

00570

4
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

TESTS CON
FACULTAD DE QUIMICA

REINVESTIGACION QUIMICA Y BIOLOGICA DE LA PLANTA MEDICINAL
RATIBIDA LATIPALIARIS RICHARDS. AISLAMIENTO E IDENTIFICA-
CION DE UN POLIALCHOL DE LAS FRACCIONES DE MAYOR POLA-
RIDAD DE CIGARRILLA MEXICANA (ZUCC ET MARTIUS ex DC)
AIELLO.

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
MARIA ADELINA JIMENEZ ARELLANES

MEXICO, D. F.,

1992.



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.

RESUMEN

El estudio de las fracciones de mayor polaridad de Cigarrilla mexicana Aiello permitió el aislamiento de un nuevo producto natural que fue caracterizado por métodos químicos y espectroscópicos como el 2-O-metil-manitol.

El extracto cloroformo:metanol de las partes aéreas de Ratibida latipaliaris Richards mostró una toxicidad significativa para Artemia salina ($LC_{50} = 366.61 \mu\text{g/ml}$). Así mismo el extracto demostró una notable actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas (Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis), Gram negativas (Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli) y en la levadura Cándida albicans.

Por último dicho extracto presentó una alta citotoxicidad in vitro para los siguientes sistemas de tumores: KB ($ED_{50} = 6.2 \mu\text{g/ml}$), carcinoma de pecho MCF-7 ($ED_{50} = 2.4 \mu\text{g/ml}$), carcinoma de pulmón A-549 ($ED_{50} = 7.7 \mu\text{g/ml}$) y adenocarcinoma de colón HT-29 ($ED_{50} = 4.0 \mu\text{g/ml}$).

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo mediante la determinación de la toxicidad contra Artemia salina permitió el aislamiento y la purificación de 7 compuestos, los cuales fueron caracterizados mediante métodos químicos y espectroscópicos como: la ratibinólida I (36), la ratibinólida II (37), el β -sitosterol (38), la hispidulina (40), el β -D-glucositolsterol (41), la pedalitina (42) y el 2- α - β -D-glucopiranosil- $\Delta^{1(10),4(5)}$ -germacradien-6 α ,7 β ,11 β -ólida (43), constituyendo este último un nuevo producto natural.

De los compuestos aislados la ratibinólida I y la ratibinólida II mostraron alta toxicidad para Artemia salina y para la línea celular P-388 (leucemia linfocítica de muridos) la ratibinólida I presentó un $ED_{50} = 1.2 \mu\text{g/ml}$ y la ratibinólida II presentó un $ED_{50} = 2.4 \mu\text{g/ml}$. Por otra parte las flavonas hispidulina (40) y la pedalitina (41) demostraron moderada actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram positivas.

ABSTRACT

A novel mannitol derivative, 2-O-methyl-D-mannitol was isolated and characterized from the most polar fractions of a methanol extract of Cigarrilla mexicana Aiello.

The aerial parts of Ratibida latipaliaris were extracted with a mixture of CHCl_3 : MeOH (1:1). The resulting extract was toxic to Artemia salina (LC_{50} 366.61 $\mu\text{g/ml}$) and exhibited significant cytotoxicity against KB (ED_{50} = 6.2 $\mu\text{g/ml}$), MCF-7 breast carcinoma (ED_{50} = 2.4 $\mu\text{g/ml}$), A-549 lung carcinoma (ED_{50} = 7.7 $\mu\text{g/ml}$) and HT-29 colon adenocarcinoma (ED_{50} = 4.0 $\mu\text{g/ml}$) human cell culture systems. The active extract was subsequently fractionated by column chromatography on silica gel, using the brine shrimp assay to guide the isolation. Repeated column chromatography of the active fractions led to the isolation of a novel sesquiterpene lactone, 2- α - β -D-glucopyranosyl- $\Delta^1(10),4(5)$ -germacradien-6 α ,7 β ,11 β -olide (43) and four known compounds, ratibinolide I (36), ratibinolide II (37), hispiduline (40) and pedaltine (42). The proposed structure of 43, was based on spectroscopic and chemical evidences. The cytotoxic activity of the sesquiterpene lactone was evaluated in the P-388 murine cell culture system. Compound 43 was inactive (ED_{50} > 20 $\mu\text{g/ml}$) but 36 and 37 exhibited ED_{50} of 2.3 $\mu\text{g/ml}$ and 0.2 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Also the antimicrobial properties of the extract of Ratibida latipaliaris against Candida albicans and Gram positive and Gram negative bacteria was investigated. It was found the extract exhibited a remarkable activity against all the microorganisms tested. Of the isolated compounds the flavones 40 and 42 showed a moderated activity against Gram positive bacteria.

CONTENIDO.

| | |
|--|----|
| Lista de Abreviaturas. | 1 |
| Lista de Cuadros. | 3 |
| Lista de Figuras. | 5 |
| Lista de Espectros. | 7 |
| Introducción. | 9 |
| Capitulo I. Aislamiento e identificación de un polialcohol de las fracciones de mayor polaridad de <u>C. mexicana.</u> | 17 |
| 1.1. Antecedentes. | 17 |
| 1.2. Objetivos. | 19 |
| 1.3. Materiales y Métodos. | 19 |
| 1.3.1. Aislamiento y purificación del compuesto <u>10.</u> | 19 |
| 1.3.2. Preparación del derivado acetilado <u>10a.</u> | 21 |
| 1.3.3. Prueba de Molisch. | 21 |
| 1.3.4. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas. | 21 |
| 1.4. Resultados y discusión. | 22 |
| Conclusiones. | 29 |
| Espectro de RMN ¹³ C del compuesto <u>10.</u> | 30 |
| Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>10.</u> | 31 |
| Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>10a.</u> | 32 |
| Espectro de RMN ¹ H homonuclear del compuesto <u>10.</u> | 33 |
| Capitulo II. Reinvestigación química y biológica de la planta medicinal <u>Ratibida latipaliaris</u> Richards. | 34 |
| 2.1. Antecedentes. | 34 |
| 2.2. Justificación y objetivos. | 37 |
| -objetivos particulares | 47 |
| 2.3. Parte experimental. | 48 |
| 2.3.1. Determinación de la toxicidad para el crustaceo <u>Artemia salina.</u> | 48 |

| | |
|--|----|
| - Preparación de las muestras. | 48 |
| - Incubación de los huevecillos de <u>Artemia salina</u> . | 50 |
| - Bioensayo. | 50 |
| 2.3.2. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana. | 50 |
| - Microorganismos de prueba. | 50 |
| - Preparación de las muestras de prueba y testigos. | 51 |
| - Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba. | 51 |
| - Siembra de los microorganismos. | 51 |
| - Evaluación de la actividad antimicrobiana. | 52 |
| 2.3.3. Material vegetal. | 52 |
| 2.3.4. Extracción y fraccionamiento preliminar. | 53 |
| 2.3.5. Análisis cromatográfico. | 53 |
| 2.3.6. Aislamiento y purificación de los compuestos. | 54 |
| - Obtención de la ratibinólida I (<u>36</u>). | 54 |
| - Obtención de la ratibinólida II (<u>37</u>). | 55 |
| - Obtención del β -sitosterol (<u>38</u>). | 55 |
| - Obtención de la hispidulina(<u>40</u>). | 57 |
| - Obtención del glucósido del β -sitosterol (<u>41</u>), y de la pedalitina (<u>42</u>). | 58 |
| - Obtención 2- α - β -D- glucopiranosil- $\Delta^{1(10)4(5)}$ -germacradien-6 α ,7 β , 11 β , ólida (<u>43</u>). | 58 |
| 2.3.7. Caracterización de los compuestos. | 59 |
| 2.3.7.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas. | 59 |
| 2.3.7.2. Obtención de los derivados acetilados de los compuestos <u>42</u> y <u>43</u> . | 60 |
| 2.3.7.3. Hidrolisis del compuesto <u>43</u> . | 60 |

| | |
|---|-----|
| - Hidrolisis ácida. Obtención del derivado <u>43c</u> . | 60 |
| - Hidrolisis enzimática con celulasa. Obtención del derivado <u>43b</u> . | 61 |
| - Hidrolisis enzimática con β -glucosidasa. | 62 |
| 2.3 7.4. Acetilación del compuesto <u>43b</u> . | 62 |
| 2.4. Resultados y discusión. | 63 |
| 2.4.1. Evaluaciones biológicas preliminares. | 63 |
| 2.4.2. Estudio de las fracciones activas 148-199. | 67 |
| 2.4.2.1. Obtención de la ratibinólida I (36) y ratibinólida II (37). | 67 |
| 2.4.2.2. Obtención del β -sitosterol (38). | 72 |
| 2.4.3. Estudio de las fracciones activas 226-269. | 72 |
| 2.4.3.1. Obtención de la hispidulina (40). | 72 |
| 2.4.4. Estudio de las fracciones activas 273-286. | 73 |
| 2.4.4.1. Obtención del β -D-glucositosterol. | 73 |
| 2.4.4.2. Obtención y caracterización de la pedalitina (42). | 73 |
| 2.4.4.3. Obtención y caracterización de 2- α - β ,D-glucopiranosil- $\Delta^{1(10),4(5)}$ -germacradien-6 α ,7 β ,11 β -ólida (43). | 80 |
| Espectro de U.V. del compuesto <u>42</u> . | 103 |
| Espectro de I.R. del compuesto <u>42</u> . | 104 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>42</u> . | 105 |
| Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>42</u> . | 106 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>42a</u> . | 107 |
| Espectro de masas FAB negativo del compuesto <u>43</u> . | 108 |
| Espectro de masas FAB positivo del compuesto <u>43</u> . | 109 |
| Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>43</u> . | 110 |

| | |
|--|-----|
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43</u> . | 111 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43a</u> . | 112 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43b</u> . | 113 |
| Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>43b</u> . | 114 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43c</u> en Benzeno- d_6 . | 115 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43c</u> en CDCl_3 . | 116 |
| Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>43d</u> . | 117 |
| Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>43d</u> . | 118 |
| Resumen y Conclusiones. | 119 |
| Bibliografía | 121 |

Lista de abreviaturas.

| | | |
|---------------------|---|---|
| CHCl ₃ | : | Cloroformo |
| CDCl ₃ | : | Cloroformo deuterado |
| MeOH | : | Metanol |
| MeOD | : | Metanol deuterado |
| MHz | : | megahertz |
| Hz | : | Hertz |
| dddd | : | doble de doble de doble de dobles |
| ddd | : | doble de doble de dobles |
| da | : | doblete ancho |
| dc | : | doblete cuarteteado |
| s | : | singlete |
| m | : | multiplete |
| c | : | cuarteto |
| s a | : | singlete ancho |
| t | : | triplete |
| d | : | doblete |
| J | : | constante de acoplamiento |
| ppm | : | partes por millon |
| I. R. | : | infrarrojo |
| U. V. | : | ultravioleta |
| RMN ¹ H | : | resonancia magnética nuclear protónica |
| RMN ¹³ C | : | resonancia magnética nuclear de carbono-13 |
| EMIE | : | espectro de masas por impacto electrónico |
| m/z | : | masa carga |
| δ | : | delta |
| λ _{max} | : | longitud de onda máxima |

| | | |
|-------------------------|---|------------------------|
| V_{\max} | : | vibración máxima |
| AlCl_3 | : | tricloruro de aluminio |
| HCl | : | ácido clorhídrico |
| KBr | : | bromuro de potasio |
| H_2SO_4 | : | ácido sulfúrico |
| BaCl_2 | : | cloruro de bario |
| h | : | hombro |
| nm | : | nanometros |
| p. f. | : | punto de fusión |
| Me | : | metilo |
| α | : | alfa |
| β | : | beta |
| LC_{50} | : | concentración letal 50 |
| DL_{50} | : | dosis letal 50 |
| DE_{50} | : | dosis efectiva 50 |
| N | : | normalidad |
| TMS | : | tetrametilsilano |
| DMSO | : | dimetilsulfoxido |
| μl | : | microlitro |
| μg | : | microgramo |
| ml | : | mililitro |
| mm | : | milimetro |
| sol | : | solución |

Lista de Cuadros

| CAPITULO I | Página |
|--|--------|
| Cuadro 1.1. Constantes de acoplamiento del aldonitrilo peracetilado de la manosa y del producto natural acetilado <u>10a.</u> ----- | 25 |
| CAPITULO II | |
| Cuadro 2.1. Especies, distribución y sinonimias del género <u>Ratibida.</u> ----- | 36 |
| Cuadro 2.2. Metabolitos aislados del género <u>Ratibida.</u> | 38 |
| Cuadro 2.3. Metabolitos aislados de <u>Ratibida latipaliaris</u> ----- | 47 |
| Cuadro 2.4. Resumen del fraccionamiento biodirigido en cromatografía en columna del extracto cloroformo:metanol de <u>Ratibida latipaliaris.</u> ----- | 54 |
| Cuadro 2.5. Sistema de elución y reactivos cromogénicos utilizados.----- | 56 |
| Cuadro 2.6. Resolución vía cromatografía en columna de las fracciones 148-199.----- | 57 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Cuadro 2.7. | Resolución vía cromatografía en columna de las fracciones 273-286.----- | 59 |
| Cuadro 2.8. | Toxicidad para <u>Artemia salina</u> del extracto y fracciones cromatográficas primarias.----- | 64 |
| Cuadro 2.9. | Potencial antimicrobiano del extracto y fracciones primarias.----- | 65 |
| Cuadro 2.11. | Cosntantes físicas y espectroscópicas del compuesto <u>42</u> .----- | 74 |
| Cuadro 2.12. | Constantes espectroscópicas del compuesto <u>42a</u> .----- | 76 |
| Cuadro 2.13. | Efecto batocrómico de las bandas I y II en el espectro de U.V. del compuesto <u>42</u> .- | 79 |
| Cuadro 2.14. | Cosntantes físicas del compuesto <u>43</u> .----- | 81 |
| Cuadro 2.15. | Constantes espectroscópicas de los compuestos <u>43</u> y <u>43a</u> .----- | 84 |
| Cuadro 2.16. | Constantes espectroscópicas de los compuestos <u>43b</u> , <u>43c</u> y <u>43d</u> .----- | 86 |

Lista de Figuras

| CAPITULO I | | Página |
|--------------|--|--------|
| Figura 1.1 | Estructuras de glucocucurbitacinas aisladas de las fracciones de mayor polaridad de la <u>Cigarrilla mexicana</u> Aiello.----- | 18 |
| Figura 1.2. | Estructura parcial A y B del producto natural <u>10</u> .----- | 20 |
| Figura 1.3. | Estructuras parciales A y B del producto natural <u>10</u> .----- | 24 |
| Figura 1.4. | Comparación del patrón de acoplamiento del producto natural acetilado <u>10a</u> y del manitol acetilado.----- | 26 |
| CAPITULO II. | | |
| Figura 2.1. | Localización de especies de <u>Ratibida</u> .---- | 35 |
| Figura 2.2. | Vista estereoscópica del compuesto <u>37</u> .--- | 68 |
| Figura 2.3. | Desplazamientos químicos del metilo C-14 en varias eudesmanólidas.----- | 70 |
| Figura 2.4. | Fragmentos más importantes del espectro de masas del compuesto <u>42</u> .----- | 78 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Figura 2.5. | Estructuras de los derivados obtenidos por acetilación, hidrólisis ácida y enzimática del compuesto <u>43</u> .----- | 83 |
| Figura 2.6. | Correlación homonuclear de la porción sacárida del compuesto <u>43</u> .----- | 89 |
| Figura 2.7. | Correlación homonuclear de la porción aglicona del compuesto <u>43b</u> .----- | 92 |
| Figura 2.8. | Correlación homonuclear de los protones 1,2 α ,3 α ,3 β del producto natural.----- | 93 |
| Figura 2.9. | Correlación homonuclear de los protones H-8 α , H-8 β , H-9 α y H-9 β y H-7 de la aglicona acetilada (<u>43c</u>).----- | 96 |
| Figura 2.10. | Correlación homonuclear de la aglicona <u>43d</u> (obtenida por hidrólisis ácida).----- | 100 |

Lista de Espectros.

| CAPITULO I | Página |
|--|--------|
| Espectro 1.2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>10</u> . --- | 30 |
| Espectro 1.3. Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>10</u> . ---- | 31 |
| Espectro 1.4. Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>10a</u> . --- (derivado acetilado). | 32 |
| Espectro 1.5. Espectro de RMN ^1H homonuclear del- compuesto <u>10</u> . ----- | 33 |
| CAPITULO II. | |
| Espectro 2.1. Espectro de U. V. del compuesto <u>42</u> . ----- | 103 |
| Espectro 2.2. Espectro de I. R del compuesto <u>42</u> . ----- | 104 |
| Espectro 2.3. Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>42</u> . --- | 105 |
| Espectro 2.4. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto <u>42</u> . -- | 106 |
| Espectro 2.5. - Espectro de RMN ^1H del compuesto <u>42a</u> --- (derivado acetilado). ----- | 107 |
| Espectro 2.6. Espectro de masas FAB negativo del compuesto <u>43</u> . ----- | 108 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Espectro 2.7. | Espectro de masas FAB positivo del compuesto <u>43</u> .----- | 109 |
| Espectro 2.8. | Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto <u>43</u> .----- | 110 |
| Espectro 2.9. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43</u> .--- | 111 |
| Espectro 2.10. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43a</u> --- (derivado acetilado).----- | 112 |
| Espectro 2.11. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43b</u> --- (aglicona obtenida por hidrolisis enzimática).----- | 113 |
| Espectro 2.12. | Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto <u>43b</u> .----- | 114 |
| Espectro 2.13. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43c</u> --- (en benzeno deuterado).----- | 115 |
| Espectro 2.14. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43c</u> --- (en CDCl ₃).----- | 116 |
| Espectro 2.15. | Espectro de RMN ¹ H del compuesto <u>43d</u> --- (aglicona obtenida por hidrolisis ácida).----- | 117 |
| Espectro 2.16. | Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto <u>43d</u> .- | 118 |

INTRODUCCION

El potencial de las plantas superiores como una fuente de nuevos fármacos se encuentra aún inexplorado. Se estima que existen alrededor de 250,000-500,000 especies de plantas y sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado desde el punto de vista fitoquímico y el número de extractos vegetal sometidos a pruebas biológicas o farmacológicas es todavía menor. Por ejemplo, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos ha evaluado unas 35,000 especies de plantas con una posible actividad antitumoral entre los años de 1957 a 1981 y recientemente han adquirido unas 20,000 especies tropicales de América Latina, Africa y el sureste de Asia, las cuales no han sido investigadas con respecto a su actividad farmacológica (Suffness et al., 1982).

El proceso por el cual tiene que pasar una planta o compuesto puro para probar su actividad farmacológica es largo y tedioso y requiere una colaboración multidisciplinaria de botánicos, químicos, farmacólogos y toxicólogos por tan solo mencionar algunos. Este proceso involucra los siguientes etapas:

- 1.- Colección, identificación botánica y secado de la planta.
- 2.- Preparación del extracto apropiado y análisis cromatográfico preliminar en cromatografía de capa fina o cromatografía líquida de alta presión.
- 3.- Prueba biológica y farmacológica del extracto crudo.
- 4.- Diversos pasos consecutivos de separación cromatográfica y aplicación de bioensayos para el monitoreo de la actividad biológica.
- 5.- Verificación de la pureza de los compuestos aislados.
- 6.- Elucidación estructural por métodos químicos y espectroscópicos.
- 7.- Síntesis total y/o parcial.
- 8.- Preparación de derivados o análogos para investigación de la relación estructura-actividad.
- 9.- Aislamiento a gran escala para pruebas farmacológicas adicionales y toxicológicas.

La selección de una planta para su estudio es un factor crucial en el proceso de cualquier investigación. La recolecta del material vegetal se puede efectuar al azar. Sin embargo, los procedimientos de recolección se fundamentan principalmente en consideraciones de tipo quimiotaxonómico y en la información etnobotánica disponible. Existe una mayor probabilidad de que las plantas de importancia y amplio uso en la medicina tradicional contengan compuestos activos farmacológicamente. Por ejemplo en el caso de la actividad anticancerígena ha podido demostrarse una correlación entre actividad biológica y el uso en la medicina tradicional de una planta determinada (Farnsworth, 1981; Spjut, 1976).

Muchos de los ensayos requieren procesos especializados de cultivos de células y de manejo de animales de laboratorio así como la participación de bioquímicos, biólogos y farmacólogos. Son pocos los casos en que puede realizarse bioensayos dentro de un laboratorio de fitoquímica y en consecuencia, el fraccionamiento biodirigido en la mayoría de las veces se realiza en cooperación con grupos de investigación que cuentan con la infraestructura apropiada. En el pasado, los farmacólogos rehusaban la idea de probar los extractos vegetales crudos en sus bioensayos; sin embargo, el establecimiento paulatino de una estrecha colaboración con fitoquímicos ha determinado que los resultados relacionados con el aislamiento de principios activos sean más efectivos y en menor tiempo. De esta manera en la actualidad, numerosos laboratorios de productos naturales tienen miras a expandirse y a usar bioensayos que pueden ser realizados por personal no especializado. Muchos de de estos ensayos son de gran interés y necesarios para fitoquímicos en los países tercermundistas y es ahí precisamente donde el potencial de plantas con posibles principios activos es mayor. En la actualidad muchos de estos ensayos simples se han convertido en método de rutina en un gran número de laboratorios fitoquímicos. A continuación se enumeran algunos de los bioensayos de fácil

implementación:

- i).- Determinación de la toxicidad para el crustáceo Artemia salina (Anderson et al., 1971).
- ii).- Inhibición de las agallas inducidas por Agrobacterium tumefaciens en discos de papa (Kahl et al., 1982; Zaene et al., 1974; Chilton et al., 1980; Ream et al., 1982; Ferrigni et al., 1982, inter alia).
- iii).- Inhibición del crecimiento de Lemna minor (Einhellig et al., 1985; Zeringe 1987; Anderson 1991).
- iv).- Inhibición del desarrollo de los huevecillos de Erizo de mar (Cimino et al., 1990).
- v).- Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica (Mitscher et al., 1972; van de Berghe et al., 1978; Ieven et al., 1979; Dornberger y Li 1982; Mitscher et al., 1984; Verpoorte et al., 1982; von Beer et al., 1984; Anderson, et al., 1991).
- vi).- Bioensayos en líneas celulares de tumores humanos en cultivos celulares in vitro (Giard et al., 1973; Soule et al., 1973; Fogh and Trempe, 1975).
- vii).- Evaluación del potencial antileucémico en múridos (P-388) (Geran et al., 1972).

La búsqueda de agentes antimicrobianos representa uno de los propósitos más difundidos entre los laboratorios de investigación fitoquímica (Recio et al., 1989). Sin embargo, los compuestos de origen vegetal con actividad antimicrobiana no compiten con los antibióticos usados clínicamente, por lo tanto la búsqueda se ha concretado a compuestos que presenten un espectro de actividad complementaria para los fármacos ya existentes y principalmente, nuevos prototipos estructurales de origen natural (Mitscher et al., 1972).

La búsqueda de compuestos antifúngicos requiere una atención principal como resultado del incremento en la incidencia de las micosis oportunistas, asociadas principalmente con el SIDA y el tratamiento con fármacos inmunosupresores. Son pocos los agentes antifúngicos indicados en el tratamiento de micosis sistémica y su

eficacia es muy limitada (Bork, 1983., Hufford et al, 1988). Por último la investigación de plantas usadas en la medicina tradicional para afecciones de la piel puede proveer nuevos agentes antisépticos tópicos los cuales constituyen una necesidad primaria en el tercer mundo.

Los ensayos antibacterianos pueden clasificarse en tres grupos; métodos de difusión, de dilución y métodos bioautográficos (Rios, et al, 1988). Para evaluar la actividad inhibitoria de extractos sobre el crecimiento de microorganismos, el método de dilución en agar en cajas de Petri con inoculación por multipuntos o dilución en caldo nutritivo es la técnica más conveniente ya que no se necesita infraestructura sofisticada. La bioautografía es otra herramienta donde se combina la cromatografía en capa fina y un bioensayo in situ, que permite el monitoreo y la localización de los compuestos activos en una mezcla compleja. Este es el método más eficiente para el aislamiento biodirigido de principios activos. La técnica bioautográfica fue ampliamente usado en el campo de los antibióticos. Muchos de los procedimientos publicados se basan en el proceso de difusión en agar, por lo cual el agente antimicrobiano es transferido del cromatograma a una placa de agar inoculada a través de un proceso de difusión. Los problemas relacionados con el proceso de difusión pueden ser evitados mediante la detección bioautográfica directa en la placa de cromatografía de capa fina. Las zonas de inhibición son visualizadas mediante la detección de la actividad deshidrogenasa con sales de tetrazolium (MTT, INT, etc.). La técnica de agar-overlay se considera como el método bioautográfico más conveniente hasta el momento, este método puede ser usado para el aislamiento de compuestos antibacterianos de diversas especies vegetales (Hamburger et al, 1987., Wang et al, 1989, Orjala et al, 1989).

Los ensayos usados para la detección de actividad antifúngica son un poco similares a los métodos para los

compuestos antibacterianos (Janssen et al., 1988). Los ensayos de dilución en agar son más convenientes para propósito de screening. Se ha publicado un procedimiento bioautográfico directo para la producción de esporas de las especies de Aspergillus, Penicillium y Cladosporium. Las placas para cromatografía de capa fina son rociadas con una suspensión de esporas e incubadas durante 2 ó 3 días en una atmósfera húmeda. Las zonas de inhibición se visualizan directamente debido a la producción de esporas pigmentadas por el crecimiento fúngico después de este tiempo. Los métodos bioautográficos directos se han utilizados principalmente con Cladosporium cucumerium como un ensayo rutinario durante muchos años, por medio del cual se aislaron una serie de diversos compuestos antifúngicos (Hostettman et al., 1990). Sin embargo, el método bioautográfico directo no es aplicable con la levadura Candida albicans (Rahalison et al., 1991).

Los procedimientos de evaluación para la detección de agentes anticancerígenos potenciales incluyen ensayos citotóxicos con cultivos de células y ensayos de mecanismos de acción bioquímica basados en infraestructura especializada. Algunos de los ensayos de fácil implementación pueden predecir esta actividad in vitro e in vivo. Un ejemplo, es el empleo del crustáceo Artemia salina Leach como un ensayo de bajo costo. Los huevos de Artemia salina son incubados en un medio artificial con agua de mar; el ensayo consiste en determinar la toxicidad de los compuestos de prueba por medio de la cuantificación del número de organismos muertos. Esta evaluación demostró una buena correlación con la actividad citotóxica observada en los cultivos celulares P-388 de leucemia de muridos.

El bioensayo en disco de papa (inhibición del crecimiento de las agallas) es otro sistema de prueba usado como "pre-screening" para la detección de la actividad antitumoral (Lippincott et al., 1975). El crecimiento de agallas es una enfermedad neoplásicas de plantas, inducidas por las cepas de Agrobacterium tumefaciens mediante la transferencias de plásmidos inductores del tumor de la

bacteria a las células de la planta. La inhibición del crecimiento de agallas mostró una correlación con la actividad 3PS (leucemia de múridos in vivo); para el ensayo los discos de papa son inoculados en cajas de petri con A. tumorigenes en un medio de crecimiento que contiene la muestra de prueba. Después de la incubación por 21 días, se cuentan las agallas crecidas y se calcula el porcentaje de inhibición por comparación con controles. Este método requiere condiciones estériles en cambio el método de la determinación de toxicidad para Artemia salina no requiere condiciones de esterilidad. Recientemente se han publicado resúmenes que proveen detalles de estos bioensayos y su aplicación en el fraccionamiento biodirigido de extractos vegetales (Anderson et al., 1991., McLaughlin, 1991).

Los compuestos antimitóticos como la vinblastina y la podofilotoxina demostraron un efecto inhibitorio de la división celular en huevos fertilizados de golilla o pilluelo de mar y en oocitos de estrella de mar (White et al., 1981; Jacobs et al., 1981). Los huevos se recolectan de la hembra de pilluelo de mar y artificialmente son fertilizados con esperma obtenido de los machos. Posteriormente, se tratan con las sustancias de prueba. La inhibición de la división puede observarse al microscopio después de un determinado tiempo de incubación. Se ha reportado que este sistema es muy utilizado para el estudio del mecanismo de acción demostrado por agentes antitumorales potenciales; este ensayo requiere una mínima infraestructura y condiciones sin esterilidad. La actividad antimitótica puede ensayarse en las algas verdes unicelulares Microsterias denticulata (Meindl et al., 1981). El núcleo de esta alga sufre una migración característica durante la división celular, la cual es perturbada por los inhibidores de la formación de los microtúbulos. Esta técnica es muy utilizada para el "screening" de extractos vegetales. Algunos polifenoles tetracíclicos biogénicamente relacionados a los estilbenos de Bauhinia rufescens Lam (Leguminosae) han demostrado una gran actividad antimitótica en

este bioensayo (Maillard et al., 1990).

Un camino para el control de las enfermedades tropicales como la esquistosomiasis, la fiebre amarilla y el paludismo consiste en la eliminación del vector del parásito que las ocasiona. La quimioterapia o quimioprevención mediante productos sintéticos resulta demasiado costoso en muchos de los países en vías de desarrollo, por lo que se necesitan derivados de plantas con actividad molusquicida y larvicida capaz de interrumpir el ciclo de vida del parásito, mediante la eliminación del huésped intermediario. El vector de la esquistosomiasis es un caracol de agua dulce del género Bulinus o Biomphalaria. El ensayo para la actividad molusquicida es simple y requiere solamente del suministro de caracoles del tamaño apropiado. La prueba básicamente implica la introducción de la sustancia o el extracto vegetal de prueba en agua conteniendo caracoles transmisores de esquistosomiasis y observar la mortalidad de los moluscos (WHO 1965). En el caso de Biomphalaria glabrata, la mortalidad puede confirmarse al observar los latidos de corazón de los organismos sobrevivientes en el microscopio. Un resumen de los ensayos relacionados al control de la esquistosomiasis y ejemplos de agentes molusquicidas naturales se describió recientemente en la literatura (Martson 1991).

Los mosquitos del género Anopheles y Aedes son vectores del paludismo y la fiebre amarilla o dengue, respectivamente. La eficacia de extractos vegetales como agentes larvicidas ha sido muy estudiada por diversos grupos de investigación (Zarroug et al., 1988; Qureshi et al., 1986). Para el "screening" sistemático de extractos vegetales con actividad larvicida potencial se usa el ensayo con larvas de Aedes aegypti (Zarroug et al., 1988; Qureshi et al., 1986). El ensayo consiste en exponer a la larva a varias concentraciones de la muestra de prueba por un día para apreciar el efecto mortal después de 30 min y 24 hr. Un procedimiento similar se ha descrito por otros investigadores (Zarroug et al., 1988; Qureshi et al., 1986).

En las últimas décadas el interés por la búsqueda de nuevos principios activos a partir de materias primas vegetales ha sido notable. La selección de las mismas utilizando como criterio el uso en la medicina tradicional, es un hecho bien documentado y que ha permitido el hallazgo de importantes fármacos (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1980; Farnsworth, 1980; Galeff, 1980; Fairbairn, 1980; Salemink, 1980; inter alia). En este sentido la flora medicinal mexicana representa una fuente potencial valiosísima para la búsqueda de principios activos. El conocido uso tradicional de la misma así como la gran riqueza y diversidad son sus principales características. La investigación de las plantas que conforman la flora medicinal mexicana constituye un compromiso y un gran reto para los investigadores nacionales en las áreas de la fitoquímica, botánica y farmacología, entre otras.

CAPITULO I.

Aislamiento e identificación de un polialcohol de las fracciones de mayor polaridad de Cigarrilla mexicana (Zucc et. Martius ex D. C.) Aiello.

1.1. Antecedentes

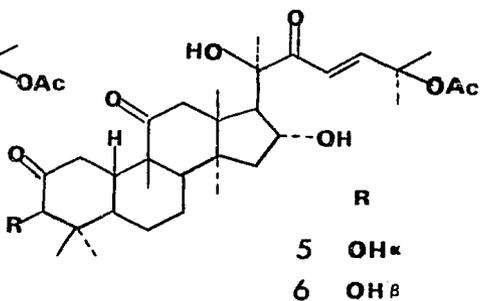
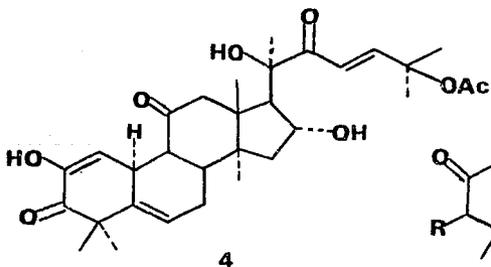
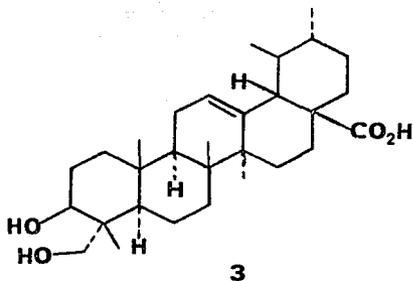
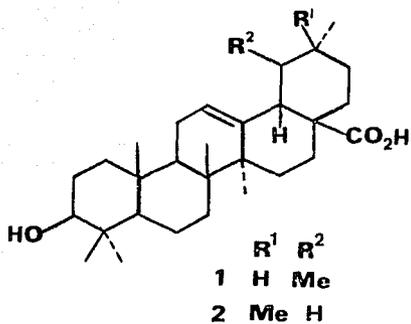
La Cigarrilla mexicana (Zucc. et. Martius ex D. C.) Aiello es una planta endémica de México perteneciente a la familia Rubiaceae. Se encuentra distribuida principalmente en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León.

Popularmente se le conoce con los nombres de cigarra, cigarrilla, cacaloxochitl, flor de San Pedro (Hidalgo) y flor de cuervo (San Luis Potosí); sus hojas y corteza son extremadamente amargas y se emplean en la medicina tradicional como emético (Aiello, 1979) y antiparasitario (Lorence, 1986).

Un estudio fitoquímico previo del extracto metanólico de esta planta medicinal condujo al aislamiento y la elucidación estructural de tres ácidos triterpénicos, cinco cucurbitacinas y un polialcohol (manitol) (Camacho et al Rios, 1988; Castañeda, et al 1988; Mata et al 1988). La metodología utilizada en estos estudios se describe a continuación: el material vegetal pulverizado procedente del estado de Hidalgo (Barranca de Tolaltongo Hidalgo voucher DL504040) se extrajo sucesivamente con hexano y metanol según se muestra en el Esquema 1.1. Posteriormente, el extracto metanólico se fraccionó preliminarmente vía una cromatografía preparativa en columna sobre gel de sílice obteniéndose 939 fracciones. Cabe hacer notar que del extracto metanólico precipitó espontáneamente grandes cantidades de manitol.

Sucesivas cromatografías en columna de las fracciones 223-256 de polaridad intermedia permitieron el aislamiento de los ácidos ursólico, oleanólico y 3- β -23-dihidro-urs-12-en-28-oico (1-3) y de tres de las cucurbitacinas (cucurbitacina E,

Figura 1.1.- Estructuras de metabolitos aislados de las fracciones de polaridad intermedia de Cigarrilla mexicana Aiello.



3-epi-isocucurbitacina e isocucurbitacina B) (4-6) (Figura 1.1). Las cucurbitacinas antes mencionadas poseen actividad citotóxica (Kupchan 1967., Arisawa 1984).

El estudio de las fracciones combinadas 759-787 permitió el aislamiento de dos glucocucurbitacinas que fueron caracterizadas como la 2- β -D-glucopiranosilcucurbitacina-F-25-acetato (7) y la 2- β -glucopiranosilcucurbitacina-B (8) (Figura 1.2.).

Finalmente, cabe destacar que las fracciones 788-904 pertenecientes al grupo de fracciones de mayor polaridad no fueron investigadas.

1.2. - Objetivos.

Con la finalidad de ampliar el conocimiento del contenido metabólico de la especie Cigarrilla mexicana, se consideró pertinente proseguir con el estudio fitoquímico de las fracciones de mayor polaridad obtenidas en el estudio previo (Castañeda 1988).

Es importante destacar que el trabajo forma parte de un estudio sistemático de Rubiaceas mexicanas usadas en medicina tradicional.

Para el cumplimiento de los propósitos antes señalados se consideraron los siguientes objetivos específicos:

1.- Separar mediante métodos cromatográficos los constituyentes mayoritarios de las fracciones de mayor polaridad del extracto metanólico de Cigarrilla mexicana.

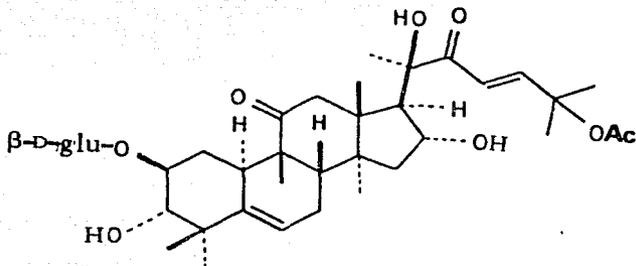
2.- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.

1.3. - Materiales y Métodos.

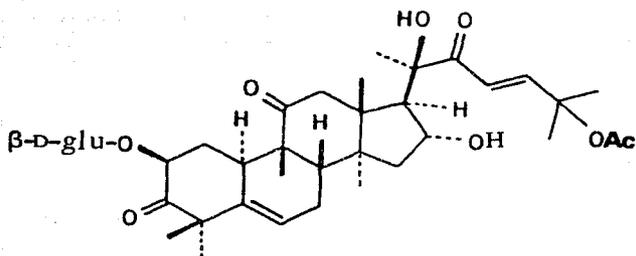
1. 3. 1. Aislamiento y purificación del 2-O-metil-D-manitol (10).

Las fracciones combinadas 788-904 (243.1285 g) obtenidas en el

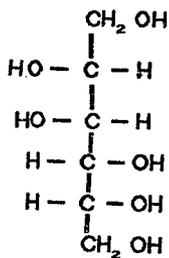
Figura 1.2.- Estructuras de glucocurbitacinas aisladas de las fracciones de mayor polaridad de *Cigarrilla mexicana* Aiello.



7



8



9

estudio previo (Camacho y Rios, 1988; Castañeda, 1988; Mata, 1988) se recromatografiaron en una columna de gel de sílice (sílica gel Merck 60 gránulos de 0.2-0.5 μ). La elución de la columna se realizó con cloroformo:metanol en diferentes proporciones; se recogieron un total de 182 fracciones de 50 ml cada una, combinándose aquellas cromatográficamente similares; de las fracciones 64-105 eluidas con cloroformo:metanol 85:15 se obtuvieron 10.9323 g de un sólido cristalino de sabor dulce, soluble en metanol y agua, con punto de fusión 90-97°C.

1. 3. 2. Preparación del derivado acetilado 10a.

Para preparar el derivado acetilado, se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó 24 hrs a temperatura ambiente; y pasado este tiempo, se procesó de la manera habitual (Shriner, Fuson - Curtin, 1980). Se acetilaron 50 mg del compuesto 10 obteniéndose 50 mg del derivado acetilado 10a con punto de fusión 87-92°C.

1. 3. 3. Prueba de Molish.

Una pequeña cantidad del compuesto 10 se disolvió en 3 ml de agua destilada y a la solución resultante se le adicionó 1 ml de solución reactiva de α -naftol (10 % de etanol); seguidamente se agregaron por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A continuación se observó el desarrollo de la coloración en la interfase de los líquidos.

1. 3. 4. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

El espectro de IR se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer 5998; los espectros de RMN se registraron en un aparato Varian VXR - 300S utilizando como disolventes cloroformo y/o

dimetilsulfóxido y como muestra de referencia interna el TMS.

La rotación óptica se midió en un polarímetro digital JASCO DIP 360 y los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jhones y no están corregidos. Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 F 254 Merck) y como agente revelador se usó sulfato cérico (Stahl, T., 1969).

1. 4. Resultados y discusión.

De las fracciones de mayor polaridad obtenidas del extracto metanólico de las partes aéreas de C. mexicana Aiello se obtuvo un polialcohol que fue caracterizado por métodos químicos y espectroscópicos, como el 2-O-metil-D-manitol, un nuevo producto natural. Las evidencias que permitieron su identificación serán el objetivo fundamental de la presente sección.

El producto se obtuvo como un sólido cristalino soluble en solventes polares, ópticamente activo, con punto de fusión 89-92°C, la reacción negativa frente al reactivo de Molish descartó en un principio su posible carácter sacárido. La fórmula molecular $C_7H_{16}O_6$ se estableció mediante un análisis elemental.

El espectro de IR (Espectro 1.1) presentó bandas características para grupos hidroxilos (3400-3300, 1070 y 1050 cm^{-1}).

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Espectro 1.2) en DMSO resultó bastante simple, presentando señales para siete átomos de carbono en concordancia con la fórmula molecular.

De acuerdo al análisis del espectro APT y consideraciones de la teoría del desplazamiento químico las señales se asignaron de la siguiente forma: a) las señales negativas a campos más bajos debían corresponder a cuatro metinos

unidos a funciones oxigenadas (67,69.71 y 81 ppm); b) Las dos señales positivas en 60 y 63.5 ppm debían corresponder a dos grupos hidroximetileno; c) por último la señal negativa que aparece en 57.61 ppm era asignable a un grupo metoxilo.

El espectro de resonancia magnética nuclear protónica (Espectro 1.3) confirmó la presencia de un grupo metoxilo alifático ya que a 3.3 ppm aparece un singulete que integraba para tres protones. También se observaron señales para varios hidrógenos unidos a funciones carbinólicas y para varios grupos hidroxilos en la región comprendida entre 3.39 y 3.7 ppm.

Al tratar el producto natural con anhídrido acético y piridina se obtuvo el derivado pentacetilado 10a (Espectro 1.4) demostrándose químicamente la naturaleza polialcohólica del compuesto.

El espectro de resonancia magnética nuclear protónica del derivado pentacetilado 10a (Espectro 1.4) presentó las siguientes características:

- a) En 2.09 ppm se observaron dos singuletes anchos que integraron en conjunto para 15 hidrógenos metílicos de cinco grupos acetatos.
- b) En 3.4 ppm se observó el singulete asignable a un grupo metoxilo.
- c) En 5.09, 5.3 y 5.6 ppm se localizaron resonancias atribuibles a tres hidrógenos geminales a funciones acetoxilo.
- d) En 3.35 ppm se observó un multiplete que bien podía corresponder a un hidrógeno geminal a una función etérea.
- e) Finalmente, el espectro presentó dos sistemas AB centrados en 4.49 y 4.09 ppm, asignables a los hidrógenos geminales de los acetatos de los dos alcoholes primarios.

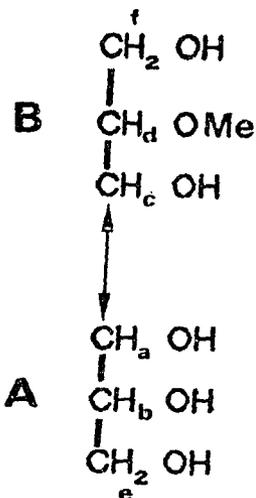
El análisis del espectro COSY (Espectro 1.5) permitió establecer las secuencias estructurales parciales que se ilustran en la Figura 1.3. Las correlaciones homonucleares más importantes se describen a continuación:

- a) El doblete de dobletes en 5.57 ppm (H_a) mostró una clara

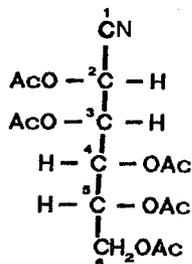
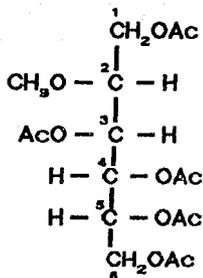
interacción con el multiplete centrado en 5.07 ppm (H_b) que a su vez correlacionaba con una de las ramas de los dos sistemas AB centrados en 4.29 y 4.09 ppm. Estas interacciones permitieron establecer la estructura parcial "A" de la Figura 1.3.

- b) El doblete de dobletes centrado en 5.28 ppm (H_c) correlacionó con el multiplete (H_d) centrado en 3.38 ppm debajo de la señal del metoxilo. H_d también correlacionaba con otra de las ramas de los dos sistemas AB. Este último grupo de interacciones condujo a la estructura parcial B de la Figura 1.3.

Figura 1.3. Estructuras parciales "A" y "B" del producto natural



Cuadro 1.1. - Constantes de acoplamiento del aldonitrilo peracetilado de la manosa y del producto natural acetilado 10a.



PRODUCTO NATURAL ACETILADO

ALDONITRILLO PERACETILADO
DE LA MANOSA **

$$J_{4-5} = 8.67 \text{ Hz}$$

$$J_{4-5} = 9.50 \text{ Hz}$$

$$J_{3-4} = 2.45 \text{ Hz}$$

$$J_{3-4} = 2.00 \text{ Hz}$$

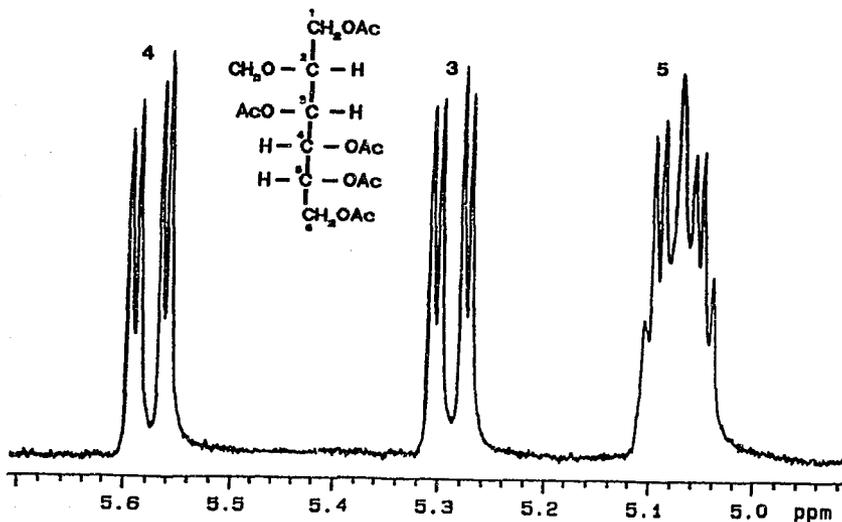
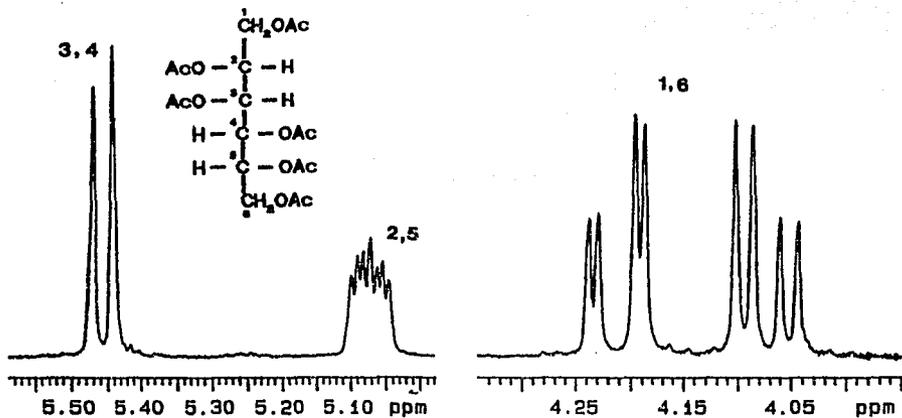
$$J_{5-6} = 2.92 \text{ Hz}$$

$$J_{5-6} = 2.70 \text{ Hz}$$

$$J_{5-6'} = 5.28 \text{ Hz}$$

$$J_{5-6'} = 4.00 \text{ Hz}$$

Figura 1.3.- Comparación del patrón de acoplamiento del producto natural acetilado 10a y del manitol acetilado.



Como un resultado de la interacción entre los núcleos H_a y H_c , las dos estructuras parciales de la Figura 1.3. deben estar unidas entre sí a través de los átomos de carbono que contienen a estos hidrógenos.

Para establecer la configuración de los sustituyentes en el polialcohol, se realizó un análisis comparativo de la magnitud de las constantes de acoplamiento vecinales de los hidrógenos geminales a los esteres secundarios del derivado acetilado, con las correspondientes a los de una serie de aldonitrilos peracetilados (Velasco *et al.*, 1990). El análisis indicó que las constantes observadas para el derivado acetilado 10a eran muy similares a las del aldonitrilo peracetilado de la manosa (ver Cuadro 1.2). De estos resultados se podía concluir que el arreglo de los constituyentes oxigenados en el polialcohol natural era el mismo que el observado en la D-manosa.

Para comprobar esta hipótesis se decidió hacer un análisis comparativo de los valores de las constantes de acoplamiento (vecinal y geminal) de los hidrógenos primarios y secundarios del derivado 10a con los del manitol acetilado. En la Figura 1.4. se indican los valores comparativos. Para obtener los valores de las constantes de acoplamiento se registró el espectro de resonancia magnética nuclear del derivado peracetilado del manitol, el cual se preparó a partir de una muestra comercial (Merck). Como se aprecia en la Figura 1.4. las constantes de acoplamiento encontradas para el manitol acetilado concordaban con las observadas para el producto natural. Cabe hacer notar que en el manitol los protones de la parte inferior de la molécula son equivalentes a la parte superior de la misma, por lo que en el manitol H_3 y H_4 son equivalentes y sus señales aparecen como un doblete en 5.44-5.47 ppm, en cambio en el producto natural debido a la presencia del grupo metoxilo los protones H_3 y H_4 no son equivalentes y sus señales aparecen como un doblete de dobletes en 5.29 y 5.58 ppm respectivamente, mostrando una pequeña interacción con una constante de acoplamiento de 2.45 Hz. Finalmente, el patrón de acoplamiento de H_b que resuena en 5.08 ppm es idéntico

al que presentan los hidrógenos H_5 y H_2 del manitol acetilado.

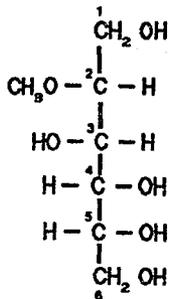
Con los resultados presentados hasta el momento se podía inferir que el grupo metoxilo debía localizarse en el núcleo C-2 o en el C-5 del manitol. Sin embargo, el valor negativo de la rotación óptica permitió establecer que el compuesto pertenece a la serie D y en consecuencia el grupo metoxilo debía estar presente en el C-2 del manitol. Con todas las evidencias presentadas se propone la estructura del producto 10 como la del 2-O-metil-D-manitol, que constituye un nuevo producto natural. Para confirmar de manera inequívoca la estructura de este compuesto sería deseable realizar un análisis del mismo por difracción de rayos X, lamentablemente hasta la fecha no ha sido posible obtener los cristales adecuados para la realización del análisis antes mencionado.

CONCLUSIONES.

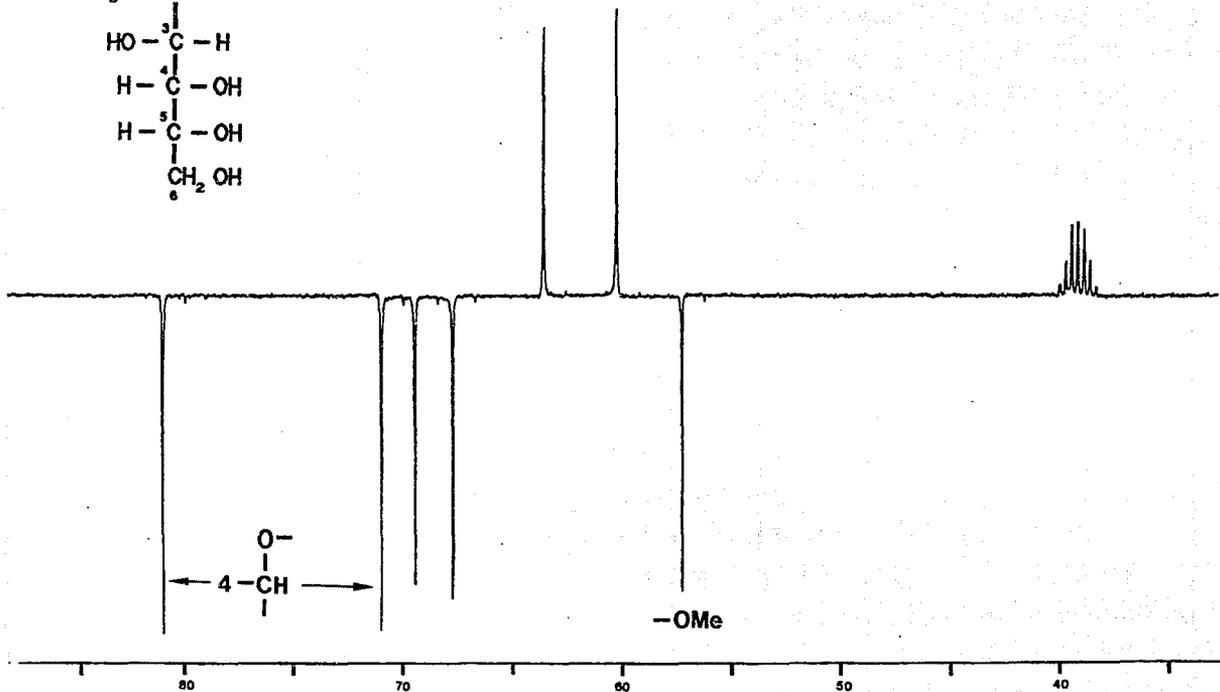
El estudio de las fracciones de mayor polaridad de Cigarrilla mexicana permitió aislar un nuevo producto natural que fue caracterizado por métodos químicos y espectroscópicos como el 2-O-metil-D-manitol.

Este producto ha sido obtenido sintéticamente con anterioridad, como un subproducto de la hidrólisis de glucoproteínas metiladas. Sin embargo a la fecha no se había aislado de fuente natural alguna. Cabe hacer notar que en la literatura no se encuentran descrita sus propiedades espectroscópicas y sólo se ha reportado su actividad óptica (Foster, 1960) la cual se encontraba en perfecta armonía con la encontrada para el producto natural.

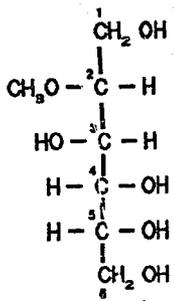
Este compuesto fue evaluado como un agente potencial hipoglucemiante, encontrándose resultados negativos.



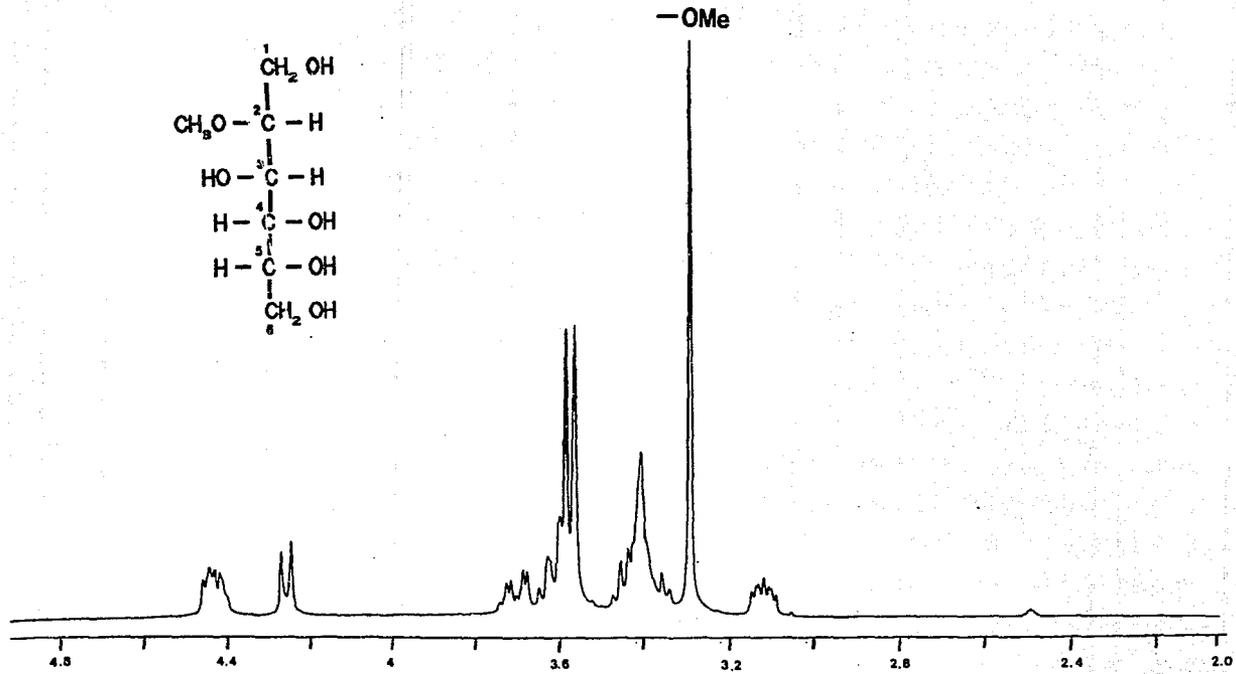
2-CH₂OH

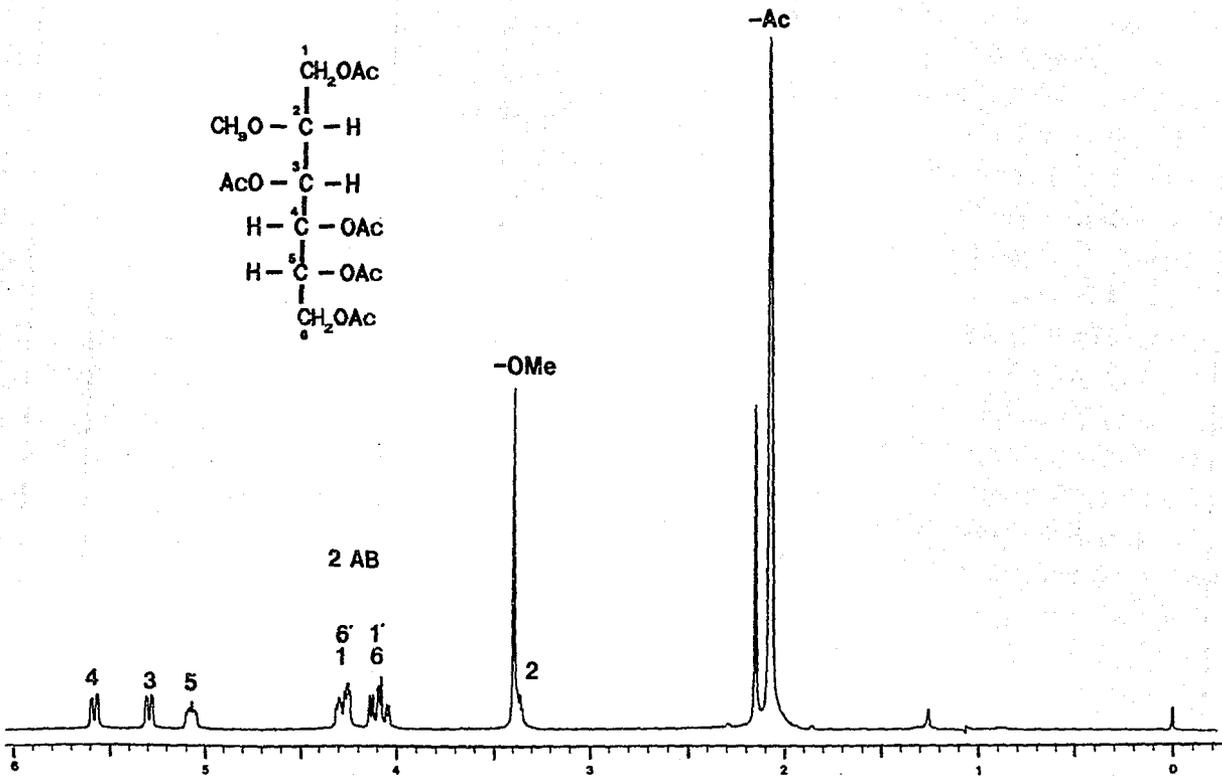
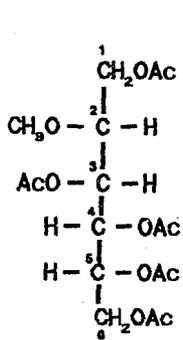


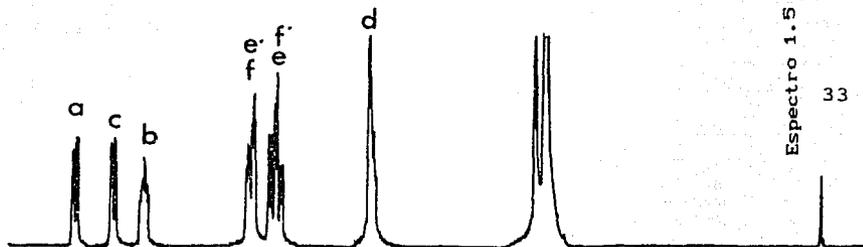
Espectro 1.2.



-OMe

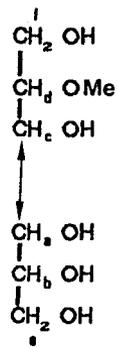
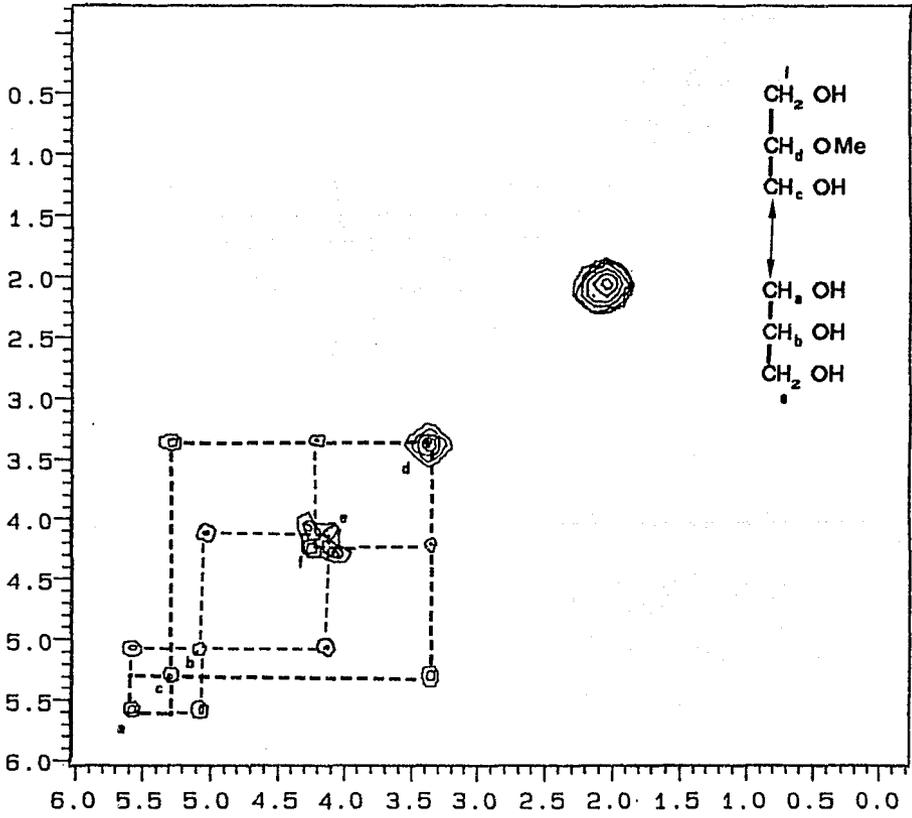






Espectro 1.5

33



CAPITULO II.

Reinvestigación química y biológica de la planta medicinal Ratibida latipaliaris Richards.

2.1.- Antecedentes de Ratibida latipaliaris.

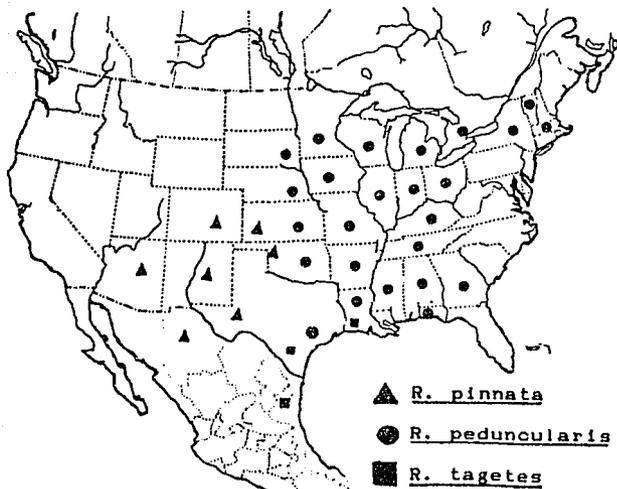
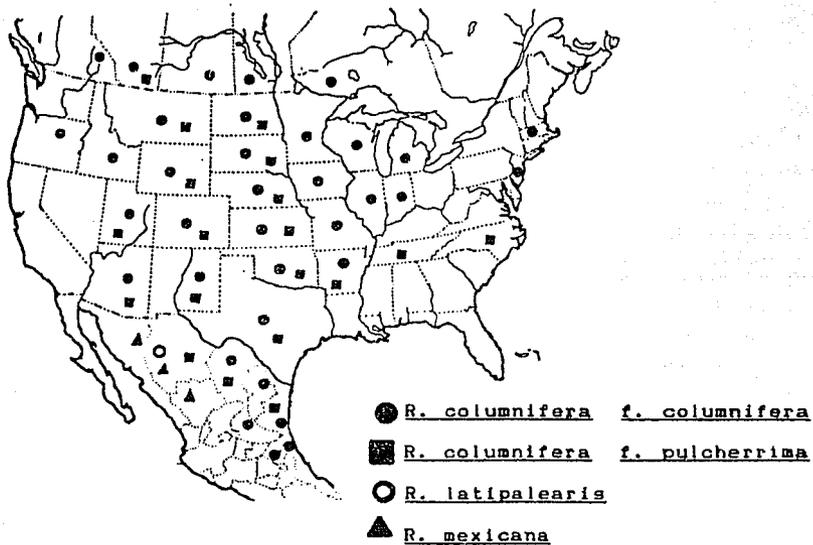
El género Ratibida Richards pertenece a la familia Asteraceae (tribu Heliantae) y, desde el punto de vista filogenético, se encuentra estrechamente relacionado con los géneros Echinaceae y Rudbeckia. Comprende seis especies y una variedad. Este género se localiza en las praderas, las laderas montañosas, los bosque de pinos y las planicies del sur de Canadá, los Estados Unidos y el Norte de México (ver Figura 2.1). En el Cuadro 2.1. se enumeran las especies de este género, indicando para cada una sus sinonimias y distribución (Richards 1969).

Las especies que son utilizadas en la medicina tradicional de nuestro país son Ratibida latipaliaris Richards y Ratibida mexicana (Watson, W.M. Sharp). La primera se utiliza en el tratamiento de heridas de la piel, inflamaciones y dolores de cabeza (Bye 1989). La segunda se utiliza para dolores de cabeza, desordenes gastrointestinales, resfriados e inflamaciones de la piel (Richards 1969).

La planta Ratibida latipaliaris es conocida comúnmente como 'chi'punuwa' por los indios tarahumaras. Es una hierba perenne, de tallo simple o ramificado que mide de 55 a 117 cm de altura posee hojas alternas, espinosas y moteadas en ambas superficies, sus flores son amarillas y miden de 0.8 a 3.1 cm de largo. Cabe hacer notar que esta planta es endémica del estado de Chihuahua, México (Richards 1969).

Los estudios químicos del género son muy escasos y solamente las especies R. columnifera, R. pedunculiaris y R. latipaliaris han sido investigadas. Las investigaciones sobre R. columnifera y R. pedunculiaris condujeron al aislamiento e identificación de

Figura 2.1.- Localización de especies de Ratibida (Richards 1968).



Cuadro 2.1.- Especies, distribución y sinonimias del género Ratibida.

| NOMBRE CIENTIFICO | SINONIMIAS | DISTRIBUCION |
|--|---|--|
| <u>Ratibida mexicana</u> (Watson, W.M. Sharp) | Lepachis mexicana | Sierra Madre Occ. Chihuahua, Durango y Sonora. |
| <u>Ratibida pinata</u> (Vent., Barnhart) | Lepachys pinata Rudbekia pinata Obeliscaris pinata Lepachys pinnatifida | Centro y Oeste de E.U., Sureste de Canada. |
| <u>Ratibida peduncularis</u> (Torr., Gray, Barnhart) | Lepachys peduncularis Lepachys serratum Ratibida picta | Costa de Texas Estados Unidos |
| <u>Ratibida columnifera</u> (Nutt, Wost, Standl) | Rudbekia columnifera Rudbekia columnaris Ratibida columnaris Lepachys columnaris | Sureste de Canada Estados Unidos y Norte de México |
| <u>Ratibida latipalmaris</u> (Richards) | ----- | Sierra Madre Occ. de Chihuahua. |
| <u>Ratibida tagetes</u> (James, Barnhart) | Rudbekia tagetes Rudbekia globosa Lepachys columnaris Lepachys tagetes | Suroeste de Est. Unidos y Chihuahua |

veintiseis lactonas sesquiterpénicas (1-26) de los tipos xantonólidas, ratibidanólidas, elemanólidas y eudesmanólidas; tres flavonas (27,28,29); un fenil propanoide (30); dos sesquiterpenoides simples (31,32) y tres acetilenos (33,34,35) (ver Cuadros 2.2).

Recientemente, el estudio biodirigido de Ratibida latipaliaris, utilizando como bioensayo la determinación de la toxicidad para Artemia salina, permitió el aislamiento de dos lactonas sesquiterpénicas bioactivas: la ratibinólida I ($LC_{50} = 62.75 \mu\text{g/ml}$), que posee el poco común núcleo de geigerano, y la ratibinólida II ($LC_{50} = 69.53 \mu\text{g/ml}$), que es una eudesmanólida (Cuadro 2.3). Cabe destacar que la estereoquímica en el centro quiral C-1 de la ratibinólida II se asignó tentativamente como β con base en experimentos de resonancia magnética nuclear protónica utilizando reactivos de desplazamiento. De manera adicional, en ese estudio se obtuvieron la flavona hispidulina, que presentó moderada actividad contra Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus, y el β -sitosterol (Rojas 1990).

2.2.- Justificación y objetivos:

El propósito del presente estudio es la reinvestigación química y biológica de la especie medicinal R. latipaliaris, como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional (Castañeda 1987; García 1987; Albor, 1988 1988; Camacho 1989; Rojas 1989; Rodríguez 1990; Castañeda 1991 y Rodríguez 1991, inter alia). La propuesta original de la presente investigación se realizó con base en las siguientes consideraciones:

1.- Las plantas utilizadas en medicina tradicional constituyen fuentes potenciales y valiosas de principios activos.

Cuadro 2.2. Metabolitos aislados del género Ratibida.

Ratibida columnifera.

NOMBRE DEL COMPUESTO

ESTRUCTURA

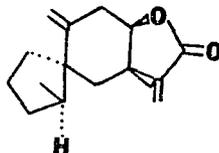
REFERENCIA

Lactonas sesquiterpénicas.

Ratibinólidos

1

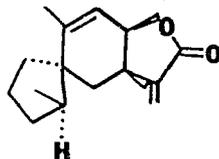
(4S, 5S, 7R, 8R,)-Ratibida-
11(13)-dien-8, 12-ólida.



Herz, et al.
1985.

2

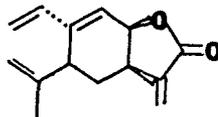
(4S, 5S, 7R, 8R)-Ratibida-
9, 11(13)-dien-8, 12-ólida.



Herz, et al
1985.

Elemánólidos

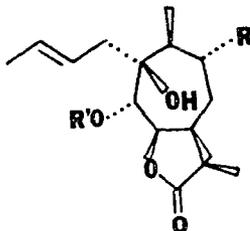
3 (5R, 7R, 8R, 10S)-Elema-1, 3-
11(13)-trien-8, 12-ólido.



Herz, et al
1985.

Xantanólidos

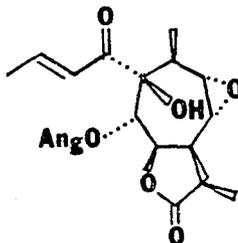
4 5 6 (C15, 5S, 6R, 7S, 10S, 11R)-1
-hidroxi-2-oxo-5-aciloxi-
xant-3-en-6, 12-ólidos.



Herz, et al
1985.

4 5 6
R H H H
R' An Ti iBu

7 (1S, 5S, 6R, 7R, 9S, 10S, 11R)
-8, 9-epoxi-1-hidroxi-2-
oxo-5-angeloxi-xant-3-en
6, 12-ólido.



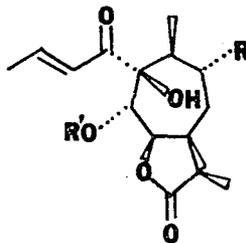
Herz, et al
1985.

8, 9, 10 (1S, 5S, 6R, 7S, 9R, 10S, 11R)

11 1, 9-dihidroxi-2-oxo-5-(aciloxi)-xant-3-en-6, 12-ólidos.

9 R = OH R' = Ang 10 R = OH R' = Tig

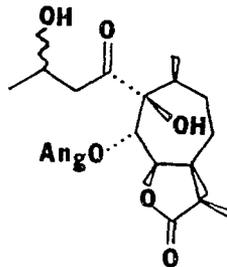
10 R = OH R' = iBut 11 R = OAc R' = Ang



Herz, et al
1985.

12 (1S, 4R, 5S, 6R, 7S, 10S, 11R)

-1, 4-dihidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xantan-6, 12-ólido.

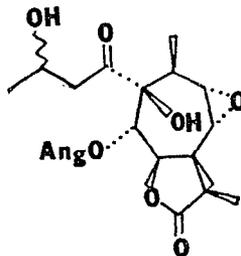


Herz, et al
1985.

13, 14 (1S, 4R, 5S, 6R, 7R, 8R, 9S,

10S, 11R)-8, 9-epoxi-1-hidroxi-2-oxo-5-angeloxi-xantan-6, 13-ólidos

13 R = H 14 R = Et

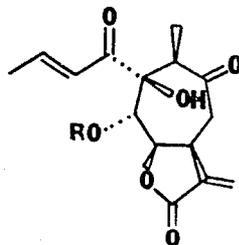


Herz, et al
1985.

15

5 α -O-(2-metil-butirato)-9-oxo-seco-ratiférólido

R = MeBu



Ellmauerer,
et al 1987.

16

5 α -O-angelato-9-oxo-seco-ratiférólido

R = Ang

17

5 α -O-(2-metil-butirato)-9 α -hidroxi-seco-ratiférólido.

R = MeBu

Ellmauerer,
et al 1987.

Ellmauerer,
et al 1987.

18

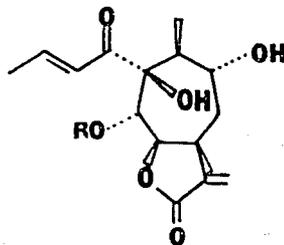
5 α -O-isoButirato-9 α -hidroxi - seco-ratiférólido.

R = iBu

19

5 α -O-angelato-9 α -hidroxi-seco-ratiférólido.

R = iBu

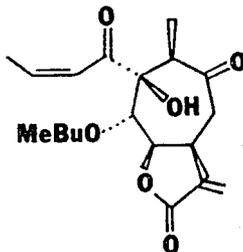


Ellmauerer,
et al 1987.

Ellmauerer,
et al 1987.

20

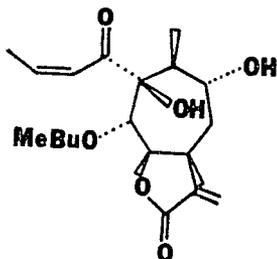
5 α -O-(2-metilbuti-
rato)-9- 3z- seco-
-ratiferólido.



Ellmauerer,
et al 1987.

21

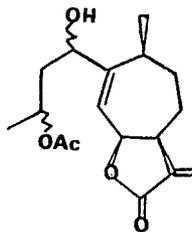
5 α -O-(2-metilbuti-
rato)-9 α -hidroxi-
3z-seco-ratiferó-
lido.



Ellmauerer,
et al 1987.

22

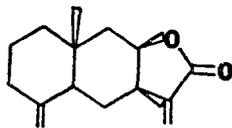
2-hidroxi-4-acetoxi-
xantan -1(5) -en-6 α -
12-ólido.



Ellmauerer
et al 1987.

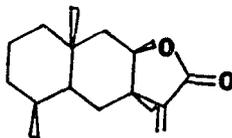
Eudesmanólidos

23



Herz, et al
1985.

24

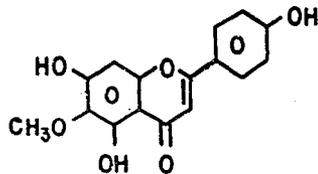


Ellmauerer,
et al 1987.

Flavonoides

27

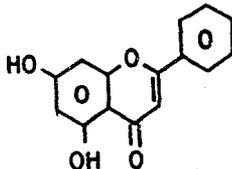
5,7,6-trihidroxi-6-
metoxi-flavona



Herz, et al
1985.

28

5,7-dihidroxi-flavona

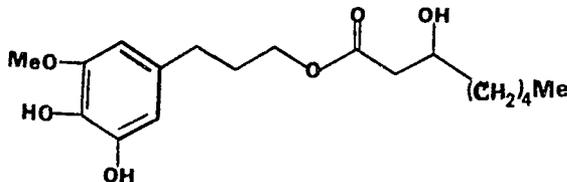


Ellmauerer,
et al 1987.

fenilpropanoides

30

4-O-desmetil-
schkuhrianol



Ellmauerer
et al 1987.

sesquiterpenoides simples

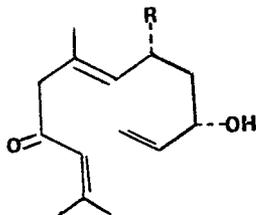
31

(-)-(3S, 5R)-5-hidroxi-
9-oxonerólidol

Hertz, et al
1985.

32

(-)-(3S, 5R)-9-oxo-
nerolidol



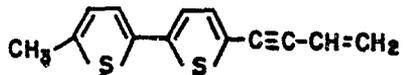
Hertz, et al
1985.

31 R = OH

32 R = H

Acetilenos

33 2-(3-buten-1-ínil)-4-(1,3-pentadieníl)-tiofeno



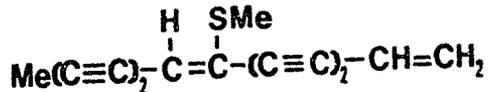
Herz, et al
1985.

34 4'-(3-buten-1-ínil)-4-metil-2,2'-bitiofeno



Herz, et al
1985.

35 7-metiltio-1,7-tridecadien-3,5,9-tetraíno



Ellmauerer,
et al 1987.

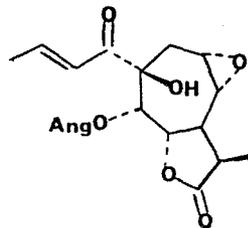
Cuadro 2.2 Continuación.

Ratibida peduncularis.

Lactonas sesquiterpénicas

25

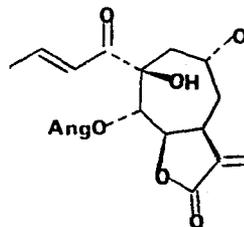
(1S, 5R, 6R, 7R, 8R,
9S, 10S, 11R)-2, 9-
epoxi-1-hidroxi-
2-oxo-5-angeloxi-
xantan-3-en-6, 12-
ólido.



Herz, et al
1985.

26

5 α -O-(2-metilbu-
tirato)-9 α -hidro-
xi-seco-ratife-
rólido.



Ellmauerer,
et al 1987.

- 2.- Las investigaciones químicas y farmacológicas relacionadas con la medicina tradicional Tarahumara son muy escasas y, por lo tanto, la información disponible que permitiría su eventual adaptación a los programas de salud oficiales, con las ventajas que esto implicaría, es prácticamente inexistente.
- 3.- El uso como agente antiséptico que se le atribuye a la planta en la región tarahumara.
- 4.- La ambigüedad en relación a la estereoquímica del centro quiral C-1 de la ratibinólida II, requería el aislamiento de mayores cantidades de este compuesto con la finalidad de establecer de manera inequívoca la configuración relativa de la estructura mediante un análisis de difracción de Rayos X.
- 5.- La necesidad de realizar evaluaciones biológicas de las dos ratibinólidas, considerando la alta toxicidad que presentaron ambos compuestos para Artemia salina.
- 6.- Por último, es importante enfatizar que cualquier proyecto encaminado a la resolución de algunos problemas de salud pública nacional, bien sea mediante el hallazgo de nuevos principios activos a partir de materias primas nacionales o mediante la investigación sistemática de las distintas floras regionales, está, por sí misma, bien justificado.

Objetivos particulares.

Con el propósito de implementar el presente proyecto de investigación se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de R. latipaliaris Richards.
- 2.- Preparar el extracto vegetal de acuerdo a las técnicas fitoquímicas convencionales.
- 3.- Efectuar el fraccionamiento del extracto obtenido en el punto anterior.

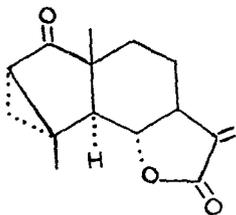
- 4.- Separar y purificar los constituyentes de las diferentes fracciones.
- 5.- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.
- 6.- Determinar la toxicidad para Artemia salina y la actividad antimicrobiana del extracto total, las fracciones y los compuestos aislados.
- 7.- Obtener cristales adecuados de la ratibinólida II para realizar el análisis de difracción de Rayos X, con el fin de establecer inequívocamente la estereoquímica en el centro quiral C-1.
- 8.- Contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana.
- 9.- Correlacionar en lo posible los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura en cuanto a la composición química de especies relacionadas y a la actividad biológica de las sustancias aisladas.

2.3. - Parte experimental

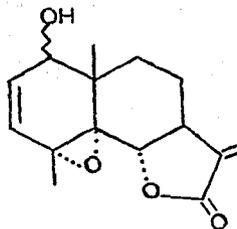
2.3.1.- Determinación de la toxicidad para el crustáceo Artemia salina Leach.

Preparación de las muestras:

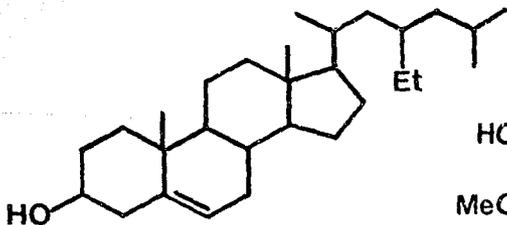
Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos) se preparan disolviendo 20 mg del material en 2 ml del disolvente apropiado. De esta solución se transfieren 500, 50 y 5 μ l a tres viales; se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío, cada concentración se prepara por triplicado.

Cuadro 2.3. - Metabolitos aislados de Patibida latipallaris.

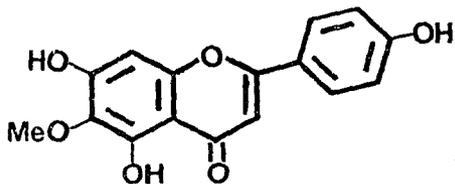
RATIBINOLIDA I



RATIBINOLIDA II



β SITOSTEROL



HISPIDULINA

Incubación de los huevecillos de Artemia salina:

Los huevos de Artemia salina se incubaron en un medio salino artificial durante un periodo de 48 hrs.

Bioensayo:

Se transfieren 10 crustáceos a cada uno de los frascos que contenían las muestras a evaluar y 5 ml de medio salino artificial, teniendo una concentración final de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Los frascos se mantuvieron con iluminación durante 24 hr; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes, para calcular la LC_{50} o el porcentaje de mortalidad. En el primer caso, se utilizó el programa de analisis de probabilidad Finney. Cuando se obtiene un LC_{50} menor a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para un extracto o fracción y un LC_{50} menor a 200 $\mu\text{g/ml}$ para un compuesto puro se considera como activo (Anderson, et. al., 1991).

2.3.2.- Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana:

Microorganismos de prueba:

Para la evaluación biológica se emplearon bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y una levadura. A continuación se enumeran los microorganismos de prueba utilizados, indicando además las cepas correspondientes:

| | | |
|----------------|------------------------------|---------------|
| Gram positivas | <u>Staphylococcus aureus</u> | CATCC 6538). |
| | <u>Bacillus subtilis</u> | CATCC 6633). |
| Gram negativas | <u>Pseudomona aeruginosa</u> | CATCC 9027). |
| | <u>Escherichia coli</u> | CATCC 8739). |
| Levadura | <u>Candida albicans</u> | CATCC 10231). |

Preparación de las muestras de prueba y los testigos:

A 2 mg de compuesto se adicionaron 2 ml de disolvente, mezclas de dimetilsulfóxido en agua en proporciones no mayores de 50:50 o solución al 10% en agua de tween 20 y tween 80.

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

Preparación de los inóculos de los microorganismos de prueba:

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

La levadura (C. albicans) se desarrolló en caldo glucosa 2% Sabouraud (Merck) y se incubó por 48 hrs a 28°.

Una vez desarrollado los microorganismos fue necesario estandarizar su número a una concentración aproximada de 10^6 células/ml, empleando el patrón de turbidez # 1 de McFarland (0.1 ml de BaCl₂ 1% y 9.9 ml de H₂SO₄ 1%) mediante la dilución del cultivo con solución salina isotónica (Bailey, 1986).

Siembra de microorganismos:

Se llenaron cajas petri estériles con 20 ml de agar antibiótico # 1 (para bacterias) y de agar glucosa 4% (para levadura). Se dejaron a temperatura ambiente el tiempo suficiente hasta solidificar. Estas cajas se incubaron a una temperatura de 37°C las que contenían agar antibiótico y a 28°C las de agar glucosa por 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se desecharon las cajas que estaban contaminadas.

Se sembró 1 ml de la solución de microorganismos estandarizados de manera uniforme en cada caja petri. Con un

horador cilíndrico de 10 mm de diámetro se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de 11 mm de diámetro aproximadamente. Posteriormente, se adicionó a cada perforación 100 y 50 µl de la solución problema y 100 µl del control positivo.

Las cajas ya preparadas se mantuvieron a temperatura ambiente por un período de 1 a 2 hrs para facilitar la difusión de las muestras (problemas y patrones). Transcurrido ese tiempo, las placas se incubaron por 24 hrs a 37°C (para las bacterias) y 48 hrs a 28°C las levaduras.

Evaluación de la actividad antimicrobiana:

Transcurrido el tiempo de incubación, se evaluó la actividad antimicrobiana de las fracciones y de los compuestos, midiendo el diámetro de inhibición que circunda a cada una de las perforaciones. Las pruebas se realizaron por duplicado y todo el procedimiento se efectuó en condiciones estériles, bajo una campana de flujo laminar.

2.3.3. Material vegetal.

El material vegetal (hojas y tallo) de Ratibida latipaliaris se recolectó en el Municipio de Guachochi, Cusárare, Chihuahua el 6 de junio de 1990. Una muestra de referencia (Voucher, Bye y Ramamorthy 17847) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional del Instituto de Biología, U.N.A.M.

La planta se secó a temperatura ambiente y se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley # 4.

2.3.4. Extracción y fraccionamiento preliminar.

2.7 Kg del material vegetal se extrajeron vía maceración, utilizando 16 l de la mezcla de cloroformo-metanol (1:1), tres veces por periodos de 24 hrs en cada ocasión, después de concentrar in vacuo se obtuvieron 286.63 g de extracto.

El extracto CHCl_3 :MeOH se fraccionó mediante cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice desactivada al 10% con agua destilada (1.5 Kg de sílica gel merck G60 gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230); el proceso de elución se llevó a cabo con hexano, hexano:cloroformo, cloroformo, cloroformo:metanol y metanol en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 332 fracciones de 500 ml cada una. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron semejantes.

- 1.- En el cuadro 2.4 se enumeran los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.
- 2.- A cada una de las fracciones combinadas se les determinó la toxicidad para Artemia salina y su potencial antimicrobiano en contra de las bacterias Gram positivas y Gram negativas de prueba y la levadura Candida albicans.

2.3.5.- Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck); utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los sistemas eluyentes y los reactivos reveladores empleados se resumen en el cuadro 2.5.

Cuadro 2.4. - Resumen del fraccionamiento biodirigido via cromatografia en columna del extracto cloroformo:metanol de R. latipaliaris.

| ELUYENTE | PROPORCION | FRACCIONES COMBINADAS |
|---------------------|------------|-----------------------|
| Hexano | 100 | 1-34 |
| Hexano | 100 | 35-54 |
| Hexano: Cloroformo | 90:10 | 55-60 |
| Hexano: Cloroformo | 90:10 | 61-68 |
| Hexano: Cloroformo | 80:20 | 69:90 |
| Hexano: Cloroformo | 80:20 | 91-140* |
| Hexano: Cloroformo | 70:30 | 141-147 |
| Hexano: cloroformo | 70:30 | 148-199* |
| Hexano: Cloroformo | 60:40 | 200-208 |
| Hexano: Cloroformo | 60:40 | 209-225 |
| Hexano: Cloroformo | 50:50 | 226-249* |
| Cloroformo | 100 | 250-258 |
| Cloroformo | 100 | 259-269 |
| Cloroformo: Metanol | 90:10 | 270-272 |
| Cloroformo: Metanol | 90:10 | 273-286* |
| Cloroformo: Metanol | 90:10 | 287-291 |
| Cloroformo: Metanol | 80:20 | 292-320 |
| Metanol | 100 | 321-322 |

* Fracciones activas contra Artemia salina.

2.3.6. - Aislamiento y purificación de los compuestos:

Obtención de la Ratibinolida I (36):

Las fracciones combinadas 148-198 (16.3 g) de la columna original (ver Cuadro 2.4) se recromatografiaron en una columna de

gel de sílice (420 g); como eluyentes se emplearon hexano, hexano:cloroformo, cloroformo, cloroformo:metanol y metanol en diferentes proporciones, se recogieron un total de 314 fracciones de 100 ml cada una (Cuadro 2.6); cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina. De los eluatos secundarios 112-120 cristalizaron 17 mg (0.0063 %) de un polvo blanco idéntico en todos los aspectos a la ratibinólida I (Rojas 1990; Rojas 1991).

Obtención de la Ratibinólida II (37):

De las fracciones secundarias 155-171 y 155-198 del Cuadro 2.6 se obtuvieron 30 mg (0.0011 %) de un sólido cristalino. El sólido fue posteriormente purificado por cromatografía en capa fina utilizándose placas de gel de sílice y como eluyente el sistema III del Cuadro 2.5. (CHCl₃:MeOH 7:3). Finalmente, se obtuvieron 18 mg de un polvo cristalino blanco de punto de fusión 276-280°C, idéntico a la la Ratibinólida II. El producto fue recrystalizado sucesivamente hasta obtener cristales adecuados para análisis de Rayos X. La mezcla de disolventes utilizada para las recrystalizaciones fue hexano:acetona 6:4.

Obtención del β -sitosterol (38):

De las fracciones combinadas 121-124 del Cuadro 2.6 y de las aguas madres de las fracciones 155-198 (inciso anterior) cristalizaron 877.3 mg de una sustancia con punto de fusión 140-142°C, identificado como β -sitosterol por comparación con una muestra de referencia.

Cuadro 2.5.- Sistemas de elución y reactivos cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

| Sistemas de eluyentes | Composición | Proporción | Referencia |
|-----------------------|---|-------------|--------------------------|
| I | Eter isopropílico Tolueno Diclorometano | 1 1 1 | Elmaverer et al 1987. |
| II | Cloroformo Metanol | Diversas | _____ |
| III | Hexano: Cloroformo | Diversas | _____ |
| IV | Acetona: Agua | 9:1 | Anaya et al. 1990. |
| V | Cloroformo: Metanol: Agua | 60:13:1 | Anaya et al 1990. |

| REACTIVO | COMPOSICION DEL AGENTE CROMOGENO | REFERENCIA |
|---------------------|---|------------|
| I.- Sulfato cérico* | 12 g sulfato cérico 22.2 ml H ₂ SO ₄ conc. 350 g de hielo picado | Sthal 1969 |
| II.- Anisaldehido* | 0.5 ml anisaldehido 9 ml de etanol 0.5 ml de H ₂ SO ₄ con. 1 ml Acido acético. | Sthal 1969 |

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

Cuadro 2.6. Recromatografía en columna de gel de sílice de las fracciones primarias 148-198 (ver cuadro 2.4):

| ELUYENTE | PROPORCION | F R A C C I O N E S | |
|--------------------|------------|---------------------|------------|
| | | RECOGIDAS | COMBINADAS |
| Hexano | 100 | 1-44 | 1-32 |
| | | | 33-57 |
| Hexano: Cloroformo | 90:10 | 45:65 | 58-62 |
| | | | 63-65 |
| Hexano: cloroformo | 80:20 | 66-107 | 66-78 |
| | | | 79-88 |
| | | | 89-96 |
| | | | 97-111 |
| Hexano: cloroformo | 70:30 | 108-215 | 112-120 |
| | | | 121-154 |
| | | | 155-198 |
| | | | 199-210 |
| Hexano: cloroformo | 60:40 | 216:235 | 211-226 |
| | | | 227-237 |
| Hexano: Cloroformo | 50:50 | 236-275 | 238-247 |
| | | | 248-268 |
| Cloroformo | 100 | 276-295 | 269-277 |
| | | | 278-281 |
| Clorformo: Metanol | 80:20 | 296-314 | 282-314 |

Obtencion de la Hispidulina (40):

De las fracciones 226-249, 250-258 y 259-269 de la columna original (Cuadro 2.4) precipitaron 411.5 mg de un polvo amarillo de punto de fusión 290-292°C. De las fracciones 151-168 de la columna IV (Cuadro 2.7) se obtuvieron 55 mg adicionales de este producto.

Obtención del glucosido del β -sitosterol (41) y de la pedalitina (42).

De las fracciones 273-286 de la columna original (Cuadro 2.4) precipitaron 285 mg de un polvo blanco con un punto de fusión $243-246^{\circ}\text{C}$, idéntico en todos los aspectos a una muestra auténtica del β -D-glucositosterol.

Las aguas madres de las fracciones 273-286 (8 g) fueron recromatografiadas en columna utilizando como adsorbente 120 g de gel de sílice (60 Merck malla 70-230 mm) y como eluyentes hexano y mezclas de hexano:cloroformo, cloroformo, cloroformo:metanol y metanol (Cuadro 2.7.). Se recogieron un total de 335 fracciones, cada fracción de 50 ml.

De las fracciones 170-216 de esta columna (Cuadro 2.7) precipitaron 91 mg de un polvo amarillo (42) de punto de fusión $247-251^{\circ}$, soluble en metanol.

Obtención de la $2-\alpha-\beta$ -D-glucopiranosil $\Delta^{1(10),4(5)}$ germacrendien- $6\alpha,7\beta,11\beta,12$ - olida. (43).

Las fracciones secundarias 235-310 del Cuadro 2.7 consistían fundamentalmente de un producto y para separarlo de la mezcla se sometió a una cromatografía preparativa en placa de gel de sílice utilizando el sistema de eluyentes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 85:15. Como resultado de este proceso se obtuvieron 176 mg de un sólido cristalino de punto de fusión $155-158^{\circ}\text{C}$.

Cuadro 2.7.-Recromatografía en columna de las fracciones primarias 273-286 (Cuadro 2.4).

| ELUYENTE | PROPORCION | FRAC. COMBINADAS. |
|---------------------|------------|-------------------|
| Hexano | 100 | 1-11 |
| Hexano: cloroformo | 95:05 | 12-31 |
| Hexano: cloroformo | 90:10 | 32-40 |
| Hexano: cloroformo | 80:20 | 41-53 |
| Hexano: cloroformo | 50:50 | 54-96 |
| Cloroformo: hexano | 70:30 | 97-117 |
| Cloroformo: hexano | 90:10 | 118-127 |
| Cloroformo | 100 | 128-150 |
| Cloroformo: metanol | 98:02 | 151-168 |
| Cloroformo: metanol | 97:03 | 169-234 |
| | | 235-310 |
| Cloroformo: metanol | 95:05 | 311-335 |

2.3.7.- Caracterización de los compuestos aislados:

2.3.7.1.- Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Los espectros de U.V. se registraron en un instrumento Beckman DU-7; los espectros de I.R. se obtuvieron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin Helmer modelo 599B en pastilla de KBr y en solución (utilizando como disolvente CHCl_3 o MeOH).

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica de 300 MHz y de ^{13}C de 75 MHz se determinaron en un instrumento Varian VXR-300s (Instituto de Química UNAM), utilizando como disolvente CDCl_3 , Py-d_5 , MeOD o benceno- d_6 y como referencia interna TMS.

Los espectros de masas se determinaron en un instrumento Hitachi Perkin-Helmer RMU-GD (Instituto de Química UNAM) y en el aparato Finigan MAT 90 de la Universidad de Illinois, por el Doctor Douglas Kinghorn.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jones, y se reportaron sin corregir. El análisis de Rayos X se realizó en un Difractómetro Nicolet R 3m cm Radiación Cu-K_α (λ = 1.54178Å), en el Instituto de Química, UNAM.

2.3.7.2.- Obtención de los derivados acetilados de los compuestos 42 y 43.

Para formar los derivados acetilados de los compuestos 42 y 43, se utilizó un ml de piridina y un ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 hrs y, al término de este tiempo, los productos acetilados fueron separados por el método convencional (Shriner, Fuson-Curtin, 1980). Se acetilaron 23 mg del compuesto 42, obteniéndose 15 mg del derivado acetilado 42a con un punto de fusión 181-183°. Del compuesto 43 se acetilaron 54 mg, obteniéndose 43.5 mg del derivado 43a, bajo la forma de un aceite.

2.3.7.3.- Hidrólisis del compuesto 43.

Hidrólisis ácida: obtención del derivado 43c.

Por cada 10 mg de compuesto se añadió 2 ml de HCl 2N. La mezcla se mantuvo a reflujo durante 2 hr. Al cabo de este tiempo, la solución se extrajo dos veces con 20 ml de acetato de etilo. La fase acuosa remanente se pasó por una columna intercambiadora de iones básica (intercambiador de aniones débilmente alcalino II

Merck) con la finalidad de neutralizar la solución. La solución resultante se utilizó para la detección cromatográfica de azúcares.

La glucosa se detectó mediante una cromatografía en capa fina (gel de sílice 60 F₂₅₄) previamente rociada con H₃BO₃ 0.036M, utilizando los sistemas de elución IV y V y el agente cromógeno II del cuadro 2.5. En todos los casos se utilizaron patrones de azúcares adquiridos comercialmente de la casa Merck : LC(+)-ramnosa, LC(+)-arabinosa, DC(-)-fructosa, DC(+)-galactosa, DC(+)-glucosa, DC(+)-lactosa, DC(+)-xilosa.

La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua destilada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Posteriormente, se concentró al vacío obteniéndose una sustancia aceitosa la cual se purificó por cromatografía preparativa en capa delgada de gel de sílice, utilizando CHCl₃:MeOH 99:01 como eluyente y el agente I como reactivo visualizador (Cuadro 2.5). Luego del proceso de purificación se obtuvieron 28 mg de un producto aceitoso 43c, el cual resulto homogéneo en diversos análisis mediante cromatografía en capa fina (ccf).

Hidrólisis enzimática con celulasa: Obtención del derivado 43b.

A 100 mg del compuesto 43 se adicionaron 10 ml de agua destilada y 20 mg de celulasa (Sigma tipo I). La mezcla se dejó a 36°C durante 72 hrs. El término de la hidrólisis se verificó mediante cromatografía en capa fina utilizando el sistema II y el agente cromógeno I (Cuadro 2.5). Al cabo de este tiempo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y al concentrar al vacío se obtuvieron 26 mg del producto 43b. La detección del azúcar se realizó en la fase acuosa de la misma forma como se describió en el inciso anterior.

Hidrólisis enzimática con β -glucosidasa.

A 10 mg del compuesto 43 se agregaron 2 ml de agua destilada con 10 mg de β -glucosidasa (Sigma tipo II). La mezcla de reacción se incubó a 36°C durante 76 hrs. El término de la hidrólisis se verificó mediante cromatografía en capa fina utilizando el sistema II y el agente cromógeno I (Cuadro 2.5). La mezcla se extrajo dos veces con 20 ml de acetato de etilo. De la fase orgánica se obtuvo la aglicona 43b como un sólido vítreo y de la fase acuosa se identificó el azúcar de la misma forma que en la hidrólisis ácida.

2.3.7.4.- Acetilación del compuesto 43c.

Por cada 100 mg de compuesto, se empleó 1. ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 hrs y al término de este tiempo, el producto acetilado se separó por el método convencional (Shriner, Fuson-Curtin, 1980); 17 mg del compuesto 43b se acetilaron obteniéndose 8 mg del producto acetilado 43d como un sólido amorfo, de punto de fusión 119-120°.

2.4.- Resultados y Discusión.

2.4.1.- Evaluaciones biológicas preliminares.

Al extracto de Ratibida latipaliaris preparado mediante una mezcla de CHCl_3 :MeOH (1:1) se le determinó la toxicidad para Artemia salina Leach y la potencialidad antimicrobiana en contra de la levadura Candida albicans y de bacterias Gram positivas y Gram negativas. En los dos casos se obtuvieron resultados positivos (ver Cuadro 2.8 y 2.9). Los resultados de la evaluación de la toxicidad para Artemia salina (Cuadro 2.8) se encuentran expresados en términos de la dosis letal media (LC_{50}) y en el caso de las pruebas antimicrobianas (Cuadro 2.9) en términos de diámetros de inhibición del crecimiento microbiano. Las evaluaciones seleccionadas ofrecen las ventajas de ser rápidas, de bajo costo y requerir poca cantidad de muestra. La determinación de la toxicidad para Artemia salina se ha empleado en varias ocasiones como guía para conducir el fraccionamiento y aislamiento de sustancias bioactivas, las cuales en múltiples ocasiones han mostrado citotoxicidad in vitro para células cancerígenas (Anderson et al. 1991); actividad antihelmíntica (Camacho, 1990) y antipalúdica (Hui et al., 1989; Hostettmann, 1982; Martson, 1991). En lo que se refiere a la determinación de la actividad antimicrobiana, los microorganismos de prueba empleados se eligieron de acuerdo a los criterios convencionales (Mistcher et al., 1982). Con excepción de Bacillus subtilis, todos los demás microorganismos son huéspedes normales del hombre; aunque bajo ciertas condiciones pueden llegar a presentar patogenicidad (Pelczar, 1982).

El extracto activo se fraccionó vía una cromatografía preparativa en columna (Cuadro 2.4, sección experimental). Las

Cuadro 2.8.- TOXICIDAD PARA Artemia salina DEL EXTRACTO Y
FRACCIONES DE Ratibida latipaliaris.

| MUESTRA OBJETO DE EVALUACION. | LC ₅₀ (µg/ml) | COMPUESTO AISLADO |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|
| EXTRACTO | 366.6 | _____ |
| FRACCIONES PRIMARIAS | | |
| 1 -34 | >1000 | _____ |
| 35 -54 | >1000 | _____ |
| 55 -60 | >1000 | _____ |
| 61 -68 | >1000 | _____ |
| 69 -90 | >1000 | _____ |
| 91 -140 | 68.64 | _____ |
| 141-147 | >1000 | _____ |
| 148-199 | 251.135 | <u>36</u> |
| | | <u>37</u> |
| 200-208 | >1000 | _____ |
| 209-225 | >1000 | _____ |
| 226-249 | 215.0 | <u>40</u> |
| 250-258 | >1000 | _____ |
| 259-269 | >1000 | _____ |
| 270-272 | >1000 | _____ |
| 273-286 | 761.3 | <u>41</u> |
| | | <u>42</u> |
| | | <u>43</u> |
| 287-291 | >1000 | _____ |
| 292-320 | >1000 | _____ |
| 321-322 | >1000 | _____ |

Cuadro 2.9.- POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO, FRACCIONES PRIMARIAS Y COMPUESTOS AISLADOS DE Ratibida latipaliaris.

DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm).

| COMPUESTO | <u>Staphylococcus aureus</u> | <u>Bacillus subtilis</u> | <u>Pseudomona aeruginosa</u> | <u>Escherichia coli</u> |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| ESTREPTOMICINA | | | | |
| 100 µg | 7 | 12 | 9 | 7 |
| EXTRACTO | | | | |
| 100 µg | 5 | 8 | 5 | 3 |
| FRACCIONES | | | | |
| <u>91-140</u> 50 µg | - | - | - | - |
| 100 µg | 2 | - | - | - |
| <u>148-199</u> 50 µg | 5 | 4 | - | - |
| 100 µg | 3 | 6 | - | - |
| <u>226-249</u> 50 µg | - | 4 | - | - |
| 100 µg | - | 6 | - | - |
| <u>273-286</u> 50 µg | - | 1 | - | - |
| 100 µg | - | 3 | - | - |
| COMPUESTOS AISLADOS | | | | |
| <u>40*</u> 50 µg | 4.5 | 8 | - | - |
| 100 µg | 6.5 | 11 | - | - |
| <u>42</u> 50 µg | - | 2 | - | - |
| 100 µg | - | 4 | - | - |
| <u>43</u> 50 µg | - | - | - | - |
| 100 µg | - | - | - | - |

* Rojas et al. 1990.

Cuadro 2.9. - Continuación.

DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION CmmD.

| COMPUESTO | <u>Candida albicans</u> | |
|-------------------|-------------------------|---|
| NISTATINA | | |
| 100 μ g | | 9 |
| EXTRACTO | | |
| 100 μ g | | 6 |
| FRACCIONES | | |
| <u>91-140</u> | 50 μ g | - |
| | 100 μ g | - |
| <u>148-199</u> | 50 μ g | - |
| | 100 μ g | - |
| <u>226-249</u> | 50 μ g | - |
| | 100 μ g | - |
| <u>273-286</u> | 50 μ g | - |
| | 100 μ g | - |

fracciones primarias combinadas de acuerdo al análisis cromatográficos en capa fina fueron evaluados biológicamente utilizando los mismos ensayos simples. Los resultados de estas evaluaciones se indican en los cuadros 2.8 y 2.9.

Las fracciones activas para el ensayo de Artemia salina, 91-140, 148-190, 226-238 y 273-286 del cuadro 2.4 se obtuvieron en cantidades adecuadas y por lo tanto fueron sujetas a estudios posteriores.

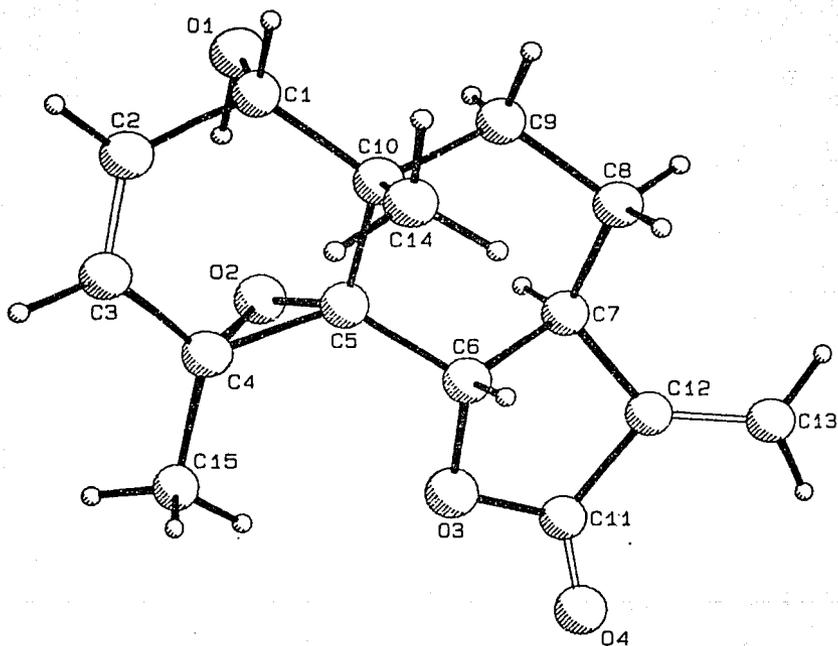
2.4.2. Estudio de las fracciones activas 148-199.

2.4.2.1. Obtención de la ratibinólida I, (36) ratibinólida II (37).

La recromatografía de las fracciones activas 148-199 (cuadro 2.6 sección experimental) permitió el aislamiento de la ratibinólida I (0.0006% de rendimiento) y de la Ratibinólida II 37 (0.0011% de rendimiento). Estos compuestos presentaron una LC_{50} de 62.749 $\mu\text{g/ml}$ y 69.53 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Ambas lactonas presentaron las mismas características físicas y espectroscópicas que las de una muestra auténtica obtenida previamente de la misma planta (Rojas *et al.*, 1990).

Cristalizaciones sucesivas del compuesto 37 permitió obtener cristales adecuados para el análisis de difracción de rayos X. En la Figura 2.2 se ilustra una vista estereoscópica de la ratibinólida II.

Como se desprende de la estructura de la Figura 2.2 la estereoquímica del grupo hidroxilo en el centro quiral C-1 resultó ser α y no β como había sido previamente determinado mediante un análisis de resonancia magnética nuclear protónica, utilizando reactivos de desplazamiento químico (Rojas, 1990). Por otra parte el anillo B adopta una forma de silla con el grupo metilo en C-10 en posición axial, en tanto que el anillo A y el anillo de 5

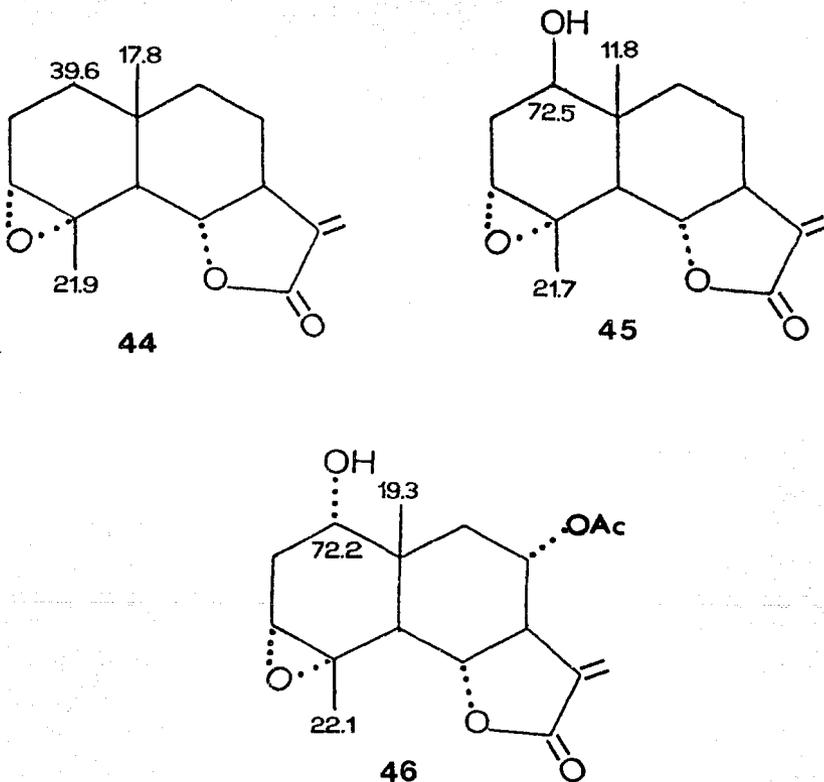
Figura 2.2. - Vista estereoscópica del compuesto 37.

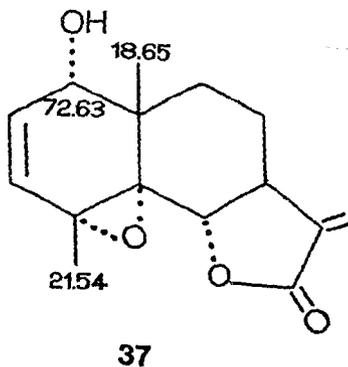
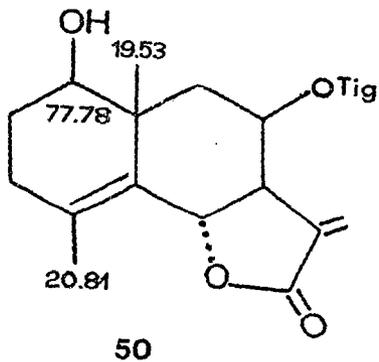
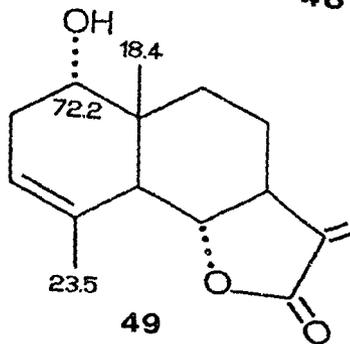
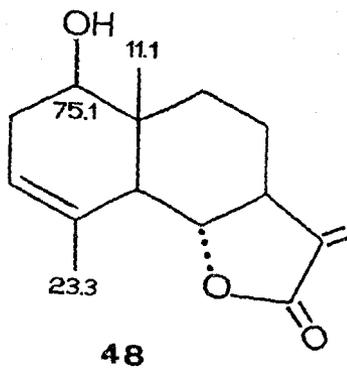
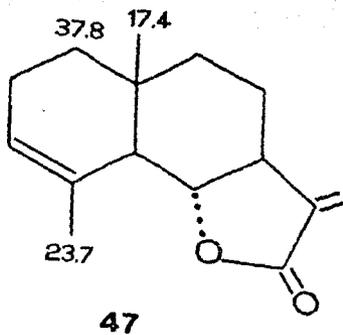
membros adoptan una conformación de semisilla.

La determinación inequívoca de la estructura de la ratibinólida II permitió concluir que el desplazamiento químico del metilo en C-10 en la resonancia magnética nuclear de ^{13}C de las eudesmanólidas que presentan una función epoxidica entre C-4 y C-5 y un sustituyente α orientado en el núcleo C-1 (caso de la ratibinólida II) es de magnitud similar que en las eudesmanólidas con doble ligadura o función epoxidica entre C-3 y C-4 y un sustituyente α orientado en C-1 (Da silva, et.al., 1981; Herz, et.al., 1983; Mata, et.al., 1984).

En la Figura 2.3 se ilustran varias eudesmanólidas con sustituyentes α orientados en C-1 y funciones epoxidicas o dobles ligaduras entre C-3 y C-4 y, en todos los casos, el desplazamiento químico de C-10 oscila entre 18.4 y 19.3 ppm, valores muy similares al observado para la ratibinólida II de 18.65 ppm. Estos valores no difieren mucho de los registrados para las eudesmanólidas sin sustituyentes en C-1 y con las características estructurales en C-3 y C-4 antes mencionados (véase compuestos 44 y 47 de la Figura 2.3, que se incluyen con fines comparativos). Por el contrario, en las eudesmanólidas que presentan sustituyente en C-1 con una orientación β (45), el desplazamiento del metilo en en C-10 sufre un efecto diamagnético debido a la interacción γ -gauche ejercido por el sustituyente en C-1 (Mata, et.al., 1983; Herz, et al., 1983; Da silva, et al., 1987). Los desplazamientos químicos observados para C-14 en los compuestos 47 y 49 de la Figura 2.3 con un doble enlace entre C-3 y C-4 ilustran este efecto. Sin embargo, cuando la doble ligadura o una función epoxidica está presente entre C-4 y C-5 (véase compuestos 50 y 37) y el sustituyente está α o β orientado (50) el metilo C-10 no se desplaza a campo alto. En el caso de la ratibinólida II (37) que presenta un epóxido entre C-4 y C-5 se pensó que seguía el mismo comportamiento que el compuesto 50, sin embargo es claro que sigue un comportamiento similar a los

Figura 2.3.- Desplazamientos químicos del C-14 en varias eudesmanólidas (Da Silva, et.al., 1981; Herz, et.al. 1983).

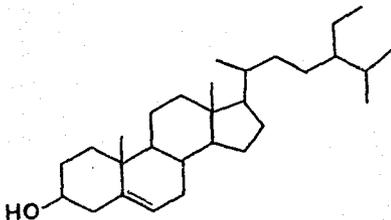




presentados por los compuestos 44 y 49. Por lo tanto, en eudesmanólidas sustituidas en C-1 con una función epóxidica entre C-4, C-5 y con una doble ligadura entre C-2 y C-3 el desplazamiento químico del metilo en C-10 puede ser utilizado como criterio para establecer la estereoquímica en el centro quiral C-1.

2.4.2.3.- Obtención del β -sitosterol (38).

De las fracciones secundarias 121-154 y 155-198 (Cuadro 2.6, sección experimental) se obtuvo el β -sitosterol (0.0324 % de rendimiento), idéntico en todos sus aspectos a una muestra patrón.

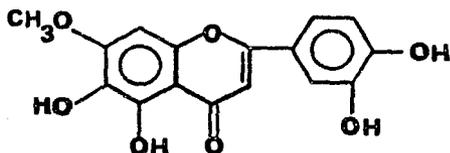


2.4.3.- Estudio de las fracciones activas 226-269.

2.4.3.1.- Obtención de la Hispidulina (40).

La recromatografía de las fracciones primarias 226-249 y de las fracciones 151-168 de la columna IV (Cuadro 2.4 y 2.7) precipitó una flavona que fue identificada como hispidulina (40) por comparación con una muestra auténtica (0.0152 % de rendimiento)

Cuadro 2.11.-Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 42.



Fórmula molecular : $C_{16}H_{12}O_7$

Peso molecular : 316

U.V. λ_{max} MeOH nm : 284, 348

(espectro 2.1) $AlCl_3$ nm : 295, 425

HCl nm : 285, 366

IR V_{max} (KBr) cm^{-1} : 3385, 3192, 2953, 1654, 1609, 1571, 1497,

(espectro 2.2) 1370, 1272, 1163.

E.M.I.E m/z (%) : 316 (100) M^+ , 315 ($M^+ - 1$), 301 ($M^+ - 15$),

288, 183, 182, 167, 154, 138, 137, 134

1H R.M.N (MeOD, δ) : 3.76 (s, $-OCH_3$)

300 MHz 6.5 (d, H-3, H-8)

(espectro 2.3) 7.35 (m, H-2', H-6')

6.9 (dd, H-5')

^{13}C R.M.N. (MeOD, δ): 184.76 (C-4), 166.9 (C-2), 159.27

(espectro 2.4) (C-4'), 155.1 (C-7) 151.1 (C-5) 147.5

(C-9), 124.2 (C-1' y C-6), 120.8 (C-6')

117.2 (C-8'), 114.6 (C-2'), 103.9 (C-3

y C-10), 95.7 (C-8) y 61.4 (OCH_3).

de este producto se incluyen en el Cuadro 2.11. El tratamiento del producto natural 42 con anhídrido acético y piridina permitió la obtención del derivado acetilado 42a cuyas constantes físicas y espectroscópicas se resumen en el Cuadro 2.12. La fórmula molecular del producto 42 se estableció como $C_{16}H_{12}O_7$ por espectrometría de masas. El espectro de UV (Espectro 2.1) presentó dos bandas de absorción características para flavonas, la banda II aparece en 284 nm y la banda I aparece en 345 nm (Markham 1985).

El espectro de IR (Espectro 2.2) presentó señales para hidroxilos fenólicos (3385 , 3192 y 1163 cm^{-1}), C-H (2953 cm^{-1}), carbonilo de γ -pirona (1654 cm^{-1}) y carbonos aromáticos (1600 , 1571 y 1497 cm^{-1}).

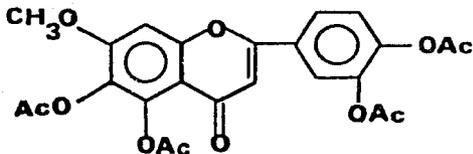
El espectro de resonancia magnética nuclear protónica (Espectro 2.3) mostró señales para:

- a) Un grupo metoxilo en 3.89 ppm.
- b) Dos protones en 6.5 ppm atribuibles a los protones H-3 y H-8 de una flavona.
- c) Tres protones aromáticos 6.9 (dd, $J = 8$ Hz) y 7.35 ppm (m) asignables a los hidrógenos H-2', H-3' y H-6' del anillo B de una flavona con sustituyentes oxigenados en C-3' y C-4'.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C (Espectro 2.4) presentó señales para 16 átomos de carbono en concordancia con la fórmula molecular establecida y mostró el perfil típico de una flavona (Mabry y Harbone, 1982); las resonancias se describieron de la siguiente manera:

- a) la señal observada a 184.76 ppm se asignó al grupo carbonilo de la γ -pirona.
- b) las cinco resonancias siguientes en 155.5, 151.5, 147.5, 142.2 y 159.5 ppm se asignaron a carbonos cuaternarios aromáticos unidos a grupos oxigenados.
- c) a campo más alto de la región aromática se observan señales para cuatro metinos aromáticos (128.8, 117, 114.6 y 95.7 ppm) y la resonancia característica de C-3 en 103.9 ppm.

Cuadro 2.12. - Constantes espectroscópicas del derivado acetilado (42a) del compuesto 42.



| | | |
|----------------------------------|---|--------------------------|
| Fórmula molecular | : | $C_{24}H_{20}O_{11}$ |
| Peso molecular | : | 484 |
| 1H R. M. N. (MeOD, δ) | : | 2.3-2.4 (s, 4 CH_3CO) |
| (espectro δ) | | 3.8 (s, OCH_3) |
| | | 6.8 (s, H-3) |
| | | 7.55 (s, H-8) |
| | | 7.94 (cm, H-2' y H-6') |
| | | 7.4 (s, H-5') |

d) las señales positivas en 155.1 y 106.2 ppm se asignaron a C-9 y C-10, respectivamente.

e) las señales positivas que se localizaron en 166.7 y 124.2 ppm fueron asignados a los carbonos 2 y 1'.

f) finalmente, la señal negativa en 81.45 ppm se asignó a un grupo metoxilo.

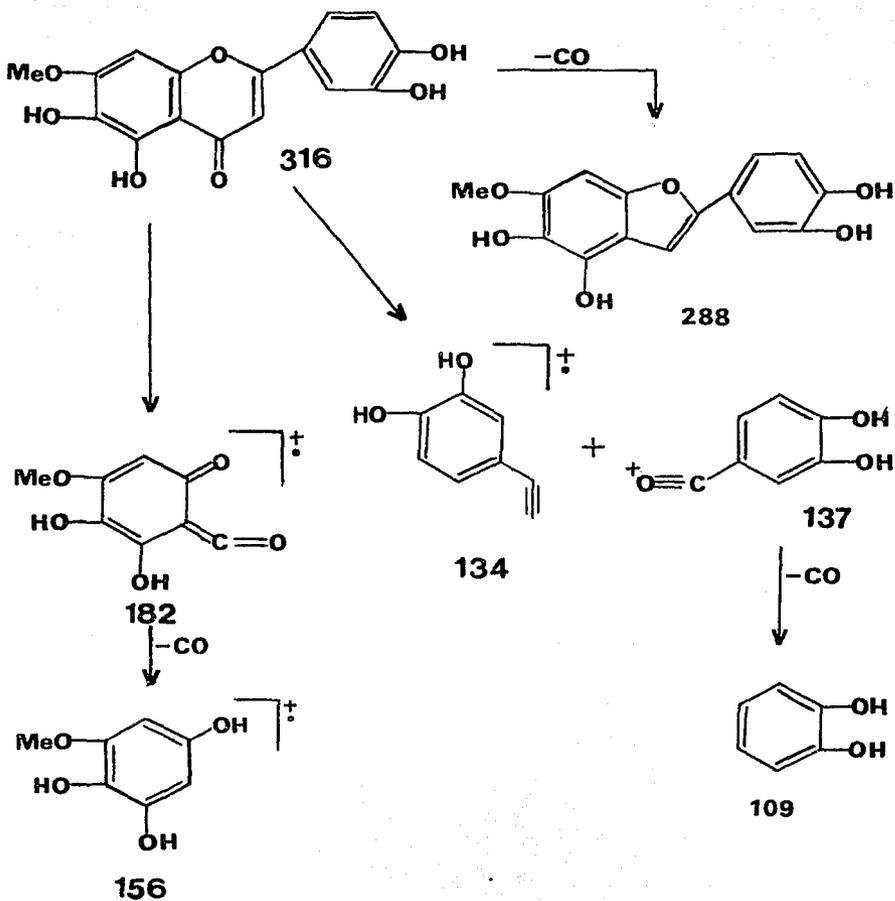
El espectro de masas presentó fragmentos a m/z 315 (M-1), m/z 301 (M⁺-15) 182, 167, 139, 137 y 134. Los fragmentos a m/z 182 y 167 permitieron determinar que el grupo OCH₃ se localizaba en la posición 7 del esqueleto base y confirmaban que en el anillo B se encontraban dos grupos hidroxilos (Harbone, 1975; MarcKham, 1985). En la Figura 2.4 se muestran los fragmentos más importantes.

La presencia de los grupos hidroxilos en C-5, C-6, se confirmó cuando al registrar el espectro de U.V. en presencia de AlCl₃, se observó un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción I y II (Cuadro 2.13). El AlCl₃ forma quelatos con los grupos funcionales 5-hidroxi-4-ceto y orto-dihidroxi presentes en la molécula del producto natural. Esta reacción provoca un cambio batocrómico de las bandas I y II en espectros de U.V. (Jurd, 1962; Mabry, 1970). La estabilidad de estos quelatos han sido estudiados ampliamente (Mabry, 1970; Jurd, 1969), habiéndose establecido que en presencia de HCl el quelato formado entre el sistema 5-hidroxi-4-ceto es más estable que el quelato formado en el sistema orto-dihidroxi.

Como al agregar HCl se observo solamente la regeneración de la banda I se concluyo inequívocamente que los otros dos grupos hidroxilos se localizaban en disposición orto y muy probablemente en los carbonos C-3' y C-4'.

Además en presencia de un grupo OH en C-5 y la ausencia de un OH en C-3, la banda I sufre un cambio batocrómico de 35 a 55 nm al adicionar AlCl₃/HCl (Jurd, 1962; Mabry, 1970). Cuando existe un grupo OH en C-6 que es el caso que se presenta en el producto 42 el cambio de la banda I es de 17-20 nm (Mears y Mabry, 1972).

Figura 2.4.- Fragmentos mas importantes del espectro de masas del compuesto 42 (Pedalitina).



Cuadro 2.13.- Efecto batocrómico de las bandas I y II del compuesto 42 (pedalitina) en el espectro de U.V. presencia de AlCl_3/HCl (ver espectro 2.1).

| Disolvente | Banda I | Banda II |
|-----------------|--------------|-----------------------|
| MeOH | 256(ch), 284 | 348 |
| AlCl_3 | 246(ch), 294 | 302(ch), 343(ch), 425 |
| HCl | 280(ch), 285 | 366 |

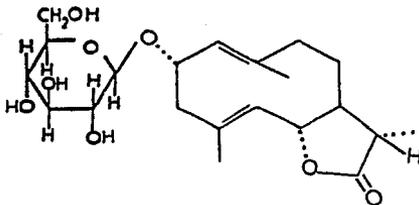
La presencia de los grupos hidroxilos en la molécula fue confirmado químicamente al acetilar el compuesto 42 con piridina y anhídrido acético, obteniéndose un derivado tetraacetilado; en el espectro de resonancia magnética nuclear protónica (Espectro 2.5) se observaron 4 señales simples en 2.3 ppm que corresponden a los 15 protones de los 4 grupos acetatos de la molécula. Con base en el análisis presentado anteriormente y la comparación de datos observados con los de una serie de flavonas descritas en la literatura, se identificó al producto natural 42 como la 5,6,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxi-flavona (pedalitina) la cual constituye la porción aglicona de un glicósido aislado de una especie Eupatorium y de Sesamum indicum (Kupchan, 1969).

Al realizarle la prueba de toxicidad para Artemia salina esta flavona presentó una $LC_{50} > 1000\text{ppm}$ y presentó moderada actividad antimicrobiana contra Bacillus subtilis. (Cuadro 2.8 y 2.9) obteniéndose halos de inhibición de 4 y 2 mm de diámetro a una concentración de 100 y 50 ppm, respectivamente.

2.4.4.3.- Obtención y caracterización de 2- α - β -D-glucopiranosil- $\Delta^1(10),4(5)$ germacradien-6 α ,7 β ,11 β -ólida (43).

Sucesivas cromatografías en capa delgada de las fracciones secundarias 235-310 de la columna IV (Cuadro 2.7, sección experimental), permitieron el aislamiento de un compuesto cristalino de color blanco, con punto de fusión 155-158 $^{\circ}$ en un rendimiento de 0.0065 % en relación al peso de la planta seca. En el Cuadro 2.14 se resumen sus constantes físicas y los datos de IR, y espectrometría de masas. Su fórmula molecular se estableció como $C_{21}H_{32}O_8$ por espectrometría de masas de tipo FAB de alta resolución, modalidades positivo y negativo. En el espectro de FAB negativo (Espectro 2.6) el ión molecular se encontró en m/z 411 ($M - HD^-$); también se observaron fragmentos importantes a m/z 503 ($M - H + glicero$) $^-$, m/z 595 ($M - H + 2$

Cuadro 2.14. - CONSTANTES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL COMPUESTO
43.



POLVO CRISTALINO DE COLOR BLANCO.

SOLUBLE EN SOLVENTES POLARES.

FORMULA MOLECULAR: $C_{21}H_{32}O_8$

P.F. 153-155°C

PRUEBA DE MOLISCH: POSITIVA

I.R. (Sol.) cm^{-1} : 3400-3300, 2910, 1770, 1150-1050.

E.M. FAB negativo m/z : 411 ($M^+ - HD^-$)

503 ($M-1 + glicerol^-$)

595 ($M-1 + 2 glicerol^-$)

E.M. FAB positivo m/z : 597 ($M + H + 2 glicerol^+$)

505 ($M + H + glicerol^+$)

251 (aglicona + HD^+)

233 (aglicona - H_2O^+)

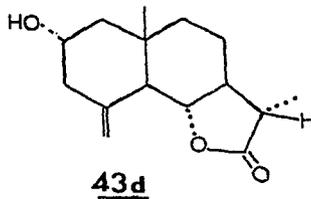
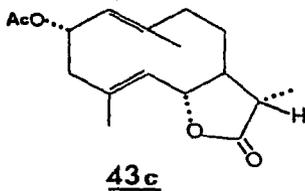
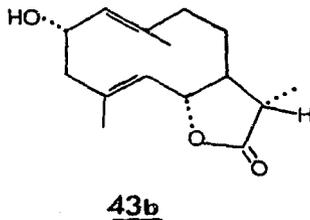
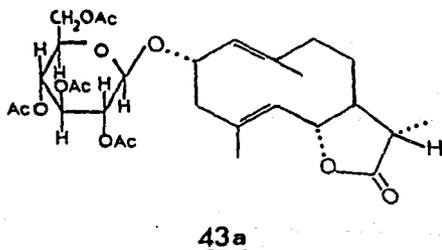
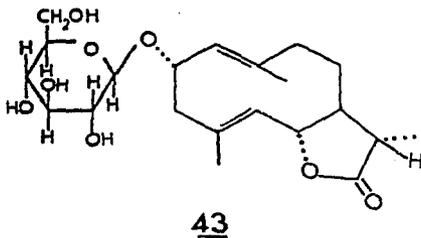
glicerol)⁻. En el espectro FAB positivo (Espectro 2.7) se registraron iones a m/z 597 ($M + H + 2 \text{ glicerol}$)⁺, 505 ($M + H + \text{ glicerol}$)⁺, 251 (aglicona + H), 233 ($M^+ - H_2O - \text{ glucosa}$)⁺. La solubilidad del compuesto 43 en disolventes de alta polaridad y su comportamiento (reacción positiva) frente al reactivo de Molisch sugirieron su naturaleza glicosídica, misma que fue confirmada posteriormente mediante la hidrólisis del producto natural en condiciones ácidas (HCl 1 N) y enzimáticas (celulasa y β -glucosidasa). En ambos casos se detectó a la glucosa mediante cromatografía en capa fina como único carbohidrato presente en los productos de hidrólisis.

Durante el proceso de caracterización del compuesto 43 se realizaron varias reacciones que se indican en el transcurso de la discusión y que permitieron la obtención de los derivados siguientes: 43a (glicósido acetilado), 43b (aglicona obtenida por hidrólisis enzimática), 43c (aglicona 43b acetilada) y 43d (aglicona obtenida por hidrólisis ácida), las estructuras de estos compuestos se indican en la Figura 2.5 y las constantes espectroscópicas de estos derivados se resumen en los Cuadros 2.15 y 2.16 (RMN-H' y RMN ¹³C).

El espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C (Espectro 2.8, Cuadro 2.15) del producto natural 43 presentó señales para 21 átomos de carbono en armonía con la fórmula molecular. Las señales en 100 (C-1'), 73 (C-2'), 75.4 (C-3'), 69.8 (C-4'), 76.30 (C-5') y 61.30 (C-6') ppm se asignaron a los carbonos de la β -D-glucosa por comparación con modelos adecuados (Miyase, 1987; Ohmura, 1989; Shimizu, 1989; Uchiyama, 1989; Shekhani, 1990). Las quince resonancias restantes debían corresponder a la porción de la aglicona de la molécula y se discriminaron de la siguiente forma:

- a) la señal positiva a 177.9 ppm al carbonilo de una lactona en anillo de cinco miembros (Marco, 1991).
- b) las absorbancias en 140.4, 139.70, 128.80 y 127.2 ppm (las dos primeras positivas y las dos últimas negativas en el espectro de

Figura 2.5. - Productos de hidrólisis ácida (43d) y enzimática (43b) y derivados acetilados (43a y 43c) del compuesto 43.



Cuadro 2.15.- Constantes espectroscópicas de RMN protónica y ^{13}C de los compuestos 43 y 43a.

| Protones | <u>43</u> | <u>43a</u> |
|--------------------|----------------------|-------------------------|
| H-1 | 4.88-5.00 m | 4.85 da (9.46 Hz) |
| H-2 | 4.88-5.00 m | 4.7 dddd (9.9, 5.5 Hz) |
| H-3 α | 2.62 dd (11, 4.8 Hz) | 2.64 dd (11.3, 4.8 Hz) |
| H-3 β | 2.15 m | ----- |
| H-5 | 4.88-5.00 m | 4.73 da (10.3 Hz) |
| H-6 | 4.53 dd (10, 8.9 Hz) | 4.51 dd (10, 8.9 Hz) |
| H-7 | 1.63 m | 1.65 m |
| H-11 | 2.20 m | 2.25 dc (12.1, 7 Hz) |
| H-13 | 1.24 d (7 Hz) | 1.26 (7 Hz) |
| H-14 | 1.49 s | 1.51 s |
| H-15 | 1.72 s | 1.72 s |
| H-1' | 4.41 d (8 Hz) | 4.63 d (8Hz) |
| H-2' | 3.2-3.5 m | 5.07 dd (9.3, 8.0 Hz) |
| H-3' | 3.2-3.5 m | 5.19 dd (9.3 Hz) |
| H-4' | 3.2-3.5 m | 4.99 dd (9.3, 8.0 Hz) |
| H-5' | 3.2-3.5 m | 3.67 m |
| H-6' | 3.82 sa | 4.23 dd (13.1, 5.03 Hz) |
| H-6'' | 3.4 m | 4.15 d (13.1 Hz) |
| CH ₃ CO | ----- | 2.01 s |
| CH ₃ CO | ----- | 2.02 s |
| CH ₃ CO | ----- | 2.05 s |
| CH ₃ CO | ----- | 2.08 s |

Tabla 2.15. Continuación.

| Carbono | <u>43</u> | <u>43a</u> |
|------------------------------------|-----------|------------|
| C-1 | 127.28 | 127.80 |
| C-2 | 73.60 | 71.80 |
| C-3 | 45.60 | 46.0 |
| C-4 | 140.4 | 141.5 |
| C-5 | 128.8 | 129.40 |
| C-6 | 80.7 | 81.0 |
| C-7 | 54.4 | 55.0 |
| C-8 | 27.7 | 28.23 |
| C-9 | 40.60 | 41.0 |
| C-10 | 139.70 | 139.9 |
| C-11 | 41.7 | 42.2 |
| C-12 | 177.90 | 178.10 |
| C-13 | 12.7 | 13.2 |
| C-14 | 16.6 | 17.0 |
| C-15 | 17.9 | 18.3 |
| C-1' | 100.0 | 98.5 |
| C-2' | 73.0 | 71.8 |
| C-3' | 75.4 | 71.8 |
| C-4' | 69.8 | 68.6 |
| C-5' | 76.3 | 72.9 |
| C-6' | 61.3 | 62.0 |
| $\underline{\text{CH}}_3\text{CO}$ | — | 20.70 |
| $\underline{\text{CH}}_3\text{CO}$ | — | 20.60 |
| $\underline{\text{CH}}_3\text{CO}$ | — | 20.59 |
| $\text{CH}_3\underline{\text{CO}}$ | — | 169.2 |
| $\text{CH}_3\underline{\text{CO}}$ | — | 169.3 |
| $\text{CH}_3\underline{\text{CO}}$ | — | 170.2 |
| $\text{CH}_3\underline{\text{CO}}$ | — | 170.5 |

Cuadro 2.16.- Constantes espectroscópicas de RMN protónica y de ^{13}C de los compuestos 43b, 43c y 43d.

| Protones | 43b | 43c | 43d | |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | CDCl_3 | Benceno | |
| H-1 | 4.94 da (9.9 Hz) | 4.92 da (9.9 Hz) | 4.69 da (9.9 Hz) | 1.3 y 1.9 m |
| H-2 | 4.68 dddd (9.9, 5.5 Hz) | 5.62 dddd (10.0, 5.5 Hz) | 5.64 dddd (10.0, 5.5 Hz) | 3.92 dddd (12.5, 5.3 Hz) |
| H-3 α | 2.64 dd (11.2, 5.5 Hz) | 2.67 dd (11, 5 Hz) | 2.48 dd (10.8, 5 Hz) | 2.71 ddd (12.5, 5.3 Hz) |
| H-3 β | 2.05 dd (11 Hz) | 2.10 m ————— | 2.0 t (11.0 Hz) | 2.01 dd (12.5 Hz) |
| H-5 | 4.83 da (10 Hz) | 4.89 da (10 Hz) | 4.49 da (10 Hz) | 2.15 d (11.1 Hz) |
| H-6 | 4.52 dd (10, 8.8 Hz) | 4.52 dd (10, 8.8 Hz) | 3.88 t (10, 9 Hz) | 3.99 dd (10.6 Hz) |
| H-7 | 1.67 m | 1.65 m | 1.62 m | 1.68 m |
| H-11 | 2.25 dc (12.0, 7 Hz) | 2.25 dc (12, 7 Hz) | 1.65 dc (12, 7 Hz) | 2.36 dc (12, 7 Hz) |
| H-13 | 1.26 d (7 Hz) | 1.26 da (7 Hz) | 1.03 da (7 Hz) | 1.25 d (7 Hz) |
| H-14 | 1.48 sa | 1.56 s | 1.21 s | 0.89 s |
| H-15 | 1.73 d (1.4 Hz) | 1.75 s | 1.33 s | 5.05 y 4.9 (13 Hz) |
| CH_3CO | ————— | 2.06 s | 1.73 s | ————— |

Cuadro 2.16. Continuación.

| Carbono | 43b | 43c | 43d |
|------------------------|--------|-------|--------|
| C-1 | 129.3 | 126.4 | 29.70 |
| C-2 | 69.30 | 73 | 67.2 |
| C-3 | 48.8 | 45.1 | 50.6 |
| C-4 | 140.5 | 139.6 | 141.7 |
| C-5 | 130.5 | 130.5 | 53.70 |
| C-6 | 81.2 | 81.0 | 79.50 |
| C-7 | 54.9 | 55.0 | 52.60 |
| C-8 | 28.40 | 28.3 | 22.8 |
| C-9 | 41.0 | 41.0 | 37.90 |
| C-10 | 137.60 | 139.2 | 145.70 |
| C-11 | 42.20 | 42.1 | 41.10 |
| C-12 | 178.30 | 178.1 | 179.40 |
| C-13 | 13.20 | 13.2 | 12.50 |
| C-14 | 17.20 | 17.1 | 18.80 |
| C-15 | 18.50 | 18.3 | 111.40 |
| CH_3CO | ---- | 21.2 | ---- |
| CH_3CO | ---- | 170.5 | ---- |

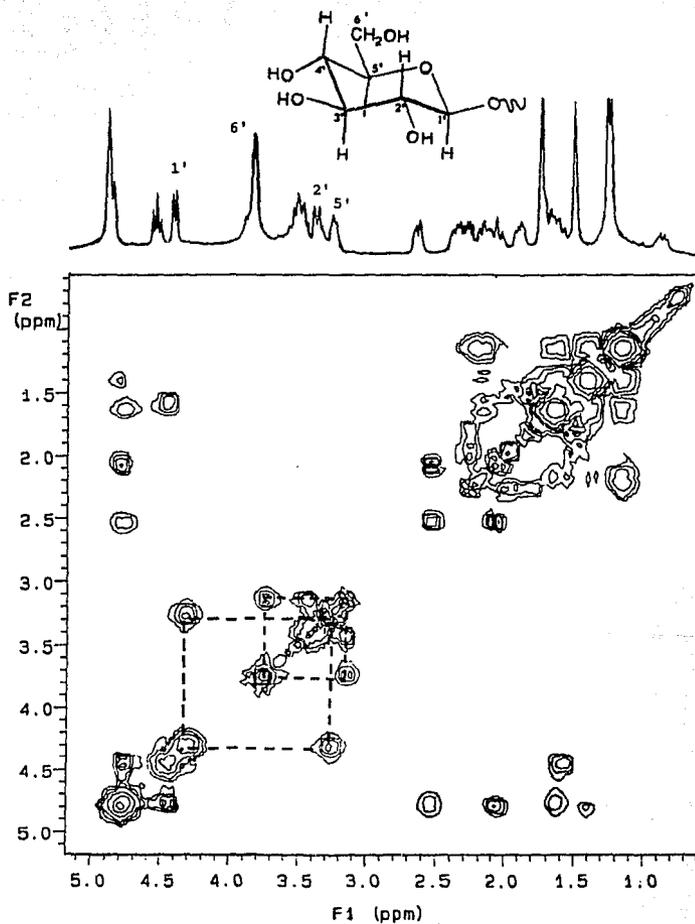
APT) corresponden a los carbonos de dos dobles ligaduras trisustituidas.

c) las resonancias negativas a 80.70 y 73.60 ppm se asignaron a los carbonos bases de funciones oxigenadas secundarias. De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico la señal en 80.70 pp debía corresponder a la de una función lactónica y etérea, respectivamente.

d) las resonancias negativas a 12.7 y 16.6 y 17.9 ppm se asignaron a tres metilos y las cinco señales restantes a tres metilenos (45.6, 27.7 y 40.6 ppm) y dos metinos (54.4 y 41.7 ppm, señales negativas).

El espectro de RMN ^1H (Espectro 2.9) indicó que dos de los metilos se encontraban unidos a carbonos de carácter olefínico (1.72 y 1.49 ppm) en tanto que el tercero se encontraba unido a un carbono terciario (1.25 ppm, d, $J = 7$ Hz) no olefínico. De manera adicional, se observaron claramente señales para dos hidrógenos vinílicos en la región comprendida entre 4.88 y 5 ppm, el hidrógeno base de una función lactónica en 4.53 ppm (dd, $J = 9$ Hz) (Borella, 1992; Marco, 1991; Tan *et al.*, 1991) y el hidrógeno anomérico del azúcar en 4.41 ppm (d $J = 8$ Hz). La magnitud de la constante de acoplamiento de este último concordaba con la naturaleza β del enlace glicosídico; la hidrólisis del glicósido con la enzima β -glucosidasa confirmó lo anterior. El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina condujo a la obtención de el derivado tetraacetilado 43a (Figura 2.5) confirmando químicamente la presencia de una sola unidad de glucosa en la molécula y la ausencia de funciones carbinólicas adicionales en la porción aglicona del compuesto 43. El espectro de RMN ^1H (Espectro 2.10) del derivado 43a mostró mejor resolución de las señales correspondientes a la porción glicosídica (β -D-glucosa). En el espectro COSY del producto 43a ilustrado en la Figura 2.6 se pueden observar claramente las conectividades de los hidrógenos del azúcar.

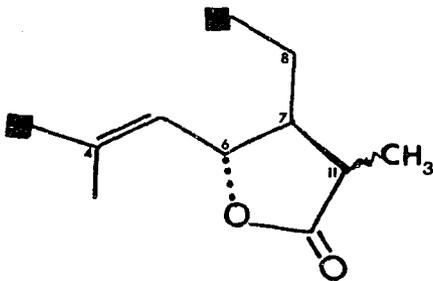
Figura 2.6. Correlación homonuclear de la porción sacarida del producto natural.



Las evidencias químicas y espectroscópicas presentadas hasta el momento no dejaban lugar a dudas acerca de la estructura de la porción sacárida del producto natural, así mismo sumadas a consideraciones quimiotaxonómicas (Tan, 1991; Milosauljevic, 1991), permitieron inferir que la aglicona era una lactona sesquiterpénica que presentaba dos dobles ligaduras trisustituidas, dos grupos metilos unidos a carbonos insaturados y un metilo unido a un carbono terciario.

El análisis de los espectros de RMN¹H y ¹³C de la aglicona 43b (Espectro 2.11, 2.12) obtenida por hidrólisis enzimática claramente indicó que la lactona era una germacradienólida (Miyase, 1991; Zdero, 1987; Ohmura, 1989; Cardona, 1991; Uchiyama, 1989) que presentaba el anillo lactónico de cinco miembros trans fusionado en las posiciones C-6 y C-7 del núcleo base y un sustituyente oxigenado en C-2 (un hidroxilo en la aglicona 43b y un residuo β-D-glucopiranosil en el producto natural 43). Las evidencias más importantes que permitieron establecer la anterior conclusión fueron las siguientes:

a) En el espectro de RMN¹H (espectro 2.11) se observó una señal doble de dobles en 4.51 ppm ($J_{6-5} = 10$ Hz y $J_{6-7} = 8.9$ Hz) asignada al hidrógeno geminal base de la lactona (H₆). Esta señal a su vez correlacionaba en el espectro COSY (Figura 2.7) con el doblete ancho en 4.83 ppm con una $J_{5-6} = 10$ Hz (H-5) y con el multiplete en 1.67 ppm (H-7) con una $J_{6-7} = 8.9$ Hz. El doblete cuarteteado en 2.20 ppm (H-11) $J_{11-7} = 12$ Hz, $J_{11-13} = 7$ Hz también interaccionaba con H-7 (1.63 ppm) y con el doblete ($J_{13-11} = 7$ Hz) en 1.26 Hz. Cabe mencionar que H-7 mostraba correlaciones difíciles de determinar en el espectro de la Figura 2.7, pero que indicaban la presencia de otros hidrógenos vecinales además de H-6 y H-11. La magnitud de las constantes de acoplamiento entre H-6 y H-7 eran congruentes con la disposición trans diaxial de estos hidrógenos (Mata, 1984; Bohlman, 1980). Las conectividades previamente descritas permitieron deducir la estructura parcial A.



Estructura parcial A.

Nótese que en la estructura parcial A se colocó un metilo sobre el C-4, ya que el espectro de la aglicona, al igual que el del producto natural, mostró señales para dos metilos sobre doble ligadura trisustituida en 1.48 y 1.73 ppm.

b) La otra señal vinílica del espectro que absorbe en 4.94 ppm (H-1, d, $J_{1-2} = 9.93$ Hz), correlacionaba en el espectro COSY (Figura 2.8) con la resonancia en 4.68 (H-2, ddd, $J_{1-2} = J_{2-3\alpha} = 9.9$ Hz, $J_{2-3\beta} = 5.5$ Hz), que con base en la teoría del desplazamiento químico debía corresponder a un hidrógeno alílico y geminal a la función carbinólica de la aglicona (función α -glicosídica del producto natural).

Esta última señal se desplazó paramagnéticamente a 5.61 ppm en la aglicona acetilada (Espectro 2.13).

A su vez H-2 se acoplaba con los multipletes centrados en 2.65 ppm (H-3 α , dd, $J_{3\alpha-3\beta} = 11.2$ Hz, $J_{3\alpha-2} = 5.5$ Hz) y 2.05 ppm (H-3 β , dd, $J_{3\beta-3\alpha} = J_{3\beta-2} = 10.5$ Hz). Es de hacer notar que H-3 α y H-3 β conformaban el sistema AB típico de dos protones geminales de un metileno, vecino a un centro asimétrico. De nuevo

Figura 2.7.- Correlación homonuclear de la porción aglicona del producto 43b.

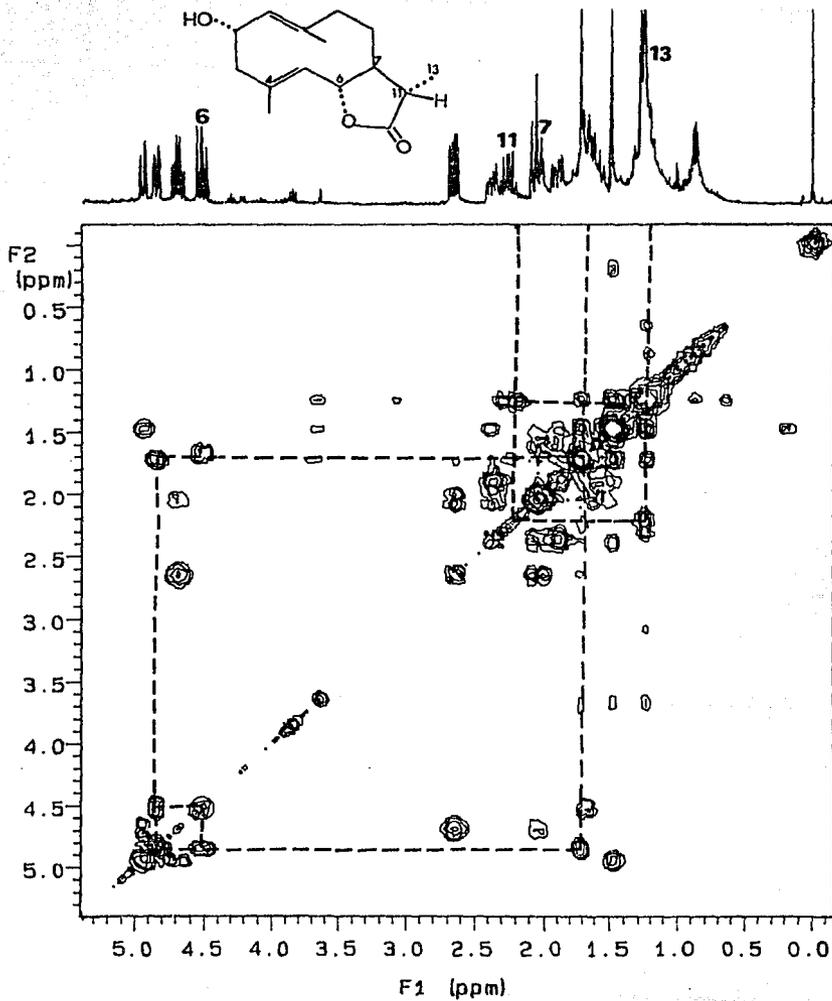
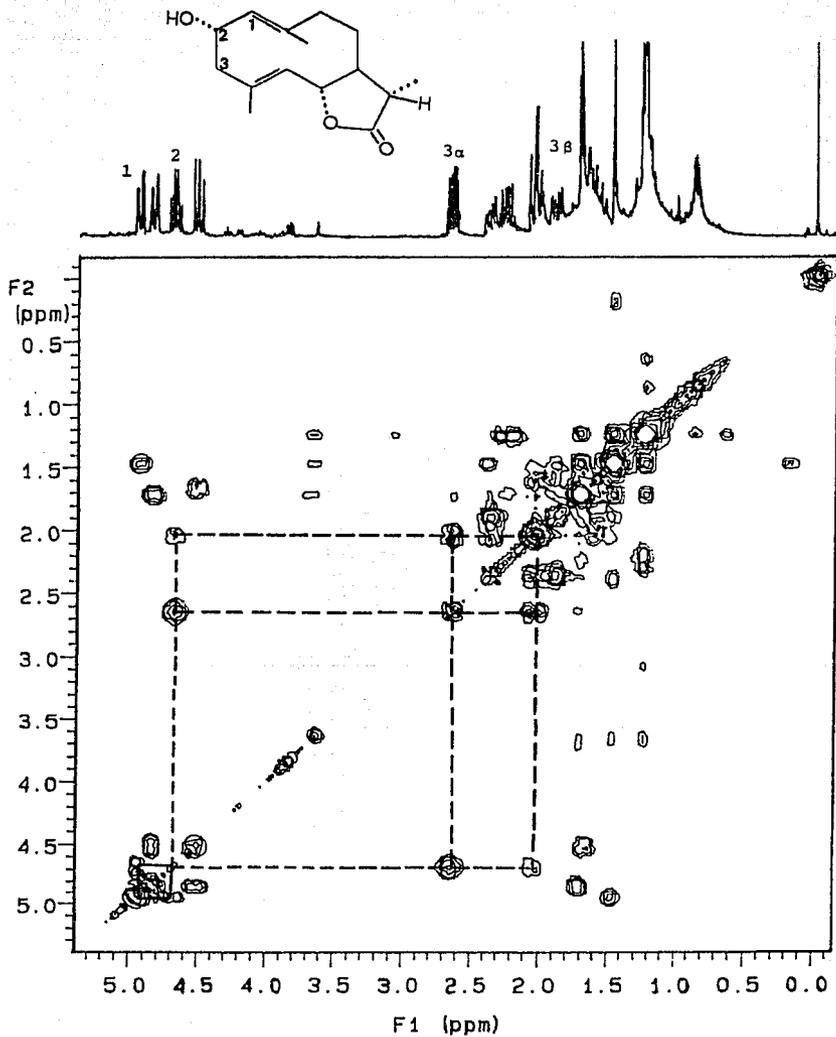
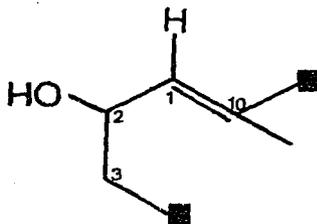


Figura 2.8.- Correlación homonuclear de los protones H-1, H-2 α , H-3 α y H-3 β del producto natural.



el valor de J entre H-2 y H-3 β era congruente con la disposición trans de estos hidrógenos.

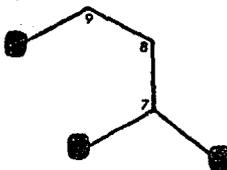
Las conectividades recién descritas permitieron deducir la estructura parcial B.



Estructura parcial B.

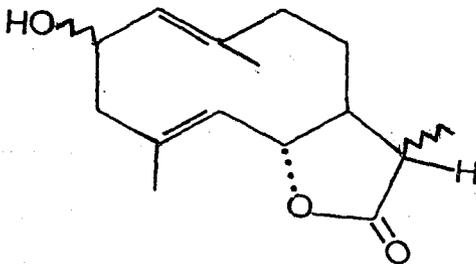
Siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de la estructura parcial A, el segundo metilo vinílico se colocó sobre el C-10 de la estructura parcial B.

Finalmente, en 2.37 ppm (H-9 α , dd, $J = 13.0, 6.3$ Hz) y 1.90 Hz (8 α , ddd, $J = 13.0, 6.3$ y 2 Hz), se observaban dos multipletes, que además de interactuar entre sí, presentaban correlaciones adicionales. En el espectro COSY de la aglicona acetilada (Figura 2.9), estas interacciones se observaban más claramente, la señal en 2.41 ppm (H-9 α , dd, $J_{9\alpha-9\beta} = 13$ Hz, $J_{9\alpha-8\beta} = 6.3$ Hz) se acoplaba con un doblete ancho en 2.04 ppm (H-9 β , dda, $J_{9\beta-9\alpha} = 13$ Hz). H-9 α a su vez interactuaba con el doblete de doblete centrado en 1.91 ppm (H-8 α , dd, $J_{8\alpha-9\alpha} = 5.8$ Hz; $J_{8\alpha-8\beta} = 12.9$ Hz) y H-8 α con el multiplete entre 1.6 y 1.75 ppm, donde evidentemente resuenan H-8 β y H-7. Con base en las observaciones antes señaladas se dedujo la estructura parcial C.



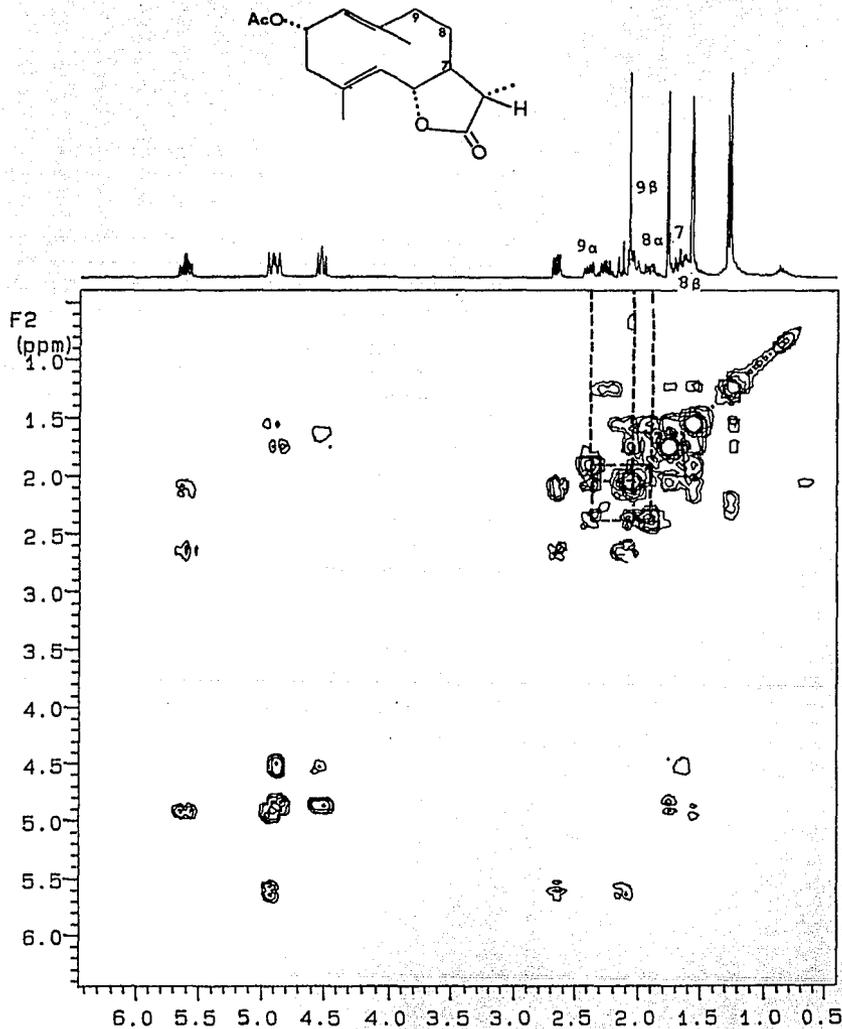
Estructura parcial C.

La integración de las estructuras parciales A,B y C permite proponer la estructura D.



Estructura D.

Figura 2.9. Correlación homonuclear de los protones H-8 α , H-8 β , H-9 α , H-9 β y H-7 de la aglicona acetilada.



La estereoquímica relativa del grupo metilo en C-11 se determinó con base en las siguientes consideraciones:

- a) El valor de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 en 43 y sus derivados 43b y 43c.
- b) El análisis del efecto de disolventes (benceno y cloroformo) sobre el desplazamiento del metilo C-13 en la aglicona acetilada 43c.

En el primer caso como se ilustra en el Espectro 2.13 y de acuerdo a un estudio realizado por Nirayanan *et al.*, (1968), los metilos pseudoecuatorial en el centro C-11 de las lactonas sesquiterpénicas con el anillo lactónico trans fusionado entre C-6 y C-7, se desplaza diamagnéticamente alrededor de 0.23 ppm en soluciones de benceno- d_6 en relación a los valores observados en soluciones de $CDCl_3$ (Espectro 2.14). Por otra parte, en las lactonas con las mismas características estructurales, pero con metilos pseudoaxiales en C-11, el desplazamiento a campo alto es de una mayor magnitud ($\Delta = + 0.46$). En el caso de la aglicona acetilada 43c la diferencia en la magnitud de los desplazamientos químicos para C-13 ($\Delta\delta = \delta_{CDCl_3} - \delta_{C_6D_6}$) fue de + 0.23, consistente con la naturaleza pseudoecuatorial del metilo C-13 y, por lo tanto, con la orientación α del mismo. La magnitud de la constante de acoplamiento entre H-7 y H-11 fue de 12 Hz, lo cual era congruente también con la disposición α del metilo C-13; si la orientación hubiese sido β la constante de acoplamiento J_{7-11} correspondería a un valor aproximado de 7.5 Hz (Narayanan y Ven Katasubramaniam 1968; Borella, 1992; Marco, 1991; Jacupovic, 1991; Mengi, 1991). El espectro de ^{13}C de la aglicona 43b era muy similar al del glicósido y difería tan solo en la ausencia de las señales del azúcar y en el desplazamiento químico del C-2. En el caso del compuesto 43 está resonancia se encontraba desplazada a campos mas bajos debido al efecto de glicosidación (ver Cuadro 2.15).

Por último para determinar en forma decisiva la estereoquímica en C-2 de la aglicona 43b y del producto natural 43 se analizó el patrón de acoplamiento que presentaba el hidrógeno geminal a la función carbinólica en el derivado 43d, obtenido mediante la hidrólisis ácida del producto natural.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (Espectro 2.15) y de ^{13}C (Espectro 2.16) de 43d presentan las características de una lactona sesquiterpénica del tipo eudesmanólida (Mata, 1984; Herz, 1983; da Silva, 1981) con un metileno exocíclico en la posición C-4 y al igual que la aglicona 43b presentaba el anillo lactónico trans fusionado entre las posiciones C-6 y C-7 del núcleo base y una función carbinólica en C-2.

Las diferencias y similitudes más importantes entre los espectros de RMN de la aglicona 43b y el producto de hidrólisis ácida 43d, así como el análisis del patrón de acoplamiento que permitió establecer la estereoquímica relativa en el centro C-2 del producto natural se resumen a continuación:

1.- Resonancia Magnética Nuclear Protónica:

1.1.- La señal correspondiente al hidrógeno geminal de la función carbinólica en C-2 se encontraba diamagnéticamente desplazada en 43d a 3.92 ppm ($\Delta_{\text{H-2}} \text{ 43b} - \text{ 43d} = 4.68 - 3.92 = + 0.76$), consistente con la pérdida del carácter alílico de H-2.

Esta señal se observaba como un doble de doble de doble de dobles con constantes de acoplamiento $J = 12.5$ y 5.3 Hz, indicando claramente que H-2 interactuaba con los hidrógenos de dos metilenos vecinales.

El valor de la constante de acoplamiento $J = 12.5$ Hz era congruente con la disposición trans diaxial de H-1 α , H-2 β y H-3 α y en consecuencia con la estereoquímica α ecuatorial del hidroxilo en C-2. La constante de acoplamiento de 5.3 Hz correspondía a la interacciones axial-ecuatorial de los hidrógenos H-2 β , H-1 β y H-3 β . Con base a

este análisis se pudo inferir entonces que la estereoquímica de la función oxigenada en los compuestos 43 y 43b era también α .

1.2.- En el espectro de 43d no se observaron señales para metilos sobre dobles ligaduras y en su lugar se observó una señal simple para un grupo metilo unido a un centro cuaternario en 0.89 ppm y dos singuletes anchos en 5.05 y 4.90 ppm, asignables a los protones vinílicos de un metileno exocíclico (Jacupovic, 1991). Estas dos últimas resonancias mostraban una clara interacción en el espectro COSY (Figura 2.10).

1.3.- La señal de H-5 en 43d se observó como un doblete en 2.15 ppm ($J_{5-6}=11.1$ Hz), el cual interaccionaba con el doblete de dobletes en 3.99 ppm (H-6, $J_{6-5}=J_{6-7}=10.6$ Hz) en el espectro de correlación homonuclear (Figura 2.10). A su vez H-6 (3.99 ppm) interaccionaba con H-7 (1.68 ppm). La multiplicidad de las señales anteriores y la magnitud de las constantes de acoplamiento eran congruentes con la disposición trans de la lactona entre H-6 y H-7. Como era de esperarse la señal de H-6 se encontraba también desplazada paramagnéticamente en relación al desplazamiento observado para el protón H-6 en el compuesto 43b.

1.4.- Por último, las señales para H-13 y H-11 del compuesto 43d fueron similares tanto en desplazamientos químicos como en el patrón de acoplamiento, a los observados en el compuesto 43b.

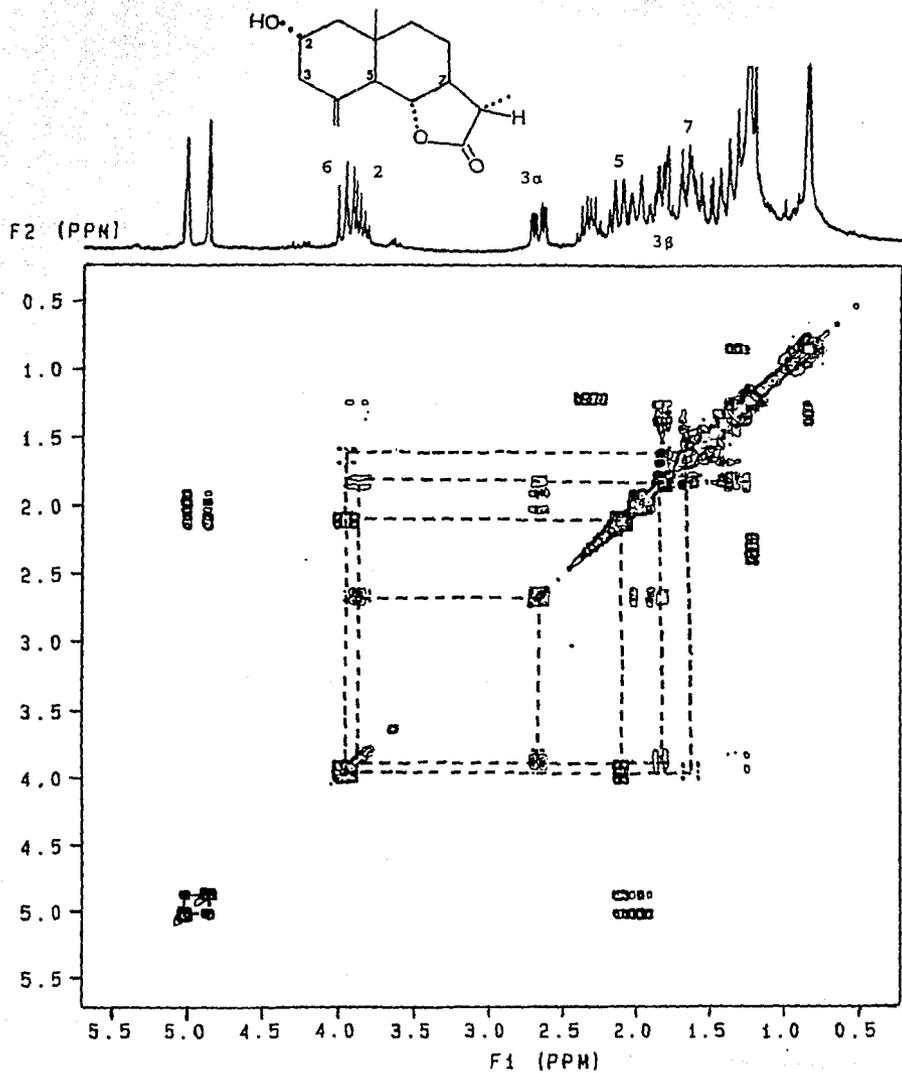
2.- Resonancia magnética nuclear de ^{13}C :

2.1.- En ambos compuestos 43b y 43d el espectro presentó 15 señales, de las cuales las correspondientes a C-12 (C=O de la lactona), C-6 (C-O de la lactona), C-2, C-3, C-7, C-11 y C-13 resultaron muy similares.

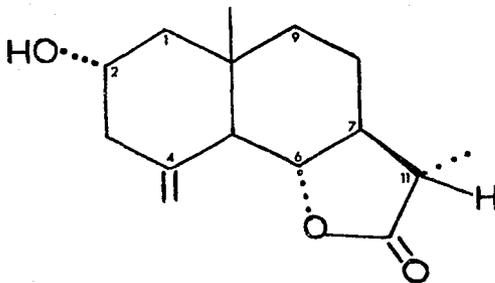
2.2.- En la zona donde resuenan los carbonos vinílicos se observaron sólo dos señales en 141.70 y 111.40 ppm, observación consistente con la presencia del metileno exocíclico en C-4.

2.3.- En 29.70 ppm (C-1), 53.70 ppm (C-5), 45.70 ppm (C-10) se encontraban señales asignables a un metileno, un metino y un

Figura 2.10.- Correlación homonuclear de la aglicona 43d obtenida¹⁰⁰ por hidrólisis ácida.

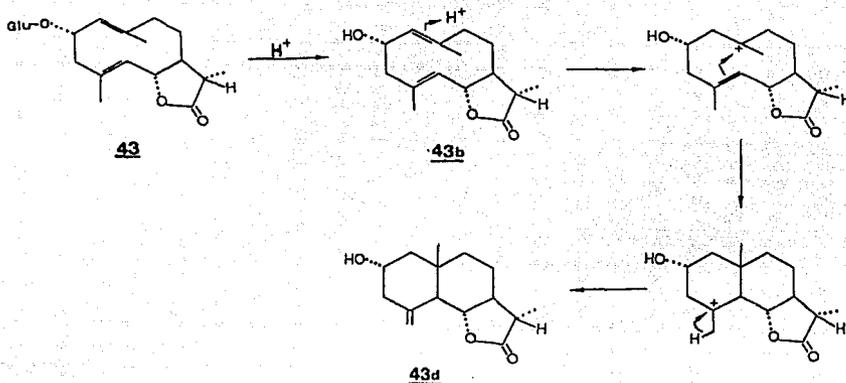


carbono cuaternario, respectivamente las cuales sustituían tres de las señales olefinicas de 43b y que permitieron por comparación con modelos adecuados establecer que el producto 43d era una eudesmanólida (da Silva, 1981; Mata, 1984; Herz, 1983, Milosauljevic, 1991; Mengi, 1991). Así mismo las tres señales restantes en 22.80, 37.90 y 18.809 ppm correlacionaban con las previamente descritas para los carbonos, C-8, C-9 y C-14 de varias eudesmanólidas (da Silva, 1981; Mengi, 1991; Shekhani, 1990; Jakupovic, 1991; Shimuzu, 1989). Con base en las consideraciones anteriores la estructura para el compuesto 43d obtenido por hidrólisis ácida se estableció como se ilustra a continuación.



Estructura del compuesto 43d.

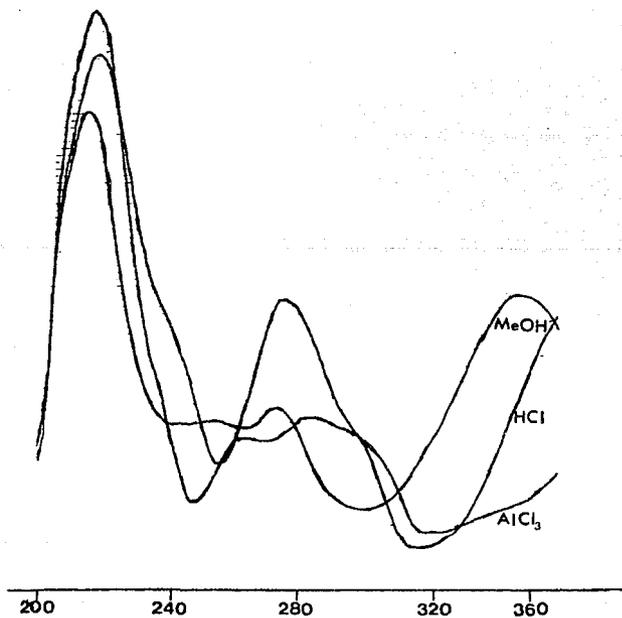
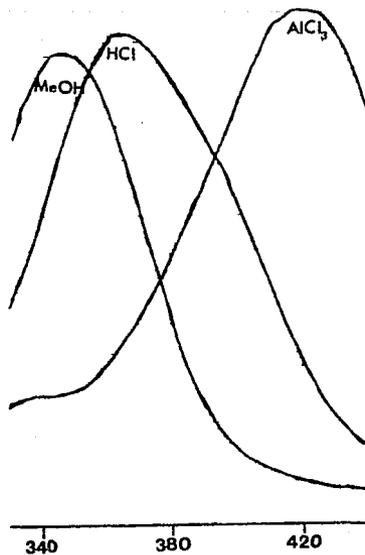
La formación del compuesto 43d durante la hidrólisis ácida del producto natural (43), a partir de la aglicona 43b se puede explicar mediante el siguiente mecanismo de reacción.

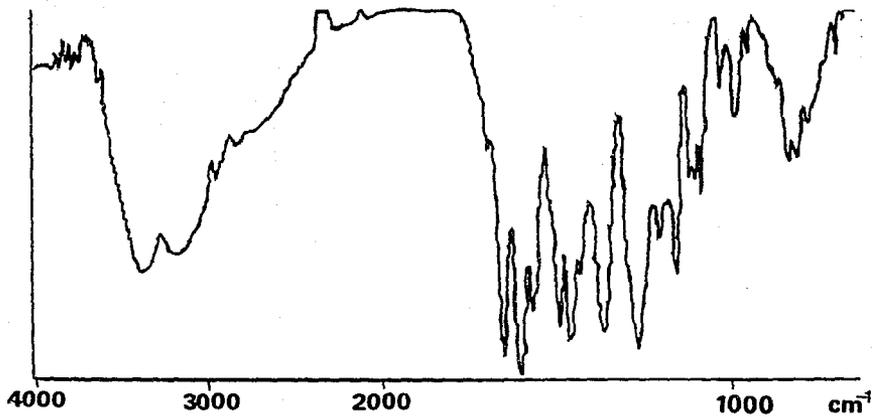


Con base en la discusión anterior la estructura del compuesto natural **43** y de la aglicona **43b** obtenida por hidrolisis enzimática se propone como 2α - β -D-glucopiranosiloxi- $\Delta^{1(10),4(5)}$ -germacradien- $6\alpha,7\beta,11\beta,12$ -olida y 2α -hidroxi- $\Delta^{1(10),4(5)}$ -germacradien- $6\alpha,7\beta,11\beta,12$ -ólida, respectivamente.

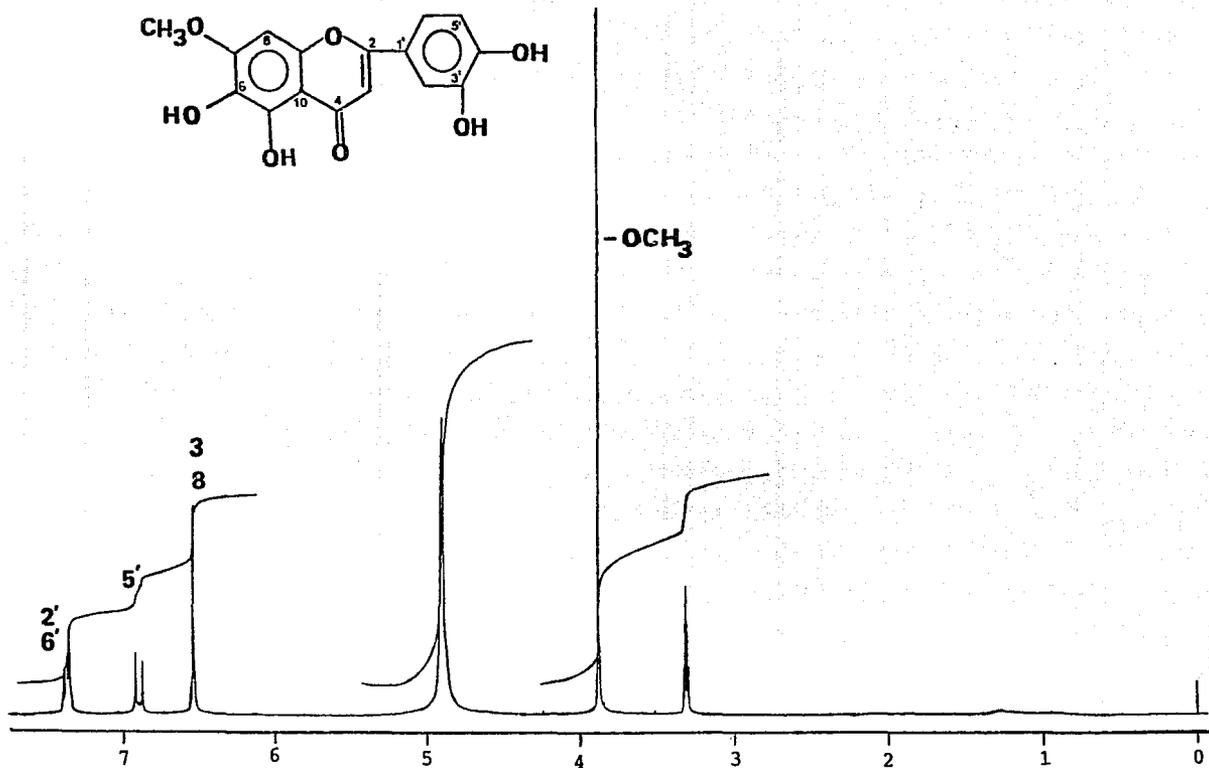
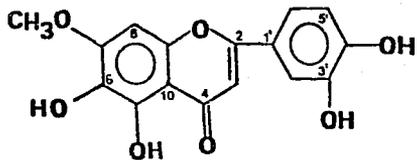
Cabe hacer notar que la estructura propuesta para la aglicona **43b** corresponde a la previamente descrita para el producto de la reducción catalítica de la tamaulipina A (Fischer *et al.*, 1968; Witt *et al.*, 1978). Los escasos datos de RMN protónica descrita por Fischer se encuentra en perfecta armonía con los encontrados para la aglicona **43b**. También es importante mencionar que el tratamiento de la dihidrotamaulipina con ácido acético y anhídrido acético (Fischer *et al.*, 1968) no da origen al eudesmano correspondiente, sin embargo bajo las condiciones de la hidrolisis ácida de **43** (HCl 2N) se formó el eudesmano **43d**, no descrito previamente como derivado sintético ni como producto natural.

El compuesto **43** presentó un LC_{50} mayor a 1000 ppm en la determinación de toxicidad para *Artemia salina*. En la determinación de la actividad antimicrobiana potencial los resultados obtenidos fueron negativo. Por último en la valoración de actividad citotóxica en las líneas celulares KB y en P-388 los resultados no fueron significativos ($ED_{50} > 20 \mu\text{l/ml}$).

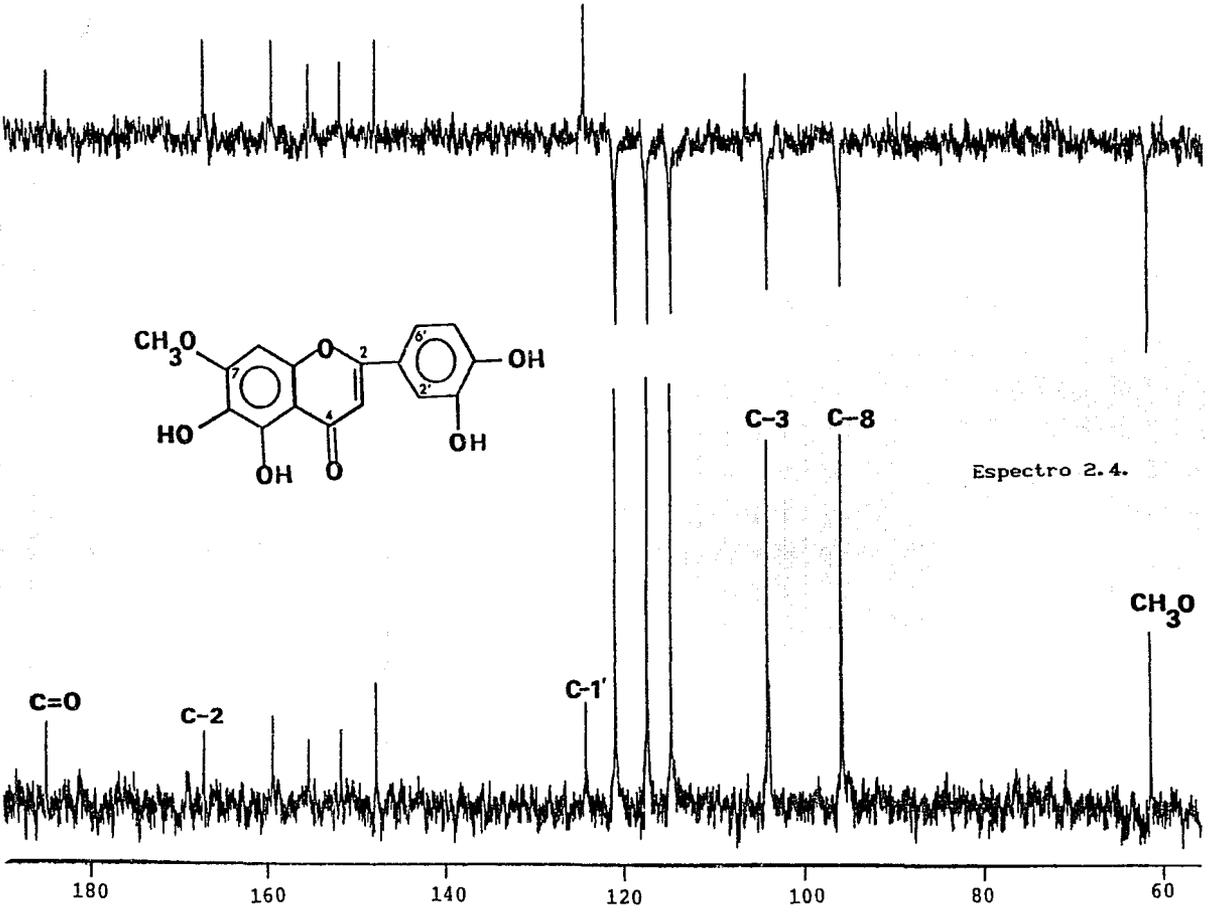
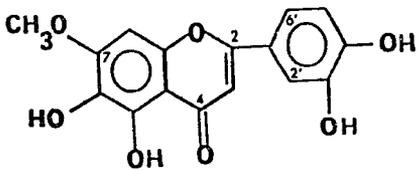




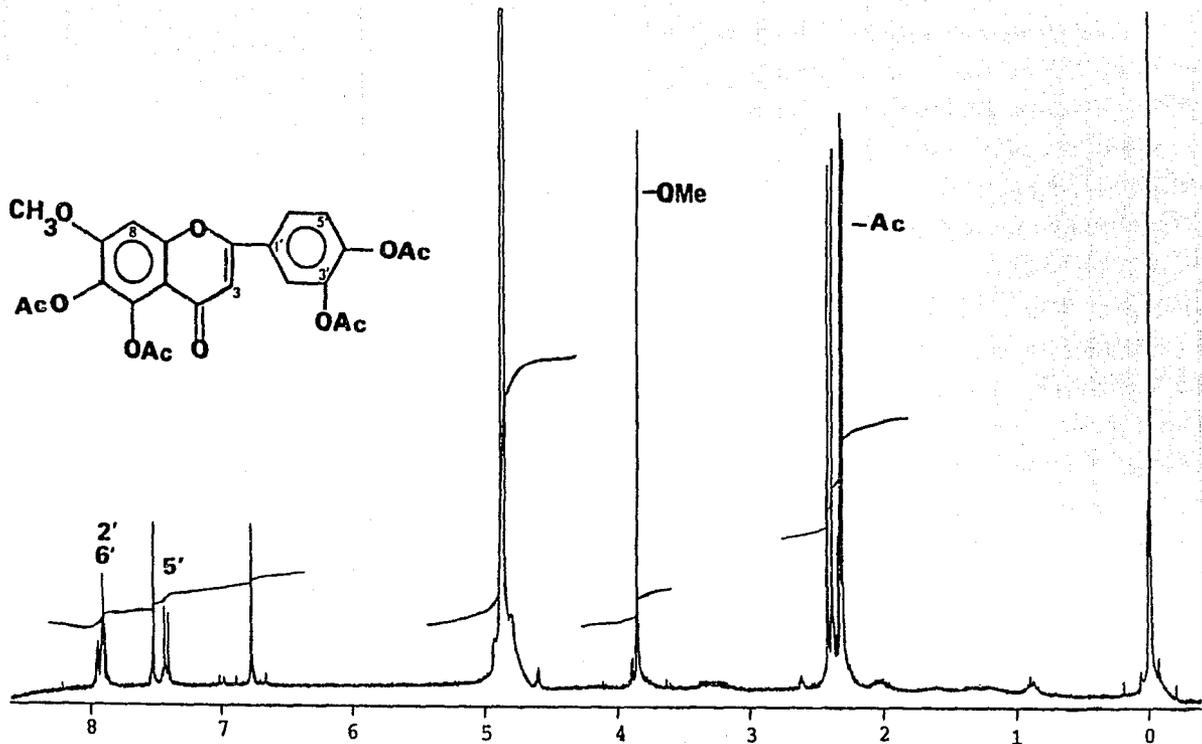
Espectro 2.2.



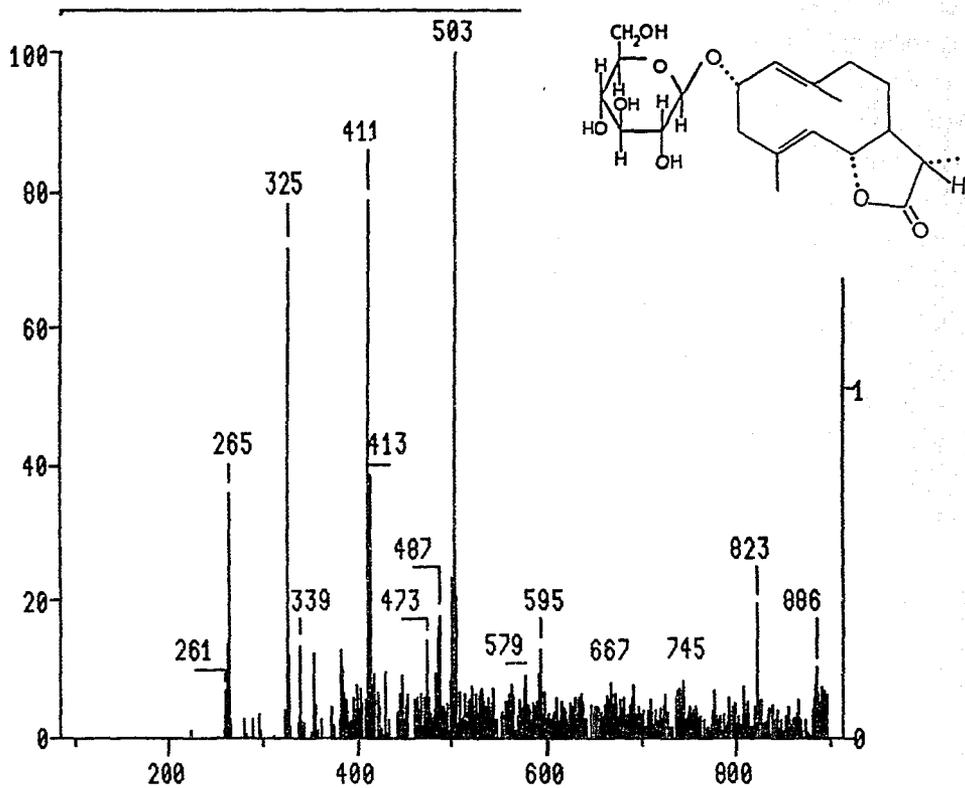
Espectro 2.3



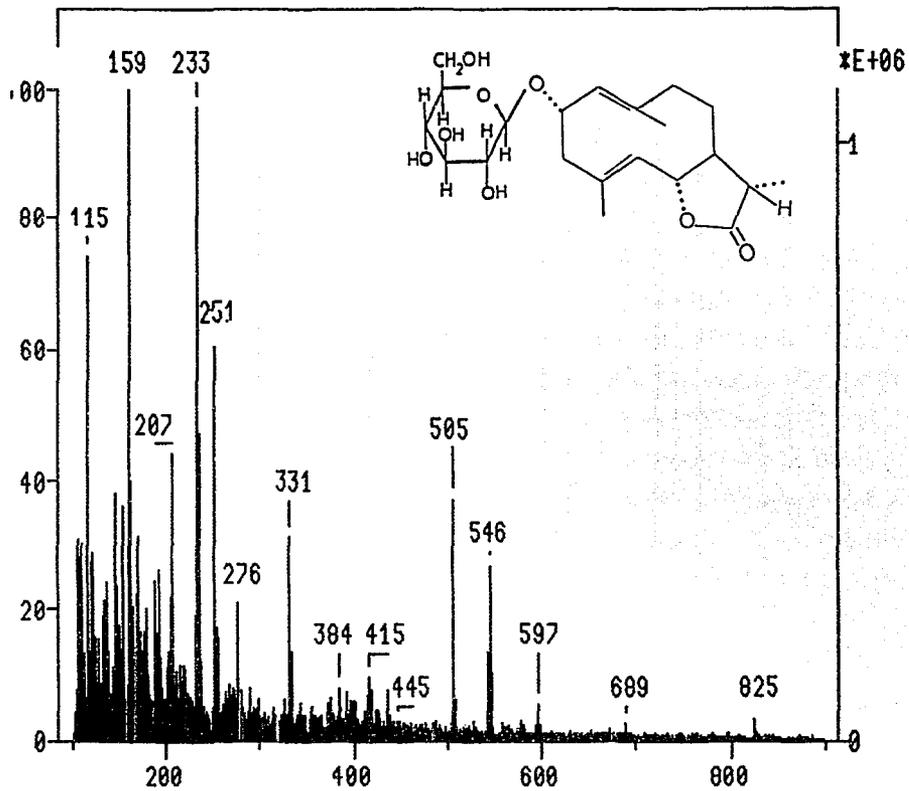
Espectro 2.4.



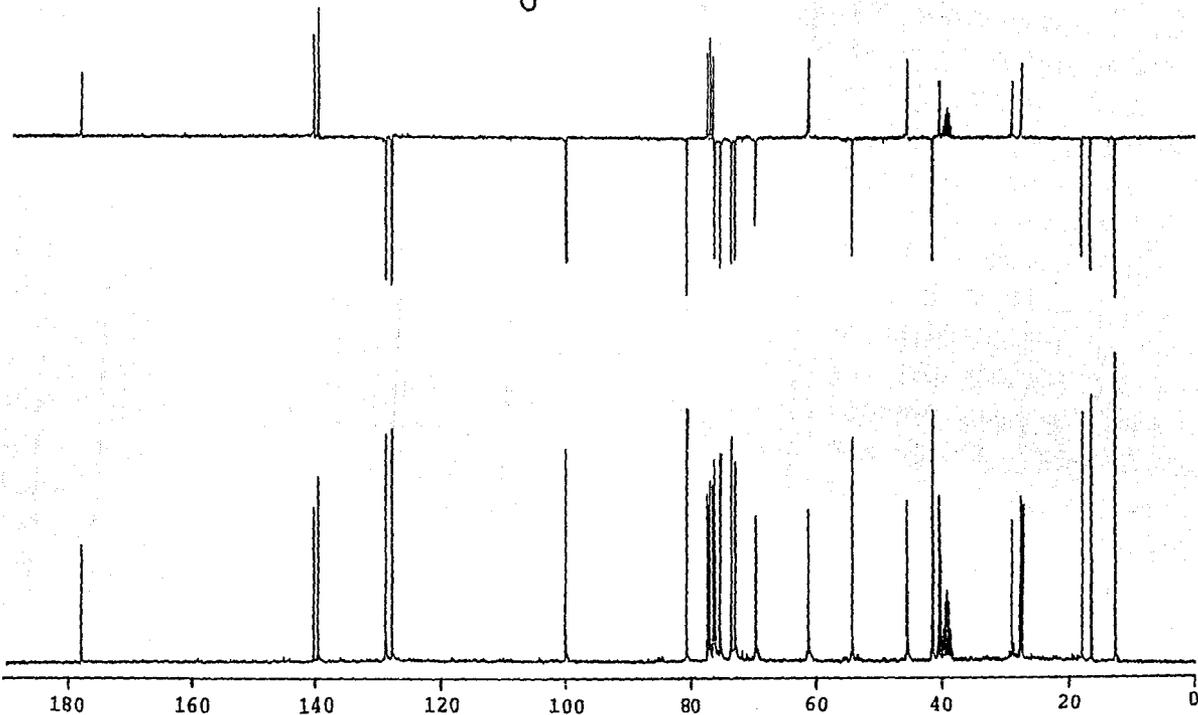
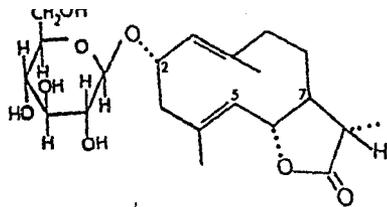
Espectro 2.5.



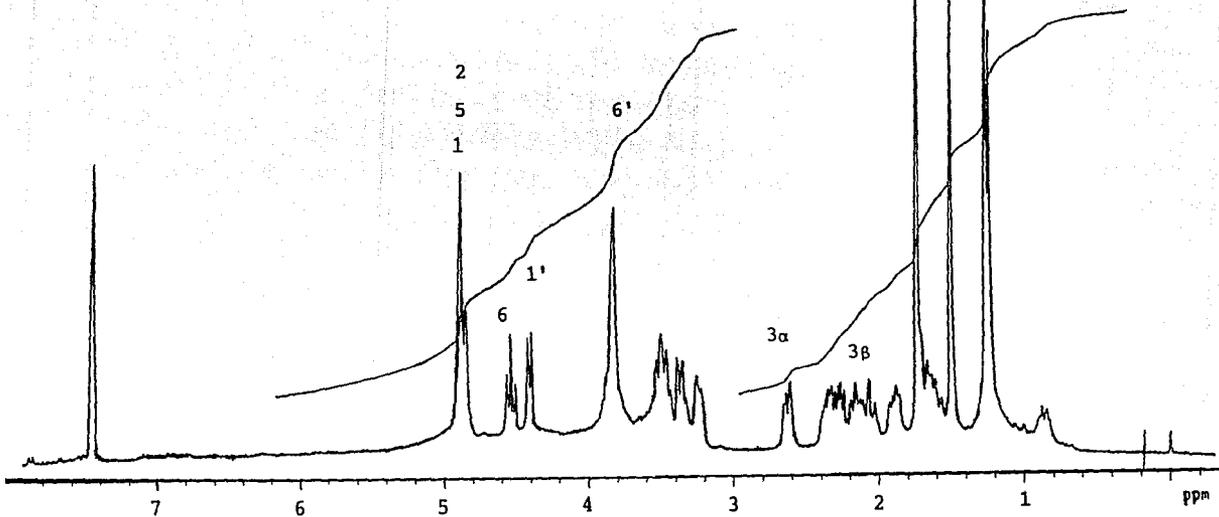
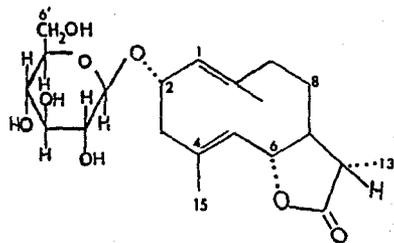
Espectro 2.6



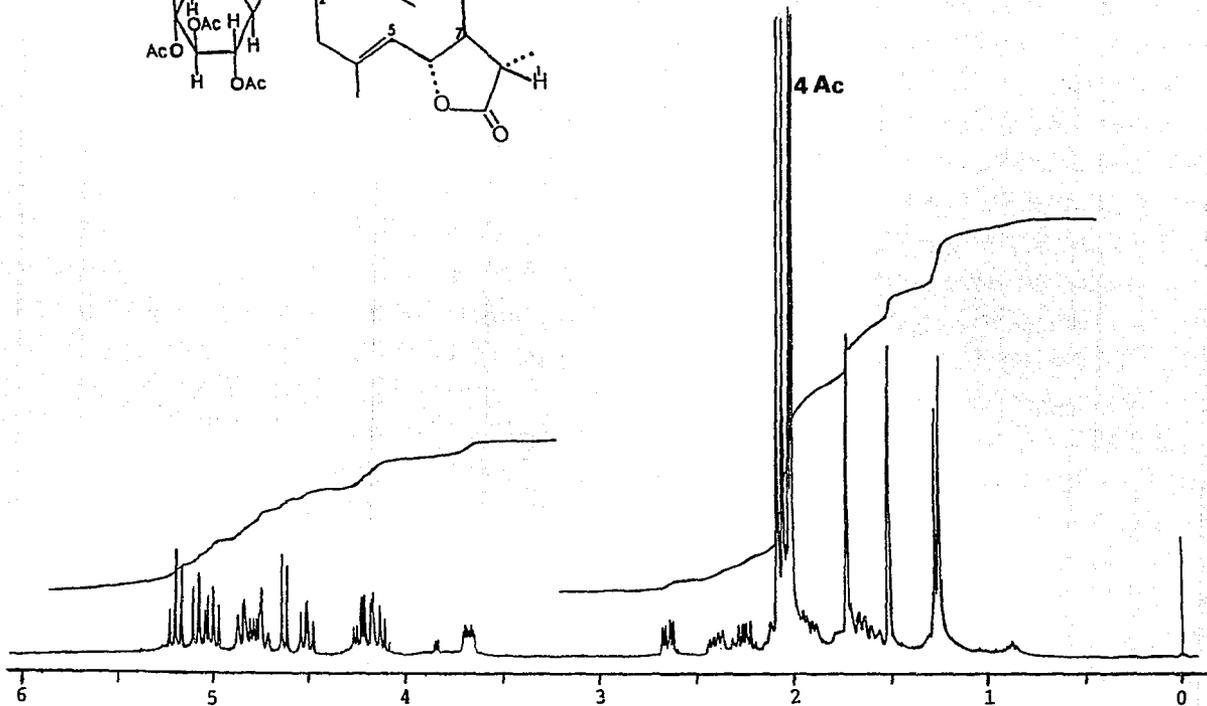
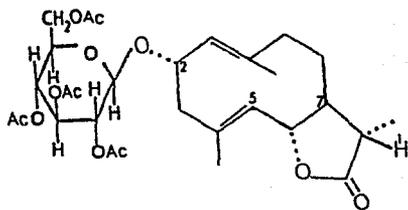
Espectro 2.7.



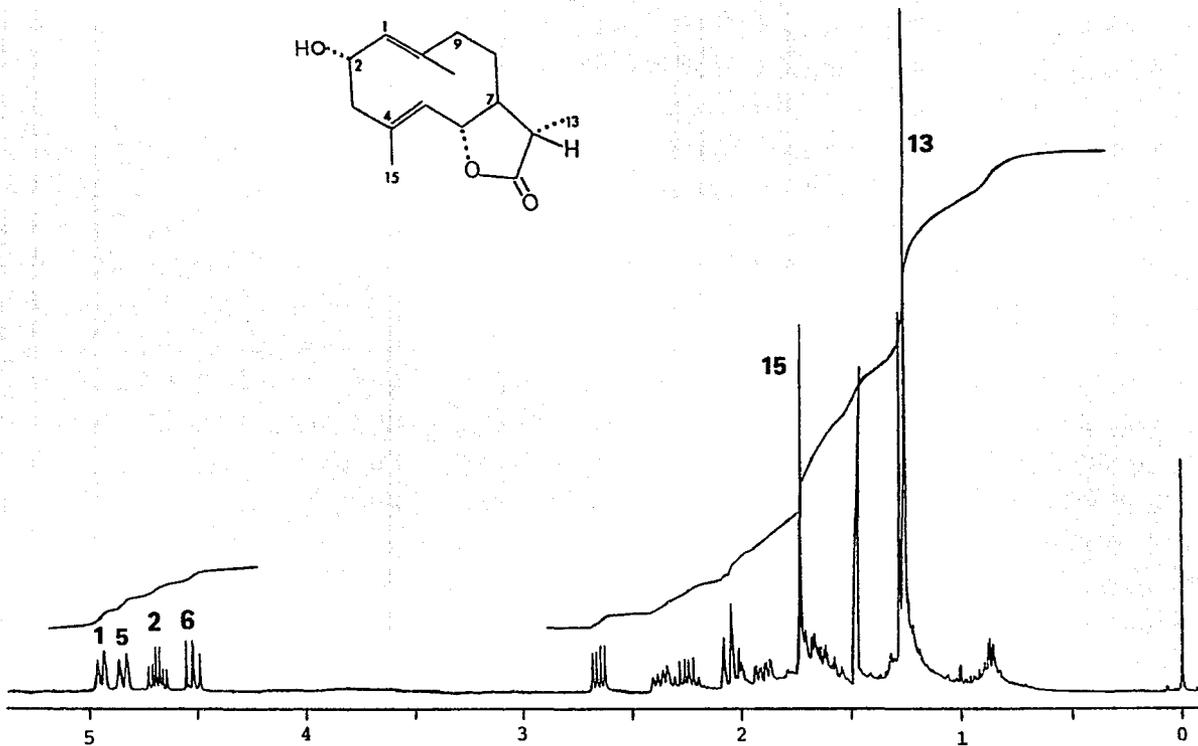
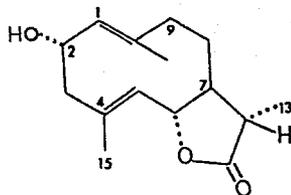
Espectro 2.8



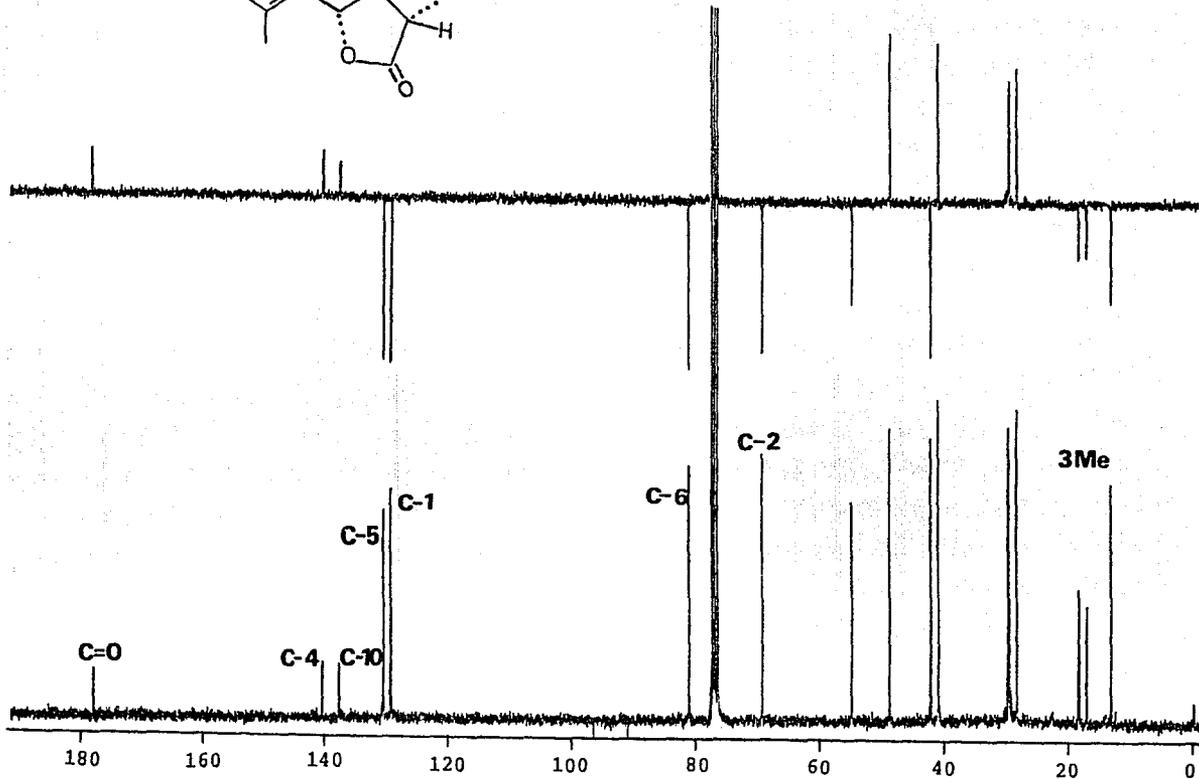
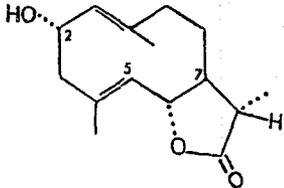
Espectro 2.9.



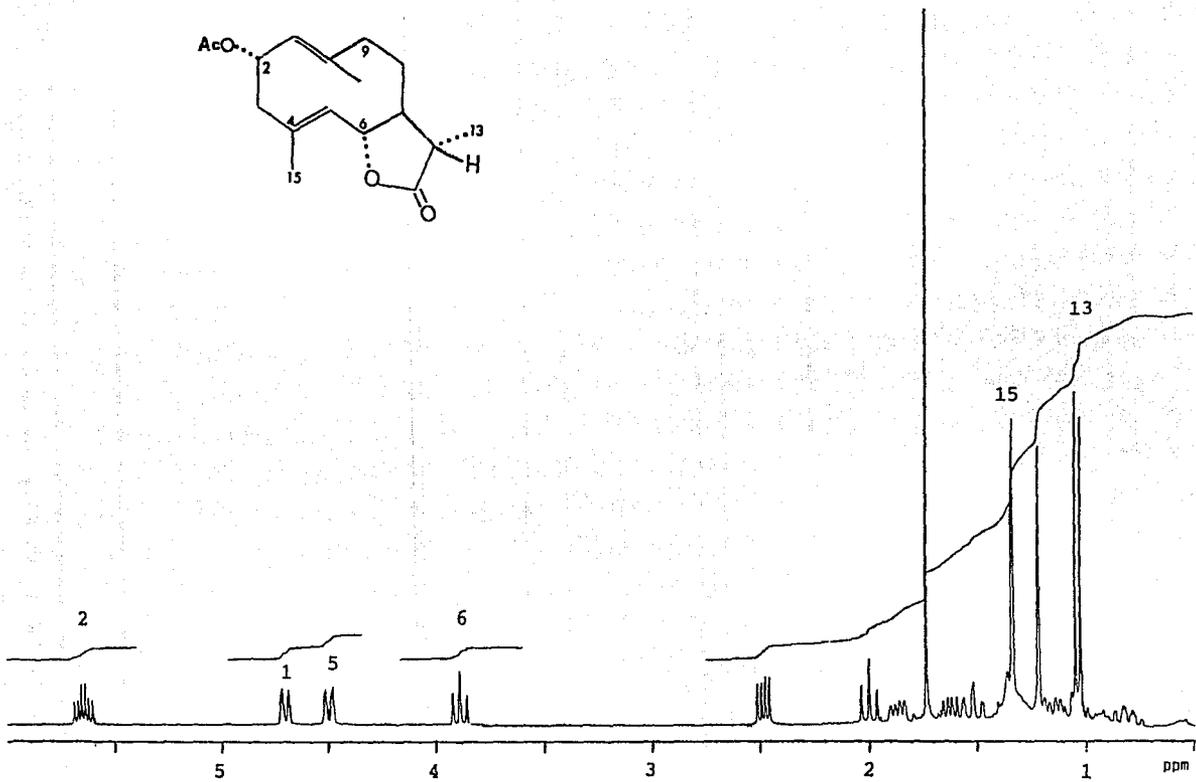
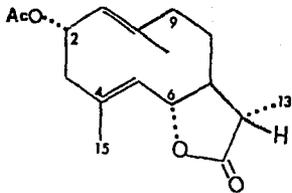
Espectro 2.10.



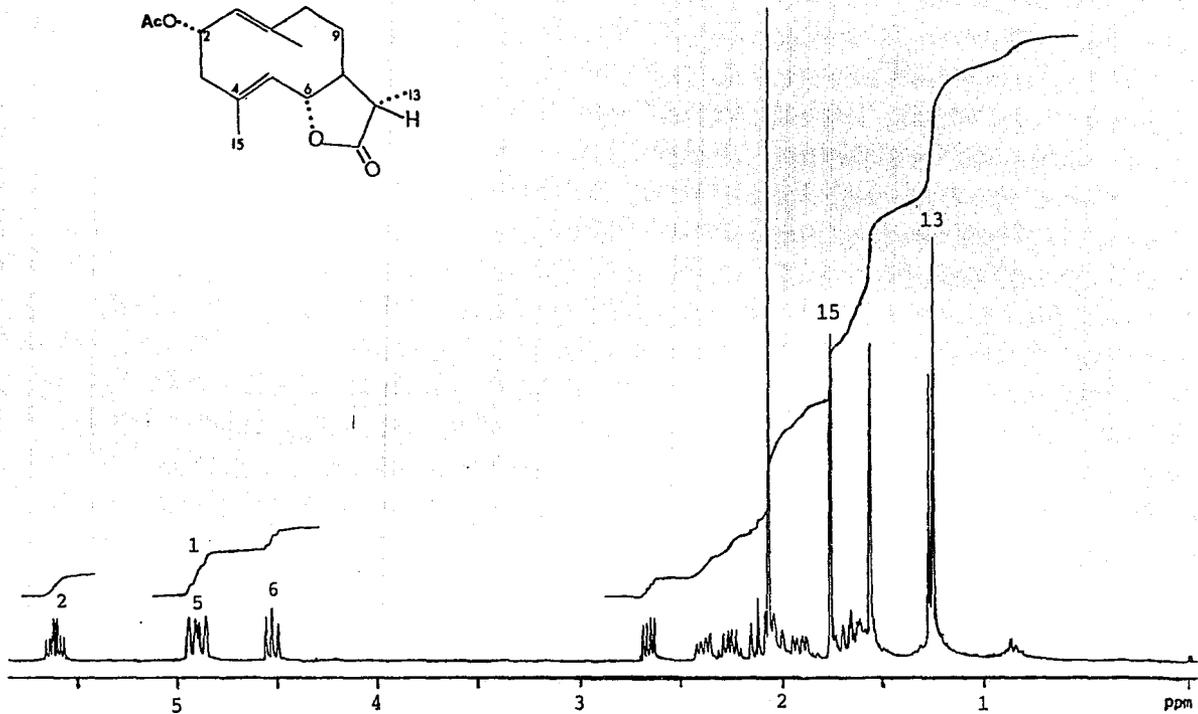
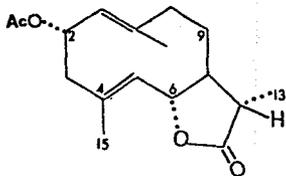
Espectro 2.11.



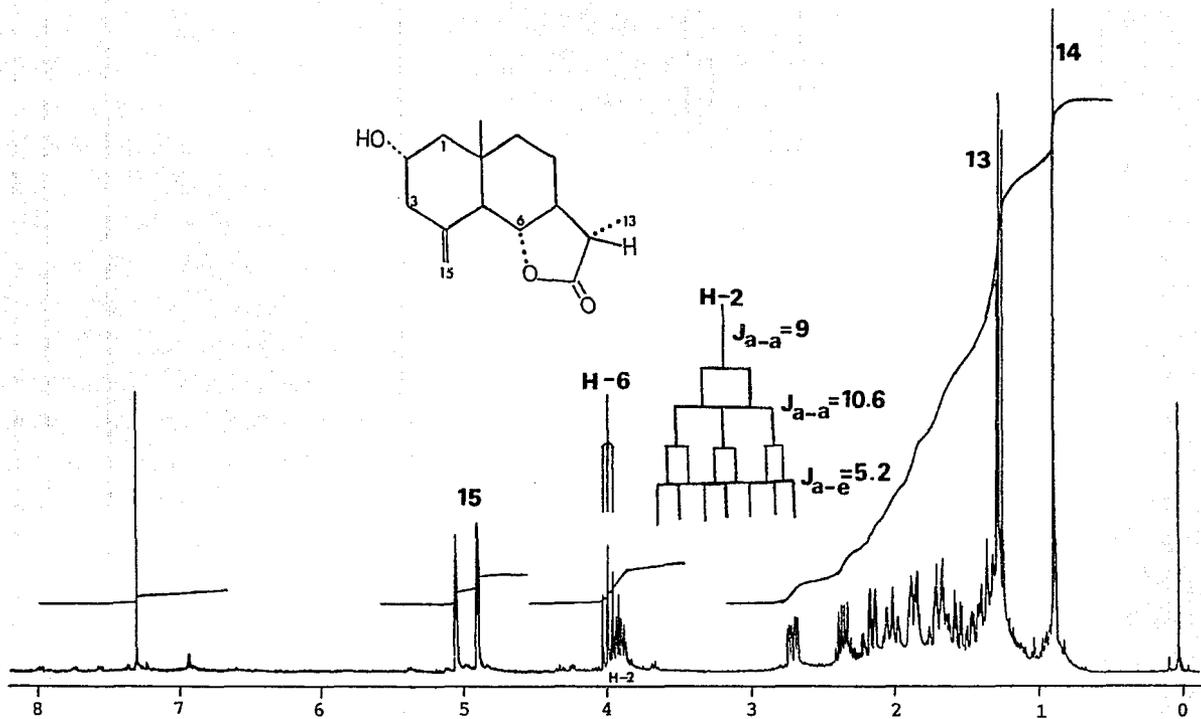
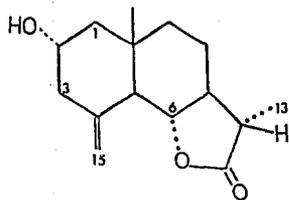
Espectro 2.12.



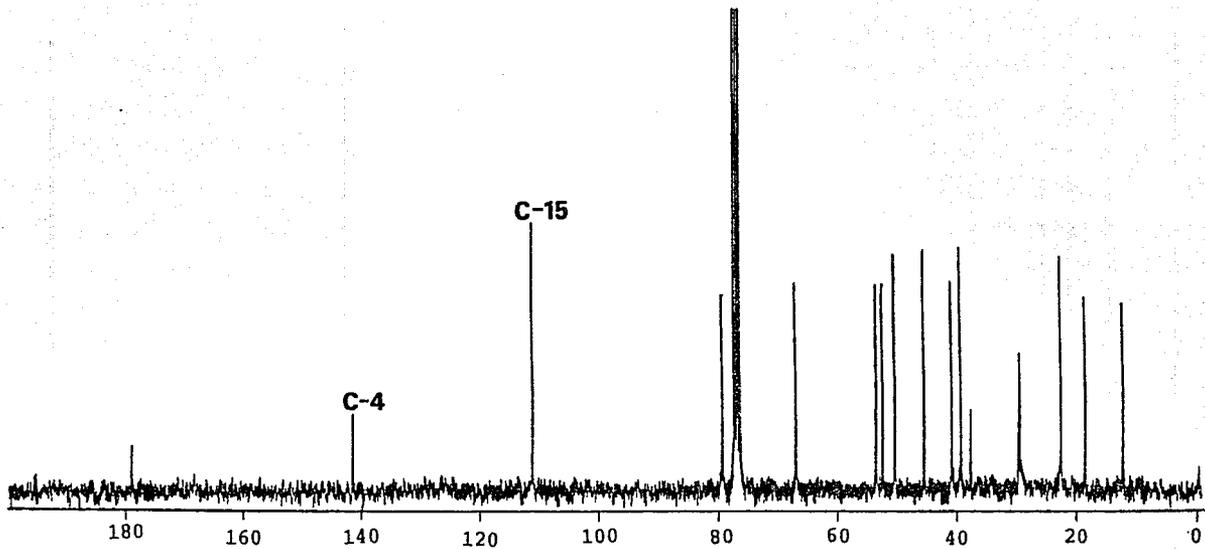
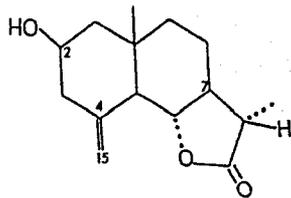
Espectro 2.13.



Espectro 2.14.



Espectro 2.15.



Espectro 2.16.

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- El extracto $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ de las partes aéreas de Ratibida latipaliaris mostro un toxicidad significativa para Artemia salina. Asi mismo el extracto demostro una notable actividad antimicrobiana en contra de Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli y también mostro actividad en contra de Candida albicans, además exhibio significativa actividad citotóxica en los sistemas de cultivos celulares humanos de KB, carcinoma de pecho, carcinoma de pulmón y adenocarcinoma de colón

2.- El fraccionamiento biodirigido del extracto activo mediante la determinación de la toxicidad contra Artemia salina permitio el aislamiento y la purificación de 7 compuestos, los cuales fueron caracterizados mediante métodos químicos y espectroscópicos como: la ratibinólida I (36), la ratibinólida II (37), el β -sitosterol (38), la hispidulina (40), el β -D-glucositolsterol (41), la pedalitina (42) y el glicósido 2- α - β -D-glucopiranosil- Δ 1(10),4(5)-germacradien-6 α ,7 β ,11 β -olida (43), constituyendo este último un nuevo producto natural. Cabe destacar que el producto natural 43 es el primer germacranólido aislado del género Ratibida.

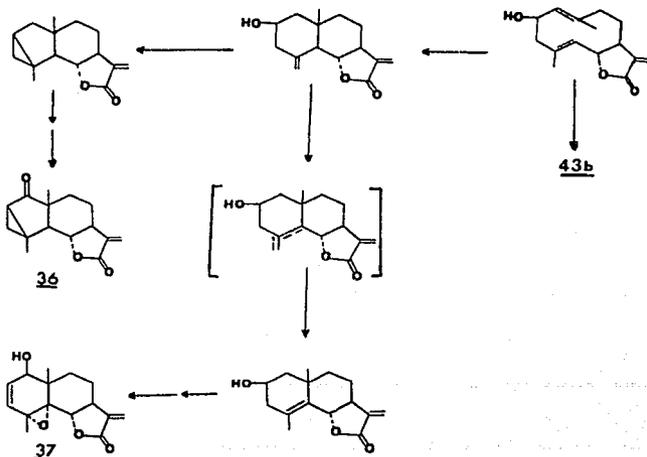
3.- De los compuestos aislados solamente la ratibinólida I y la ratibinólida II mostraron alta toxicidad para Artemia salina en concordancia con los resultados previamente obtenidos (Rojas, et al 1990). Por otra parte las flavonas hispidulina y la pedalitina fueron los únicos compuestos que demostraron moderada actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram positivas. Posiblemente la actividad que presentó el extracto original se debía entonces a un efecto sinérgico de los dos flavonoides y a la presencia de otros compuestos aún no aislados.

4.- Se determinó la actividad citotóxica de las lactonas sesquiterpénicas aisladas en las líneas celulares KB y P-388. La ratibinólida III (43) resulto inactiva en ambas líneas celulares ($ED_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$), la ratibinólida I (36) y la ratibinólida II (37) demostraron una actividad significativa en el sistema P-388 ($ED_{50} = 2.3$ y $0.2 \mu\text{g/ml}$ respectivamente).

5.- La hispidulina también fue evaluado como agente potencial citotóxico a pesar de que su toxicidad para Artemia salina fue $>$ de $1000 \mu\text{g/ml}$. La flavona resulto bastante activa en el sistema P-388 ($ED_{50} = 0.4 \mu\text{g/ml}$).

6.- Se logró establecer inequívocamente la estereoquímica en el centro quiral C-1 de la ratibinólida II mediante el análisis de difracción de rayos X. Además el estudio permitió generar un modelo de ^{13}C en eudesmanólidas con características estructurales de la ratibinólida II.

7.- Desde el punto de vista biogenético la coexistencia del compuesto 2- α - β -D-glucopiranosil- $\Delta^{1(10),4(5)}$ -germacradien-6 α -7 β -11 β -olida (43) y de la ratibinólida I (36) y la ratibinólida II (37) permiten especular la siguiente ruta metabólica.



Bibliografia

1. - Abdel-Mogib, M.; Jacupovic, J.; Dawidar, A.M.; Metwally, M.A.; Abou-Elzahab, M.; *Phytochemistry*, 29 2581-2584 (1990).
2. - Akherem, A.; Avvakumov, G.V.; Sidorova, I.V.; Strel'chyonok, D.A.; *Journal of Chromatography*, 180, 69-82 (1979).
3. - Anderson, J.E.; Goetz, G.E.; McLaughlin, J.L. and Suffness, M.; *Phytochem. Anal.*, 2, 107 (1991).
4. - Bohlman, F.; Zdero, C.; *Phytochemistry*, 19, 587-591 (1980).
5. - Borella, J.C.; Callegari Lopes, J.L.; *Phytochemistry*, 31, 692-695 (1992).
6. - Bork, V.K.; *Dtsch. Apoth. Ztg*, 123 407 (1983).
7. - Cardona, M. C.; Fernandez, I.; Pedro, J.R.; Perez, B.; *Phytochemistry* 30, 2331-2333 (1991).
8. - Da Silva, A.J.R.; Garcia, M.; Baker, P.; Rabi, J.; *Organic Magnetic Resonance*, 16, 234-235 (1981).
9. - Farnsworth, N.R.; Kaas, C.J. *J. Ethnopharmacol.*, 3 85 (1981).
10. - Fischer, N.H.; Mabry, T.J. *Tetrahedron.*, 24 4091 (1968).
11. - Fischer, N.H.; Mabry, T.J. *Chemical Communications.*, 1235 (1967)
12. - Foster, A.B., Horton, D.; Stacey, M.; Webber, J.M.; *J. Chem. Soc.*, 2587-2590 (1960).
13. - Gallies, D.G.; Lewis, D.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1155-1159 (1985).
14. - Gao, F.; Wang, H.; Mabry, T.J.; *Phytochemistry*, 24 1605-1607 (1990)
15. - Gao, F.; Wang, H.; Mabry, T.J.; *Phytochemistry*, 29 1601-1607 (1990).
16. - Hamburger, M.O.; Cordell, G.A.; Tantivatana, P.; Ruangrunsi, N.; *J. Nat. Prod.*, 50 695 (1987).
17. - Hamburger, M.; Hostettman, K.; *Phytochemistry*, 30 3864-3874 (1991).

18. - Hanson, J.R.; *Natural Product Reports*, 211-227 (1988).
19. - Harbone, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H.; *The Flavonoids*, Vol. I y II, Academic Press 1975, USA.
20. - Herz, W., Santhanam, Warner, P.S.; Hoer, R.; Horhammer, L.; Frakas, L; *Tetrahedron letter*, 3419 (1970a).
21. - Herz, W.; Kulanthaivel, P.; *Phytochemistry*, 22 715-720 (1983).
22. - Homans, A.L.; Funchs, A. *J. Chromatog.*, 51 327 (1970).
23. - Hostettmann, K.; Kizo, H.; Tamimori, T.; *Planta medica*, 44, 34 (1982).
24. - Jacupovic, R.X.; Tan, F.; Bohlman, P.E.; Jia, Z.J.; *Phytochemistry*, 30 1573-1577 (1991).
25. - Jacupovic, J.; Tan, R.X.; Bohlman, F.; Jia, Z.L.; Huneck, S.; *Phytochemistry*, 30 1941-1946 (1991).
26. - Jiménez, C.; Villaverde, M.C.; Riguera, R.; Castedo, C.; *Phytochemistry*, 28 2773-2776 (1989).
27. - Jurd, L.; *In the Chemistry of flavonoids compound*, Pergamon Press 1962, USA.
28. - Krishnaswamy, N.R.; Seshadri, T.R.; Tahir, P.J. *Indian J. Chem.*, 6 676 (1968).
29. - Kouno, I.; Mon, K.; Akiyama, T.; Hashimoto, M.; *Phytochemistry* 30 351-353 (1991).
30. - Kupchan, S.M.; Sigel, C.W.; Hemingway, R.J.; Knox, J.R.; Udayamorthy, M.S. *Tetrahedron*, 25, 1603-1615 (1969).
31. - Lippincot, J.A.; Lippincot, B.B. *Annu. Rev. Microbiol.*, 29 377 (1975).
32. - Mabry, T.J.; Markham, K.R.; Thomas, M.B.; *The Sistematic Identification of Flavonoids*, Sprigner-Verlag, (1970) Berlin.
33. - Matson, A., Hostettman, K.; *In methodos in plant biochemistry*, Vol. 6, pag. 153-178, Academic Press, (1991), USA.
34. - Markham, K.R.; *Techniques of flavonoids identification.*, Academic Press, 1982 USA.

- 35.- Martson, A.; Hostettman, K.; In *Methodos in Plant Biochemistry*, Vol.6, pag. 153-178, Academic Press 1991, USA29
- 36.- Marco, J.A.; Sanz, F.J.; Yuste, A.; *Phytochemistry*, 30 3661-3668 (1991).
- 37.- Mata, R.; Delgado, G.; Romo de Vivar, A.; *Phytochemistry*, 23 1665-1668 (1984).
- 38.- Mata, R.; Rios, L.; Camacho, M. del R.; Reguero, M. T.; Lorence, D.; *Phytochemistry*, 27 1887-1884 (1988).
- 39.- Mata, R.; Castañeda, P.; Camacho, M. del R.; *Journal of Natural Products*, 51 836-839 (1988).
- 40.- Mata, R.; Rojas, A.; Soriano, M.; Villena, R.; Bye, R.; Linares, E.; *Heterocycles*, 31 111-114 (1990).
- 41.- McLaughlin, J.L.; Suffness, M.; In *Methods in Plant Biochemistry*, pag. 1-32, Vol. 6, Academic Press 1991, USA.
- 42.- Mengi, N.; Taneja, S.C.; *Phytochemistry*, 30 2329-2330 (1991).
- 43.- Milosavljevic, S.; Aljancic, I.; Macura, S.; *Phytochemistry*, 30, 3464-3466 (1991).
- 44.- Miyase, T.; Ferushima, S.; *Chem. Pharm. Bull.*, 35 2869-2874 (1987).
- 45.- Mose, P.G.; Pregosin, P.S.; Randall, W.E.; *J.C.S. Perkin I*, 1525-1527 (1974).
- 46.- Nandy, A.K.; Podder, G.; Sahu, N.P.; Mahato, S.B.; *Phytochemistry*, 28 2769-2772 (1989).
- 47.- Narayanan, C.R.; Venkatasubramanian, N.K.; *The Journal of Organic Chemistry*, 33 3156-3163 (1968).
- 48.- Ohmura, K.; Miyase, T.; Veno, A.; *Phytochemistry*, 28 1919-1929 (1989).
- 49.- Pfander, H.; Stol, H.; *Natural Product Reports*, 69-95 (1991).
- 50.- Rojas, A.; Villena, R.; Jiménez, A.; Mata, R.; *Journal of Natural Products* 54 1279-1282 (1991).
- 51.- Sanz, F.J.; Barbera, O.; Marco, A.; *Phytochemistry*, 28 2163-2167 (1989).
- 52.- Shekani, M.S.; Shah, P.M.; Yasmin, A.; Siddiqui, R.; Perveen, S.; Khan, K.M.; Kazmi, S.U.; Rahman, A.V.; *Phytochemistry*, 29 2573-2576 (1990).

- 53.- Shimuzo, S.; Miyase, T.; Veno, A.; Usmanghani, K.;
Phytochemistry, 28 3399-3402 (1989).
- 54.- Spring, O.; *Phytochemistry*, 30 519-522 (1991).
- 55.- Uchiyama, T.; Miyase, T.; Veno, A.; Usmanghani, K.;
Phytochemistry, 28 3369-3372 (1989).
- 56.- Uchiyama, T.; Nishimura, K.; Miyase, T.; Veno, A.;
Phytochemistry, 29 2947-2951 (1990).
- 57.- Velasco, D.; Castells, J.; Lopez-Calahorra, F.; *J. Org.
Chem.*, 55, 3526-3530 (1990).
- 58.- Warashina, T.; Ishinio, M.; Miyase, T.; Veno, A.;
Phytochemistry, 29 3217-3224 (1990).
- 59.- White, S.J.; Jacobs, R.S.; *Mol. Pharmacol.*, 20 614 (1981).
- 60.- Witt, E.M.; Watkins, F.S.; *J.C.S. Perkin II.*, 204 (1978).
- 61.- Zdero, C.; Bohman, F.; Scott, R.; *Phytochemistry*, 26
1999-2006 (1987).