

00570 /
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA
Hintonia latiflora (Sesse et Mociño ex D.C.) Y AISLAMIENTO
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL Teloxya graveolens**

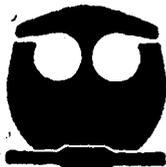
(Willd) W. A. Weber

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-QUIMICA FARMACEUTICA)**

P R E S E N T A :

MA. DEL RAYO CAMACHO CORONA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1

I N D I C E

	Página
LISTA DE TABLAS -----	viii
LISTA DE FIGURAS -----	xiv
LISTA DE ESQUEMAS -----	xvi
LISTA DE ESPECTROS -----	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS -----	xxiv
RESUMEN -----	xxv
INTRODUCCION GENERAL -----	1
OBJETIVO Y JUSTIFICACION GENERAL -----	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS -----	10
CAPITULO I. NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA <u>Hintonia latiflora.</u>	
1. GENERALIDADES ACERCA DE LA <u>Hintonia latiflora.</u>	12
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Material vegetal -----	18
2.2 Métodos de extracción y fraccionamiento	18
2.3 Análisis cromatográficos -----	23
2.4 Aislamiento y purificación de los compues- tos -----	23

	Página
2.4.1 Obtención de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10</u> -----	23
2.4.2 Obtención de β -sitosterol, <u>11</u> -----	23
2.4.3 Obtención de 5-O-[6"-acetil- β -D-galactopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>12</u> -----	24
2.4.4 Obtención de 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13</u> -----	24
2.4.5 Obtención de 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> -----	24
2.4.6 Obtención de 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>15</u> -----	25
2.4.7 Obtención de 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>16</u> -----	25
2.4.8 Obtención de 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> -----	28
2.4.9 Obtención de manitol, <u>9</u> -----	28
2.5 Caracterización de los compuestos aislados -----	28

Página

2.5.1	Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	28
2.5.2	Prueba de Molish para carbohidratos -----	29
2.5.3	Hidrólisis enzimática de los compuestos <u>13</u> y <u>14</u> con celulosa -----	30
2.5.4	Hidrólisis enzimática de <u>13</u> y <u>14</u> con β -glucosidasa y β -galactosidasa respectivamente -----	31
2.5.5	Hidrólisis ácida de <u>14</u> -----	32
2.5.6	Hidrólisis ácida del compuesto <u>17</u> -	32
2.5.7	Obtención de derivados acetilados-	33
2.5.8	Obtención de derivados metilados -	34
2.5.9	Obtención de 7,4',5'-trihidroxí-4-fenil-5,2'-oxidocumarina, <u>17D</u> , a partir de la 5,7,3',4'-tetrahidroxí-4-fenilcumarina, <u>17A</u> -----	35
2.6	Evaluación biológica <u>in vitro</u> de los compuestos obtenidos de la <u>H. latiflora</u> ----	36
2.6.1	Determinación de la toxicidad <u>in vitro</u> contra <u>Artemia salina</u> GRAY -	36
2.6.2	Determinación de la actividad anti palúgica -----	37

	Página
2.6.3 Actividad antimicrobiana -----	37
3.0 RESULTADOS Y DISCUSION -----	38
3.1 Identificación de la 3- <u>Q</u> -β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13</u> ----	40
3.2 Identificación de la 5- <u>Q</u> -β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> -----	65
3.3 Identificación de 5- <u>Q</u> -[6"-acetoxi-β-D-galactopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>12</u> ; 5- <u>Q</u> -β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>15</u> y 5- <u>Q</u> -β-D-glucopiranosil-3,4-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>16</u> -----	86
3.4 Identificación de 5- <u>Q</u> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> --	99
3.5 Identificación 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10</u> -----	123
3.6 Identificación del β-sitosterol, <u>11</u> -----	137
3.7 Identificación del manitol, <u>9</u> -----	137
3.8 Ensayos biológicos -----	137
4.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES -----	139

CAPITULO II. AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

DEL Teloxys graveolens.

1.0	GENERALIDADES DEL <u>Teloxys graveolens</u> -----	141
2.0	GENERALIDADES DE <u>Ascaridia galli</u> , <u>Fasciola hepatica</u> y <u>Stomoxys calcitrans</u> -----	144
3.2	MATERIALES Y METODOS	
3.1	Material vegetal -----	148
3.2	Determinación de la toxicidad para el crustáceo <u>Artemia salina</u> -----	148
3.3	Métodos de Extracción -----	148
3.4	Fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico -----	150
3.5	Separación de los constituyentes de las fracciones activas del extracto acetónico--	150
3.5.1	Obtención de la 5,7-dihidroxi- flavanona (pinocembrina) <u>19</u> -----	154
3.5.2	Obtención de la mezcla I -----	154
3.5.3	Obtención de la 5-hidroxi-flavona--	155
3.6	Separación de los constituyentes de las fracciones inactivas del extracto acetónico	155
3.6.1	Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxi- flavanona (pinostrobina) <u>18</u> -----	155
3.6.2	Obtención de la 5,7-dihidroxi-flavo- na (crisina) <u>20</u> -----	156
3.6.3	Obtención del 3- β -glucositosterol --	156

3.7	Fraccionamiento del extracto hexánico -----	156
3.7.1	Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxi- flavanona (Pinostrobina) <u>18</u> -----	157
3.7.2	Obtención del Estigmasterol <u>21</u> -----	157
3.7.3	Obtención del Estigmast-22-en-3-ol, <u>22</u> --	157
3.7.4	Obtención del β -sitosterol, <u>11</u> -----	157
3.8	Caracterización de los compuestos aislados ----	157
3.8.1	Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	157
3.8.2	Preparación de los derivados -----	158
3.9	Evaluación <u>in vitro</u> del efecto ovicida, larvici- da y fasciolicida de la pinocembrina -----	161
3.9.1	Evaluación del efecto ovicida de la pi- nocembrina -----	161
3.9.2	Evaluación del efecto larvicida de la pinocembrina -----	162
3.9.3	Evaluación del efecto fasciolicida de la pinocembrina -----	164
3.10	Análisis estadístico y cálculo del porcentaje de efectividad -----	165
4.0	RESULTADOS Y DISCUSION -----	166
4.1	Obtención de la pinocembrina del extracto acetó- nico del <u>T.graveolens</u> -----	166
4.2	Determinación de la actividad ovicida, larvicida y fasciolicida <u>in vitro</u> de la pinocembrina ----	177

	Página
4.2.1 Actividad ovicida de la pinocembrina -----	177
4.2.2 Actividad fasciolicida de la pinocem- brina -----	181
4.2.3 Actividad larvicida de la pinocembrina ---	181
5.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES -----	185
6.0 RECOMENDACIONES -----	186
APENDICE 1 -----	187
APENDICE 2 -----	191
BIBLIOGRAFIA -----	195

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Especies del género <u>Hintonia</u> -----	14
Tabla 3. Otros usos medicinales de la <u>Hintonia latiflora</u> -----	16
Tabla 2. Constituyentes del complejo "Copalchi"-	15
Tabla 4. Metabolitos secundarios descritos en el género <u>Hintonia</u> -----	17
Tabla 5. Sistemas de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina -----	21
Tabla 6. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo resultante de la partición del extracto metanólico de la corteza de <u>H. latiflora</u> -----	22
Tabla 7. Resumen de la separación vía cromatografía en columna de las aguas madres de las fracciones 252-258 de la columna original -----	26
Tabla 8. Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 365-470 de la columna original -----	27

	Página
Tabla 9. Hidrólisis enzimática de los compuestos <u>13</u> y <u>14</u> -----	31
Tabla 10. Hidrólisis ácida de los compuestos <u>12</u> , <u>14</u> , <u>15</u> , <u>16</u> y <u>17</u> -----	33
Tabla 11. Derivados acetilados obtenidos en el presente capítulo -----	34
Tabla 12. Derivados metilados obtenidos en la presente sección -----	35
Tabla 13. Rendimiento de los compuestos aislados de la <u>H. latiflora</u> -----	40
Tabla 14. Constantes físicas y espectroscópicas de la 3- <u>O</u> - β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13</u> -----	51
Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acetilado de la 3- <u>O</u> - β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13B</u> -----	52
Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13A</u> -----	53
Tabla 17. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acetilado de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13C</u> -----	54

Tabla 18.	Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos base de oxígeno del glucósido <u>13</u> y de su aglicona <u>13A</u> -	46
Tabla 19.	Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>O</u> - β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> --	72
Tabla 20.	Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>O</u> - β -D-tetraacetilgalactopiranosil-4'-acetoxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14B</u> -----	73
Tabla 21.	Constantes físicas y espectroscópica de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14A</u> -----	74
Tabla 22.	Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>O</u> - β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina, <u>14C</u> -----	75
Tabla 23.	Constantes físicas y espectroscópicas de <u>12</u> , <u>15</u> , <u>16</u> y su aglicona -----	87
Tabla 24.	Desplazamientos químicos (δ) en RMN'H de los compuestos <u>12</u> , <u>15</u> , <u>16</u> y su aglicona -----	88
Tabla 25.	Constantes físicas y espectroscópicas de la 5- <u>O</u> - β -D-glucopiranosil-7,3',5'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> -----	103

<p>Tabla 26. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-tetraacetoxi-glucopiranosil-7,3',4'-triacetoxi-4-fenilcumarina, <u>17B</u> -----</p>	<p>104</p>
<p>Tabla 27. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>17A</u> -----</p>	<p>105</p>
<p>Tabla 28. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina, <u>17D</u> -----</p>	<p>106</p>
<p>Tabla 29. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcumarina, <u>17C</u> -----</p>	<p>107</p>
<p>Tabla 30. Constantes físicas y espectroscópicas de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona (7-metil-Luteolina) <u>10</u> -----</p>	<p>126</p>
<p>Tabla 31. Constantes físicas y espectroscópicas de 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-flavona, <u>10B</u> -----</p>	<p>127</p>
<p>Tabla 32. Constantes físicas y espectroscópicas de 3',4'-diacetoxi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10A</u> -----</p>	<p>128</p>
<p>Tabla 33. Metabolitos secundarios descritos en el <u>Teloxys graveolens</u> -----</p>	<p>143</p>

	Página
Tabla 34. Resumen del fraccionamiento biodirigido vía cromatografía en columna del extrac- to acetónico del <u>T. graveolens</u> -----	151
Tabla 35. Recromatografía en columna de las frac- ciones cromatográficas más activas (180-569) del extracto acetónico -----	152
Tabla 36. Recromatografía en columna de las frac- ciones cromatográficas más activas (570-612) del extracto acetónico -----	153
Tabla 37. Rendimiento de los compuestos aislados del <u>T. graveolens</u> -----	159
Tabla 38. Toxicidad* de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extrac- to acetónico del <u>T. graveolens</u> para A. salina	166
Tabla 39. Toxicidad* de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto ace- tónico del <u>T. graveolens</u> -----	167
Tabla 40. Toxicidad de las fracciones obtenidas de la recromatografía en columna sobre gel de sí- lice de las fracciones más activas (180-569)	168
Tabla 41. Toxicidad* de las fracciones obtenidas de la recromatografía en columna sobre gel de sí- lice de las fracciones más activas (570-612)	169

	Página
Tabla 42. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina), <u>19</u>	170
Tabla 43. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7-diacetoxi-flavanona, <u>19B</u> -----	171
Tabla 44. Eficacia de la pinocembrina contra larvas de <u>A. galli</u>	178
Tabla 45. Análisis de varianza del efecto ovicida de la pinocembrina	179
Tabla 46. Actividad fasciolicida de la pinocembrina expresada en porcentaje de mortalidad ----	181
Tabla 47. Eficacia de la pinocembrina sobre larvas de <u>S. calcitrans</u>	183
Tabla 48. Análisis de varianza del efecto larvicida de la pinocembrina	184

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desarrollo de los crustáceos durante 48 horas. -----	4
Figura 2. Preparación de las muestras. -----	4
Figura 3. Bioensayo. -----	4
Figura 4. Estructuras de la Asimicina <u>1</u> , la bulatacina <u>2</u> , y la bulatacinona <u>3</u> ----	5
Figura 5. Metabolitos secundarios aislados de la <u>Hintonia latiflora</u> -----	39
Figura 6. Fragmentos más importantes del espectro de masas de la 23,24-dihidrocucurbitacina F -----	47
Figura 7. Región comprendida entre 3-5 ppm de los espectros de RMN'H de los derivados <u>13B</u> y <u>13C</u> -----	48
Figura 8. Experimento de desacoplamiento para <u>13B</u> -----	49
Figura 9. Comparación de la región donde resuenan los protones base de acetato de <u>13B</u> y del derivado acetilado de la 25-acetil-2-O- β -D-glucopiranosilcucurbitacina F -----	50

	Página
Figura 10. Región aromática del espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ de <u>14B</u> -----	67
Figura 11. Estructura del compuesto <u>14B</u> y efecto protector del 4'arilo sobre el sustituyente en la posición C-5 de la arilcumarina -----	68
Figura 12. Patrón de fragmentación de <u>14A</u> -----	70
Figura 13. Metilación de la 5-O- -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina	71
Figura 14. Obtención de la 5-O- -D-glucopiranosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcumarina <u>17C</u> -----	102
Figura 15. Patrón de fragmentación de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10</u> -----	125
Figura 16. Estructuras de los compuestos aislados del <u>T. graveolens</u> -----	160

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
Esquema 1. Extracción de la corteza de <u>H. latiflora</u> -----	19
Esquema 2. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de la <u>H. latiflora</u> ----	20
Esquema 3. Extracción de las partes aéreas de <u>Teloxys graveolens</u> Willd -----	149

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1.	Espectro de UV de la 3- <u>O</u> -β-D-gluco- piranosil-23,24-dihidrocucurbitaci- na F, <u>13</u> -----	55
Espectro 2.	Espectro de IR de la 3- <u>O</u> -β-D-gluco- piranosil-23,24-dihidrocucurbitaci- na F, <u>13</u> -----	56
Espectro 3.	Espectro de RMN ¹³ C en piridina de la 3- <u>O</u> -β-D-glucopiranosil-23,24- dihidrocucurbitacina F, <u>13</u> -----	57
Espectro 4.	Espectro de RMN'H en piridina de la 3- <u>O</u> -β-D-glucopiranosil-23,24-di- hidrocucurbitacina F, <u>13</u> -----	58
Espectro 5.	Espectro de IR del derivado aceti- lado de la 3- <u>O</u> -β-D-glucopiranosil- 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13B</u> -	59
Espectro 6.	Espectro de RMN'H en CDCl ₃ del de- rivado acetilado de la 3- <u>O</u> -β-D- glucopiranosil-23,24-dihidrocucur- bitacina F, <u>13B</u> -----	60
Espectro 7.	Espectro de IR de la 23,24-dihidro- cucurbitacina F, <u>13A</u> -----	61

	Página
Espectro 9. Espectro de RMN ¹³ C en piridina de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13A</u> -----	62
Espectro 10. Espectro de IR del derivado acetilado de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13 C</u> -----	63
Espectro 11. Espectro de Masas del derivado acetilado de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13C</u> -----	
Espectro 12. Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del derivado acetilado de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>13C</u> -----	64
Espectro 13. Espectro de UV de la 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> -----	76
Espectro 14. Espectro de IR de la 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> -----	77
Espectro 15. Espectro de RMN ¹ H en DMSO-d ₆ de la 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14</u> -----	78
Espectro 16. Espectro de IR de la 5-O-β-D-tetraacetil-galactopiranosil-4'-acetoxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14B</u> -----	79

Espectro 17.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 de la 5-O- β -D-tetraacetyl-galactopiranosil-4'-acetoxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14B</u> -----	80
Espectro 18.	Espectro de IR de la 5,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>14A</u> -----	81
Espectro 19.	Espectro de Masas de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>14A</u> -----	
Espectro 20.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 de la 5,4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, <u>14A</u> -----	82
Espectro 21.	Espectro de IR de la 5-O- β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina, <u>14C</u> -----	83
Espectro 22.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 de la 5-O- β -D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina -----	85
Espectro 23.	Espectro de IR de la 5-O-[6"-acetil- β -D-galactopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>12</u> -----	89
Espectro 24.	Espectro de RMN'H en piridina- d_5 de la 5-O-[6"-acetil- β -D-galactopiranosil]-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>12</u> -----	90

Espectro 25.	Espectro de IR de la 5- <u>0</u> -β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>15</u> -----	92
Espectro 26.	Espectro de RMN'H en CDCl ₃ -d ₆ de la 5- <u>0</u> -β-D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>15</u> -----	93
Espectro 27.	Espectro de IR de la 5- <u>0</u> -β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>16</u> -----	95
Espectro 28.	Espectro de RMN'H en CDCl ₃ -DMSO-d ₆ de la 5- <u>0</u> -β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>16</u> -----	96
Espectro 29.	Espectro de IR de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina --	97
Espectro 30.	Espectro de RMN'H en CDCl ₃ -DMSO-d ₆ de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina -----	98
Espectro 31.	Espectro de Masas de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina --	
Espectro 32.	Espectro de UV de la 5- <u>0</u> -β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> -----	107

	Página
Espectro 33. Espectro de IR de la 5- <u>O</u> - β -D-gluco- piranosil-7,3',4'-trihidroxi-4- fenilcumarina, <u>17</u> -----	108
Espectro 34. Espectro de Masas de 5- <u>O</u> - β -D-gluco- piranosil-7,3',4'-trihidroxi-4- fenilcumarina, <u>17</u> -----	
Espectro 35. Espectro de RMN'H en DMSO de la 5- <u>O</u> - β -D-glucopiranosil-7,3',4'-tri- hidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> -----	109
Espectro 36. Espectro de RMN ¹³ C en DMSO-d ₆ de la 5- <u>O</u> - β -D-glucopiranosil-7,3',4'-tri- hidroxi-4-fenilcumarina, <u>17</u> -----	113
Espectro 37. Espectro de IR de la 5- <u>O</u> - β -D-tetra- acetoxi-glucopiranosil-7,3',4'-tri- acetoxi-4-fenilcumarina, <u>17B</u> -----	115
Espectro 38. Espectro de RMN'H en CDCl ₃ de la 5- <u>O</u> - β -D-tetraacetoxi-glucopiranosil- 7,3',4'-triacetoxi-4-fenilcumarina, <u>17B</u> -----	116
Espectro 39. Espectro de IR de la 5,7,3',4'-tetra- hidroxi'4'fenilcumarina, <u>17A</u> -----	117
Espectro 40. Espectro de Masas de la 5,7,3',4'-te- tra hidroxi-4-fenilcumarina, <u>17A</u> ---	

Espectro 41.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 5,7,3',3'-tetra- hidrox-4-fenil- cumarina, <u>17A</u> -----	118
Espectro 42.	Espectro de IR de 7,4',5'-trihidro- xi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina, <u>17D</u> -----	119
Espectro 43.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil- 5,2'-oxidocumarina, <u>17D</u> -----	120
Espectro 44.	Espectro de IR DE 5-O- β -D-glucopi- ranosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenil- cumarina, <u>17C</u> -----	121
Espectro 45.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3', 4'-trimetoxi-4-fenilcumarina, <u>17C</u> -	122
Espectro 46.	Espectro de IR de la 5,3',4'-tri- hidrox-7-metoxi-flavona, <u>10</u> -----	129
Espectro 47.	Espectro de Masas de la 5,3',4'- trihidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10</u> ---	
Espectro 48.	Espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi- flavona, <u>10</u> -----	130

Espectro 49 .	Espectro de UV de la 5,3',4'-tri-acetoxi-7-metoxi-flavona, <u>10B</u> -----	
Espectro 50 .	Espectro de IR de la 5,3',4'-tri-acetoxi-7-metoxi-flavona, <u>10B</u> -----	132
Espectro 51 .	Espectro de Masas de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-flavona, <u>10B</u> --	
Espectro 52 .	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ de la 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-flavona, <u>10B</u> -----	133
Espectro 53 .	Espectro de UV de la 3',4'-diaceto-xi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10A</u> -	134
Espectro 54 .	Espectro de IR de la 3',4'-diaceto-xi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10A</u> -	135
Espectro 55 .	Espectro de Masas de la 3',4'-di-acetoxi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10A</u> -----	
Espectro 56 .	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ de la 3',4'-diacetoxi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona, <u>10A</u> -----	136
Espectro 57 .	Espectro de IR de la 5,7-dihidroxi-flavona, <u>19</u> -----	172
Espectro 58 .	Espectro de RMNH en DMSO-d ₆ de la 5,7-dihidroxi-flavanona, <u>19</u> -----	173
Espectro 59 .	Espectro de RMN ¹³ C en DMSO-d ₆ de la 5,7-dihidroxi-flavanona, <u>19</u> -----	175

LISTA DE ABREVIACIONES

D ₂ O:	agua deuterada
TMS:	Tetrametilsilano
CDCl ₃ :	cloroformo deuterado
DMSO-d ₆ :	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
Piridina-d ₅ :	Piridina pentadeuterada
EMIE:	Espectro de masas obtenido por impacto electrónico
EMIQ:	Espectro de masas obtenido por ionización química
IR:	Infrarrojo
UV:	Ultravioleta
RMN'H:	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C:	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
s:	singulete
d:	doblete
dd:	doble de doble
m:	multiplete
t:	triplete
J:	Constante de acoplamiento
MHz:	Mega Hertz
Hz:	Hertz
PF:	punto de fusión
F.M.:	Fórmula molecular
P.M.:	Peso molecular
ppm:	partes por millón
δ:	desplazamiento en ppm

RESUMEN

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional, se realizó el estudio fitoquímico de las especies Hintonia latiflora (Sesse et. Mociño D.C.) Bullock y Teloxys graveolens (Willd) W.A. Weber.

El estudio fitoquímico convencional del extracto metanólico de la corteza de la Hintonia latiflora, permitió el aislamiento y caracterización de los siguientes compuestos: el β -sitosterol, 11; el manitol, 9; la 7-metil-luteolina, 10; la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13; la 5-O-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 12; la 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 15; la 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 16; la 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 14 y la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 17. Los compuestos 13 y 14 representan nuevos productos naturales. El compuesto 16 presentó moderada actividad antipalúdica (IC_{50} =12.5 ppm).

El estudio fitoquímico biodirigido mediante la determinación de la toxicidad para Artemia salina de los extractos hexánico y acetónico del Teloxys graveolens permitió el aislamiento del componente bioactivo pinocembrina, 19 (LC_{50} =8.2 ppm); también se demostró su actividad potencial larvicida sobre Stomoxys calcitrans y antihelmíntica sobre Fasciola hepática y A.galli.

INTRODUCCION GENERAL

La búsqueda de nuevos agentes medicinales a partir de fuentes naturales vegetales constituye una de las metas más importantes en el área de la Química Farmacéutica. La selección de las fuentes potenciales se realiza con base en numerosos criterios, entre los cuales destacan: el azar, consideraciones de tipo quimiotaxonómico y el uso popular de numerosas plantas en diferentes regiones del mundo. Es importante resaltar que la selección de plantas potenciales utilizando como criterio el uso tradicional es un hecho bien documentado y que ha permitido el hallazgo de importantes fármacos (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1980; Farnsworth, 1980; Bingel, 1977; Galeffi, 1980; Fairbairn, 1980; Salemink, 1980; inter alia).

Una vez seleccionadas las fuentes potenciales se procede a la investigación de las mismas siguiendo para ello estudios fitoquímicos biodirigidos o convencionales (Powel y Smith, 1980; Cancer Treatment Rep, 1976; Douros y Suffness, 1978; Wall y Wani, 1977; Spjut, 1985; Geran, et al, 1972; Suffnes y Douros, 1979; Ferrigni, et al, 1984; Powel, et al, 1987; Tantishaiyakul, et al, 1986; Hui, et al, 1986; Wang, et al, 1988; inter alia). El primer método tiene la ventaja de permitir el aislamiento de sustancias bioactivas, aún cuando éstas se encuentren presentes en pequeñas cantidades y que de otra forma no pueden ser detectadas. Además, re-

sulta mucho más conveniente para el fitoquímico ya que le ahorra el trabajo de aislar un mayor número de compuestos que probablemente no tengan actividad biológica. Es de hacer notar que la implementación de esta estrategia implica un trabajo multidisciplinario en el cual deben participar biólogos, farmacólogos y otros especialistas competentes para la realización de los ensayos biológicos específicos. De manera alternativa, durante la última década se han utilizado ensayos sencillos de fácil implementación por el fitoquímico y que permiten destacar en forma preliminar algunas actividades biológicas de mayor complejidad. De entre éstos destaca por su economía y sencillez la determinación de la letalidad o toxicidad de extractos, fracciones o sustancias puras para el crustáceo Artemia salina (Meyer, et al, 1982). En general, los compuestos bioactivos son tóxicos en dosis bajas, por lo tanto la toxicidad de extractos vegetales para el organismo antes mencionado puede ser empleado como una guía para conducir el fraccionamiento y aislamiento de sustancias bioactivas.

El método consiste en evaluar extractos, fracciones o compuestos puros en concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm. Posteriormente, a cada vial conteniendo la concentración adecuada del material se le adiciona un volumen determinado de medio salino y 10 larvas del crustáceo con 48 horas de desarrollo. Al cabo de 24 horas se cuentan los organismos sobrevivientes, se determina el porcentaje de mortalidad

de cada dosis; finalmente se determina la dosis letal media mediante regresión lineal (ver Figuras 1, 2 y 3).

La toxicidad para el organismo antes mencionado ha correlacionado, en múltiples ocasiones, con citotoxicidad in vitro para células cancerosas (Ferrigni, et al, 1982; Meyer, et al, 1982; Hui, et al, 1989; Ferrigni, et al, 1984; Gill, et al, 1987; Powel, et al, 1987; Anderson, et al, 1988; Wang, et al, 1988; Hui, et al, 1986; inter alia). Un ejemplo reciente del empleo de este ensayo para el aislamiento de sustancias bioactivas lo constituye la obtención de las novedosas acetogeninas, asimicina (Patente: NSC No. 609700) 1, bulatacina (estereoisómero de la asimicina) 2 y bulatacinona, 3 (Hui, et al, 1989). La primera, se aisló de Asimina triloba y las dos últimas de Annona bullata, ambas pertenecientes a la familia de las Anonáceas (Figura 4). La asimicina, además de presentar toxicidad para A. salina ($LC_{50} = 0.03$ ppm), fue tóxica para las células 9KB ($DE_{50} < 10^{-5}$ $\mu\text{g/ml}$); 9PS ($DE_{50} < 10^{-7}$ $\mu\text{g/ml}$); 9ASK (10 $\mu\text{g/ml}$) y 3PS (0.22 mg/Kg en ratones) y también presentó actividad antipalúdica, insecticida y nematocida. Fue muy potente in vitro contra varios tipos de cáncer humano, pero su actividad no fue selectiva, ya que fue tóxica para todas las líneas celulares a bajas concentraciones, mientras que la bulatacina y la bulatacinona mostraron toxicidad selectiva en líneas celulares de tumores

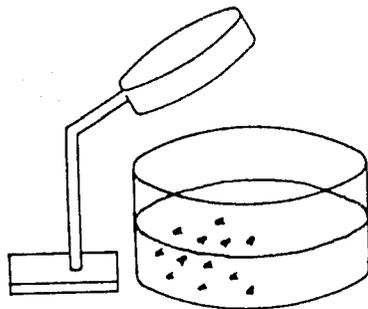


Figura 1. Desarrollo de los Crustáceos durante 48 horas

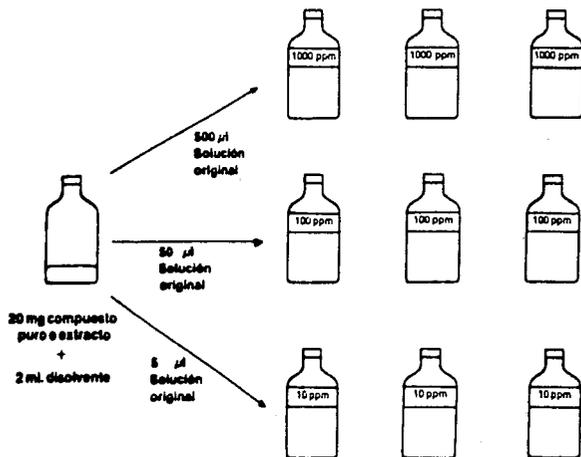


Figura 2. Preparación de las muestras

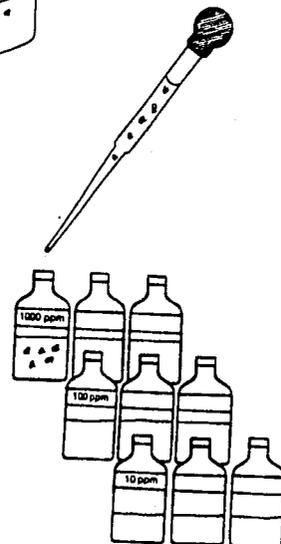
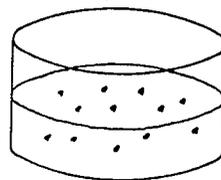


Figura 3. Bioensayo

humanos. En otras células susceptibles (9PS y 9KB) los valores medio de inhibición del crecimiento celular (DE_{50}) fueron de 10^{-12} - 10^{-15} $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La bulatacina al igual que su estereoisómero mostraron actividad insecticida mientras que la bulatacinona no.

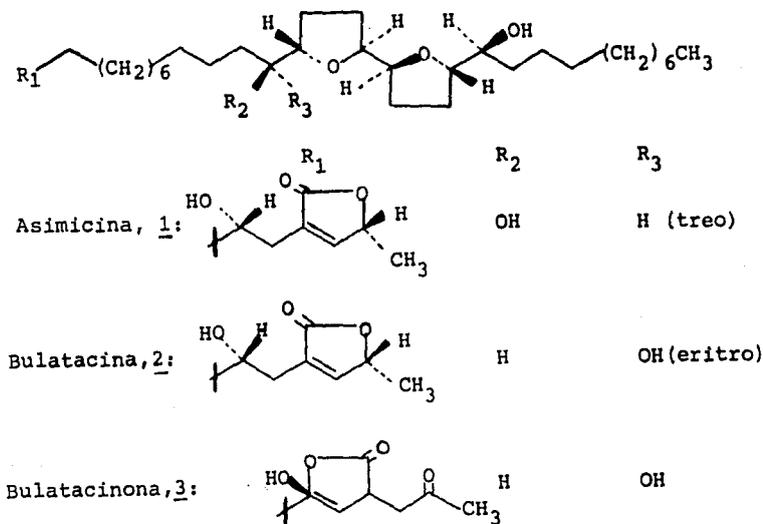


Figura 4. Estructuras de la asimicina 1, la bulatacina 2 y la bulatacinona 3.

Otro biensayo simple que ofrece también numerosas ventajas en la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos es el de la inhibición de las agallas inducidos por Agrobacterium tumefaciens en la papa.

(Kahl, et al, 1982; Zaenen, et al, 1974; Chilton, et al, 1980; Ream, et al, 1982; Chilton, 1983; inter alia). La utilidad del método radica en que la formación de algunos tumores en plantas y animales implica la incorporación de ácidos nucleicos extraños y muchas sustancias pueden impedir la iniciación de estos tumores o inhibir su crecimiento. En 1980 Galsky, et al., demostró que existía una buena correlación entre la actividad anticancerígena in vivo en sistemas 3PS (leucemia en ratones), de muchos extractos y sustancias puras y la inhibición de la formación de las agallas sobre los discos de papa (Galsky, et al., 1980).

Finalmente, cabe mencionar que este ensayo además de demostrar la actividad anticancerígena (profiláctica) permite destacar también la actividad cancerinostática (terapéutica) de las sustancias evaluadas.

En el caso de los estudios fitoquímicos convencionales o clásicos se aíslan y caracterizan los metabolitos de las plantas y posteriormente son ensayados biológicamente. Este procedimiento tiene la desventaja de que generalmente se aíslan los metabolitos que se encuentran en cantidades relativamente altas y que no necesariamente son los responsables de la actividad biológica. Sin embargo, en el caso de plantas utilizadas en la medicina popular, este tipo de estrategia permite no sólo conocer los ele-

mentos constitutivos de la flora medicinal regional, sino también determinar la compatibilidad de las mezclas de drogas que tan comúnmente se utilizan en este tipo de medicina. Cabe hacer notar que son muy pocos los estudios que se han realizado en esta última dirección, por lo cual es una área muy fértil y que plantea interesantes proyectos.

OBJETIVO Y JUSTIFICACION GENERAL

En general, las condiciones sanitarias de muchos países en desarrollo se encuentran deterioradas a consecuencia de numerosos factores y entre ellos podemos citar la desnutrición, las precarias condiciones socio-económicas y la deficiente higiene ambiental, por tan solo mencionar algunos.

En las regiones de clima cálido, en donde las denominadas convencionalmente enfermedades tropicales son las que prevalecen esta situación es aún más grave.

A consecuencia de estas enfermedades se registra un alto índice de mortalidad en países asiáticos, africanos y latinoamericanos.

En México, la malaria (considerada por algunos autores como un flagelo de la humanidad) así como numerosas enfermedades parasitarias constituyen un grave problema de salud pública, estadísticas recientes señalan que estas enfermedades se encuentran entre los veinte padecimientos más frecuentes de enfermedades tropicales (ver Apéndice 2).

En relación al paludismo es un hecho bien conocido (Huang, 1984; Hostettmann, et al, 1987; Klayman, 1985; inter alia) la necesidad de nuevas drogas antipalúdicas (sintéticas ó naturales) y en este sentido cabe destacar que en México la información acerca de plantas antimaláricas de uso popular es más o menos abundante y plantea in-

teresantes investigaciones. Entre las numerosas plantas mexicanas usadas en Medicina Tradicional para el tratamiento de la malaria y que potencialmente podían ser fuentes de nuevos principios activos se encuentran numerosas Rubiáceas. Son de particular interés las que forman parte del denominado complejo copalchi entre las cuales se encuentran la Exostema caribaeum Jacq., R. et S. y la Hintonia latiflora (Sesse et Mocino ex D.C.) Bullock.

También muchas plantas son utilizadas efectivamente como agentes antihelmínticos. Entre ellas destacan: Inula viscosa, Bidens pilosa, y Teloxys graveolens (Willd) W.A. Weber, por tan solo mencionar algunas. Lamentablemente estas plantas no han recibido la debida atención en lo que respecta al estudio de sus propiedades antihelmínticas (Bompard, 1949; Martínez, 1953; Martínez 1956; Matuda, 1958; Martínez, 1969; Chávez, 1976; Boue, 1977; Amo, 1979; Font Quer, 1980; Gallardo, 1983). El empleo de la determinación de la toxicidad para Artemia salina podría ser utilizado como un indicador preliminar para el aislamiento de compuestos bioactivos de estas plantas (Susplagas, et al, 1980; N'Dounga, et al, 1984; El Hadi, et al, 1984; Marles y Farnsworth, 1989; Anderson, et al, 1988; inter alia).

En este sentido, el estudio químico de las plantas usadas en la medicina tradicional con miras de determinar sus elementos constitutivos y la búsqueda de nuevos y/o conocidos principios activos esta bien justificado, particu-

larmente si dichos principios o la materia prima son efectivos para combatir, a un costo menor, aquellas enfermedades que más afectan a una población dada. La crítica situación económica de México y sus múltiples problemas de salud justifican aún más este tipo de proyectos.

Considerando lo antes expuestos y como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional, el propósito fundamental de esta tesis fue el de realizar el estudio químico convencional de la Hintonia latiflora (Sesse et Moc ex D.C.) Bullock y el análisis biodirigido del Teloxys graveolens (Willd) W.A. Weber. Para ello se consideraron pertinentes los siguientes objetivos específicos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Efectuar las operaciones preliminares propias a la preparación de los extractos vegetales para cada una de las plantas objeto del estudio, siguiendo las técnicas fitoquímicas convencionales.
2. Efectuar el fraccionamiento de los extractos obtenidos de Hintonia latiflora y de Teloxys graveolens, en el primer caso de acuerdo a la metodología convencional y en el segundo mediante un fraccionamiento biodirigido.
3. Separar y purificar el mayor número de constituyentes

de las diferentes fracciones obtenidas en el punto 4 para H. latiflora y en el caso de T. graveolens únicamente los compuestos bioactivos.

4. Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
5. Determinar la toxicidad para A. salina en las diferentes etapas del estudio biodirigido de T. graveolens y de los compuestos puros aislados en el caso de H. latiflora.
6. Contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana.
7. Comparar en lo posible los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a:
 - a) La composición química de las especies estudiadas.
 - b) La actividad biológica de las sustancias aisladas y su posible relación con las propiedades medicinales que le atribuyen a las plantas objeto de estudio.
8. Determinar la actividad antihelmíntica de las sustancias bioactivas aisladas del Teloxys graveolens sobre Ascaridia galli y Fasciola hepática.

CAPITULO I

NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA H. latiflora.1. GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO Hintonia.

El género Hintonia pertenece a la familia Rubiaceae (Subfamilia: Cinchonoideae; Tribu: Cinchoneae) y comprende de cuatro especies, las cuales se encuentran distribuidas en el oeste y suroeste de México y Guatemala. En la Tabla 1 se especifican estas especies, sus sinonimias, nombres comunes y distribución. Desde el punto de vista medicinal la especie más importante es la H. latiflora (Sesse et Moc. ex D.C.) Bullock, que se caracteriza por ser un arbusto de siete metros de altura, de hojas opuestas, ovadas ó ovales de 4-12 cm; flores acampanadas, blancas aromáticas de 5-7 cm, fruto capsulado oval o abovado, anguloso con semillas pequeñas y aladas (Martínez, M., 1979). Esta planta al igual que otras especies relacionadas de la familia Rubiaceae como son la Coutarea hexandra Jack, la Exostema mexicanum Gray y Exostema caribaeum Jacq se utiliza en la medicina tradicional como un agente antipalúdico. En este sentido, es importante mencionar que la H. latiflora está incluida en un conjunto de plantas que constituyen el complejo "Copalchi". Estas plantas pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae. Las cortezas de las Rubiaceas (del complejo "Copalchi") se caracterizan por ser extremadamente amargas y por su empleo en el tratamiento del paludismo.

En la Tabla 2 se resumen las especies que constituyen este conjunto y también se indican sus sinonimias y referencias. Además de la propiedad antipalúdica a la Hintonia latiflora se le han atribuido otras bondades medicinales, mismas que se resumen en la Tabla 3.

Desde el punto de vista fitoquímico son escasos los estudios que se han descrito sobre el género; la Hintonia latiflora ha sido la única especie investigada y los diferentes estudios han resultado en el aislamiento e identificación de una oxidocumarina (4), dos triterpenos tetracíclicos del tipo cucurbitano (5 y 6), dos fenilcumarinas simples (7 y 8) y el manitol (9) (ver Tabla 4).

Tabla 1. Especies del género Hintonia.

NOMBRE CIENTIFICO	SINONIMIAS	NOMBRE COMUN	DISTRIBUCION
<u>H. latiflora</u> (Moc et Sesse ex D.C.) Bullock	<u>Coutarea pterosperma</u> <u>Coutarea latiflora</u> <u>Portlandia pterosperma</u>	Campanillo (Chis.), Copalchi (Oax.), Copalchile (Dgo.), Copalquin (Son.), Corteza de Jojutla (Mor.), Falsa quina (Mich.), Gurañona (Oax.), Jujetillo, Palo amargo (Dgo.), Quina (Gro., Oax.), San Juan (Oax.), Juje- tillo (Son.)	Sureste de Chihuahua a Guerrero, Chiapas Morelos, Puebla Oaxaca y Guatemala
<u>H. octomera</u> (Hemsley) Bullock	<u>Coutarea octomera</u>	Kabal-K'aak, Pay-luch (lengua maya)	Yucatan
<u>H. standleyana</u> Bullock	—	—	—
<u>H. lumaana</u> (Baillon) Bullock	—	—	—

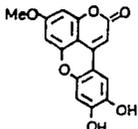
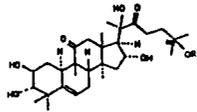
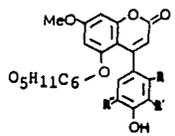
Tabla 2. Constituyentes del complejo "Copalchi".

FAMILIA	PLANTA	NOMBRE COMUN	REFERENCIA
Euphorbiaceae	<u>Croton suberosus</u> H.B.K.	Chiquique	Stark, 1850
	<u>C. discolor</u> H.B.K.		Brandes, 1826
	<u>C. cascarilla</u> Don		Bergen, 1827
	<u>C. eluteria</u> Benn.		Bergen, 1827
	<u>C. pseuduchina</u> Schlecht	China blanca	Schlechtendal, 1830
		Cascarilla de Trinidad	
	<u>C. niveus</u> Jacq:	Copalchi blanco	Martínez, 1944
		Campanillo	
	<u>C. reflexifolius</u> H.B.K.	Soliman prieto, Copalchi	Standley, 1923
	<u>C. draco</u> Schlecht	Copalchi de Huestaca	Lichinger, 1889
	<u>C. hibiscifolius</u> D.C.	Copalchi de Veracruz	Lichinger, 1889
	<u>C. sanguinius</u>		
	<u>C. glabellus</u> L.	Copalchi	Stark, 1850
		Pereira, 1855	
	<u>C. subfragilis</u> Mull.	Copalchi	Standley, 1923
Rubiaceae	<u>Coutarea latiflora</u> D.C.	Copalchi de Jojutla	Martínez, 1944
		China od. Falsa quina	Standley, 1923
		Campanillo	Standley, 1923
	<u>Coutarea hexandra</u> Jacq.	Copalchi de Oaxaca	Lichinger, 1889
	<u>C. pterosperma</u> Standl.	Copalchi de Jojutla,	Martínez, 1944
		Palo amargo	Standley, 1923
	<u>Exostema caribaeum</u> Roem et Schulf	Copalchi de Michoacán	Martínez, 1944
	Falsa quina	Standley, 1923	

Tabla 3. Otros usos medicinales de la Hintonia latiflora.

USOS MEDICINALES	PARTE USADA	MODO DE USO	VIA DE ADMINISTRACION	REFERENCIA
Hipoglucemiante	corteza	cocción	oral	Oliver y Zard, 1979; Terres, 1913 Paris y Bastien, 1960.
Antiperiódico	-	-	-	Bye, 1986; Díaz, 1976
Curar granos	tallos	-	lavados	"
Febrífugo	corteza	cocción	oral	"
Antiséptico	tallos	-	lavados	"
Tranquilizante	-	-	-	"
Tratamiento de la bilis	corteza	infusión	oral	"
Úlcera gástrica	corteza	macerado	oral	"

Tabla 4. Metabolitos secundarios descritos en el género Hintonia.

FUENTE NATURAL	CONSTITUYENTE	ESTRUCTURA	IDENTIFICACION	REFERENCIA
<u>Coutarea latiflora</u>	7-metoxi-4',5'-dihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina, <u>4</u>		PF, UV, IR, RMN ¹ H, RMN ¹³ C, EM	Reher, <u>et al</u> , 1983
<u>Hintonia latiflora</u>	25-acetato-23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>5</u> 23,24-dihidrocucurbitacina F, <u>6</u>	 5: R=OAc 6: R=OH	PF, RO, UV, IR, RMN ¹ H, RMN ¹³ C, EM	Reguero, <u>et al</u> , 1987.
<u>Hintonia latiflora</u>	5-O-β-D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>7</u> 5-O-β-D-glucopiranosil-2',4',5'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, <u>8</u> manitol, <u>9</u>	 7: R=H; R ¹ =OH; R ² =H 8: R=OH; R ¹ =H; R ² =OH	UV, IR, RMN ¹ H, PF UV, IR, RMN ¹ H, PF	Soto, <u>et al</u> , 1988. "
		$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $		

PARTE EXPERIMENTAL

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1 Material vegetal

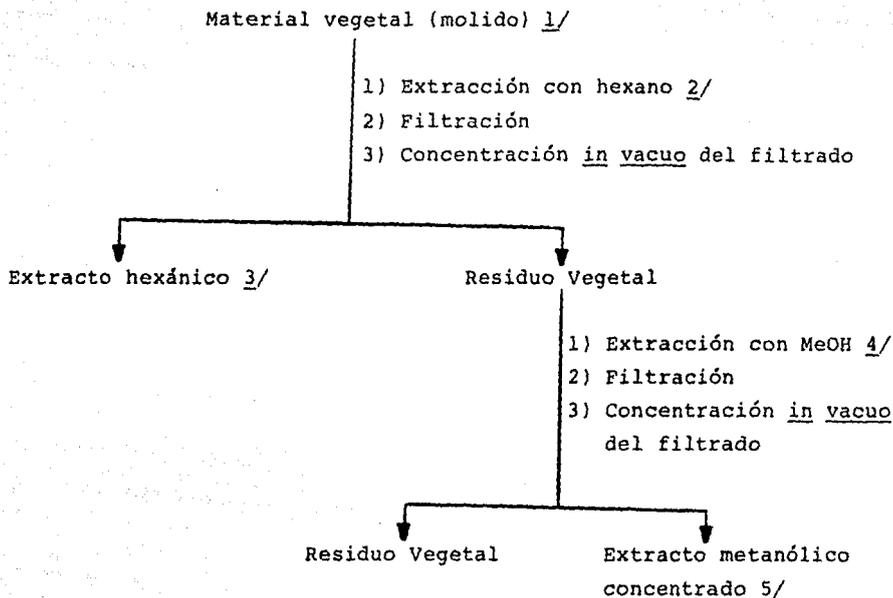
La corteza de Hintonia latiflora (Sesse et Mociño ex DC) Bullock se colectó en Jolalpan, Puebla en mayo de 1987. Una muestra de referencia (Voucher: Bye y Linares No. 15516) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional, Instituto de Biología UNAM.

El material vegetal se secó en una estufa, se cortó en trozos pequeños y posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos Modelo T. Whyte 4.

2.2 Métodos de Extracción y Fraccionamiento

El material vegetal pulverizado se extrajo primero con hexano y luego con metanol siguiendo el procedimiento señalado en el Esquema 1. El extracto metanólico fue fraccionado de manera preliminar mediante un proceso de partición según el procedimiento descrito en el Esquema 2.

El extracto de acetato de etilo (120.2 g) resultante del proceso de partición se fraccionó vía una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (1.20 Kg, sílica gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Se



1/ Cantidad de material vegetal 3.056 Kg

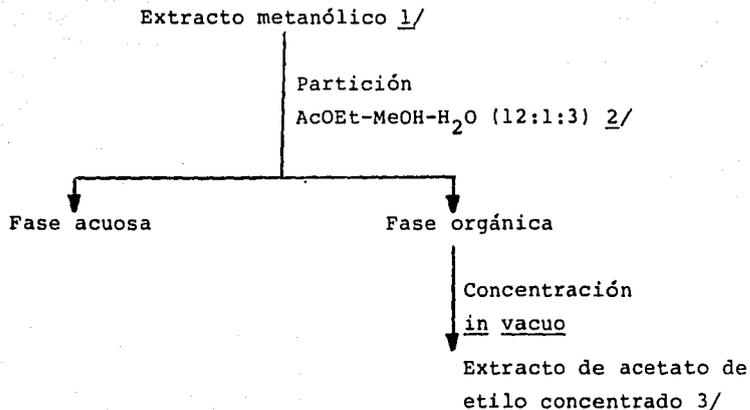
2/ Extracción vía maceración (dos veces por periodos de 2 días cada vez, 6.9 l hexano).

3/ Cantidad total de extracto hexánico 7.0 g.

4/ Extracción vía maceración (tres veces por periodos de 2 días cada vez, 6 l de metanol)

5/ Cantidad total de extracto metanólico 636.9 g

Esquema 1. Extracción de la corteza de H. latiflora.



1/ 636.9 g de extracto metanólico se disolvieron 0.60 l de metanol-1.0 l H₂O

2/ Se efectuaron cuatro extracciones con AcOEt (de 600 ml por vez). Se empleó un extractor líquido-líquido, para líquidos menos densos que el agua

3/ Peso del extracto de acetato de etilo concentrado: 120 g

Esquema 2. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de H. latiflora.

Tabla 5. Sistema de eluyentes y agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

<u>S I S T E M A D E E L U Y E N T E S</u>			
<u>SISTEMA DE ELUYENTES</u>	<u>COMPOSICION</u>	<u>PROPORCION</u>	<u>REFERENCIA</u>
I	Hexano- CHCl_3	Diversas proporciones	—
II	CHCl_3	100	—
III	CHCl_3 -AcOEt	70:30	—
IV	CHCl_3 -Acetona	90:10	—
V	CHCl_3 -MeOH	Diversas proporciones	—
VI	Isop OH-AcOEt- H_2O	8:11:6	Stahl, 1969
VII	CHCl_3 -MeOH- H_2O	64:50:10	Bauer, 1985
VIII	MeOH-AcOEt- H_2O	1:10:3	Yamada, 1978
IX	CHCl_3 -MeOH	90:10	—

<u>A G E N T E S C R O M O G E N O S *</u>		
<u>REACTIVO</u>	<u>COMPOSICION</u>	<u>REFERENCIA</u>
Acido sulfúrico (A)	Acido sulfúrico 20%	Yamada, 1978
Sulfato cérico (B)	12 g de sulfato cérico 22.2 ml de H_2SO_4 concentrado 350 g de hielo	Stahl, 1969
Anisaldehído (C)	0.5 ml de anisaldehído 9 ml de etanol 0.5 ml de H_2SO_4 concentrado 1.0 ml de ácido acético	Stahl, 1969

*En todos los casos antes de revelar con el agente cromógeno se procedió a visualizar las placas con UV. (onda corta y larga), y para el desarrollo del color era necesario calentar por 2 minutos a 110°C aproximadamente.

Tabla 6. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto de acetato de etilo resultante de la partición del extracto metanólico de la corteza de Hintonia latiflora.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados*
Hex/CHCl ₃	50:50	1- 18	1- 74	—
Hex/CHCl ₃	30:70	19- 14	75-120	—
CHCl ₃	100	75-108	121-133	<u>10</u>
CHCl ₃ /MeOH	99:1	109-118	134-158	<u>10</u>
CHCl ₃ /MeOH	98:2	119-139	159-165	<u>10</u>
CHCl ₃ /MeOH	97:3	140-153	166-174	<u>10</u>
CHCl ₃ /MeOH	96:4	154-175	175-185	<u>10</u>
CHCl ₃ /MeOH	95:5	176-185	186-204	<u>11</u>
CHCl ₃ /MeOH	94:6	186-208	205-211	<u>11</u>
CHCl ₃ /MeOH	92:8	209-248	212-220	<u>10</u>
			221-251	<u>12</u>
			252-288	<u>13</u>
CHCl ₃ /MeOH	90:10	249-398	289-293	<u>16</u>
			294-301	<u>16</u>
			302-310	<u>15</u>
			311-317	<u>15</u>
			318-324	<u>15</u>
			325-329	<u>15</u>
			330-338	<u>16</u>
			339-364	<u>16</u>
CHCl ₃ /MeOH	85:15	399-417	365-398	—
CHCl ₃ /MeOH	80:20	418-431		
CHCl ₃ /MeOH	70:30	432-455	399-470	—
CHCl ₃ /MeOH	50:50	456-470		

*El número indica la estructura correspondiente.

recogieron un total de 470 fracciones de 500 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina combinándose aquellas cromatográficamente similares. En la Tabla 6 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y los compuestos aislados.

2.3 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo la metodología convencional utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (silica gel 60 GF 254, Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromógenos (Tabla 5).

2.4 Aislamiento y purificación de los compuestos.

2.4.1 Obtención de la 5,3',4'-trihidroxí-7-metoxi-flavona (7-metil-luteolina) 10.

De las fracciones 121-185 y 212-220 de la columna original (Tabla 6) se obtuvo un sólido amarillo-verdoso, el cual se recrystalizó en cloroformo, obteniéndose 721 mg de unos cristales pequeños de color amarillo de pf. 272-273°C.

2.4.2 Obtención del β -sitosterol 11.

De las fracciones 186-211 de la columna original (Tabla 6) se obtuvo un polvo cristalino blanco, pf. 140-142°C. La cantidad total obtenida fue de 58.8 mg.

2.4.3 Obtención de la 5-O-(-6"-acetil- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 12.

De las fracciones 221-251 (Tabla 6) cristalizaron 4.059 g de un sólido color blanquecino de pf. 229-233°C. Por otra parte, las aguas madres de las fracciones 252-288 (12.52 g) se cromatografiaron en 145 g de gel de sílice (desactivada al 10%). En la Tabla 7 se resumen los sistemas de elución empleados, el número de fracciones obtenidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y los compuestos aislados.

De las fracciones 128-152 de esta columna cristalizaron 144.7 mg adicionales del producto 12 como un sólido de color amarillo pálido. Obteniéndose un rendimiento total de 4.02 g.

2.4.4 Obtención de la 3-O- β -glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13.

De las fracciones 252-288 de la columna de la Tabla 6 y de las fracciones 128-152 de la Tabla 7 se obtuvo un polvo amorfo de color blanco extremadamente amargo, pf. 119-201°C, la cantidad total de 13 fue de 1.43 g.

2.4.5 Obtención de la 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 14.

De las fracciones 202-222 de la columna de la Tabla 7 se separaron 789 mg de unos cristales transparentes en for-

ma de agujas muy finas de color amarillo pálido, pf. 218-221°C.

2.4.6 Obtención de la 5-O- β -galactopiranosil-3',4'-di-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 15.

De la fase orgánica obtenida del proceso de partición acetato de etilo-metanol-H₂O, cristalizaron en forma espon-tánea 32.87 g de un sólido amarillo de pf. 227-230°C. 45.3437 g de este producto se obtuvieron de las fracciones 302-329 de la columna original y de las fracciones 223-266 de la columna de la Tabla 7. Por otra parte, de las frac-ciones 149-194 (ver Tabla 8), resultantes de la recromato-graffa de las fracciones 365-470 (27 g) de la columna ori-ginal, se obtuvo un gramo adicional de esta sustancia. El rendimiento total del compuesto 15 fue de 81.24 g.

2.4.7 Obtención de la 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-di-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 16.

Del extracto metanólico de la corteza desengrasada precipitaron 0.293 g de un polvo cristalino de color ama-rillo de pf. 253-255°C. Así mismo de las fracciones 289-301 y 330-364 de la columna original se aislaron 462 g adicionales de este producto. El total obtenido fue de 4.82 g.

Tabla 7. Resumen de la separación vía cromatografía en columna de las aguas madres de las fracciones 252-288 de la columna original.

Eluyente	Proporción	No. de Fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados*
CHCl ₃	100%	1- 15	1- 48	—
CHCl ₃ /MeOH	98:2	16- 36	49-127	—
CHCl ₃ /MeOH	96:4	37-138	128-136	<u>12</u>
CHCl ₃ /MeOH	94:6	139-305	137-146 147-152	<u>12</u> <u>12</u>
CHCl ₃ /MeOH	92:8	306-352	153-186	—
CHCl ₃ /MeOH	90:10	353-393	187-201	—
CHCl ₃ /MeOH	86:14	394-442	202-217	<u>14</u>
			218-222	<u>14</u>
CHCl ₃ /MeOH	80:20	443-480	223-229	<u>15</u>
CHCl ₃ /MeOH	70:30	481-525	230-251	<u>15</u>
CHCl ₃ /MeOH	60:40	526-546	252-266	<u>15</u>
CHCl ₃ /MeOH	50:50	547-562	267-393	—
			394-480	—
			481-562	—

*El número indica la estructura correspondiente.

Tabla 8. Resumen de la cromatografía en columna de las fracciones 365-470 de la columna original**.

Eluyente	Proporción	No. de Fracciones	Fracciones combinadas	Compuestos aislados*
CHCl ₃	100	1- 38	1- 63	—
CHCl ₃ /MeOH	99:1	39- 50	64-148	—
CHCl ₃ /MeOH	97:3	51- 63	149-157	<u>16</u>
			158-194	<u>16</u>
CHCl ₃ /MeOH	95:5	64- 87	195-225	—
CHCl ₃ /MeOH	93:7	88-108	226-242	<u>17</u>
			243-255	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	90:10	109-643	256-270	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	85:15	644-680	271-362	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	80:20	681-748	363-467	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	70:30	749-779	468-512	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	60:40	780-799	513-674	<u>17</u>
CHCl ₃ /MeOH	50:50	800-825	675-696	<u>17</u>
			697-825	<u>9</u>

*El número indica la estructura correspondiente.

**Se colectaron 362 fracciones de 50 ml cada una.

2.4.8 Obtención de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina 17.

De las fracciones 226-296 de la columna de la Tabla 8, se aislaron 6.91 g de un sólido cristalino de color amarillo intenso de pf. 250-252°C.

2.4.9 Obtención del Manitol 9.

De las fracciones 697-825 de la columna de la Tabla 8, se obtuvieron 1.19 g de un sólido cristalino blanco, pf. 150-152°C.

2.5 Caracterización de los compuestos aislados.

2.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

- a) Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johnes y no están corregidos.
- b) Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer 599B.
- c) Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202.
- d) Las rotaciones óptimas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241.
- e) Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi-Perkin-Elmer RMU-GD (Instituto de Química de la UNAM).

- f) Los espectros de RMN¹H fueron registrados en un espectrofotómetro Varian 390, utilizando como disolventes CDCl₃, DMSO-d₆, Piridina-d₅ y como referencia interna TMS.
- g) Los espectros de RMN¹³C de 13 se determinaron en un espectrofotómetro FT-80 Varian, utilizando como disolvente piridina-d₅ y DMSO-d₆ y como referencia interna TMS.
- h) Los espectros de RMN¹³C de los compuestos 17 y 28 se determinaron en un aparato Varian VXR-300s (Instituto de Química de la UNAM.).
- i) Los análisis elementales se efectuaron en Galbraith Laboratories, Inc., Knoxville, Tenn., USA.

2.5.2 Prueba de Molish para carbohidratos.

A una pequeña cantidad de cada uno de los compuestos 12, 13, 14, 15, 16 y 17 en 3 ml de agua destilada, separadamente se les adicionó 1 ml de una solución de reactivo de α -naftol (10% en etanol); seguidamente se adicionaron por las paredes de cada uno de los tubos de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos. La coloración observada era indicativa de una prueba positiva para carbohidratos. En todos los casos se uso un control positivo y uno negativo.

2.5.3 Hidrólisis enzimática de los compuestos 13 y 14 con celulasa.

A 100 mg de 13 y 14, por separado, se agregaron 1.0 ml de agua destilada y 200 mg de celulasa (Sigma, Tipo I) las mezclas se incubaron a 36°C durante 72 horas. El término de la hidrólisis se verificó mediante CCF utilizando el sistema IX y el agente cromógeno B de la Tabla 5. Al cabo de este tiempo, cada una de las mezclas se extrajo con acetato de etilo. En cada caso, las fases orgánicas combinadas se purificaron por cromatografía preparativa en capa delgada sobre gel de sílice utilizando el sistema CHCl_3 -MeOH (8:2). En la Tabla 9 se indican los compuestos hidrolizados con celulasa, así como el rendimiento de las agliconas obtenidas y sus correspondientes puntos de fusión. Las fases acuosas obtenidas de cada una de las hidrólisis efectuadas se filtraron a través de una columna de resina intercambiadora de aniones Tipo I (Merck) (Yamada, et al, 1978). La presencia de glucosa o galactosa en las fases acuosas se determinó por CCF utilizando cromatoplasmas de gel de sílice, los sistemas VI y VII y el agente cromógeno C de la Tabla 5.

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

2.5.4 Hidrólisis enzimática de 13 y 14 con β -glucosidasa y β -galactosidasa respectivamente.

100 mg de cada uno de los compuestos (13 y 14) se disolvieron en 1 ml de agua destilada y fueron tratados con 10 mg de β -glucosidasa (Sigma, Tipo II) y 10 mg de β -galactosidasa (Sigma), respectivamente. Las mezclas se incubaron a 36°C por 72 horas. El término de la hidrólisis se verificó como en la sección 2.5.3. Al cabo de ese tiempo, las agliconas fueron extraídas con acetato de etilo; los azúcares se identificaron de la fase acuosa correspondiente siguiendo el procedimiento señalado anteriormente (3.5.3). Los rendimientos de las agliconas obtenidas y sus puntos de fusión se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Hidrólisis enzimática de los compuestos 13 y 14.

Compuesto	Cantidad de Compuesto	Aglicona obtenida (rendimiento)	Punto de fusión
<u>13</u> *	100 mg	13A (59.7 mg)	146-150°C
<u>14</u> *	100 mg	14A (51.0 mg)	212-214°C
<u>13</u> **	10 mg	13A (6.25 mg)	153-155°C
<u>14</u> ***	10 mg	14A (5.0 mg)	210-213°C

*celulosa ** β -glucosidasa *** β -galactosidasa

2.5.5 Hidrólisis ácida de 14.

Para efectuar la hidrólisis ácida del compuesto 14 se disolvieron 60 mg del compuesto en 120 ml de HCl 2N, la mezcla anterior se reflujo durante 3 horas. Al término de la hidrólisis precipito un sólido amarillento que luego de sucesivos lavados con varias porciones de agua destilada origino 43.2 mg de un producto cristalino. Es de hacer notar que el término de la hidrólisis fue verificado, utilizando el sistema IX y los agentes cromógenos A y B de la Tabla 5.

2.5.6 Hidrólisis ácida del compuesto 17.

Para realizar la hidrólisis ácida del compuesto 8 se disolvieron 1000 mg del compuesto en 36 ml de H_2SO_4 1.5 N y la mezcla de reacción se reflujo durante 1.5 hs. El término de la hidrólisis se verificó mediante CCF como se describió en la sección 2.5.5. La aglicona resultante se separó de la mezcla de reacción por filtración al vacío y se lavó sucesivamente con agua destilada, obteniéndose finalmente 603.3 mg de un sólido amarillo.

En la Tabla 10 se indican los compuestos sometidos a hidrólisis ácida, el rendimiento de las agliconas obtenidas y sus puntos de fusión.

Tabla 10. Hidrólisis ácida de los compuestos 12, 14, 15, 16 y 17.

Compuesto	Cantidad de compuesto	Aglicona obtenida (rendimiento)	Punto de fusión
<u>12</u> **	60 mg	<u>12A</u> (26.8 mg)	131-134°C
<u>14</u> *	60 mg	<u>14A</u> (43.2 mg)	199-205°C
<u>15</u> *	100 mg	<u>15A</u> (45.9 mg)	138-140°C
<u>16</u> *	10 mg	<u>16A</u> (4.7 mg)	137-139°C
<u>17</u> **	1000 mg	<u>17A</u> (603.3 mg)	166-167°C

*hidrolizados con HCl 2N **hidrolizados con H₂SO₄ 1.5N

2.5.7 Obtención de derivados acetilados.

Para obtener los derivados acetilados de los productos aislados se utilizó 1 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. En todos los casos, la mezcla de reacción se dejó en reposo durante 12 horas y al término de este tiempo los productos acetilados fueron separados de la manera habitual. (Shriner, Fuson-Curtin, 1980).

Los compuestos que fueron acetilados, el rendimiento de los productos obtenidos así como sus puntos de fusión se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Derivados acetilados obtenidos en el presente capítulo.

Compuesto	Cantidad de compuesto	Producto acetilado (rendimiento)	Punto de fusión
<u>10</u>	62.4 mg	<u>10A</u> (55.3 mg)	205-207°C
<u>11</u>	10 mg	<u>11A</u> (9.5 mg)	118-120°C
<u>12</u>	50 mg	<u>12B</u> (42.9 mg)	83- 86°C
<u>13</u>	20 mg	<u>13B</u> (15.1 mg)	136-138°C
<u>13A</u>	100 mg	<u>13C</u> (75 mg)	96-97°C
<u>14</u>	40 mg	<u>14B</u> (32 mg)	88-90°C
<u>15</u>	204 mg	<u>15B</u> (312 mg)	76-79°C
<u>16</u>	50 mg	<u>16B</u> (43 mg)	89-93°C
<u>17</u>	100 mg	<u>17B</u> (145 mg)	90-92°C

2.5.8 Obtención de los derivados metilados.

A cada 100 mg de muestra disuelta en metanol se les adicionó una solución etérea saturada con diazometano preparada con 4 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%, 20 ml de éter etílico y 2 g de N-nitroso-N-metil-urea. La mezcla de reacción resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas, al ca-

bo del tiempo antes señalado se obtuvieron los derivados metilados correspondientes. En la Tabla 12 se resumen los compuestos que fueron metilados, el rendimiento de los compuestos obtenidos y sus puntos de fusión.

Tabla 12. Derivados metilados obtenidos en la presente sección.

Compuesto	Cantidad de compuesto	Producto metilado (rendimiento)	Punto de fusión
<u>14</u>	10 mg	14 C (7.1 mg)	216-219°C
<u>15</u>	200 mg	15 C (157.2 mg)	175-181°C
<u>16</u>	15 mg	16 C (12 mg)	-
<u>17</u>	100 mg	17 C (88.4 mg)	-

2.5.9 Obtención de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina 17D, a partir de la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, 17A.

100 mg del compuesto 17A se disolvieron en 30 ml de una solución metanólica de KOH al 5%. La mezcla se dejó en agitación por tres horas a temperatura ambiente y después se aciduló con 25 ml de HCl 1N, la solución ácida se extrajo con tres porciones de 30 ml de acetato de etilo y

la fase orgánica resultante se lavó con 2 porciones de agua destilada de 10 ml c/u, finalmente se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró in vacuo, obteniéndose 89.7 mg de un sólido color amarillo pálido, de PF. 280°C insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos (hexano, cloroformo, acetona, metanol y piridina) y soluble en DMSO.

2.6 Evaluación biológica in vitro de los compuestos obtenidos de H. latiflora.

Las fenilcumarinas y la glucocucurbitacina fueron evaluadas biológicamente como posibles agentes potenciales antipalúdicos y también se determinó la toxicidad de los mismos contra Artemia salina.

2.6.1 Determinación de la toxicidad in vitro contra Artemia salina Gray.

- Preparación de las muestras.

Las muestras (20 mg del compuesto puro ó 20 mg de extracto o fracción) objeto de evaluación se disolvieron en 2 ml de un disolvente apropiado. De esta solución fueron transferidos a tres viales, por separado, 500 μ l, 50 μ l y 5 μ l obteniéndose en cada una disoluciones de 1000, 100 y 10 ppm, respectivamente. Cada transferencia se realizó por triplicado. Finalmente se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío.

- Incubación de los huevos de A. salina.

Los huevos de A. salina fueron incubados en un medio salino artificial durante 48 horas, finalizado el tiempo de incubación los camarones fototrópicos fueron colectados con una pipeta Pasteur.

- Bioensayo.

Se transfirieron diez camarones a cada uno de los viales conteniendo la muestra a ensayar y 5 ml de un medio salino artificial. Los viales fueron mantenidos con iluminación durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se contabilizaron los crustáceos sobrevivientes y se determinó el porcentaje de mortalidad con cada una de las dosis. En el caso de los compuestos puros el cálculo de las LC_{50} se realizó por regresión lineal (Meyer, et al, 1982).

2.6.2 Determinación de la actividad antipalúdica.

La actividad antipalúdica in vitro fué realizada por la Dra. M. O'Neill de la Escuela de Farmacia, Universidad de Londres.

2.6.3 Actividad antimicrobiana.

Los ensayos microbiológicos de los compuestos 12, 15 y 16 y su respectiva aglicona se efectuaron en los laboratorios de Química Medicinal de la Universidad de Kansas (Lawrence, E.E.U.U.), a través de un programa de bioensayos organizado por la IOCD (International Organization for Chemistry Development).

3.0 RESULTADOS Y DISCUSION

Del extracto metanólico de la corteza de la H. latiflora luego de un fraccionamiento preliminar vía una partición entre acetato de etilo-metanol-agua (12:1:3) y posteriores cromatografías en columna sobre gel de sílice, se aislaron y caracterizaron: un compuesto de naturaleza esteroidal (β -sitosterol, 11), un polialcohol (manitol, 18), un flavonoide (7-metil-luteolina, 10), una glucocurbitacina (3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13) y cinco fenilcumarinas: 5-O-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 12; 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 15; 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 16; 5-O- β -D-glucopiranosil-7,4',3'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 17 y 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 14.

Los compuestos 13 y 14 representaron nuevos productos naturales.

Las estructuras de los compuestos obtenidos se ilustran en la Figura 5 y sus rendimientos se indican en la Tabla 13.

En general, la caracterización de los compuestos aislados se realizó por métodos químicos, espectroscópicos y por comparación con muestras auténticas.

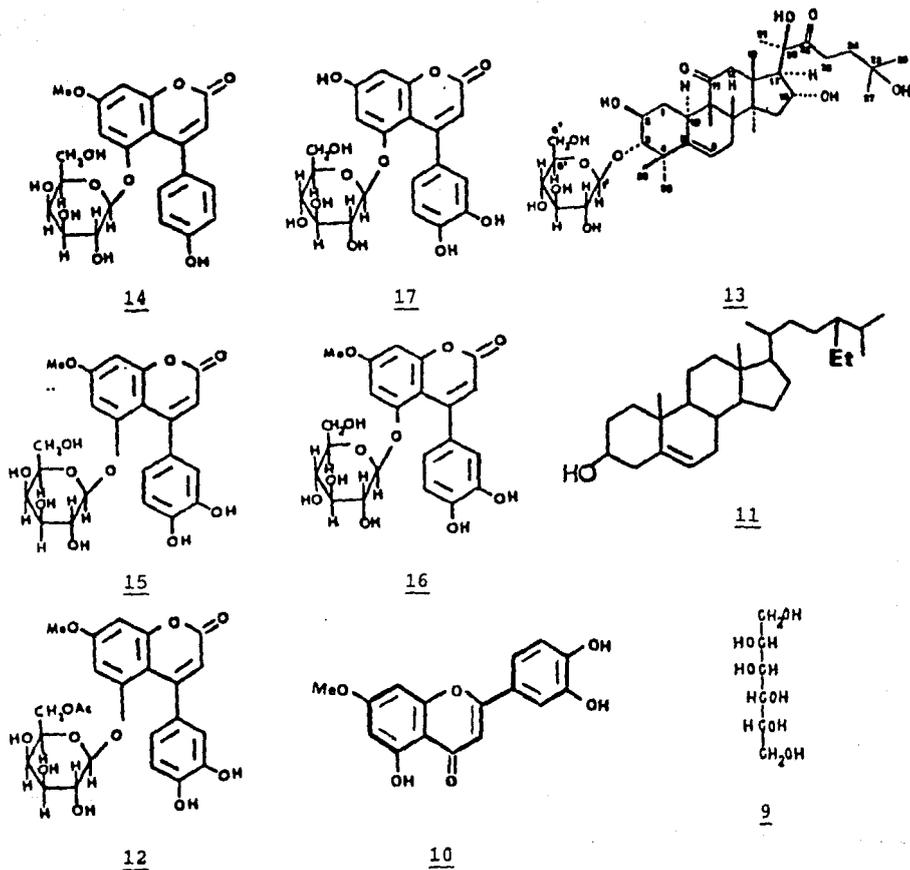


Figura 5. Metabolitos secundarios aislados de la *Hintonia latiflora* (Sesse et Mociño ex D.C.) Bullock

Tabla 13. Rendimiento de los compuestos aislados de H.
latiflora.

Compuesto	gramos obtenidos	% de rendimiento en base a planta seca
<u>10</u>	721 mg	0.024
<u>11</u>	58.8 mg	0.019
<u>12</u>	4.20 g	0.137
<u>13</u>	1.43 g	0.047
<u>14</u>	789 mg	0.026
<u>15</u>	81.24 g	2.68
<u>16</u>	4.81 g	0.158
<u>17</u>	6.91 g	0.226
<u>9</u>	1.19 g	0.039

3.1 Identificación de la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-
dihidrocucurbitacina F, 13.

De las fracciones 252-288 de la columna original (ver Tabla 6, sección experimental) precipitaron 1.43 g de un sólido de color blanco, de sabor extremadamente amargo, ópticamente activo, soluble en metanol y parcialmente soluble en acetona y acetato de etilo. Las constantes físicas y espectroscópicas de este compuesto se resumen en la Tabla 14.

El resultado positivo de la prueba de Molish sugirió la naturaleza glicosídica del producto natural, lo cual se confirmó mediante la hidrólisis de una pequeña cantidad del compuesto con celulosa y β -glucosidasa. El análisis cromatográfico de los productos de la hidrólisis permitió detectar una sustancia de menor polaridad que el glicósido original (sistema IX) y a la glucosa como único azúcar presente.

La fórmula molecular de este compuesto (13) se estableció mediante análisis elemental como $C_{36}H_{58}O_{12}$, la cual permite un índice de insaturación de ocho. El espectro de UV (Espectro 1) presentó sólo una absorción terminal a 243 nm. El espectro de IR (Espectro 2) mostró bandas características para grupos hidroxilo (3400 cm^{-1}), carbonilo de cetona (1690 cm^{-1}) y doble ligadura (1630 cm^{-1}).

El espectro de RMN¹³C (Espectro 3) presentó señales para 36 carbonos de los cuales seis (δ 62.9, 71.7, 76.2, 78.4, 78.6 y 107) eran fácilmente asignables a la β -D-glucosa por comparación con modelos previamente descritos en la literatura (Laurie, *et al*, 1985; Vande, *et al*, 1982; Yamada, 1978; Bull, 1979). Las restantes señales correspondieron a la aglicona y concordaron con las de un triterpeno tetracíclico de tipo cucurbitano con dos carbonilos de cetona (δ 213.1 y 216), tres funcionalidades carbonílicas secundarias (δ 70.4, 97.7 y 71.2), dos terciarias (δ 80.1 y 69.2) y una doble ligadura trisustituída

[δ 119.9 (d) y δ 142.0 (s)]. El espectro de RMN'H (Espectro 4) en piridina- d_5 permitió tan sólo detectar la presencia de varios metilos terciarios en la molécula y al igual que en el caso del espectro de RMN¹³C no se observaron señales para grupos acetato. Al considerar la poca resolución del espectro de RMN'H en piridina, de este producto natural, se decidió realizar el análisis de RMN'H de su derivado peracetilado 13B. Las constantes físicas y espectroscópicas de éste se resumen en la Tabla 15.

Las características más importantes del espectro fueron las siguientes:

- a) a campo alto se observaron señales para ocho grupos metilo terciarios (δ 0.94, 0.97, 1.065, 1.16, 1.2, 1.24, 1.43) ;
- b) en la zona donde resuenan los grupos metilo de acetato se observaron señales para seis de estos grupos (δ 1.92, 1.98, 2.02, 2.06 y 2.09), confirmando la existencia en la molécula de una sola unidad de glucosa y de dos funciones carbinólicas secundarias ;
- c) en 2.63 aparecía un doblete ($J=14$ Hz) parte de un sistema AB conformado por H-12 y H-12' ;
- d) en δ 4.17 se apreció el multiplete correspondiente a H-6' ;
- e) en δ 4.73 un doblete ($J=7$ Hz) correspondiente al hidrógeno anomérico axial, congruente con los resultados de la hidrólisis con β -glucosidasa ;

f) finalmente, en δ 5.75 se observó un multiplete asignable al hidrógeno vinílico de la doble ligadura trisustituida detectada previamente mediante el espectro de RMN¹³C del glicósido.

El análisis de las características espectroscópicas y espectrométricas de la aglicona (Tabla 16) permitió su caracterización como la 23,24-dihidrocucurbitacina F.

Las evidencias más importantes que condujeron a la anterior conclusión se resumen a continuación:

a) el espectro de masas (Espectro 8) presentó fragmentos [de m/z 502, 405, 387, 369, 351, 142, 113 y 87 (pico base)] característicos de un 23,24-dihidrocucurbitano (Kupchan, et al, 1970). En la Figura 6 se ilustra el patrón de fragmentación para este núcleo triterpénico.

Cabe hacer notar que el ión de m/z 405 ($M^+ - 155$, C₂₄H₃₇O₅) permitió concluir que en C-20 y C-25 se encuentran dos hidroxilos terciarios. La pérdida consecutiva de tres moléculas de agua a partir del ión de m/z 405 origina los fragmentos de m/z 387, 369 y 351 que son típicos de algunas cucurbitacinas trihidroxiladas en la parte tetracíclica de la estructura (Kupchan, et al, 1970; Audier, et al, 1966; Bittner, et al, 1973);

b) el espectro de RMN¹³C de la aglicona (Espectro 9) mostró señales para 30 carbonos y fue muy similar al glicósido,

difiriendo únicamente en la ausencia de las señales correpondientes al azúcar. En este caso se observaron claramente las señales para cinco carbonos oxigenados (δ 70.4, 81.4, 71.0, 80.1 y 69.0), tres de ellos secundarios y dos terciarios ;

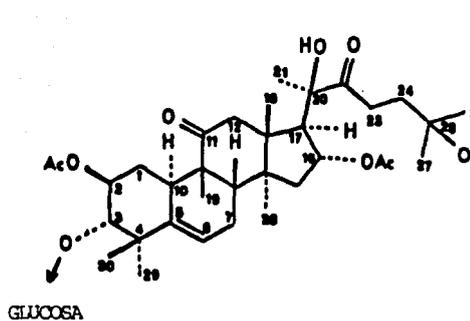
c) el espectro de RMN'H (Espectro 12) de la aglicona acetilada, cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 17, mostró señales para:

- c.1 Ocho metilos terciarios (δ 0.99, 1.04, 1.1, 1.23, 1.24 y 1.44) ;
- c.2 tres metilos de acetato (δ 1.91, 1.97 y 2.04), mismas que confirmaron químicamente la presencia de tres funciones carbinólicas secundarias en la aglicona ;
- c.3 el hidrógeno secundario en C-17 en δ 2.69 (d, J=7 Hz) ;
- c.4 uno de los hidrógenos en C-12, H-12' (δ 3.19, d, J=15 Hz) ;
- c.5 un protón vinílico de una doble ligadura trisustituída en δ 5.73 atribuible a H-6 por comparación con modelos adecuados (Lavie, 1971; Yamada, 1978) ;
- c.6 un OH (δ 4.95) que desaparecía al registrar el espectro con D₂O ;
- c.7 tres hidrógenos geminales de funciones acetoxilo en δ 4.65 (d, J=10 Hz, H-3), 5.02 (ddd, J=10,10,6 Hz,

H-2) y 5.11 (t, J=7 Hz, H-16). El patrón de acoplamiento de las dos primeras señales era consistente con el de dos hidrógenos mutuamente acoplados y vecinales. Las únicas posiciones factibles para la ubicación de estos dos hidrógenos correspondían a C-2 y C-3 con una estereoquímica α y β respectivamente. La tercera señal correspondía a H-16. (Laurie, et al, 1985; Lavie, et al, 1971).

Hasta este punto de la discusión sólo restaba establecer el punto de unión del azúcar a la aglicona. En este sentido, la comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos base de oxígeno del glicósido y de la aglicona fué de gran utilidad. Como se aprecia en la Tabla 18 los desplazamientos químicos para los carbonos 2 y 16 en el glicósido (δ 70.41 y 71.21) y en la aglicona (δ 70.49 y 71.08) fueron casi de igual magnitud; en cambio, la señal para el C-3 de la aglicona se observó a δ 81.4 y en el glucósido a δ 93.7. El efecto paramagnético ($\Delta\delta=12.3$) observado en la señal correspondiente a C-3 era congruente con la ubicación del azúcar en C-3 (Laurie, et al, 1985; Okabe, et al, 1982).

Tabla 18. Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos base de oxígeno del glucósido 13 y de su aglicona 13A.



Carbono	δ 13	δ 13A
2	70.41	70.4
3	<u>93.7</u>	<u>81.2</u>
16	71.21	71.0
20	80.1	80.1
25	69.2	69.1

Otra evidencia adicional que apoyo la glucosidación del grupo hidroxilo en C-3 de la aglicona se obtuvo al comparar la zona comprendida entre 3 y 5 ppm del espectro de RMN¹H de los derivados acetilados del glucósido 13 y de la aglicona 13A (Figura 7). De esta comparación se pudo deducir claramente que la señal correspondiente al hidrógeno en C-3 del glicósido acetilado (δ 3.24) se desplaza paramagnéticamente en relación con la señal observada en la aglicona acetilada (δ 4.61). Cabe hacer notar, que la asignación del doblete a δ 3.24 como H-3, se verificó por experimentos de desacoplamiento (Figura 8).

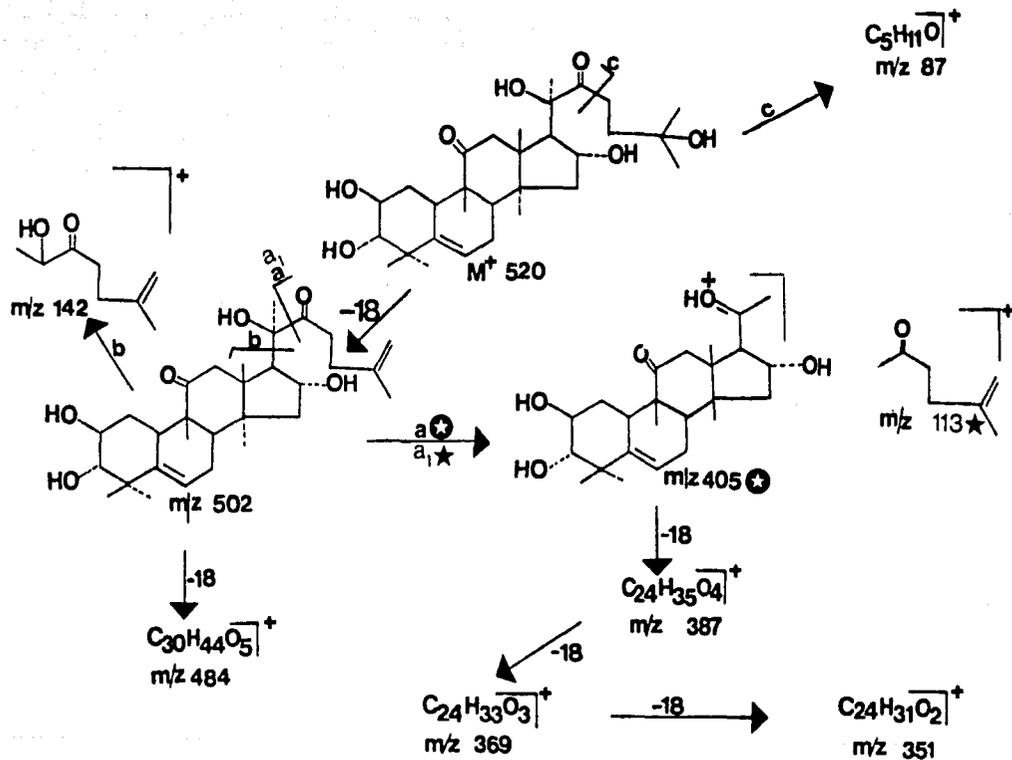


Figura 6. FRAGMENTOS MAS IMPORTANTES DEL ESPECTRO DE MASAS DE LA 23,24-DIHIROCURBITACINA F

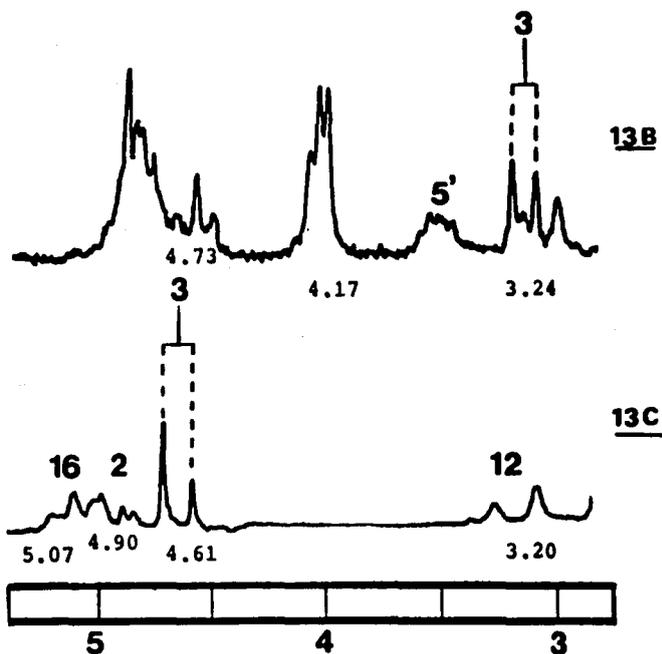


Figura 7. Región comprendida entre 3-5 ppm de los espectros de RMN¹H de los derivados 13B y 13C.

Finalmente, la comparación de la zona comprendida entre δ 4 y 5.5 del espectro de RMN¹H de 13B con la correspondiente en el espectro del derivado acetilado de la 25-acetil-2-O- β -D-glucocucurbitacina F (Castañeda, 1988), indicó que el azúcar no podría encontrarse en la posición C-2, ya que si este hubiese sido el caso, el patrón de los hidrógenos geminales a las funciones acetoxilo serían idénticos como al que se muestra en la parte inferior de la Figura 9.

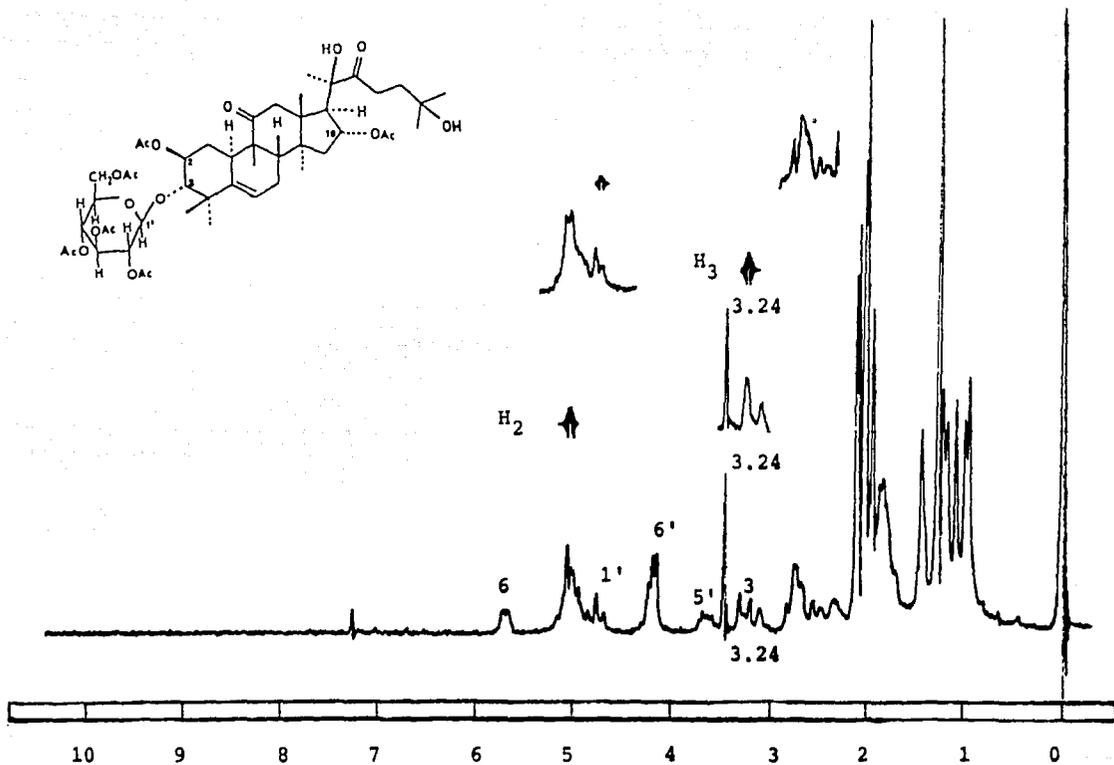


Figura 8. Experimento de desacoplamiento de 13B.

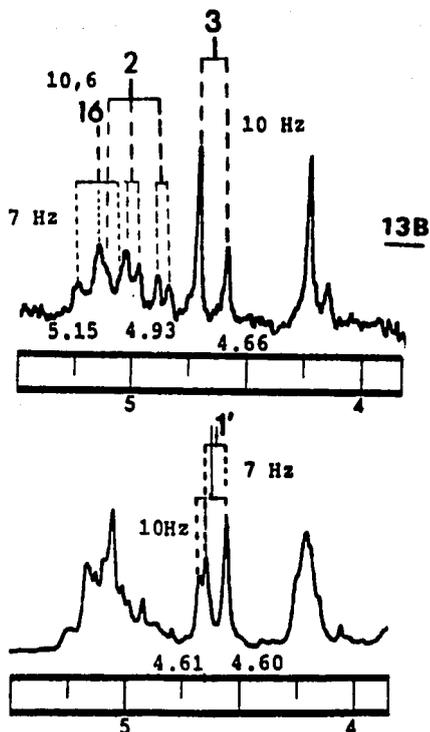
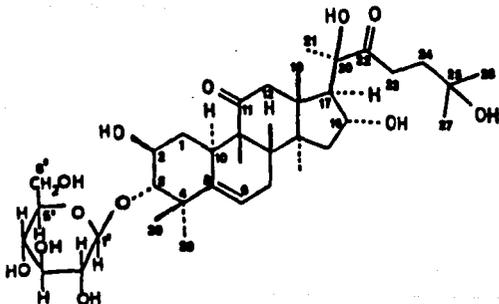


Figura 9. Comparación de la región donde resuenan los protones base de acetato de 13B y del derivado acetilado de la 25-acetil-2-O- β -D-glucocucurbitacina F.

En conclusión el análisis de la información presentada anteriormente permitió establecer que la estructura del compuesto 13 corresponde a la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, la cual representa un nuevo producto natural.

Tabla 14. Constantes físicas y Espectroscópicas de la 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13.

F.M.	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂ (LDH = 8)	
P.M.	682 g/mol	
P.F.	199-201°C	
UV	MeOH max nm	243
		Espectro 1
[α] _D	+ 39.0 (MeOH)	
IR	KBr max cm ⁻¹ :	3400, 2920, 2970, 1690, 1630, 1455, 1430, 1370, 1285, 1255, 1210, 1155, 1070, 1020, 620
		Espectro 2
RMN ¹ H (90MHz Piridina-d ₅ δ):	(Ver Espectro 4)	Espectro 4
RMN ¹³ C (Piridina-d ₅ δ):	19.2 (q, C-19), 20.3 (q, C-18) 20.4 (q, C-30), 20.5 (q, C-28), 23.4 (q, C-29), 25.2 (t, C-7), 25.4 (q, C-21), 29.7 (q, C-27), 30.0 (q, C-26), 32.6 (t, C-23), 34.0 (t, C-1), 34.1 (d, C-10), 38.3 (t, C-24), 42.5 (s, C-4), 43.1 (d, C-8), 46.2 (t, C-15), 48.6 (s, C-13), 48.8 (s, C-9), 49.2 (t, C-12), 51.0 (s, C-14), 58.8 (d, C-17), 62.9 (d, C-6'), 69.2 (s, C-25), 70.4 (d, C-2), 71.2 (d, C-16), 71.7 (d, C-4'), 76.2 (d, C-2'), 78.4 (d, C-5'), 78.6 (d, C-3'), 80.1 (s, C-20), 93.7 (d, C-3), 107.0 (d, C-1'), 119.4 (d, C-6), 142.0 (s, C-5), 213.1 (s, C-11), 216 (s, C-22)	Espectro 3



Análisis elemental:

C_{63.34} % H_{8.5}% O_{28.16}

Tabla 15. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acetilado de la 3-O-β-D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13B.

F.M.	$C_{48}H_{70}O_{18}$	
P.M.	1030 g/mol	
P.F.	136-138°C	
IR KBr max cm^{-1} :	3400, 2920, 2970, 1690, 1630, 1455, 1430,	Espectro 5
	1370, 1285, 1255, 1210, 1155, 1070, 1020, 620	
RMN ¹ H (90MHz, $CDCl_3$, δ):	0.94 (s, 3H, Me-), 0.97 (s, 3H, Me-), 1.065 (s, 3H, Me-), 1.16 (s, 3H, Me-), 1.2 (s, 3H, Me-), 1.24 (s, 6H, 2Me-), 1.43 (s, 3H, Me-), 1.92 (s, 3H, Ac-), 1.98 (s, 6H, 2Ac-), 2.02 (s, 3H, Ac-), 2.06 (s, 3H, Ac-), 2.09 (s, 3H, Ac-), 2.63 (d, 1H, J=15 Hz, H-12), 2.68 (d, 1H, J=7 Hz, H-17), 3.14 (d, 1H, J=15 Hz, H-12'a), 3.24 (d, 1H, J=10 Hz, H-3), 3.63 (m, 1H, H-5'), 4.17 (m, 1H, J=4 Hz, H-6'), 4.73 (d, 1H, J=7 Hz), 5.75 (m, 1H, H-6).	Espectro 6

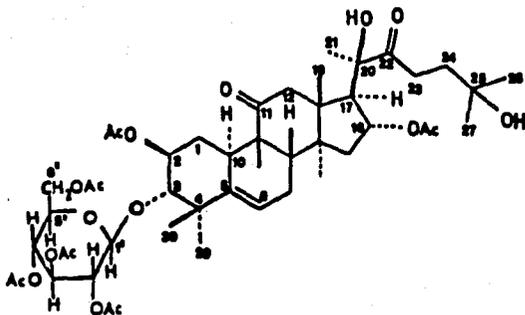


Tabla 16. Constantes físicas y espectroscópicas de la 23,24-dihidrocucurbitacina F, 13A.

F.M.	$C_{30}H_{48}O_7$	
P.M.	520 g/mol	
P.F.	155-156°C	
IR $\frac{KBr}{max} cm^{-1}$:	3420, 2960, 1690, 1610, 1455, 1430, 1390,	Espectro 7
	1370, 1250, 1210, 1110, 1050, 1025, 750, 620	
EMIE, m/z (%):	502 (M^+), 484, 469, 459, 451, 405, 387, 369,	Espectro 8
	166, 142, 113, 97, 95	
RMN ^{13}C (Piridina- d_5 , δ):	19.2 (q, C-19), 20.2 (q, C-18), 20.3 (q, C-30), 20.4 (q, C-28), 22.4 (q, C-29), 24.2 (t, C-7), 25.4 (q, C-21), 29.7 (q, C-27), 30.0 (q, C-26), 32.5 (t, C-23), 34.6 (t, C-1), 34.7 (d, C-10), 38.4 (t, C-24), 42.7 (s, C-4), 43.2 (d, C-8), 46.4 (t, C-15), 48.7 (s, C-9), 48.8 (s, C-13), 49.3 (t, C-12), 51.1 (s, C-14), 58.7 (d, C-17), 69.1 (s, C-25), 70.4 (d, C-2), 71.0 (d, C-16), 80.1 (s, C-20), 81.4 (d, C-3), 119.7 (d, C-6), 142.5 (s, C-5), 212.9 (s, C-11), 215.8 (s, C-22).	Espectro 9

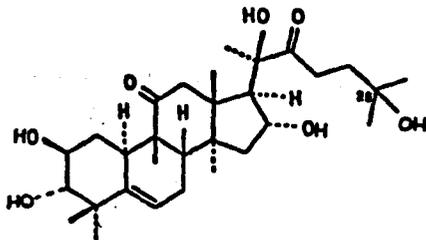


Tabla 17. Constantes físicas y espectroscópicas del derivado acetilado de la 23,24-dihidro-cucurbitacina F, 13C.

F.M. $C_{36}H_{54}O_{13}$

P.M. 694 g/mol

P.F. 155-156°C

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

Espectro 10

EMIE, m/z (%):

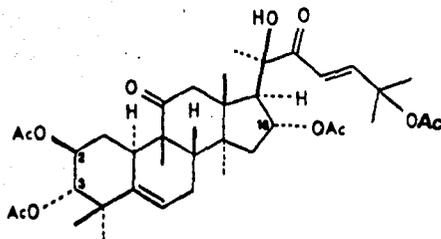
485.2 (0.8), 484.2 (2.3), 405.2 (1.2),
387.2 (1.4), 55.1 (32.0), 41.1 (33.5),
142.1 (92.7), 43.1 (100)

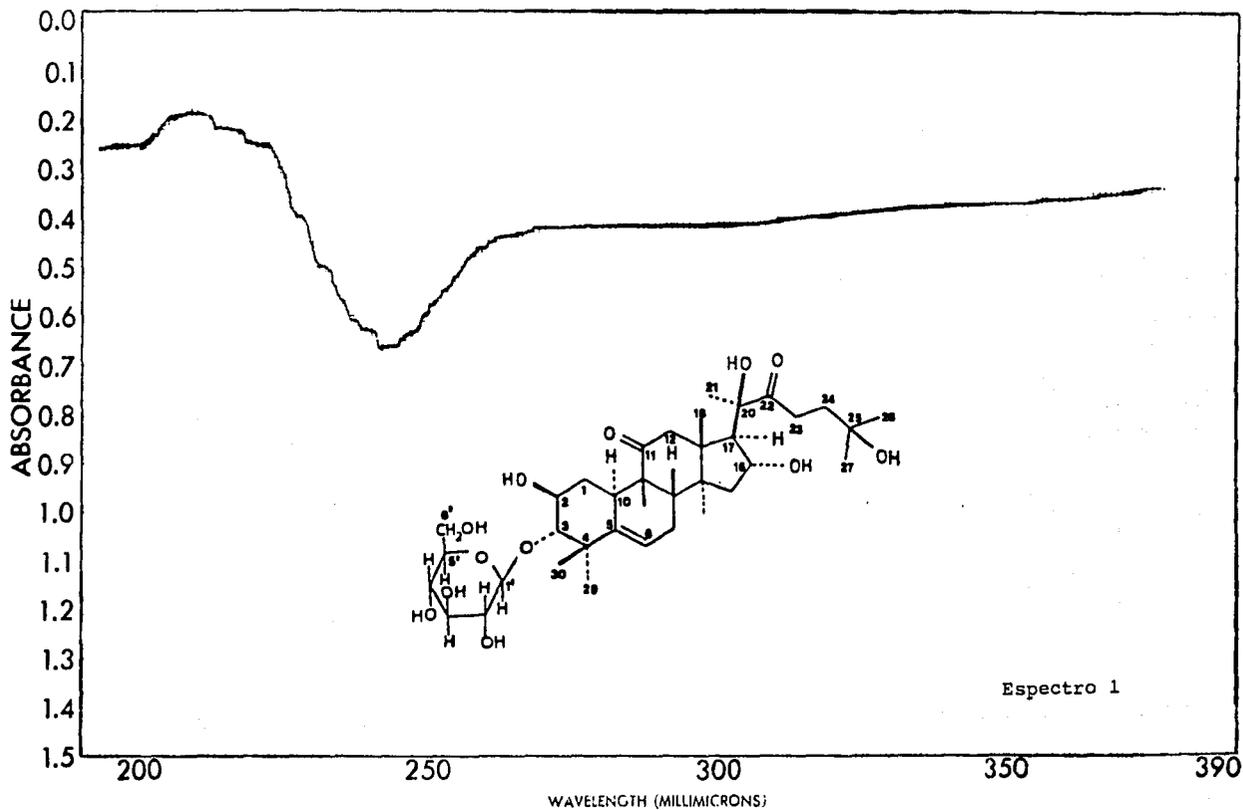
Espectro 11

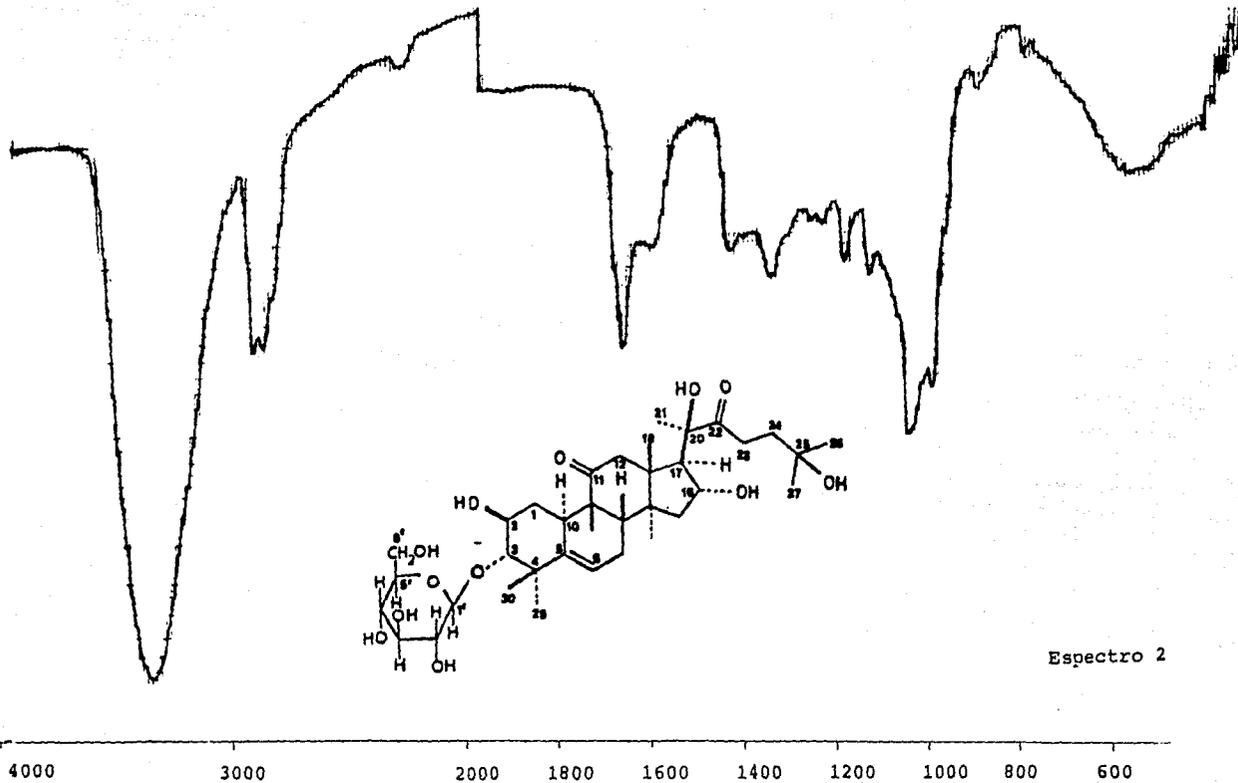
RMN¹H (CDCl₃, δ):

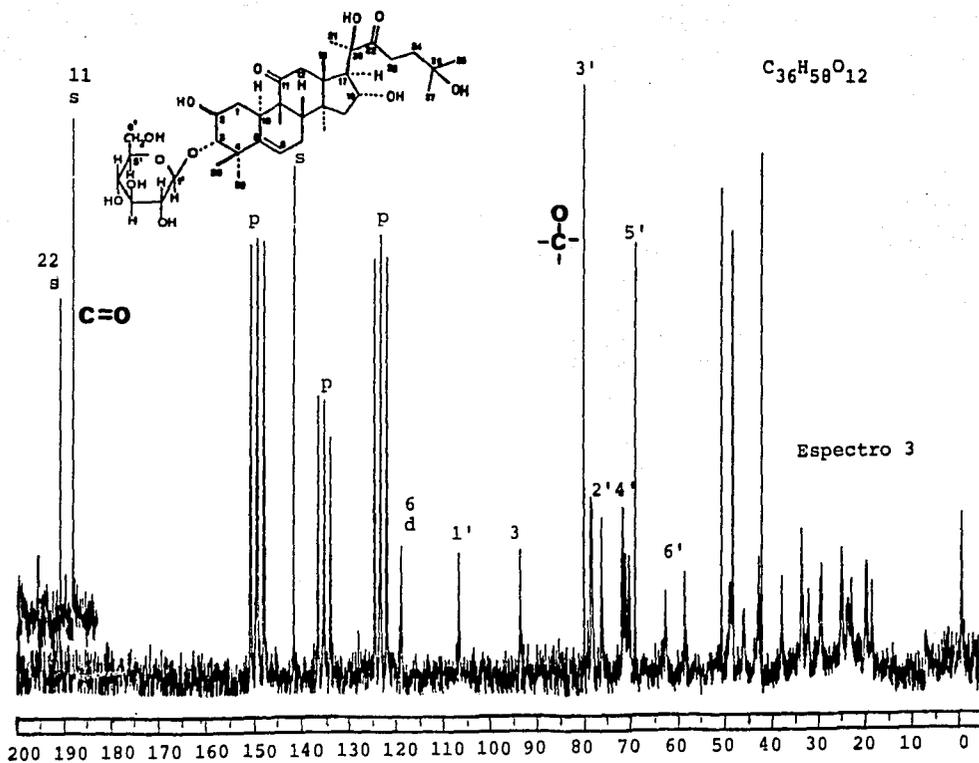
0.98 (s, 3H, Me-), 1.04 (s, 6H, 2Me-),
1.1 (s, 3H, Me-), 1.22 (s, 3H, Me-), 1.24
(s, 6H, 2Me-), 1.43 (s, 3H, Me-), 1.91
(s, 3H, Ac-), 1.97 (s, 3H, Ac-), 2.05 (s,
3H, Ac-), 2.65 (d, 1H, J=15Hz, H-12α),
2.69 (d, 1H, J=7Hz, H-17), 3.17 (d, 1H,
J=15Hz, H-12'β), 4.23 (sa, 1H, ν D₂O),
4.65 (d, 1H, J=10 Hz, H-3), 5.02 (ddd,
1H, J=10,10,6Hz, H-2), 5.11 (t, 1H,
J=7Hz, H-16), 5.73 (m, 1H, H-6).

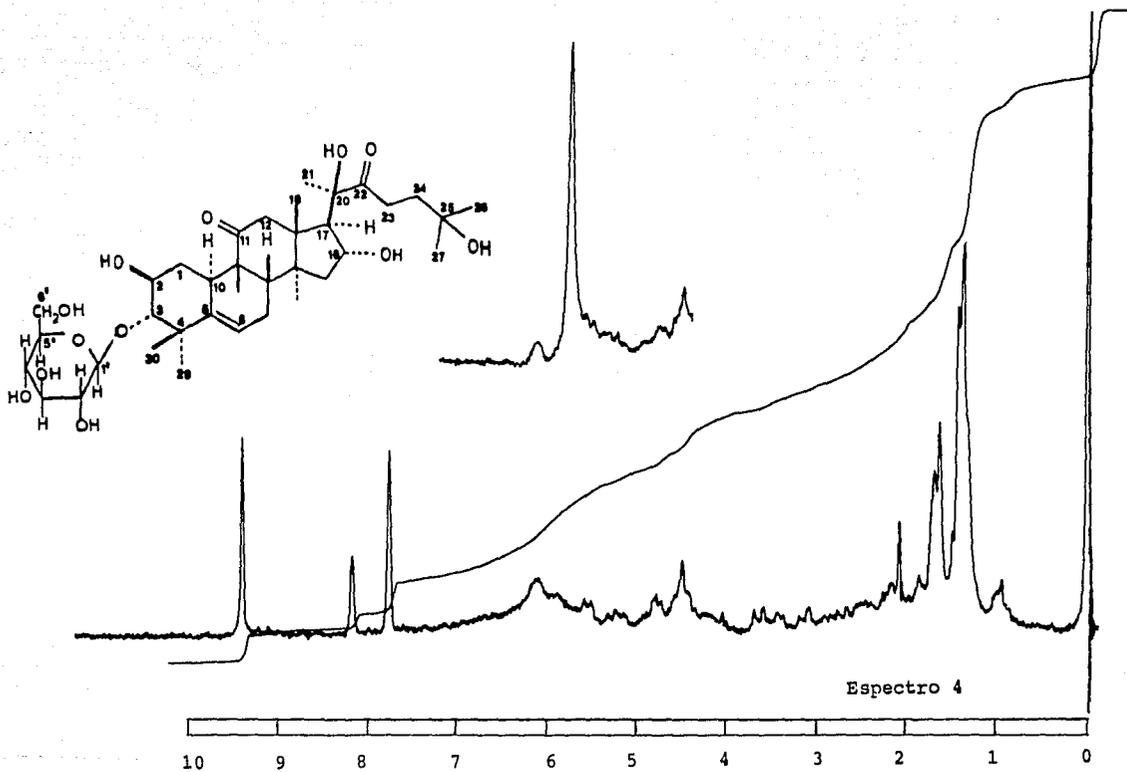
Espectro 12

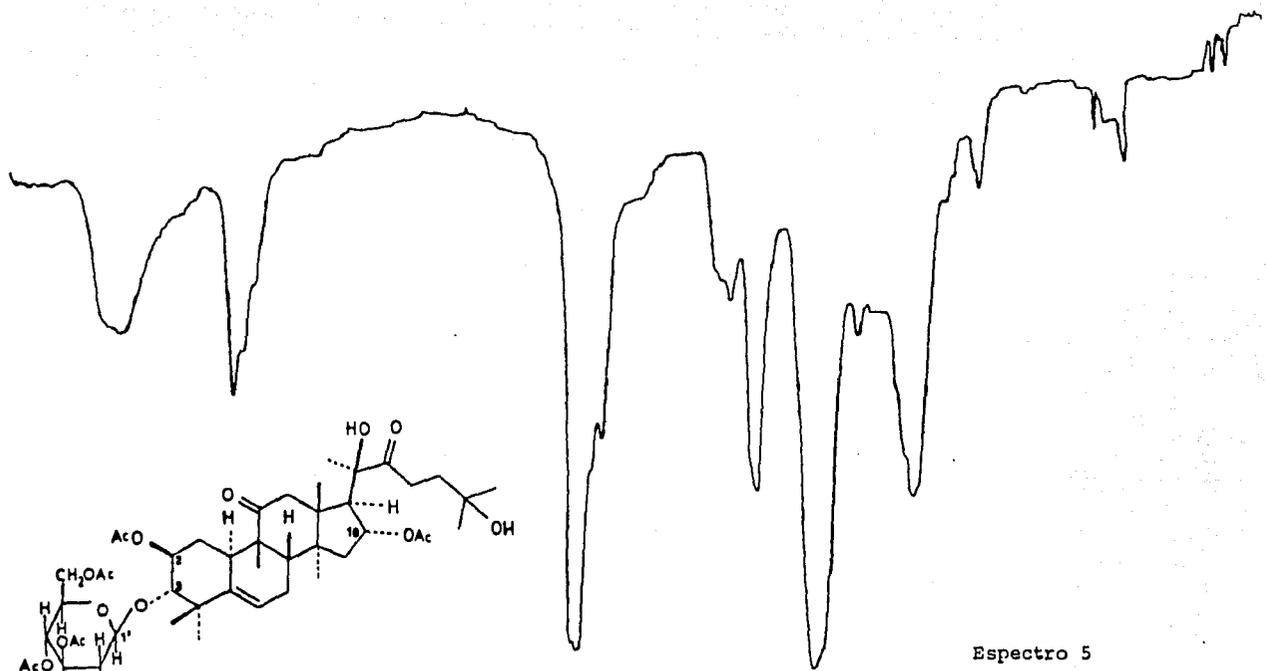






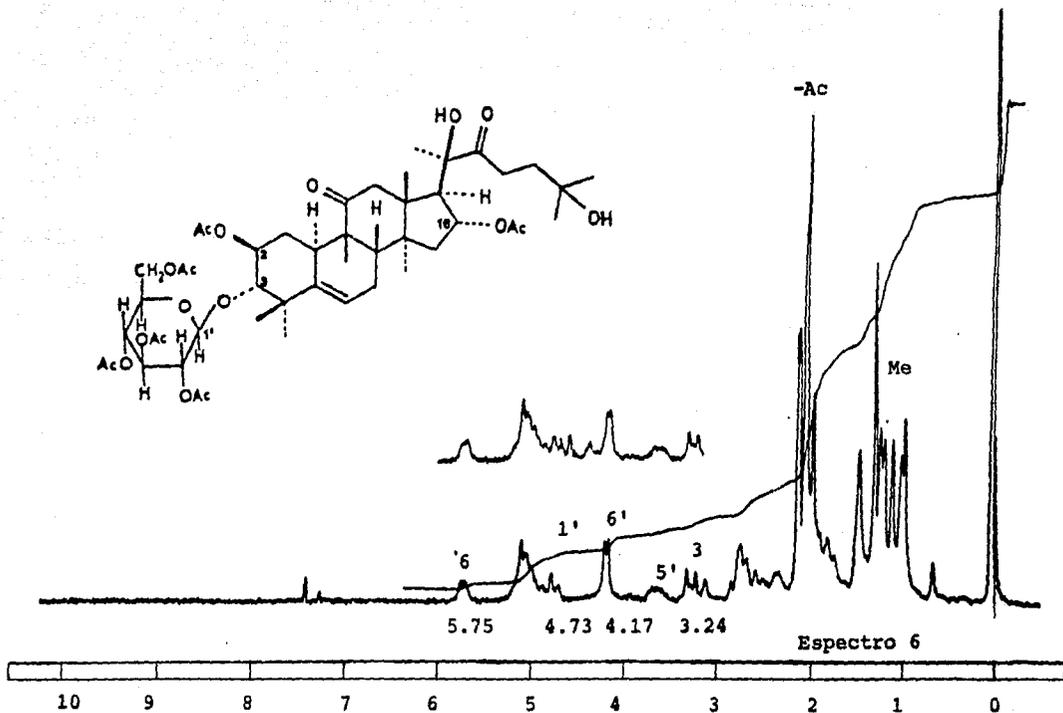


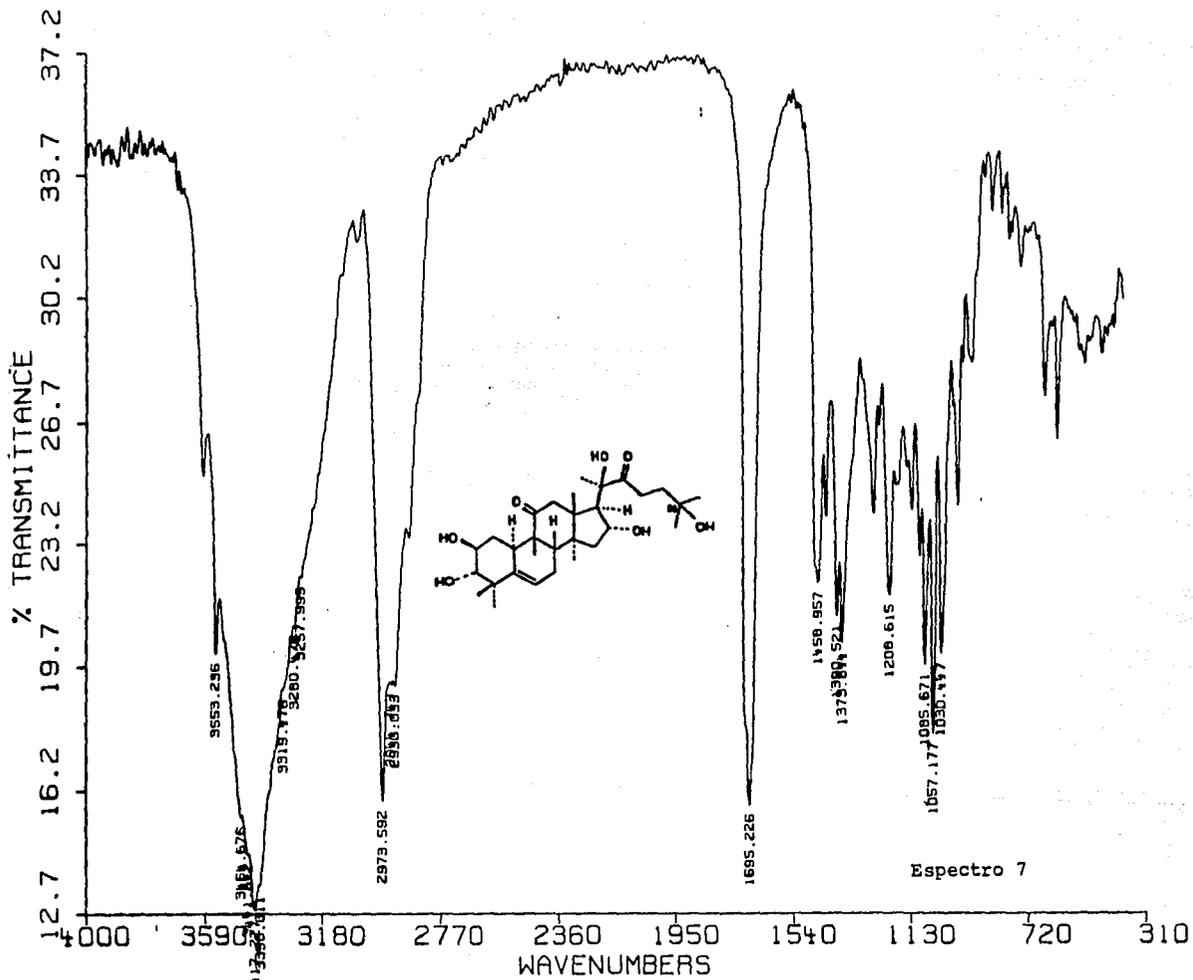


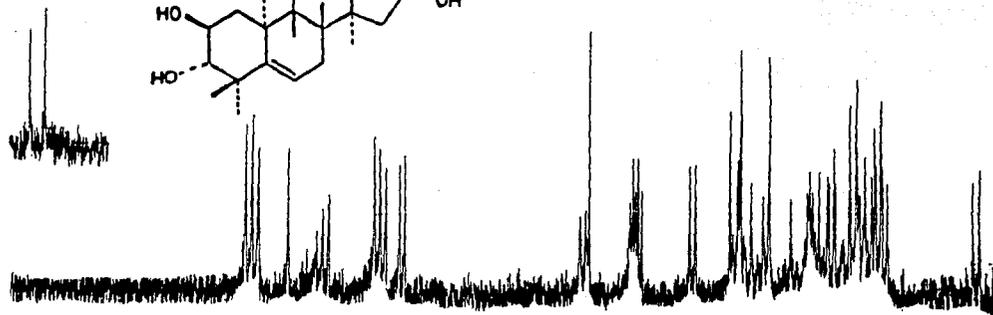
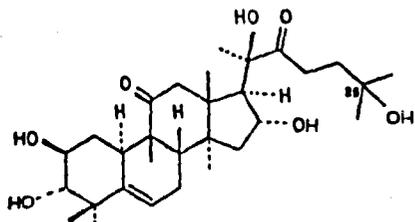


Espectro 5

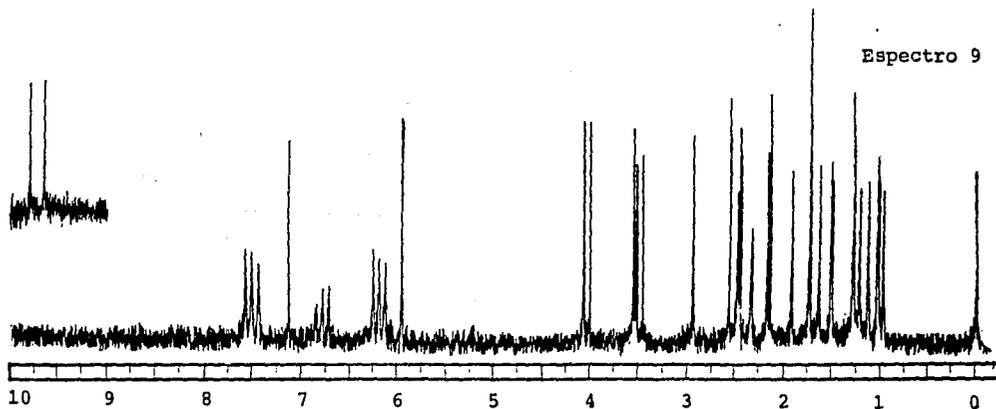


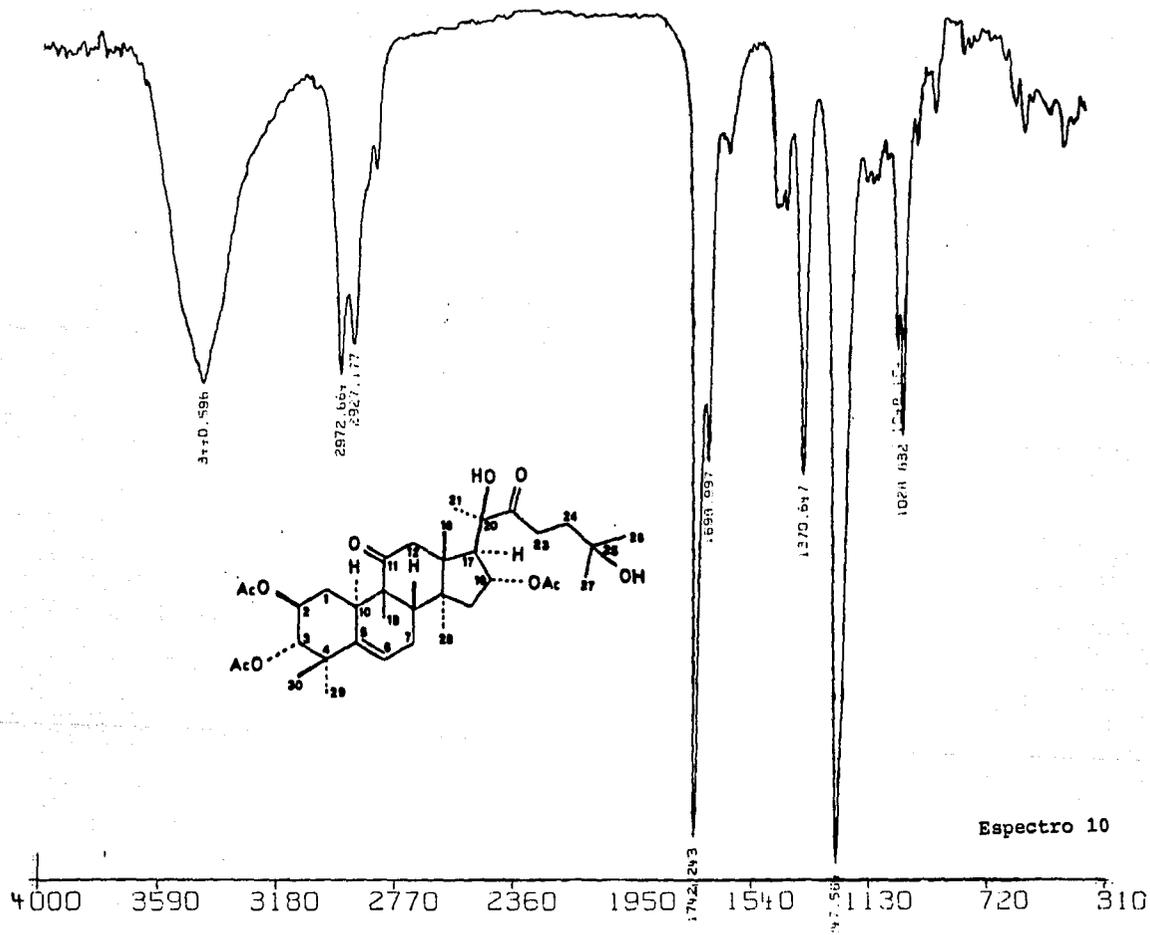




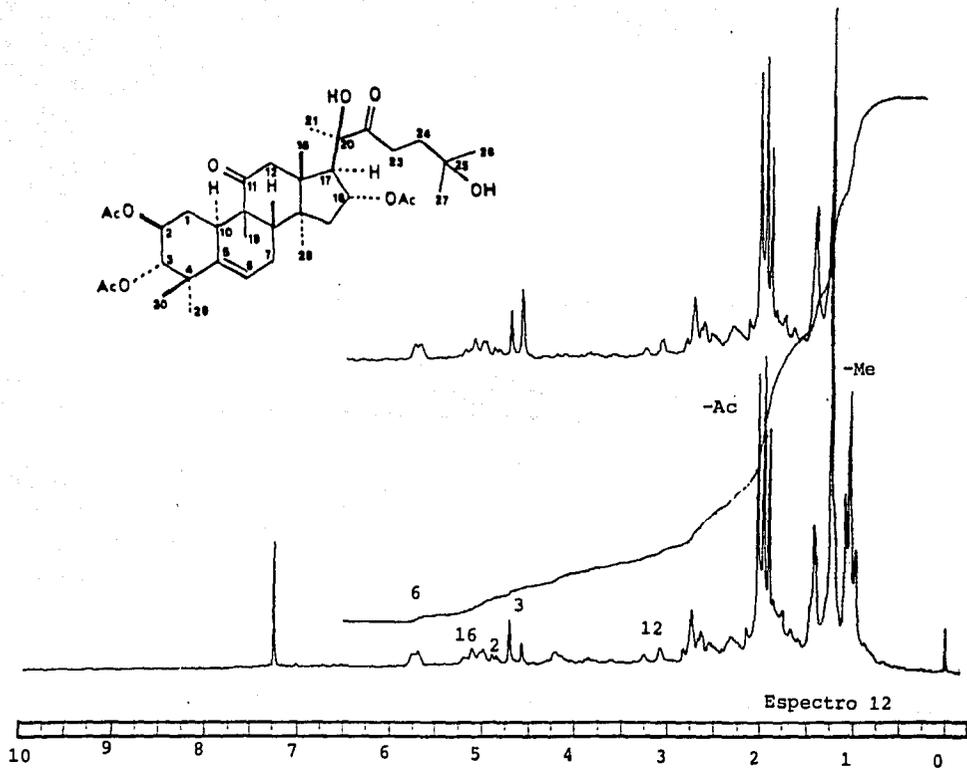


Espectro 9





Espectro 10



3.2 Identificación de la 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 14.

De las fracciones 202-222 de la columna cromatográfica de la Tabla 7 (ver parte experimental) cristalizaron 789 mg de un compuesto en forma de agujas muy finas de color amarillo pálido, PF 218-221°C, ópticamente activo y soluble en metanol y etanol. Las constantes físicas y espectroscópicas de esta sustancia se resumen en la Tabla 19.

Las características de solubilidad del compuesto, así como su comportamiento frente al reactivo de Molish sugirieron, al igual que en el caso del compuesto 13, su naturaleza glicosídica.

Las hidrólisis ácida (HCl 2N) y enzimática (con β -galactosidasa) de una pequeña cantidad del producto natural permitieron detectar a la galactosa como único azúcar presente y a otra sustancia de menor polaridad que el compuesto original. Dicho análisis se realizó en placas de gel de sílice mediante los sistemas VI, VII y IX y los agentes cromógenos B y C de la Tabla 5.

La fórmula molecular del producto natural 14 se determinó mediante un análisis elemental como $C_{22}H_{22}O_{10}$, la cual permite un índice de insaturación de 12.

El espectro IR (Espectro 14) presentó bandas características para hidroxilos (3460 y 3330 cm^{-1}), carbonilo de α -pirona (1675 cm^{-1}) y aromaticidad (1600 y 1515 cm^{-1}).

El espectro UV (Espectro 13) mostró las absorciones típicas (212,250 y 329 nm) de una fenilcumarina (Donnelly, 1973).

El espectro de RMN'H en DMSO-d₆ (Espectro 15) permitió confirmar:

- a) el carácter β-glicosídico del compuesto ya que a δ 4.6 se observó el doblete (J=8 Hz) característico del hidrógeno β-anomérico del azúcar;
- b) el carácter aromático debido a la presencia de señales por debajo de δ 6.5. A δ 7.16 se observó claramente un doblete (J=8 Hz), que integraba para dos hidrógenos, posiblemente parte de un sistema A₂B₂;
- c) la naturaleza 4-fenilcumarina de la aglicona ya que se observó el singulete típico de H-3 de la estructura base en δ 5.78 .

Este mismo espectro mostró un singulete característico para un metoxilo aromático (δ 3.83), las restantes señales para los hidrógenos de la porción azucarada (H-2"-H-6") y la correspondiente de un hidroxilo fenólico en δ 9.56.

El tratamiento del glicósido 14 con anhídrido acético y piridina permitió obtener el derivado acetilado 14B, cuyas características físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 20.

El espectro de RMN'H en CDCl₃ (Figura 17) del derivado peracetilado confirmó no sólo la naturaleza monofenólica del compuesto sino que también la presencia en la mo-

lécua de una unidad de galactosa, debido a la presencia de una señal para el metilo de un acetato aromático en δ 2.34 y de cuatro resonancias para metilos de acetato alifático en δ 1.19, 1.97, 2.04 y 2.24, respectivamente.

El espectro del derivado acetilado 14B (Espectro 17) a diferencia del espectro de RMN'H del glicósido original (Espectro 15) mostró una mayor resolución en la región aromática (Figura 10) ya que se pudo observar claramente:

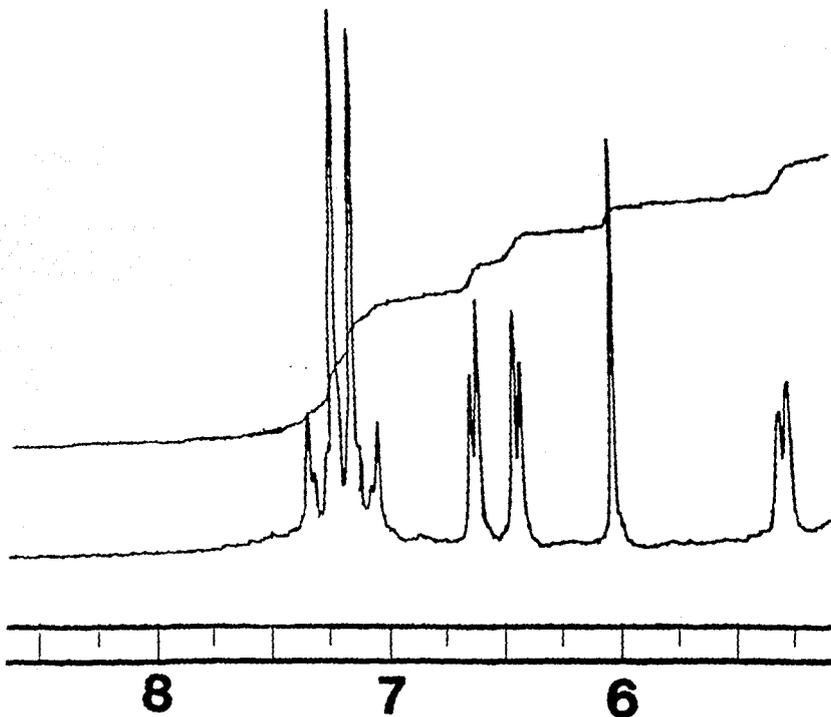


Figura 10. Región aromática del espectro de RMN'H de 14B.

a) el sistema A_2B_2 característico de un anillo aromático con una sustitución para. El desplazamiento paramagnético ($\Delta\delta=0.2$) observado para las dos señales que integran este sistema 7.1 (d, $J=8$ Hz) y 7.3 (d, $J=8$ Hz), indicó que la función fenólica se encontraba en la posición 4' del esqueleto base ;

b) un sistema AB de un anillo aromático tetrasustituido con una relación meta centrado en 6.50 (d, $J=3$ Hz) y 6.63 (d, $J=3$ Hz) y asignable a los protones H-6 y H-8 de una fenilcumarina 5,7-disustituída (Mata, et al, 1987; Mata, et al, 1988; Donnelly, 1973) ;

c) el singulete correspondiente al protón H-3 centrado en δ 6.05. Es de hacer notar que la ausencia de una señal para un grupo metilo de acetato alrededor de δ 1.5 en el espectro de RMN¹H del derivado acetilado 14B indicaba que el enlace o-glucosídico se formaba entre el hidroxilo del carbono anomérico del azúcar y el hidroxilo fenólico ubicado en el carbono 5 de la aglicona (Mata, et al, 1988; Mata, et al, 1987) (ver Figura 11).

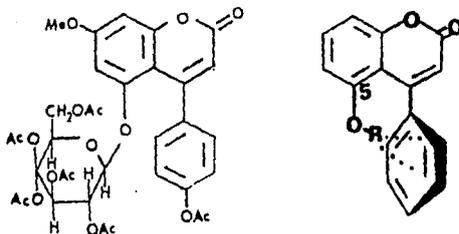


Figura 11. Estructura del compuesto 14B y efecto protector del 4-arilo sobre el sustituyente en la posición C-5 de la 4-arylcumarina.

Al efectuar la hidrólisis ácida, utilizando una mayor cantidad del glicósido 14 fué posible aislar la aglicona 14A. Este compuesto se obtuvo como un sólido amarillo verdoso de pf 199-205°C; sus constantes físicas y espectroscópicas se indican en la Tabla 21.

El análisis de los datos resumidos en la Tabla 21 permitieron identificar a la aglicona como la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina la cual no ha sido descrita como producto natural.

Las características espectroscópicas más importantes observadas para la aglicona 14A fueron las siguientes:

a) el espectro de RMN'H en CDCl_3 -DMSO- d_6 (Espectro 19) fue muy similar al del glicósido 14, diferenciándose fundamentalmente en la ausencia de las señales para el azúcar.

Las señales más relevantes fueron las siguientes:

- a.1 el singlete del metoxilo aromático (δ 3.78);
- a.2 el singlete correspondiente al H-3 (δ 5.78) de la estructura base ;
- a.3 el sistema AB de un anillo aromático con una sustitución meta centrado en δ 6.35 y 6.25 (J=3 Hz) del anillo A ;
- a.4 el sistema A_2B_2 de un anillo aromático con una sustitución para [δ 6.75 (J=8 Hz), δ 7.12 (J=8 Hz)] correspondientes a los hidrógenos H-3', H-5' y H-2', H-6', respectivamente ;

a.5 dos señales para hidrógenos fenólicos (δ 8.10 y 9.10) que desaparecieron al registrar el espectro con D_2O y asignables a los hidroxilos fenólicos en C-5' y C-4'.

b) el espectro de masas presentó los fragmentos característicos de una 4-fenilcumarina (Donnelly, 1968 y 1973), observándose iones importantes de m/z 284 (M^+ , pico base); m/z 256 y m/z 241. El fragmento de m/z 256 resulta de la pérdida de una molécula neutra de monóxido de carbono para originar un catión de benzofurano. La pérdida subsecuente de un metilo da origen al ión de m/z 241, tal como se muestra en la Figura 12.

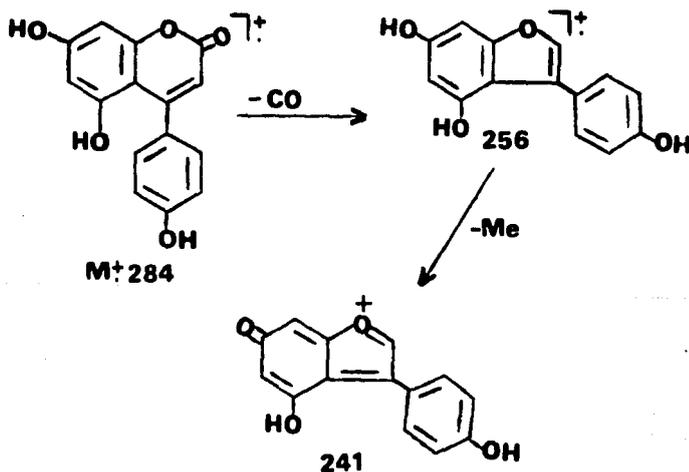


Figura 12. Patrón de fragmentación de 14A.

La prueba inequívoca para la localización del azúcar en la posición 5 de la aglicona se obtuvo al transformar el compuesto 14 en el 14C por medio de una reacción de metilación con diazometano (Figura 13). Las propiedades físicas y espectroscópicas de 14C (Tabla 22) fueron idénticas al compuesto 5-O-β-D-galactosil-4',7-dimetoxi-4-fenilcumarina previamente aislado de la especie relacionada Exostema caribaeum (Mata, R., et al, 1988). Las evidencias analizadas previamente permitieron identificar al compuesto 14 como la 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, también un nuevo producto natural.

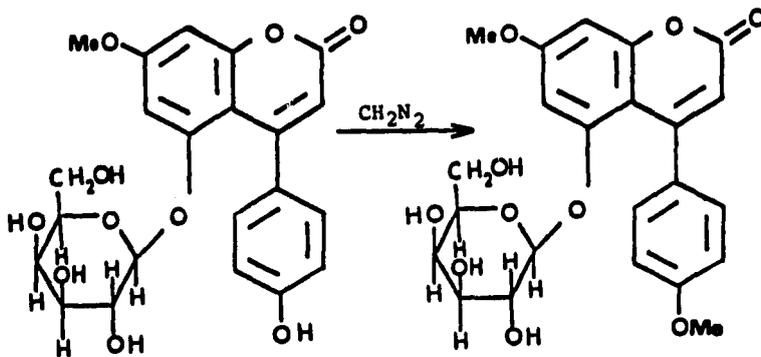
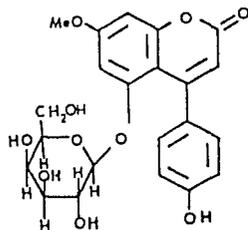


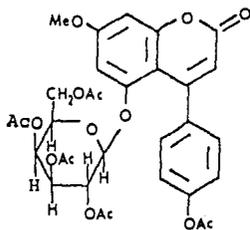
Figura 13. Metilación de 5-O-β-D-Galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 14.

Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 14.



F.M.	$C_{22}H_{22}O_{10}$	
P.M.	446 g/mol	
P.F.	218-221°C	
$[\alpha]_D$	-3.659 (MeOH)	
UV λ_{max}^{MeOH} nm:	212, 250, 327	Espectro 13
IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} :	3460, 3330, 1675, 1615, 1600, 1515, 1485, 1440, 1365, 1300, 1280, 1260, 1240, 1205, 1175	Espectro 14
RMN ¹ H (DMSO- d_6 , δ): 90 MHz	3.83 (s, 3H, -MeO-7), 4.60 (d, 1H, J=7 Hz, H-1''), 5.78 (s, 1H, H-3), 6.58 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.65 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 6.73 (d, 2H, J=8Hz, H-3', H-5'), 7.16 (d, 2H, J=8Hz, H-2', H-6'), 3-4.4 (m, H-2''-H-6''), 9.56 (sa, 1H, -OH, $\sim D_2O$).	Espectro 15
Análisis Elemental:	$C_{59.44\%}$, $H_{3.40\%}$, $O_{38.2\%}$	

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de: la 5-O- β -D-tetraacetilgalactopiranosil-4'-acetoxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 14B.



F.M.

$C_{32}H_{32}O_{15}$

P.M.

656 g/mol

P.F.

202-205°C

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :

3450, 2920, 2850, 1760-1720, 1610, 1540,
1500, 1430, 1360, 1300, 1230-1190, 1160,
1070-1040, 940, 900, 840, 650

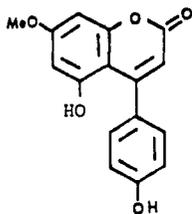
Espectro 16

RMN^1H ($CDCl_3$, δ):
80 MHz

1.91 (s, 3H, Ac-), 1.97 (s, 3H, Ac-), 2.04
(s, 3H, Ac-), 2.24 (s, 3H, Ac-), 2.34 (s,
3H, 4'-Ac-), 3.89 (s, 3H, -MeO-7), 4.05-
5.3 (m, 5H, H-2''-H-6''), 6.05 (s, 1H, H-3),
6.5 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.63 (d, 1H,
J=3Hz, H-6), 7.1 (d, 2H, J=8Hz, H-3', H-5'),
7.3 (d, 2H, J=8Hz, H-2', H-6').

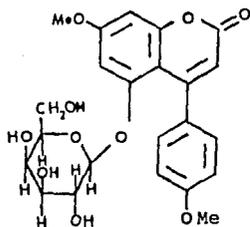
Espectro 17

Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenol-cumarina, 14A.

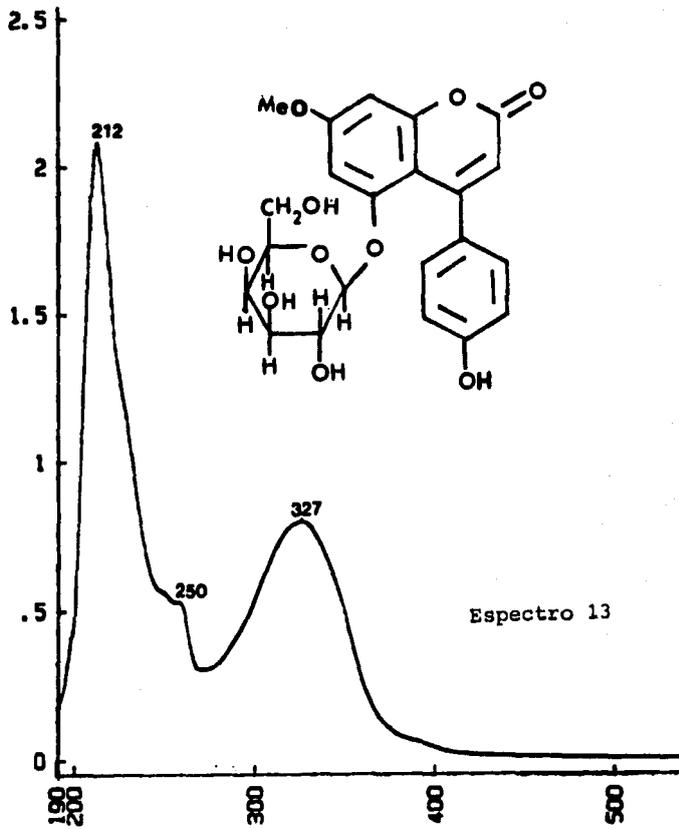


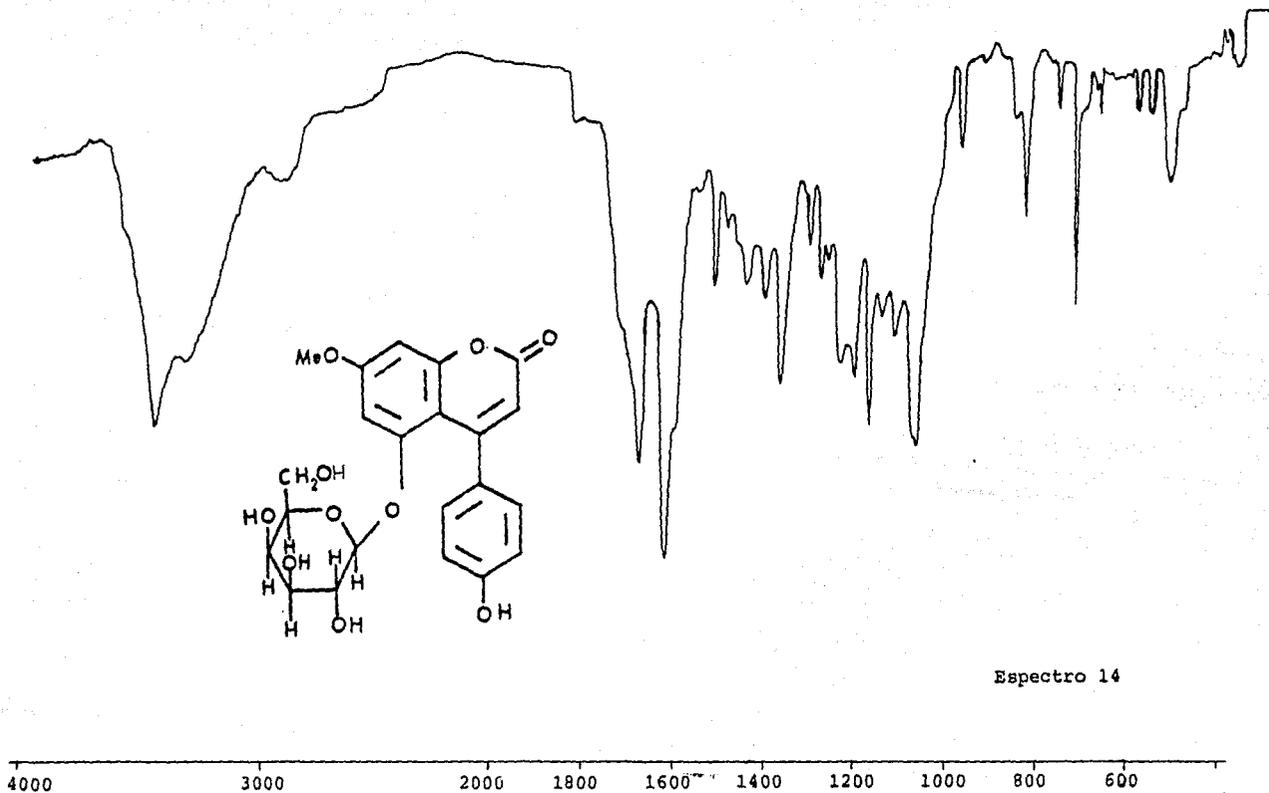
F.M.	$C_{16}H_{12}O_5$	
P.M.	284 g/mol	
P.F.	199-205°C	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} :	3400, 1700, 1690, 1610, 1515, 1350, 835	Espectro 18
EMIE m/z (%):	284 (100, M^+), 256 (43), 241 (20)	Espectro 19
RMN ¹ H (DMSO- d_6 - $CDCl_3$) δ , 90 MHz)	3.78 (s, 3H, -O- Me -7), 6.25 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.35 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 6.75 (d, 2H, J=8Hz, H-3', H-5'), 7.12 (d, 2H, J=8Hz, H-2', H-6'), 8.10 (sa, 1H, OH-5), 9.10 (sa, 1H, OH-4').	Espectro 20

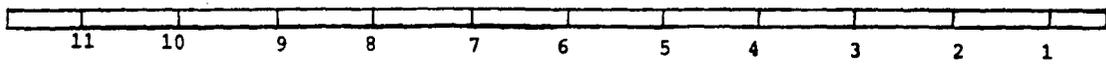
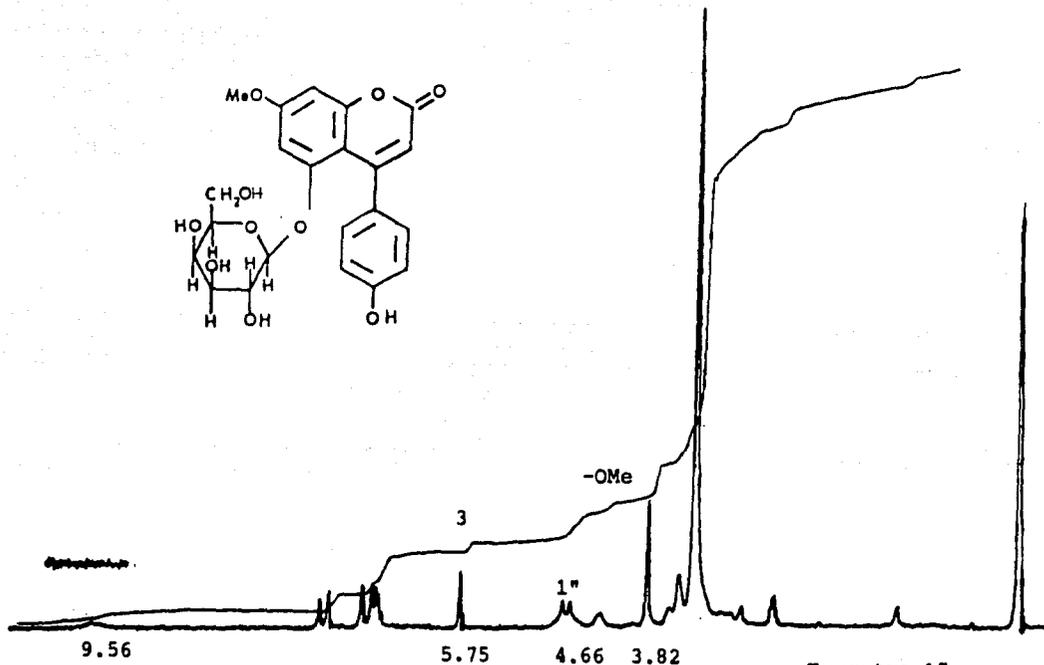
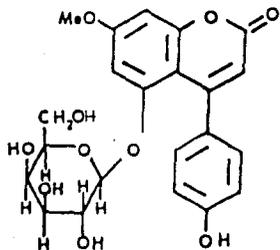
Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-galactosil-7,4'-dimetoxi-4-fenilcumarina, 14C.



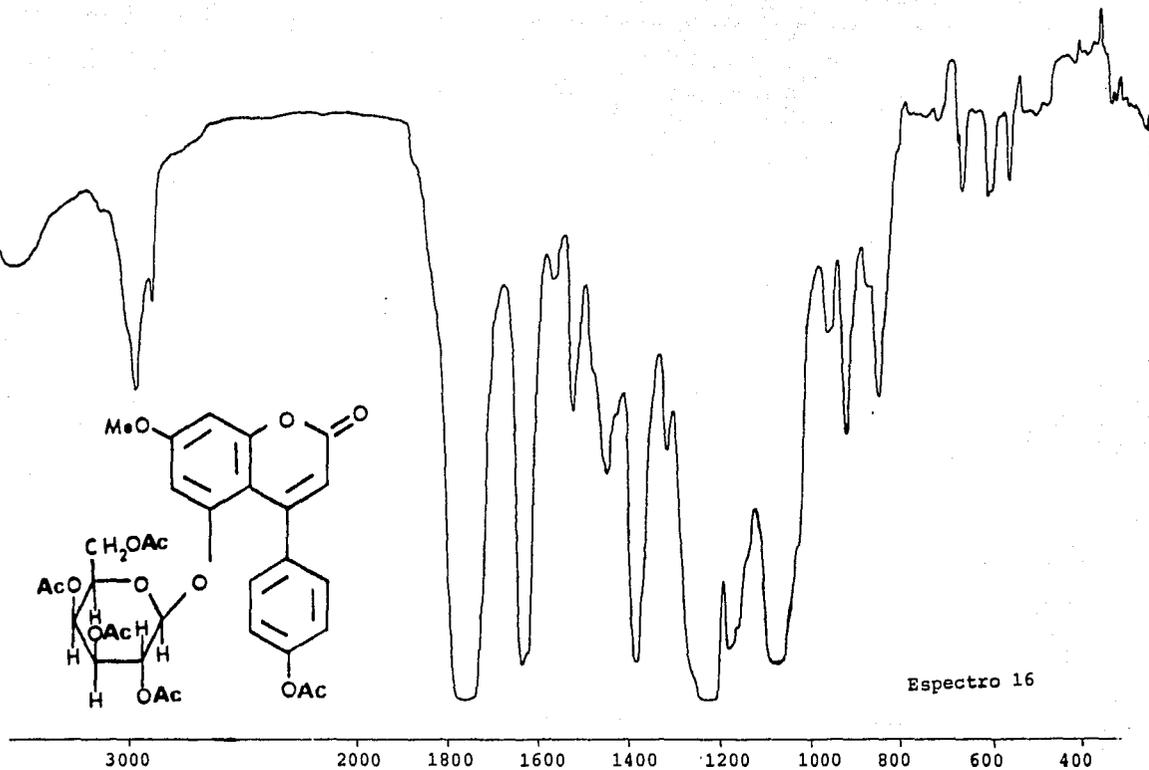
F.M.	$C_{24}H_{26}O_{10}$	
P.M.	460 g/mol	
P.F.	217-219°C	
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} :	3500, 3200, 1690, 1671, 1614, 1593, 1512, 1444, 1367, 1262, 1241, 1205, 1171, 1120, 1068, 831	Espectro 21
RMN ¹ H ($CDCl_3$ -DMSO- d_6 , δ): 90 MHz	4-3 (m, H-2''-H-6''), 3.84 (s, 6H, -OCH ₃), 4.54 (d, 1H, J=8Hz, H-1''), 5.92 (s, 1H, H-3), 6.53 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 6.62 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.87 (d, 2H, J=8Hz, H-3' y H-5'), 7.20 (d, 2H, J=8Hz, H-2' y H-6')	Espectro 22

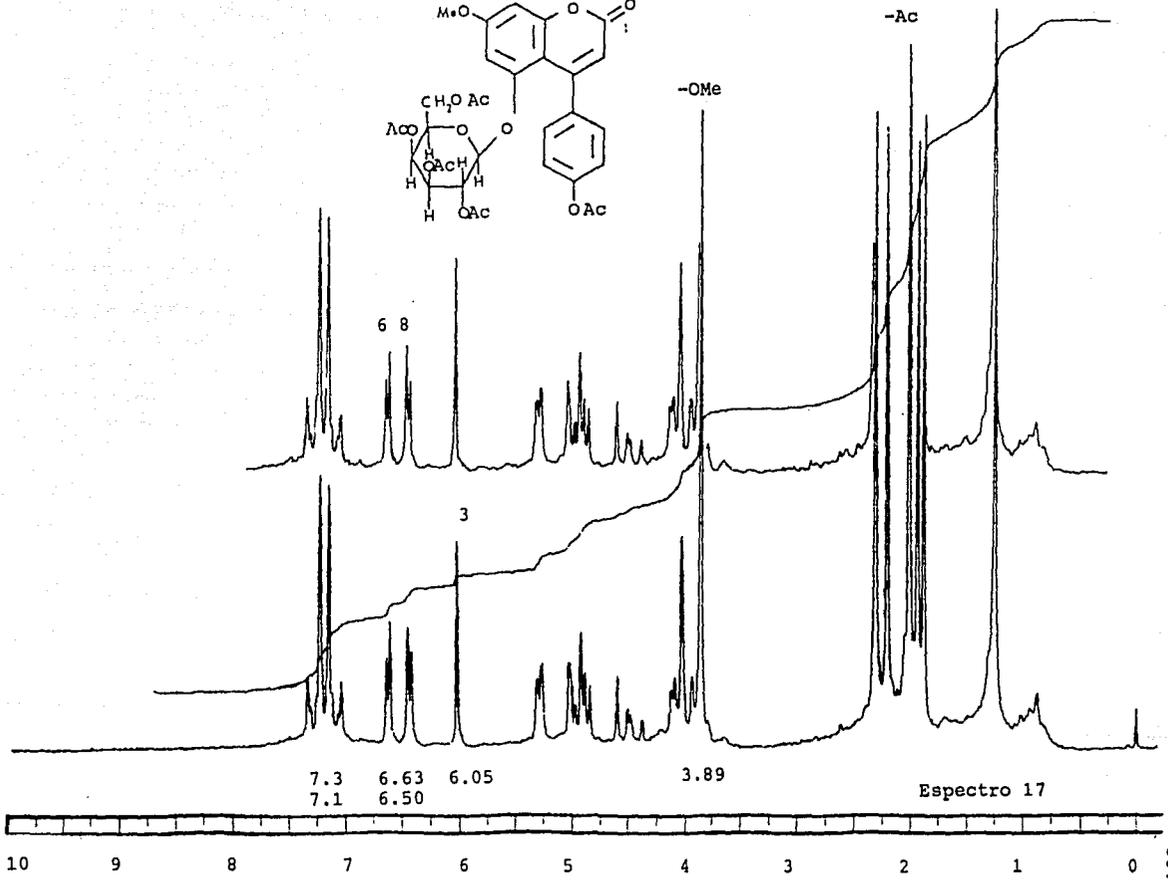
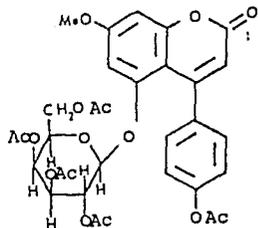


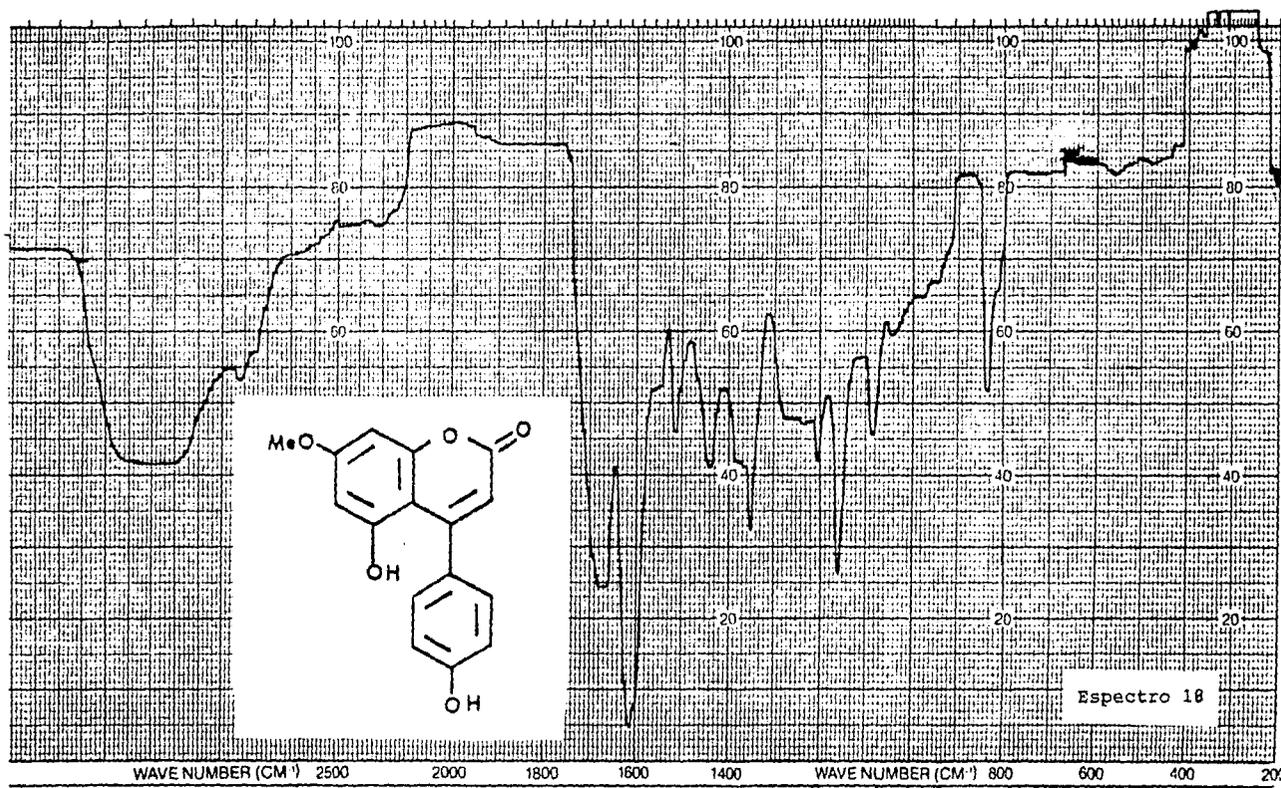


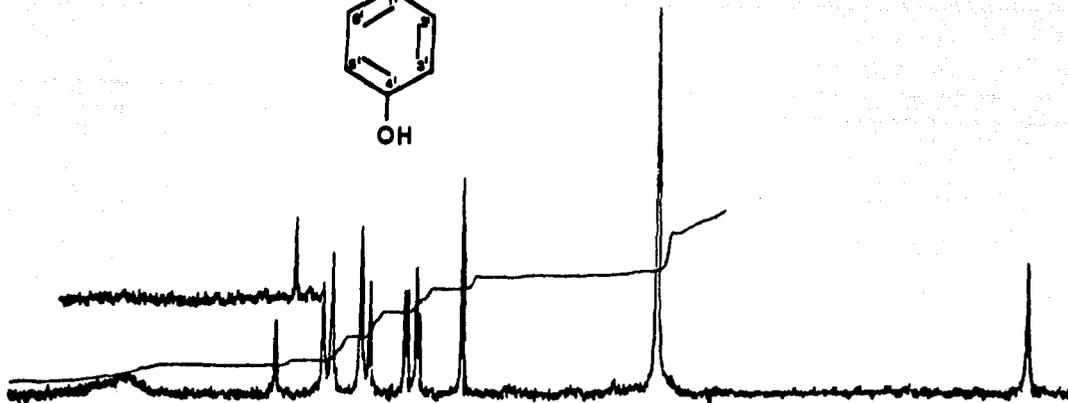
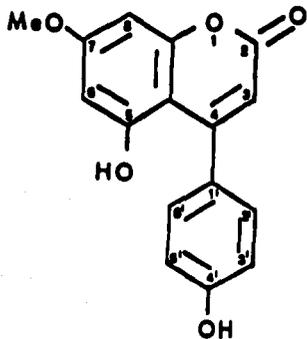


ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

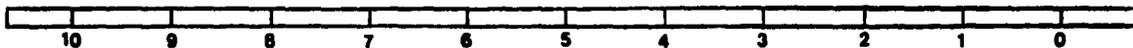


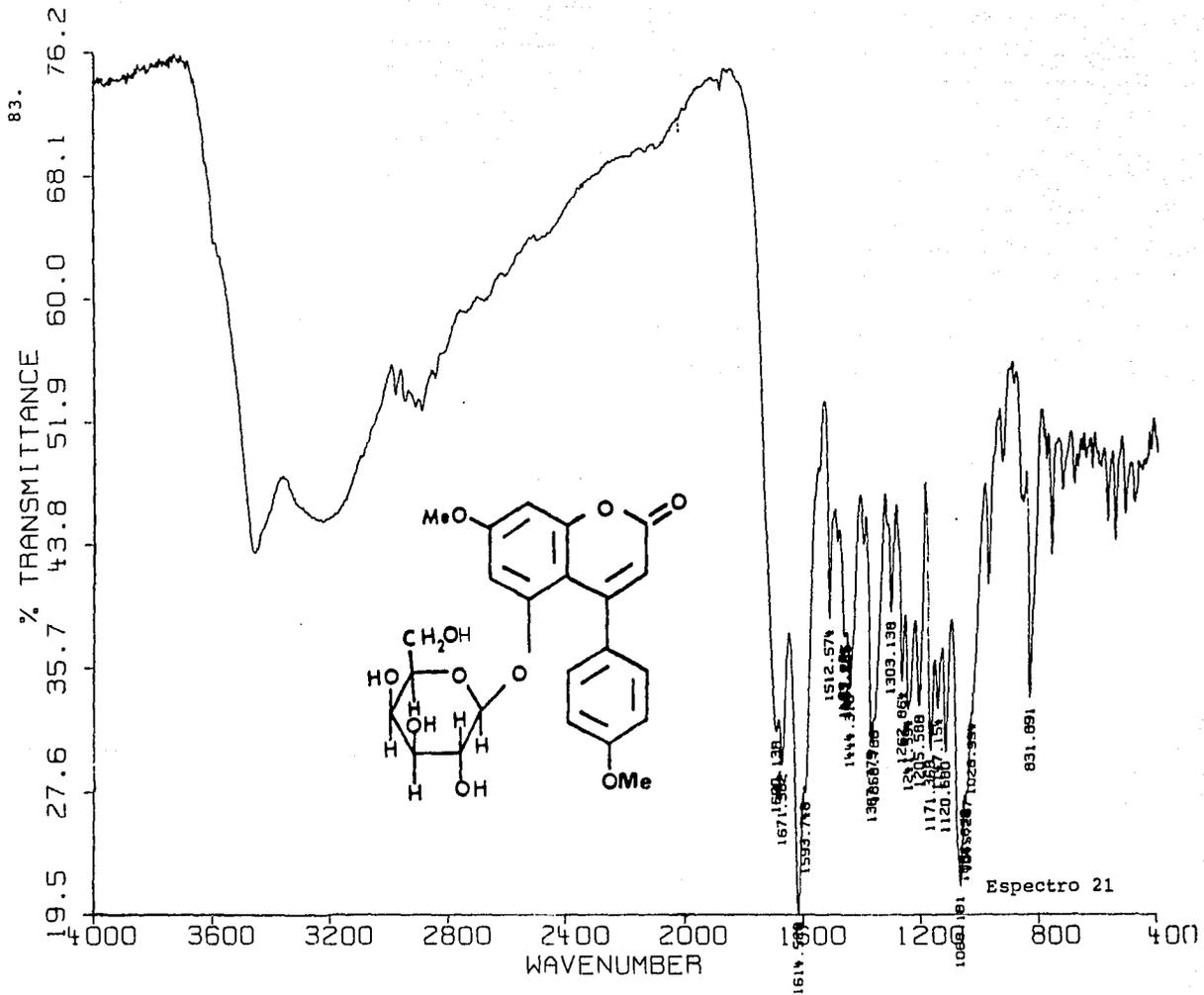


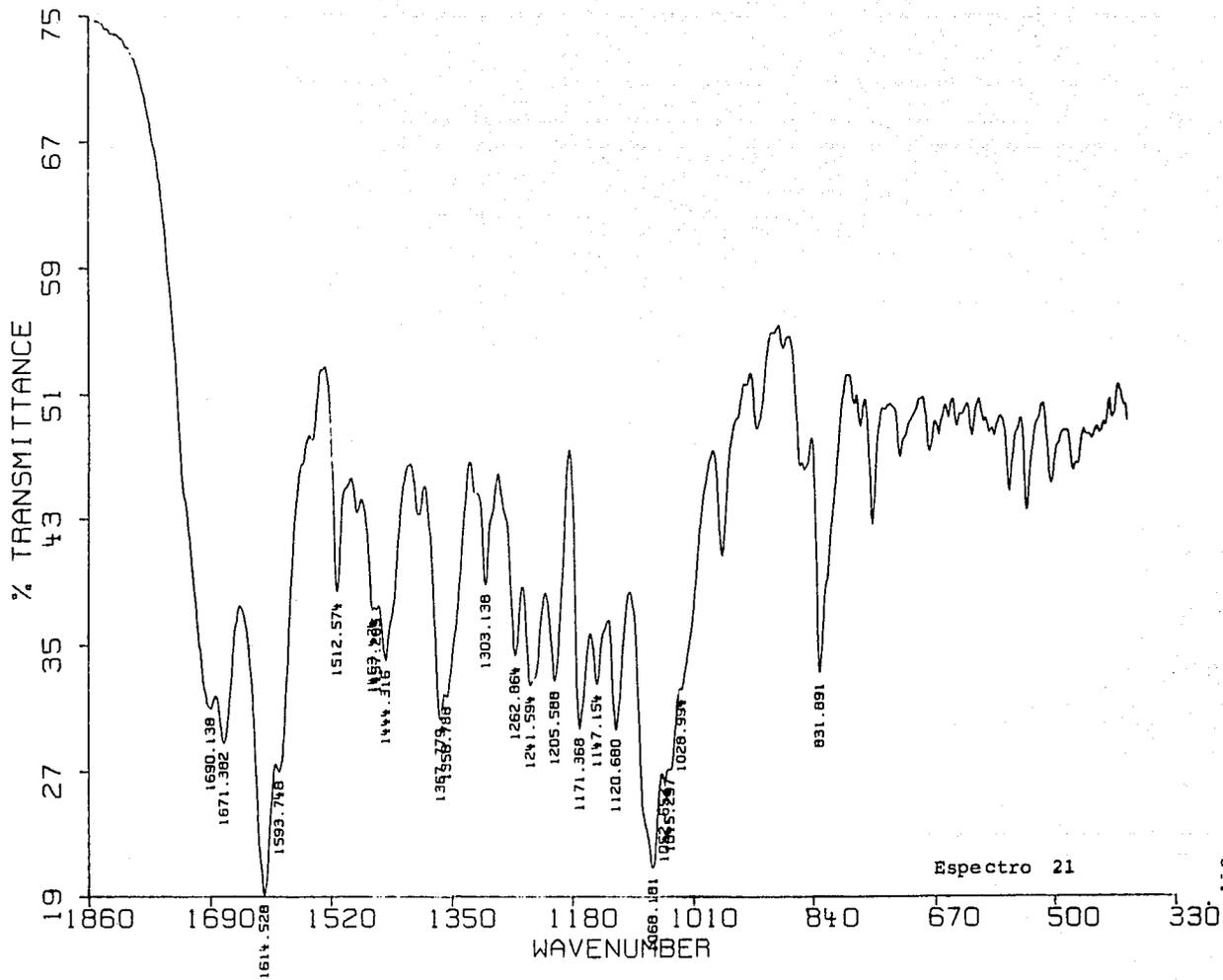


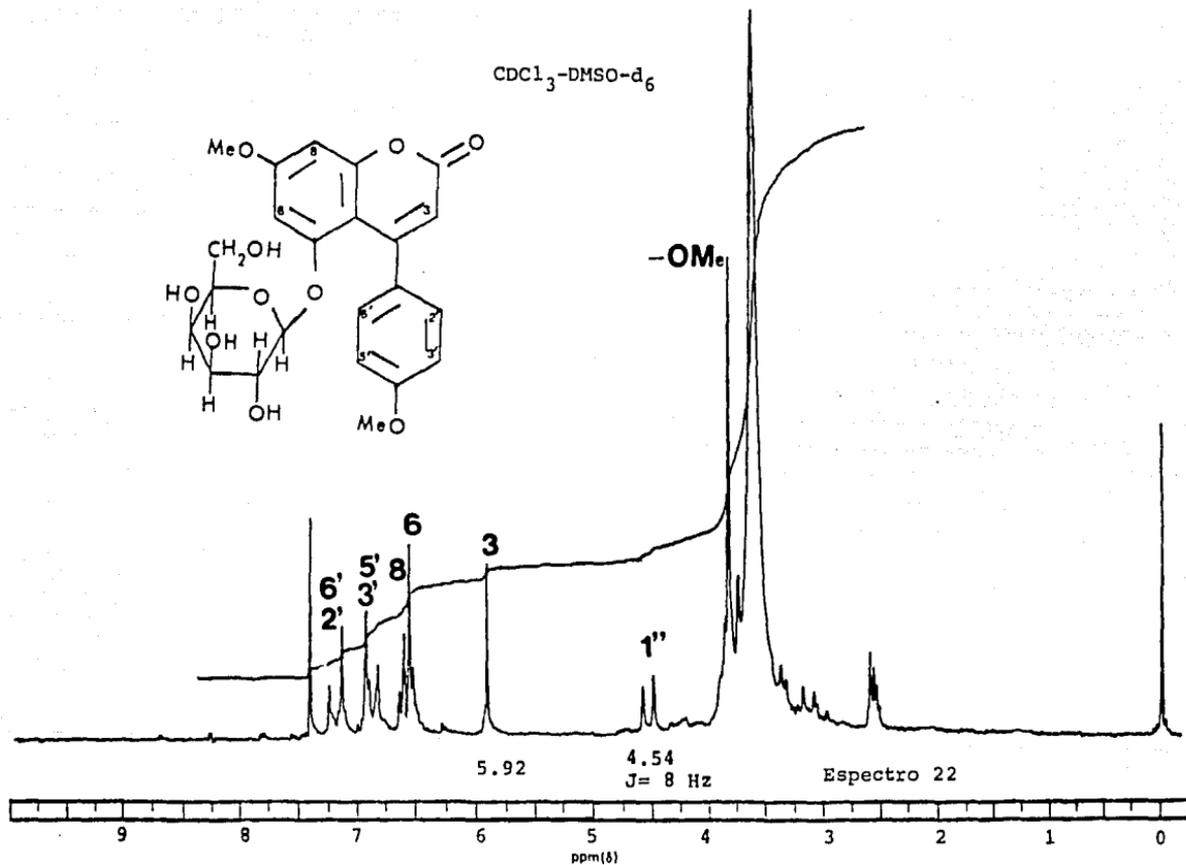


Espectro 20









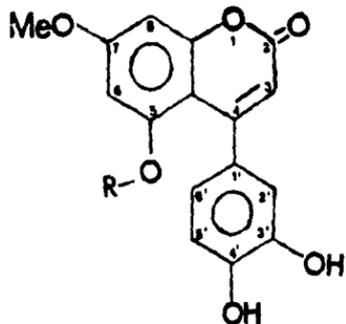
3.3 Identificación de los compuestos 12, 15 y 16.

Los tres compuestos se aislaron en forma de sólidos cristalinos como se indicó en la parte experimental, y la identificación de los mismos se realizó por el análisis de sus datos físicos y espectroscópicos y por medio de reacciones de degradación.

Las constantes físicas y espectroscópicas de 12, 15 y 16 se muestran en las Tablas 23 y 24. Los compuestos mostraron comportamientos cromatográficos similares al compuesto 14 y al igual que éste, los tres fueron muy solubles en disolventes polares, reaccionaron positivamente con el reactivo de Molish y por hidrólisis ácida con H_2SO_4 ó HCl de 12, 15 y 16, originaron galactosa, galactosa y glucosa respectivamente, y una aglicona idéntica en los tres casos.

Por otra parte, la comparación con muestras auténticas de fenilcumarinas aisladas con anterioridad de Exostema caribaeum (Calzada, 1987; García, 1988) permitió identificar los compuestos 12, 15 y 16 como la 5-O-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina; la 5-O- β -D-galactopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina y la 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, respectivamente.

Tabla 23. Constantes físicas y espectroscópicas de 12, 15, 16 y su aglicona.



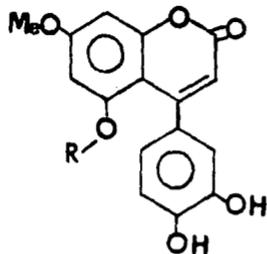
12: R=6"-acetil- β -D-galactopiranosil

15: R= β -D-galactopiranosil

16: R= β -D-glucopiranosil

	C o m p u e s t o		
	<u>12</u>	<u>15</u>	<u>16</u>
F.M.	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
P.M.	504 g/mol	462 g/mol	462 g/mol
P.F.	229-233°C	227-230°C	255-257°C
IR ν_{\max}^{KBr} cm ⁻¹ :	3460, 3400, 2900, 1725, 1705, 1690, 1610, 1510, 1075, 1045, 600	3550, 3360, 2920, 1714, 1610, 1520, 1430, 1445, 1365, 1190, 1200, 1160, 1080, 840	3530, 3410, 2900, 1698, 1615, 1520, 1430, 1360, 1340, 1315, 1235, 1160, 1110, 1080, 1050, 1000
	Espectro 23	25	27
<u>12A</u> = <u>15A</u> = <u>16A</u> = 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina			
F.M.		C ₁₆ H ₁₂ O ₆	
P.M.		300 g/mol	
P.F.		138-140°C	
IR ν_{\max}^{KBr} cm ⁻¹ :		3420, 3250, 1670, 1620, 1590, 1512, 1500, 1430, 1380, 1350, 1300, 1270, 1240, 1200, 1150, 1115, 1080, 1050, 995, 845, 815, 790, 750	Espectro 29
EMIE m/z (%):		272.1 (100), 300.1 (87.9), 257 (37.7), 43.1 (28.1), 313.1 (1.6), 328 (4.0), 356.1 (4.5), 357.1 (1.4)	Espectro 31

Tabla 24. Desplazamientos químicos (δ) en RMN¹H de los compuesto 12, 15, 16 y su aglicona.



12: R=6"-acetil- β -D-galactopiranosil

15: R= β -D-galactopiranosil

16: R= β -D-glucopiranosil

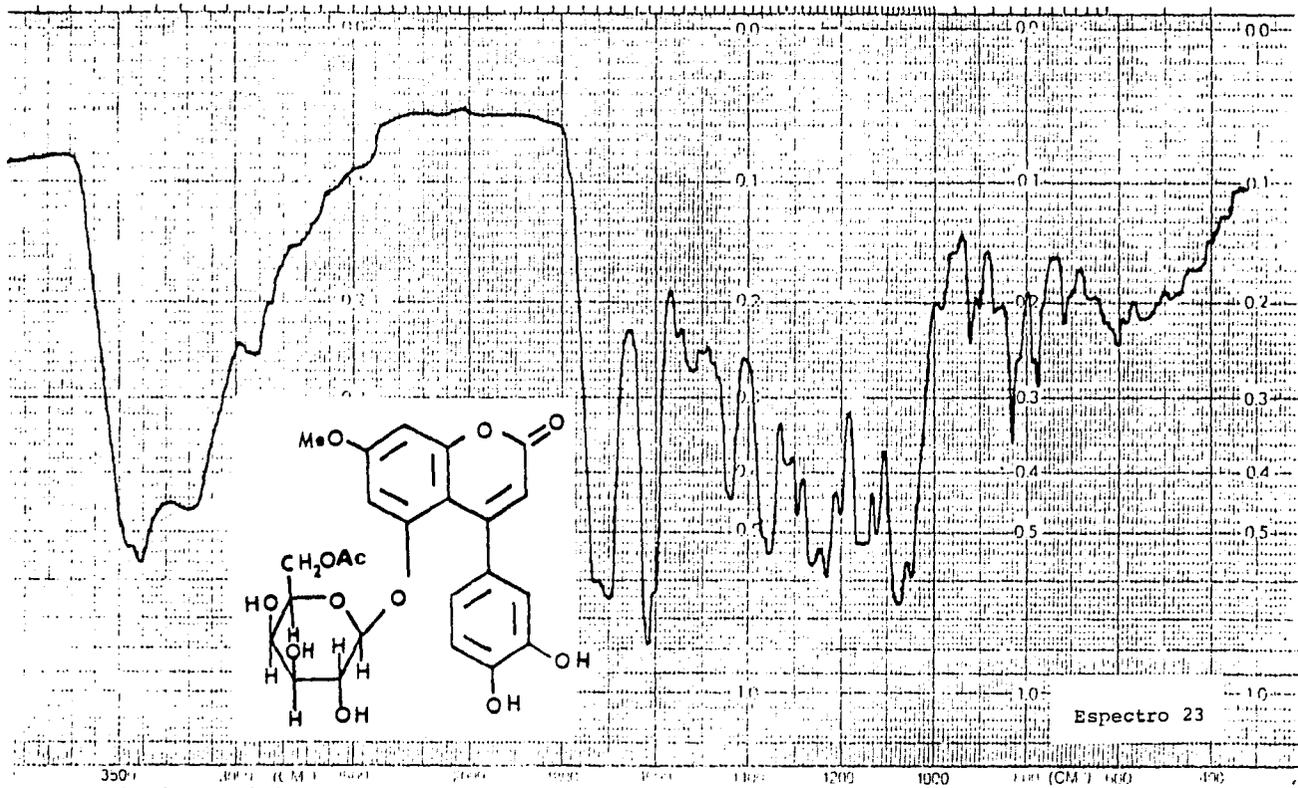
12A=15A=16A: R=H

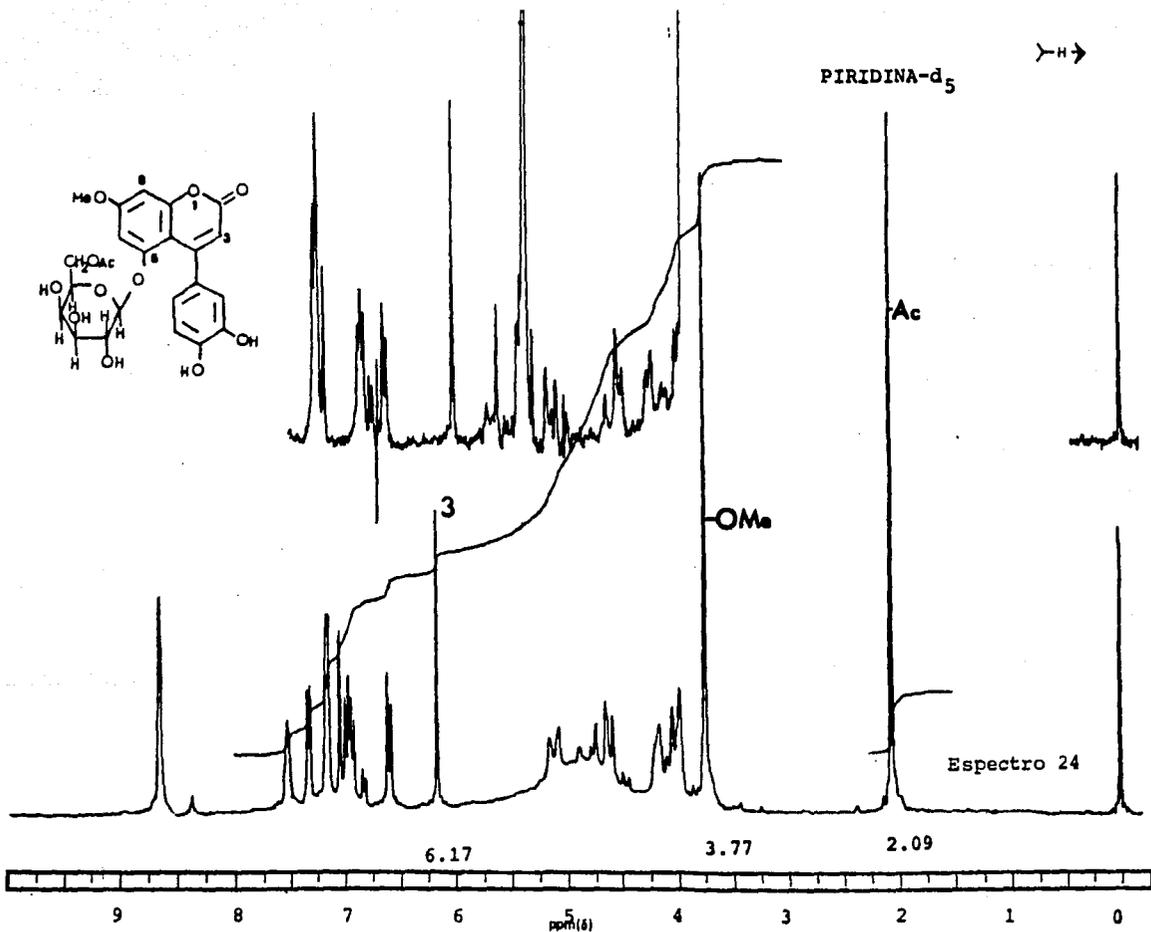
Protón	C o m p u e s t o			
	<u>12</u> ^a	<u>15</u> ^b	<u>16</u> ^b	Aglicona ^b
H-3	6.19 s	6.20 s	5.87 s	5.78 s
H-6	6.98 d (3Hz)	6.57 d (3Hz)	6.56 d (3Hz)	6.24 d (3Hz)
H-8	6.61 d (3Hz)	7.08 d (3Hz)	6.61 d (3Hz)	6.37 d (3Hz)
H-2'	7.33 d (3Hz)	7.38 d (3Hz)	6.80 d (3Hz),	6.77 d (3Hz)
H-5'	7.10 d (8Hz)	7.20 d (8Hz)	6.82 d (8Hz),	6.79 d (8Hz)
H-6'	6.98 dd (8,3Hz)	6.22 dd (8,3Hz)	6.55 dd (8,3Hz)	6.62 dd (8,3Hz)
7-OMe-	3.77 s	3.67 s	3.85 s	3.84 s
H-1"	5.15 d (8Hz)	5.26 (8Hz)	4.70 d (8Hz)	—
H-2"-H-6"	4.05-5.25 m	4-4.5 m	3.1-4.6 m	—
6"-CH ₃ -CO-	2.09 s			
Espectro	24	26	28	30

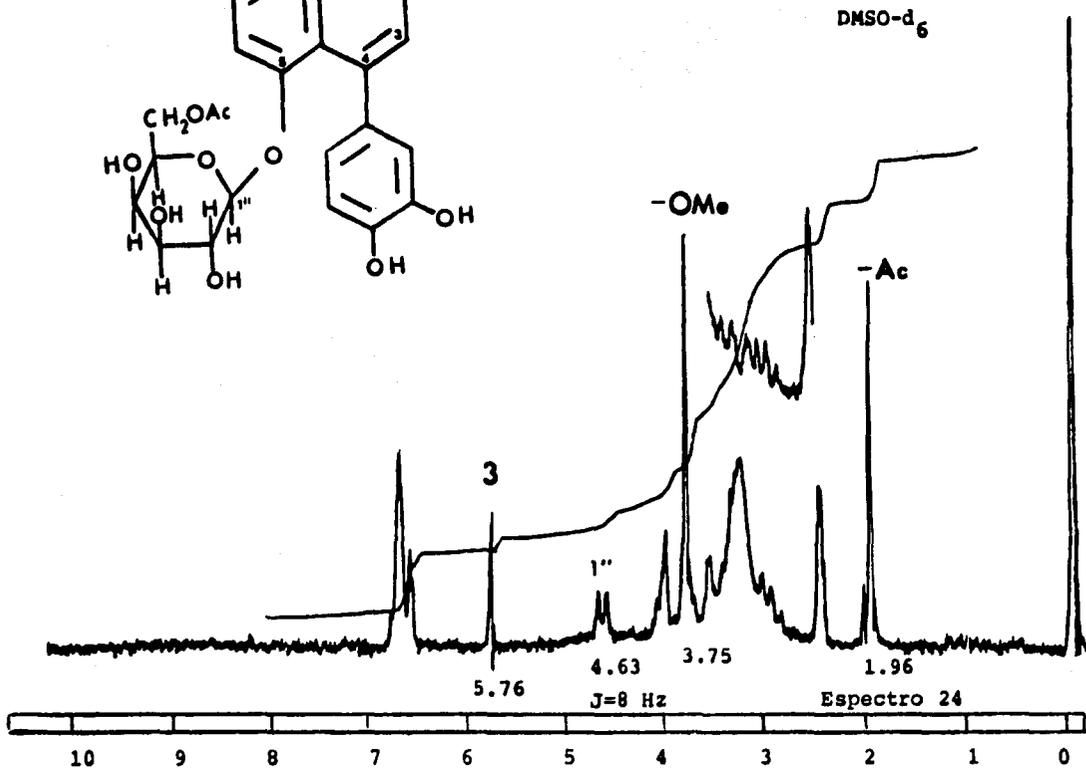
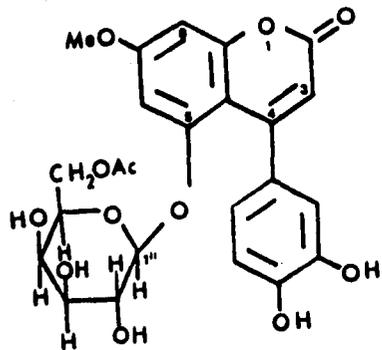
^a Piridina-d₅ como solvente

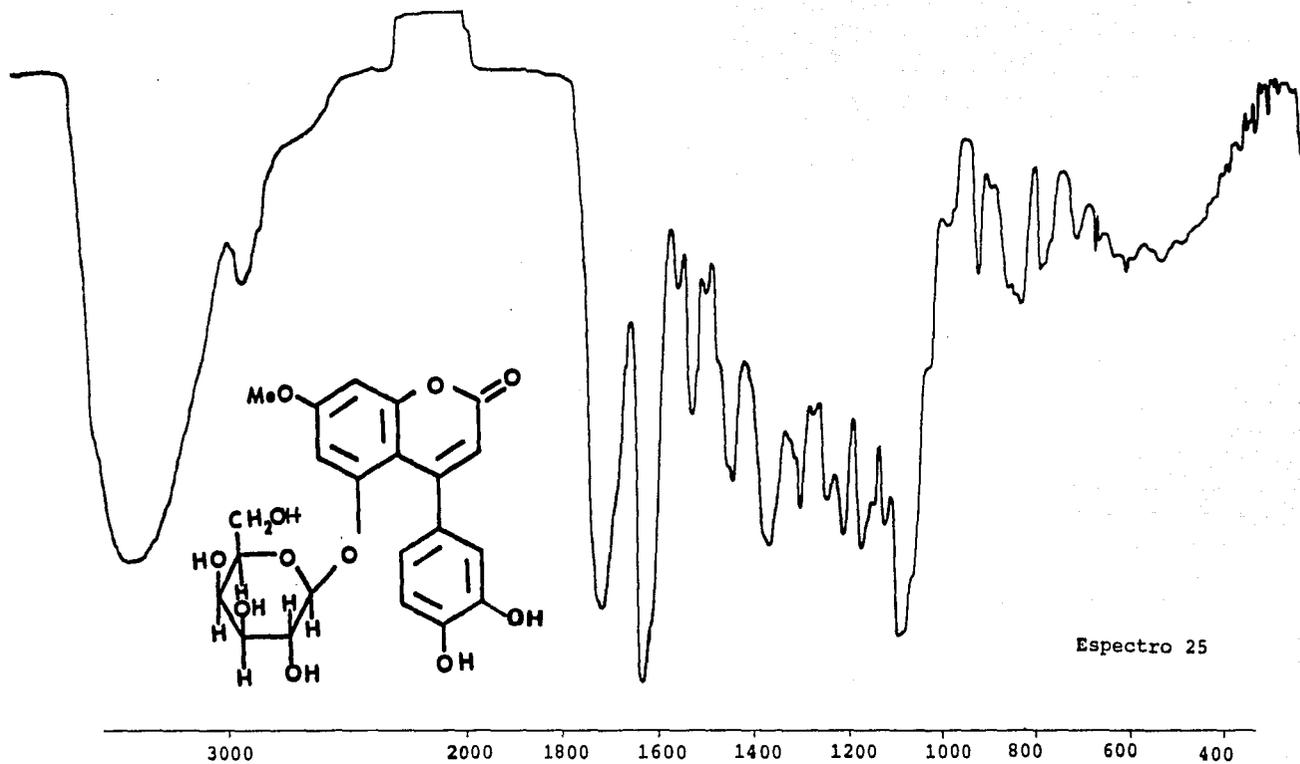
^b CDCl₃-DMSO-d₆ como solvente

TMS como referencia interna

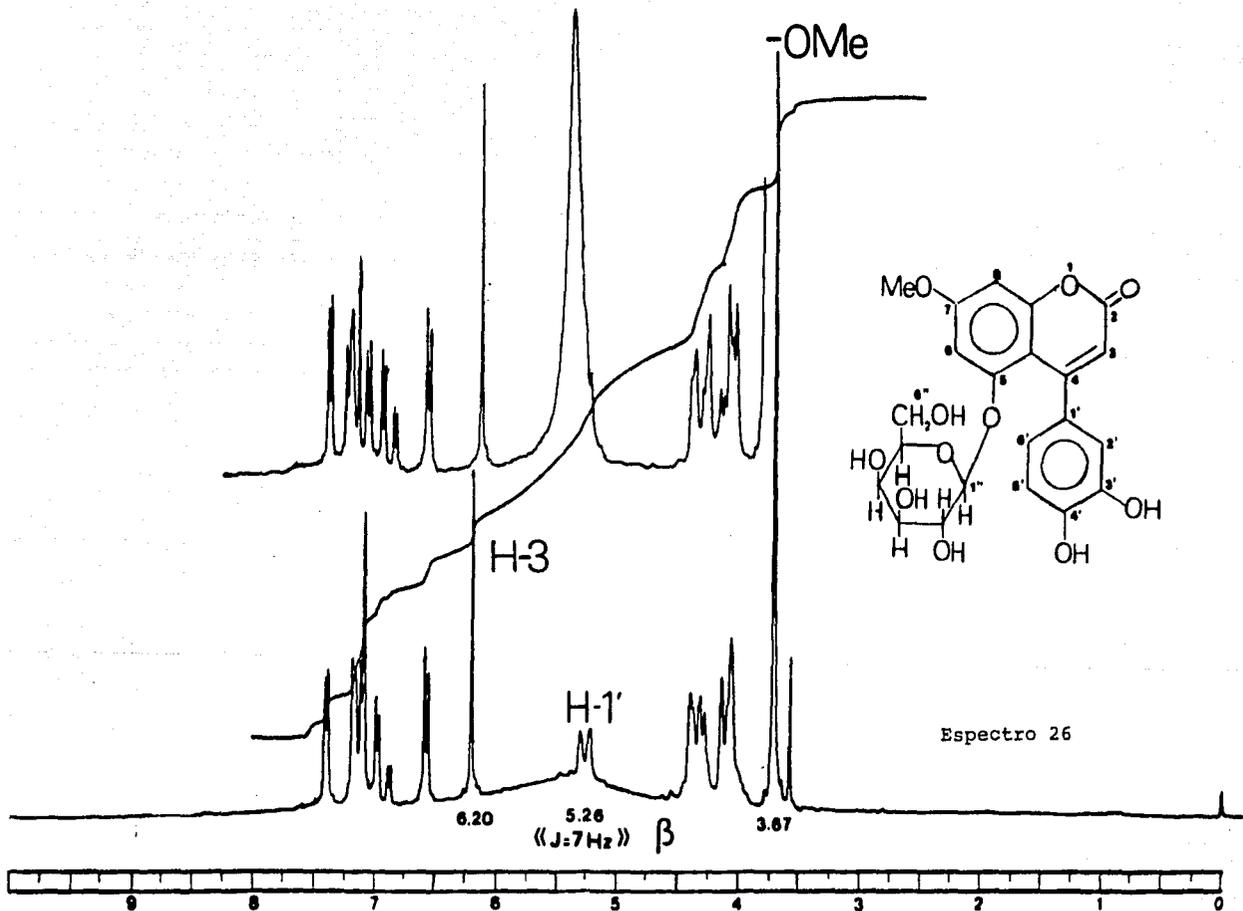






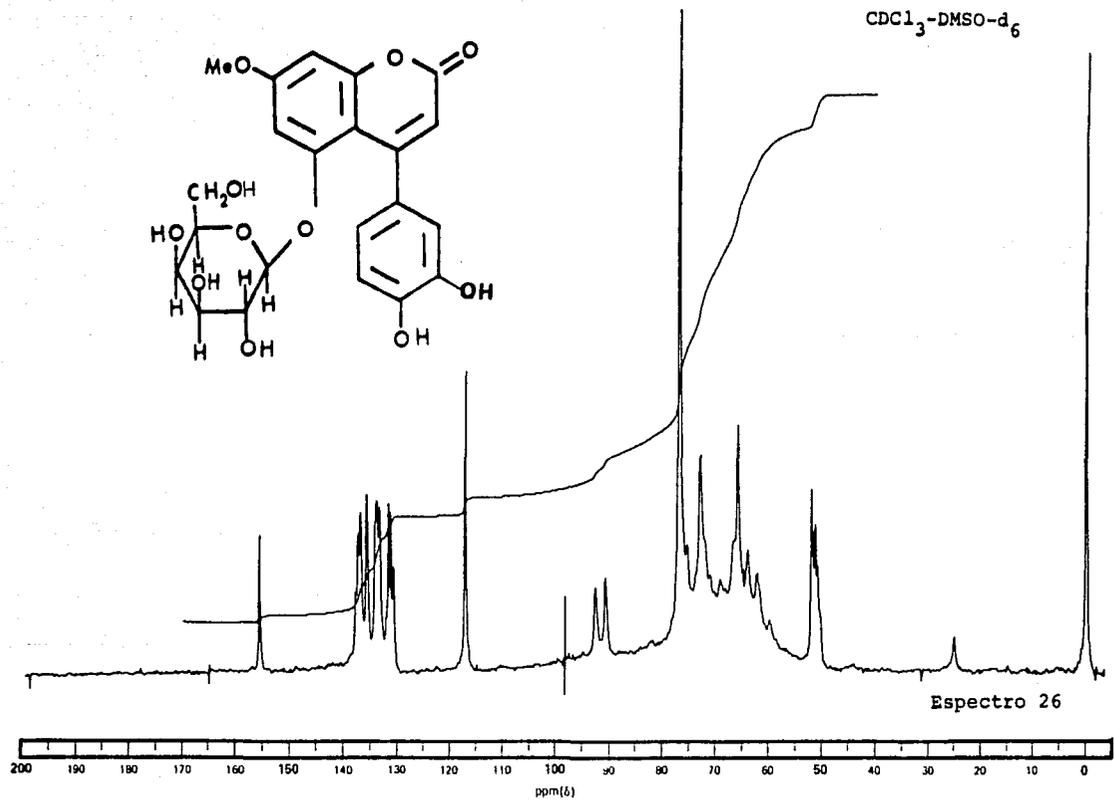
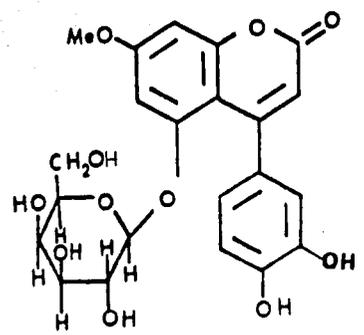


PIRIDINA d_5

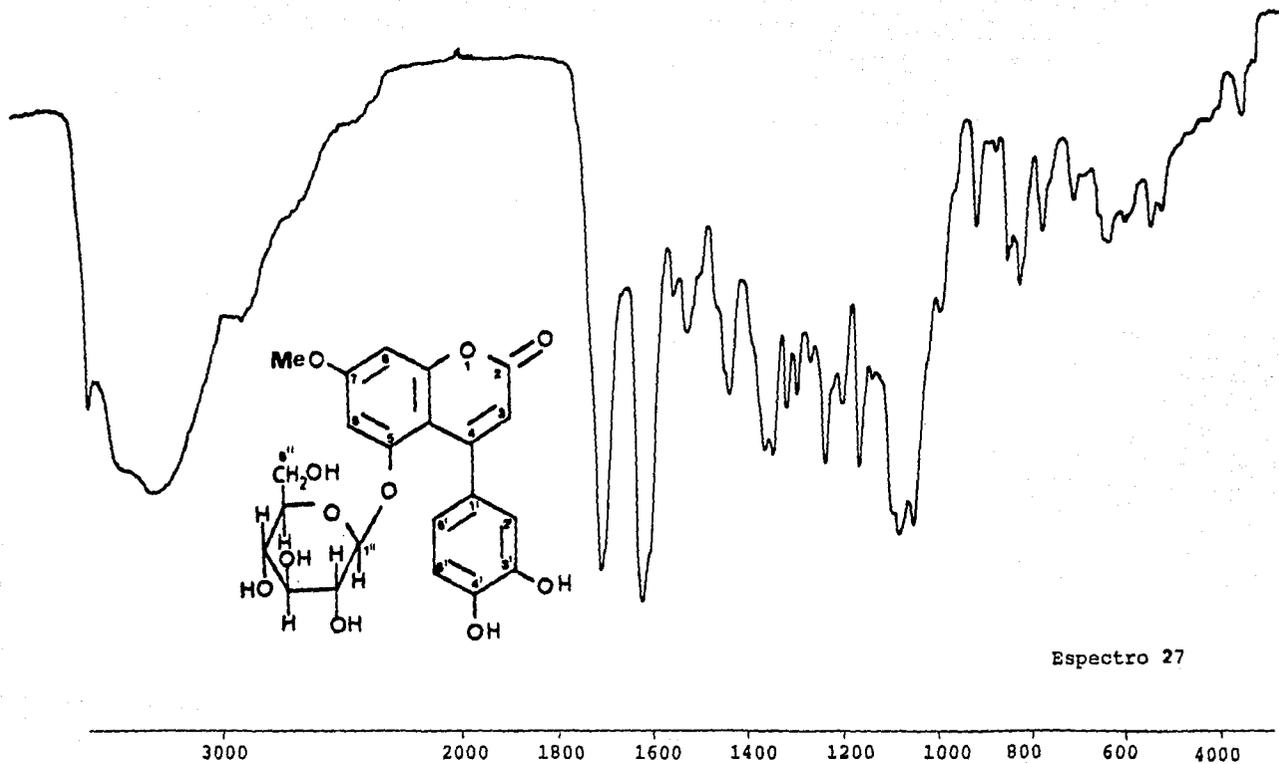


→ H

CDCl_3 -DMSO- d_6

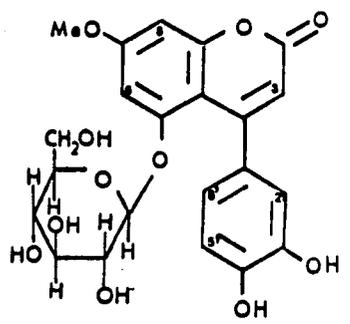


Espectro 26



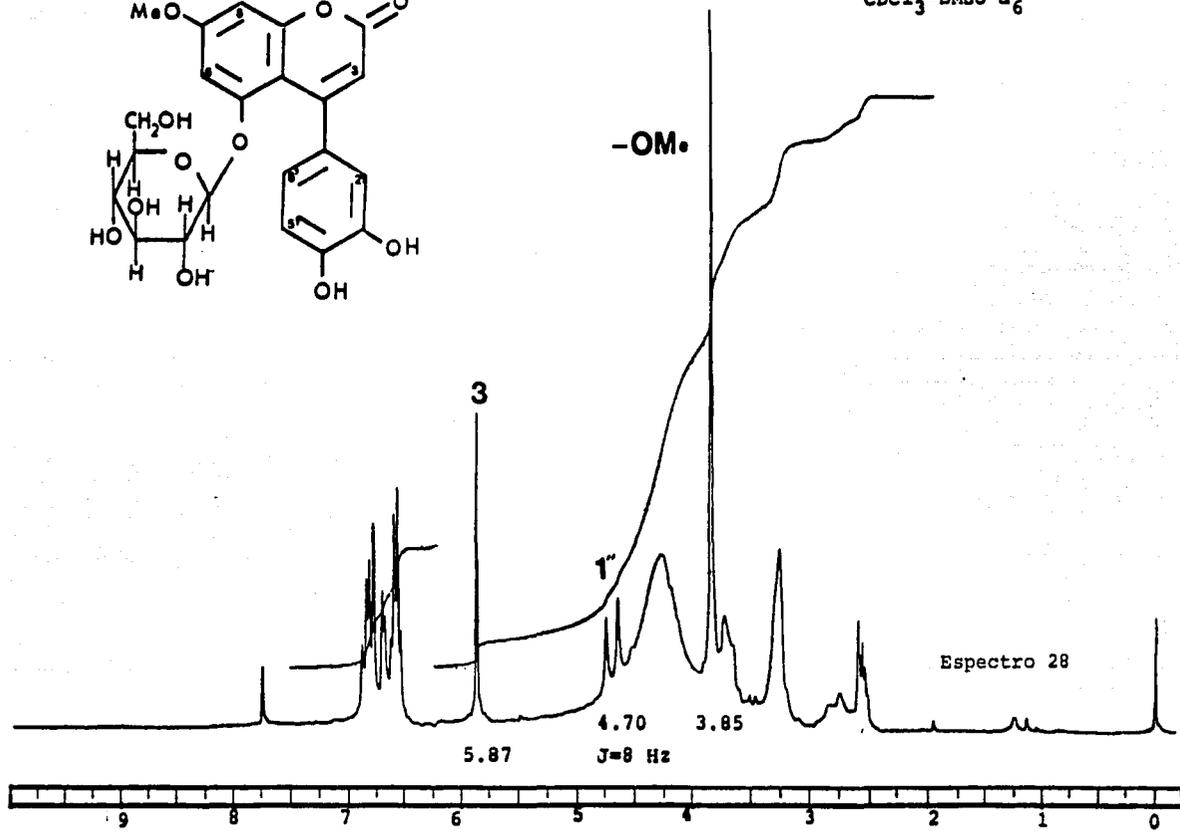
Espectro 27

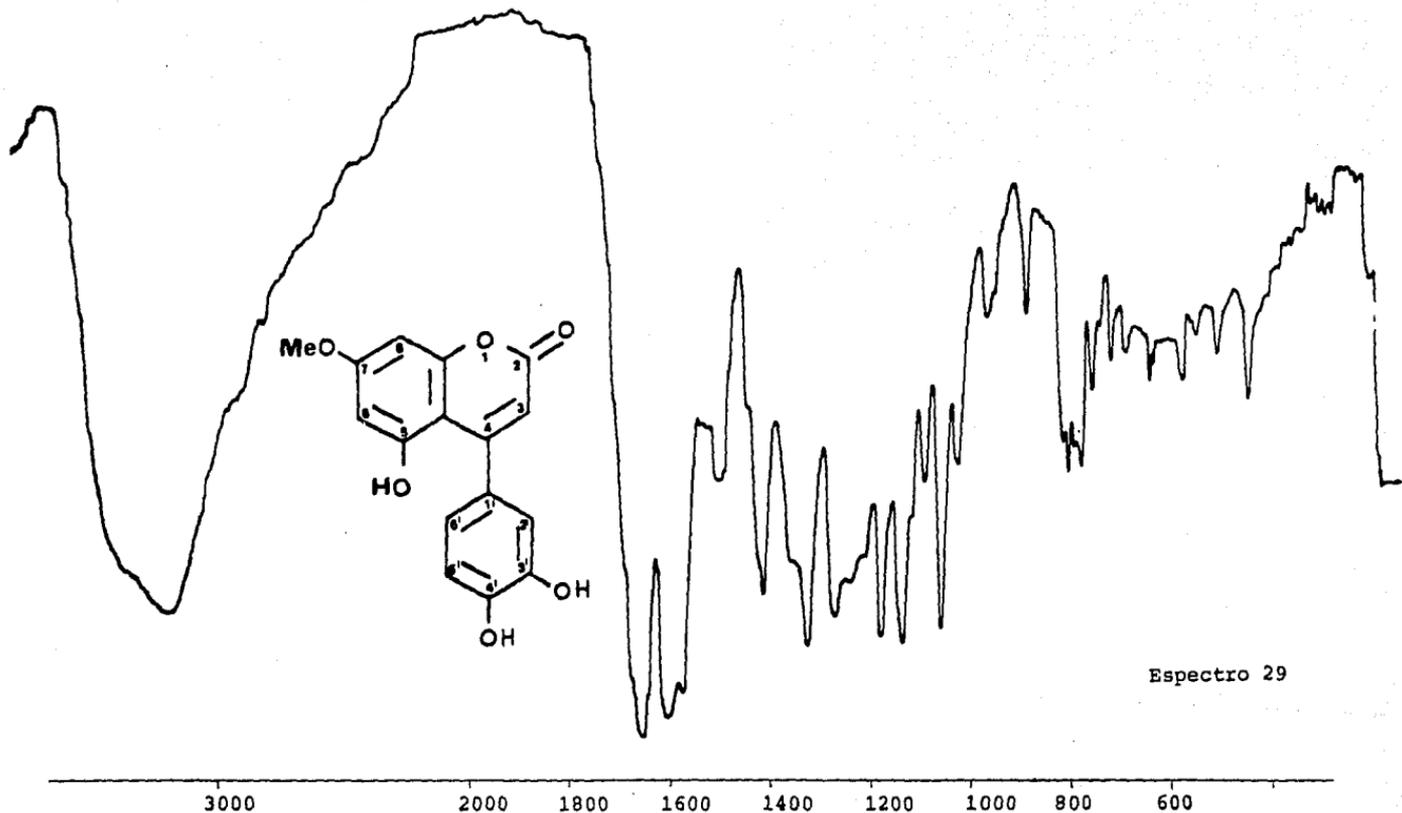
→H



CDCl₃-DMSO d₆

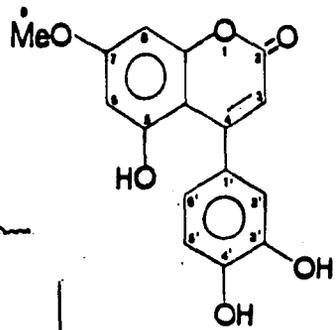
-OMe





CDCl₃-DMSO d₆

→H→



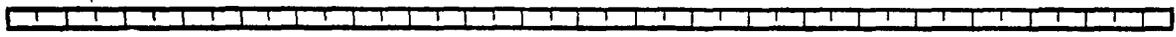
-OMe

3

5.78

3.84

Espectro 30



10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

3.4 Identificación de la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 17.

La última fenilcumarina caracterizada en este estudio fue la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, la cual se aisló como agujas grandes de color amarillo brillante al recromatografiar las fracciones de mayor polaridad de la columna original (ver Tabla 8). Las características físicas y espectroscópicas del compuesto 17 se indican en la Tabla 25.

El esqueleto de 4-fenilcumarina propuesto para este compuesto se dedujo fácilmente a partir del análisis de los espectros de UV, IR, RMN-H y de RMN¹³C. El UV (Espectro 32) mostró máximos de absorción a 258 y 331 nm, en tanto que el IR (Espectro 33) presentó bandas, asociadas con la presencia de hidroxilo fenólico (3350 cm⁻¹), aromaticidad (1600, 1510 cm⁻¹) y del sistema α -pirona de una 4-fenilcumarina (1670 cm⁻¹). Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas de IQ como C₂₁H₂₀O₁₁. El espectro presentó el ión molecular de m/z 449 (M⁺ + 1) y otros picos importantes de m/z 286, 258, 243, 162 y 180 (pico base).

El espectro de RMN'H en DMSO (Espectro 35) presentó las mismas características que el compuesto 14, diferenciándose fundamentalmente en la ausencia de la señal para un grupo metoxilo aromático. La obtención del derivado peracetilado permitió confirmar la naturaleza trifenólica

del mismo y la presencia de una unidad de azúcar ya que el espectro RMN'H del derivado presentó tres señales para metilos de acetatos aromáticos (δ 2.34, 2.33) y cuatro para acetatos no aromáticos (δ 1.89, 1.99 y 2.03).

Las características físicas y espectroscópicas de este derivado se resumen en la Tabla 26.

El análisis cromatográfico de los productos de la hidrólisis ácida permitió detectar a la glucosa como el único carbohidrato y a la aglicona 17A, altamente fluorescente y diferente a la de los compuestos 12, 15, 16 y 14.

Las constantes físicas y espectroscópicas de la aglicona 17A se resumen en la Tabla 27. Esta aglicona mostró características físicas y espectroscópicas similares a la aglicona de los compuestos 12, 15 y 16, diferenciándose exclusivamente en la ausencia del metoxilo aromático en C-7 y en los desplazamientos químicos de H-6 y H-8. El tratamiento de la aglicona con KOH permitió la obtención de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina 17D, idéntica en todos sus aspectos al producto natural previamente obtenido de la Exostema caribaeum Tabla 28. Una vez más queda de manifiesto que las 5,4'-dihidroxifenilcumarinas se ciclizan en condiciones básicas para original oxidocumarinas. A diferencia de las obtenciones previas, la reacción procedió con menor cantidad de base. La localización de la unidad de glucosa unida al hidroxilo en C-5 y la orien

tación β de este enlace se establecieron siguiendo el mismo razonamiento que para el compuesto 14. Finalmente, la demostración inequívoca de la estructura propuesta se logró al correlacionar químicamente los compuestos 16 y 17 por medio de una reacción de metilación con diazometano (Figura 14). Ambos compuestos originaron el mismo derivado metilado, cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 29.

Cabe hacer notar que el compuesto 17 ya había sido aislado previamente de la Coutarea hexandra (Aquino, et al, 1988), y sus constantes físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las descritas para este compuesto. Lamentablemente en esa investigación no se obtuvo la aglicona correspondiente, por lo que no fue posible la comparación de los datos físicos y espectroscópicos.

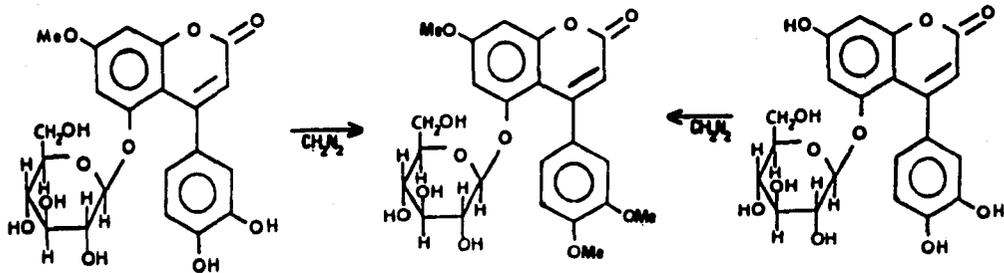
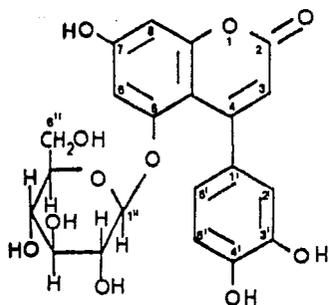


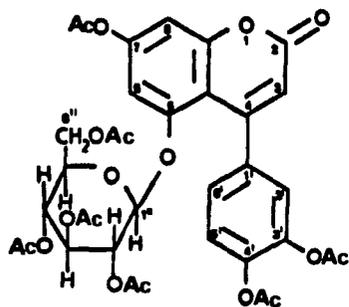
Figura 14. Obtención de la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trimetoxi-4-fenilcumarina.

Tabla 25. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5-O-β-D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina 17.



F.M.	$C_{21}H_{20}O_{11}$	
P.M.	448 g/mol	
P.F.	250-252°C	
$[\alpha]_D^{25}$	- 34.8	
UV MeOH max nm	258 y 331	
IR KBr max cm^{-1} :	3350, 1670, 1600, 1545, 1510, 1420, 1350, 1280, 1220, 1160, 1070, 820	Espectro 32 Espectro 33
EMIQ (Amonio)	449 (15, $M^+ + 1$), 286 (95), 258 (1), 243 (3), 162 (65), 180 (100),	Espectro 34
PMN ¹ H (90MHz, DMSO- d_6 , δ)	2.6 (m, 1H, H-2''), 3.19 (s, 4H), 4.6 (sa, 1H, D_2O , -OH), 4.78 (d, 1H, $J=8Hz$, H-1'), 4.96 (sa, 1H, $\sim D_2O$, -OH), 5.73 (s, 1H, H-3), 6.40 (d, 1H, $J=2Hz$, H-8), 6.47 (d, 1H, $J=2Hz$, H-6), 6.7 (m, 3H, ABx, H-2', H-5' y H-6'), 8.9 (sa, 1H, $\sim D_2O$, -OH)	Espectro 35
PMN ¹³ C (90MHz, DMSO- d_6 , δ)	60.64 (t, C-6''), 69.42 (d, C-4''), 72.7 (d, C-2''), 76.14 (d, C-3''), 76.8 (d, C-5''), 96.79 (d, C-8), 99.0 (d, C-6), 100.0 (d, C-1), 102.4 (s, C-4a), 110.02 (d, C-3), 114.53 (d, C-2'), 115.6 () 119.0 (d, C-6'), 130.59 (s, C-1'), 143.86 (s, C-3'), 145.40 (s, C-4'), 155.57 (s, C-5), 155.90 (s, C-8a), 156.25 (s, C-4), 159.51 (s, C-2), 161.40 (s, C-7).	Espectro 36

Tabla 26. Constantes físicas y espectroscópicas de 5-O-β-D-tetracetoxi-glucopiranosil-7,3',4'-triacetoxi-4-fenilcumarina 17B.



F.M.

$C_{30}H_{34}O_{18}$

P.M.

683 g/mol

P.F.

85-88°C

IR ν_{max} KBr cm^{-1} :

1780, 1720, 1600, 1500, 1420, 1360, 1200,
1110, 1020, 900, 830, 600

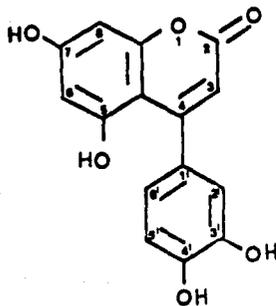
Espectro 37

RMN¹H (80MHz, CDCl_3, δ):

1.89 (s, 3H, AcO-), 1.99 (s, 3H, AcO-), 2.03 (s, 6H, 2AcO-), 2.33 (s, 3H, AcO-), 2.34 (s, 6H, 2AcO-), 3.5-5.2 (m, 7H, H-1'-H-6''), 6.2 (s, 1H, H-3), 6.67 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.93 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 7.05-7.35 (m, 3H, H-2', H-6', H-5').

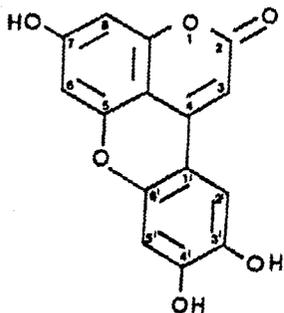
Espectro 38

Tabla 27. Constantes físicas y espectroscópicas de 5,7,3',4'-Tetrahidroxi-4-fenilcumarina, 17A.



F.M.	$C_{15}H_{10}O_6$	
P.M.	286 g/mol	
P.F.	217-220°C	
IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :	3300, 1700, 1660, 1620, 1605, 1550, 1520, 1440, 1370, 1300, 1160, 1120, 1080, 1040, 1000, 810	Espectro 39
EMIE, m/z (%):	243 (1), 258 (100), 286 (92.7), 69.1 (31.7), 43.1 (29.4)	Espectro 40
1H RMN (90MHz, DMSO- d_6 , $CDCl_3$, δ)	5.59 (s, 1H, H-3), 6.06 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.16 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 6.4-6.8 (m, 3H, H-2', H-6', H-5'), 9.0 (sa, 1H, ν D_2O , OH)	Espectro 41

Tabla 28. Constantes físicas y espectroscópicas de la 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5,2'-oxidocumarina 17D.



F.M.

$C_{15}H_{10}O_6$

P.M.

284 g/mol

P.F.

280°C

EMIE m/z. (%):

284 (M^+ , 100), 256 (35), 241 (10), 228 (50)

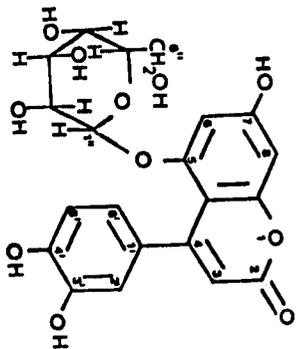
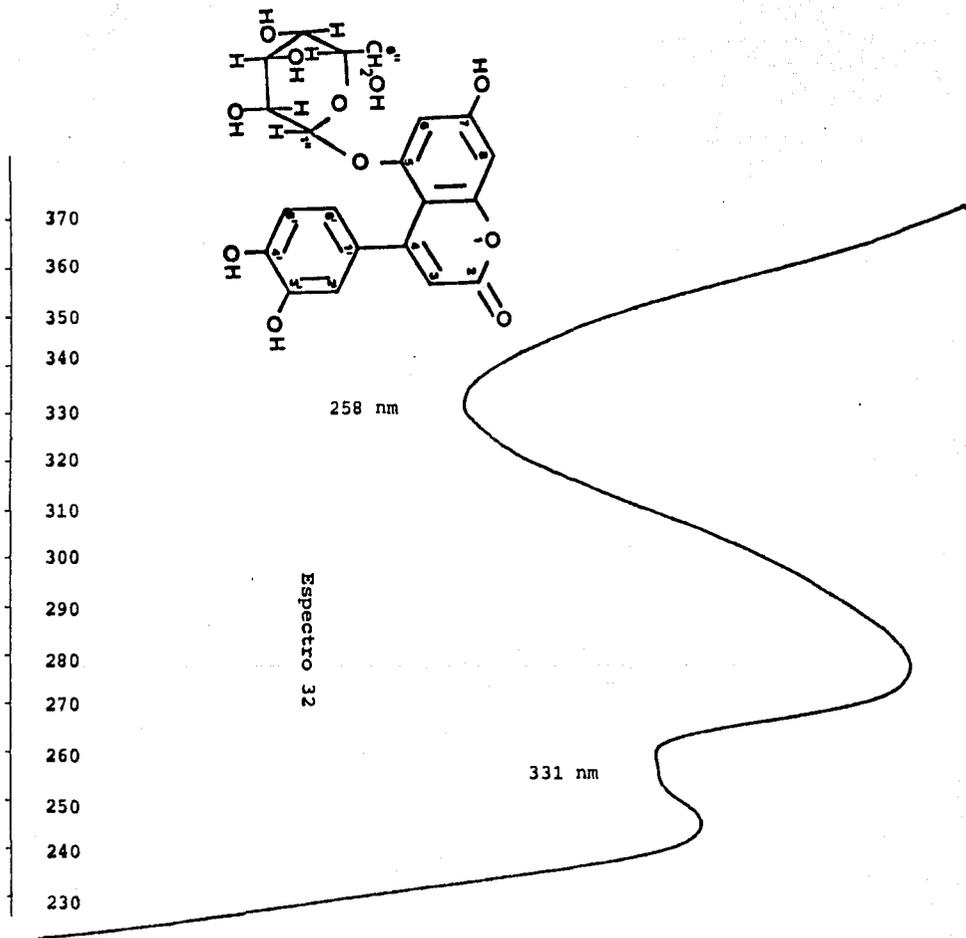
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} :

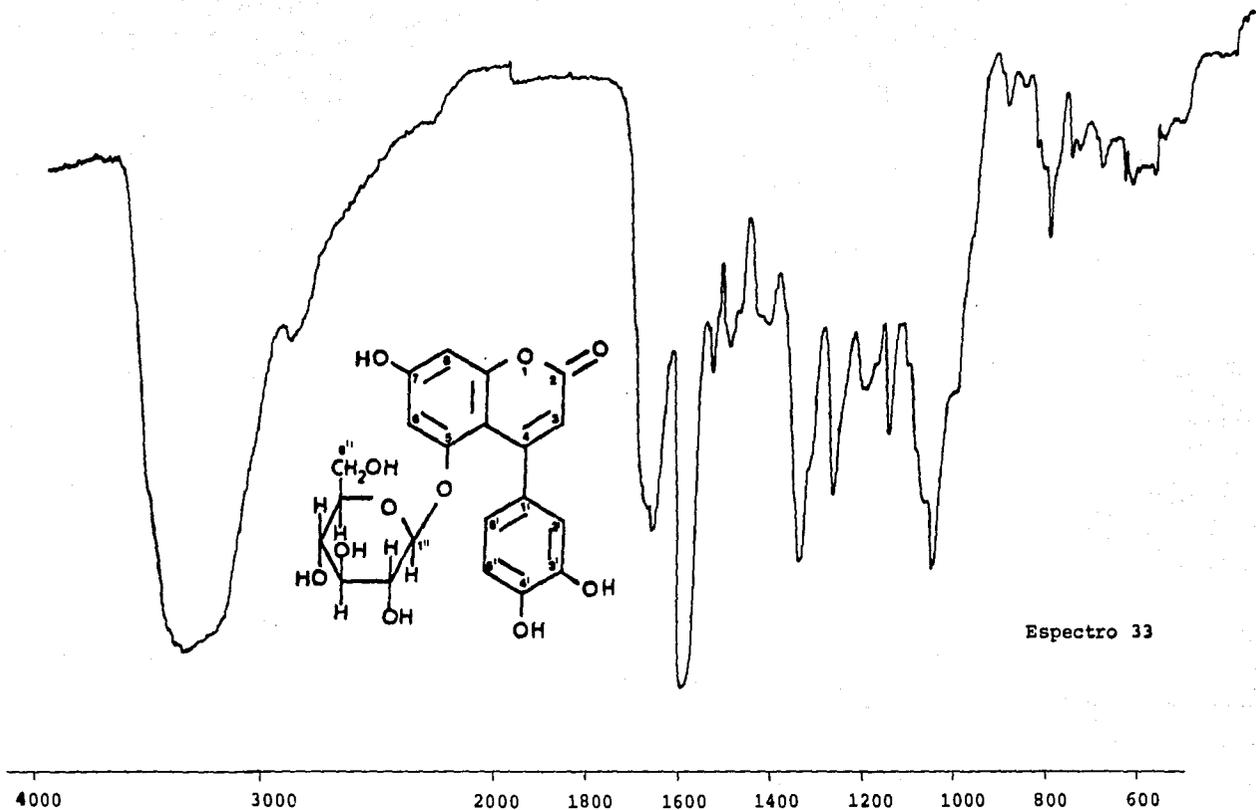
1698, 1625, 1560, 1520, 1465, 1300, 1175

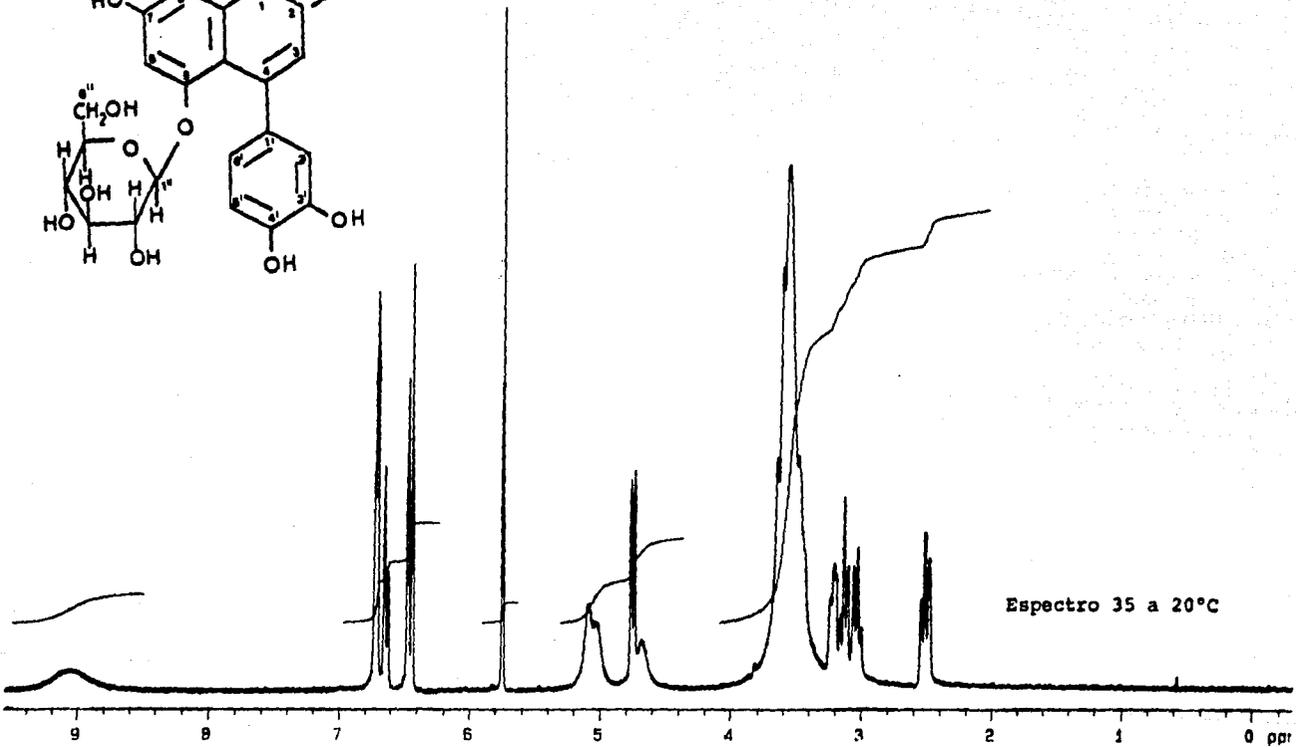
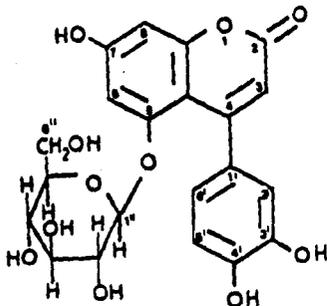
Espectro 42

RMN¹H (CDCl₃-DMSO-d₆, δ): 7.20 (s, 1H, H-6'), 6.72 (s, 1H, H-3'), 6.45 (s, 2H, H-6, H-8), 5.91 (s, 1H, H-3), 10.30 (s, 3H, OH)

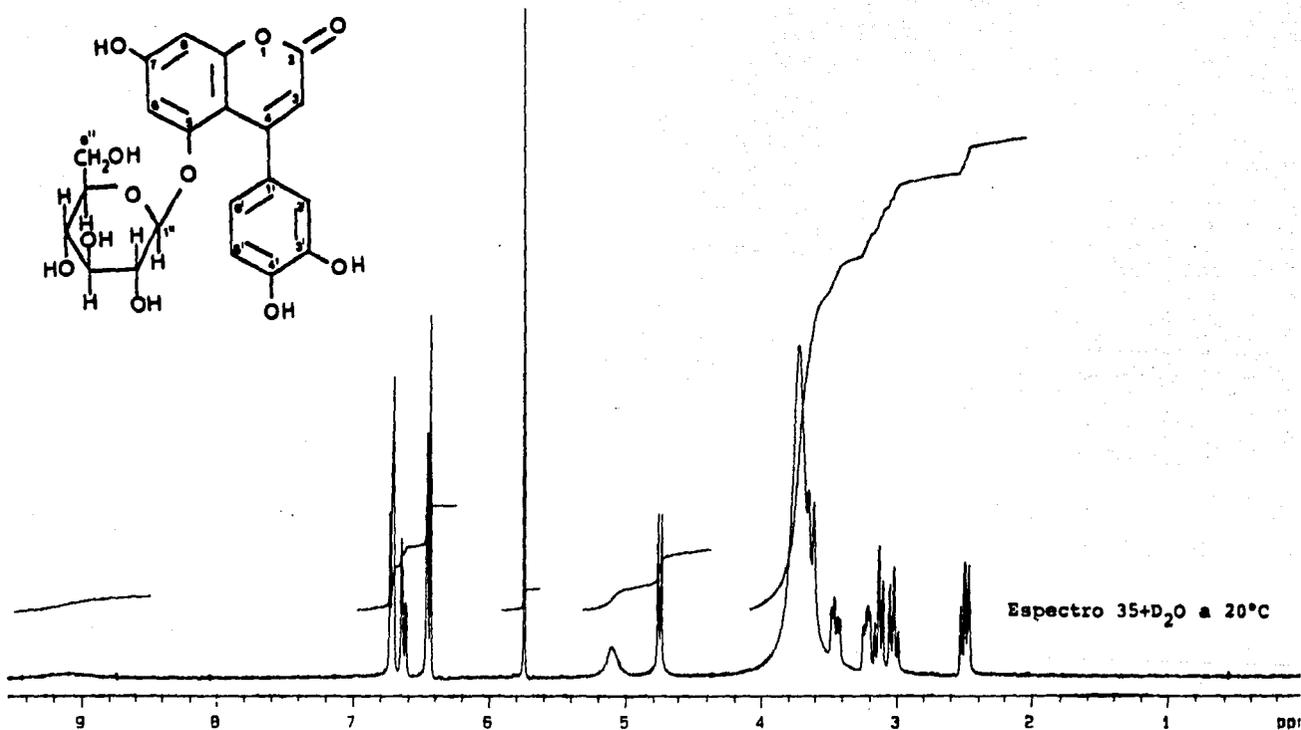
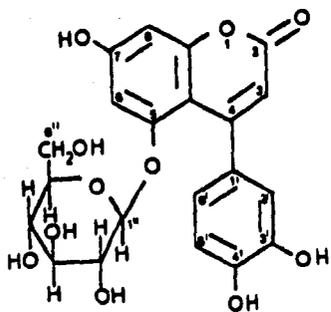
Espectro 43

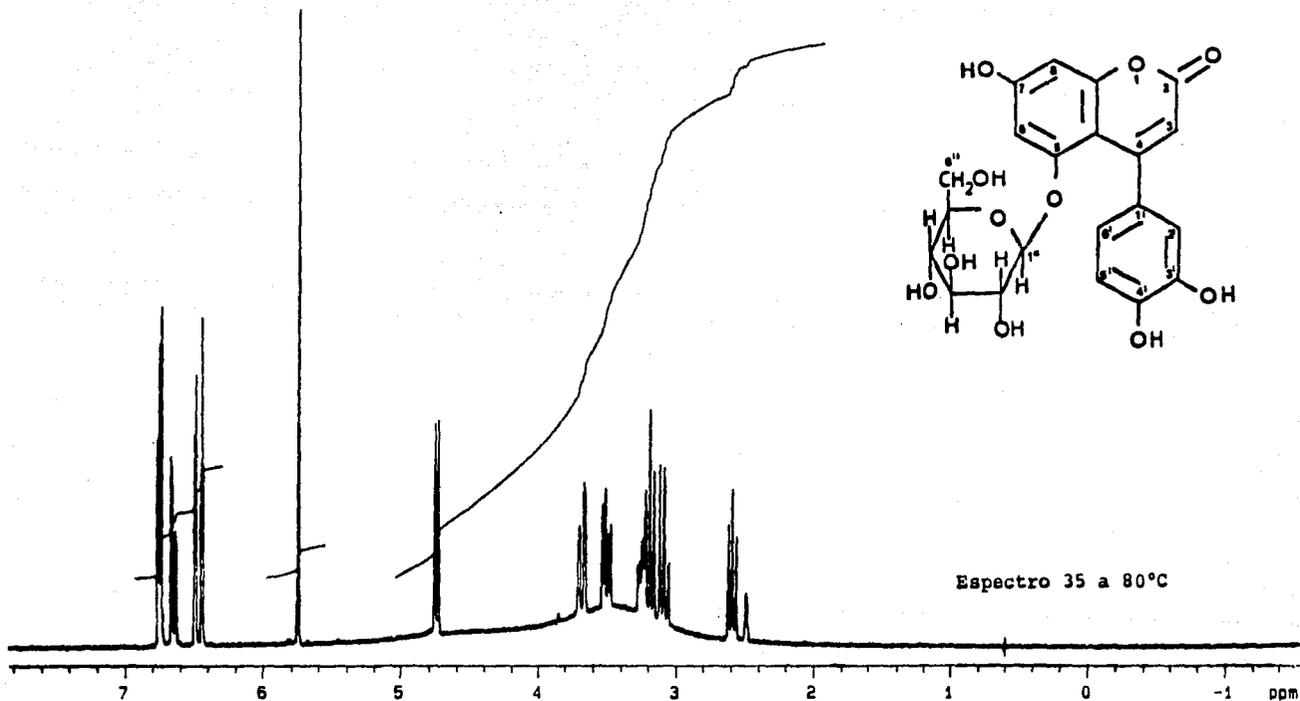


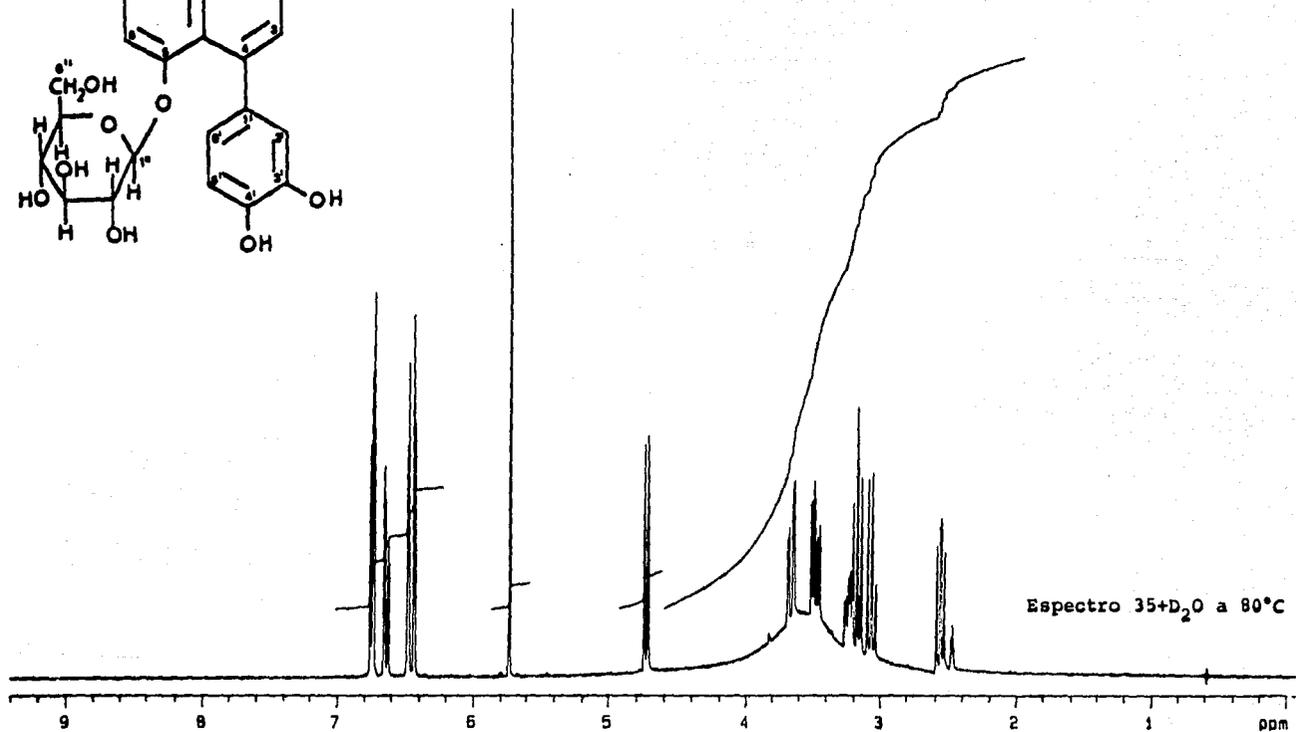
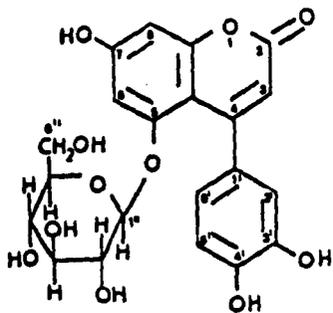




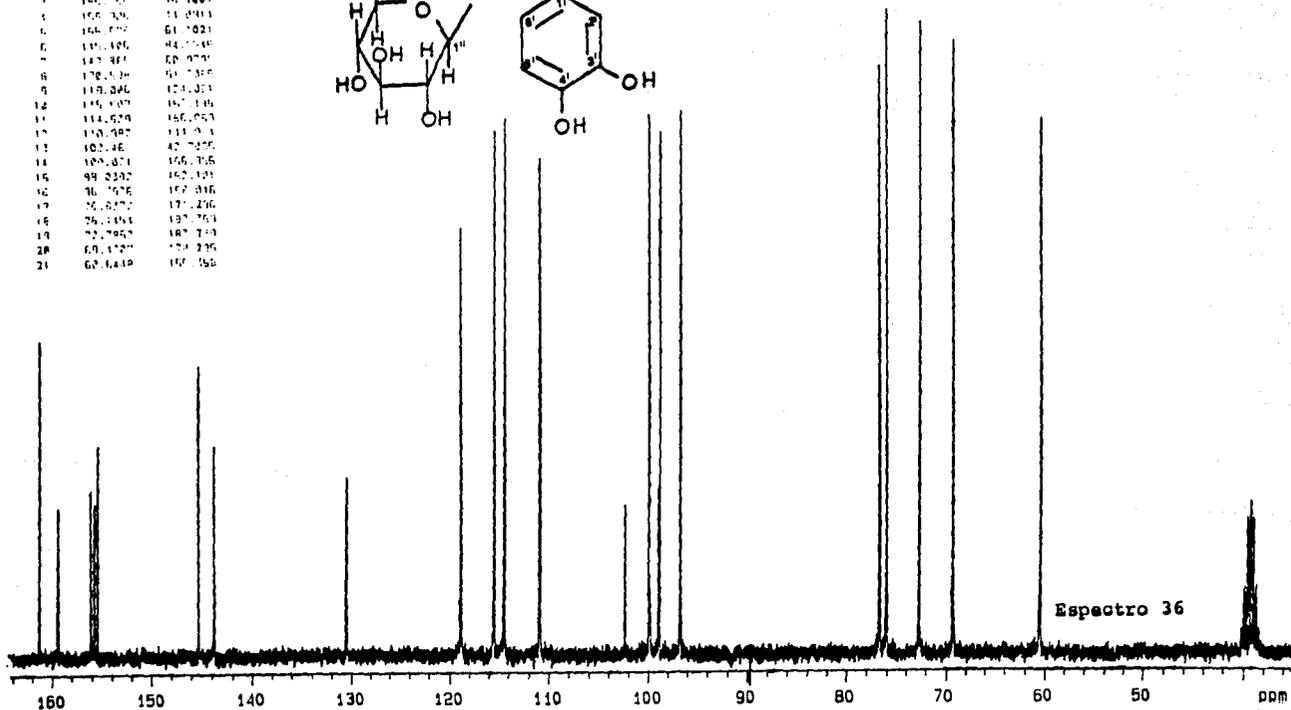
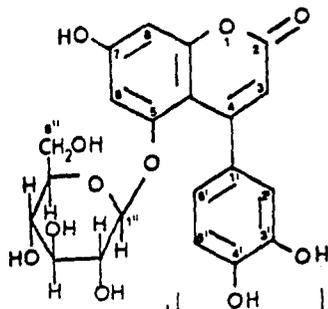
Espectro 35 a 20°C

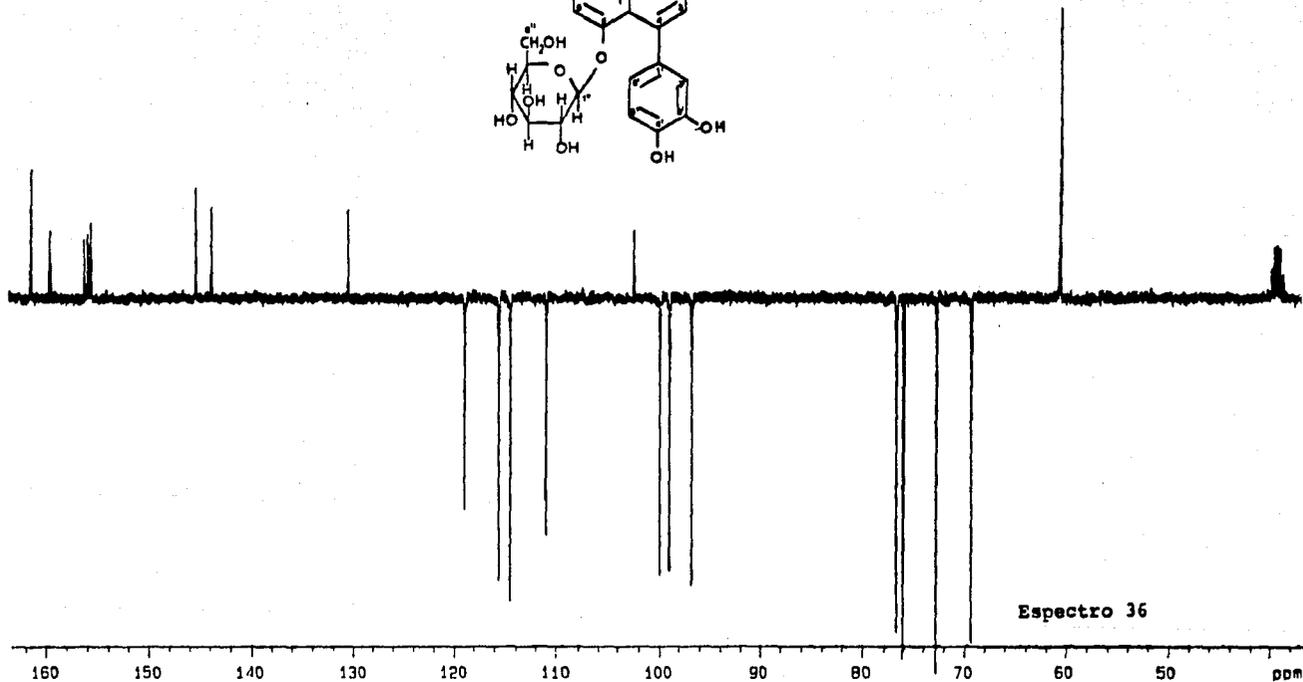
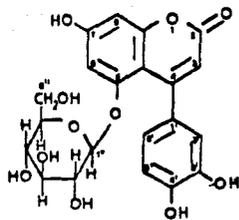




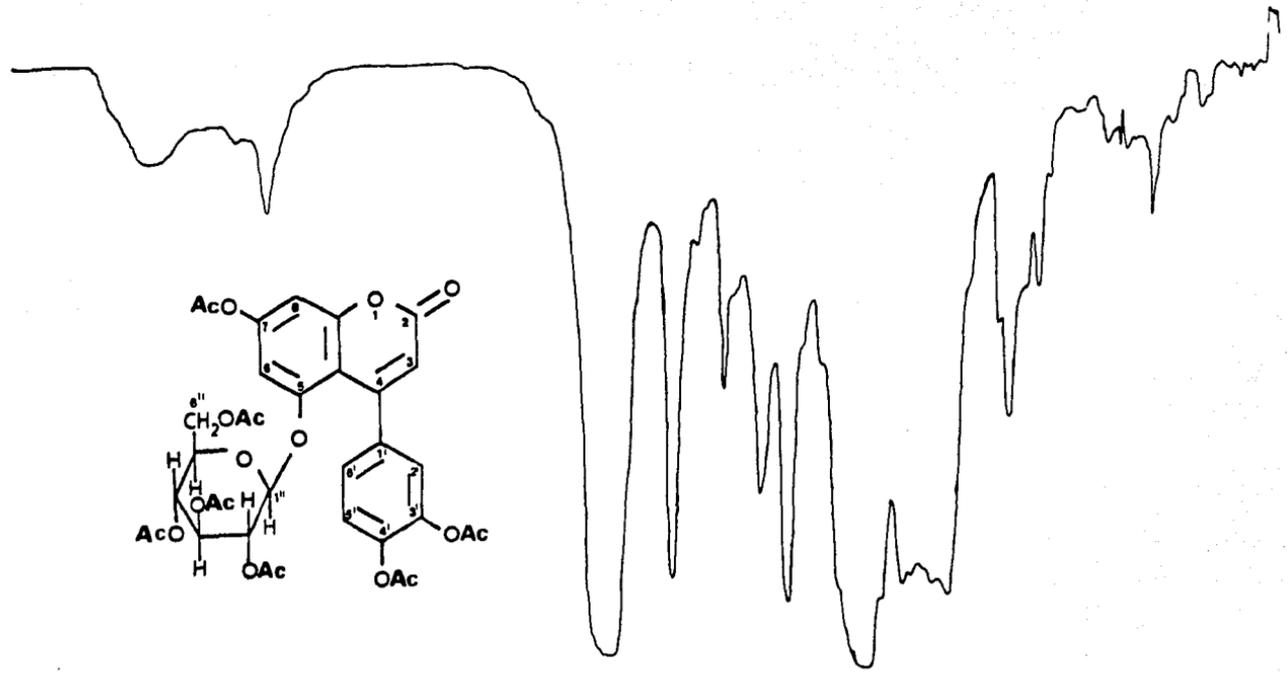
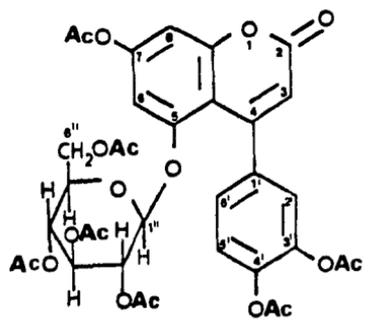


index	freq ppm	intensity
1	167.102	41.0 31
2	164.517	67.0 56
3	162.717	10.0 67
4	157.320	51.0 91.1
5	156.892	61.0 82.1
6	155.186	44.0 54.8
7	149.917	69.0 97.7
8	128.139	97.0 38.8
9	119.246	124.0 51.1
12	115.187	147.0 1.6
13	114.629	156.0 57.3
14	110.187	111.0 1.3
15	102.146	42.0 25.8
16	100.871	156.0 3.6
17	99.232	162.0 1.1
18	76.768	172.0 1.6
19	76.577	177.0 2.6
20	76.184	187.0 7.4
21	75.792	187.0 7.4
22	75.172	178.0 2.9
23	68.619	177.0 5.6



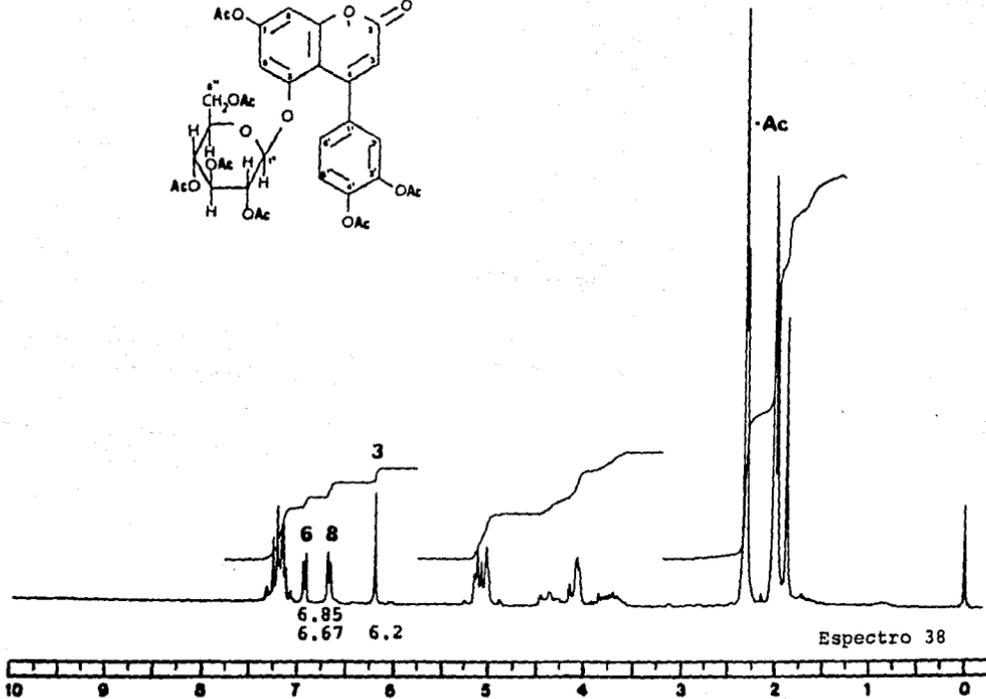
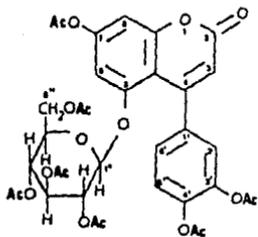


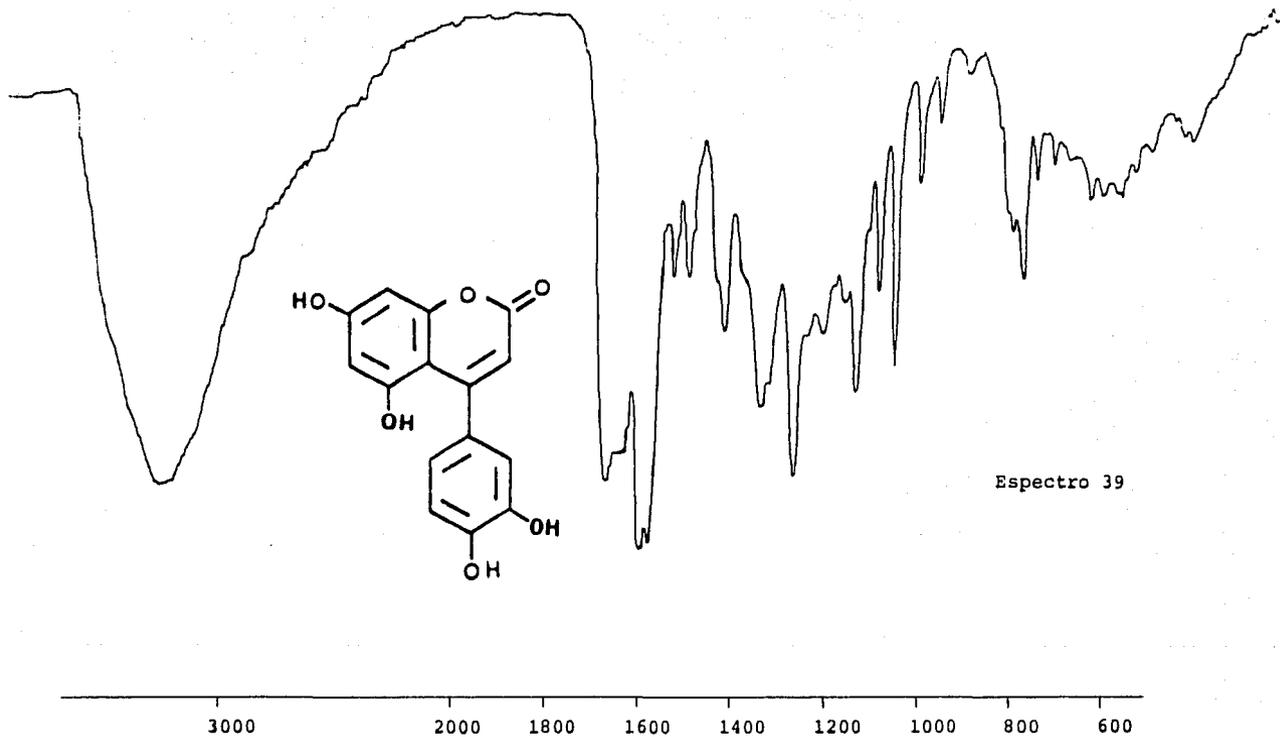
Espectro 36



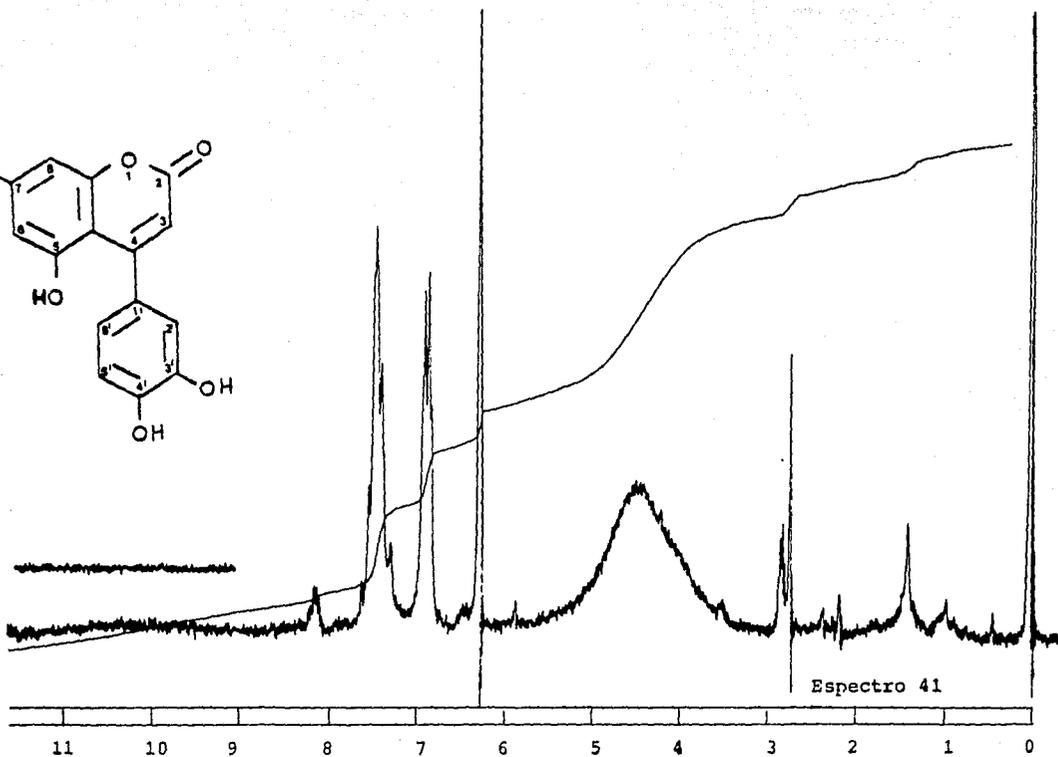
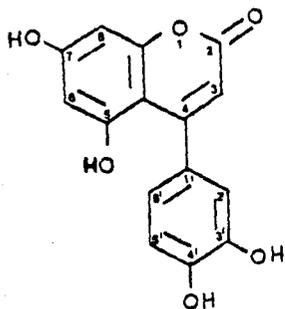
Espectro 37

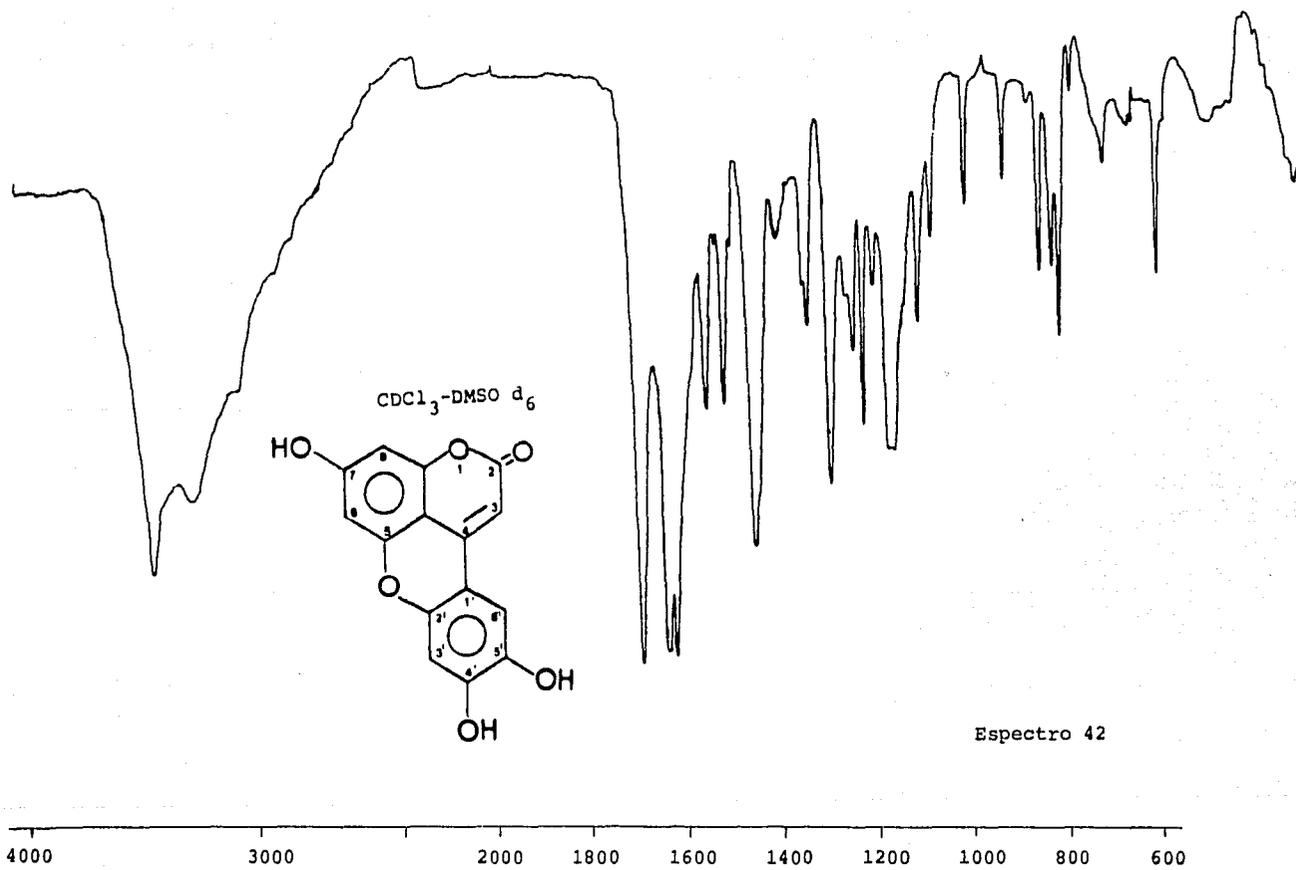
4000 3000 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600

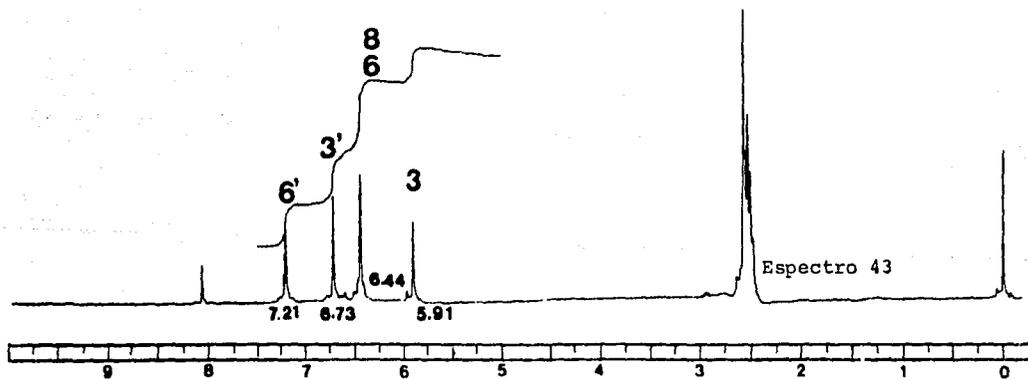
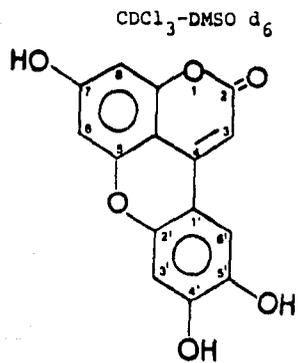
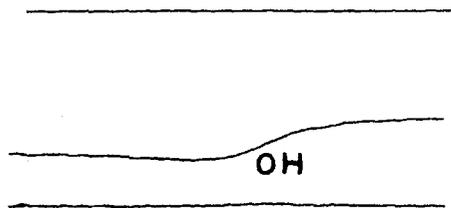


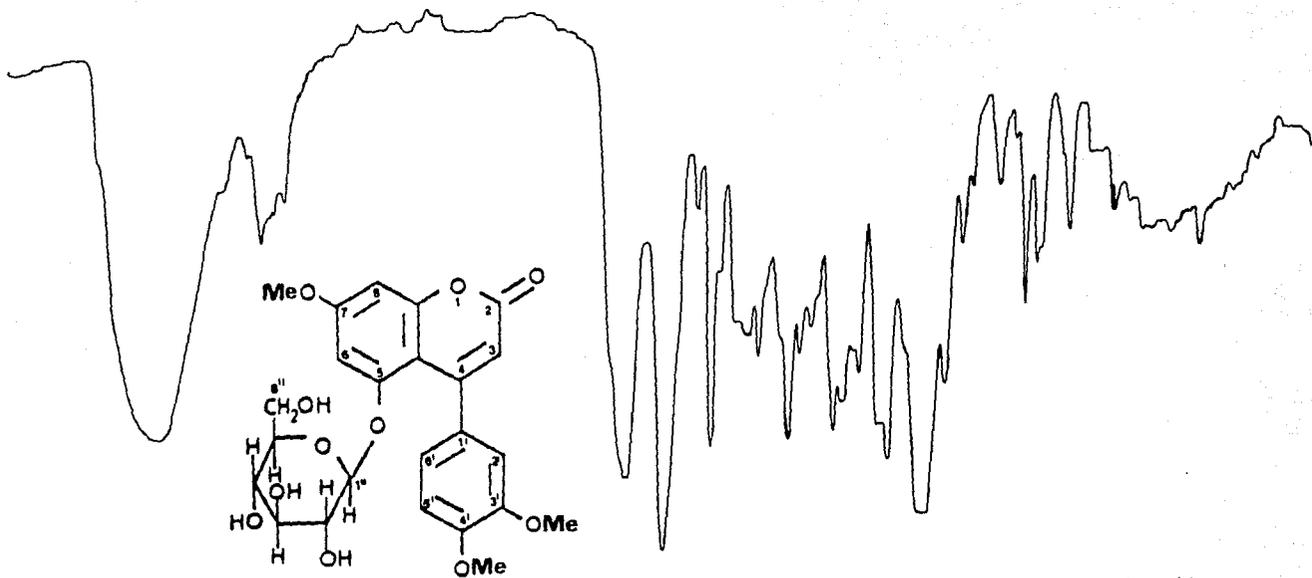


Espectro 39



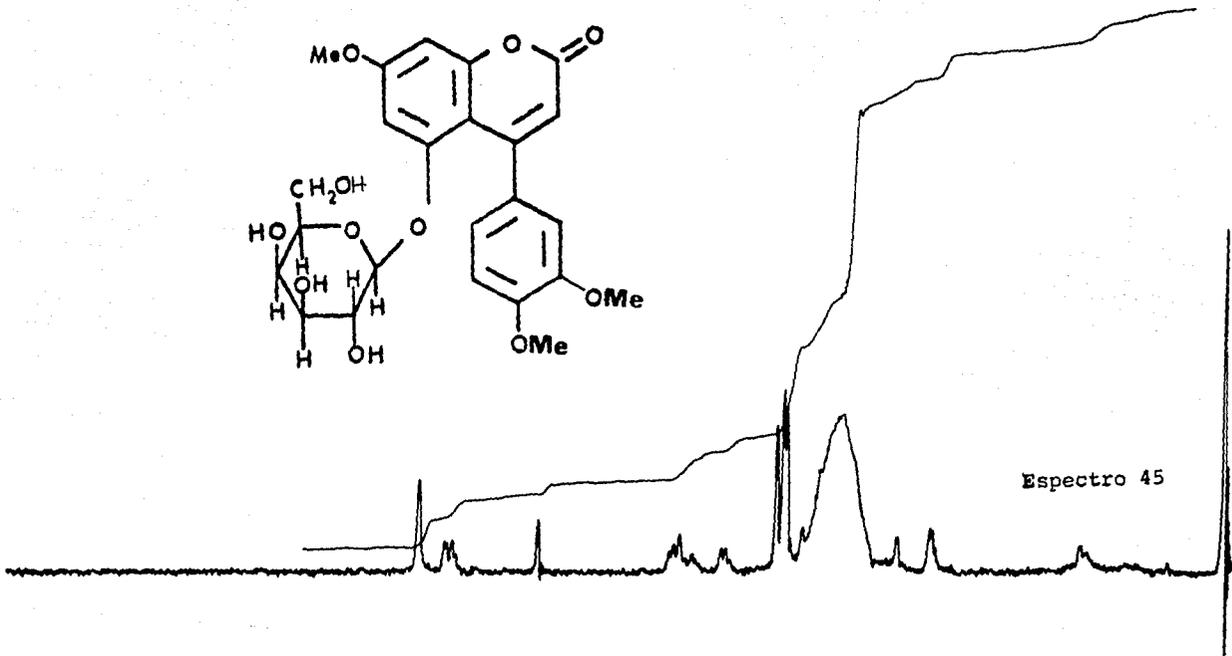
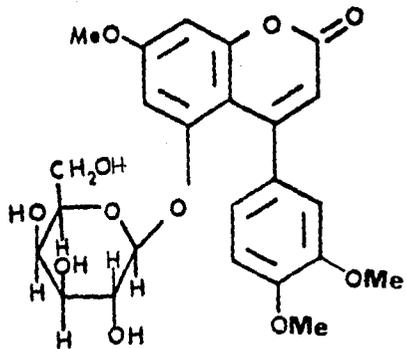






Espectro 44

4000 3000 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600



3.5 Identificación de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona (7-metil-luteolina) 10.

El compuesto 10 se obtuvo como un polvo amarillo de las fracciones de menor polaridad de la columna original (ver parte experimental), y sus constantes físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 30.

Su fórmula molecular se estableció como $C_{16}H_{12}O_6$ por espectrometría de masas y permitió calcular un índice de insaturación de diez.

El compartamiento cromatográfico en capa fina, así como los espectros de UV, IR y EM indicaron que el compuesto 10 era una flavona. Su espectro de IR (Espectro 46) mostró bandas para hidroxilo aromático (3420, 3220 cm^{-1}), carbonilo de α -pirona (1660 cm^{-1}) y aromaticidad (1600 y 1500 cm^{-1}); por otra parte, el espectro de masas (Espectro 47) presentó los fragmentos característicos para una flavona trisustituída en el anillo B y tetrasustituída en el anillo A. Los fragmentos más importantes se ilustran en la Figura 15.

El espectro de RMN¹H en $CDCl_3$ -DMSO- d_6 (Espectro 48) presentó las siguientes características:

- a) un singlete para OH fenólico que se intercambia con D_2O a δ 11.29. El desplazamiento paramagnético de esta señal era congruente con la presencia de un OH en C-5 (Harborne, 1975);

- b) un sistema ABC característico de un anillo aromático trisustituido [δ 6.53 (d, $J=3\text{Hz}$, H-2'), 6.93 (d, $J=8\text{Hz}$, H-5'), 7.3 (dd, $J=3\text{Hz}$, H-6')];
- c) un sistema AB típico de dos hidrógenos aromáticos con una relación meta [δ 6.28 (d, $J=3\text{Hz}$, H-8) y 6.45 (d, $J=3\text{Hz}$, H-6)], consistente con el patrón de sustitución del anillo A;
- d) el singulete característico de H-3 de una flavona en δ 6.48;
- e) un singulete de un metoxilo aromático en δ 3.85.

El tratamiento de 10 con anhídrido acético y piridina generó los derivados diacetilado 10A y triacetilado 10B, confirmando este último la naturaleza trifenólica de la flavona. La desprotección observada para las señales de los hidrógenos del anillo B [δ 7.35 (d, $J=3\text{Hz}$, H-2'), 7.7 (d, $J=8\text{Hz}$, H-5') y 7.68 (dd, $J=3\text{Hz}$, H-6')] en el espectro de RMN'H del derivado 10B (ver Tabla 31) fue consistente con la presencia de dos grupos fenoles orto. Finalmente, la disposición de dos hidroxilos en el anillo B y de uno en la posición C-5 permitió establecer inequívocamente que el sustituyente en C-7 correspondía al grupo metoxilo.

Con base en el análisis anterior, se identificó a la flavona como la 7,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona conocida con el nombre de 7-metil-luteolina (Harborne, 1975).

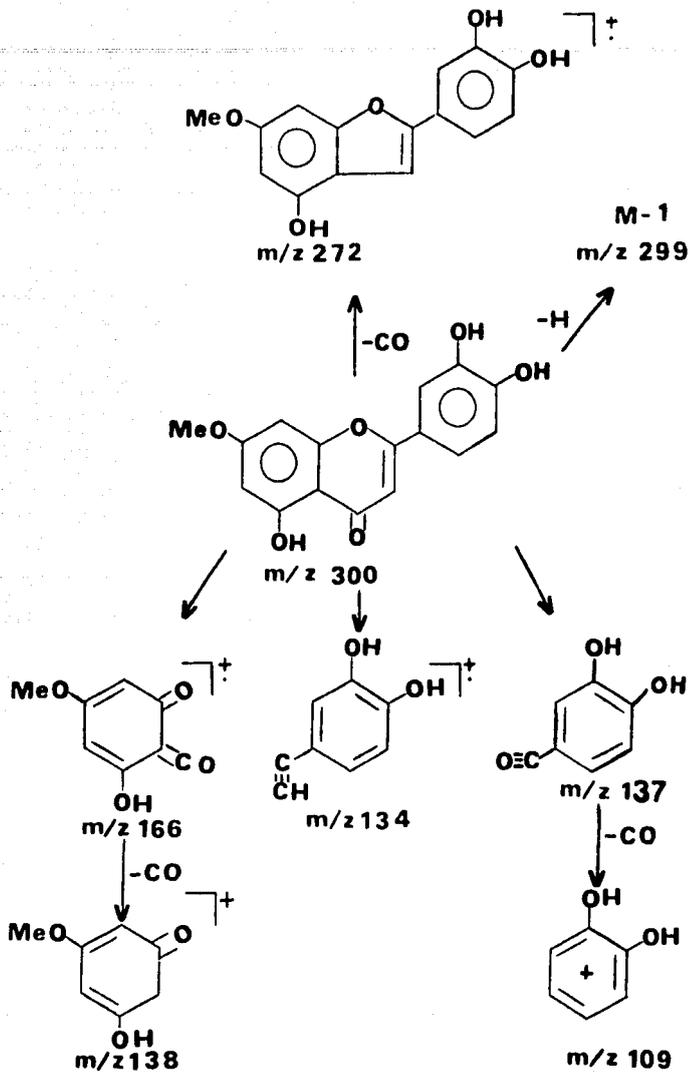
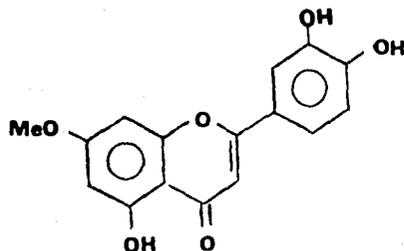


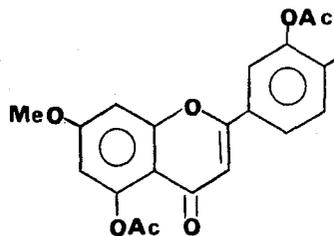
Figura 15. Patrón de fragmentación de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona 10.

Tabla 30. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-flavona 10 (7-metil-luteolina).



F.M.	$C_{16}H_{12}O_6$	
P.M.	300 g/ml	
P.F.	272-275°C	
IR λ_{max} KBr cm^{-1} :	3420, 3220, 2940, 2700, 1660, 1600, 1500, 1440, 1380, 1340, 1300, 1270, 1210, 1190, 1160, 1125, 1100, 1040, 1025, 980, 940, 850, 840, 820, 795, 770, 690	Espectro 47
EMIE, m/z (%):	300 (100), 271 (44.9), 69.1 (31.7), 95.1 (30.7), 257 (27.5), 243 (10), 228 (7.5), 167 (20), 134 (17.5), 137 (12.5), 123 (10), 151 (20), 153 (15), 299 (21), 109 (2)	Espectro 48
RMN ¹ H (80MHz, CDCl ₃ DMSO-d ₆ δ)	2.65-3.5 (sa, \approx D ₂ O, OH), 3.85 (s, 3H, 7-OMe), 6.28 (d, 1H, H-8), 6.45 (d, 1H, H-6), 6.48 (s, 1H, H-3), 6.53 (d, 1H, J=3Hz, H-2'), 6.93 (d, 1H, J=8Hz, H-5'), 7.30 (dd, 1H, J=3 y 8Hz, H-6'), 11.29 (s, 1H, 5-OH, \approx D ₂ O).	Espectro 49

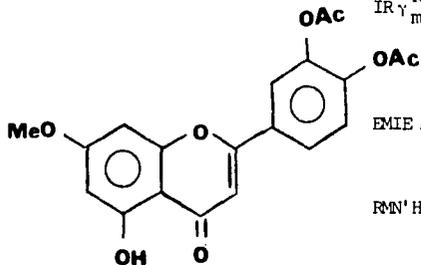
Tabla 31. Constantes físicas y espectroscópicas de 5,3',4'-triacetoxi-7-metoxi-flavona, 10B.

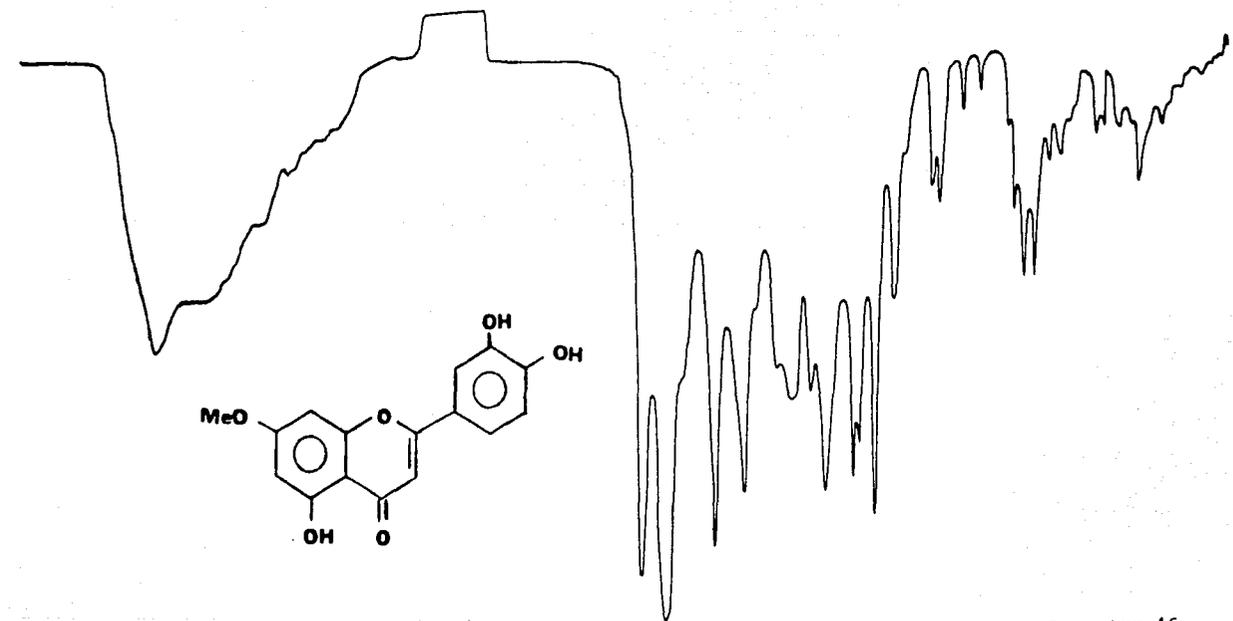


F.M.	$C_{22}H_{18}O_9$	
P.M.	426 g/mol	
UV λ_{max}^{MeOH} nm:	262 (0.93), 311 (1.09)	Espectro 50
IR ν_{max}^{KBr} :	3400, 3080, 2930, 1770, 1640, 1620, 1510, 1500, 1450, 1440, 1370, 1355, 1265, 1280, 1210, 1200, 1160, 1130, 1110, 1090, 1050, 1020	Espectro 51
EMIE m/z (%):	43.1 (100), 300 (43.0), 384.2 (10.6), 271.1 (9.0), 385.2 (2.2), 386.2 (0.4), 426.3 (0.4)	Espectro 52
RMN ¹ H (80MHz, CDCl ₃ , δ):	2.3 (s, 3H, AcO-), 2.32 (s, 3H, AcO-), 2.4 (s, 3H, AcO-), 3.88 (s, 3H, CH ₃ O-7-), 6.52 (s, 1H, H-3), 6.58 (d, 1H, J=3Hz, H-8), 6.83 (d, 1H, J=3Hz, H-6), 7.35 (d, 1H, J=3Hz, H-2'), 7.7 (d, 1H, J=8Hz, H-5'), 7.68 (dd, 1H, J=3,8Hz, H-6').	Espectro 53

Tabla 32. Constantes físicas y espectroscópicas de 3',4'-diacetoxi-5-hidroxi-7-metoxi-flavona 10A.

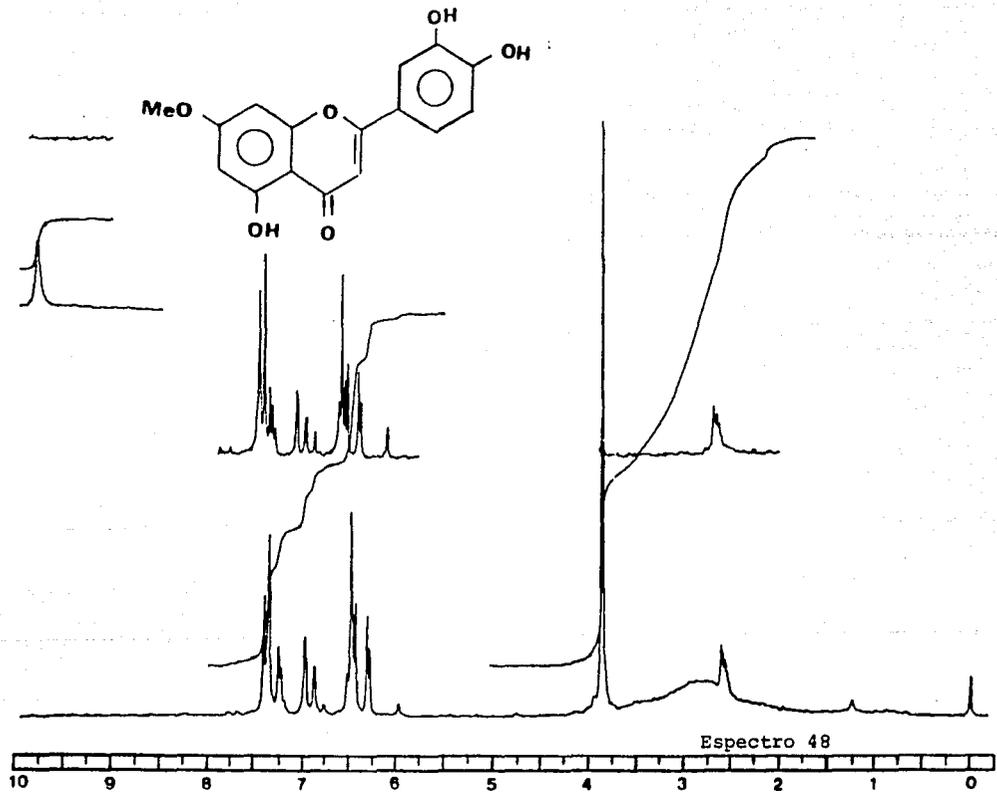
	F.M.	$C_{19}H_{16}O_6$	
	P.M.	372 g/mol	
	UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$	275 (1.235), 320 (0.82)	Espectro 54
	IR $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	3400, 3080, 1765, 1660, 1620, 1600, 1500, 1430, 1370, 1345, 1300, 1370, 1340, 1210, 1200, 1160, 1120, 1040, 1015, 979, 850, 650	Espectro 55
	EMIE, m/z (%)	43.1 (100), 300.1 (78), 384.1 (15.5), 271.1 (15.2), 344.1 (0.3), 385.2 (3.5), 386.1 (0.7)	Espectro 56
	RMN ¹ H (80MHz, CDCl ₃ δ)	2.32 (s, 3H, AcO-3'), 2.34 (s, 3H, AcO-4'), 3.85 (s, 3H, AcO-7), 6.35 (dd, 1H, 3,8Hz, H-6), 6.47 (d, 1H, J=3,8Hz, H-8), 6.58 (s, 1H, H-3), 7.36 (d, 1H, J=3Hz, H-2'), 7.73 (d, 1H, J=8Hz, H-5'), 7.7, 7.78 (dd, 1H, J=8,3Hz, H-6'), 10.55 (s, 1H, OH, H-5, ~ D ₂ O)	Espectro 57

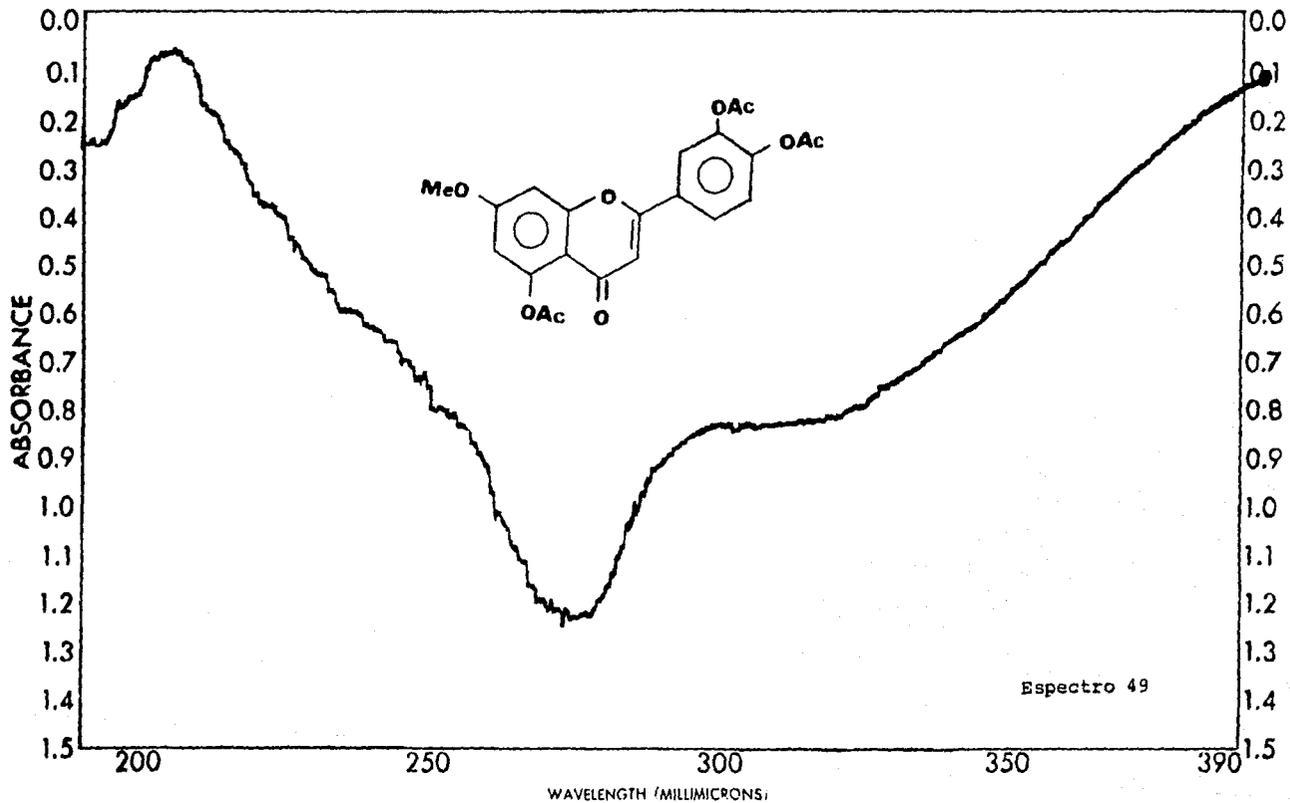


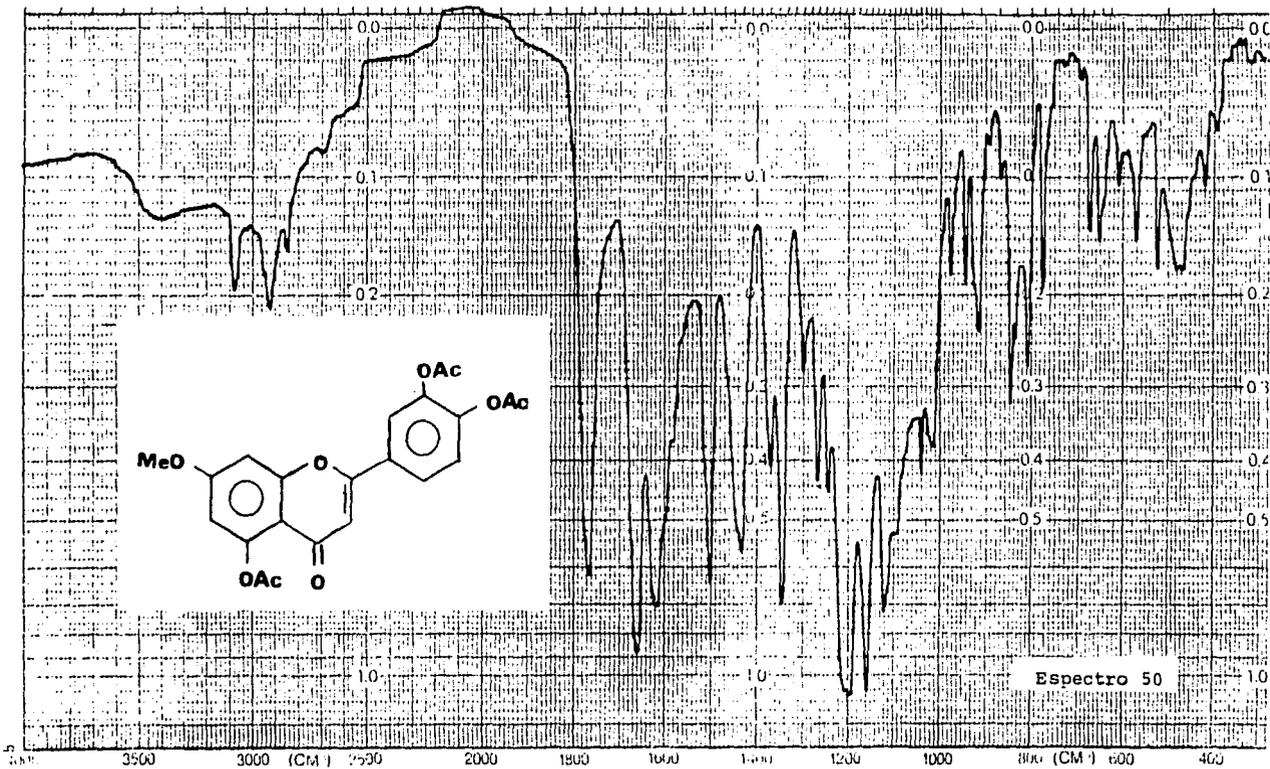


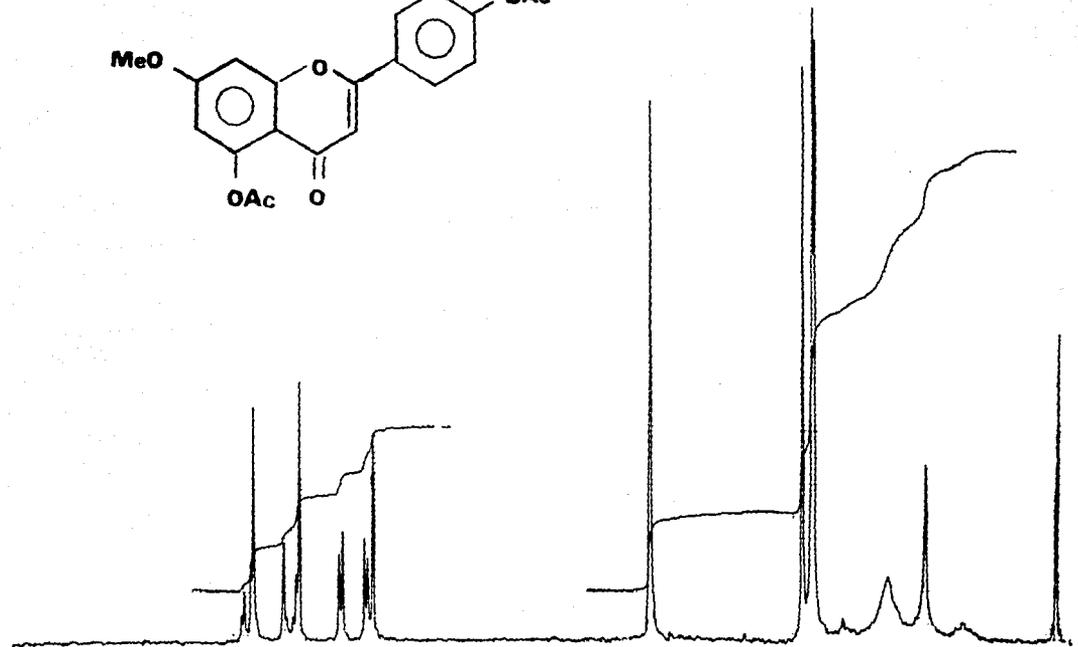
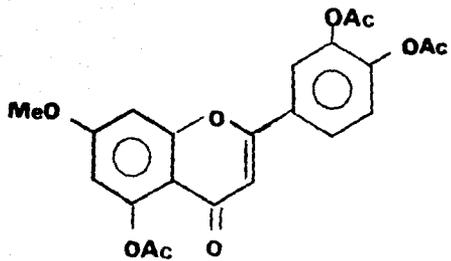
Espectro 46

4000 3000 2000 1800 1600 1400 1200 1000 800 600

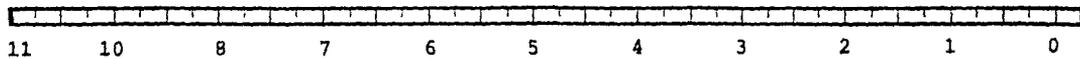


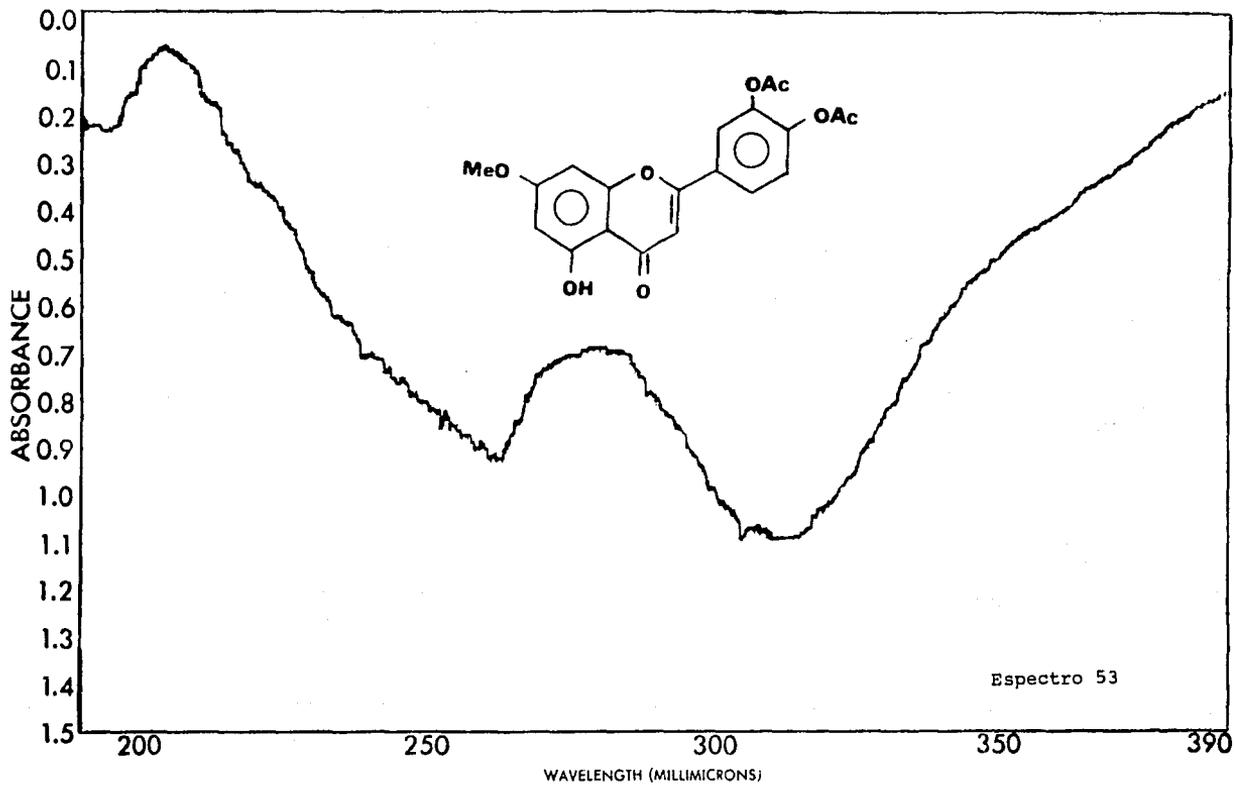


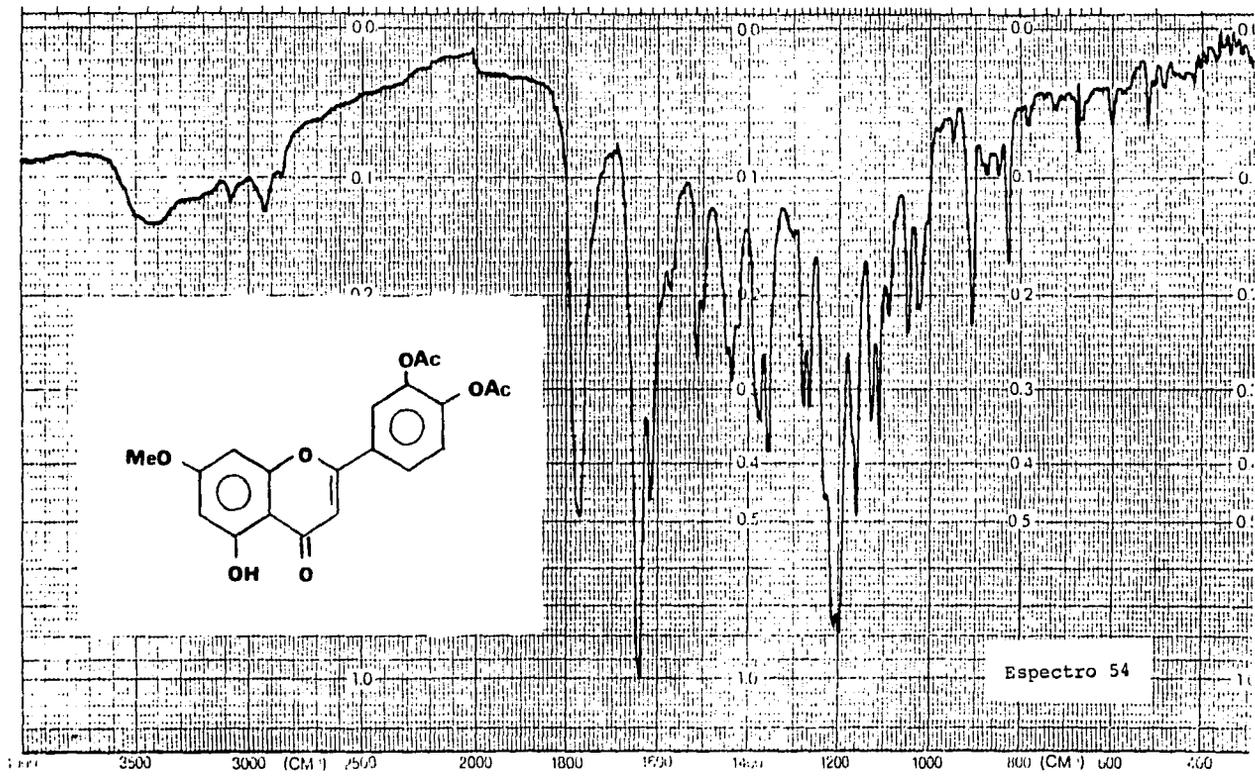




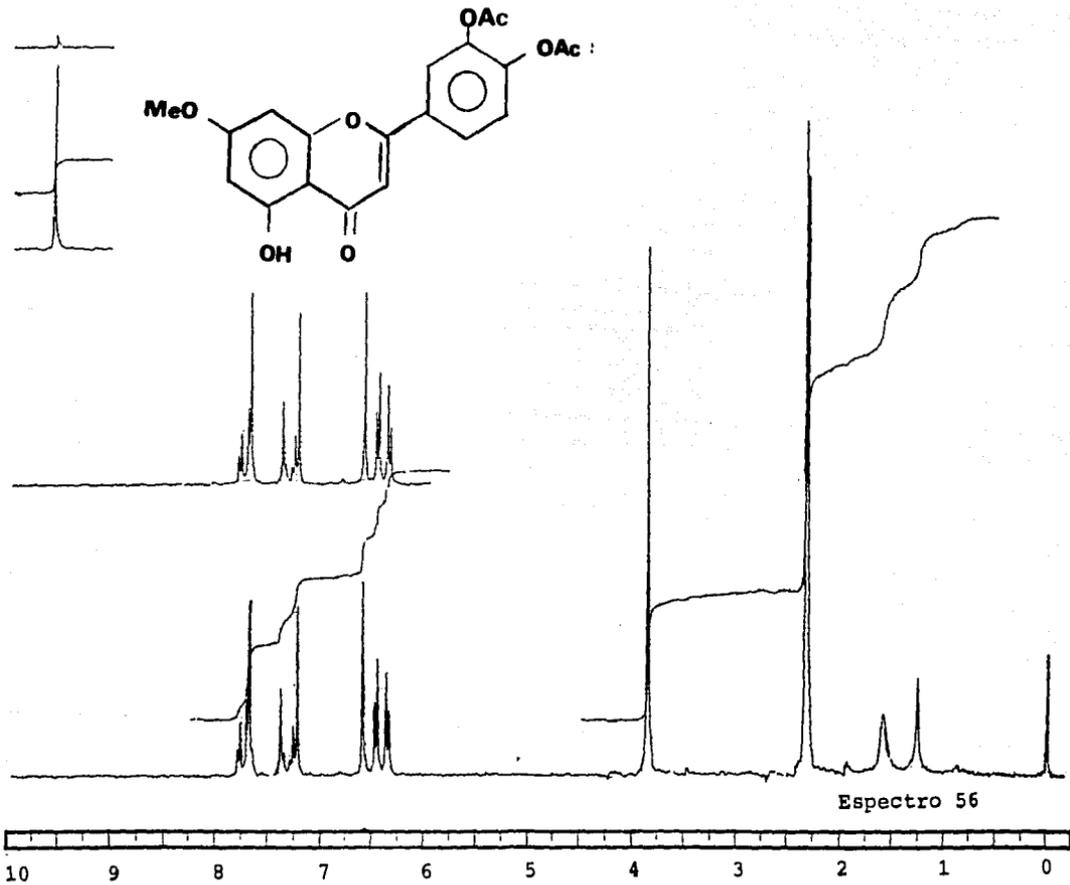
Espetro 52







Espectro 54



3.6 Identificación del β -sitosterol 11.

De las fracciones 186-211 de la columna original se aisló el β -sitosterol el cual se caracterizó por comparación con una muestra auténtica siguiendo la metodología convencional.

3.7 Identificación del manitol 9.

De las fracciones 697-825 de la columna de la Tabla 8 se logró aislar un sólido blanco muy soluble en disolventes polares, el cual se caracterizó como el manitol por comparación con una muestra auténtica.

3.8 Ensayos biológicos.

Desde el punto de vista biológico, las fenilcumarinas y la glucocucurbitacina fueron evaluadas in vitro como agentes antipalúdicos potenciales. El método empleado está basado en la inhibición de la toma de hipoxantina radioactiva por el parásito (IC_{50}).

En todos los casos, se uso como patrón el difosfato de cloroquina (IC_{50} 0.078). También se le determinó su toxicidad para el crustáceo A. salina.

En el caso de la evaluación como agentes antipalúdicos potenciales se encontraron los siguientes resultados:

- a) El extracto metanólico de la planta presentó una moderada actividad (IC_{50} =12.5 ppm).

- b) De las cumarinas la que presentó mejor actividad fue el glucósido 16 ($IC_{50}=12.5$ ppm).
- c) Finalmente, la glucocucurbitacina fue poco activa ($IC_{50}=31$ ppm).

En relación a la toxicidad para A. salina sólo la aglicona 17A presentó moderada toxicidad. Todos los compuestos restantes presentaron dosis medias letales mayores a 1000 ppm.

Por último, el compuesto 15 mostró moderada actividad contra Candida albicans ($MIC=12.5 \mu g/ml$), mientras que su aglicona la 3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina fue inactiva.

4.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan del presente capítulo son las siguientes:

1. El estudio fitoquímico convencional de la H. latiflora permitió el aislamiento y caracterización de cinco fenilcumarinas, una glucocucurbitacina, una flavona, el β -sitosterol 11 y el manitol, 9. Las fenilcumarinas fueron caracterizadas como la 5-O- β -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 16; la 5-O- β -D-galactopiranosil-3,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 15; la 5-O-(6"-acetil- β -D-galactopiranosil)-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina, 12; la 5-O- β -D-glucopiranosil-7,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, 17; y la 5-O- β -D-galactopiranosil-4'-hidroxi-7-metoxi-4-fenilcumarina 14, siendo esta última un nuevo producto natural. La glicocucurbitacina se identificó como la 3-O- β -D-glucopiranosil-23,24-dihidrocucurbitacina F, 13, también un nuevo producto natural. Finalmente, la flavona se identificó como la 7-metil-luteolina 10.
2. Desde el punto de vista quimiotaxonómico, resulta interesante destacar que una vez más las fenilcumarinas y cucurbitacinas no son metabolitos mutuamente excluyentes en especies relacionadas a Hintonia. Previamente, la

coexistencia de estos dos tipos de metabolitos se demostró en la Exostema mexicanum (Albor, 1989; Mata, et al, 1989).

Por otra parte, este constituye el primer reporte de flavonoides en el género Hintonia.

- 3.0 El extracto metanólico presentó moderada actividad antipalúdica ($IC_{50}=12.5$ ppm). De las cumarinas la que presentó mejor actividad fue el glucósido 16 ($IC_{50}=12.5$ ppm). El compuesto 15 presentó una moderada actividad contra C. albicans ($MIC=12.5\mu g/ml$).

CAPITULO II

AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL Teloxys graveolens.1.0 Generalidades del Teloxys graveolens.

El Teloxys graveolens Willd (Sinonimia: Chenopodium graveolens), conocido comúnmente con los nombres de Epozote del zorrillo y Epozote de coyote, se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta la Argentina. En México se encuentra en gran parte del territorio, en medio de muchos tipos de vegetación (Rzedowski y Rzedowski, 1979).

Rzedowski, 1978, hace la siguiente descripción del T. graveolens:

"Hierba anual, erguida, glandulosa, muy olorosa, de 20 a 80 cm de altura; tallo simple o ramificado, a veces rojizo; peciolo delgado, hojas ovadas u oblongas, de 2 a 6 cm de largo por 1 a 3 cm de ancho, sinuado-pinnatífidas, con los lóbulos oblongos o deltoides, glabras ó algo viscidas en el haz, cubiertas de glándulas amarillas en el envés; influencia de numerosas cimas axilares, dispuestas en largas panículas; flores sesiles en la bifurcación de las ramas laterales y una sola termina en el extremo de cada una de las ramas laterales; flores pediceladas generalmente abortivas, caedizas, sus pedicelos espiniformes; perianto de menos de 1 mm de largo, corniculado en el ápice de los

l6bulos, cubierto de glándulas, envolviendo incompletamente el fruto; semilla por lo general horizontal, de 0.5 mm de diámetro, de color café oscuro y con el pericarpo adherente".

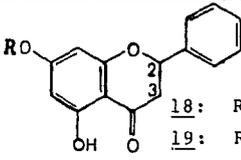
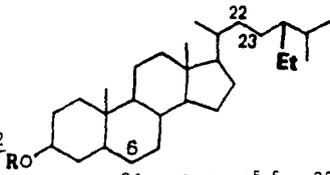
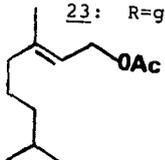
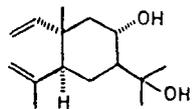
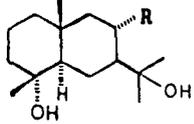
Desde épocas precolombinas las partes aéreas de Teloxys graveolens se emplean como vermífugo. Actualmente su actividad antihelmíntica se conoce en toda la República.

El epazote de zorrillo forma parte del cuadro básico de drogas vegetales de la OMS para el tratamiento de parasitosis en varios países en desarrollo (Informe de la ONUDI, ID/295). El epazote posee además de sus propiedades medicinales, actividad nematocida en diversos tipos de suelo (Morishita, et al, 1978).

Desde el punto de vista fitoquímico solamente se ha descrito un trabajo (Mata, et al, 1987). La investigación condujo al aislamiento y caracterización de varios terpenoides, tres flavonoides y tres esteroides (ver Tabla 33).

Con la finalidad de obtener compuestos bioactivos se considero pertinente reinvestigar la planta, orientando el estudio fitoquímico mediante la determinación de la toxicidad para Artemia salina.

Tabla 33. Metabolitos secundarios descritos en el Teloxys graveolens.

Fuente	Constituyente	Estructura	Referencia
<u>Teloxys graveolens</u>	Pinostrobrina, <u>18</u>	 <p>18: R=OME $\Delta^{2,3}$ 19: R=OH 20: R=OH, $\Delta^{2,3}$</p>	Mata, et al, 1987.
	Pinocembrina, <u>19</u>		
	Crisina, <u>20</u>		
	Estigmasterol, <u>21</u>	 <p>21: R=H, $\Delta^{5,6}$ $\Delta^{22,23}$ 22: R=H, $\Delta^{22,23}$ 23: R=glucosa, $\Delta^{5,6}$</p>	
	Estigmast-22-en-3-ol, <u>22</u>		
	3 β -glucositosterol, <u>23</u>		
	Acetato de geranilo, <u>24</u>		
	(+)-8 α -hidroxi-elemol, <u>25</u>		
	Criptomeridiol, <u>26</u>	 <p>(+)-8α-acetoxi-criptomerimeridiol, <u>27</u> 26; R=H 27: R=OAc</p>	

La identificación de los compuestos aislados se realizó por IR, RMN¹H, RMN¹³C, EMIE, PF y por comparación con muestras auténticas.

2.0 GENERALIDADES DE Ascaridia galli, Fasciola hepatica y Stomoxys calcitrans.

2.1 Ascaridia galli Dujardin (Phylum: Nematelminthes; Clase: Nematoda; Orden: Ascaroidea; Familia: Heterakidae) es un parásito que normalmente se aloja en el intestino delgado de las aves de corral. Su ciclo biológico es directo. Tanto las larvas como los gusanos adultos afectan al huésped, pero los efectos de las larvas son más serios que los de gusanos adultos. En este último sentido, A. galli, se asemeja al Ascaris lumbricoides (Clase: nematoda; Orden: Ascaroidea; Familia: Ascaridae). Las larvas de A. galli a diferencia de las larvas de A. lumbricoides no migran por hígado y los pulmones del huésped, así mismo los huevos son menos resistentes a factores climatológicos fuera del huésped (Reid, etal, 1960; Tongson y Mc Graw, 1966; Lapage, 1971).

Actualmente existen agentes antihelmínticos sintéticos efectivos para el tratamiento de la parasitosis producida por este nematodo. Sin embargo, a la fecha no se ha desarrollado ningún fármaco de origen natural eficaz para la cura de la enfermedad.

2.2 Stomoxys calcitrans Geoffroy, se conoce comúnmente con el nombre de "mosca de los establos" debido a su abundancia en las caballerizas y sus alrededores. Se encuentra en todo el mundo y es, aproximadamente de igual tamaño que la Musca domestica. Las larvas se alimentan de material vegetal y el parásito adulto de sangre. Este insecto ataca al hombre, caballos, vacas y otros mamíferos; así como también a las aves y algunos reptiles. Es el agente transmisor de una gran variedad de enfermedades (surra de los equinos; mal de la cadera de los equinos, ganado bovino, ovino y caprino; nagana del ganado vacuno, ovino, caprino y equino; carbunco y tripanosomiasis humana) y es hospedero intermediario del nemátodo Habronema majus, ya que generalmente inicia su alimentación con sangre de un huésped y termina en otro.

Las moscas originan mayores problemas en los lugares donde pueden encontrar fácilmente los criaderos adecuados. Por ello, las medidas de control son dirigidas hacia los criaderos eliminando la humedad de las camas, el heno, las heces, evitando el acúmulo de desechos vegetales y por el uso de insecticidas como el DDT y las piretrinas.

2.3 Fasciola hepatica Linnaeus (Phylum: Platyhelminthes; Clase: Trematoda; Orden: Digeneaticas), conocida comúnmente como duela del hígado, es un parásito cosmopolita que se aloja en los conductos biliares de ovinos, caprinos, bovinos, animales domésticos, silvestres y el hombre. El ciclo vital de la duela del hígado es indirecto, ya que requiere de un hospedero intermediario (Lymnaea, Fossaria, Galva y Pseudosuccinea) para poder completarlo (Gómez, et al, 1978; Hadar, et al, 1978; Quiroz, 1984; Landeros, et al, 1981; Soulsby, 1987).

La duela del hígado es el agente causante de la fasciolosis, enfermedad muy extendida entre especies domésticas de interés económico, como bovinos y caprinos. Se presenta en forma aguda y crónica, siendo esta última la más común. La fasciolosis aguda generalmente produce la muerte del hospedero, ocasionando de este modo pérdidas directas inmediatas. La fasciolosis crónica causa pérdidas de diferente índole como son: la disminución en la producción de leche y carne en los bovinos (Black, et al, 1972; Quiroz, et al, 1973; Sewell, et al, 1968; Ross, 1970; Cawdery, et al, 1977); la reducción en la producción de lana en los ovinos (Roseby, 1970), aparte de influir negativamente en la concepción (Cawdery, 1976); todo ello como consecuencia de la desnutrición y la mala conversión alimenticia que realizan los animales parasitados. Una de las complicaciones

más frecuentes de la fasciolosis crónica es la crostridio-
sis (cabeza negra) enfermedad causada indirectamente por
la duela.

Actualmente en México de acuerdo a numerosas investi-
gaciones la fasciolosis constituye un grave problema de
índole pecuario, su incidencia es variable alcanzando has-
ta valores de un 100% en algunos lugares (Ciprian, 1977;
Gómez, et al, 1978; Miranda, 1979; Reyes, 1979; Quiroz,
1984). Como este parásito ocasiona numerosas pérdidas
económicas, ha sido objeto de numerosos estudios. Sin em-
bargo, a la fecha se han desarrollado pocos agentes fascio-
licidas comerciales (Diamfenetida, Rafoxanida, Albendazol,
Triclabendazol, etc.) todos de origen sintético y ninguno
actua en todos los estados de desarrollo del parásito.

3.0 MATERIALES Y METODOS.

3.1 Material vegetal.

Las partes aéreas del T. graveolens Willd fueron obtenidas en el mercado de Sonora, México, D.F., en enero de 1989.

El material se dejó secar a temperatura ambiente, se cortó en trozos pequeños y posteriormente se pulverizó en un molino de cuchillos modelo Wiley 4.

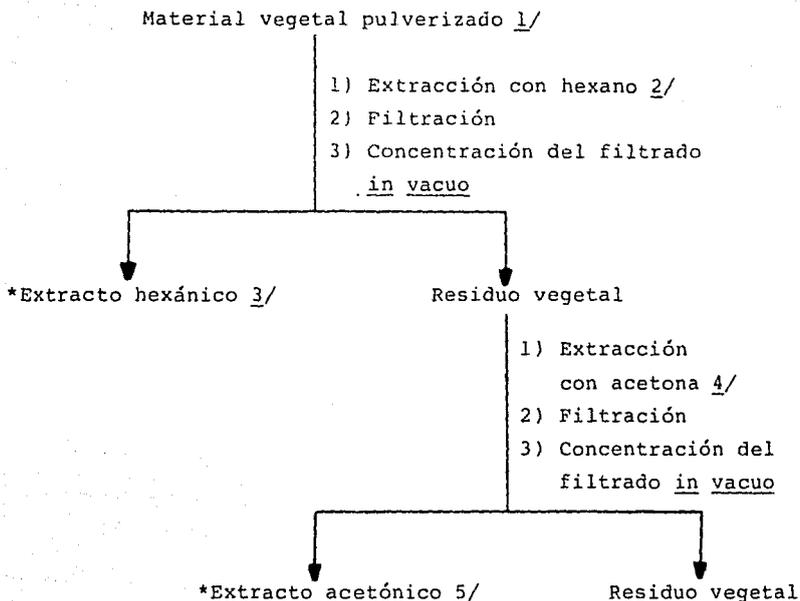
3.2 Determinación de la toxicidad para el crustáceo Artemia salina.

El bioensayo utilizado para dirigir el estudio fitoquímico de T. graveolens se realizó de acuerdo a la metodología especificada en la sección 2.6.1 del Capítulo I.

3.3 Métodos de extracción.

El material seco y pulverizado (1.37 Kg) se extrajo con hexano y luego con acetona de acuerdo al procedimiento indicado en el Esquema 3.

Los dos extractos resultantes se evaluaron biológicamente mediante el ensayo mencionado en la sección anterior.



1/ Cantidad del material vegetal 1.37 Kg

2/ Maceración (tres veces por periodos de dos días cada vez, 4.5 l hexano).

3/ Cantidad total del extracto hexánico 14.5 g

4/ Extracción vía maceración (cuatro veces por periodos de dos días cada vez) y por reflujo (una vez por dos horas, 5 l de acetona)

5/ Cantidad total del extracto acetónico 44 g

*Determinación de la toxicidad del extracto para A. salina.

Esquema 3. Extracción de las partes aéreas del Teloxys graveolens.

3.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico.

El total del extracto acetónico (44 g) se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (440 g, silica gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se inició con hexano y se prosiguió con mezclas de hexano-cloroformo y cloroformo-metanol. Se recogieron un total de 700 fracciones de 250 ml cada una; cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. A cada una de las fracciones combinadas se les determinó, la toxicidad para A. salina. En la Tabla 34 se resume el fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico.

3.5 Separación de los constituyentes de las fracciones activas del extracto acetónico.

Las fracciones más activas (180-569 y 570-612) obtenidas del fraccionamiento del extracto acetónico fueron recromatografiadas sobre gel de sílice y las fracciones resultantes también se evaluaron mediante el mismo bioensayo (ver Tablas 35 y 36).

Tabla 34. Resumen del fraccionamiento biodirigido vía cromatografía en columna del extracto acetónico de Teloxys graveolens.

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas*	Actividad biológica
Hexano	100	1- 27	1- 20	-
Hex/CHCl ₃	80:20	28- 61	20- 51	-
Hex/CHCl ₃	70:30	62-147	52- 95	+
Hex/CHCl ₃	60:40	148-237	96-132	+
Hex/CHCl ₃	50:50	238-256	133-179	+
Hex/CHCl ₃	40:60	257-284	180-305	++
Hex/CHCl ₃	30:70	285-358	306-569	++
Hex/CHCl ₃	20:80	359-383	570-586	++
Hex/CHCl ₃	10:90	384-495	587-612	++
CHCl ₃	100	496-523	613-646	-
CHCl ₃ /MeOH	99:1	524-562	647-659	-
CHCl ₃ /MeOH	98:2	563-571	660-672	-
CHCl ₃ /MeOH	95:5	572-618	673-679	-
CHCl ₃ /MeOH	90:10	619-646	680-694	-
CHCl ₃ /MeOH	80:20	647-669	695-700	-
CHCl ₃ /MeOH	30:70	670-687		
CHCl ₃ /MeOH	50:50	688-693		
MeOH	100	694-700		

*Las fracciones combinadas fueron evaluadas biológicamente

- inactiva
+ poco activa
++ muy activa

Tabla 35. Recromatografía en columna de las fracciones cromatográficas más activas (180-569) del extracto acetónico.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas*	Actividad biológica
Hexano	100	1- 39	-
Hexano/Cloroforno	90:10	40- 68	++
		69-159	+
Hexano/Cloroforno	80:20	160-373	++
Hexano/Cloroforno	70:30		
Hexano/Cloroforno	60:40		
Hexano/Cloroforno	40:60	374-437	++
Hexano/Cloroforno	20:80	438-523	-
Cloroforno	100		
Cloroforno/Acetona	99:1		
Cloroforno/Acetona	98:2		
Cloroforno/Acetona	97:3		
Cloroforno/Acetona	95:5		
Cloroforno/Acetona	90:10	524-570	-
Cloroforno/Acetona	80:20		
Cloroforno/Acetona	70:30		
Cloroforno/Acetona	50:50		
Cloroforno/Acetona	30:70		
Acetona	100		

Se recolectaron 570 fracciones de 20 ml cada una.

*Las fracciones combinadas fueron evaluadas biológicamente.

+ poco activas

++ muy activas

- inactivas

Tabla 36. Recromatografía en columna de las fracciones cromatográficas más activas (570-612) del extracto acetónico.

Eluyente	Proporción	Fracciones combinadas*	Actividad biológica
Hexano/Cloroformo	50:50	1- 30	++
Hexano/Cloroformo	40:60	31-157	++
Hexano/Cloroformo	30:70		
Hexano/Cloroformo	20:80		
Cloroformo	100		
Cloroformo/Acetona	95:5	158-166	-
		167-179	++
		180-214	++
		215-242	++
Cloroformo/Acetona	92:8	243-311	-
Cloroformo/Acetona	80:20	312-360	-
Cloroformo/Acetona	70:30		
Cloroformo/Acetona	50:50		
Acetona	100		

Se recolectaron 360 fracciones de 100 ml cada una.

*Las fracciones combinadas fueron evaluadas biológicamente.

+ poco activas

++ muy activas

- inactivas

3.5.1 Obtención de la 5,7-dihidroxi-flavanona (Pinocebrina),
19.

Las fracciones 40-68 y 160-437 de la Tabla 35, mostraron una actividad biológica significativa; de estas fracciones precipitaron 648 mg de un sólido de color verde, el cual fue purificado por cromatografía en columna sobre gel de sílice (impregnada con nitrato de plata al 10%). En esta ocasión los eluyentes empleados fueron los siguientes: hexano-cloroformo (50:50; 30:70; 10:90), cloroformo y cloroformo-acetona (95:5). El producto puro se obtuvo como un sólido amarillo intenso, pf. 195-197°C.

Las fracciones 31-157 y 167-242 de la Tabla 36, también presentaron toxicidad considerable para Artemia salina. De la primera fracción precipitaron 272.8 mg adicionales de la sustancia 19.

Las fracciones 167-242, fueron a su vez recromatografiadas en 28 g de gel de sílice (impregnada con nitrato de plata al 10%) utilizándose los mismos eluyentes de las Tablas 35 y 36.

De las fracciones 216-418 de esta última columna se obtuvieron 119.9 mg de 19. El rendimiento total de la Pinocebrina fue de 1.041 g.

3.5.2 Obtención de la mezcla I.

Las fracciones 69-159 (Tabla 35) moderadamente activas, fueron purificadas por tratamiento con carbón activado. Lue-

go del proceso de purificación se obtuvieron 231 mg de un sólido de aspecto ceroso, de color crema, $pf=30^{\circ}C$. Este producto se denominó mezcla I.

3.5.3 Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (Pinostrobin) 18.

De las fracciones 51-68 de la Tabla 35 se aislaron 223.4 mg de unos cristales en forma de agujas y de color blanco, pf 97-99°C.

3.5.4 Obtención de la 5,7-dihidroxi-flavona (Crisina) 20.

De las fracciones 417-437 de la Tabla 35, precipitaron 33.1 mg de un sólido de color amarillo, pf 74-77°C.

3.6. Separación de los constituyentes de las fracciones inactivas del extracto acetónico.

3.6.1 Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (Pinostrobin) 18.

De las fracciones 116-132 de la Tabla 34, se obtuvieron 172.9 mg adicionales de la Pinostrobin.

3.6.2 Obtención de la 5,7-dihidroxi-flavona (Crisina), 20.

De las fracciones 306-569 de la columna original (ver Tabla 34), se obtuvieron 1.03 g adicionales de 20, obteniéndose un rendimiento total de 1.361 g de Crisina.

3.6.3 Obtención del 3- β -glucositosterol, 23.

De las fracciones 613-659 de la columna original (Tabla 34), se aisló un sólido de color sepía que fue purificado por recristalización con acetona. Proporcionando finalmente 285.9 mg de un sólido de color blanco de p.f. 78-80°C.

3.7 Fraccionamiento del extracto hexánico.

El extracto hexánico (14.5 g) se fraccionó preliminarmente mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (140 g) la elución se inició con hexano-cloroformo y se continuo con cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Se recolectaron 680 fracciones de 65 ml cada una.

3.7.1 Obtención de la 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona (Pinostrobina), 18.

De las fracciones 81-125 de la columna del extracto hexánico, eluidas con hexano-cloroformo 90:10 se aislaron 156.2 mg adicionales de 30, obteniéndose finalmente un rendimiento de 453.5 mg de Pinostrobina.

3.7.2 Obtención del Estigmasterol, 21.

De las fracciones 93-105 (hexano-cloroformo, 70:30) del fraccionamiento del extracto hexánico se obtuvieron 73.2 mg de un compuesto de color crema, p.f. 123-127°C.

3.7.3 Obtención del Estigmast-22-en-3-ol, 22.

De las fracciones 184-328 de la columna del extracto hexánico precipitaron 130.1 mg de un sólido de color blanco en forma de agujas muy finas, p.f. 149-151°C.

3.7.4 Obtención del β -sitosterol, 11.

De las fracciones 329-435 del extracto hexánico eluidas con hexano-cloroformo 70:30, 60:40 y 50:50, precipitaron 60 mg de una sustancia cristalina, p.f. 124-127°C.

3.8 Caracterización de los compuestos aislados.

3.8.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Los aparatos para obtener las constantes físicas y es-

pectroscópicas de los compuestos aislados fueron los mismos que se utilizaron en el estudio fitoquímico de la Hintonia latiflora (Capítulo I, sección 2.5.1).

3.8.2 Preparación de los derivados.

3.8.2.1 Derivados acetilados y metilados.

Las metodologías, empleadas para preparar los derivados metilados de la mezcla I y los derivados acetilados de 19 y 21 fueron las mismas que se describieron en las secciones 2.5.7 y 2.5.8 del Capítulo I.

A continuación se resume el rendimiento y el punto de fusión de los derivados obtenidos.

Compuesto	Cantidad del Compuesto	Compuesto acetilado	Compuesto metilado	Punto de fusión
<u>19</u>	100 mg	82.3 g	—	195-197°C
<u>21</u>	30 mg	18 mg	—	123-127°C
<u>Mezcla I</u>	100 mg	—	63.3 mg	—
<u>Mezcla I metilada</u>	50 mg	—	—	—

En general, la caracterización de los productos obtenidos se realizó mediante la combinación de métodos químicos, espectroscópicos y por la comparación de sus propiedades físicas y espectroscópicas con las observadas para muestras auténticas obtenidas en un estudio previo de la planta (Mata, et al, 1987). En la Figura 16 se resumen la totalidad de los compuestos aislados del T. graveolens. En la Tabla 37 se resumen los compuestos aislados y sus respectivos rendimientos.

Tabla 37. Rendimientos de los compuestos aislados de T. graveolens.

Compuesto	Gramos obtenidos	% de rendimiento en base a planta seca
<u>11</u>	0.060	0.0044
<u>18</u>	0.453	0.033
<u>19</u>	1.041	0.076
<u>20</u>	1.361	0.099
<u>21</u>	0.073	0.0053
<u>22</u>	0.130	0.0095
<u>23</u>	0.285	0.0208
Mezcla I	0.231	0.0168

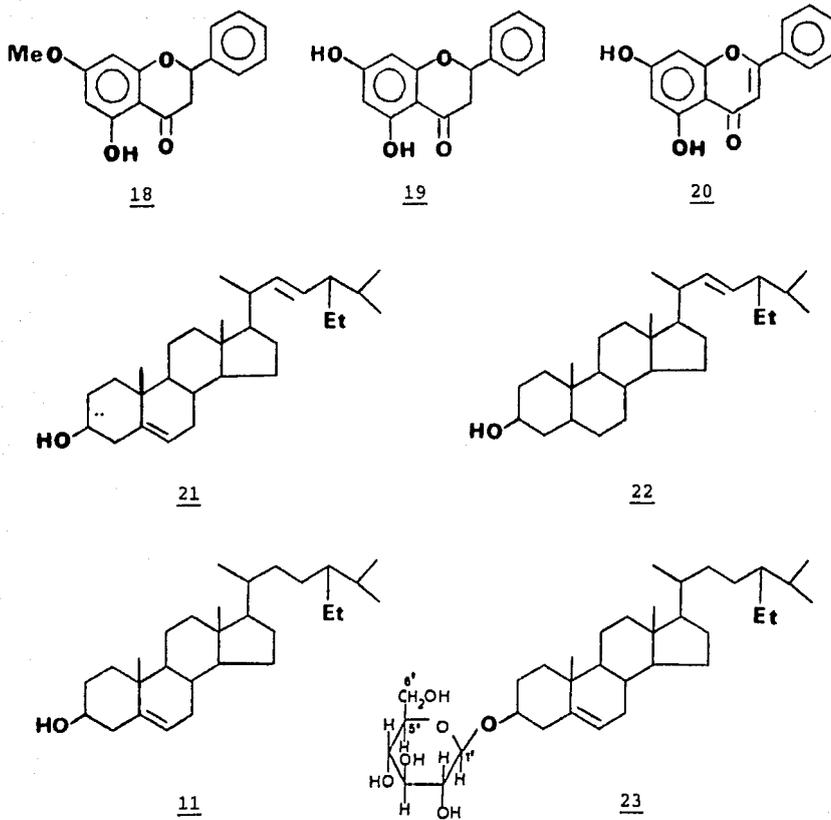


Figura 16. Estructuras de los compuestos aislados del *Teloxys gravecolens*.

3.9 Evaluación in vitro del efecto ovicida, larvicida y fasciolicida de la pinocembrina.

Los experimentos conducentes a la evaluación del efecto ovicida de la pinocembrina sobre la larva 2 de Ascaridia galli y la larva 3 de Stomoxys calcitrans se realizaron bajo un diseño de bloques completamente aleatorio, con cuatro repeticiones por tratamiento (1000, 100 y 10 ppm) para el caso de la larva 2 de A. galli y con cinco repeticiones por tratamiento (1000, 500 y 250 ppm) en el caso del ensayo sobre larvas de S. calcitrans.

3.9.1 Evaluación del efecto ovicida de la pinocembrina.

3.9.1.1 Cosecha y preparación de los huevos infestantes de A. galli.

Se colectaron intestinos delgados de pollos sacrificados en el rastro. Los intestinos se incidieron longitudinalmente con tijeras, se inspeccionaron a todo lo largo. En cuando se observó la presencia de los parásitos (A. galli) se procedió a colectarlos con una aza, a continuación se lavaron y se mantuvieron en solución salina isotónica. Posteriormente las hembras se separaron de los machos. Las hembras adultas, se molieron en un mortero y se colocaron en cajas de Petri, conteniendo una parte de Formalina al 2% en 75 partes de agua destilada. Los huevos fueron incubados a 30°C durante 18 días, con aereación diaria. Al cabo de

este tiempo se determinó el número de huevos infestados de acuerdo a la metodología descrita por Tongson y colaboradores (Tongson et al., 1966).

3.9.1.2 Preparación de la muestra y bioensayo.

Se disolvieron 20 mg de pinocembrina en 2 ml de metanol; de la solución resultante, alícuotas de 200 μ l, 20 μ l y 2 μ l se transfirieron a 12 viales (cuatro viales por dilución). El disolvente se eliminó a temperatura ambiente y una vez secas las muestras, se procedió a colocar 25 huevos infestantes en cada uno de los viales y se adicionó agua destilada hasta completar 2 ml. Posteriormente los viales conteniendo los huevos larvados y la muestra se incubaron a 30°C, durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se contaron el número de larvas vivas y muertas. El conteo se realizó bajo observación microscópica y se tomó como criterio para considerar la muerte de la larva la ausencia de movilidad frente a estímulos luminosos. Como control se utilizó una serie de cinco viales conteniendo cada uno 25 huevos infestantes suspendidos en 2 ml de una mezcla de una parte de Formalina al 2% en 75 partes de agua destilada.

3.9.2 Evaluación del efecto larvicida de la pinocembrina.

3.9.2.1 Preparación de las muestras a evaluar.

Se disolvieron 80 mg de pinocembrina en 8 ml de metanol (solución original). Posteriormente, alícuotas de 300, 150 y 75 μ l de la solución original se transfirieron por separado a 15 cajas de Petri (5 cajas por cada concentración),

finalmente el disolvente se evaporó a temperatura ambiente.

3.9.2.2 Obtención e identificación de las larvas de Stomoxys calcitrans.

Las moscas adultas se atraparon en el establo de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM). Para el desarrollo de las larvas, 10 moscas (en promedio) se colectaron en varios frascos conteniendo estiércol de vaca fresco. Posteriormente, los frascos se taparon con una gasa, y se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Al cabo del tiempo especificado, y luego de retirar las moscas muertas, se observaron los huevecillos (2 mm) de color blanco, los cuales se incubaron con suficiente humedad, a una temperatura de 25°C, durante ocho días. Finalizado este tiempo, se seleccionaron 200 larvas en el estadio tres. Estas larvas se identificaron como Stomoxys calcitrans (Lapage, 1971 y Soulsby, 1982), por observación al microscopio de sus espiráculos posteriores. El insecto adulto, huevo y pupa, también fueron identificados con base en sus características morfológicas (Lapage, 1971 y Soulsby, 1982).

3.9.2.3 Evaluación.

Las larvas reunidas se repartieron en las cajas de Petri (10 larvas en cada caja), que contenían la sustancia objeto de la evaluación, 3 ml de agua destilada y una pequeña cantidad de paja molida. Las cajas de Petri fueron mantenidas en una incubadora a 24-27°C y se hicieron conteos

de larvas vivas y muertas a las 24 horas. Se tomó como criterio para considerar la muerte de las larvas la falta de movilidad y la ausencia de respuesta a los estímulos mecánicos. El control se preparó de igual forma (en cinco cajas de Petri), pero sin la sustancia problema.

3.9.3 Evaluación del efecto fasciolicida de la pinocembrina.

3.9.3.1 Preparación de la sustancia objeto de evaluación, testigo y blanco.

Se disolvieron por separado 5 mg de pinocembrina y 5 mg de diamfenetida acetilada (testigo) en 0.1 ml de metanol y se adicionó agua hasta completar 10 ml. A partir de estas soluciones se prepararon por duplicado soluciones con una concentración final de 50 y 9 ppm. Como blanco se utilizó una solución de metanol en agua.

3.9.3.2 Desenquistamiento de las metacercarias.

Las metacercarias de F. hepática obtenidas del CENID-Microbiología INIFAP, SARH, se desenquistaron de acuerdo a la técnica empleada por Dixón, (Dixon, 1966) con las modificaciones realizadas por Sánchez e Ibarra (Sánchez e Ibarra, 1987).

3.9.3.3 Evaluación.

Las pruebas se realizaron en una campana de flujo laminar, bajo las mayores condiciones posibles de esterilidad.

El medio de cultivo utilizado para el ensayo fue adaptado del descrito por Smith y Clegg (Smith y Clegg, 1981), consistente solamente de medio RPMI 1940, 1000 U/ml de penicilina y 50 ppm de estreptomycinina.

El ensayo se realizó en cajas multicámaras para cultivo de tejidos con capacidad de 3 ml por pozo. A cada pozo conteniendo el medio de cultivo se le adicionaron 10 metacercarias recién desenquistadas y la sustancia a evaluar. Se incubaron durante tres días a 37°C con 5% de CO₂; al cabo del tiempo mencionado se evaluó el efecto de cada sustancia sobre las metacercarias desenquistadas mediante la observación con un microscopio invertido.

3.10 Análisis estadístico y cálculo del porcentaje de efectividad.

Con la finalidad de determinar posibles diferencias significativas entre los grupos con tratamiento, los resultados obtenidos en los ensayos especificados en las secciones 3.9.1 y 3.9.2 se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey (Daniel, 1980; Márquez, 1988). Por otra parte la efectividad para la pinocembrina se midió en base al número de sujetos vivos presentes en los grupos tratados en relación al número de individuos vivos en el grupo sin tratamiento y los cálculos correspondientes se realizaron con la fórmula siguiente:

$$\text{Eficacia} = \frac{\bar{X} \text{ grupo testigo} - \bar{X} \text{ grupo tratado}}{\bar{X} \text{ testigo}} \times 100, \text{ (Wescott, et al, 1980; Powers, et al, 1982, inter alia).}$$

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Obtención de la Pinoembrina del extracto acetónico de T. graveolens.

Los ensayos de toxicidad para A. salina de los extractos acetónico y hexánico de T. graveolens indicaron que el extracto acetónico era mucho más activo que el hexánico (ver Tabla 38).

Tabla 38. Toxicidad* de los extractos hexánico y acetónico de T. graveolens para Artemia salina.

Extracto	% MORTALIDAD		
	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
Hexánico	36.66	66.6	3.33
Acetónico	100	20	6.66

*Expresada en % de mortalidad.

Posteriormente, el fraccionamiento biodirigido del extracto más activo mediante una cromatografía preparativa en columna condujo a la obtención de dos fracciones activas (180-569 y 570-612). Estas fracciones como era de esperarse fueron más activas que el extracto original. En la Tabla 39 se resumen los resultados de las evaluaciones biológicas de cada una de las fracciones combinadas obtenidas al realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto acetónico.

Tabla 39. Toxicidad de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna del extracto acetónico de T. graveolens.

FRACCION	% MORTALIDAD		
	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
1- 20	0	0	0
21- 51	0	0	0
52- 95	36.66	3.33	0
96-132	46.66	0	0
133-179	53.33	50	0
180-305	96.66	76.66	56.66
306-569	100	26.66	6.66
570-586	76.66	0	0
587-612	100	56.66	3.33
613-646	0	0	0
647-659	0	0	0
660-672	0	0	0
673-679	0	0	0
680-687	0	0	0
688-700	0	0	0

*Expresada en % de mortalidad de los crustáceos.

Las fracciones activas obtenidas de la columna original fueron recromatografiadas con la finalidad de separar los com-

puestos activos y los resultados de las evaluaciones biológicas de las fracciones secundarias correspondientes se resumen en las Tablas 40 y 41.

Tabla 40. Toxicidad* de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna sobre gel de sílice de las fracciones más activas (180-569).

FRACCION ACTIVA 180-569 DE LA COLUMNA ORIGINAL	% MORTALIDAD		
	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
1- 39	0	0	0
40- 68	53.33	23.33	0
69-159	100	50	0
160-373	100	6.0	0
374-437	100	0	0
438-523	0	0	0
524-570	0	0	0

*Expresada en % de mortalidad de los crustáceos.

De las fracciones activas 40-68 y 160-437 (Tabla 40), precipitó un sólido cristalino de color amarillo y biológicamente activo ($LC_{50}=8.2$ ppm) el cual fue identificado como la Pinocembrina.

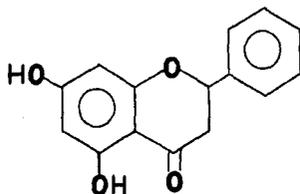
Tabla 41. Toxicidad* de las fracciones más activas (570-612).

FRACCION ACTIVA 570-612 DE LA COLUMNA ORIGINAL	% MORTALIDAD		
	1000 ppm	100 ppm	10 ppm
1- 30	100	23.33	3.33
31-157	100	100	16.66
158-166	0	0	0
167-179	100	33.33	6.66
180-214	100	100	66.66
215-242	100	40	3.33
243-311	0	0	0
312-360	0	0	0

*Expresada en % de mortalidad de los crustáceos.

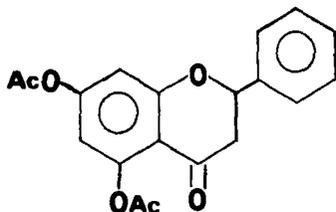
La mayoría de las fracciones de la Tabla 41 resultaron activas. De la fracción 31-157 cristalizaron cantidades adicionales de pinocembrina. Por otra parte, la recromatografía de las fracciones 167-242 (Tabla 41), permitió el aislamiento de una mayor cantidad del compuesto bioactivo. El rendimiento total de la pinocembrina 19 fue de 1.04 g. El compuesto se identificó por comparación de las constantes físicas y espectroscópicas de su derivado acetilado con las de una muestra auténtica previamente obtenida en nuestro laboratorio. En las Tablas 42 y 43 se resumen las constantes físi-

Tabla 42. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7-dihidroxi-flavanona (Pinocembrina), 19.

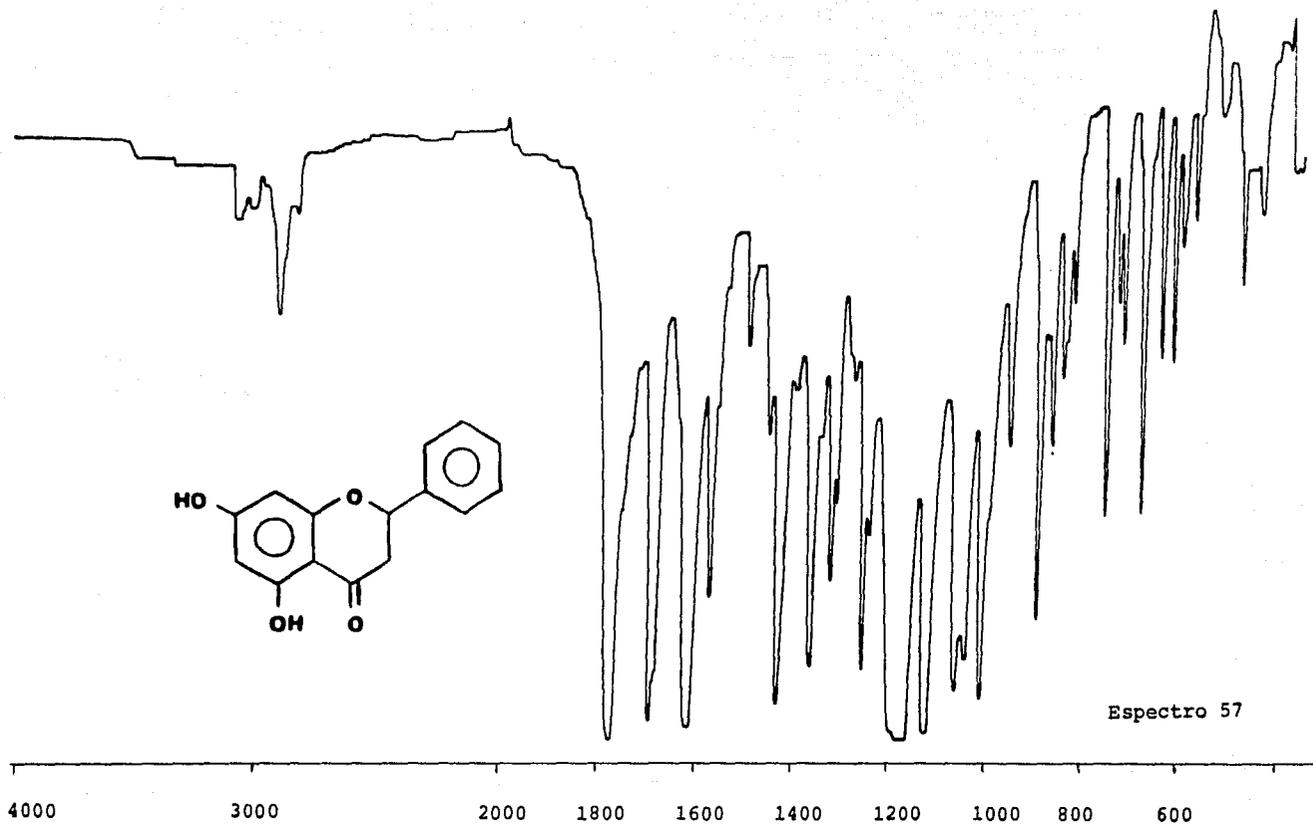


F.M.:	$C_{15}H_{12}O_4$	
P.M.:	256 g/mol	
P.F.:	195-197°C	
IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1}	1770, 1690, 1620, 1570, 1435, 1360, 1320, 1260, 1180, 1130, 1070, 1020, 900, 770, 690	Espectro 58
RMN ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆ , δ):	2.78 (dd, 1H, J=17,5 Hz, H-3), 3.26 (dd, 1H, J=11,17 Hz, H-3), 5.59 (dd, 1H, J=11,5 Hz, H-2), 5.9 (d, 1H, 3 Hz, H-6), 5.94 (d, 1H, 3 Hz, H-8), 7.34- 7.62 (m, 5H, H-2'-H-5'), 10.9 (s, 1H, OH-5, H ₂ O)	Espectro 59
RMN ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆ , δ):	42.10 (t, C-3), 78,39 (d, C-2), 95.04 (d, C-6), 95.92 (d, C-8), 101.8 (s, C-10), 126.63 (d, C-2' y C-6'), 128.56 (d, C-3', C-4', C-5'), 138.69 (s, C-1'), 162.72 (s, C-9), 163.49 (s, C-5), 166.71 (s, C-7), 195.99 (s, C-4)	Espectro 60

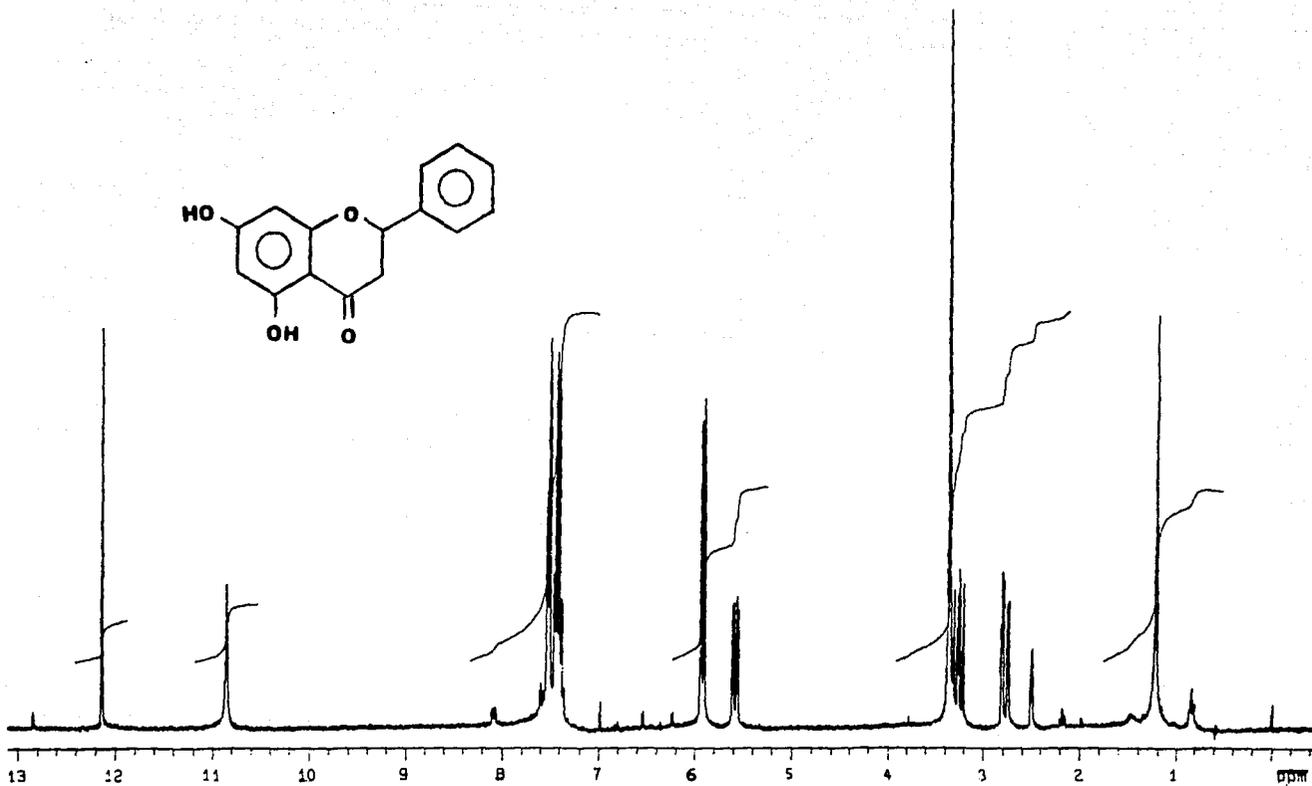
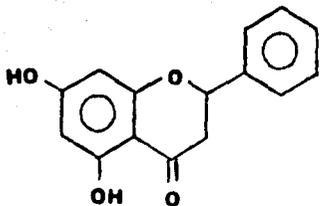
Tabla 43. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,7-diacetoxi-flavona, 19A.



F.M.:	$C_{19}H_{16}O_6$	
P.M.:	340 g/mol	
P.F.:	102-104°C	
IR $\nu_{\max}^{KBr} \text{ cm}^{-1}$:	1795, 1710, 1630, 1595, 1450, 1200, 1140, 1040	Espectro 61
RMN ¹ H (80 MHz, $CDCl_3$, δ):	2.25 (s, 3H, AcO-), 2.27 (s, 3H, AcO-) 2.75 (dd, 1H, $J=17,5$ Hz, H-3'), 3.1 (dd, 1H, $J=17,11$ Hz, H-3), 5.47 (dd, 1H, $J=17,5$ Hz, H-2), 6.51 (d, 1H, $J=3$ Hz, H-8), 6.77 (d, 1H, $J=3$ Hz, H-6), 7.4 (s, 5H, H-2-H-6)	Espectro 62

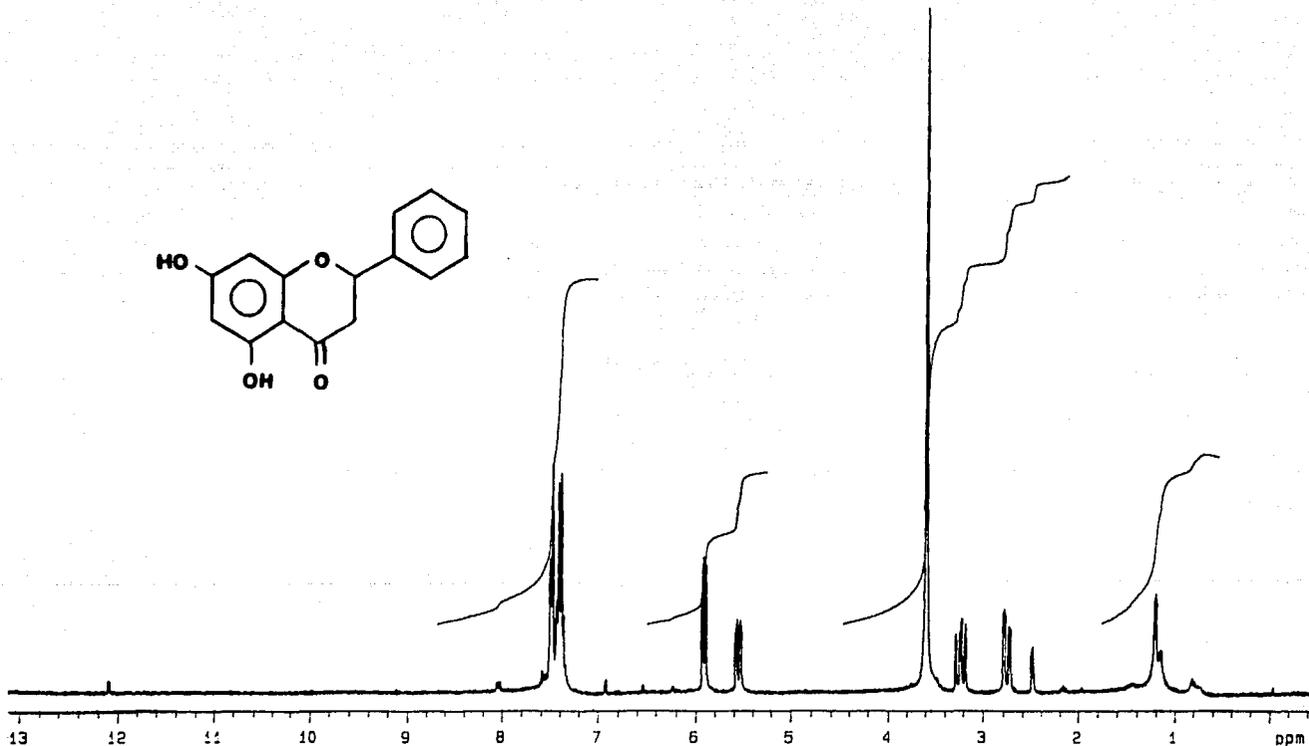
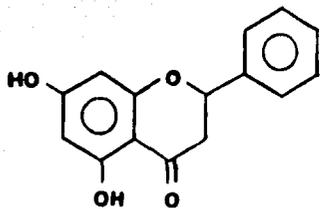


Espectro 57



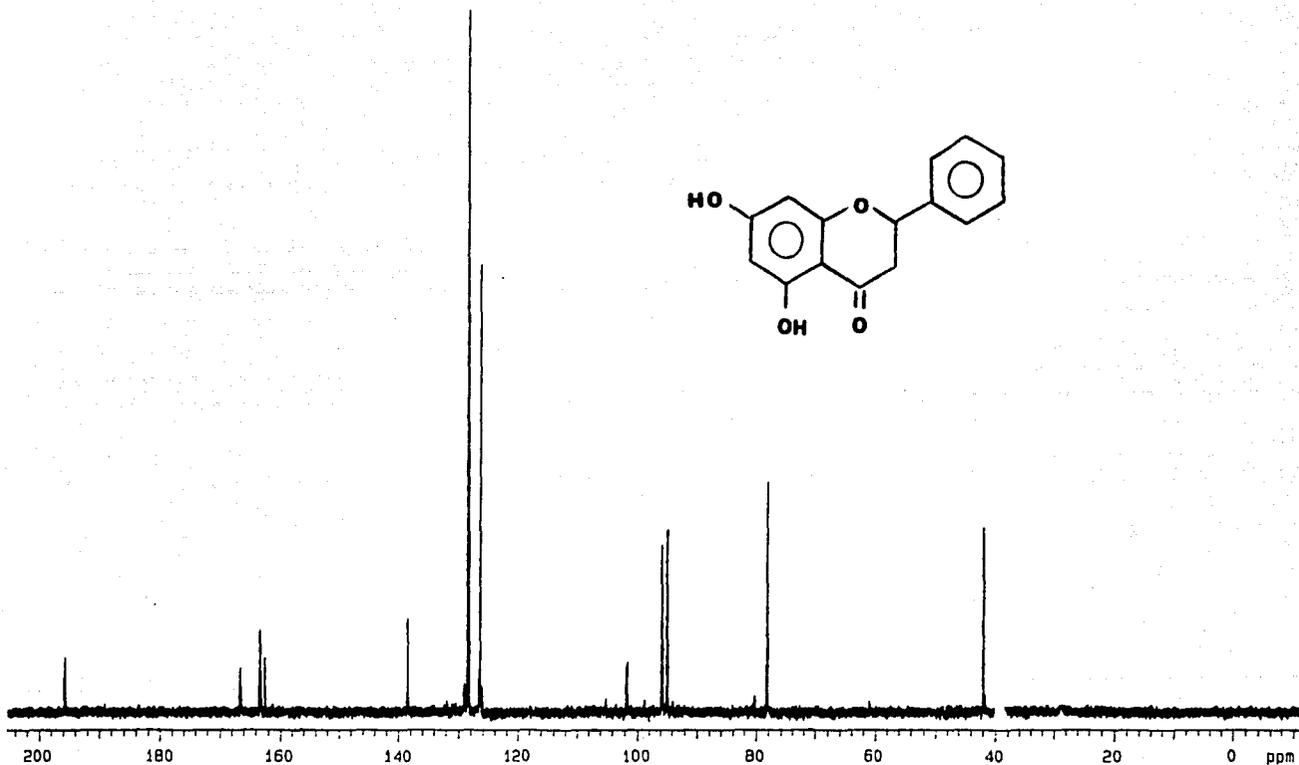
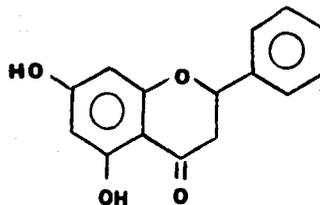
Espectro 58

173.



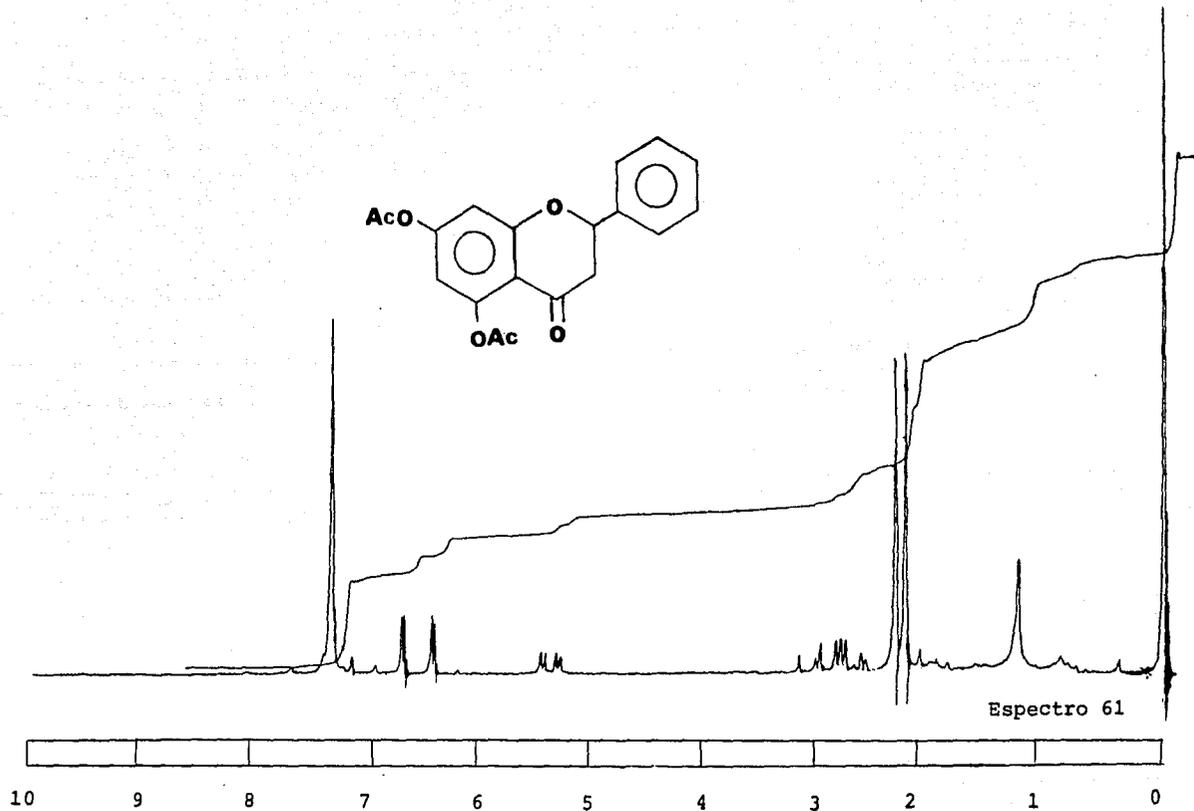
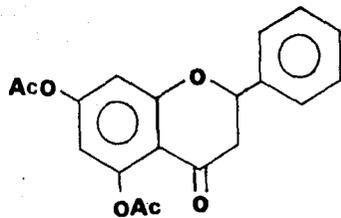
Espectro 58+d₂O

174



Espectro 59

175



cas y espectroscópicas de la pinocembrina y de su derivado acetilado respectivamente.

De las fracciones 69-159 (Tabla 40), también activas se aisló una mezcla de dos ácidos grasos insaturados (Mezcla I), los cuales están en proceso de identificación.

4.2 Determinación de la actividad ovicida, larvicida y fasciolicida in vitro de la pinocembrina

La alta toxicidad de la pinocembrina ($LC_{50} = 8.2$ ppm) para el crustáceo Artemia salina Leach, así como el uso popular de la planta objeto de este estudio, planteo la necesidad de evaluar al compuesto como un posible agente anti-helmíntico. Para lograr este objetivo y dadas las condiciones, se realizaron los bioensayos sobre huevos con larva dos de A. galli y metacercarias recién desenquistadas de F. hepática.

4.2.1 Actividad ovicida de la pinocembrina.

En el caso de la evaluación del efecto ovicida de la pinocembrina, el método utilizado se basó en determinar la toxicidad de la sustancia para la larva 2 de A. galli. Los resultados de este ensayo así como el porcentaje de eficacia de la pinocembrina a las diferentes concentraciones utilizadas se resumen en la Tabla 44.

Tabla 44. Eficacia de la pinocembrina contra larva 2 de A. galli.

GRUPO*/TRATAMIENTO	huevos con larva 2 vivas por vial				No. total de huevos con larva 2 vivas por grupo	\bar{X} de huevos*** con larva 2 vivas por grupo	Eficacia** % mortalidad de huevos con larva 2
	1	2	3	4			
I 1000 ppm	10	7	10	10	37	9.25 \pm 0.750	63
II 100 ppm	22	21	22	23	88	22 \pm 0.408	12
III 10 ppm	25	25	25	25	100	25 \pm 0	0
IV Testigo (sin tratamiento)	25	25	25	25	100	25 \pm 0	0

*Cada grupo comprendía 4 viales conteniendo cada uno 25 huevos infectantes.

**Con respecto al grupo testigo.

***Media \pm error estándar ($p < 0.05$)

Grupo	Mínimo	Máximo
1	7	10
2	21	23
3	25	25
4	25	25

Tabla 45. Análisis de varianza del efecto ovicida de la pinocebrina.

Hipotesis: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$ $H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$

Fuente de variación	g.l.	s.c.	c.m.	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{teórica}}$
Tratamientos	3	676.68	225.56	$F_{\text{cal}} = 309.34$	$F_{\text{teo}} = 0.95, 3, 12 = 3.49$
Error	12	8.75	0.7292		
Total	15	685.44	—		

Como $F_{\text{cal}} > F_{\text{teo}}$, se acepta H_a y se rechaza H_0

Prueba de Tukey:

	\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	\bar{X}_4
\bar{X}_1	-	12.75*	15.75*	15.75*
\bar{X}_2	-	-	3.0*	3.0*
\bar{X}_3	-	-	-	0
\bar{X}_4	-	-	-	-

*Pares de grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Como se puede apreciar en la Tabla 41 la mayor eficacia (63%) se obtuvo en el caso del grupo I. En relación al grupo II la eficacia fue del 12% y los grupos III y IV (testigo) la eficacia fue nula ya que todas las larvas permanecieron vivas.

El análisis de varianza y la prueba de Tukey indicaron que hubo un efecto de tratamiento significativo ($p < 0.05$), manifestándose esta significancia entre los tres grupos tratados, tal como se señala en la Tabla 45.

Los resultados obtenidos pueden ser considerados bastante satisfactorios ya que fueron obtenidos a las 24 horas del tratamiento que por analogía con el Albendazol, Tiabendazol, Ivermectina y Netobimin (Información de Laboratorios) es muy posible que a mayor tiempo de exposición los resultados sean mejores y sea mucho mayor sobre las larvas jóvenes y parásitos adultos que carecen de la protección del huevo. (Lapage, 1971; Tongson, 1966; Reid, 1960; inter alia).

4.2.2 Actividad fasciolicida de la pinocembrina.

En relación a la actividad fasciolicida de la pinocembrina, el método utilizado se baso en observar (bajo microscopio invertido) el grado de inhibición de la movilidad y viabilidad de los parasitos de los lotes tratados con relación a los lotes testigo.

Los resultados obtenidos en este ensayo se resumen en la Tabla 46.

Tabla 46. Actividad fasciolicida de la pinocembrina expresada en % de mortalidad.

Concentración	% de mortalidad		
	blanco	Diamfenetida acetilada	Pinocembrina
50 ppm	0	100	100
9 ppm	0	100	100

Como se puede observar, la actividad fasciolicida de la pinocembrina fue idéntica a la de la diamfenetida acetilada, ya que a 50 ppm (a las 72 horas) el parásito estaba desintegrado mientras que a 9 ppm sólo había muerto.

4.2.3 Actividad larvicida de la pinocembrina.

Finalmente con respecto a la determinación de la actividad larvicida de la pinocembrina sobre S. calcitrans,

el método utilizado se basó en el porcentaje de mortalidad observado para las larvas tratadas con respecto al grupo testigo. Los resultados obtenidos de esta prueba se resumen en la Tabla 47.

Como se puede apreciar, el grupo tratado con 1000 ppm no presentó ninguna larva viva a las 24 horas, dando una eficacia de 100%, mientras que los grupos II y III presentaron un porcentaje de eficacia de 54 y 20% respectivamente.

El análisis de varianza y el contraste de medias de Tukey (ver Tabla 48) indicaron que había diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las medias de mortalidad de los tres tratamientos. Es decir, los resultados del % de mortalidad obtenidos de este ensayo, fueron directamente proporcionales a las concentraciones utilizadas de pinocebrina (a mayor concentración mayor efecto larvicida).

Considerando el alto porcentaje de mortalidad obtenido a 1000 ppm de la larva 3 de S. calcitrans y los daños que produce este insecto en forma adulta al ganado en general y al hombre, se consideraría pertinente para estudios futuros, la evaluación de la pinocebrina in vivo como un posible agente insecticida.

Tabla 47. Eficacia de la pinocembrina sobre larva tres de S. calcitrans.

GRUPO*/TRATAMIENTO	Larvas vivas en cada una de las cajas de Petri					No. total de larvas vivas por grupo	\bar{X} de larvas*** vivas por grupo	Eficacia** % de mortalidad de larvas por tratamiento
	1	2	3	4	5			
I 1000 ppm	0	0	0	0	0	0	0 ± 0.0	100
II 500 ppm	5	6	3	5	4	23	4.6 ± 0.509	54
III 250 ppm	9	9	6	8	8	40	8 ± 0.547	20
IV Testigo (sin tratamiento)	10	10	10	10	10	50	10 ± 0.0	0

*Cada grupo estaba integrado por 5 cajas conteniendo cada una 10 larvas

**Con respecto al grupo testigo.

***Media \pm error estándar ($p < 0.05$).

Grupo	Mínimo	Máximo
1	0	0
2	3	6
3	6	9
4	10	10

Tabla 48. Análisis de varianza del efecto larvicida de la pinocebrina.

Hipótesis: $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$ $H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$

Fuente de variación	g.l.	s.c.	c.m.	$F_{\text{calculada}}$	$F_{\text{teórica}}$
Tratamientos	3	287.35	95.78	$F_{\text{cal}} = 136.83$	$F_{\text{teo}} = 0.95, 3.16 = 3.24$
Error	16	11.20	0.70		
Total "	19	298.55	-		

Como $F_{\text{cal}} > F_{\text{teo}}$, se acepta H_a y se rechaza H_0

Prueba de Tukey

	\bar{X}_1	\bar{X}_2	\bar{X}_3	\bar{X}_4
\bar{X}_1	-	4.6*	8.0*	10.0*
\bar{X}_2	-	-	3.4*	6.0*
\bar{X}_3	-	-	-	2.0*
\bar{X}_4	-	-	-	-

*Pares de grupos estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

5.0 RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se derivan del presente capítulo son las siguientes:

1. El estudio fitoquímico biodirigido de T. graveolens, mediante la determinación de la toxicidad para A. salina, condujo al aislamiento de la flavanona pinocembrina ($LC_{50} = 8.2$ ppm) como único componente bioactivo.

2. La pinocembrina se evaluó como agente ovicida, larvícida y fasciolícida. El efecto ovicida se determinó sobre huevos con larva 2 de Ascaridia galli encontrándose una eficacia del 63% a 1000 ppm. El efecto larvícida se evaluó sobre larvas de S. calcitrans encontrándose una eficacia del 100% a 1000 ppm. Finalmente la actividad fasciolícida se realizó sobre metacercarias recién desenguistadas de Fasciola hepática a concentraciones de 9 y 50 ppm. La eficacia de la pinocembrina como agente fasciolícida fué del 100%, comparable al del patrón diamfenetida acetilada.

3. Este estudio constituye el primer reporte de la evaluación de la pinocembrina como agente ovicida, larvícida y fasciolícida

6.0 RECOMENDACIONES

1. Valorar la eficacia de la pinocembrina contra las moscas adultas de S. calcitrans.
2. Determinar la eficacia de la pinocembrina sobre larvas jóvenes y el parásito adulto de A. galli y de otros tipos de helmintos.
3. Determinar la toxicidad de la pinocembrina contra el animal vertebrado.
4. Buscar la dosis letal mínima de la sustancia activa.
5. Valorar la estabilidad del compuesto ensayado.

APENDICE 1

CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE PEROXIDOS TOTALES DE SOLUCIONES
HIDROALCOHOLICAS DE TRES TIPOS DE EPAZOTE.

A partir de tinturas vegetales* ó de material fresco se pueden obtener soluciones hidroalcohólicas denominadas "Microdosis" que contienen aproximadamente una cantidad equivalente a la milésima parte de la dosis de los principios activos usualmente utilizados. Estas soluciones se preparan disolviendo de una a diez gotas de tintura en 10 ml de vehículo (una parte de alcohol de caña de 96° y dos partes de agua hervida). Alternativamente las Microdosis se preparan mediante una maceración de la siguiente manera: el material fresco y cortado se coloca en un frasco oscuro de boca ancha, provisto de una tapa a continuación se agrega alcohol de caña (entre la mitad y dos terceras partes) y agua potable hasta llenar el frasco. El proceso de maceración se realiza por un mes en un lugar fresco y seco, agitando el frasco esporádicamente. Finalizado el tiempo de maceración se separa el extracto obtenido y se coloca en otro frasco oscuro, debidamente etiquetado, en un lugar fresco y seco (Martínez y Martínez, 1985).

*Según la USP XX las tinturas se definen como soluciones alcohólicas ó hidroalcohólicas preparadas a partir de materiales vegetales ó de sustancias químicas. Las soluciones hidroalcohólicas que se obtienen se diluyen finalmente hasta que 100 ml de tintura equivalen a 10 g de los principios activos de la droga.

Independientemente de la forma de preparación de la microdosis, la solución resultante se suministra a los pacientes mediante un gotero sobre la lengua o sobre la mucosa bucal. El número de gotas que se administra oscila generalmente entre uno y cuatro, de una a varias veces en 24 horas, dependiendo de la enfermedad, peso, recuperación del paciente, etc.

Según Martínez la efectividad de este tratamiento se basa en lo siguiente... "existe un mecanismo neurohormonal a partir de las papilas gustativas como sitio de acción y que desencadena la producción de respuestas corporales en los sitios de desequilibrio (enfermedad) por intermedio del hipotálamo y otras formaciones cerebro glandulares" (Martínez y Martínez, 1985).

Actualmente en muchas regiones del país se tratan numerosas enfermedades mediante el sistema de microdosis (Martínez y Martínez, 1985). Concretamente en algunas medicaturas de Oaxaca, sanitaristas del Instituto Nacional de Nutrición tratan exitosamente las parasitosis producidas por diversos nemátodos (principalmente por Ascaris lumbricoides) con microdosis de soluciones hidroalcohólicas de dos variedades de Chenopodium ambrosoides (Isunza, et al, 1988). La solución utilizada por el grupo de Isunza se prepara a partir del material vegetal fresco (aproximadamente 280 g de material vegetal en frascos de 1000 ml).

Para el tratamiento a los pacientes se les suministra durante cinco días consecutivos tres gotas de la solución, tres veces al día (Isunza, et al, 1988).

Como es bien sabido el aceite esencial de estas dos variedades de C. ambrosoides es rico en Ascaridol (64.1%) el cual es un agente teratogénico.

Considerando lo anterior y a petición del Dr. S. Isunza del Instituto Nacional de Nutrición se decidió realizar la determinación cuantitativa de peróxidos (en base al ascaridol) de estas soluciones hidroalcohólicas a fin de implementarlas de manera oficial. Es de hacer notar que también se valoró la cantidad de peróxidos presentes en una solución hidroalcohólica de T. graveolens y del aceite esencial de Chenopodium, con fines comparativos.

Para la determinación de los peróxidos se utilizó el método yodométrico que se encuentra descrito en la Farmacopea Mexicana, y los resultados de las valoraciones se presentan en la Tabla A-I.

Tabla A-I. Resultados de las valoraciones yodométricas de las soluciones hidroalcohólicas de varias especies de Epazote.

Material objeto de la valoración	% de peróxidos en base al ascaridol
C. ambrosoides verde	0.035
C. ambrosoides morado	0.0276
T. graveolens	0.0276
Aceite esencial	64.1

Los resultados anteriores muestran que los valores encontrados son considerablemente más bajos que el contenido en el aceite esencial que fué de 64.1%.

Considerando que los valores son muy bajos y que las dosis son muy pequeñas y no continuas el riesgo de toxicidad es mucho menor que con el uso del aceite esencial. Aunque en las medicaturas de Oaxaca no se usa el T. graveolens se encontró que esta planta tiene la misma cantidad de peróxidos que el C. ambrosoides morado.

APENDICE 2.

Tabla A-II. Veinte principales padecimientos notificados de enfermedades transmisibles y orden de importancia según Institución.

Padecimientos	1983				1984	
	SSA		IMSS		SSA	
	Orden de importancia	Número	Orden de importancia	Número	Orden de importancia	Número
Todas las causas		10429350		15595684		12190177
Infecciones respiratorias agudas	1	5799483	1	6223530	1	7158759
Enteritis y otras enfermedades diarreicas	2	2348753	2	2865072	2	2412304
Otras parasitosis intestinales	3	892694	-	-	3	1004906
Amibiasis	4	784876	4	1019436	4	851485
Influenza	5	203771	6	311013	5	191471
Paludismo	6	75029	-	-	6	85501
Varicela	7	57777	9	71243	8	56485
Neumonía	8	51327	10	56760	7	59182
Fiebre Urtiana	9	42851	-	-	9	52690
Fiebre paratifóidea y otras salmonelosis	10	33564	8	107923	10	31089
Dengue	11	23510	16	20686	11	27331
Blenorragia	12	18034	-	-	12	19302
Rubeola	13	15287	17	18003	15	11999
Tuberculosis	14	11506	-	-	-	-
Hepatitis vírica	15	11018	20	14607	13	14134
Fiebre tifoidea	16	7992	-	-	17	7629
Escarbiasis	17	5867	12	53900	16	10048
Angina estreptocócica y escarlatina	18	5756	15	21841	18	7163
Sífilis todas formas	19	5176	-	-	19	6396
Conjuntivitis hemorrágica	20	4823	-	-	-	-
Amigalitis aguda	-	-	3	2586522	-	-
Ascariasis	-	-	5	450433	-	-
Oxiuriasis	-	-	7	164615	-	-
Giardiasis	-	-	11	54844	-	-
Parotiditis	-	-	13	51278	-	-
Intoxicación alimentaria (bacteriana)	-	-	14	48863	20	6298
Infecciones Gomocólicas	-	-	18	16156	-	-
Erisepela	-	-	19	14757	-	-
Tuberculosis	-	-	-	-	14	12609
Las demás causas	-	30256	-	1424202	-	-

NOTA: El IMSS, sólo presenta los datos para las 20 principales causas, por lo que no se pudo obtener el total del grupo.
 FUENTE: SSA, Dirección General de Estadística e Informática, con base en datos de la Dirección General de Epidemiología.
 IMSS, Jefatura de Servicios de Medicina Preventiva, Boletín Epidemiológico Anual, 1983, México, 1983.

Tabla III Morbilidad Hospitalaria por Diagnóstico Principal de Egresos, Sexo y Días-Estancia para algunas Instituciones del Sector Salud. 1984.

Diagnóstico ¹	Departamento del Distrito Federal				Petróleos Mexicanos				Secretaría de la Defensa Nacional			
	Total	Hombres	Mujeres	Días-Estancia	Total	Hombres	Mujeres	Días-Estancia	Total	Hombres	Mujeres	Días-Estancia
Todas las causas	55 780	24 241	31 539	278 324	56 589	19 957	36 632	288 946	53 275	23 579	29 696	376 760
Fiebre Tifoidea y Paratífoides	303	177	126	2 242	-	-	-	-	635	332	303	3 245
Amibiasis	1 387	817	570	8 665	-	-	-	-	002.1-002.9	312	242	4 105
Enfermedades Infecciosas Intestinales	-	-	-	-	1 681	924	757	7 496	3 131	1 666	1 465	18 322
Tuberculosis	139	83	56	816	251	105	146	3 208	404	276	128	3 483
Difteria	4	3	1	11	-	-	-	-	200	140	60	1 968
Tosferina	126	56	70	953	-	-	-	-	6	2	4	33
Infecciones Meningocócicas	-	-	-	-	47	18	29	190	68	43	25	476
Sarampión	92	54	38	702	182	65	117	890	71	43	28	590
Paludismo	1	1	-	4	63	41	22	266	40	34	6	264
Enfermedades Venéreas	3	3	-	26	414	238	176	1 910	79	64	15	519
Todas las Demás Enfermedades Infecciosas y Parasitarias	1 514	801	713	9 243	-	-	-	-	2 847	1 534	1 313	15 256
Tumor Maligno del Estómago	-	-	-	-	18	11	7	219	54	29	25	315
Tumor Maligno del Cólon	-	-	-	-	12	6	6	207	10	1	9	56
Tumor Maligno del Recto, de la Porción Rectosigmoidea, del Ano	-	-	-	-	7	3	4	76	6	1	5	27
Tumor Maligno de la Tráquea, de los Bronquios y del Pulmón	-	-	-	-	52	40	12	423	102	67	35	690
Tumor Maligno de la Mama de la Mujer	-	-	-	-	50	-	-	305	95	-	95	762
Tumor Maligno del Cuello del Utero	-	-	-	-	-	-	-	-	202	-	202	1 639
Leucemia	-	-	-	-	48	22	26	914	28	12	16	285
Otros Tumores Malignos	197	122	75	2 156	75	20	55	560	99	58	41	666
Tumor Benigno del Utero	-	-	-	-	359	-	359	1 990	212	-	212	1 417
Otros Tumores Benignos y los de naturaleza no especificada	354	176	178	1 972	-	-	-	-	130	48	82	792
Enfermedades de las Glándulas Tiroideas	6	1	5	36	92	4	88	290	81	35	46	438
Distonias Músculos	178	95	83	1 533	1 067	414	653	9 086	1 100	517	583	8 494
Deficiencias Nutricionales	815	448	367	7 013	84	38	46	887	1 129	637	492	7 839
Otras Enfermedades de las Glándulas Endocrinas de la Nutrición del Metabolismo y Trastornos de la Inmunidad	106	53	53	1 122	-	-	-	-	573	313	260	3 832
Enfermedades de la Sangre y de los Organos Hematopoyéticos	-	-	-	-	-	-	-	-	135	61	74	585
Trastornos Mentales	382	287	95	4 767	398	201	197	1 654	548	372	176	4 648
Esclerosis en Placas	-	-	-	-	13	4	9	80	62	30	32	375
Otras Enfermedades del Sistema Nervioso	725	435	290	3 963	-	-	-	-	1 305	727	578	12 056
Enfermedades del Ojo y sus Anexos	159	87	72	562	843	452	391	3 350	1 273	686	587	6 721
Enfermedades del Oído y de la Apófisis Mastoidea	69	41	28	373	274	130	144	1 087	799	427	372	6 713

¹ La lista presentada corresponde a la morbilidad captada por el formato estadístico PEC-6-20 Asistencia y Servicios Médicos, con base a la 9a. Revisión de Enfermedades (CIE), OMS.

Tabla IV. Cinco principales Padecimientos Notificados de Enfermedades Transmisibles y Orden de Importancia por Entidad Federativa, Reportados por la Secretaría de Salud. 1984.

Padecimiento	Orden de Importancia	Número
TOTAL		12 190 177
Todas las Causas		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	7 158 759
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	2 412 304
Otras Parasitosis Intestinales	3	1 004 906
Amibiasis	4	851 485
Influenza	5	191 471
Campeche¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	131 820
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	77 888
Paludismo	3	25 525
Parasitosis Intestinal	4	9 660
Amibiasis	5	8 939
Chiapas¹		
Paludismo	1	60 999
Infecciones Respiratorias Agudas	2	21 077
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	3	13 054
Parasitosis Intestinal	4	8 581
Amibiasis	5	7 207
Guerrero¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	5 541
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	316 739
Parasitosis Intestinal	3	163 964
Amibiasis	4	61 073
Paludismo	5	43 415
Oaxaca¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	26 317
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	462 928
Amibiasis	3	206 562
Parasitosis Intestinal	4	100 739
Paludismo	5	69 256
Quintana Roo¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	39 639
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	17 375
Parasitosis Intestinal	3	51 254
Paludismo	4	15 871
Amibiasis	5	12 359
Sinaloa¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	5 695
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	2	4 393
Parasitosis Intestinal	3	227 901
Amibiasis	4	119 494
Paludismo	5	39 610
Tabasco¹		
Infecciones Respiratorias Agudas	1	26 094
Parasitosis Intestinal	2	19 060
Enteritis y Otras Enfermedades Diarreicas	3	9 116
Amibiasis	4	157 005
Paludismo	5	61 005

¹Todas las causas.

FUENTE: SSA, Dirección General de Epidemiología, Dirección de Vigilancia Epidemiológica, Informe Semanal de Enfermedades Transmisibles EPI-1-79.

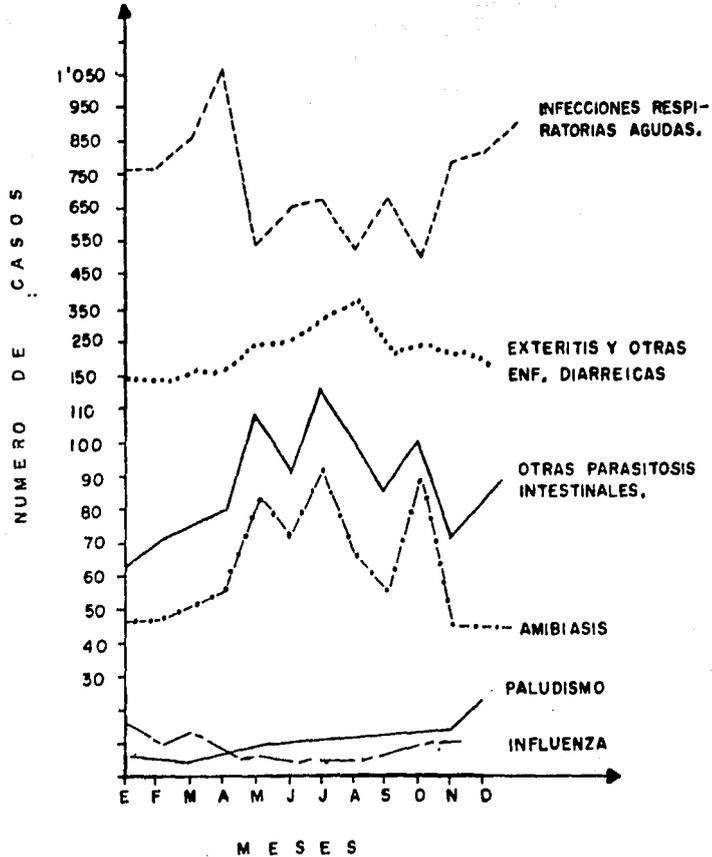


Figura A-1 Casos nuevos de enfermedades (6 principales por frecuencia) según mes Estados Unidos Mexicanos 1985.

BIBLIOGRAFIA

- Abreo, M.J. y Sneden, A.T.; J. Nat. Prod., 52, 822 (1989).
- Aiello, A.; Journal of the Arnold Arboretum, 60, 39 (1979).
- Albor, C.; Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. México (1989).
- Amo, R.S.; Plantas medicinales del estado de Veracruz, INIREB. Jalapa, Ver., México (1979).
- Anderson, J.E.; Chang, C.J.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod. 51, 307 (1988).
- Aquino, R.; D'Agostino, M.; Simone, F.; Pizza, C.; Phytochemistry, 27, 1827 (1988).
- Audier, H.E. y Das, B.C.; Tetrahedron Letters, 20, 2205 (1966).
- Bastien, M.; "Recherches sur les Copalchis, Drogues Hypoglycémiantes et en Particular sur la Coutarea latiflora D.C. (Rubiaceae)", Dissertation, Paris, (1961).
- Bauer, R.; Berganza, L.H.; Seligmann, O.; Wagner, H.; Phytochemistry, 24, 1587 (1985).
- Bergen, H.; Santen, H.L.; Magazin der ausländischen Literatur der gesammelten Heilkunde, un Arbeiten des Aerztlichen Vereins zu Hamburg, 14 360 (1927).
- Black, N.M. y Floyd, G.; The Vet. Record, 90, 71 (1972).

- Bittner, M.; Poyser, K.A.; Poyser, J.P.; Silvia, M.;
Weldt, E. y Sammes, P.G., Phytochemistry, 12, 1427
(1973).
- Bohmont, C.; Aaronson, L.M.; Mann, K.; Pardini, R.S.;
J. Nat. Prod., 50, 427 (1987).
- Bompard, P.; Los grandes remedios vegetales. Ed. Divulga-
ción. México, p. 135 (1949).
- Bove, W. El mérido del hogar, tratado popular de plan-
tas medicinales. Ed. Mexicana, México (1977).
- Brandes, R.; Archiv des Apothekervereins im nördlichen
Teutschland, 17, 197 (1926).
- Brandes, R.; Archiv des Apothekervereins im nördlichen
Teutschland, 19, 80 (1926).
- Bull, J.R.; Chalmers, A.A.; Coleman, P.C.; S. Afr. J.
Chem., 32, 27 (1979).
- Bye, R.A.; Economic Botany, 40, 103 (1986).
- Calzada, B.F.; Tesis Profesional, Facultad de Química,
UNAM, México (1987).
- Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados
Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos
Mexicanos. 5a. Edición. Secretaría de Salud, México
(1988).
- Cancer Treatment Rep., 60, 973 (1976).

- Castañeda, P.; Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM, México (1988).
- Cawdery, M.J.H.; Br. Vet. J., 132, 568 (1976).
- Cawdery, J.J.H.; Strickland, K.L.; Conway, A.; Crow, P.S.; Br. Vet. J., 133, (1977).
- Chávez, A.M.T.; Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México (1976).
- Chilton, M.D.: Scientific American, 248, 51 (1983).
- Chilton, M.D.; Saiki, R.K.; Yadav, N.; Gordon, M.P.; Quetier, F.; Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4060 (1980).
- Ciprian, C.N.; Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México (1977).
- Daniel, W.W.; Bioestadística. Base para el análisis de ciencias de la salud. Ed. Limusa, México (1980).
- Díaz, J.L., Usos de las plantas medicinales de México, Monografías Científicas II. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, México (1976).
- Dixon, K.E.; Parasitology, 56, 431 (1966).
- Donnelly, B.J.; Donnelly, D.M.X.; O'Sullivan, A.M.; Tetrahedron, 24, 2617 (1968).
- Donnelly, D.M.X.; Thompson, J.C.; Whalley, W.B.; Ahmad, S.; J.C.S. Perkin I, 1737 (1973).

- Douros, J. y Suffness, M.; Cancer Chemother. Pharmacol., 1, 91 (1978).
- El Hadi, M.A.; Ahmed, K.B.; Yahia, M.E.K.; Planta Médica, 1, 74 (1984).
- Farkas, L.; J. of Ethnopharmacology, 2, 145 (1980).
- Farnsworth, N.S.; J. of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980).
- Fairbairn, J.W.; J. of Ethnopharmacology, 2, 99 (1980).
- Farnsworth, N.W. Y Bingel, A.S. En Wagner, H. y Wolff, P. Ed. "New Natural Product and Plants drugs with pharmacological, biological on the therapeutical activity". Springer-Verlang, Berlin Hidenberg, New York, p. 1-23 (1977).
- Ferrigni, N.R.; McLaughlin, J.L.; Powell, R.G.; Smith, C.R.; J. Nat. Prod., 47, 347 (1984).
- Ferrigni, N.R.; Putnam; J.E.; Anderson, B.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; Moore, D.S.; McLaughlin, J.L.; Powell, R.G.; Smith, C.R.; J. Nat. Prod., 45, 679 (1982).
- Font Quer, P.; Plantas medicinales. Ed. Labor, Barcelona, p. 1033 (1980).
- Galeffi, C.; J. Ethnopharmacology, 2, 129 (1980).
- Gallardo, V.M.C.; Tesis Profesional, ENEP-Iztacala, UNAM, México (1983).

- Galsky, A.G.; Wilsey, J.P.; Powell, R.G.; Plant Physiol., 65, 184 (1980).
- García, M.R.; Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México (1987).
- Geran, R.I.; Greenberg, N.H.; Mac Donald, N.N.; Schumacher, A.A.; Abbott, B.J.; Cancer Chemother. Rep., 3, 1 (1972).
- Gill, M.T.; Bajaj, R.; Chang, C.J.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 50, 36 (1987).
- Gómez, T.; Agudelo, R.; Pérez, R.R.; Bravo, Z.F.; Rev. Lat. Microbiol., 20, 121 (1978).
- Hadar, I. y Kimberlee, R.S.; J. Parasitol., 64, 1134 (1978).
- Harborne, J.B.; Mabry, J.T. The Flavonoids, Chapman and Hall, London, N.Y. (1975).
- Harborne, J.B.; Mabry, J.T. The Flavonoids Advances in Research, Chapman and Hall. London, N.Y. (1982).
- Hui, Y.H.; Chang, C.J.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 49, 1175 (1986).
- Hui, Y.H.; Chang, C.J.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 51, 307 (1988).
- Hui, Y.H.; Rupprecht, J.K.; Liu, Y.M.; Anderson, J.E.; Smith, D.L.; Chang, C.J.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 52, 463 (1989).

- Kahl, G.; Schell, J.S.; Molecular Biology of Plant Tumors, Academic Press, New York (E.E.U.U.) p. 155-544 (1982).
- Kupchan, S.M.; Smith, R.M.; Aynehchi, Y.; Maruyama, M.; J. Org. Chem., 35, 2891 (1970).
- Landeros, V.M.A.; Ibarra, V.F.; Escudero, C.J.L.; Millán, S.F.; Téc. Pec. Méx., 40, 47 (1981).
- Lapage, G.; Parasitología Veterinaria, Ed. Continental, México, 1971.
- Laurie, W.A.; McHale, D.; Sheridan, J.B.: Phytochemistry, 24, 2659 (1985).
- Lavie, D. y Clotter, E., Chem. Org. Nat., 29, 307 (1971).
- Marles, R.J. y Farsworth, N.R.; J. Nat. Prod., 52, 261 (1989).
- Márquez de Cantu, M.J.; Probabilidad y Estadística para ciencias químico biológicas. Ed. UNAM, México (1988).
- Martínez, B.E. y Martínez, O.D.; Microdosis Terapéutica con millonésimas por vía lingual. VAZ Zacatecas, México (1985).
- Martínez, M. Flora del Estado de México. Toluca, Dir. de Agric. y Ganadería. 5V en 1. México (1956).
- Martínez, M. Las Pinaceas del Estado de México. Toluca, México. Dir. de Agric. y Ganadería 5V en 1. México (1953-1958).

- Martínez, M.; Plantas medicinales de México. Ed. Botas, México (1969).
- Martínez, M., Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica (1979).
- Mata, R.; Navarrete, A.; Alvarez, L.; Pereda, M.R.; Romo de Vivar, A.; Phytochemistry, 26, 191 (1987).
- Mata, R.; Albor, C.; Pereda, M.R.: Planta Médica, en prensa (1989).
- Mata, R.; Calzada, F.; García, M.R.; Reguero, T.; J. Nat. Prod., 50, 866 (1987).
- Mata, R.; Calzada, F.; García, M.R.: J. Nat. Prod., 51, 851 (1988).
- Mata, R.; Castañeda, P.; Camacho, M.R.; J. Nat. Prod., 51, 836 (1988).
- Matuda, E.; Las labiadas del Estado de México. Dir. de Agric. y Ganadería, 3V en 1. México (1957-1958).
- Mayer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L.; Planta Médica, 45, 31 (1982).
- Miranda, G.F.; Tesis Profesional, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México (1979).
- Morishita, T.; Tagoimi, T.; Matsuzaka, T. y Taketsugu (ch. i. Kari Kogyo Co. Ltd). Japan 7747, 013 (Cl. AOIN

- 9/08) 29 Nov. 1977 Appl. 73/143, 634, 24 de 1973. (En C.A. 88: 100366j, 1978) (1978).
- N'Dounga, M.; Balansard, G.; Babadjamain, P.T.; Gasquet, M.; Boundon, G.; Plant Med. Phytother., 17, 64 (1984).
 - Okabe, H.; Miyahata, Y.; Yamauchi, T.; Tetrahedron Letters, 23, 77 (1982).
 - Oliver, B. y Zahnd, G.R.; Quart, J. Crude Drug Res., 17, 139 (1979).
 - Paris, M.R. Y Bastien, M.M.; Ann. Pharm. Franc., 17, 205 (1960).
 - Pereira, J.; The Elements of Materia Medica and Therapeutics, 2, 414 (1855).
 - Powell, R.G.; Bajaj, R.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 50, 293 (1987).
 - Powell, R.G.; Smith, C.R.: Recent Advances in Phytochemistry, 14, Plenum Press, N.Y. (E.E.U.U.), p. 23 (1980).
 - Powers, K.G.; Wood, I.B.; Eckert, J.; Gibson, T.; Smith, H.J.; Vet. Parasitol., 10, 248 (1982).
 - Quiroz, R.H.; Castel, B.H.A.; Fernández, de C.L. Revista Vet., UNAM, 5, 31 (1973).
 - Quiroz, R.H. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de animales domésticos. Ed. Limusa, México (1984).
 - Ream, L.W.; Gordon, M.P.: Sciences, 218, 854 (1982).

- Reguero, M.T.; Mata, R.; Bye, R.; Linares, E.; Delgado, G.; J. Nat. Prod., 50, 315 (1987).
- Reher Gesa, Untersuchungen der Rinde von *Coutarea latiflora* D.C. (Rubiaceae) und anderer "Copalchi"-Rinden-Isolierung und charakterisierung neuer Inhaltsstoffe, Tesis Doctoral, Universidad de Hamburgo, (1982).
- Reher, G.; Khraus, J.L.; Sinnwell, V.; Konin, W.A.; Phytochemistry, 22, 1524 (1983).
- Reid, W.M.; Journal of Parasitology, 46, 63 (1960).
- Reyes, S.R.: Tesis Profesional, Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México (1979).
- Romero, R.C.M.; Castillo, R.A.R.; Martínez, M.A.C.; Calderon, F.C.J.; Vet. Mex., 20, 151 (1989).
- Roseby, F.B.: Australian Vet. J., 46, 433 (1970).
- Ross, J.C.: Br. Vet. J., 126, 13 (1970).
- Rzedowski, J.; Vegetación de México. LIMUSA, México pag. 210 (1978).
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G.C. Flora Fanerogámica del Valle de México. CECSA, México. pp. 186-144 (1979).
- Salemink, C.A.; J. of Ethnopharmacology, 2, 135 (1980).
- Sánchez, E.B. e Ibarra, V.F.; Tec. Pec. Mex., 25, 397 (1987).

- Schlechtendal, D.: Linnaea, 5, 84 (1830).
- Sewel, M.M.H.; Hamond, J.A.; Dinning, C.A.; Br. Vet. J., 124, 160 (1968).
- Shriner, R.L.; Fuson, R.C.; Curtin, D. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. LIMUSA, México (1980).
- Smith, M.A. Y Clegg, J.A.; Zeitschrift für Parasitenkunde, 66, 9 (1981).
- Soto, R.B.; Díaz, C.F.; Yáñez, R.O.; Collera, C.O.; García, F.J.; Spectros Int. J., 6, 123 (1988).
- Soulsby, E.J.L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Ed. Interamericana, México (1987).
- Spjut, R.W.: Economic Botany, 39, 266 (1985).
- Stahl, E.: Thin Layer Chromatography. Ed. Bolliger, H.R.; Brenner, M.; Ganshirt, H. Berlin (1969).
- Standley, P.C.: Trees and shrubs of Mexico. Contr. from the U.S. National Herbarium, 23, 610 (1923).
- Stark, J.; Pharm. Journ. and Trans., 9, 463-66 (1949-50).
- Suffness, M. y Douros, J.; Methods in Cancer Research, 16, 73 (1979).
- Susplagas, C.; Balansard, G.; Rossi, J.C.; Gasquet, J.J.M.; Timon-David, P. Herba Hung., 19, 19 (1980).

- Tantishaiyakul, V.; Pummangura, S.; Chaichan-Tipyreth, C.; Ma, W.W.; McLaughlin, J.L.; J. Nat. Prod., 49, 180 (1986).
- Terres, J.; An. Inst. Med. Nac. México, 12, 109 (1913).
- Tongson, M.S. y McCraw, B.M.; Philipp. J. Vet. Med. 5, 1 (1966).
- Vende Velde, V. Lavie, D.; Tetrahedron, 39, 317 (1983).
- Wang, Z.W.; Ma, W.W.; McLaughlin, J.L.; Gupta, M.P.; J. Nat. Prod., 51, 382 (1988).
- Wall, M.E. Y Wani, M.C.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 17, 117 (1977).
- Wang, Z.W.; Ma, W.W.; McLaughlin, J.L.; Gupta; M.P.; J. Nat. Prod., 51, 382 (1988).
- Wescott, R.B.: Rarrell, C.J.; Gallina, A.M.; Foryet, W.T.; Am. J. Vet. Res., 41, 1326 (1980).
- Yamada, Y.; Hagiwara, K.; Iguchi, K.; Susuki, S.; Hsu, H.Y.; Chem. Pharm. Bull., 26, 3107 (1978).
- Zaenen, I.; Van Larekehe, V.; Tenchy, H.; Van Montagu, M.; Schell, J.; J. Bol. Biol., 86, 109 (1974).