para diferenciar entre las dos posibilidades restantes (C y D), igualmente el valor del desplazamiento químico de la señal que aparecía como un singulete en δ 104.2 fué decisivo. La magnitud del desplazamiento químico indicaba que era el C-8 y no el C-6 del anillo A del monómero inferior, el punto de unión con la otra unidad. Si el carbono de enlace hubiese sido el C-6 el singulete se habría encontrado aproximadamente en 90 ppm (Chari, *et al.*, 1987).

Con base en las evidencias antes presentadas, se concluyó que la estructura de este compuesto era la correspondiente a la amentoflavona (34), la cual había sido ya descrita previamente en la literatura (Geiger, *et al.*, 1975).

Los siguientes compuestos aislados en orden decreciente de polaridad, fueron caracterizados como la bilobetina (33) y la ginkgetina (32). Sus propiedades físicas y espectroscópicas como ya se indicó fueron muy similares a las del compuesto previamente descrito (34). Por otra parte, el tratamiento prolongado de los compuestos con diazometano, originó el mismo derivado permetilado, lo cual permitía concluir que los productos naturales (32) y (33) eran también biflavonas del mismo tipo que la amentoflavona.

De acuerdo a la fórmula molecular, el compuesto (33) y (32) presentaban 14 y 28 unidades de masa más, respectivamente que la amentoflavona.

La diferencia más importante observada en los espectros de RMN fué la presencia de una y dos señales para grupos metoxilo (δ 3.76 en RMN¹H y δ 55.4 en RMN¹³C para 33 y δ 3.76, 3.82 en RMN¹H y δ 55.40, 56.01 en RMN¹³C para 32). Consecuentemente, los productos 33 y 32 eran derivados mono y dimetilado de la amentoflavona.

Para determinar la disposición de los grupos metoxilo, fué de gran importancia el análisis comparativo de los desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos (Figura 10). Como la única diferencia significativa observada en el caso de la bilobetina, fué el desplazamiento paramagnético de uno de los hidrógenos del sistema ABX (δ 7.17), se pudo concluir que el grupo metoxilo se encontraba en C-4' del monómero superior.

La última biflavona se caracterizó como la ginkgetina (32), mediante un análisis similar (Figura 10) al realizado para la bilobetina (33). En este caso, los grupos metoxilos se ubicaban en las posiciones C-4' y C-7 del monómero I, ya que en este caso, se vieron afectados los hidrógenos del sistema ABX (δ 7.18 y 8.06) y del sistema AB (δ 6.35 y 6.42).

Con relación a los ensayos biológicos, los resultados indicados en las gráficas 1,2, evidenciaron claramente que el extracto cloroformo-metanólico de hojas y ramas de Celaenodendron mexicanum, inhibió selectiva y significativamente el crecimiento radicular de Amaranthus leucocarpus. Así mismo sobre Echinichloa crussgalli fué estimulante; en este último

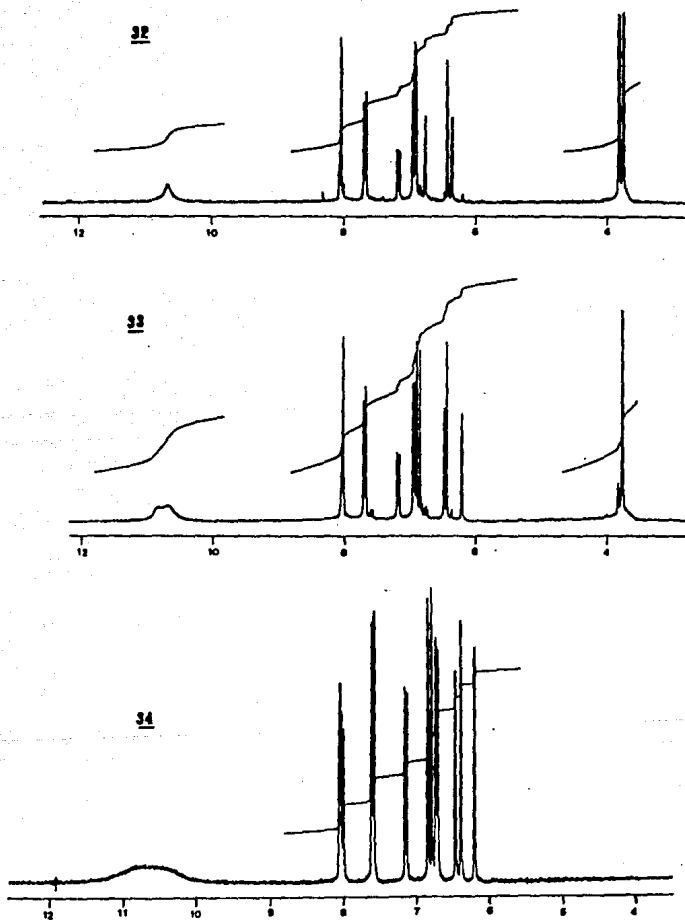


Figura 10. Región aromática de los compuestos 32, 33 y 34.

caso el efecto estimulante fué de 20%.

En el caso de los compuestos (ver gráfica 3), los efectos observados sobre el crecimiento radicular de ambas especies de prueba fueron también selectivos. Los compuestos 28 y 29 mostraron un efecto inhibitorio acentuado sobre Echinochloa, en cambio que sobre Amaranto el efecto fué estimulante. En consecuencia ambos triterpenoides constituyen buenos agentes herbicidas naturales. Por el contrario, las biflavonas presentaron un efecto estimulante sobre Echinochloa e inhibitorio sobre Amaranto.

Los resultados obtenidos en los ensayos contra hongos fitopatógenos fueron poco alentadores, ya que en ninguno de los casos se observó inhibición significativa del crecimiento de los hongos fitopatógenos objeto de las evaluaciones (gráficas 4-7).

2.6 CONCLUSIONES

2.6.1 El estudio fitoquímico convencional de las partes aéreas de Celaenodendron mexicanum, condujo al aislamiento y caracterización de siete metabolitos : tres biflavonas (dinkgetina , bilobetina y amentoflavona), el β -sitossterol y tres triterpenoides (friedelina, maytensifoli-na B y el 3β -hidroxi-16 oxo-D₁A friedelano, constituyendo este último un nuevo producto natural).

2.6.2 El extracto total de las partes aéreas, ramas y - compuestos caracterizados fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos y contra hongos fitopatógenos. El - efecto alelopático se determinó sobre Echinochloa crus-galli y Amaranthus leucocarpus, encontrándose en el caso de ambos extractos un efecto selectivo sobre el creci -- miento radicular de las especies de prueba (inhibitorio en el caso de Amaranthus y estimulante en el caso de - Echinochloa). Así mismo, los compuestos caracterizados presentaron también efectos diferentes sobre las dos es- pecies objeto de estudio. Las actividades más relevantes se observaron en el caso de la friedelina y de la amento- flavona.

Por otro lado, los resultados obtenidos de las evaluacio- nes sobre hongos fitopatógenos no fueron muy alentadores.

Anaya, A.; Calera, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; J. Chem. Ecol., 18 (7), 2145 (1990).

Barley, Diagnostic Microbiology, C.V. Mosby Company, 176-200 (1974).

Betancor, C.; Freire, R.; González, A.G.; Salazar, J.A.; Pascard, C.; Prange, T.; Phytochemistry, 19, 1989 (1990).

Bingel, A.S.; New Nat Prod and Plant Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutical Activity, New York (1977).

Calera, M.; Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, 1990.

Clarck, A.; J. Pharm. Sci., 40, 950 (1981).

Courtney, J.L.; Shannon, J.S.; Tetrahedron Lett., 1, 13 (1963).

Contreras, J.L.; Tesis profesional, Escuela de Química, Universidad de Motolinía, 1990.

Cristanto, D.; Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, 1990.

Chari, V.; Ilyas, M.; Wagner, H.; Neszmelyi, A.; Cheri, F.;
Chen, L.; Lin, Y.; Lin, Y.M.; Phytochemistry, 1977, 16, 1273
(1977).

Cheval, K.K.; Handa, B.K.; Rahaman, W.; J. Chromatography,
49, 484 (1970).

Dawson, R.; Jarvis, M.; Jefferies, P.; Payne, T.; Rosich, R.;
Aust. J. Chem., 19, 2133 (1966).

Dimbi, M.; Mpuza, K.; Edmond, D.; Nairin, R.D.; Bull. Soc.
Chim. Belg. 94 (2), 141 (1983).

Dominguez, X.; Franco, R.; Cano, G.; Chávez, N.; Rev. Latinoam.
Quim. 14, 150 (1980).

Dreyer, D.; Rev. Latinoam. Quim. 9, 97 (1978).

El-Towil, B.; Arab. Gulf J. Sci. Res. 1 (2), 395 (1983).

Estrada, L.E.; Jardín Botánico de Plantas Medicinales
"Maximino Martínez", Universidad Autónoma de Chapingo, 1985.

Fairbairn, J.W.; J. of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980).

Farnsworth, N.; Bingel, S.; New Nat Prod. and Plant Drugs with
Pharmacological Biological or Therapeutical Activity, New
York, Berlin (1976).

Farkas, L.; J. of Ethnopharmacology, 2, 145 (1968).

Fernández, C.; Fraga, B.; Hernández, M.; Phytochemistry, 25
(12), 2825 (1986).

Garg, H.S.; Mitra, C.R.; Phytochemistry, 10, 2787 (1971).

Ghisalberti, E.L.; Jefferies, P.R.; Selton, M.;
Phytochemistry, 12 (5), 1125 (1973).

Gunasekera, S.; Sultanbawa, M.; Chem. and Ind., 18, 700
(1973).

Gunatilaka, L.; Dhammika, N.P.; Tetrahedron Lett., 10,
1727-1730 (1970).

Gunatilaka, L.; Dhammika, N.P.; Uvais, M.; J.C.S. Chem.
Comm., 434 (1970).

Gunatilaka, L.; Dhammika, N.P.; Waseer, M.; Phytochem., 22
(4), 9071 (1983).

Harborne, J.B.; The Flavonoids. Advances in research since
1980 (1988).

Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; The Flavonoids. Parte 1 y 2
(1975).

Hirota, H.; Moriyama, Y.; Tsuyuki, T.; Tanahashi, Y.;
Takahashi, T.; Katoh, Y.; Satoh, H.; Bull. Chem. Soc. Jap. **48**
(6), 1884 (1975).

Hsu, H.Y.; Chen, Y.P.; Kakisawa, H.; Phytochemistry, **10**, 11
(1971).

Jackson, B.; Locksley, H.D.; Scheinmann F.; Wolstenholme,
W.A.; J. Chem. Soc. (C), 3701 (1971).

Jefferies, P.; Knox, J.; Scaf, B.; Aust. J. Chem., **26**, 2100
(1973).

Jefferies, P.; Knox, J.; Scaf, B.; Aust. J. Chem., **27**, 1097
(1974).

Joshi, B.S.; Kamat, V.N.; Viswanathan, N.; Tetrahedron, **29**,
1365 (1971).

Jury, S.L.; The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and
Economic. **63** (1987).

Kaplan, E.; Rivett, D.; J. Chem. Soc. C, 262 (1968).

Karanjgaokar, C.G.; Radhakrishnan, P.V.; Venkataraman, K.;
Tetrahedron Lett., **33**, 3195 (1967).

Kikuchi, T.; Shingu, T.; Niwa, M.; Yokoi, T.; Chem. Pharm. Bull., 21 (6), 1306 (1973).

Kikuchi, T.; Takayama, M.; Toyoda, T.; Arimoto, M.; Niwa, M.; Chem. Pharm. Bull., 21 (10), 2243 (1973).

Konoshima, M.; Ikeshiro, Y.; Nishinaga, A.; Matsuura, T.; Kubota, T.; Sakamoto, H.; Tetrahedron Lett., 2, 121 (1969).

López, C.; Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, 1980.

Martínez, N.; Comunicación personal, (1990).

Martínez, M.; Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, 1987.

Mitscher, L.; Raghau, G.; Nat. Prod. and Drug Develop., 193-212 (1984).

Nair, R.A.; Sankara, S.; Indian J. Chem., 13, (6), 639 (1975).

Nosaki, H.; Suzuki, H.; Hirayama, T.; Kasai, R.; Yang Wu, R.; Hsiung, K.; Phytochemistry, 25, 479 (1986).

Patra, A.; Kumar, S.; Magn. Reson. Chem., 25, 95 (1987).

Payne, T.; Jefferies, P.; Tetrahedron, 29, 2575 (1973).

Peeter, A.; Warren, R.; Chexal, K.K.; Handa, B.K.; Rahman, W.;
Tetrahedron, 27, 1625 (1971).

Ponsinet, G.; Ourisson, G.; Phytochemistry, 4, 799 (1965).

Puyvelde, V., De Kimpe, N.; Costa, J.; J. Nat. Prod., 52, 620
(1989)

Rizk, A.F.; Bot. J. Linn. Soc., 94, 293 (1987).

Rene, R.; Nothis, A.; Plant. Med. Phytother., 4 (1), 63
(1979).

Rizvi, S.H.; Shoeb, A.; Kapil, R.S.; Popli, S.P. Experientia,
36, 146 (1980).

Rogers, D.; Phillips, F.; Joshi, B.; Viswanathan, N.; J.C.S.
Chem. Comm., 1048 (1980).

Rosler, H.; Star, A.; Mabry, T.; Phytochemistry, 10, 450,
(1971).

Rzedowski, J.; Rzedowski, C.; Flora fanerogámica del Valle de
México. Vol. II. ENCB, IPN, 1a. Edición (1985).

Sachdev, K.; Kulshreshtha, D.; Ind. J. Chem., 21 B, 798
(1982).

Subbarao, M.; Satyanarayana, T.; Indian Drugs, 1985, 23 (3), 140-1.

Tanaka, T.; Tanaka, O.; Lin, Z.; Shou, J.; Ageta, H.; Chem. Pharm. Bull. 31 (2), 780 (1983).

Trotin, F.; Benzanger, B.; Pinkas, M.; Robelet, A.; Ann. Pharm. Fr. 30 (7-8), 555 (1972).

Varshney, A.K.; Aquil, M.; Rahman, W.; Okigawa, M.; Kawano, N.; Phytochemistry, 12, 1501 (1973).

Varshney, A.K.; Rahman, W.; Okigawa, M.; Kawano, N.; Experientia, 29 (7), 784 (1972).

Venkateswara, K.R.; Indian Chem. Soc., 1962, 32, 561-2.

Wagner, H.; Ludwig, C.; Grotjahn, L.; Khan, M.; Phytochemistry, 26 (3), 897 (1987).

Waterman, P.; Hussain, R.; Bioch. Syst. Ecol., 11 (1), 21 (1983).

Webster, G.L.; Taxon 24 (516), 593 (1975).

Witz, P.; Herrmann, H.; Lehn, J.; Ourisson, G.; Mémoires Présentés à la Société Chimique, 1101 (1963).