

302927 2A
29.

universidad femenina de México

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO

**METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS
DEL TORONJIL BLANCO
(AGASTACHE SP)**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
CONTRERAS TREJO BERNARDA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1987



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.

I N D I C E

AGRADECIMIENTOS

I. INTRODUCCION

II. ANTECEDENTES

III. PARTE TEORICA

IV. PARTE EXPERIMENTAL

V. RESULTADOS

VI. ESPECTROS

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

VIII. CONCLUSIONES

IX. BIBLIOGRAFIA

C O N T E N I D O

AGRADECIMIENTOS	5
I. INTRODUCCION	9
II. ANTECEDENTES	
1. Botánicos	12
2. Descripción taxonómica	13
3. Composición química	13
4. Sinónimos	14
5. Usos	14
III. PARTE TEORICA	
1. Aceites esenciales	16
2. Biogénesis de terpenos	18
3. Biogénesis de flavonoides	21
IV. PARTE EXPERIMENTAL	
1. Aceites esenciales	25
2. Compuestos di y triterpenoides	26
3. Compuestos flavonoides	29
V. RESULTADOS	
1. Aceites esenciales	32
2. Compuestos di y triterpenoides	37
3. Compuestos flavonoides	39
VI. ESPECTROS	44
VII. DISCUSION DE RESULTADOS	65
VIII. CONCLUSIONES	68
IX. BIBLIOGRAFIA	70

I. INTRODUCCION

Entre la gran variedad de plantas que son utilizadas en la medicina popular mexicana se encuentra el TORONJIL BLANCO, que forma parte del complejo medicinal de los tres toronjiles. - Los otros miembros de dicho complejo son: el toronjil rojo o morado (Agastache mexicana) y el tojonjil azul o chino (Draccocephalum maldivica).

La aplicación de estas plantas se remontan desde los tiempos prehispánicos, en donde el TORONJIL BLANCO solo se le ha encontrado como componente de poblaciones locales, y no se sabe todavía si exista en poblaciones nativas.

En estos últimos años, dichas plantas han tenido una gran demanda en el mercado, y a consecuencia de su sobreexplotación ya no se encuentra tan abundante en la naturaleza y en algunas poblaciones locales se han llegado a su extinción.

Por lo que despierta el interés, en estudiar dichas plantas desde el punto de vista quimiotaxonómico, sobre todo al TORONJIL BLANCO que se le ha clasificado por el momento como a fin Agastache mexicana. Ya que no tiene una clasificación taxonómica definida como los demás toronjiles.

Por lo que esta tesis, tiene como objetivo aislar e identificar los principales metabolitos secundarios del TORONJIL BLANCO y compararlos con los del toronjil rojo¹. Y contribuir con este estudio a tratar de cooperar al problema, de ver si ambas plantas pertenecen a la misma especie o no.

II. ANTECEDENTES

1. BOTANICOS:

En años anteriores se hicieron estudios sobre géneros de Agastache, basados en especímenes de herbario realizado por Lint y Epling en el año de 1945, y otro hecho por Sanders en 1979², también basados en especímenes de herbario.

En éste último, Sanders demostró que el trabajo realizado por Lint y Epling tenía una aplicación limitada, debido a la mala interpretación de la variabilidad de los caracteres. La monografía inédita de Sanders esta basada en caracteres exomorfoicos (previamente en la estructura de la inflorescencia y cáliz) y constituyentes flavonoides.

Los análisis de Sanders tienen un mayor énfasis para poblaciones cercanas a la frontera de México y en Estados Unidos y es muy limitada para las poblaciones del centro de México. En base a su estudio se reconocen 14 especies de Agastache que engloba un total de 23 taxa. La gran variedad entre ciertos pares de especies son atribuidos a una hibridación y segregación antigua, aunque no se encuentra con datos experimentales para poder probar esta hipótesis.

Basados en estudios florísticos recientes en la Sierra Madre Occidental³, se ha descubierto una nueva especie que es el TORONJIL BLANCO (Méx., Mor., Mich., Pue.) que se ha clasificado por el momento como afín a Agastache mexicana.

2. DESCRIPCION TAXONOMICA:

La descripción del toronjil blanco se hizo en base a un estudio florístico, comparandola con el toronjil rojo, - presentando las siguientes características:

El toronjil blanco tiene una flor más pequeña que la del toronjil rojo, en la garganta de la corola posee pequeñas vellocidades, característica que no se presenta en el toronjil rojo, sin embargo, no hay pronunciadas diferencias de tipo taxonómico.

3. COMPOSICION QUIMICA:

En este punto se tomaron como base, dos estudios anteriormente realizados para Agastache, uno de ellos es: El análisis de flavonoides realizado por Sanders en 1979², siguiendo la metodología de Mabry (1970) y Markham (1982), en el cual se pretendía establecer diferencias taxonómicas basandose en la distribución sistemática de distintos compuestos en el género Agastache.

Sin embargo, este estudio que incluye principalmente compuestos flavonoides, tiene un uso limitado para poder establecer una diferenciación taxonómica, que es un factor apreciable para el entendimiento de la evolución de este grupo.

Sanders reporta como componentes de Agasche mexicana a la diosmetina, apigenina, 6-7dimetileter y luteolina 6-7 dime-
tyleter.

El otro aspecto que se consideró, fué el estudio realizado por A. Manjarrez y V. Mendoza sobre la composición de los aceites volátiles en Agastache mexicana³. En su trabajo se reporta a la mentona (46.75), pulegona (39.8), y citronelal (1.2) como componentes en mayor porcentaje. Designando dichos compuestos en base al tiempo de retención del limoneno. Sin embargo, el autor no especifica que tipo de planta (toronjil blanco o toronjil rojo) emplea en su estudio y aún cuando menciona que depositó un ejemplar en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM, éste no ha podido localizarse.

4. SINONIMOS:

En Nahuatl es tlalahuhuélt y tlalamalt⁴, y poleo del cerro³.

5. USOS:

La infusión del toronjil blanco, junto con el toronjil rojo y el toronjil azul, es apreciada para el tratamiento de varias enfermedades gastrointestinales, nerviosas, y cardiog vasculares⁵, dicha infusión se recomienda después de las comidas. Así, como otros padecimientos que se describen con los nombres populares de "espanto y susto"⁶.

III. PARTE TEORICA

III. PARTE TEORICA

Para efectuar un estudio comparativo entre el toronjil blanco y el toronjil rojo, se estudiaron los mismos tipos de compuestos que se reportan en investigaciones anteriores sobre Agastaches.

Dichos compuestos son: grupos de terpenos y flavonoides haciéndose también énfasis al estudio de los aceites esenciales.

1. ACEITES ESENCIALES:

Los aceites esenciales están constituidos por una gran diversidad de sustancias orgánicas, mismas que se caracterizan - por su volatibilidad en mayor o menor grado, dependiendo de la naturaleza química del compuesto que se trate.

El olor agradable que tienen algunos aceites esenciales se debe a la presencia de compuestos oxigenados, tales como: aldehídos, alcoholes, ésteres, etc. Los cuales aumentan el valor - apreciativo de la esencia. Dichas sustancias pueden ser clasificadas de acuerdo a sus grupos funcionales. Así tenemos:

- a). Hidrocarburos
- b). Alcoholes
- c). Esteres
- d). Aldehídos
- e). Cetonas
- f). Fenil propanoides

o bien, al número de unidades de C_5 en su esqueleto carbonado.

- a). Monoterpenos
- b). Sesquiterpenos
- c). Diterpenos
- d). Triterpenos
- f). Esteroides

Los terpenos están frecuentemente acompañados por derivados de fenil propanoides e hidrocarburos de cadena lineal. Los terpenos ya formados sufren fácilmente cambios secundarios, tales como oxidaciones, reducciones, esterificaciones, ciclizaciones y estos factores pueden combinarse dando una gran variedad de derivados de distintas funciones.

Gracias a la evidencia química, se puede decir, que la complejidad de la composición de los aceites esenciales se debe a la excreción o secreción de productos formados por varios procesos metabólicos. Estos compuestos son frecuentemente de gran importancia. Por ejemplo, para atraer insectos, así como para controlar el desarrollo de otras poblaciones vegetales. Es decir, cumplen con un gran número de funciones útiles para las plantas. Por otro lado, la presencia de componentes específicos pueden ser usados también para la determinación tocante al estado evolucionario en diferentes familias de plantas. También a los componentes de los aceites esenciales se les atribuyen algunas propiedades farmacológicas, por ejemplo, el canfeno y el mentol son usados como estimulantes circulatorios, el alcanfor tiende a mejorar la condición cardíaca.

2. BIOGENESIS DE TERPENOS:

La investigación pionera en la determinación de las estructuras de terpenos, fué la publicación de Ruzicka sobre la regla biogenética del isopreno⁷.

Pretendiendo la explicación de la unión de terpenos acíclicos o sustancias semejantes a éstas, las cuales pueden condensarse por mecanismos iónicos o radicales, para dar lugar a los diversos grupos de terpenos conocidos.

El valor principal de esta regla estriba en que es un concepto amplio y unificado, que implica una secuencia de eventos racionales para la biogénesis de terpenos.

Un paso fundamental en este estudio, fué el descubrimiento del ácido mevalónico⁸, y el marcado eficiente del colesterol⁹, es decir, la incorporación del carbono 14 en la posición 2 de dicho compuesto (no se marca en C-1 ya que éste se pierde en la formación del colesterol¹⁰), en carotenoides y otras sustancias terpenoides.

El ácido mevalónico es formado a partir del β -hidroxil-metilglutaril CoA (IV), este mecanismo involucra la condensación del ácido acético (I) en tejidos, para formar el acetil CoA (II) y el acetoacetil CoA (III).

Inicialmente el ácido mevalónico se encuentra como un monofosfato (VI), y que con la presencia de adenosin trifosfato da origen a un nuevo éster determinado como ácido meva -

lónico 5-pirofosfato^{II, I2} (VII). Una posterior descarboxilación y desforilización (VIII), da lugar a la formación del isopentil pirofosfato (IX), que es la unidad isoprenoide activa^{I3, I4}.

Este es un paso esencial en la formación de eventos principales en la biogénesis de terpenos.

En donde el isopentil pirofosfato sufre una isomerización reversible desplazándose hacia la formación del dimetil alil pirofosfato^{I5, I6} (X), el cual actúa como un agente alquilante para condensarse con una segunda molécula de isopentil pirofosfato para dar lugar a la formación del geranil pirofosfato (XI), precursor de los monoterpenos. A su vez el geranil pirofosfato, puede condensarse con otra molécula de isopentil pirofosfato, para dar origen al farnesil pirofosfato (XII), precursor de sesquiterpenos, escualeno y triterpenos. La secuencia aceptada para la biogénesis de terpenos, se presenta en la Figura No. I.

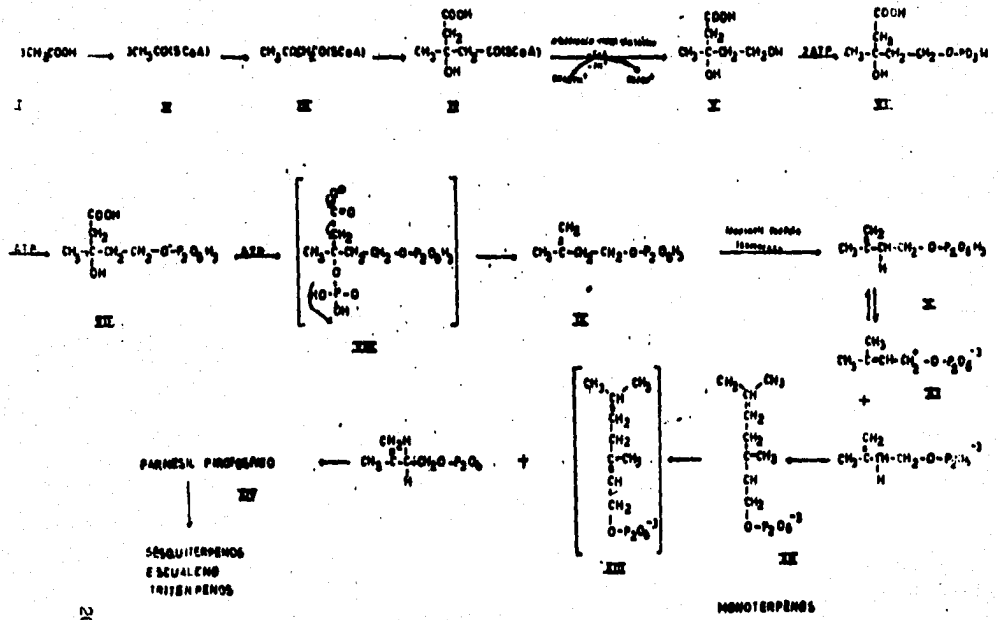


FIGURA No.1

3. BIOGENESIS DE FLAVONOIDES:

Se estima que alrededor del 2% de los carbonos foto-sintetizados por plantas son convertidos en flavonoides o -compuestos estrechamente relacionados¹⁷.

En plantas, los compuestos flavonoides generalmente se encuentran unidos a azúcares (glucósidos flavonoides).

Los glucósidos flavonoides tienen una gran variedad de formas estructurales, todas ellas contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico y éstas tienen una estructura carbonada de $C_6 - C_3 - C_6$. La gran variedad de flavonoides, se encuentran relacionadas por un camino biosintético en común, es decir, con la incorporación de precursores que provienen del ácido shikímico, o bien, mediante la condensación del ácido cinámico con tres moléculas de Malonil CoA, y todas - las otras formas se derivan a partir de unas cuantas rutas. Figura No. 2.

Los flavonoides pueden sufrir modificaciones, por - ejemplo, una hidroxilación adicional o bien una reducción, una metilación en sus grupos hidroxílicos o en el núcleo flavonoi- de, una dimerización (biflavonoides) y la más frecuente la glucosidación en los grupos hidroxílicos.

Los flavonoides contienen uno o más azúcares unidos a través del enlace hemiacetal lábil, de estos últimos exis- ten sin embargo sitio que tienen más alta probabilidad de - glucosidarse que otras. Por ejemplo, 7-OH en las flavo -

nas, isoflavonas, y dihidroflavonas, 3-(-7) en dihidroflavonoles e hidroxiflavonoles y 3-(-5) hidroxi en antocianidinas.

El azúcar más comunmente encontrado es la glucosa, pero también se encuentra la galactosa, ramosa, xilosa y con menor frecuencia la arabinosa. Es factible encontrar di, tri, y hasta tetrasacáridos. La glucosidación generalmente exhibe otra modificación, como lo es la acilación. Los glucósidos acilados pueden estar esterificados en uno o en más de sus azúcares con un ácido tal como ácido acético o ferúlico. El azúcar puede estar unido directamente al carbono, en este caso, el ataque se lleva a cabo en el núcleo bencénico en el enlace C-C. Esta unión puede establecerse únicamente en la posición 6 y 3 del núcleo flavonoide, en los compuestos actualmente conocidos.

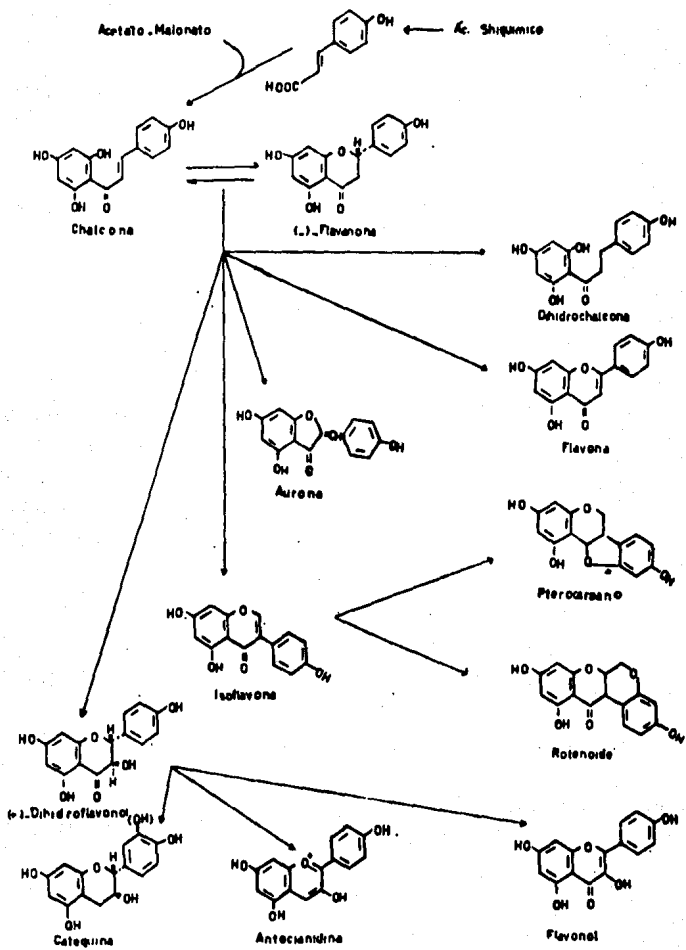


FIGURA No.2

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. ACEITES ESENCIALES:

El estudio sobre los aceites esenciales comienza con la obtención de éstos, por arrastre de vapor, tanto del toronjil blanco (TB) como del toronjil rojo (TR) en condiciones frescas.

Teniendo en cuenta que la composición de la esencia puede cambiar con la época de recolección, la etapa de crecimiento en la que se encuentre, el lugar geográfico, o bien, a pequeños cambios genéticos, se utilizaron dos diferentes recolecciones de la Cuenca de México (ambas en floración).

PRIMERA RECOLECCION: Planta silvestre anual del mes de agosto, haciendo uso de toda la planta (hojas, tallo y flor), para el toronjil blanco y el toronjil rojo.

SEGUNDA RECOLECCION: Planta cultivada del mes de octubre que para el caso del toronjil rojo se utilizó toda la planta (hoja, tallo y flor) y en el caso del toronjil blanco, se obtuvo el aceite esencial de la flor por un lado y por el otro el de la hoja y tallo.

Durante la realización de este estudio, se consideró importante hacer un mayor énfasis, para los grupos carbonílicos y confirmar de esta manera la cantidad de estos componentes en el aceite. Para este fin al aceite esencial se le sometió a dos diferentes tratamientos:

- a). Tratamiento con bisulfito de sodio
- b). Tratamiento con el reactivo de Girard (clorhidrato de metilaminoacetohidrazina).

Para el primer caso (Tratamiento con bisulfito de sodio), se preparó una solución acuosa de bisulfito de sodio al 20 por ciento, de esta solución se le agragaron 10 ml al aceite esencial, se agitó durante 30 minutos y se extrajo con cloruro de metileno, este último se evaporó con aire quedando el aceite esencial, el cual se cuantifico por cromatografía de gases.

Para el segundo caso (reactivo de Girard), a 100 mg de muestra se le agregó una cantidad igual del reactivo de Girard, el cual se solubilizo con aproximadamente 10 ml de metanol, se adicionaron 100 mg de acetato de sodio disueltos en la mínima cantidad de agua posible. Se reflujo durante dos horas. Después de este tiempo se diluyó con agua y se ajusto el pH hasta tener un rango de 2-4. Enseguida se procedió a la extracción con cloruro de metileno, el cual se evaporo con aire. El aceite esencial obtenido se analizó por cromatografía de gases, junto con aceite esencial sin tratamiento.

2. COMPUESTOS DI Y TRITERPENOIDES:

En este paso, se hizo especial énfasis sobre el estudio de los diterpenos del grupo del clerodano, que son propios de algunas especies y géneros pertenecientes a la familia de las Labiadas, para poder hacer una mayor diferenciación entre el toronjil blanco y el toronjil rojo. Sin olvidar los triterpenos que son en general más o menos comunes en este tipo de plantas.

Con este fin se hicieron diferentes extractos, separando la hoja del tallo del toronjil blanco. Utilizando solventes de menor a mayor polaridad como son: hexano, acetato de etilo, acetona, mentol. Llevando siempre un control por cromatografía en placa fina de cada uno de los extractos obtenidos, revelando con sulfato cérico.

De todos ellos son dos los que resultan de mayor interés, uno de los cuales es el extracto del tallo, y el otro es el extracto de acetato de etilo de hoja. El primero presenta un mayor número de componentes, además se observa que durante el control en placa fina, utilizando eluyentes de una polaridad mayor, se quedan las aplicaciones sobre la base de la placa, por lo que se procede acetilar el extracto.

La acetilación se lleva a cabo en un matraz de bola de 100 ml, disolviendo dicho extracto en la mínima cantidad de piridina y con la subsecuente adición lenta de anhídrido acético (reacción exotérmica), se refluja durante dos horas. Después de este tiempo se le agrega metanol y se concentra en el rotavapor, esta última operación se hace todas las veces necesarias, hasta la eliminación total de la piridina. Es decir, que con la adición del metanol se forma una mezcla azeotrópica con la piridina, facilitando de esta manera su eliminación.

Esta operación de acetilación tiene como finalidad, disminuir la polaridad de los compuestos existentes en el extracto metanólico del tallo y facilitar de esta manera su separación e identificación. La muestra acetilada, se somete a una cromatografía en columna de 55 cm de largo por 1.5 cm de diámetro, previamente ompaquetada con algodón utilizando flug

risil (fluorosilicato) como soporte. Empezando con eluyentes de baja polaridad, e irla aumentando gradualmente (hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, cloruro de metileno), se -recogen fracciones de 50 ml, llevandose el control de las mismas, en las condiciones antes mencionadas.

En las fracciones resultantes de la mezcla de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo 100%, se pudo observar durante el control en placa fina la aparición de manchas que por el color que dan al ser reveladas con sulfato cérico y por el valor de sus Rf, se sospecha que sea el ácido ursólico - sistosterol y el ácido oleanólico.

Se procede aplicar estas mismas fracciones en una -placa preparativa de 20 X 20 cm, utilizando un sistema de hexano - acetato de etilo 60:40, extrayendo posteriormente con acetona, las fracciones obtenidas se analizan nuevamente en cromatografía de placa delgada.

Del segundo extracto de acetato de etilo de la hoja, al ser tratado con la mezcla de cloruro de metileno-metanol 90:10 y al hacer el control en placa fina utilizando como eluyentes hexano - acetato de etilo 60:40, aparece una mancha - que por el color que toma (amarillo obscuro) al ser revelado con sulfato cérico y por su Rf, parece ser un clerodano. Por lo que se procedió a su aislamiento y purificación por cromatografía en placa fina, posteriormente se sometió a un análisis espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear.

3. COMPUESTOS FLAVONOIDES:

De los primeros extractos que se hicieron de la primera recolecta del toronjil blanco, al extracto de acetato de etilo de hojas, se le sometió a una percolación utilizando sílica gel como adsorbente, empleando eluyentes de menor a mayor polaridad, al llegar a la mezcla de cloruro de metileno - metanol - agua 59:32:9; y al ser sometida a un control por cromatografía en placa fina, se observa que en dicha percolación no hubo una buena separación, por lo que la muestra se extrae de la columna y posteriormente se procede a acetilar. Al hacer nuevamente el control, utilizando un sistema de hexano - acetato de etilo 90:10. Se observan cuatro manchas, cuyos Rf permiten ser separados por esta técnica. Por lo tanto, esta misma muestra es aplicada en una placa preparativa de 20 X 20 cm de sílica gel. Sin embargo, una de ellas, la cual tiene un Rf de .27 cm y que da un color amarillo después de revelar con sulfato cérico, se logra extraer una cantidad suficiente para su análisis espectroscópico por ultravioleta.

De la segunda recolecta del toronjil blanco, se hizo un extracto metanol - acuoso el cual se reflujo por cinco horas y luego se concentró en el rotavapor hasta sequedad. Parte de esta muestra es acetilada y la otra es utilizada como referencia.

La muestra acetilada se somete a una cromatografía en columna utilizando sílica gel como adsorbente, empezando con eluyentes de baja polaridad y llevando siempre el control en placa fina. Durante la realización de dicho control de las fracciones de acetato de etilo - metanol 60:40, se puede ob--

servar la aparición de una mancha fluorescente que tiene un color azul intenso, al ser sometida a radiaciones de ultravioleta de onda larga y que da un color amarillo al ser revelada con sulfato cérico. Por lo tanto, se procedió a su aislamiento por cromatografía en placa fina, utilizando como sistema acetato de etilo - hexano 60:40, una vez extraído se somete a un análisis por espectroscopia de ultravioleta.

Para ampliar el estudio de los grupos flavonoides existentes tanto en el toronjil blanco como en el toronjil rojo y poder llevar a cabo de esta manera una mejor comparación entre ambas plantas, se tomaron como base los estudio realizados por Sanders sobre grupos flavonoides de Agastache en general, siguiendo la técnica utilizada por J. Mabry para la identificación de flavonas. Dicha técnica consiste en una cromatografía en papel - bidimensional (en la primera dimensión se utiliza terbutanol-ácido acético- agua 3:1:1 y en la segunda dimensión se utiliza ácido acético acuoso al 15%).

A esta técnica fueron sometidos los extractos metanólicos del tallo del toronjil blanco y del toronjil rojo.

V. RESULTADOS

1. ACEITES ESENCIALES:

a). Primera recolección: En el toronjil rojo se obtiene un aceite de color anaranjado con un aroma penetrante y no muy denso. En el toronjil blanco su aceite es de color amarillo claro, su aroma es más suave y no muy denso.

Ambos se someten a una cromatografía de gases, utilizando un cromatografo Perkin-Elmer modelo "Sigma No.1", equipado con una columna de carbowax 20-M al 20%, utilizando un flujo de nitrógeno a una velocidad de 25ml/min., de la temperatura de la columna se programa de 60 a 180°C, la temperatura del inyector a 60°C y la del detector de ionización de flama a 180°C (cromatograma No.1).

En base al cromatograma obtenido, se puede observar que en el toronjil blanco aparecen un total de 46 componentes de los cuales 11 coinciden con los del toronjil rojo.

Componentes de mayor porcentaje en el toronjil blanco:

- i). Isopulegona
- ii). Pulegona
- iii). α - terpineno
- iv). ρ - cimeno

Componentes comunes entre el toronjil blanco y toronjil rojo:

- i). α - tujeno
- ii). α - pineno
- iii). Sabineno

- iv). β - pineno
- v). Canfeno
- vi). 1,8 - cineol
- vii). Isopulegona
- viii). Guayacol
- ix). Eugenol
- x). β - bisableno
- xi). α - bisableno

NOTA: Los compuestos fueron determinados en base al tiempo de retención del limoneno. Sólo fueron identificados los componentes que se encuentran en un mayor porcentaje bajo la curva.

Para confirmar los resultados anteriores estas mismas muestras se mandaron a cromatografía líquido - líquido de alta presión, utilizando un detector de ultravioleta (254 nm) visible Variscan (Espectro No.2). Y un detector de índice de refracción, utilizando una columna micropak M - CH - 10 en metanol-agua (45:55) a un flujo de 100 ml/hr (Espectro No.3).

En el detector de ultravioleta (detector para componentes flavonoides) se observa, que en el toronjil blanco presenta doce componentes como principales de los cuales tres son comunes con el toronjil rojo (1.0, 1.9, 3.8) que sólo presenta seis componentes.

En el detector de índice de refracción (detector para di y triterpenos) aparecen cuatro componentes como principales (0.5, 0.6, 1.3, 2.7) en el toronjil blanco. Y en el toronjil rojo sólo aparece uno como principal, que no coincide en

tiempo de retencion con ninguno de los que se presenta en el toronjil blanco.

b). Segunda recolección: En el toronjil rojo se obtiene un aceite de color anaranjado claro, con un aroma penetrante y no muy denso. La esencia de hoja y tallo del toronjil blanco es de color amarillo intenso (Cromatograma No.4), la esencia de la flor es de color amarillo pálido y su aroma es más penetrante que la del toronjil rojo (Cromatograma No.5).

En base a los cromatogramas obtenidos, el toronjil blanco presenta treinta y uno componentes de los cuales catorce son comunes con el toronjil rojo.

Componentes de mayor porcentaje en la flor del toronjil blanco:

- i). Isopulegona
- ii). Pulegona
- iii). Citronelal
- iv). Linalol
- v). Acetato de bornilo

Componentes de mayor porcentaje en la hoja y tallo de el toronjil blanco:

- i). Isopulegona
- ii). Citronelal
- iii). Pulegona
- iv). Acetato de linalilo
- v). Linalol
- vi). Acetato de bornilo
- vii). Pineno

Componentes comunes entre el toronjil blanco y el toronjil rojo:

- i). Isopulegona
- ii). Pulegona
- iii). Limoneno
- iv). β -terpineol
- v). α -felandreno
- vi). Linalol
- vii). Geranial
- viii). Neral
- ix). Canfeno
- x). Salicilato de metilo
- xi). α -terpineol
- xii). Acetato de linalilo
- xiii). β -pineno
- xiv). α -pineno

Entre los aceites esenciales no comunes y que se encuentran en un porcentaje considerable son:

Para el toronjil blanco, citronelal, acetato de bornilo, oxido de linalilo. Y para el toronjil rojo, tuyenol, es tragol, antranilato de metilo, tuyona y mentona.

De el cromatograma obtenido despúes del tratamiento con bisulfito de sodio, se pudieron hacer las siguientes observaciones, en comparación con el cromatograma de hoja y tallo inicial (sin tratamiento).

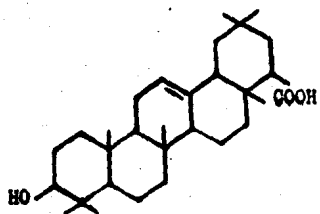
- i). Disminuye citronelal
- ii). Disminuye alcanfor
- iii). Disminuye linalol

- iv). Aumenta isopulegona
- v). Disminuye acetato de bornilo
- vi). Disminuye pulegona
- vii). Aumenta geranial
- viii). Desaparece neral

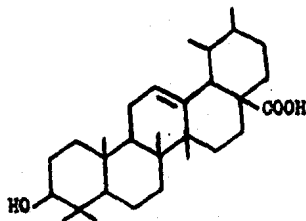
Con el reactivo de Girard se obtuvo lo siguiente:
En la esencia sin tratamiento aparece un total de once componentes y después de la reacción solo aparecen seis.

2. COPUESTOS DI Y TRITERPENOS:

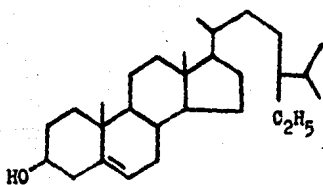
En el análisis por cromatografía en placa fina de las fracciones de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo - 100%, se comprobó realmente que se trataba del ácido ursólico, β - sitosterol, y ácido oleanólico, haciendo uso de estándares de estos mismos.



Ac. Oleanólico



Ac. Ursólico

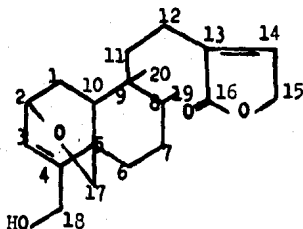


β - Sitosterol

En el análisis espectroscópico por R.M.N. (Espectro No.9), de las fracciones de cloruro de metileno-metanol 90:10, se confirma realmente que se trata de un clerodano (18-hidroxi-2.19-hepoxibiciclo-8-R breviflora lactona).

El aparato que se utilizó es un modelo Varian FT-30A que opera a 90 Mhz para H, en donde los desplazamientos químicos están dados en (p.p.m.) referidos al tetrametil silano como referencia interna, utilizando las siguientes abreviaturas: s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Los datos obtenidos fueron los siguientes:

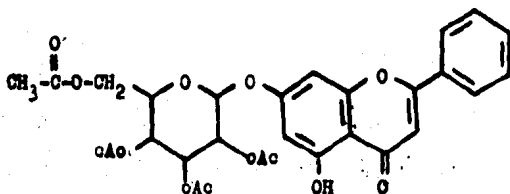
RMP (DCL) 7.05(1H, m, C₁₄); 6.25(1H, dt, C₃); 4.4 (1H, m, C₁₅); 4.25(2H, d, C₁₈); 4.1(1H, d, J = 8.1 Hz, C₁₇) y en 2.85, 1H, d, J = 8.1 Hz, 1H, C₁₇); 1.3(1H, s, C₂₀).



18-hidroxi-2,19, hepoxibiciclo
-8-R - brevifloralactona

3. COMPUESTOS FLAVONOIDES:

Del análisis espectroscópico de ultravioleta resultante del extracto de hoja de acetato de etilo (Espectro No.10) Aparecen tres máximos: 230, 263 y 312 nm utilizando como solvente metanol, dichos picos corresponden al compuesto flavonoide conocido como: Crisina.



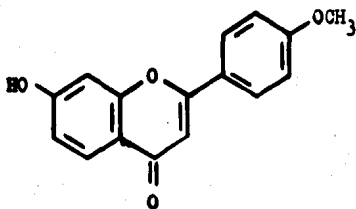
Acetato de crisina

Para confirmar la posición de sustitución en el anillo A, esta misma muestra se somete nuevamente a un análisis -espectroscópico de ultravioleta usando MeOH/HCL y $AlCl_3$ al 6% como solventes (Espectro No.11), obteniéndose los siguientes datos:

MeOH/HCL	Presenta 3 máximos: 269, 296, 389 nm
MeOH/HCL + $AlCl_3$	Presenta 3 máximos: 269, 337, 388 nm

Los resultados anteriores, nos indican la presencia de un sustituyente en la posición 7 (desplazamiento batocrómico).

En base al espectro de ultravioleta obtenido del extracto metanol-acuoso (Espectro No.12), presentan 3 máximos: 245, 280 y 312 en metanol, los cuales corresponden al compuesto conocido como: Pratol.



Pratol

Para confirmar su estructura molecular, se sometió nuevamente a un análisis espectroscópico de ultravioleta en MeOH/HCL + AlCl₃ al 6% y MeONa (Espectros No. 13 y 14), obteniéndose los siguientes datos:

MeOH/HCL	Presenta 3 máximos: 249, 280, 310nm
MeOH/HCL+AlCl ₃	Presenta 3 máximos: 249, 280, 310nm
NaOMe	Presenta 3 máximos: 250, 280, 365nm

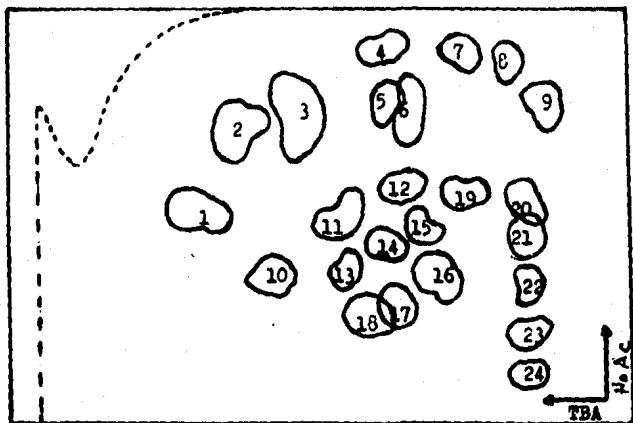
En base a los datos anteriores, se verifica la estructura propuesta ya que no hay desplazamiento de bandas con MeOH/HCL ni con AlCl₃, pero en cambio, sí hay desplazamiento con NaOMe.

Del análisis por cromatografía en papel bidimensional de los extractos metanólicos del tallo (figura No. 3 y 4), se puede observar que existe un mayor número de componentes flavonoides en el toronjil rojo. Sin embargo, en este último por las coloraciones que dan al ser sometidas a radiaciones de ultravioleta de onda larga (amarillo, amarillo-verdoso) se piensa que sean del tipo antocianidinas.

Mientras que en el toronjil blanco predominan manchas de color azul, por lo que se piensa que sean componentes del tipo flavonas, isoflavonas, hidroxiflavonas.

Comparando estos resultados con los de Sanders, tomando como base la posición de las manchas, se observa que para el toronjil rojo coinciden en posición con el Kamferol-3-galactosa, kamferol-3-ramnosa, en tanto que para el toronjil blanco no coincide con ninguno.

Tomando en consideración los estudios realizados por Mabry, el toronjil blanco únicamente coincide con la acacetina-7-O-glucósido y en el toronjil rojo coincide con la acacetina-7-O-glucósido, diosmetina-7-O-glucósido, apigenina y luteolina.



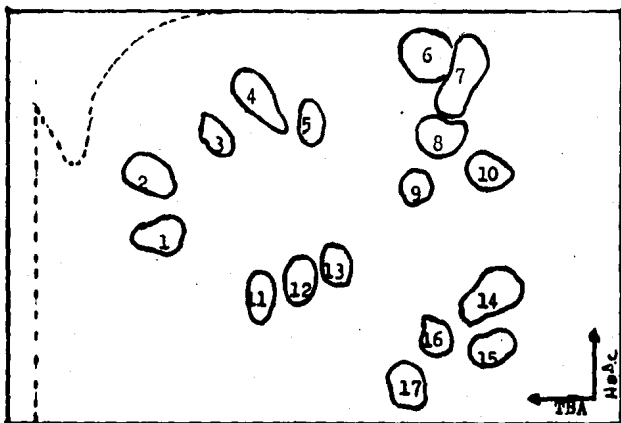
Cromatografía en papel bidimensional del toronjil rojo.

No. de Mancha

Color en U.V.

1	rojo (Acacetina-7-O-G)
2	azul
3	amarillo-verdoso
4	absorción
5	azul
6	amarillo verdoso
7	absorción
8	verde
9	verde
10	azul
11	azul
12	verie
13	rojo
14	amarillo-verdoso
15	amarillo-verdoso
16	azul
17	azul
18	verde
19	azul

(Figura No.3)



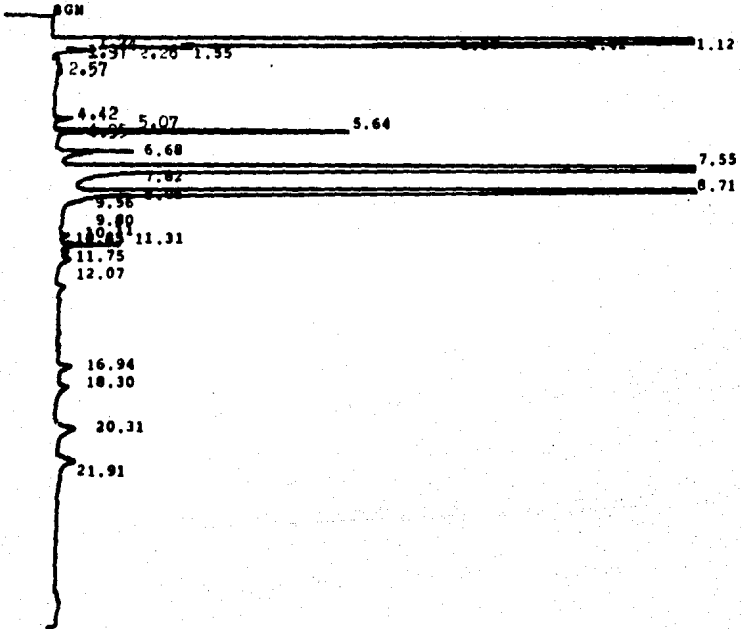
Cromatografía en papel bidimensional del toronjil blanco

<u>No. de mancha</u>	<u>Color en U.V.</u>
1	rojo (Acetina-7-0-6)
2	absorción
3	azul
4	azul
5	azul
6	amarillo-verdoso
7	amarillo-verdoso
8	azul
9	azul
10	azul
11	azul
12	azul
13	azul
14	amarillo-verdoso
15	verde
16	verde
17	verde

(Figura No.4)

VI. ESPECTROS

TORONJIL BLANCO



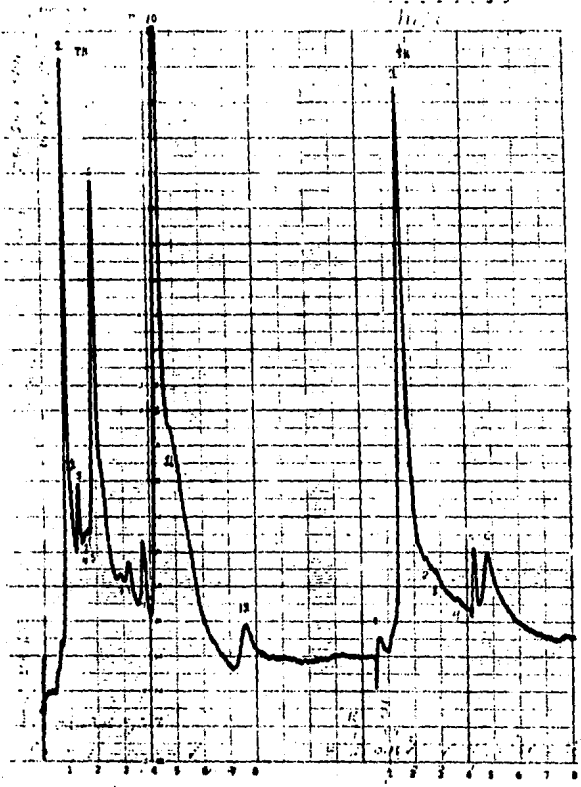
(Cromatograma No.1)

TIEMPO	TRR	C	NOMBRE
1.55	0.63	1.53	α -tuyeno
1.74	0.17	0.81	α -pineno
1.97	0.19	0.09	Sabineno
2.26	0.22	0.29	β -pineno
2.57	0.25	0.97	Canfeno
4.42	0.44	0.08	α -felanireno
4.95	0.49	0.03	1,8-cineol
5.07	0.50	0.38	Limoneno
5.64	0.56	5.10	α -terpineno
6.68	0.66	2.56	β -cimeno
7.55	0.75	44.12	Isopulegona
8.71	0.87	28.73	Pulegona
9.56	0.95	0.28	Citronelal
10.85	1.08	0.47	Guayacol
11.31	1.13	1.47	Eugenol
11.75	1.17	0.38	β -bisaboleno
12.07	1.20	0.65	α -bisaboleno

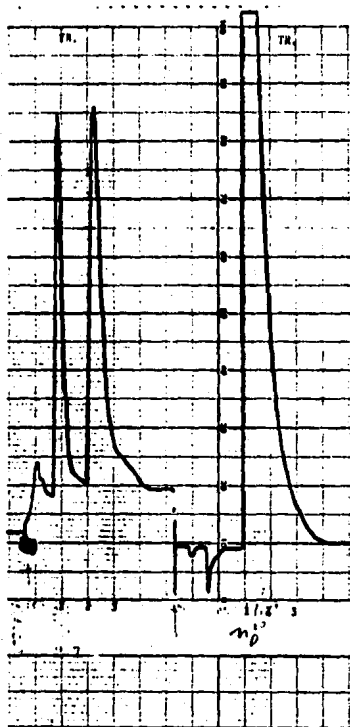
TIEMPO - Minutos

TRR - Tiempo de retención relativo, en base al limoneno.

C - Concentración en % del área bajo la curva.

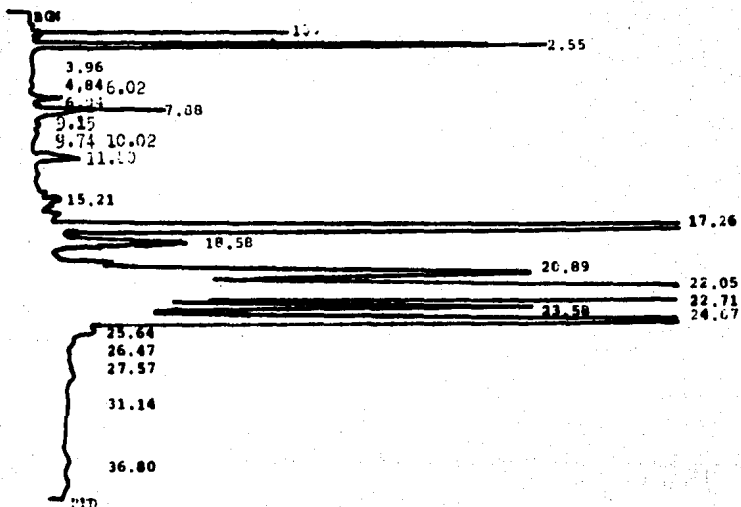


(Espectro No.2)



(Espectro No.3)

TORONJIL BLANCO TALLO-HOJAS



(Cromatogram No.4)

TIEMPO	TRR	C	NOMBRE
2.55	0.32	2.04	α - pineno
3.96	0.50	0.01	Sabineno
4.85	0.61	0.01	β - pineno
5.02	0.76	0.13	Camfeno
6.94	0.88	0.23	α - felanireno
7.88	1.00	1.11	Limoneno
15.21	1.90	0.25	Oxido de linalilo
17.26	2.19	15.99	Citronelal
18.58	2.35	2.01	Alcanfor
20.89	2.65	6.69	Linalol
22.05	2.79	9.88	Acetato de linalilo
22.71	2.88	38.55	Isopulegona
23.58	3.00	4.93	Acetato de bornilo
24.57	3.14	13.97	Pulegona
25.64	3.26	0.68	α - terpineol
26.47	3.35	0.28	Neral
27.57	3.49	0.29	Geranial
31.14	3.95	0.09	Salicilato de metilo
36.20	4.59	0.16	Geraniol

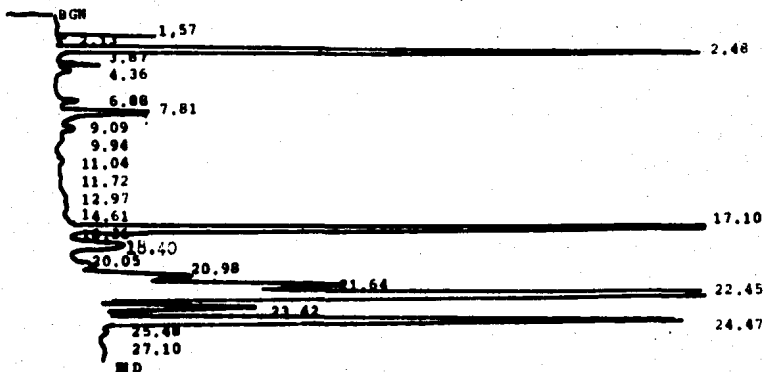
TORONJIL BLANCO FLOR

BGN

Retention Time (min)	Relative Intensity
3.14	2.55
3.78	3.96
4.85	6.02
6.94	6.94
8.73	8.84
10.02	11.80
13.11	15.11
17.22	17.22
18.50	18.50
19.48	20.91
22.08	22.08
22.88	22.88
23.61	23.61
24.76	24.76
25.77	
28.67	

TIEMPO	TRR	G	NOMBRE
2.14	0.27	0.03	α - tuyenol
2.55	0.32	0.11	α - pineno
3.96	0.50	0.08	Sabineno
4.85	0.61	0.18	β - pineno
6.02	0.76	0.13	Camfeno
6.94	0.88	0.93	α - felandreno
7.89	1.00	2.74	Limoneno
9.15	1.16	0.24	α - terpineno
9.73	1.23	0.03	ρ - cimeno
10.02	1.27	0.02	C_8 - aldehido
11.80	1.50	0.58	Terpinoleno
15.11	1.91	0.34	Oxido de linalilo
17.23	2.18	9.95	Citronelal
18.58	2.35	2.29	Alcanfor
20.91	2.65	7.45	Linalol
22.08	2.80	8.04	Acetato de linalilo
22.88	2.90	36.87	Isopulegona
23.61	3.00	4.54	Acetato de bornilo
24.76	3.13	21.77	Pulegona
25.77	3.26	1.39	β - terpineol
28.67	3.63	0.05	α - terpineol

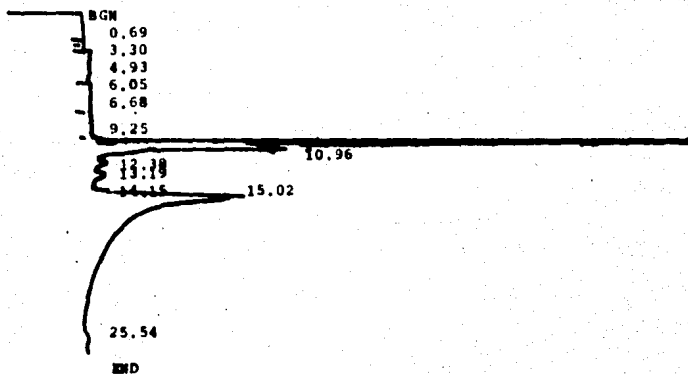
TORONJIL BLANCO TALLOS- HOJAS
 (Tratamiento con bisulfito
 de sodio)



TIEMPO	TRR	C	NOMBRE
2.48	0.49	13.03	Aumenta pineno
17.10	2.18	13.90	Disminuye citronelal
18.40	2.35	1.67	Disminuye alcanfor
20.90	2.69	3.55	Disminuye linalol
22.45	2.87	40.28	Aumenta isopulegona
23.42	2.99	3.59	Disminuye acetato de bornilo
24.47	3.13	11.44	Disminuye pulegona
27.10	3.46	0.46	Aumenta geranial

TORONJIL BLANCO

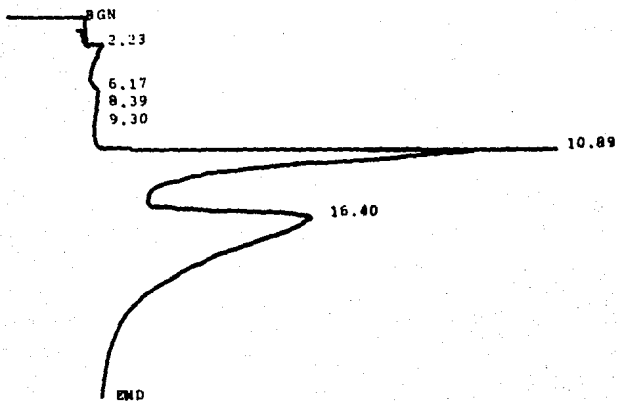
(Referencia)



(Cromatograma No.7)

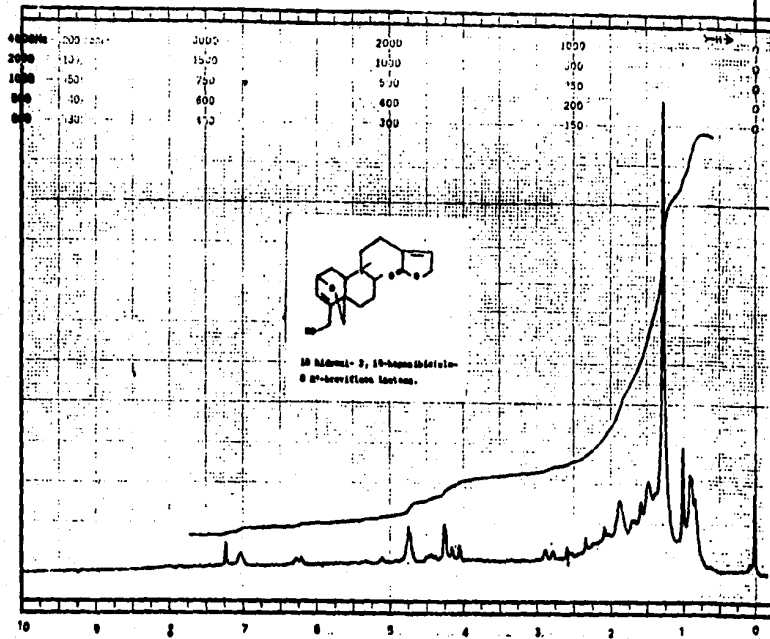
TIEMPO	TRR	C	NOMBRE
3.30	0.49	0.17	Sabineno
4.93	0.73	0.04	Camfeno
6.05	0.90	0.04	α -felandreno
6.68	1.00	0.05	Limoneno
9.25	1.38	0.05	C ₈ - aldehído
10.96	1.64	27.33	Terpinoleno
13.19	1.97	3.32	Oxido de linalilo
15.02	2.24	65.41	Alcanfor
25.54	3.82	0.69	Salicilato de metilo

TORONJIL BLANCO TRATADO CON EL
REAC. DE GIRARD



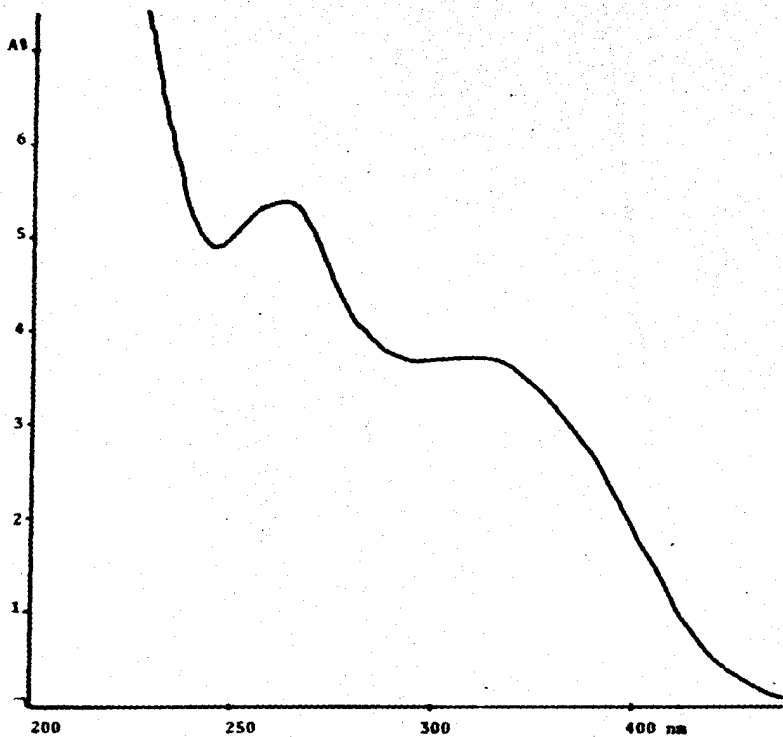
(Cromatograma No.8)

TIEMPO	TRR	C	NOMBRE
6.17	0.61	0.80	α - felandreno
8.39	0.83	0.11	α - terpineno
9.30	0.93	0.12	ρ - cimeno
10.89	1.08	39.43	Terpinoleno
16.40	1.64	58.59	Oxido de linalilo

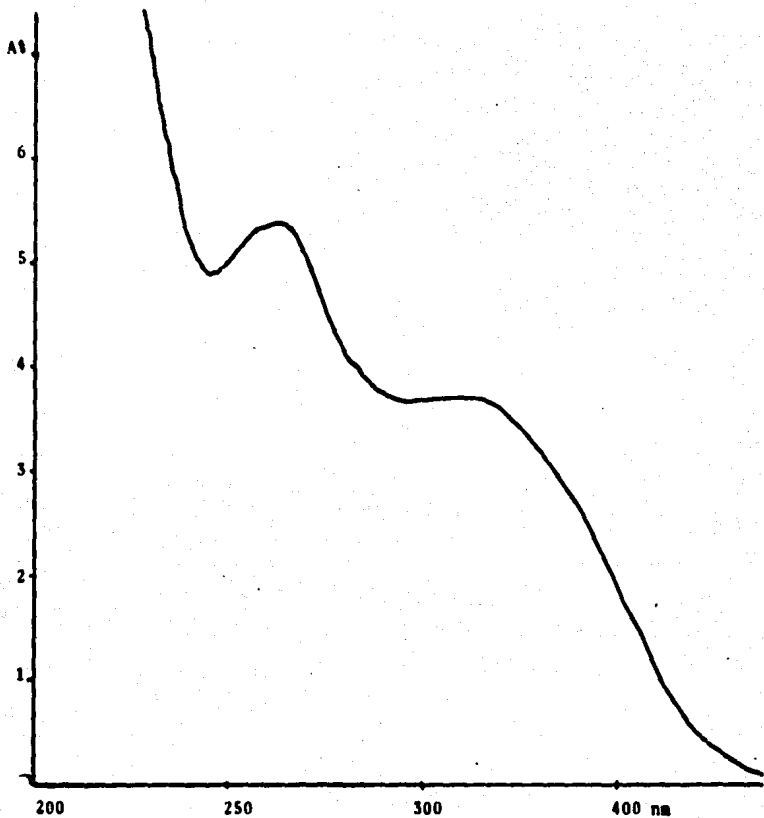


59

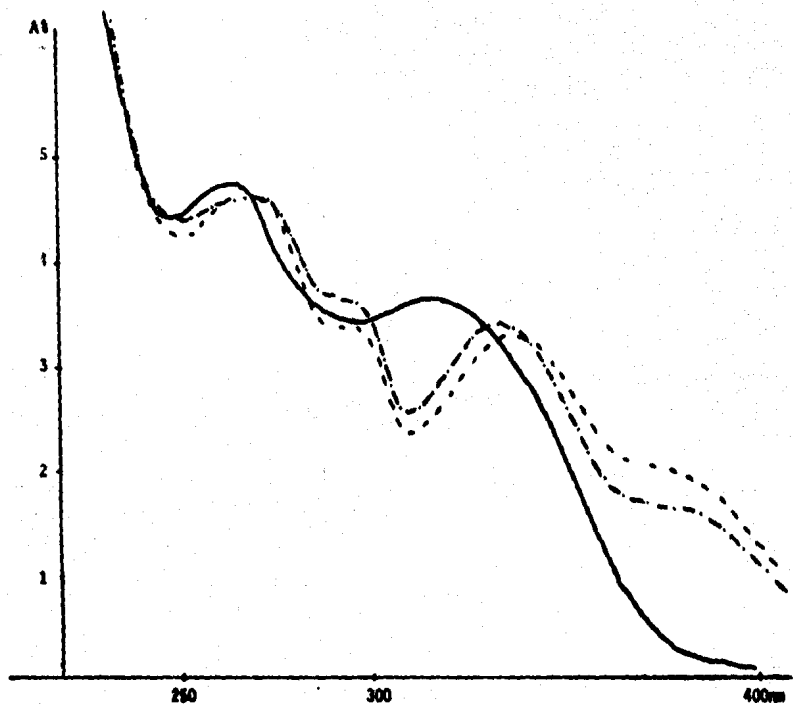
(Espectro No.9)



(Espectro No.10)

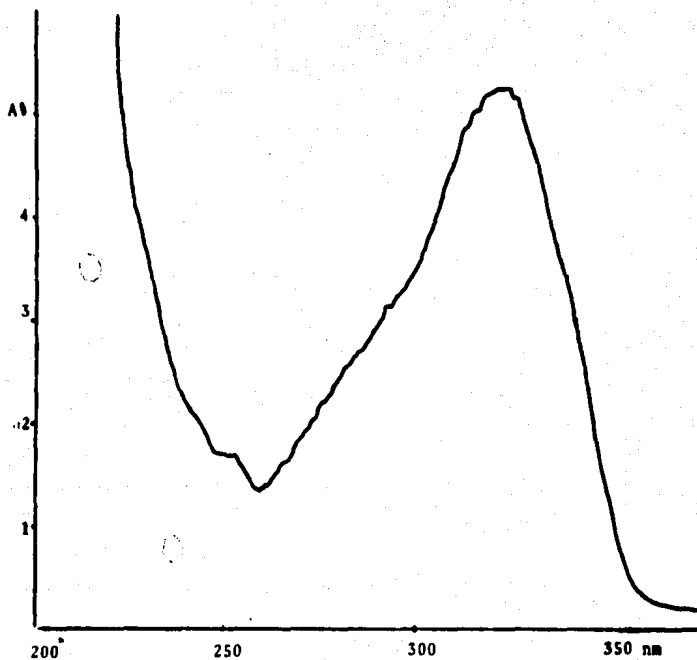


(Espectro No.10)

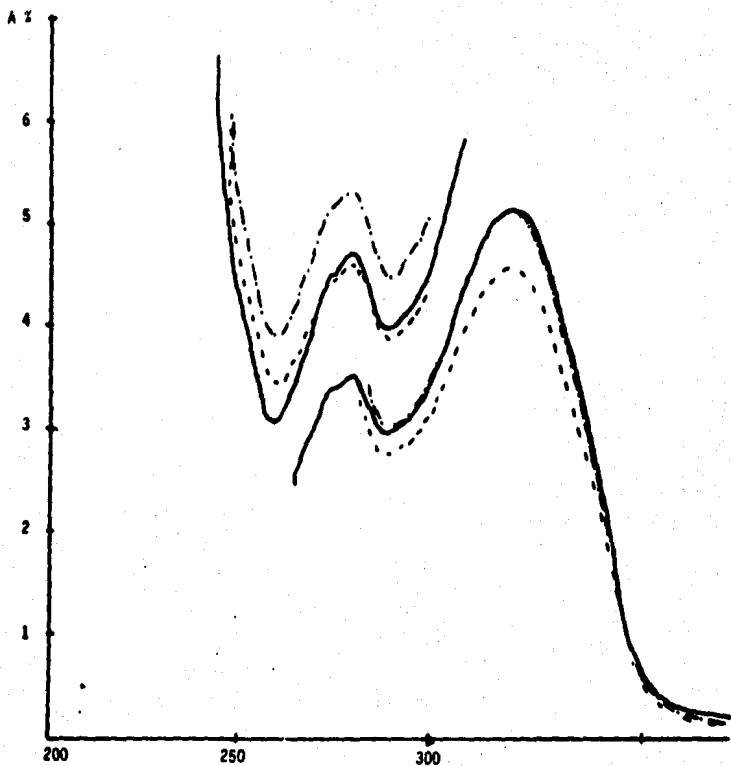


— MeOH
- · - · MeOH / HCl
· · · · AlCl₃

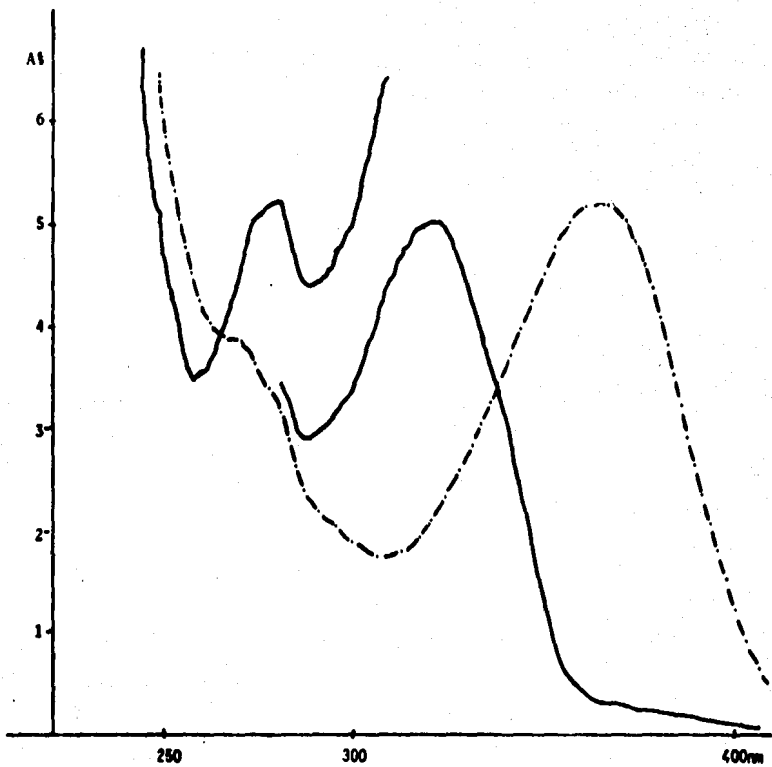
(Espectro No.11)



(Espectro No.12)



— MeOH
- - - MeOH / HCl
- · - · AlCl₃



(Espectro No.14)

VII. DISCUSION DE RESULTADOS

1. Tomando en consideración los resultados anteriores y al compararlos con los reportados por A. Manjarrez y V. Mendoza, creemos que la planta que utilizo en su estudio fué el toronjil rojo. Ya que ellos reportan como componentes principales a la mentona, pulegona y citronelal. En el caso del toronjil rojo, estudiado en forma simultanea con el toronjil blanco de esta tesis contiene: pulegona, isopulegona y mentona como componentes principales.

2. En el toronjil blanco se pudo aislar e identificar un diterpeno (clerodano), este hecho es un factor importante - desde el punto de vista quimictaxonómico ya que este tipo de compuesto es muy común en algunas especies de la familia de las Labiadas, por lo que marca una diferencia quimictaxonómica entre el toronjil blanco y el toronjil rojo, ya que en este último no se pudo aislar e identificar un compuesto similar.

3. En los compuestos flavonoides, se encuentra la crisina y al pratol (aislados e identificados en el toronjil blanco) como componentes diferentes. Esta diferencia fué mucho más marcada en la cromatografía en papel bidimensional, observándose que en el toronjil rojo existe un mayor número de componentes (24). En donde la mayoría de estos, son del tipo: antocianidinas (pelargonidina y cianidina), también fueron aislados e identificados en la flor a sus precursores biogénéticos (proantocianidina, leucoantocianidina y chalcona).

En el caso del toronjil blanco, presenta un menor número de componentes (17) en relación al toronjil rojo, donde la mayoría de ellos son del tipo: flavonas, isoflavonas, dihidroflavonas y flavonoles. Y como componentes comunes se encuen

tra la acacetina-7-O-gucósido. Este grupo también fué comparado con el estudio realizado por Sanders, lo que permite suponer que él no estudio al toronjil blanco, ya que los componentes identificados en el presente trabajo son diferentes a los que él reporto (diosmetina, apigenina-6-7-dimetiléter y luteolina-6-7-dimetiléter), tomando como base la posición de las manchas resultantes de la cromatografía en papel bidimensional.

VIII. CONCLUSIONES

A lo largo del presente trabajo se puede observar que las diferencias quimiotaxonómicas son bastante amplias - en cada uno de los compuestos químicos estudiados, así tenemos:

Que en el estudio de los aceites esenciales de la primera recolecta se tienen como componentes diferentes un total de 63 y en la segunda recolecta un total de 35.

En lo que respecta al grupo de los terpenos, la presencia del clerodano, podría ser un marcador quimiotaxonómico para distinguir entre el toronjil blanco y el toronjil rojo.

Y por último el grupo de los flavonoides, además de los componentes identificados como pratol y crisina, se tienen como componentes diferentes un total de 7 (cromatografía en papel).

Por lo que todo apunta hacia la posibilidad de que se traten de especies diferentes. Por otro lado, el artículo publicado sobre Agastache mexicana¹⁸, en donde se tratan aspectos farmacológicos y morfológicos del toronjil blanco y del toronjil rojo, se encontrarán diferencias entre estas 2 variedades.

Por lo que al toronjil blanco se le ha clasificado como Agastache mexicana subespecie Xolocotxiana.

II. BIBLIOGRAFIA

1. Espiritú, Cruz, L.P. Estudio quimiotaxonómico comparativo entre el toronjil blanco y el toronjil rojo. (téc. sis. et.al.1986). Instituto de Química. UNAM. Mex.D.F
2. R. W. Sanders A sistematyc estudi of Agastache Mexicana na seccion Brittonastrum. (Lamiaceae, Nepetae). Austin Texas, University. 1979.
3. A. Manjarrez y V.Mendoza. The volatile oild of Agastache Mexicana. Contribución No. 225, of Instituto de Química, UNAM, México,D.F.
4. R.Bye Tés curativos de México. Ed Fonart. 1983.
5. Baytelman 1979, Gali 1984, Gonzalez 1981.
6. Gonzales 1981, Sandoval 1977.
7. Ruzicka, L. Experientia 9. 357 (1953)
8. Wolf. D.E. Hoffman, C.H. Aldrch, P.E. Skeggs, H.R., wright L. D. and Folkers, K. J. Am Chem. Soc. 78, 4499 (1956)
9. Tarvovina, P. A., Gibbs, M.H. and Huff, J. W. J. Am. Chem. Soc. 78, 4498, (1956).
10. Tarvovina, P. A. Gibbs, M. H. and Huff, J. W. J. Am. Chem. Soc. 78, 6210, (1956).
11. Braitwaite, G. B. and Goodwin, T. W. Biochem. J. 67, 13 (1957).
12. Folkers, K., Shunk, C. H., Linn, B. O. Robinson, F. M Wittreich, P. E., Symposium of Biosisthesis of terpenes and Steroles, p. 20. J & A. Churchill, Ltd, London. (1959).
13. Tohen, T.T. J. Am Chem. Soc. 19, 63445, (1957).
14. Bloch, K. In Biochemistry of Steroides, p. 50. Proc. 4 th Internatl. Congr. Biochem., Ed. e. Mosseting, Pergamon Press, New York, (1959).
15. Henning, U., Moselein, E. M. and Lynen, F. Arch, Biochem., Ed. E. Mosetting, Pergamon Press, New York, - 1958.

16. Lynen, F. Eggere, H., Henning, J. and Kessel, I. Angew. Chem. 70, 738 (1958).
17. T. J. Mabry., K. R. Markham and M. B. Thomas. The Systematics Identification of flavonoids. Berlin-New York (1978).
18. R. Bye, E. Linares, T. P. Ramamoorthy, F. Garía. O. -- Collera. G. Palomino y V. Corona. Agastache Mexicana - subespecie Xolocotziana (Lamiaceae), A new toxon from the mexican medicinal plants. Contribución No. 04510 - UNAM. México, D.F. 1987.
19. Domínguez, Xorge A., Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa (1979).
20. Peter Bernfeld. Biogénesis of Natural Compounds, Ed. Macmillan Company. (1963).
21. Yoshiro Masada, Analysis of Essential Oils by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Ed. John Wiley & Sons, Inc. (1976).
22. Ernest Guenther, P. H. D. The Essential Oils. Vol. 1. Ed. D. Van Nostrand Company. Inc. (1950).