

N=8
251



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA CORTEZA Y SEMILLAS
DE *Celaenodendron mexicanum* Standl.
(EUPHORBIACEAE)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ALMA YOLANDA BAHENA PEREZ

MEXICO, D. F.,

1992.

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

LISTA DE CUADROS	I
LISTA DE ESPECTROS	II
LISTA DE ESQUEMAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE GRAFICAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI

Introducción

1 Antecedentes	1
2 Generalidades de friedelanos	
2.1 Variación estructural y distribución en la naturaleza	4
2.2 Biosíntesis	7
2.3 Propiedades físicas	7
2.4 Determinación estructural	7
2.5 Actividad biológica	20
3 Justificación y objetivos	28
4 Parte experimental	
4.1 Estudio fitoquímico y biológico de la corteza	
4.1.1 Materiales y métodos	

4.1.1.1	Material vegetal	30
4.1.1.2	Análisis cromatográficos	30
4.1.1.3	Métodos de extracción y fraccionamiento	30
4.1.1.4	Aislamiento y purificación de los compuestos	
4.1.1.4.1	Aislamiento de Friedelina (4) y del Epi-friedelinol (31)	33
4.1.1.4.2	Aislamiento del Stigmasterol (34)	33
4.1.1.4.3	Aislamiento de la 4 α .5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	33
4.1.2	Caracterización de las sustancias aisladas	
4.1.2.1	Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas	35
4.1.2.2	Oxidación de (31) con reactivo de Collins	35
4.1.2.3	Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	35
4.1.2.4	Determinación de la actividad alelopática y antifúngica del extracto total y de los compuestos aislados	36
4.2	Estudio químico y biológico preliminar de las semillas	
4.2.1	Materiales y métodos	38

4.2.2 Métodos de extracción y fraccionamiento	38
4.2.3 Análisis cromatográficos comparativos	38
4.2.4 Aislamiento de compuestos	
4.2.4.1 Aislamiento de mezcla A	39
4.2.4.2 Aislamiento de la 4 α ,5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	39
4.2.5 Ensayos biológicos	39
5 Resultados y Discusión	
5.1 Identificación de los compuestos aislados	41
5.1.1 Identificación del Epifriedelinol (31).....	43
5.1.2 Identificación de la Friedolina (4).....	47
5.1.3 Identificación del Stigmasterol (34).....	47
5.1.4 Identificación de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35).....	47
5.2 Evaluaciones biológicas de los extractos y compuestos aislados	57
6 Resumen y Conclusiones	90
7 Recomendaciones	91
8 Bibliografía	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Fuentes naturales de algunos friedelanos	8
Cuadro 2	Propiedades físicas de algunos friedelanos	10
Cuadro 3	Datos espectrales de RMN ¹ H de algunos friedelanos.	22
Cuadro 4	Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C para algunos friedelanos	23
Cuadro 5	Iones fragmentos de algunos friedelanos	25
Cuadro 6	Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos	31
Cuadro 7	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto clorofórmico de <i>C. mexicanum</i>	33
Cuadro 8	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto metanólico de las semillas de <i>C. mexicanum</i>	40
Cuadro 9	Rendimientos de los compuestos aislados de corteza y semillas de <i>C. mexicanum</i>	42
Cuadro 10	Constantes físicas y espectroscópicas de (31) ...	44
Cuadro 11	Constantes físicas y espectroscópicas de (35) ...	48
Cuadro 12	Desplazamientos químicos observados para el compuesto (35) en tres diferentes disolventes y las correlaciones ¹ H- ¹³ C observadas en el espectro HETCOR (registradas en DMSO-d ₆).....	51

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro de IR del Epifriedelinol (31).....	58
Espectro 2	Espectro de RMN^1H ($CDCl_3$) del Epifriedelinol (31)	59
Espectro 3	Espectro de RMN^1H ($CDCl_3$) del Epifriedelinol (31).	60
Espectro 4	Espectro de RMN^1H bidimensional COSY ($CDCl_3$) del Epifriedelinol (31)	61
Espectro 5	Espectro de $RMN^{13}C$ APT ($CDCl_3$) del Epifriedelinol (31)	62
Espectro 6	Espectro de masas del Epifriedelinol (31)	63
Espectro 7	Espectro de IR de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	64
Espectro 8	Espectro de RMN^1H (Dioxano) de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	65
Espectro 9	Espectro de $RMN^{13}C$ APT (Dioxano) de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	66
Espectro 10	Espectro de RMN^1H (DMSO) de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	67
Espectro 11	Espectro de RMN^1H (DMSO) de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	68
Espectro 12	Espectro de RMN^1H (DMSO) de la 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	69

Espectro 13	Espectro de RMN ¹³ C (DMSO) de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	70
Espectro 14	Espectro de RMN ¹ H (D ₂ O) de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	71
Espectro 15	Espectro de RMN ¹³ C APT (D ₂ O) de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	72
Espectro 16	Espectro de RMN ¹ H bidimensional COSY (D ₂ O) de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	73
Espectro 17	Espectro bidimensional HETCOR (D ₂ O) de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	74
Espectro 18	Espectro de doble resonancia de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	75
Espectro 19	Espectro de doble resonancia de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	76
Espectro 20	Espectro de doble resonancia de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	77
Espectro 21	Espectro de masas de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	78
Espectro 22	Espectro de masas FAB + de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	79
Espectro 23	Espectro de masas FAB - de la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35)	80

LISTA DE ESQUEMAS

III

Esquema 1 Preparación del extracto clorofórmico de la corteza de <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl	32
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolitos aislados del extracto cloroformo-metanólico de <i>C. mexicanum</i>	2
Figura 2	Estructura base de los friedelanos.....	4
Figura 3	Estructura del canofilol (7) y del canofilal (8)...	4
Figura 4	Estructuras de friedelanos	5
Figura 5	Estructuras adicionales de friedelanos	5
Figura 6	Estructuras del pachysandienol A (20), pristimerina (21) y zaylasterona (22).....	6
Figura 7	Estructuras de friedolactona (23) y ácido ortospénico (24)	6
Figura 8	Biosíntesis de friedelanos	18
Figura 9	Iones fragmentos característicos para los friedelanos tomando como base la friedelina	24
Figura 10	Compuestos analizados en los ensayos biológicos	26
Figura 11	Correlación química del producto (31) y friedelina (4)	46
Figura 12	Espectro COSY del compuesto (35)	52
Figura 13	Estructura parcial A	53
Figura 14	Estructura parcial B	53

Figura 15 Estructura parcial C 54

Figura 16 Angulo dihedral de 90° observado para el compuesto
C39 55

LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1 Extracto de corteza de <i>Celaenodendron</i> sobre Amaranto y <i>Echinochloa</i>	81
Gráfica 2 Extracto metanólico de semillas de <i>Celaenodendron</i> sobre Amaranto y <i>Echinochloa</i>	82
Gráfica 3 Lixiviado acuoso de semillas de <i>Celaenodendron</i> sobre Amaranto y <i>Echinochloa</i>	83
Gráfica 4 Compuesto (35) aislado de <i>Celaenodendron</i> sobre Amaranto y <i>Echinochloa</i>	84
Gráfica 5 Extracto metanólico de semillas de <i>Celaenodendron</i> sobre hongos fitopatógenos	85
Gráfica 6 Extracto metanólico de semillas de <i>Celaenodendron</i> sobre hongos fitopatógenos	86
Gráfica 7 Compuesto (35) sobre hongos fitopatógenos	87
Gráfica 8 Compuesto (35) sobre hongos fitopatógenos	88
Gráfica 9 Lixiviado acuoso de semillas de <i>Celaenodendron</i> sobre hongos fitopatógenos	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	: acetato de etilo
CHCl ₃	: cloroformo
MeOH	: metanol
CDCl ₃	: cloroformo deuterado
d	: doblete
s	: singulete
m	: multiplete
D ₂ O	: agua deuterada
EMIE	: espectro de masas por impacto electrónico
Hz	: hertz
IR	: infrarojo
J	: constante de acoplamiento
MHz	: mega hertz
m/z	: masa - carga
p.f.	: punto de fusión
RMN ¹ H	: resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	: resonancia magnética nuclear de carbono 13
UV	: ultravioleta
TMS	: tetrametilsilano
ppm	: partes por millón
dioxano-d ₆	: dioxano deuterado
DMSO-d ₆	: dimetil-sulfóxido deuterado
dd	: doble de dobles

INTRODUCCION

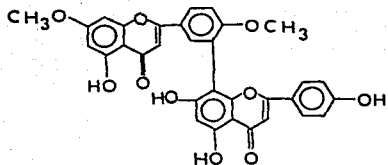
1. ANTECEDENTES

Celaenodendron mexicanum Standl es una planta que pertenece a la familia Euphorbiaceae [Subfamilia Oldfieldioideae, tribu Hyaenancheae, subtribu Paivaesinae] (Webster, 1975) y tiene la particularidad de ser una especie endémica de México; se le conoce popularmente con el nombre de Palo Prieto (Jury, 1987) y se encuentra distribuida en los estados de Jalisco y Sinaloa (Martínez, 1987). Cabe destacar que el género *Celaenodendron* es monotípico.

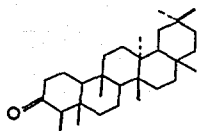
En la medicina popular es empleada como agente antimicrobiano; su corteza se utiliza principalmente para la construcción de casas ya que es altamente resistente al ataque de insectos y de microorganismos; además tiene la característica de crecer en selvas caducifolias formando bosques, observándose que en su habitat no permite el crecimiento de otras especies a su alrededor (Castañeda, 1991).

Desde el punto de vista fitoquímico, las partes aéreas de *C. mexicanum* han sido recientemente objeto de estudio (Castañeda, 1991, 1992), constituyendo este el único trabajo que se ha descrito sobre la especie. Esta investigación permitió el aislamiento y caracterización de tres triterpenos, tres biflavonas y un esteroles, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1. Las biflavonas se caracterizaron como la ginkgetina (1) la bilobetina (2) y la amentoflavona (3). Los triterpenos fueron identificados como la friedelina (4), la maytensifolina B (5), y el 3- β -hidroxid-18-oxo D:A friedelano (6), representando este último un nuevo producto natural; por último el esteroles se identificó como el β -sitosterol.

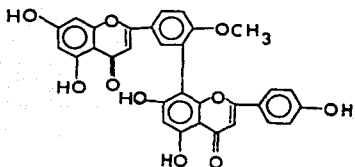
Adicionalmente, se evaluó el efecto del extracto total de



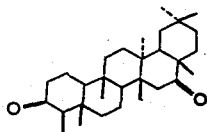
(c1)



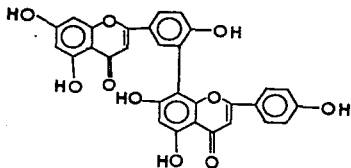
(c4)



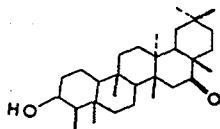
(c2)



(c5)



(c3)



(c6)

Figura 1: Metabolitos aislados del extracto cloroformo-metanólico de partes aéreas de *C. mexicanum* Standl (Castañeda, 1991)

las partes aéreas, y de los compuestos aislados sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus leucocarpus*, y sobre hongos fitopatógenos. El extracto total mostró un efecto selectivo inhibitorio sobre el crecimiento de *Amaranthus* y una acción estimulante sobre *Echinochloa*. En cuanto a los compuestos evaluados los resultados fueron también selectivos, la friedelina y la maytensifolina B mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre *Echinochloa*, en tanto que sobre *Amaranthus* el efecto fue estimulante. Por el contrario las biflavonas presentaron un efecto estimulante sobre *Echinochloa* e inhibitorio sobre *Amaranthus*.

Con respecto a la actividad antifúngica las cepas empleadas fueron *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.*, y *Helminthosporium sp.* y los resultados fueron poco alentadores, ya que en ninguno de los casos se observó inhibición significativa del crecimiento de los hongos objeto del estudio.

2. GENERALIDADES DE FRIEDELANOS

2.1 Variación estructural y distribución en la naturaleza

Los friedelanos son triterpenos pentacíclicos que tienen como esqueleto base la estructura indicada en la Figura 2.

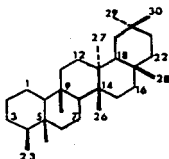
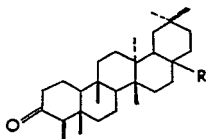


Figura 2: Estructura base de los friedelanos

En general, los friedelanos tienen como característica común un metilo en C-4 y funciones oxigenadas en C-3, presentando en este caso un grupo ceto como se puede observar en la friedelina (4), canofilol (7) y canofial (8) (Figura 3), ó un grupo hidroxilo ó un acetoxi como en los compuestos ilustrados en la Figura 4.



(7) $R=CH_2-OH$

(8) $R=CH=O$

Figura 3: Estructuras del canofilol (7) y canofial (8).

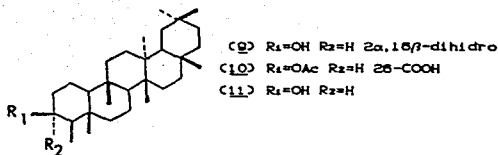


Figura 4: Estructuras de friedelanos..

Las funciones oxigenadas antes mencionadas pueden encontrarse con menor frecuencia, en otras posiciones como C-1, C-2, C-6, C-7, C-11, C-16, C-21, y C-22; ejemplos de estos friedelanos se encuentran representados por los compuestos de la Figura 5.

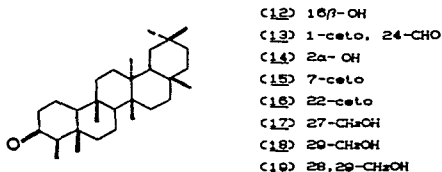


Figura 5: Estructuras adicionales de friedelanos

Los metilos C-27, C-28 y C-29 de algunos friedelanos pueden presentar diferentes grados de oxidación (alcoholes, aldehidos o ácidos) como es el caso de las estructuras (7) y (8) de la Figura 3 y los compuestos (17-19) de la Figura 5.

En algunos puede estar ausente alguno de los metilos de la estructura base como en los casos de los compuestos (20) y (21) de la Figura 6.

En cuanto a insaturaciones, los friedelanos que las presentan son escasos y estas pueden encontrarse en diversas posiciones como lo podemos observar en los productos naturales de la Figura 6.

Finalmente cabe destacar que se han aislado friedelanos poco comunes; como los indicados en la Figura 7.

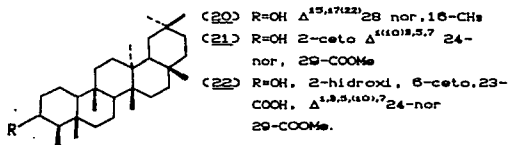


Figura 6: Estructuras del pachysandienol A (20), pristimerina (21) y zeylasterona (22).

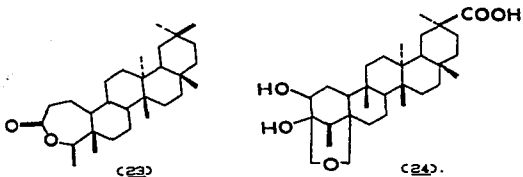


Figura 7: Estructuras de friedolactona (23) y ácido ortospenico (24).

Podemos decir que la distribución de los friedelanos en la naturaleza es muy abundante, no estando restringido a una familia de plantas en particular como se puede apreciar en el Cuadro 1, en el cual se indican fuentes naturales y algunos ejemplos de este tipo de compuestos. Se ha observado que la friedelina es el friedelano más abundante en el reino vegetal y en ocasiones se aísla conjuntamente con el epifriedelinol.

2.2 Biosíntesis

Los friedelanos se biosintetizan por la ruta acetato mevalonato, como la mayoría de los triterpenos, a partir del epoxi-escualeno como se indica en la Figura 8.

2.3 Propiedades físicas

Los friedelanos son sólidos, ópticamente activos y en general son solubles en AcOEt, CHCl₃ y MeOH. En el Cuadro 2 se indican las propiedades físicas de algunos friedelanos.

2.4 Determinación estructural

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

Debido a que son muy pocos los friedelanos que presentan dobles ligaduras conjugadas en la molécula (ver estructuras 21 y 22 de la Figura 7) la utilidad de la espectroscopia UV es muy reducida; en cuanto a la espectroscopia IR, esta es útil fundamentalmente para indicarnos los grupos funcionales que tienen las moléculas.

Los espectros de RMN y de masas de la mayoría de los friedelanos

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos Friedelinos

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Ericaceae</u>		
<u>Rhododendron barbatum</u>	Friedelina	Bahuguna <u>et al.</u> , 1987
<u>Rhododendron metternichii</u> Sieb & Zucc	Epifriedelinol	Takemoto <u>et al.</u> , 1958
<u>Rhododendron campanulatum</u> D. Don	Epifriedelinol	Rangaswami <u>et al.</u> , 1961
<u>Rhododendron westlandii</u> Hempal	Epifriedelinol	Arthur <u>et al.</u> , 1961
<u>Rhododendron anthopogon</u>	Epifriedelinol	Jain <u>et al.</u> , 1987
<u>Rhododendron reticulatum</u>	Friedelina, epifriedelinol	Koyama <u>et al.</u> , 1974
<u>Rhododendron kantschaticum</u>	Friedelina, epifriedelinol	Fokina <u>et al.</u> , 1971
<u>Rhododendron punctum</u>	Friedelina	Auf dem K. <u>et al.</u> , 1970
<u>Rhododendron caucasicum</u>	Friedelina, epifriedelinol	Fokina <u>et al.</u> , 1971
<u>Rhododendron hodgsonii</u>	Friedelina	Sengupta <u>et al.</u> , 1970
<u>Rhododendron sp</u>	Friedelina	Fokina <u>et al.</u> , 1970
<u>Rhododendron punctum</u>	Friedelina	Sambamurthy <u>et al.</u> , 1970
<u>Vaccinium uliginosum</u>	Friedelina	Nees <u>et al.</u> , 1974
<u>Vaccinium bracteatum</u>	Friedelina	Sakakibara <u>et al.</u> , 1973
<u>Vaccinium bracteatum</u> Thunb	Epifriedelinol	Yasue <u>et al.</u> , 1965

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos Friedelanos (Continuación)

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Euphorbiaceae</u>		
<u>Putranjiva roxburghii</u>	Friedelina	Sengupta <u>et al.</u> , 1968
<u>Antidesma menasu</u> Hiq. extul	Friedelina, canofilal, antidesmanol canofilol	Rizui <u>et al.</u> , 1980
<u>Euphorbia trigona</u> Hav	Friedelina, epifriedelinol friedelinol	Anjaneyulu <u>et al.</u> , 1983
<u>Celaenodendron</u> <u>mexicanum</u> Standl	Friedelina, maytensifolina B	Castañeda, 1991
<u>Euphorbia lathyris</u>	Friedelina, epifriedelinol, friedel-3-ene	Hui <u>et al.</u> , 1975
<u>Euphorbia royleana</u>	Friedelan-14en-3-ol.	Anjaneyulu <u>et al.</u> , 1974
<u>Bischofia javanica</u>	Friedelina, acetato de epifriedelinol	
<u>Euphorbia ruthiana</u>	Epifriedelinol	Dhasmana <u>et al.</u> , 1990
<u>Euphorbia nerifolia</u> L.	Friedelina, epifriedelinol	Anjaneyulu <u>et al.</u> , 1965
<u>Bridelia micrantha</u> Baill	Epifriedelinol	Pegel <u>et al.</u> , 1968
<u>Putranjiva roxburghii</u>	Friedelina, 3ohidroxifriedelan- 7-ona	Sengupta <u>et al.</u> , 1968
<u>Bischofia trifoliata</u> (Roxb) H.K.f	Friedelina, epifriedelinol	Hui <u>et al.</u> , 1968
<u>Antidesma bunias</u> Spreng	Epifriedelinol	Hui <u>et al.</u> , 1968

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Clusiaceae</u>		
<u>Cassia densifolia</u>	Friedelina	Gunasekera <u>et al.</u> , 1983
<u>Clusia ellipticifolia</u>	Friedelina	González <u>et al.</u> , 1983
<u>Moraceae</u>		
<u>Ficus binghalensis</u> Banyan	Epifriedelinol	Chatterjee <u>et al.</u> , 1968
<u>Cunoniaceae</u>		
<u>Ceratopetalum apetalum</u> D. Don	Friedelina, epifriedelinol	Jefferies, 1954
<u>Buxaceae</u>		
<u>Pachysandra terminalis</u> Sieb & Zucc	Epifriedelinol	Kikuchi <u>et al.</u> , 1967
<u>Pachysandra terminalis</u>	Pachysandienol A	Kikuchi, <u>et al.</u> , 1981
<u>Pachysandra terminalis</u>	Pachysonol, nuevos friedelanos	Kikuchi <u>et al.</u> , 1974
<u>Araliaceae</u>		
<u>Dendronax trifidus</u> (Thunb) Makino	Epifriedelinol	Kimura <u>et al.</u> , 1960
<u>Verbenaceae</u>		
<u>Clerodendrum inerme</u>	Friedelina	Achari <u>et al.</u> , 1990
<u>Clerodendron trichotomum</u> Thunb	Epifriedelinol	Nonomura, 1955
<u>Clerodendron splendens</u> Don	Friedelina, epifriedelinol	Joishi <u>et al.</u> , 1985

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos friedelanos (Continuación)

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Convolvulaceae</u>		
<u>Argyrea populifolia</u>	Friedelina, epifriedelinol	Gunatilaka <u>et al.</u> , 1973
<u>Sapindaceae</u>		
<u>Alectryon excelsum</u>	Epifriedelinol	Briggs <u>et al.</u> , 1967
<u>Rubiaceae</u>		
<u>Antirrhoea chinensis</u> (Champ) Benth & Hook	Epifriedelinol	Hui <u>et al.</u> , 1967
<u>Aclepiadaceae</u>		
<u>Asclepias tuberosa</u>	Friedelina	Pagani, 1975
<u>Menispermaceae</u>		
<u>Legnephora moorei</u>	Friedelina	Flor <u>et al.</u> , 1974
<u>Lauraceae</u>		
<u>Nachilus parviflora</u> Huisan	Friedelina, epifriedelinol	Talapatra <u>et al.</u> , 1979
<u>Lythiaceae</u>		
<u>Lagerstroemia</u> <u>lancastreri</u>	Friedelina	Talapatra <u>et al.</u> , 1983
<u>Flacourtiaceae</u>		
<u>Hydnocarpus octandra</u> Yhw	Friedelan-1ohidroxi-29-CHO, friedelan-1-oxo -29-CHO	Gunasekera <u>et al.</u> , 1973

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Celastraceae</u>		
<u>Salacia prinoidea</u> D.C.	Derivados de friedelanos	Joshi <u>et al.</u> , 1973
<u>Kokoona zeylanica</u>	Friedelan-2,3-dihidro, 6-ceto, 23-CHO, 24nor, 29-COOH	Kawai <u>et al.</u> , 1983
<u>Gymnosporia emarginata</u>	pristimerina	Wijeratne, <u>et al.</u> , 1982
<u>Maytenus diversifolia</u>	maytenfoliol	Nozaki <u>et al.</u> , 1982
<u>Kokoona zeylanica</u>	Friedelina, friedelan-3,21 -diona, 21- hidroxifriedelan-3ona	Gunatilaka, 1982
<u>Catha cassinoides</u>	Pristimerina	González <u>et al.</u> , 1975
<u>Euonymus pendulus</u>	Friedelina, epifriedelinol	Joshi <u>et al.</u> , 1978
<u>Elaeodendron glaucum</u>	Diversos derivados de friedelanos	Weeratunga <u>et al.</u> , 1982
<u>Euonymus europaea</u> L.	Friedelina, epifriedelinol	Pasich, <u>et al.</u> , 1980
<u>Elaeodendron glaucum</u>	Friedelan-3-oxo, 17-hidroxi-28nor	Anjaneyulu <u>et al.</u> , 1980
<u>Catha cassinoides</u>	Friedelina, 29y30-hidroxifriedelan-3-ona, ácido-3-oxo-friedelan-29-oico	Betancor <u>et al.</u> , 1980
<u>Euonymus europaea</u>	Friedelina, epifriedelinol	Pasich <u>et al.</u> , 1980
<u>Maytenus disperma</u>	Pristimerina	Martin, 1974
<u>Salacia prinoidea</u>	Friedelina, friedel-1-en-3-ona, friedelan-1,3-diona, 1,3-dioxo- friedelan-24-al	Tewari <u>et al.</u> , 1974
<u>Salacia prinoidea</u>	Friedelina, friedelan-1,3-diona	Rangaswami <u>et al.</u> , 1971
<u>Maytenus guianensis</u>	Friedelan-3,7-diona	De Sousa <u>et al.</u> , 1986
<u>Siphonodon australe</u> Benth	Diversos derivados de friedelanos	Shannon <u>et al.</u> , 1963

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos friedelanos (Continuación)

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Celastraceae</u>		
<u>Euonymus japonicus</u>	Friedelina, epifriedelinol	Sengupta <u>et al.</u> , 1965
<u>Euonymus radicans</u>	Friedelina	Hazaki <u>et al.</u> , 1959
<u>Maytenus octogona</u>	Friedelina, canofilol	Gonzalez <u>et al.</u> , 1986
<u>Austroplenckia populnea</u>	Acido-3 β hidroxi-2-oxo-friedelan-20oico, ácido-3 β hidroxi-2-oxo-friedelan-3-ene-20oico.	De Sousa <u>et al.</u> , 1990
<u>Euonymus revolutus</u>	10 friedelanos	Muthukuda, 1985
<u>Maytenus diversifolia</u>	Friedelina, maytenfoliol, canofilol canofilal, maytensifolina A y B, pachysanol	Nozaki <u>et al.</u> , 1986
<u>Euonymus revolutus</u>	10 friedelanos	Kumar <u>et al.</u> , 1985
<u>Catha cassinoides</u>	Friedelina, 29 y 30 hidroxifriedelan-3-ona	Betancor <u>et al.</u> , 1980
<u>Kokoona seylanica</u>	Friedelan -3-oxo, 6 hidroxil	Gunatilaka, 1979
<u>Kokoona seylanica</u>	Friedelan -3-oxo, 27-hidroxil	Gunatilaka, 1979
<u>Gentianaceae</u>		
<u>Hopsea dichotoma</u>	Friedelina, epifriedelinol	Ghosal <u>et al.</u> , 1978
<u>Canacora decussata</u>	Friedelina, epifriedelinol	Ghosal <u>et al.</u> , 1973
<u>Balanophoraceae</u>		
<u>Balanopa australiana</u> F. Muell	Friedelina, epifriedelinol	Shopper, <u>et al.</u> , 1962
<u>Pinaceae</u>		
<u>Pinus serotina</u> Hort	Epifriedelinol	Takahashi <u>et al.</u> , 1965
<u>Pinus roxburghii</u>	Friedelina	Beri, 1970

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos friedelanos (Continuación)

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Fagaceae</u>		
<u>Quercus robur</u> L.	Friedelina	Wrzeciono, 1963
<u>Quercus suber</u> L.	Friedelina	Sora <u>et al.</u> , 1950
<u>Quercus petraea</u> (Hattuschke) Liebl	Friedelina, epifriedelinol	Riabinin <u>et al.</u> , 1961
<u>Quercus championae</u> Hook	Friedelina, epifriedelinol	Arthur <u>et al.</u> , 1964
<u>Litocarpus irwinii</u>	Friedelan-2,3-diona	Hui <u>et al.</u> , 1975
<u>Litocarpus sp</u>	Friedelina, epifriedelinol, canofilol, friedelan-2,3-diona	Hui <u>et al.</u> , 1975
<u>Litocarpus sp</u>	Friedelina, epifriedelinol Friedelan-2- α -3 β -diol	Arthur <u>et al.</u> , 1974
<u>Quercus semicarpifolia</u>	Friedelina	Agrawal <u>et al.</u> , 1980
<u>Quercus glauca</u>	Friedelina, epifriedelinol	Suga <u>et al.</u> , 1974
<u>Quercus ilix</u>	Friedelina	Ribo <u>et al.</u> , 1972
<u>Quercus lanceaefolia</u>	Friedelina, canofilol, canofilal	Kulshreshtha <u>et al.</u> , 1971
<u>Quercus pachyphylla</u>	Friedelina, canofilol	Jyoti <u>et al.</u> , 1970
<u>Quercus bambusaefolia</u>	Friedelina, epifriedelinol	Arthur <u>et al.</u> , 1965
<u>Quercus myrsinae</u>	Epifriedelinol	Arthur <u>et al.</u> , 1965

Cuadro 1: Fuentes naturales de algunos friedelinos (Continuación)

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Compositae</u>		
<u>Mikania triangularis</u>	Friedelina	Knudsen <u>et al.</u> , 1986
<u>Eupatorium riparium</u> Revel	Epifriedelinol	Patra <u>et al.</u> , 1981
<u>Olearia paniculata</u>	Epifriedelinol	Corbett <u>et al.</u> , 1964
<u>Tanacetum albipannosum</u>	Friedelina, epifriedelinol	Goren <u>et al.</u> , 1990
<u>Eupatorium adenoforum</u> Sprang	Friedelina	González <u>et al.</u> , 1987
<u>Mikania triangularis</u>	Friedelina	Knudsen <u>et al.</u> , 1986
<u>Calcea parviflora</u>	Friedelina	Borges <u>et al.</u> , 1986
<u>Eremanthus clocagnus</u> Shultz-Bsp	Friedelina, epifriedelinol	Le Queene <u>et al.</u> , 1978
<u>Eupatorium azureum</u>	Epifriedelinol	Domínguez <u>et al.</u> , 1973
<u>Cuttiferae</u>		
<u>Clusia ellipticifolia</u>	Friedelina, epifriedelinol	Salama, 1986
<u>Uramia martiana</u>	Friedelina	Nagem <u>et al.</u> , 1990
<u>Calopyllium calabo</u>	Friedelina, canofilol, canofilal, 3 β -hidroxifriedelan-28-CH ₂ OH, 3 β -hidroxifriedelan-28-COOH	Gunatillaka <u>et al.</u> , 1984
<u>Caraipa densiflora</u>	Friedelina	Alves de Lima <u>et al.</u> , 1970
<u>Clusia rosea</u>	Friedelina, epifriedelinol, afriedelinol	Mishur, 1972

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Asteraceae</u>		
<u>Aster himalaicus</u>	Epifriedelinol	Talapatra <u>et al.</u> , 1989
<u>Artemisa afra</u>	Friedelina	Silbernagel <u>et al.</u> , 1990
<u>Aster baccharoides</u>	Friedelina, epifriedelinol	Hui <u>et al.</u> , 1971
<u>Aster scaber</u>	Friedelina, epifriedelinol	Tada <u>et al.</u> , 1974
<u>Aster tataricus</u> L.	Epifriedelinol	Takahashi <u>et al.</u> , 1959
<u>Rosaceae</u>		
<u>Prunus turfosa</u> Kalkman	Epifriedelinol	Barva <u>et al.</u> , 1957
<u>Prunus salus</u> L.	Epifriedelinol	Chakravarti <u>et al.</u> , 1965
<u>Prunus nerotina</u>	Friedelina	Bieschke <u>et al.</u> , 1974
<u>Myrtaceae</u>		
<u>Eugenia jambolana</u> L.	Epifriedelinol	Hui <u>et al.</u> , 1968
<u>Eugenia jambolana</u>	Friedelina, epifriedelinol	Bhargava <u>et al.</u> , 1974
<u>Guttiferae</u>		
<u>Calophyllum</u>	Friedelina	Gunasekera <u>et al.</u> , 1975
<u>Cordia alliodora</u>		
<u>Calophyllum thwaitesii</u>	Friedelina	Dahanayake <u>et al.</u> , 1974
<u>Calophyllum zeylanicum</u>	Friedelina, epifriedelinol	Gunasekera <u>et al.</u> , 1981

Fuente natural	Compuestos aislados	Referencia
<u>Hippocrateaceae</u>		
<u>Pristimera grahamii</u>	Friedelina, epifriedelinol, canofilol, friedelan-3 α -28-diol	Sukumar <u>et al.</u> , 1990
<u>Pristimera grahamii</u>	Friedelina, epifriedelinol, canofilol	Rao <u>et al.</u> , 1990
<u>Phytolaccaceae</u>		
<u>Petiveria alliacea</u>	α friedelinol	De Sousa <u>et al.</u> , 1990
<u>Orchidaceae</u>		
<u>Cymbidium aloifolium</u>	Friedelina	Barva <u>et al.</u> , 1990
<u>Vitaceae</u>		
<u>Cissum quadrangularis</u>	Friedelina	Gupta <u>et al.</u> , 1991
<u>Cheiropleuriaceae</u>		
<u>Cheiropleuria discuppie</u>	Friedelina	Kanaya <u>et al.</u> , 1990

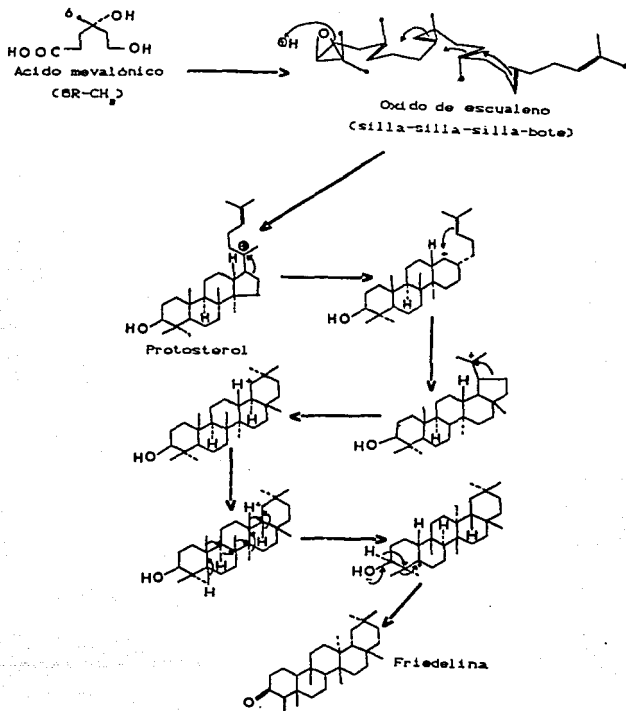


Figura 8: Biosíntesis de friedelanos

Compuesto	Número de estructura	$[\alpha]_D^{25}$ (CHCl ₃)	p. f. (°C)
Friedelina	<u>4</u>	-12.9	258-260
Canofilol	<u>7</u>	-28.2	282-283
Canofilal	<u>9</u>	-15.0	267-268
Maytenfoliol	<u>10</u>	-12.8	290-291
3β-hidroxifriedelan-16-ona	<u>6</u>	+10.9	112-115
29-hidroxifriedelan-3-ona	<u>18</u>	-12.1	268-270
30-hidroxifriedelan-3-ona		-17.9	270-271
Maytensifolina B	<u>5</u>	-21.8	280-282
Pachysonol	<u>12</u>	- 4.7	278-280

Cuadro 2: Propiedades físicas de algunos friedelanos

conocidos a la fecha presentan un perfil característico y por lo tanto son de gran utilidad en el proceso de elucidación estructural. En los Cuadros 3 y 4 se indican datos de RMN^1H y de $RMN^{13}C$, respectivamente de algunos friedelanos en $CDCl_3$ (Nozaki *et al.*, 1986; Patra *et al.*, 1987; Gunatillaka *et al.*, 1983).

En la Figura 9 podemos observar fragmentos característicos para los friedelanos tomando como base la friedelina (Hirota *et al.*, 1975) y en el Cuadro 5 se resumen fragmentos característicos de otros friedelanos (Nozaki *et al.*, 1986; Castañeda, 1991; López, 1980).

Finalmente en lo que respecta al análisis por difracción de rayos X cabe mencionar que se encuentran descritos los datos para algunos friedelanos simples (Betancor *et al.*, 1980; Rogers *et al.*, 1980).

2.5 Actividad biológica

Los estudios biológicos reportados sobre friedelanos son escasos; en la sección 1 se menciona un estudio realizado recientemente sobre la posible actividad alelopática y antimicótica de algunos friedelanos (Castañeda, 1991, 1992). En otro reporte sobre actividad biológica, el extracto metanólico de la raíz de *Maytenus diversifolia* mostró una actividad inhibitoria significativa *in vivo* contra leucemia linfocítica P-388 en ratones BDF (T/C= 100%) e *in vitro* en cultivo de células KB. La actividad antileucémica del extracto era debida a la presencia del maytenfoliol (18), del ácido maytenfólico (26) y de la maytensifolina A (27) (Nozaki *et al.*, 1986).

Otro trabajo realizado nos indica que el extracto de *M. carolinensis* fué tóxico *in vitro* contra células P-388 y D KB ; y

los componentes del extracto: β -amirina (28), β -amirona (29), friedelina (4), friedelina 3- β -ol (31), ácido ursólico (30) y β -sitosterol (32) no demostraron actividad por sí solos (Han et al., 1988).

Se efectuó otro estudio probando la actividad antiinflamatoria y diurética de la friedelina (4), el canofilal (8), el canofilol (7) y el antidesmanol (33). La actividad antiinflamatoria de los compuestos fue evaluada en ratones contra edema agudo inducido por carragenina y ninguno de ellos mostró actividad. La actividad diurética fue probada en ratas y solo la friedelina (4) a 64 mg/kg (p.o.) mostró un 99% de actividad en relación a la clorotiazida (125 mg/kg) utilizada como control positivo (Rizui et al., 1980).

La friedelina (4) y compuestos relacionados han sido considerados efectivos para el tratamiento de cáncer de ureter, convulsiones, inflamaciones, úlceras de la piel, inflamaciones de origen reumático, fiebre y disenteria (Brüning, 1978).

Más recientemente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana del canofilol (7), el canofilal (8) y el ácido canofilico (25) (Rojas, 1990) aislados de *Hippocratea excelsa* (López, 1989). Los microorganismos empleados para los ensayos, incluyeron bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y una levadura (*Candida albicans*). La medición de los halos de inhibición, demostró que el ácido canofilico y el canofilol eran inactivos para todos los microorganismos probados, en tanto que el canofilal exhibió un efecto selectivo, pero moderado inhibitorio contra *P. aeruginosa* (MIC=75 μ g/ml).

(Estructura)	H-2	H-4	Me-23	Me-24, 25, 26, 27	Me-28	Me-29	Me-30	Misc.
(4)	2.10-2.50 (m)	2.10-2.50 (m)	0.87 (d, 6.0)	0.72, 0.86, 0.94, 0.99 (c/u 3H, s)	1.00 (3H, s)	1.04 (3H, s)	1.17 (3H, s)	
(7)	2.20-2.50 (m)	2.20-2.50 (m)	0.87 (d, 6.0)	0.72, 0.87, 0.91, 0.98 (c/u 3H, s)		0.99 (3H, s)	1.14 (3H, s)	3.62 (CH ₂ -OH-17, s)
(8)	2.20-2.50 (m)	2.20-2.50 (m)	0.86 (d, 6.0)	0.66, 0.72, 0.84, 0.95 (c/u 3H, s)		0.98 (3H, s)	1.08 (3H, s)	9.44 (s, CHO-17)
(19)	2.10-2.50 (m)	2.10-2.50 (m)	0.87 (d, 6.0)	0.72, 0.86, 0.90, 1.00 (c/u 3H, s)		1.14 (3H, s)		1.30, 1.35 (c/u 1Hd, 10.0) 1.34, 1.63 (c/u 1H d, 10.5)
(6) *	1.3-2.4 (m)	1.3-2.4 (m)	0.96 (d)	0.84, 0.88, 1.04, 1.17 (c/u 3H, s)	0.92 (3H, s)	1.25 (3H, s)	1.28 (3H, s)	3.74 (m, H, -3)
(18)	2.20-2.50 (m)	2.20-2.50 (m)	0.87 (d, 6.0)	0.71, 0.86, 0.98, 0.99 (c/u 3H, s)	1.06 (3H, s)		1.14 (3H, s)	1.34, 1.42 (CH ₂ -OH-20) (c/u 1H, d, 10.0)
(5)	2.20-2.50 (m)	2.20-2.50 (m)	0.88 (d, 6.0)	0.74, 0.90, 0.91, 0.96 (c/u 3H, s)	1.05 (3H, s)	1.20 (3H, s)	1.30 (3H, s)	2.08, 2.40 (c/u 1H, AB d, 19.0, H-15)

En CDCl₃ a 290 MHz. Valores en ppm. Constantes de acoplamiento (C J en Hz) en paréntesis.

* En CDCl₃ a 300 MHz (Castañeda, 1991)

Multiplicidad asignada: s, singulete; d, doblete; m, multiplete; br, ancho.

Cuadro 3: Datos espectrales de RMN¹H de algunos friedelinos
(Nozaki et al., 1988).

Cuadro 4: Datos espectroscópicos de RMN¹³C para algunos friedelanos (Patra et al., 1987).

Carbonos	Friedelina (4)	Canofilol (7)	Mayten- foliol (19)	3β-hidroxi- friedelan- 16-ona(6)	29-hidroxi- friedelan- 3-ona (18)	30-hidroxi- friedelan- 3-ona	Mayten- sifolina B (5)	Pachysonol (12)
1	22.2	22.1	22.29	17.6	22.32	22.32	22.23	22.29
2	41.4	41.3	41.51	40.3	41.55	41.55	41.42	41.55
3	212.8	212.6	212.93	72.5	212.90	212.20	212.48	212.48
4	58.1	57.8	58.32	61.0	58.32	58.31	58.17	58.32
5	42.0	41.9	42.12	41.3	42.15	42.18	42.09	42.27
6	41.2	41.0	41.36	39.1	41.42	41.37	41.03	41.36
7	18.1	18.1	18.31	17.89	18.31	18.29	18.62	18.56
8	53.0	52.2	52.49	52.3	53.10	53.47	52.37	53.49
9	37.4	37.3	37.54	35.3	37.54	37.51	37.66	37.63
10	59.4	59.1	59.65	49.03	59.65	59.58	59.35	59.65
11	35.5	35.1	35.48	35.2	35.66	35.72	35.42	35.78
12	30.4	29.9	29.96	29.6	29.44	29.82	29.11	30.81
13	39.6	39.1	39.59	37.2	39.91	40.03	39.15	39.33
14	38.2	38.0	38.39	37.8	38.18	38.31	40.45	40.09
15	32.3	31.3	31.11	50.07	32.20	32.81	50.22	44.43
16	35.9	29.0	29.17	219.3	29.66	35.96	218.89	75.57
17	29.9	35.1	35.15	45.2	30.05	29.82	45.31	32.05
18	42.8	39.2	38.88	43.8	42.88	41.97	44.00	44.79
19	35.2	34.4	31.51	31.5	30.57	30.63	35.48	35.78
20	28.0	27.9	33.30	27.5	33.45	33.17	27.59	28.02
21	32.7	31.4	30.20	31.04	28.26	27.87	31.66	32.05
22	39.2	33.2	28.32	30.7	39.91	39.56	30.78	36.03
23	6.7	6.7	6.82	11.6	6.79	6.82	6.79	6.82
24	14.5	14.5	14.70	15.8	14.70	14.70	14.67	14.70
25	17.3	18.0	18.19	16.3	18.04	17.90	17.34	18.19
26	18.5	18.9	18.65	20.1	18.56	18.44	20.29	20.07
27	20.1	19.1	19.13	16.1	19.95	20.77	16.22	21.47
28	32.0	67.0	69.02	27.3	32.20	32.14	27.38	24.86
29	31.7	32.9	73.36	29.14	72.09	25.87	31.11	30.75
30	34.9	34.2	28.60	35.08	28.96	74.79	35.21	35.48

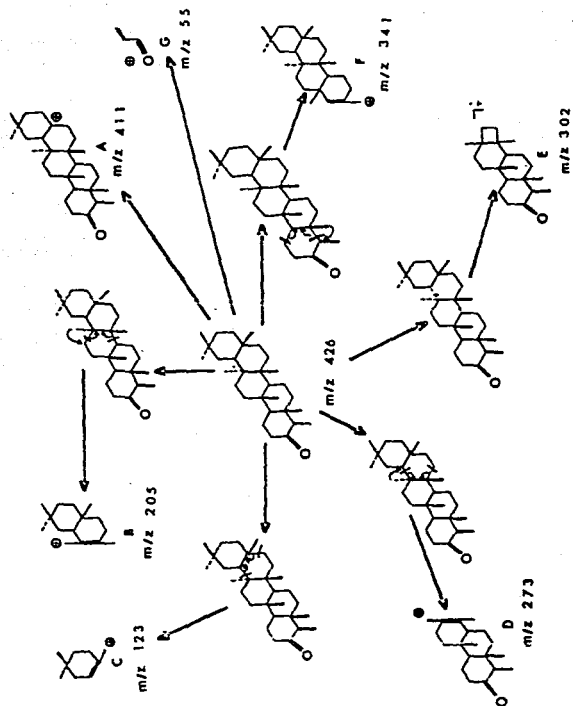
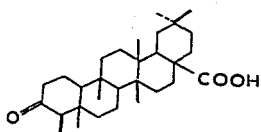


Figura 9: Iones fragmentos característicos para los friedelanos tomando como base la friedelina.

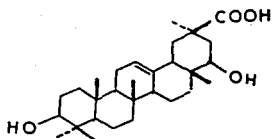
Cuadro 5: Iones fragmentos de algunos friedelanos.

Maytenfoliol (19)	Maytensifolina B (5)	Canofilol (7)	Pachysonol (12)	29-hidroxi friedelan-3-ona (18)
M+ 427.35 (100)	M+ 440.36 (100)	M+ débil 411 (100)	M+ 442.38 (6)	M+ 442.38 (90)
409 (21)	425 (43)	273 (62)	424 (11)	411 (33)
396 (4)	355 (30)		273 (100)	357 (17)
287 (4)	273 (18)			302 (65)
273 (18)	219 (43)			273 (75)
	124 (32)			221 (54)
				141 (100)

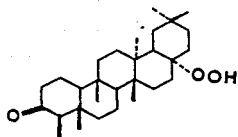
30-hidroxi- friedelan-3-ona	Friedelina (4)	Friedelan-3- hidroxi- 16-ceto (6)	Canofilal (8)
M+ 442.38 (100)	M+ 426.(44.6)	M+ 440 (20)	M+ 440 (2)
411 (22)	411 (16)	425 (31)	411 (21)
357 (10)	302 (42)	355 (17)	355 (1)
302 (35)	273 (61)	273 (6)	301 (6)
273 (71)	246 (41)	124 (29)	273 (22)
221 (29)	218 (54)	81 (64)	247 (10)
141 (75)	179 (55)	55 (400)	205 (7)
	125 (100)	39 (83)	191 (10)
	123 (58)		137 (94)
	96 (90)		55 (100)
	69 (26)		



(25) Acido canofilico



(26) Acido maytenfólico



(27) Maytensifolina A

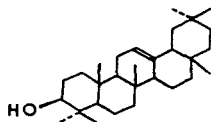
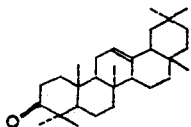
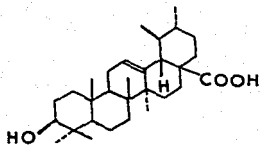
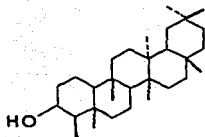
(28) β amirina(29) β amirone

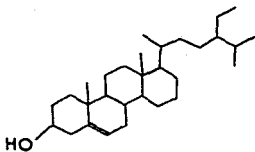
Figura 10: Compuestos analizados en los ensayos biológicos



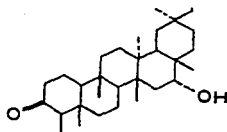
(30) Acido ursólico



(31) Friedelan 3β-ol



(32) β sitosterol



(33) Antidesmanol

Figura 10: Compuestos analizados en los ensayos biológicos
(Continuación)

3- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Uno de los principales criterios para descubrir nuevos productos naturales con actividad biológica, ha sido el estudio de plantas utilizadas en medicina tradicional (Farnsworth y Bingel, 1977; Farkas, 1988; Salemk, 1980; inter alia.).

Entre las plantas mexicanas que son utilizadas como agentes terapéuticos en la medicina popular y que potencialmente podrían constituir fuentes de principios activos se encuentra *Celaenodendron mexicanum*, que como se mencionó previamente es utilizada como agente antimicrobiano. Adicionalmente, un estudio previo de las partes aéreas de esta planta (Castañeda, 1991), condujo al aislamiento y caracterización de siete metabolitos: tres triterpenoides [la friedelina (4), la maytensifolina B (5) y el 3 β -hidroxi-16-oxo D:A friedelano (6)], tres biflavonas [la ginkgetina (1), la bilobetina (2) y la amentoflavona (3)] y un esteroide (β -sitosterol).

En esta investigación, se evaluaron el extracto y los compuestos aislados como posibles agentes alelopáticos y antifúngicos. En el caso del extracto se observó un efecto selectivo sobre el crecimiento radicular de las especies de prueba (*Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*), en el caso de los compuestos aislados solo la friedelina (4) y la amentoflavona (3) presentaron el mismo efecto. Finalmente, los resultados obtenidos de las evaluaciones sobre hongos fitopatógenos no fueron muy alentadores.

Tomando en cuenta lo anterior, el propósito del presente trabajo fué el de continuar el estudio fitoquímico de *Celaenodendron mexicanum* (corteza y semillas) con la finalidad de contribuir al conocimiento integral de la flora medicinal mexicana y obtener en lo posible compuestos bioactivos de la misma.

(García, 1987; Albor, 1988; Castañeda, 1987; Camacho, 1989; *inter alia*).

Los objetivos específicos planteados para el presente trabajo son los siguientes:

3.1 Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación del extracto vegetal.

3.2 Preparar los extractos de corteza y semillas de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlos mediante los métodos adecuados.

3.3 Separar y purificar los constituyentes de las diferentes fracciones.

3.4 Identificar, mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.

3.5 Realizar un análisis cromatográfico comparativo entre los extractos de corteza y partes aéreas, así como entre los compuestos aislados de los mismos y el extracto de las semillas.

3.6 Determinar la toxicidad de los extractos, fracciones y/o compuestos aislados para *Artemia salina* Leach, considerando que este bioensayo permite detectar en forma preliminar actividades biológicas más complejas (Meyer *et al.*, 1982).

3.7 Determinar la actividad antifúngica y alelopática potencial de los extractos y de los compuestos aislados.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Estudio fitoquímico y biológico de la corteza.

4.1.1 Materiales y métodos.

4.1.1.1 Material vegetal

El material vegetal (corteza) utilizado en este estudio, fue recolectado en el km 59 de la carretera Barra de Navidad - Puerto Vallarta, Municipio La Huerta, Jalisco; por la bióloga Nora Martijena en enero de 1990.

La corteza se secó a temperatura ambiente y posteriormente se molió en un molino de cuchillas modelo Wiley 4.

4.1.1.2 Análisis cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina, se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF-254, Merck). Los agentes reveladores utilizados se resumen en el Cuadro 5.

4.1.1.3 Métodos de extracción y fraccionamiento

El material vegetal (0.857 kg de corteza) se extrajo de acuerdo al procedimiento mostrado en el Esquema 1.

El extracto obtenido (59.3 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (593 g de sílica gel G-60 Merck, con tamaño de partícula 0.2-0.5 mm).

El proceso de elución se efectuó con hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 369 fracciones de 150 ml

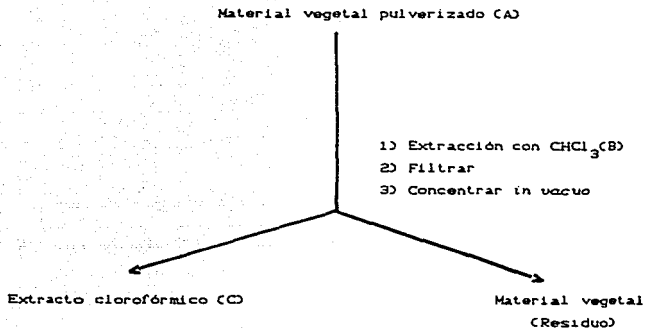
cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares.

En el Cuadro 7 se resume, los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada una de ellas y las fracciones combinadas.

AGENTE REVELADOR	COMPOSICION	REFERENCIA
Reactivo de Dragendorff	2.5 g de carbonato de bismuto 7 g de yoduro de sodio y 25 ml de ácido acético glacial.	Sthal, 1969
Sulfato cérico*	Sulfato cérico amniacal 12 g ácido sulfúrico concentrado 22.5 ml y 350 g de hielo.	Sthal, 1969
Yodo	Yodo metálico	

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

Cuadro 8: Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos



A) Cantidad de material vegetal (0.857 kg)

B) Extracción via maceración (6 veces por periodos de 48 horas cada vez, con un volumen aproximado de 4 lts).

C) Cantidad de extracto clorofórmico 59.3 g.

Esquema 1: Preparación del extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum*.

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano-Cloroformo	50:50	1-40	1-40*
Hexano-Cloroformo	40:60	41-68	41-57 58-61* 62-70
Hexano-Cloroformo	30:70	69-85	80-85*
Hexano-Cloroformo	25:75	86-111	86-90 97-111*
Hexano-Cloroformo	20:80	112-127	112-127*
Cloroformo	100	128-135	128-135*
Cloroformo-Metanol	95:5	136-227	136-141* 142-147 148-157 158-170 177-193 194-200 210-227*
Cloroformo-Metanol	90:10	228-301	228-252*
Cloroformo-Metanol	80:20	302-319	253-320
Cloroformo-Metanol	70:30	320-349	321-324 325-341 342-349
Cloroformo-Metanol	60:40	350-356	350-357
Cloroformo-Metanol	50:50	357-363	358-363
Metanol	100	364-369	364-369

* Fracciones no investigadas debido a la pequeña cantidad obtenida y a la complejidad de las mismas.

Cuadro 7: Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto cloroformico de *C. mexicanum*.

4.1.1.4 Aislamiento y purificación de los compuestos

4.1.1.4.1 Aislamiento de la Friedelina (4) y del Epi-friedelinol (31).

De las fracciones 41-57 (ver cuadro 7) precipitó un sólido blanco cristalino en forma de agujas (58 mg) el cual resultó ser una mezcla de dos compuestos. La mezcla anterior se resolvió en sus componentes individuales mediante una cromatografía preparativa en capa delgada de gel de sílice, empleando como eluyente cloroformo 100%. Se emplearon 3 placas. En cada placa se aplicaron aproximadamente 20 mg de la muestra objeto de la separación. Una vez procesadas las placas de acuerdo a los procedimientos convencionales, se obtuvieron dos compuestos:

- a) 25 mg de (31), como un sólido blanco en forma de agujas, soluble en cloroformo, con un $pf=245-249^{\circ}C$.
- b) 27 mg de un sólido blanco en forma de agujas (4) con un $pf=240-244^{\circ}C$.

4.1.1.4.2 Aislamiento del Estigmasterol (34).

De las fracciones 86-96 eluidas con hexano-cloroformo 25:75, precipitó un sólido blanco amorfo (34), el cual se purificó por recristalización, utilizando como disolventes cloroformo y metanol. Se obtuvieron 81 mg del compuesto el cual presentó un punto de fusión de $115-117^{\circ}C$.

4.1.1.4.3 Aislamiento del 4a, 5a- dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35).

De las fracciones 325-341, precipitaron 1.548 gramos de un sólido blanco cristalino (35), el cual fue purificado por tratamiento de una solución del compuesto en metanol con carbón activado. Se obtuvieron 1.32 g del compuesto puro con

un $pf=230-232$ °C.

4.1.2 Caracterización de las sustancias aisladas

4.1.2.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas

- a) Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher Johns, se reportan sin corregir.
- b) Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer modelo 500B en pastilla de KBr.
- c) Los espectros de masas fueron determinados en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5995-B.
- d) Los espectros de masas FAB fueron obtenidos en un aparato Finigan MAT 90 en la Universidad de Illinois de Chicago USA.
- e) Los espectros de RMN, fueron obtenidos en un aparato Varian VXR-300S, utilizando como disolventes $CDCl_3$, Dioxano, DMSO, D_2O y como referencia interna TMS.
- f) La rotación óptica fue medida en un polarímetro digital JASCO DIP 360.

4.1.2.2 Oxidación de (31) con reactivo de Collins

5 mg del compuesto (31), en 0.1 ml de piridina, se trataron con una solución de CrO_3 (6 mg de CrO_3 en 0.1 ml de piridina) a temperatura ambiente, con agitación durante 18 horas; al cabo de este tiempo, se procesó el crudo de la reacción obteniéndose 2 mg de un sólido amorfo soluble en $CHCl_3$.

4.1.2.3 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

Preparación de las muestras

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos), se prepararon disolviendo 20 mg de sustancia en 2 ml de disolvente adecuado. Posteriormente de esta solución, se transfiere a viales por triplicado, 500, 50 y 5 μ l respectivamente y se deja secar al vacío.

Bioensayo

Después de haber desarrollado los huevecillos de *Artemia salina* Leach durante 48 horas en un medio salino artificial, se transfieren 10 microorganismos a cada uno de los viales con la muestra y se afora a 5 ml con medio salino artificial, para obtener concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm. Después de 24 horas se cuentan el número de microorganismos vivos. Los resultados finales se expresan en porcentaje de mortalidad o mediante la concentración letal media (LC_{50}).

4.1.2.4 Determinación de la actividad alelopática y antifúngica del extracto total y de los compuestos aislados.

Procedimiento general de los bioensayos

El potencial alelopático del extracto y de los compuestos aislados de la corteza de *C. mexicanum*, fue probado sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*; en el caso del material vegetal la evaluación se realizó sobre un lixiviado acuoso y un extracto orgánico.

Con respecto a la determinación de la actividad antifúngica del extracto total y de los compuestos aislados se utilizaron los hongos de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Pythium*.

Estas evaluaciones fueron realizadas en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a la metodología previamente descrita por Anaya et al., 1990.

4.2 Estudio químico y biológico preliminar de las semillas.

4.2.1 Materiales y métodos

El material vegetal (semillas), utilizado en este estudio, fue recolectado en el lugar indicado en la sección 4.1.1.1. Posteriormente, las semillas fueron molidas en un mortero.

4.2.2 Métodos de extracción y fraccionamiento

El material vegetal (2.21 g de semillas) se extrajo via maceración con 30 ml de metanol, una vez, por un periodo de 48 horas. Posteriormente se concentró in vacuo obteniéndose 1.72 g de extracto, el cual fué fraccionado mediante una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice C 80 g de sílica gel G-60 Merck, con tamaño de partícula 0.2-0.5 mm).

El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol en diferentes proporciones: se obtuvieron 238 fracciones de 20 ml cada una y se unieron las similares cromatográficamente.

En el Cuadro 8 se resumen, los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada disolvente y las fracciones combinadas.

4.2.3 Análisis cromatográficos comparativos

Se realizaron cromatografías en capa delgada sobre gel de sílice de las fracciones obtenidas de las semillas, con los compuestos aislados de partes aéreas (Figura 1) y los compuestos (31), (34), (35), aislados de la corteza y el β -sitosterol.

Estas cromatografías comparativas se realizaron utilizando diferentes sistemas de eluyentes y utilizando como agentes reveladores, los mencionados en el Cuadro 8.

4.2.4 Aislamiento de compuestos

4.2.4.1 Aislamiento de mezcla A

De las fracciones 98-111 (Cuadro 8) eluidas con Cloroformo-Metanol 99:1, precipitó un sólido blanco amorfo (1.58 g), el cual por análisis cromatográfico resultó ser una mezcla compleja de ácidos grasos de acuerdo al comportamiento cromatográfico y al análisis del espectro de IR.

4.2.4.2 Aislamiento del 4 α -5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35).

De las fracciones 235-236 se aisló un sólido café amorfo el cual se purificó con carbón activado. Se obtuvieron 25 mg del compuesto puro).

4.2.5 Ensayos biológicos

Los procedimientos empleados para los ensayos biológicos (toxicidad para *Artemia salina* Leach, actividad alelopática y efecto antifúngico) del extracto, son los mismos indicados en las secciones 4.1.2.3 y 4.1.2.4.

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano	100	1-12	1-19
Hexano-Cloroformo	90:10	13-19	
Hexano-Cloroformo	80:20	20-35	20-26, 27-34
Hexano-Cloroformo	70:30	36-47	35-36, 37-54
Hexano-Cloroformo	50:40	48-59	55-62
Hexano-Cloroformo	50:50	60-73	63-74
Cloroformo	100	74-83	75-82
Cloroformo-Metanol	99:1	84-115	83-97, 98-101, 102-103, 104-106 107-111, 112-113
Cloroformo-Metanol	98:2	116-123	114-121
Cloroformo-Metanol	97:3	124-141	122-132, 133-141
Cloroformo-Metanol	95:5	142-153	142-152, 153
Cloroformo-Metanol	90:10	154-192	154-160, 161-166 167-200
Cloroformo-Metanol	80:20	193-207	201-206
Cloroformo-Metanol	60:40	208-224	207-218
Metanol	100	225-236	219-234, 235, 236

Cuadro 8: Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto metanólico de las semillas de *C. mexicanum* Standl.

5- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Identificación de los compuestos aislados.

Los extractos preparados a partir de la corteza (clorofórmico) y las semillas (metanólico) de *Celaenodendron mexicanum* se fraccionaron mediante cromatografía preparativa en columna de gel de sílice según se indica en las secciones 4.1.1.3 y 4.2 respectivamente. De las fracciones primarias obtenidas del extracto de la corteza se aislaron mediante diversos procedimientos cromatográficos: dos triterpenos (31) y (4), un esteroide (34) y una sustancia alcaloidea (35). En el Cuadro 9 se especifican los productos aislados y los rendimientos correspondientes. De las fracciones cromatográficas del extracto de las semillas se obtuvo un solo producto en forma pura el cual resultó idéntico al compuesto (35) obtenido de la corteza. En el Cuadro 9 se especifica también el rendimiento del producto (35) separado de las semillas.

Se realizó un análisis cromatográfico comparativo de las fracciones y compuestos aislados de la corteza con los previamente obtenidos de las partes aéreas, encontrándose dos metabolitos comunes de corteza y partes aéreas: el compuesto (35) y la friedelina (4). Cabe destacar que en el estudio previo el metabolito (35) no fue caracterizado. También se analizaron comparativamente las fracciones cromatográficas primarias del extracto de las semillas, con los compuestos aislados de la corteza y de las partes aéreas. En este caso el único metabolito común fue el (35).

Los compuestos aislados fueron caracterizados mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos y la discusión de su elucidación estructural será el objetivo principal de la presente sección.

FRACCIONES COMBINADAS	COMPUESTO	CANTIDAD OBTENIDA (mg)	RENDIMIENTO EN RELACION A PLANTA SECA (%)
41-57 (Corteza)	(4)	27	0.0031
	(31)	25	0.0029
86-96 (Corteza)	(34)	81	0.0094
325-341 (Corteza)	(35)	1548	0.1542
235-236 (Semillas)	(35)	25	1.1312

Cuadro 9: Rendimientos de los compuestos aislados de corteza y semillas de *C. mexicanum*.

5.1.1 Identificación del Epi-friedelinol (31)

El compuesto (31), fue aislado como un sólido cristalino en forma de agujas con un p.f. = 246-249°C. Su fórmula molecular fue establecida como $C_{30}H_{52}O$ por análisis elemental y espectrometría de masas. En el Cuadro 10 se resumen sus constantes físicas y espectroscópicas.

El espectro de IR (Espectro 1, Cuadro 10) mostró bandas características para C-H (2840, 2900 y 1400 cm^{-1}) y -OH (3460 cm^{-1}). Los espectros de RMN mostraron el perfil característico para un triterpeno del tipo friedelano (Patra *et al.*, 1987; Nozaki *et al.*, 1988).

En el espectro de RMN¹H (Espectros 2 y 3, Cuadro 3), se observaron señales entre 0.84 y 3.71 ppm las cuales se discriminaron de la siguiente manera:

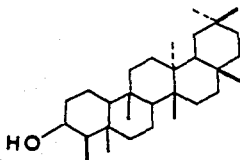
a) En la zona de 0.84 a 1.25 ppm se observaron señales atribuibles a 8 metilos (0.84, 0.91, 0.94, 0.96, 0.98, 1.003, 1.16 y 1.25 ppm) uno de los cuales debido a su multiplicidad (0.98 ppm, d) era fácilmente asignable al metilo en C-4 del esqueleto base.

b) El multiplete centrado en 1.3-1.8 ppm debía corresponder a metinos y metilenos.

c) Finalmente, la señal en 3.71 ppm era clara evidencia de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo secundario (Betancor *et al.*, 1980).

El espectro de RMN¹³C (Espectro 5, Cuadro 10), mostró señales para 30 átomos de carbono lo cual confirmaba la naturaleza triterpenoide del compuesto. De las 30 señales, la observada a campo más bajo (71.81 ppm), se asignó a un metino base de un alcohol secundario; de las 13 señales negativas observadas, ocho (11.41, 16.08, 17.92, 18.3, 19.78, 31.46, 31.73 y 34.88 ppm) se asignaron a los grupos metilos ya establecidos previamente mediante el espectro de RMN¹H y las otras cinco señales a grupos metinos (42.43, 48.87, 52.78, 61.0 y 71.81 ppm). Finalmente, las diecisiete señales restantes eran atribuibles a diez grupos

Cuadro 10: Constantes físicas y espectroscópicas de (31).



Fórmula molecular

 $C_{30}H_{52}O$

pf

245-249°C

 $[\alpha]_D^{25}$

+ 30

(CHCl₃ - 1 mg/ml)IR (KBr) cm⁻¹

3450, 2840, 2900, 1440, 1380

(Espectro 1)

RMN¹H ppm

0.84 (s, 3H, H-24)

0.91 (s, 3H, H-25)

(CDCl₃ - 300 MHz)

0.94 (s, 3H, H-26)

0.96 (s, 3H, H-26)

(Espectros 2,3,)

0.98 (d, 3H, H-23)

1.003 (s, 3H, H-27)

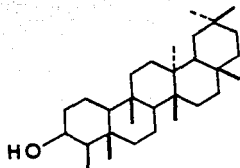
1.16 (s, 3H, H-29)

1.25 (s, 3H, H-30)

1.33-1.8 (m)

3.71 (m, 1H, H-3)

Cuadro 10: Constantes físicas y espectroscópicas de (31)
(Continuación)



RMN ¹³ C ppm (CDCl ₃ - 300 MHz) (Espectro 5)	71.81(C-3, -)	61.00(C-10, -)	52.78(C-8, -).
	48.87(C-4, -)	42.43(C-18, -)	41.39(C-5, +).
	38.88(C-13, +)	37.97(C-22, +)	37.49(C-14, +)
	36.71(C-15, +)	35.69(C-11, +)	35.18(C-9, +)
	34.98(C-19, +)	34.94(C-2, +)	34.68(C-30, -)
	32.44(C-21, +)	31.93(C-15, +)	31.73(C-28, -)
	31.45(C-29, -)	30.26(C-17, -)	29.64(C-12, +)
	29.3(C-6, +)	27.8(C-20, +)	19.78(C-25, -)
	18.3(C-25, -)	17.92(C-27, -)	17.2(C-7, +)
	16.08(C-24, -)	15.51(C-1, +)	11.41(C-23, -)

Nota: El signo entre paréntesis indica el correspondiente a la señal en el espectro de APT.

EMIE m/z (%) (Espectro 6)	428(M ⁺ 84), 413(44), 273.25(7), 218.20(9), 205.19(19), 304, 275.23(41), 276.24(25), 249.22(25), 165.
------------------------------	--

metilenos (15.51, 17.2, 20.3, 20.64, 31.03, 32.44, 34.04, 34.08, 35.60 y 36.71 ppm) y siete carbonos cuaternarios (27.8, 30.26, 35.18, 37.40, 37.07, 38.88 y 41.30 ppm).

Los datos espectroscópicos analizados hasta el momento, nos indicaban que el compuesto era un friedelano, con una función alcohólica secundaria, y de acuerdo a los desplazamientos químicos observados para C-3 (71.81 ppm) y C-23 (11.41 ppm) dicho grupo debía estar ubicado en la posición 3 (Patra et al., 1987).

Para comprobar esta hipótesis se decidió correlacionar químicamente este compuesto con la friedelina (4) mediante el tratamiento del producto (31) con piridina y trióxido de cromo (Figura 11).

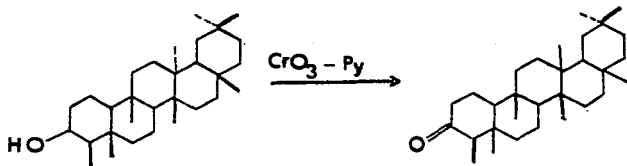


Figura 11: Correlación química del producto (31) y friedelina (4)

Como el producto de oxidación fue idéntico a la friedelina, se pudo comprobar inequívocamente que el grupo hidroxilo se encontraba en la posición 3.

Una vez ubicada la disposición del hidroxilo en C-3, el análisis del desplazamiento químico y la multiplicidad de la señal centrada en 3.71 ppm y la comparación con modelos descritos en la literatura (Anjaneyulu et al., 1989; Betancor et al., 1980), permitieron establecer que la estereoquímica del hidroxilo era β .

Con base en las evidencias presentadas, el producto natural fue identificado como el epi-friedelinol, el cual ya había sido previamente aislado de varias fuentes naturales (Takemoto et al., 1958; Yasue et al., 1965; Dhasmana et al., 1990; *inter alia*).

5.1.2 Identificación de la Friedelina (4).

El producto (4), fue aislado como un sólido blanco en forma de agujas con un p.f. = 196-200°C y se caracterizó como la friedelina por comparación con una muestra auténtica.

5.1.3 Identificación del Estigmasterol (34).

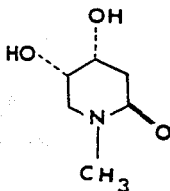
El producto (34), fue aislado como un sólido blanco amorfo, con un p.f. = 115-117°C; la comparación directa de este compuesto con una muestra auténtica, permitió identificarlo como el estigmasterol.

5.1.4 Identificación de la 4 α ,5 α -dihidroxi-N-metil-2-piperidona(35).

El producto (35), se aisló como un sólido blanco cristalino, soluble en metanol y agua, con un punto de fusión de 230-232 °C. Su fórmula molecular se estableció como C₁₄H₂₁NO₂ por EM-FAB de alta resolución, en sus modalidades positivo y negativo. Esta fórmula permite dos insaturaciones. El espectro FAB negativo presentó el ion molecular a m/z 144 (M-H)⁻, en tanto que el positivo presentó el ion molecular a m/z 146 (M+H)⁺. El espectro de IR (Cuadro 11, Espectro 7) presentó bandas de absorción características para grupo hidroxilo asociado (3280 cm⁻¹) y carbonilo de lactama (1624 cm⁻¹).

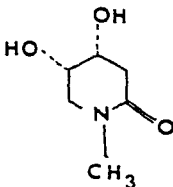
El espectro de RMN¹³C en dioxano (Espectro 9) presentó señales para seis átomos de carbono, en congruencia con la fórmula molecular. La señal positiva desplazada a campo más bajo (173.8 ppm) se asignó al grupo carbonilo de la función lactámica. De las tres señales negativas siguientes, dos (70.05 y 71.02 ppm) eran

Cuadro 11: Constantes físicas y espectroscópicas de (35)



Fórmula molecular	$C_6H_{11}NO_3$	
p. f	230 - 232°C	
$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$, 1.1 mg/ml)	-95.45	
IR (KBr) cm^{-1} (Espectro 7)	3260, 2960, 1630, 1410, 1370, 1310, 1280, 1220, 1090, 930, 710.	
$RMN^{13}C$ ($CDCl_3$, 300MHz) (Espectro 14)	171.5 (C-2,+) 69.83 (C-5,-) 43.87 (N- CH_3 ,-)	70.82 (C-4,-) 62.52 (C-6,-) 39.21 (C-3,+)
$RMN^{13}C$ ppm (Dioxano, 300MHz) (Espectro 9)	173.8 (C-2,+), 70.05 (C-5,-), 44.1 (N- CH_3 ,-),	71.09 (C-4,-), 63.7 (C-6,+), 39.3 (C-3,+).

Cuadro 11: Constantes físicas y espectroscópicas de (35)
(Continuación)



RMN^{13}C ppm (D_2O , 300MHz) (Espectro 16)	174 (C-2,+), 70.4 (C-5,-), 44.1 (N- CH_3 ,-).	71.2 (C-4,-), 53.8 (C-6,+), 39.2 (C-3,+).
EMIE m/z (%) (Espectro 21)	145 M^+ (1) , 144 $\text{M}-1$ (1) , 101 (0.7) 44 (17.9), 42 (41.1), 99, 96, 84, 13, 82 (100).	
EM FAB (+) m/z (%) (Espectro 22)	145 M^+ -1 (100), 101 (8)	
EM FAB (-) m/z (%) (Espectro 23)	144 M^+ -1 (100)	

asignables a los carbonos geminales de funciones carbinólicas secundarias y la tercera al grupo N-metilo de una función láctámica. Finalmente, las dos señales positivas restantes (39.3 y 53.7 ppm) eran atribuibles a dos grupos metílenos.

Los elementos estructurales derivados del análisis de los espectros de IR y de RMN^{13}C permitieron proponer como hipótesis preliminar que el producto natural era una lactama de seis miembros con dos funciones carbinólicas secundarias y un grupo N-metilo.

Los espectros de RMN^1H se registraron en tres diferentes disolventes (dioxano- d_6 , D_2O y DMSO-d_6) y en todos los casos se observaron siete grupos de señales, mismas que se encuentran resumidas de manera comparativa en el Cuadro 12. Cabe hacer notar, que la apariencia de todos los espectros fué muy similar, observándose mejor resolución en el espectro en D_2O (Espectro 15), por lo que para la discusión de las correlaciones homonucleares se hará referencia a este último y para consideraciones de la teoría del desplazamiento químico se hará mención al espectro en DMSO-d_6 (Espectro 11).

Los dos primeros grupos de señales (ver Cuadro 12), integraba cada una para un hidrógeno, y de acuerdo al desplazamiento químico debían corresponder a los hidrógenos α a un grupo carbonilo; por otra parte, como se puede observar en el espectro COSY (Figura 12) estos hidrógenos (2.2 y 2.42 ppm) interaccionaban entre sí y con el multiplete en 4.15 ppm (dd, $J = 10.9, 11.2$ Hz) correspondiente al hidrógeno del grupo 6 (Cuadro 12) asignable a un hidrógeno geminal a una función carbinólica secundaria. La constante de acoplamiento observada entre los hidrógenos del grupo 1 y 2 ($J = 14.2$ Hz) indicaba la relación geminal de ambos hidrógenos.

Las interacciones antes descritas entre los protones de los grupos

	δ DIOXANO	δ D ₂ O H	δ DMSO C	
Grupo 1 CH-3 β)	2.2 (m)	3.15 (m, J= 14.2, 10.9, 1.9, 1.46 Hz)	1.98 (m)	39.3
Grupo 2 CH-3 α)	2.42 (dd)	3.4 (dd, J= 14.2, 11.2, 4.8 Hz)	2.18 (dd)	39.3
Grupo 3 CN-CH ₂)	2.99 (s)	3.94 (s)	2.72 (s)	44.1
Grupo 4 CH-6 α)	3.14 (d)	4.1 (dd, J=12.6 Hz J 5-6 β)	2.76 (dd)	63.00
Grupo 5 CH-6 β)	3.9 (dd)	4.88 (dd, J=12.6 Hz J 5-6 α)	3.57 (dd)	63.00
Grupo 6 CH-4)	4.15 (dd)	5.1 (dd, J=11.2, 10.9 Hz)	3.68 (dd)	71.04
Grupo 7 CH-5)	4.58 (m)	5.55 (m)	4.28 (m)	70.05

Cuadro 11: Desplazamientos químicos observados para el compuesto (35) en tres diferentes disolventes y las correlaciones ^1H - ^{13}C observadas en el espectro HETCOR (registrados en DMSO-d₆).

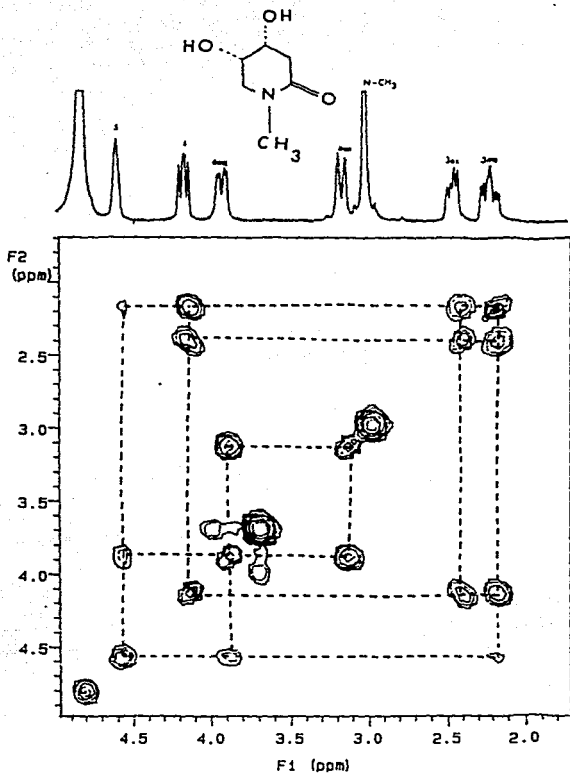


Figura 12: Espectro COSY del compuesto (30)

1, 2 y 6 (H-3 β , H-3 α , y H-4) permitieron proponer la estructura parcial A mostrada en la Figura 13.

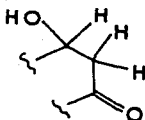


Figura 13: Estructura parcial A

Los hidrógenos correspondientes a los grupos 4 y 5 (3.14 y 3.0 ppm), que por su desplazamiento químico debían encontrarse o al nitrógeno correlacionaban entre sí (ver Figura 12) y una vez más, el valor de la constante de acoplamiento ($J = 12.6$ Hz) indicaba la relación geminal de los mismos; a su vez, los hidrógenos de los grupos 4 y 5 se encontraban interaccionando con el hidrógeno perteneciente al grupo 7 (4.58 ppm, m. H-5), el cual era también fácilmente asignable a un protón geminal a una función carbinólica secundaria. Las correlaciones recién descritas entre los hidrógenos de los grupos 4, 5 y 7 (H-5 α , H-6 β y H-5) permitieron deducir la estructura parcial B (Figura 14).

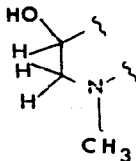


Figura 14: Estructura parcial B

De manera adicional, el espectro COSY en D_2O (Figura 12) permitió establecer el acoplamiento a larga distancia entre los hidrógenos de los grupos 1 y 7 (2.2 ppm, dd y 4.58 ppm, m).

Por último, el singlete que integraba para tres hidrógenos en 2.98 ppm pertenecientes al grupo 3 (Cuadro 12), se asignó al N-metilo previamente evidenciado por el espectro de RMN¹³C. Cabe destacar que los nueve hidrógenos previamente asignados correlacionaron en el espectro HETCOR (Espectro 17) con las señales correspondientes a cinco de los carbonos de la molécula. En el Cuadro 12 se resumen las correlaciones observadas.

La integración de las estructuras parciales A y B permitieron proponer la estructura C que se ilustra en la Figura 15, confirmando la hipótesis en relación a la estructura base del producto natural.

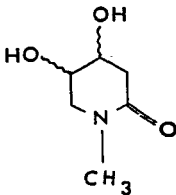


Figura 15: Estructura parcial C.

Como se puede apreciar en la estructura C, las funciones carbinólicas de la molécula se debían encontrar en disposición vecinal en C-4 y C-5, a pesar de que en el espectro COSY (Figura 12) no se observaba correlación alguna entre H-4 y H-5. La ausencia de un claro acoplamiento entre H-4 y H-5 indicaba un ángulo dihedral de casi 90° entre los planos $H_3-C_5-H_4$ y $H_5-C_4-H_4$. El análisis mediante modelos Dreiding de los distintos estereoisómeros posibles (4 α -5 α , 4 β -5 β , 4 α -5 β y 4 β -5 α ,

considerando en todos los casos una conformación de silla) y de los valores de $J_{4-3\alpha}$, $J_{4-3\beta}$, $J_{5-6\alpha}$ y $J_{5-6\beta}$, indicó que esto era solo posible si ambos hidroxilos se encontraban o orientados y unidos entre sí mediante un puente de hidrógeno (ver Figura 18). La estereoquímica $4\alpha,5\alpha$ permitía además explicar el acoplamiento de tipo W, observado entre $H-3\beta$ y $H-5\beta$ ($J = 1.46$ Hz).

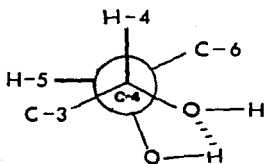


Figura 18: Angulo dihedral de 90° observado para el compuesto (35)

Por último, se realizaron una serie de experimentos de doble resonancia. Todos los hidrógenos del espectro (grupo 1- grupo 7) fueron irradiados registrándose en cada caso los espectros correspondientes (ver Espectros 18, 19 y 20). Como resultado de estos experimentos se confirmaron todas las correlaciones previamente observadas en el espectro COSY. Adicionalmente, se demostró que $H-4$ y $H-5$ mostraban una pequeña interacción ya que al irradiar la resonancia en 4.52 ppm ($H-5$) se modificaron no solamente las señales para $H-3\beta$ (2.14 ppm), $H-3\alpha$ (2.36 ppm), $H-6\alpha$ (3.08 ppm) y $H-6\beta$ (3.84 ppm) sino también la señal en 4.08 ppm ($H-4$), la cual se afinó perceptiblemente. La constante de acoplamiento sin embargo era muy pequeña ($J_{4-5} < 1$ Hz) consistente con un ángulo dihedral (θ_{4-5}) de aproximadamente 90° . Igualmente, al realizar el experimento contrario se afinó la señal en 4.52 ppm ($H-5$) además, de las otras modificaciones esperadas.

Con base en la discusión previa se propone para el producto (35) la estructura correspondiente a la 4a-5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35) que constituye un nuevo producto natural.

5.2 Evaluaciones biológicas de los extractos y compuestos aislados.

En relación a los ensayos biológicos, los extractos de corteza y semillas y el compuesto (35) fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos sobre las especies *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*. Los resultados obtenidos se resumen en las Gráficas 1-4. Además se evaluaron como posibles agentes antifúngicos sobre las especies *Helminthosporium sp.*, *Alternaria sp.*, *Fusarium sp.* y *Pythium sp.* Los resultados se muestran en las Gráficas 5-9.

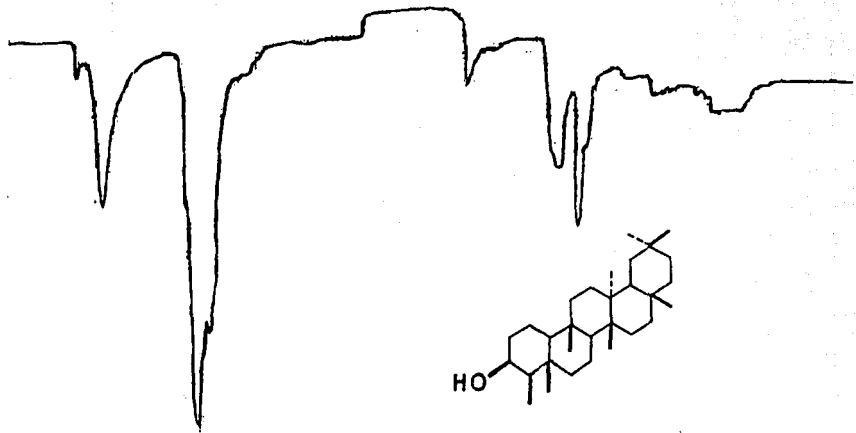
Los resultados indicados en las Gráficas 1-4, evidencian claramente que el extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum* y el compuesto (35) inhibieron de manera poco significativa el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*, en tanto que en el extracto de semillas se observó un efecto selectivo al estimular el crecimiento de *Amaranthus* e inhibir en el caso de *Echinochloa*.

Con respecto a los ensayos contra hongos fitopatógenos (Gráficas 5-9), el lixiviado acuoso de las semillas de *C. mexicanum* presentó efecto estimulante sobre *Pythium*.

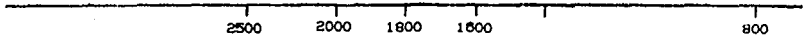
Por otro lado, el compuesto (35) mostró de manera similar, un efecto selectivo inhibitorio poco significativo sobre *Helminthosporium* y *Fusarium* y estimulante sobre *Alternaria* y *Pythium*.

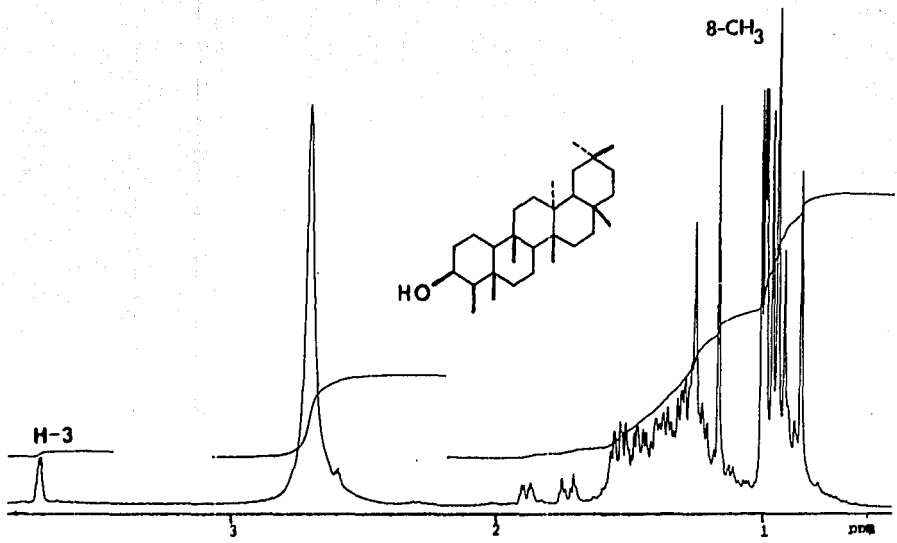
En cuanto al extracto metanólico de las semillas, este inhibió el crecimiento radial de *Helminthosporium* y *Fusarium*.

Por último se determinó la toxicidad de los extractos, de las fracciones combinadas y de los compuestos aislados para *Artemia salina* Leach (Meyer et al, 1982). En todos los casos la LC_{50} calculada mediante el método estadístico PROBIT fue $>$ a 1000 ppm.



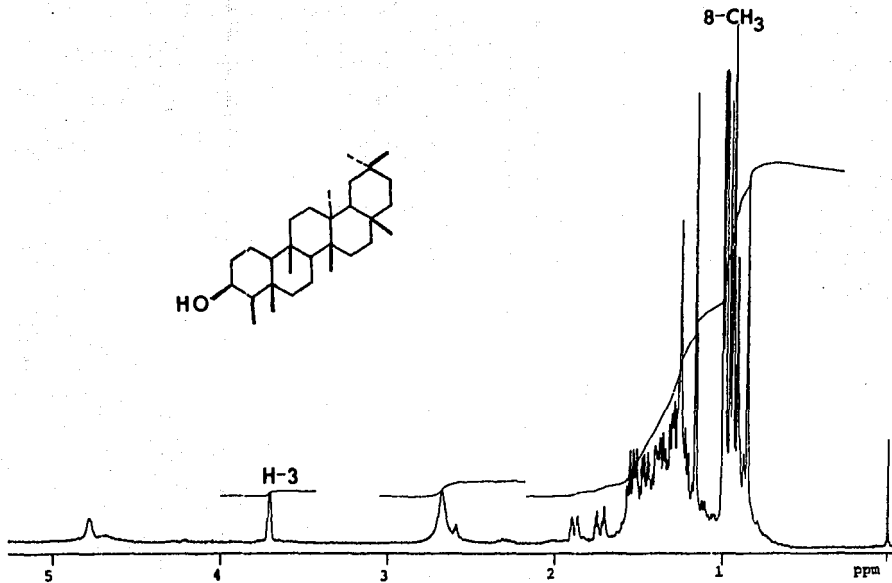
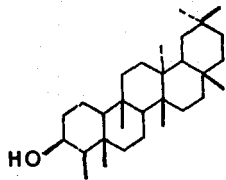
Espectro 1



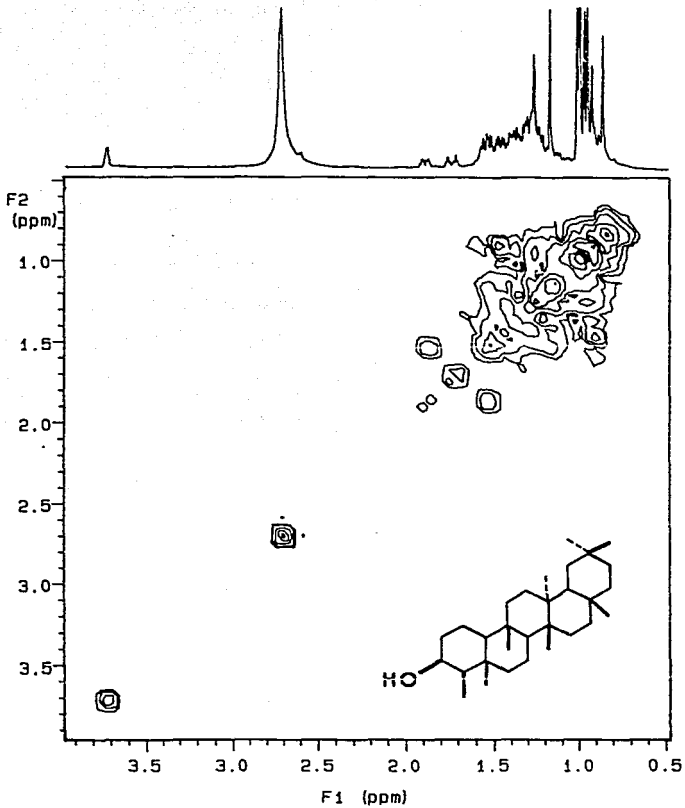


Espectro 2

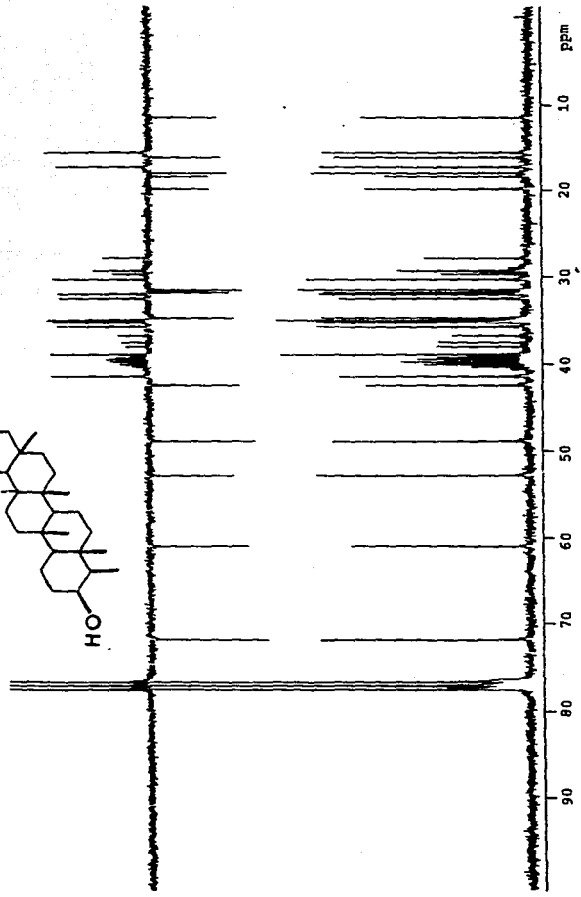
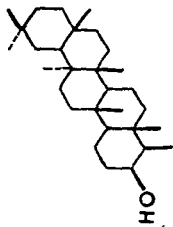
5

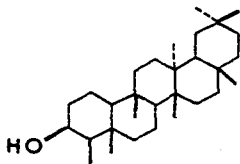
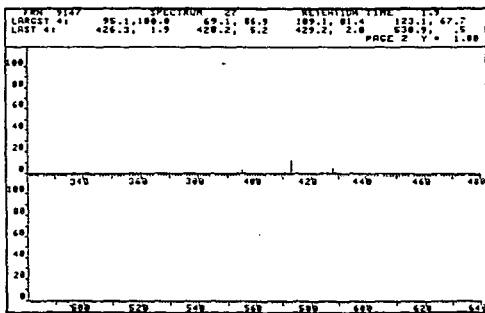
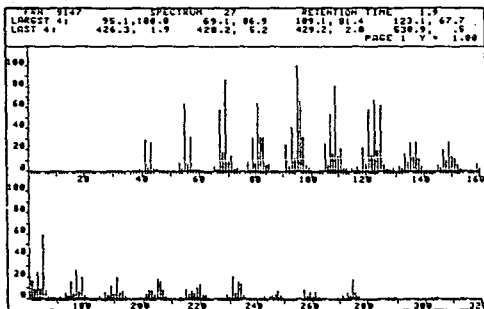


Espectro 3

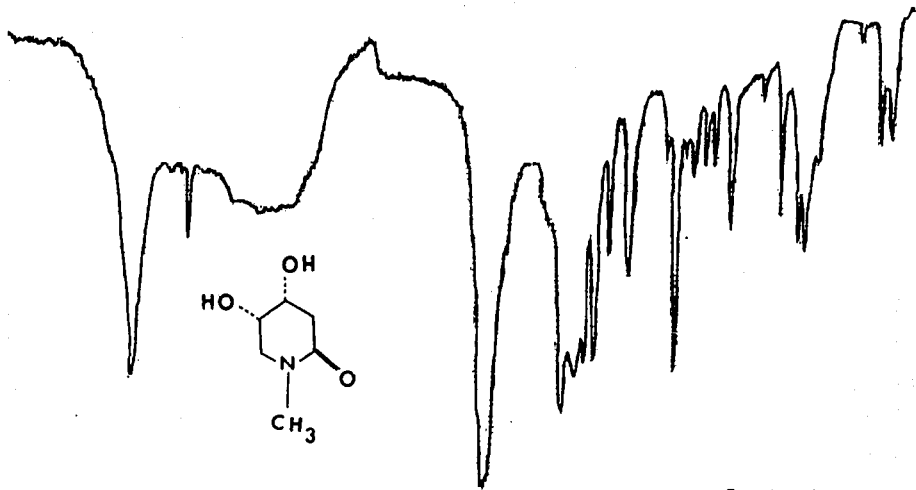


Espectro 4

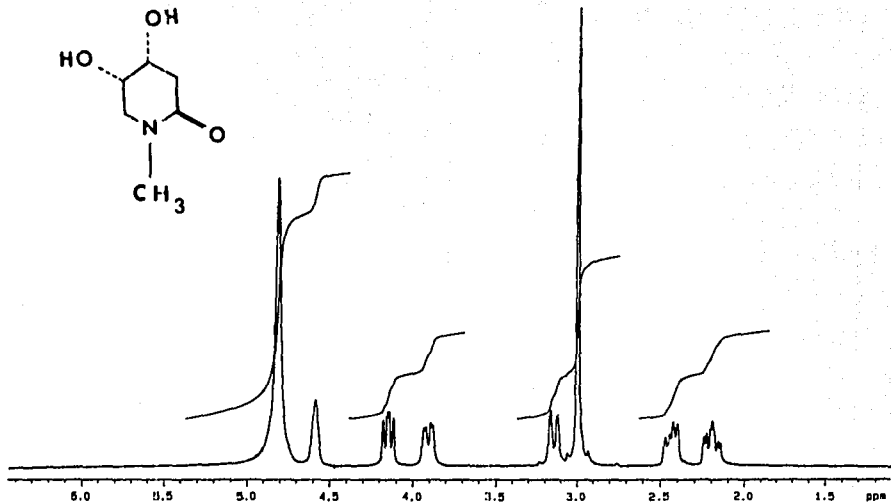
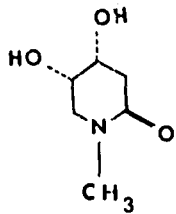


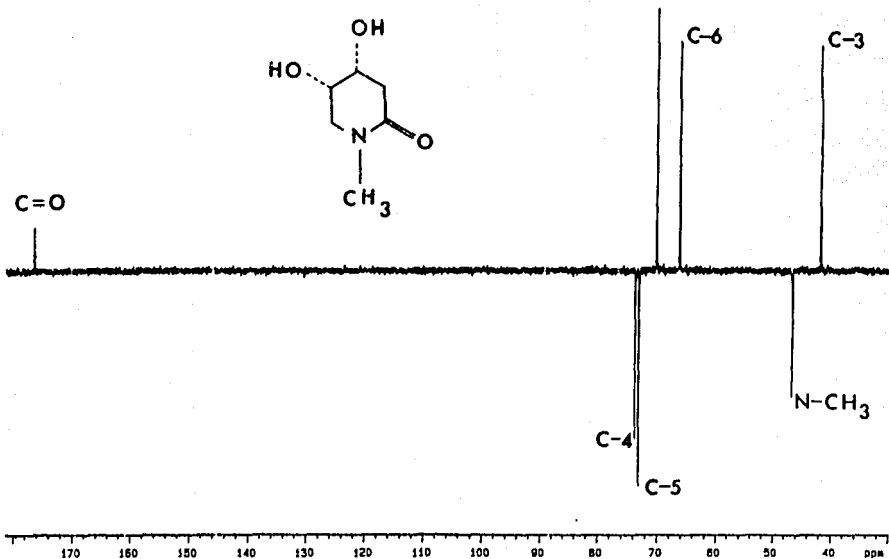
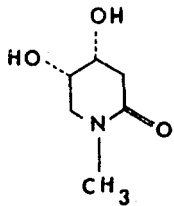


Espectro 6

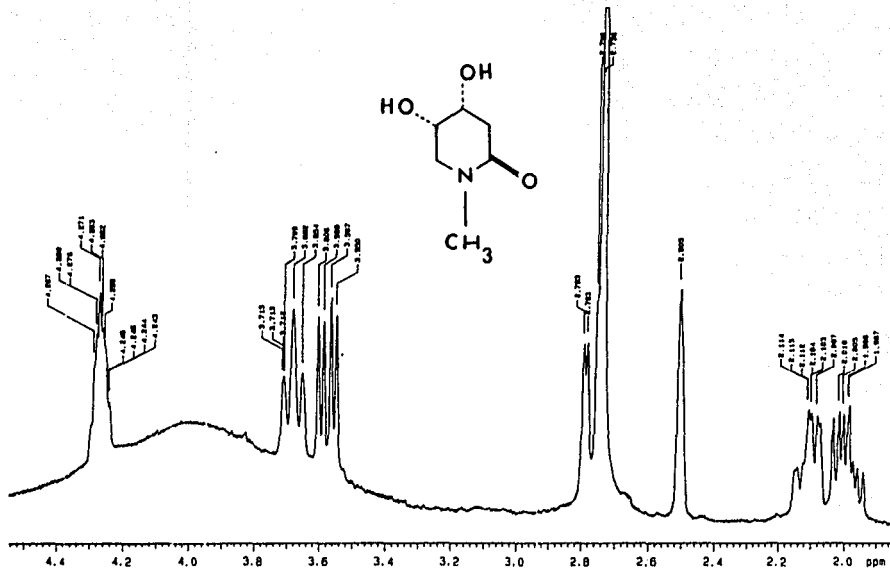
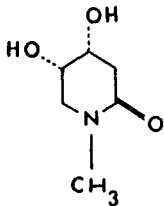


Espectro 7



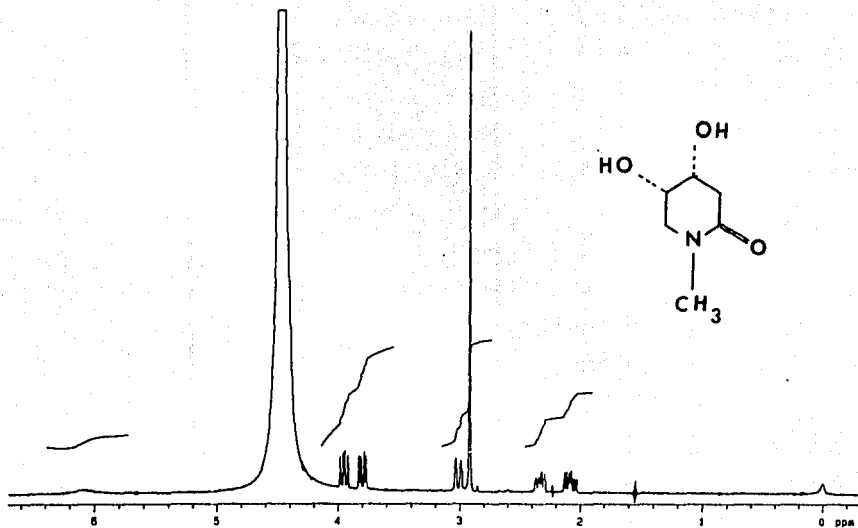


Espectro 9 2

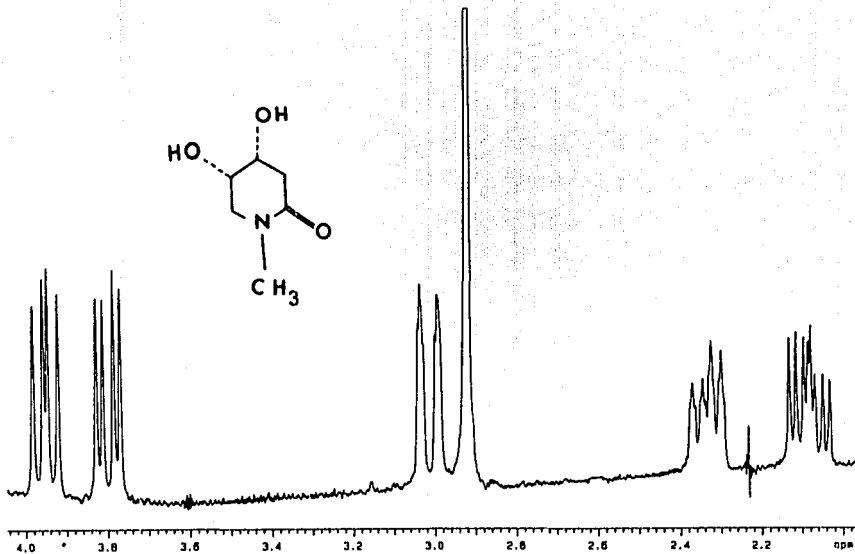
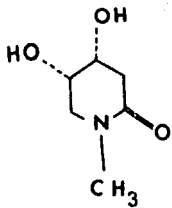


Espectro 10

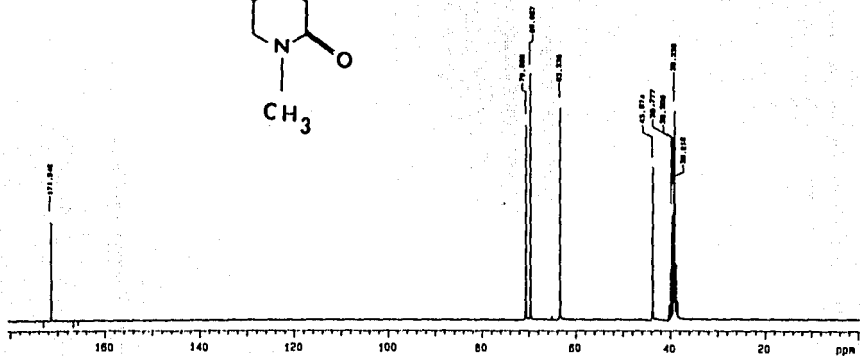
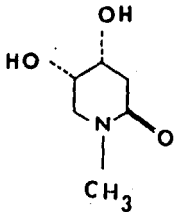
67



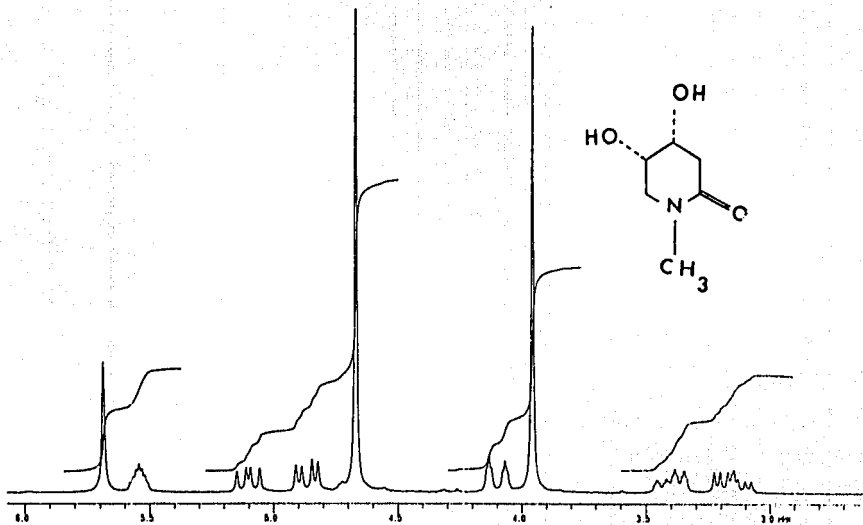
Espectro 11



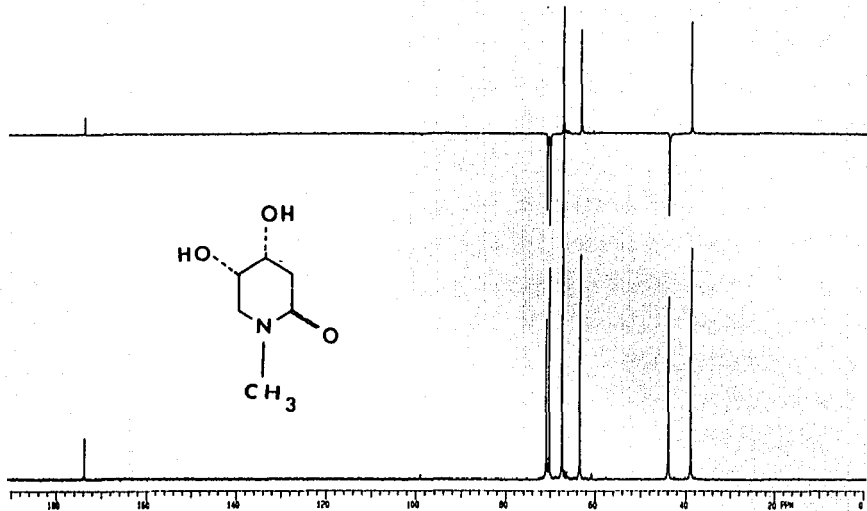
Espectro 12



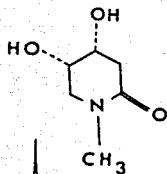
Spectro 13



Espectro 14

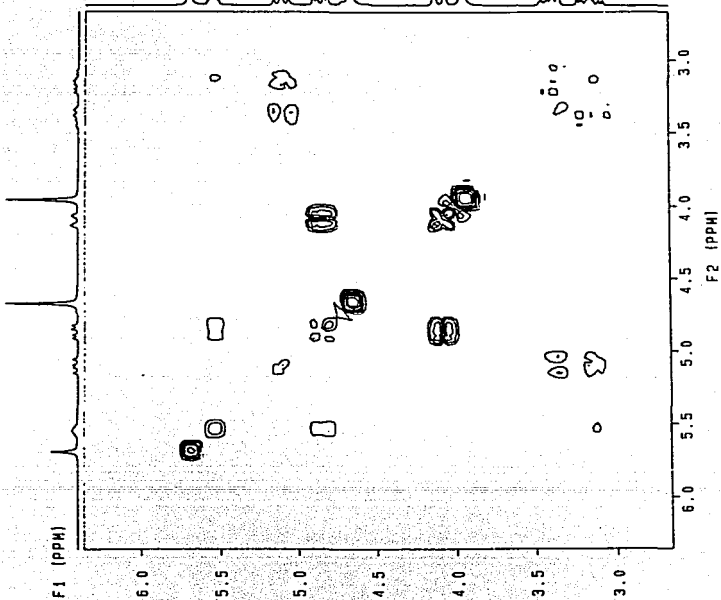


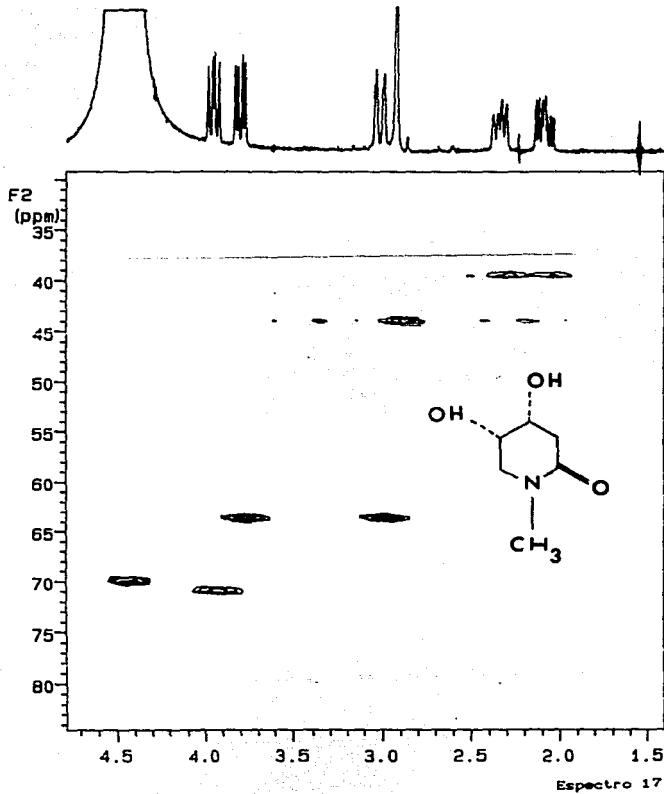
Espectro 15

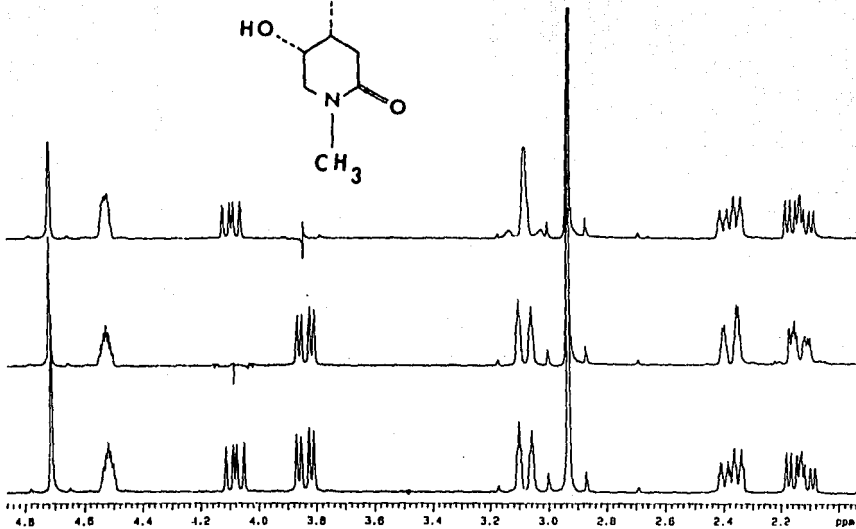
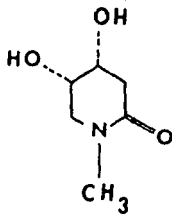


73

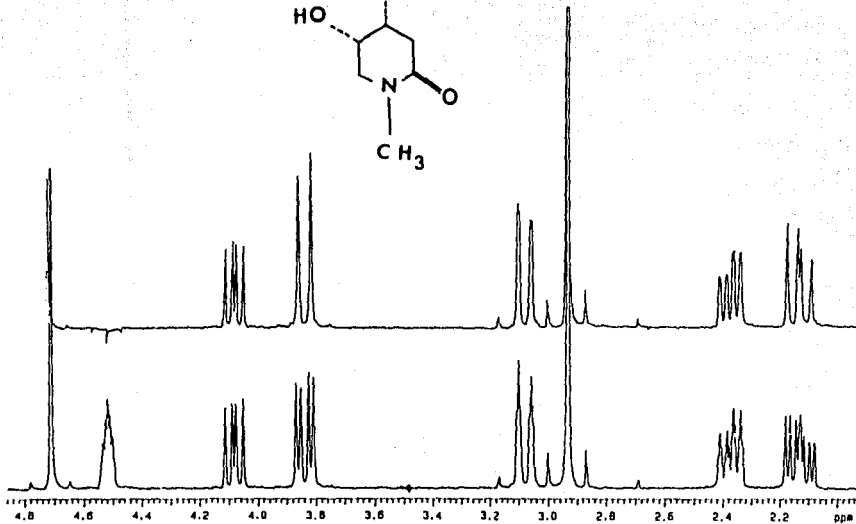
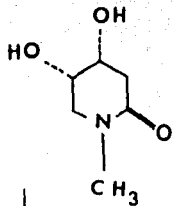
Espectro 16

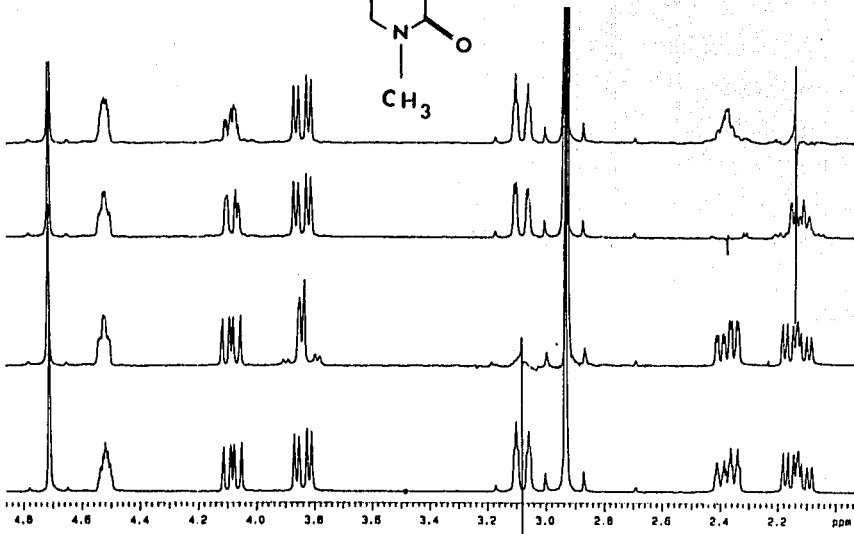
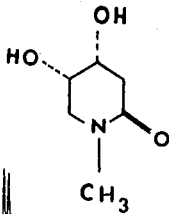


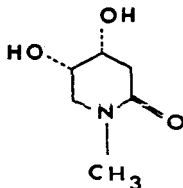
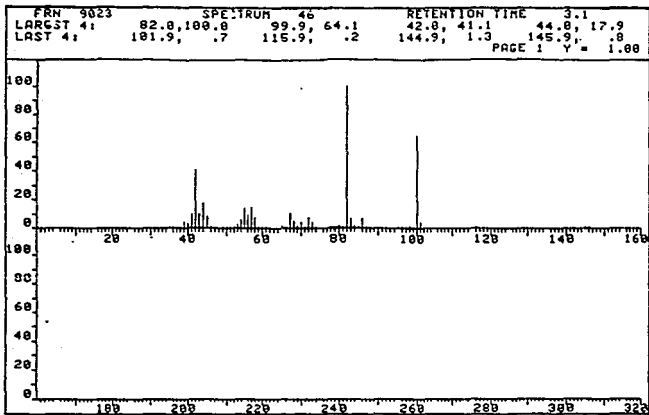


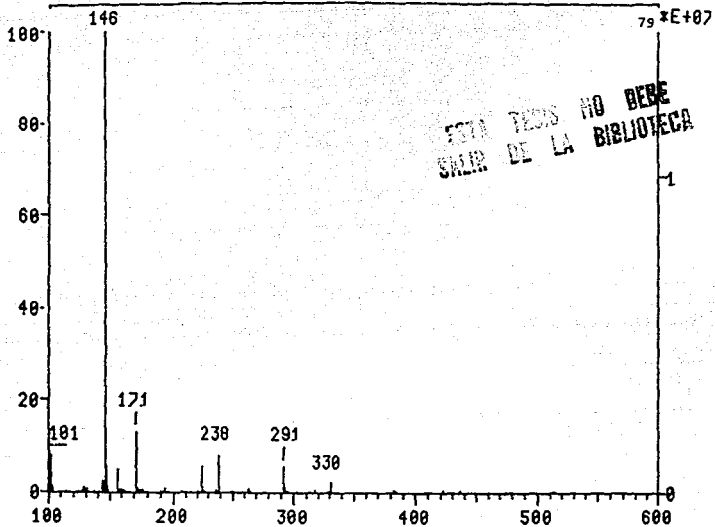


Espectro 18

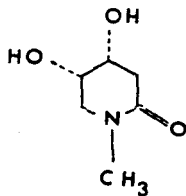


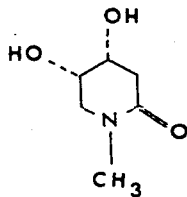
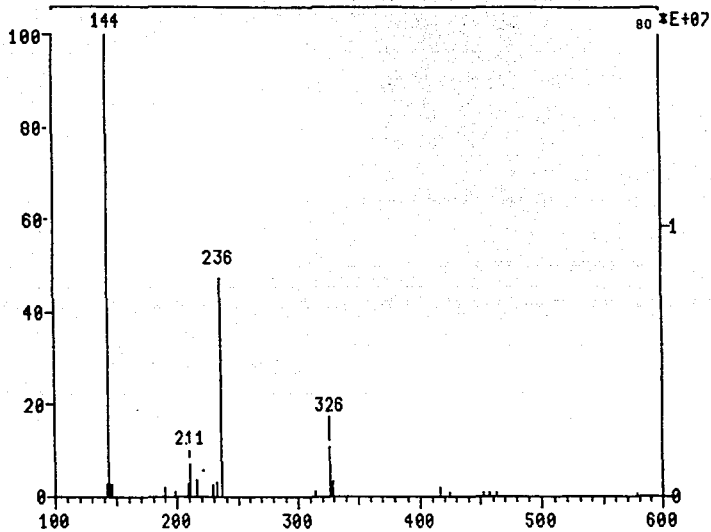






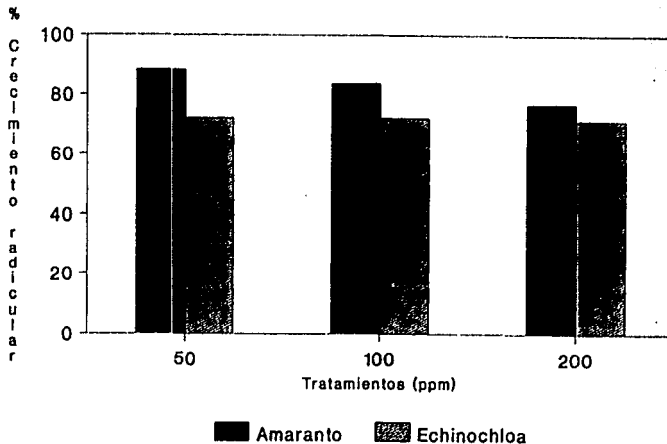
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA





Espectro 23

Extracto de corteza de *Celaenodendron* sobre Amaranto y Echinochloa

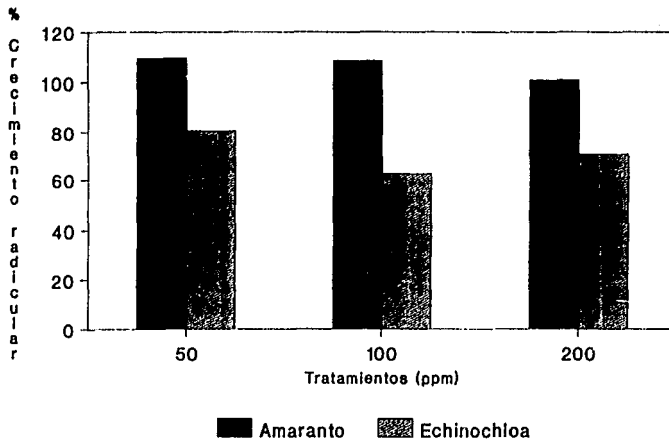


100 corresponde al testigo

Gráfica 1

81

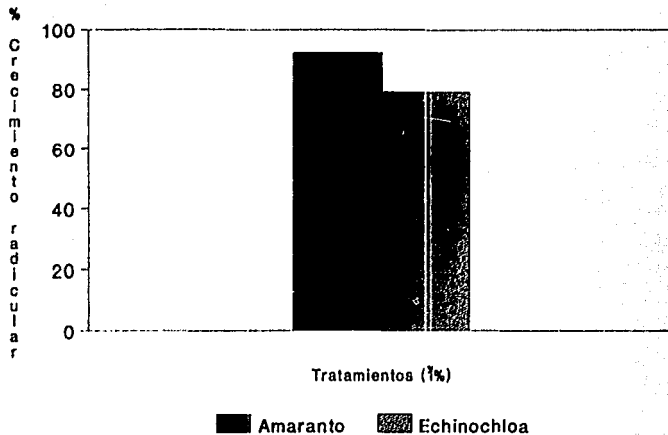
Extracto metanólico de semillas de *Celaenodendron* sobre Amaranto y Echinochloa



100 corresponde al testigo

Gráfica 2

Lixiviado acuoso de semillas de *Celaenodendron* sobre Amaranto y Echinochloa

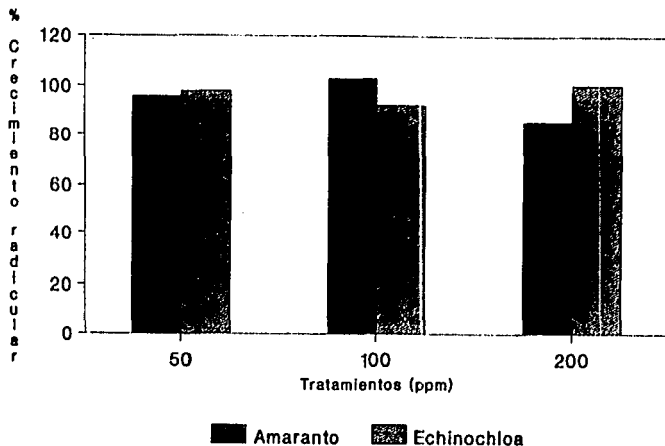


100 corresponde al testigo

Gráfica 3

83

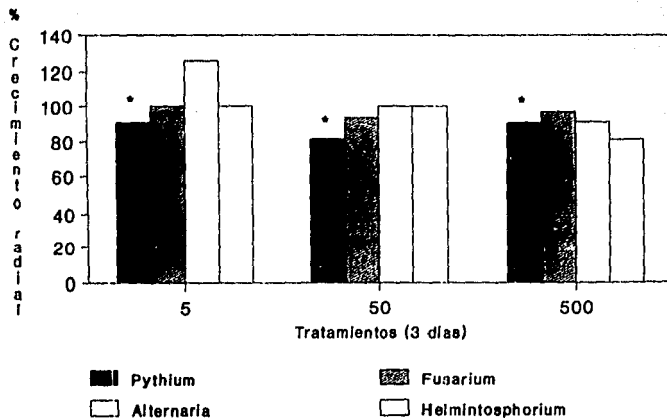
Compuesto (35) aislado
de *Celaenodendron* sobre
Amaranto y Echinochloa



100 corresponde al testigo

Gráfica 4

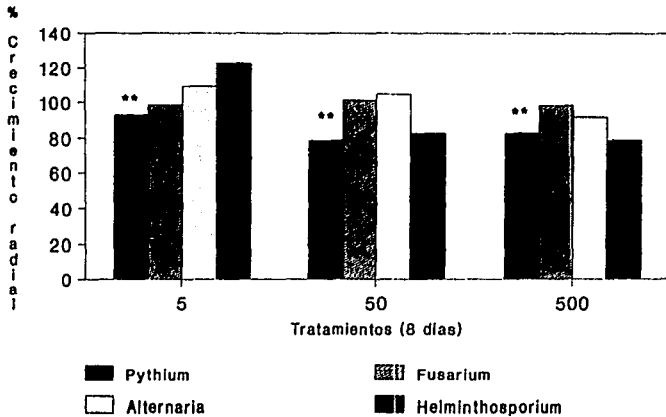
Extracto MeOH de las semillas de *Gelaenodendron* sobre hongos fitopatógenos



100 corresponde al testigo
• 1 día

Gráfica 5

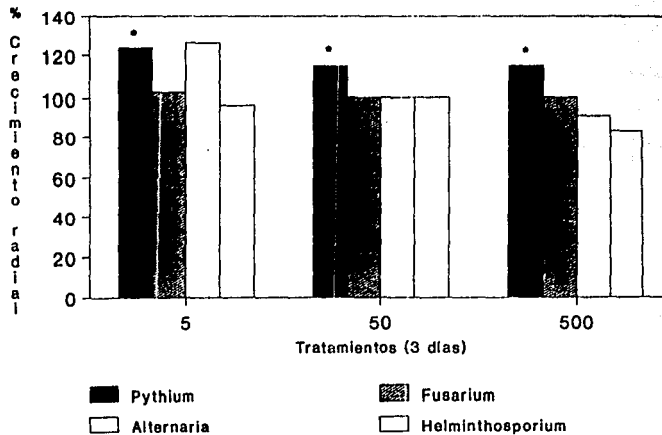
Extracto MeOH de las semillas
de *Celaenodendron* sobre
hongos fitopatógenos



100 corresponde al testigo
** 2 días

Gráfica 6

Efecto del compuesto (35) sobre hongos fitopatógenos

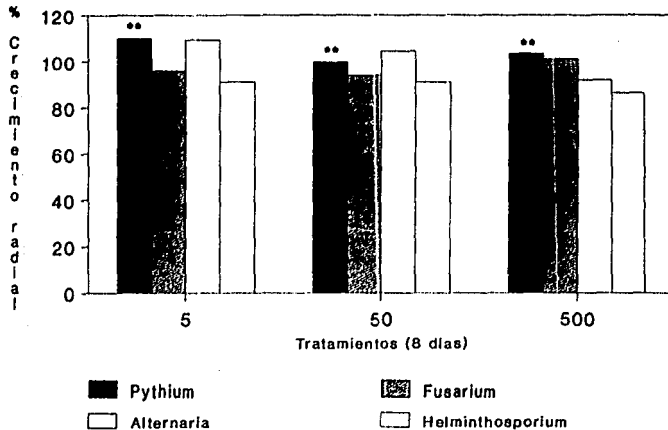


100 corresponde al testigo
• 1 día

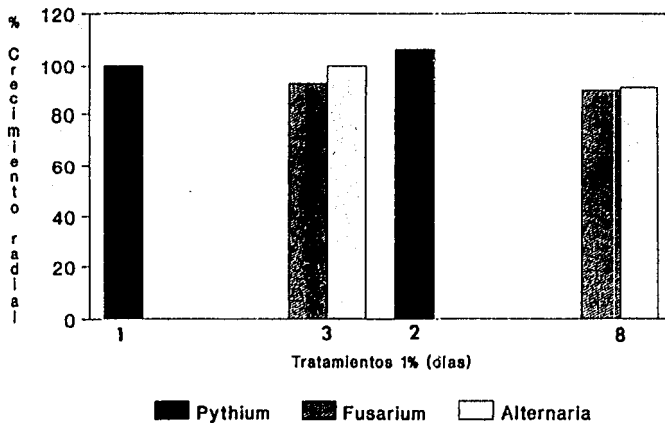
Gráfica 7

27

Efecto del compuesto (35) sobre hongos fitopatógenos



Lixiviado acuoso de semillas de *Celaenodendron* sobre hongos fitopatógenos



100 corresponde al testigo

Gráfica 9

6- RESUMEN Y CONCLUSIONES

1- El estudio fitoquímico convencional de la corteza y semillas de *C. mexicanum* Standl. condujo al aislamiento de 4 metabolitos secundarios, los cuales fueron caracterizados como: la friedelina (4), el epifriedelinol (31), el estigmasterol (34) y el 4a. 5a-dihidroxi-N-metil-2-piperidona (35) representando este último un nuevo producto natural. Este producto constituye el primer derivado de la piperidona descrito en la familia Euphorbiaceae.

2- El análisis cromatográfico comparativo de los extractos y compuestos aislados de las partes aéreas, corteza y semillas de *C. mexicanum* permitió identificar al compuesto (35) como único metabolito en común.

3- El extracto de corteza y semillas, así como el compuesto (35), fueron evaluados como posibles agentes alelopáticos y antifúngicos. El efecto alelopático se determinó sobre *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus leucocarpus*. En lo que respecta a la actividad antifúngica, los microorganismos empleados fueron *Alternaria sp.*, *Helminthosporium sp.*, *Pythium sp.*, y *Fusarium sp.* En ningún caso se obtuvo efecto significativo.

7-RECOMENDACIONES

1- Se recomienda realizar un estudio por difracción de rayos X del compuesto (35) a fin de comprobar inequívocamente la estructura propuesta.

2- Sería deseable reinvestigar fitoquímicamente la corteza de *Celaenodendron* con la finalidad de completar el perfil metabólico de esta parte de la planta. Durante el presente estudio se detectó la presencia de al menos 3 metabolitos adicionales.

3- Completar el análisis de la mezcla de ácidos grasos obtenidas durante el estudio fitoquímico de *Celaenodendron mexicanum*.

B- BIBLIOGRAFIA

Achari, B.; Chaudhuni, C.; Saha, C. R.; Dutta, P. K.; Pakrashi, S. C.; *Phytochemistry*, 29(11), (1990); *Chem. Abstr.*, 114, 98195n, (1991).

Agrawal, M.; Gupta, R.; *Curr. Sci.* 49(9) 351, (1980); *Chem. Abstr.* 93, 3950r, (1980).

Albor, C.; Estudio fitoquímico de tres Rubiáceas usadas en medicina tradicional: *Randia echinocarpa*, *Exostema mexicanum* y *Sinira mexicana*.

Alves de Lima, R.; Gottlieb, O. R.; Mesquita, A. A. L.; *An Acad. Brasil. Cienc.* 42 (Supl)133-6, (1970). *Chem. Abstr.* 75, 72475e(1971).

Anaya, A.; Calera, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; *J. Chem. Ecol.* 15(7) 2145, (1990).

Anjaneyulu, A. S. R.; Norayana, R. M.; *Phytochemistry*, 19(6) 1163-9, (1980). *Chem. Abstr.* 94, 47545n, (1981).

Anjaneyulu, A. S. R.; Row, L. R.; Subrahmanyam, C.; Murty, K. S.; *Curr. Sci.* 43(1) 10-11 (1974). *Chem. Abstr.* 80, 83304c (1974).

Anjaneyulu, V.; Rao, G. S.; *Indian J. Chem.* 23B, 663 (1984).

Anjaneyulu, V.; Row, L. R.; *Curr. Sci. India.* 34, 608 (1965). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Anjaneyulu, V.; Sambasiva, R. G.; Harischandra, P. K.; *Indian J. Pharm. Sci.* 45(2) 91-3, (1983). *Chem. Abstr.* 99, 125218t (1983).

Arthur, H. R.; Cheng, K. F.; Lau, M. P.; Lie, K. J.;

Phytochemistry, 4, 969 (1965). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Arthur, H. R.; Hui, W. H.; *J. Chem. Soc.* 551 (1961). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Arthur, H. R.; Hui, W. H.; Lam, C. N.; Szeto, S. K.; *Australian J. Chem.* 17, 697, (1964). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Arthur, H. R.; Ko, P. D. S.; Cheung, H. T.; *Phytochemistry*, 13(11) 2551-7, (1974). *Chem. Abstr.* 82, 54215k, (1975).

Auf dem Keller, S.; Von Kuerten, S.; Pachaly, P.; Zymalkowski, F.; *Pharmazie*, 25(10) 521-5 (1970). *Chem. Abstr.* 74, 39178s, (1971).

Bahuguna, R. P.; Jangwan, J. S.; *J. Nat. Prod.* 50(2) 309 (1987). *Chem. Abstr.* 107, 172428q (1987).

Barva, A. K.; Ghosh, B. B.; Ray, S.; Patra, A.; *Phytochemistry*, 29(9) 3045-7, (1990).

Barva, A. K.; Marti, P. C.; *Sci. Cult.* 23, 155 (1957); Chakravarti, D.; Momen, S. A.; *Sci. Cult.* 15, 329 (1950). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Beri, R. M. *Indian J. Chem.* 8(1), 137-8 (1970). *Chem. Abstr.* 73, 83170t, (1970).

Betancor, R. C.; Freire, R.; Gonzalez, A. G.; Salazar, J. A.; Pascard, C.; Prange, T.; *Phytochemistry* (19) 1989-1993, (1980).

Bhargava, K. K.; Dayal, R.; Seshadri, T. R.; *Curr. Sci.* 43(20)

645-6 (1974). *Chem. Abstr.* 83 28524r (1975).

Blessels H. V. A.; Van der Kerk-Van Hoof, A. C.; Kettenes-Van den Bosch, J. J.; Salemink, C. A.; *Phytochemistry* 13(1) 203-7, 1974; *Chem. Abstr.* 80, 105880z (1974).

Bingel, A. S.; *New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Springer Verlag, N. Y. (1977).

Borges del C. J.; Zertoon, B. A.; Arriaga, G. F. J.; Vazquez, B. P.; Gupta, M. P.; *Rev. Latinoam. Quim.* 17(1-2) 34-5 (1985).

Briggs, L. H.; Cambie, R. C.; Couch, R. A. F.; *New Zealand J. Sci.* 10, 1076 (1967). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Brüning, R.; Wagner, H.; *Phytochemistry* 17, 1821 (1978).

Calzada, F.; Mata, R.; López, R.; Linares, E.; Bye, R.; Barreto, V. M.; F. del Río; *Planta Med.* 57, 104-5 (1991).

Camacho, C.; Nuevos metabolitos secundarios de la *Hintonia latiflora* Bullock y aislamiento de compuestos bioactivos de *Teloxys graveolens* Willd. Tesis UNAM (1989).

Castañeda, P.; Constituyentes de la *Cigarrilla mexicana* Parte II. Tesis UNAM, (1986).

Castañeda, P.; Aislamiento e identificación de un nuevo Ent-labdano de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq (Sapindaceae). Estudio químico y biológico de *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae). Tesis UNAM, (1991).

Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Torres, B. A.;

Anaya, A. L.; Mata, R.; *J. of Chemical Ecology* 18(7) 1025-37 (1992).

Chakravarti, D.; Chakravarti, N. N.; Chakravarti, A.; *J. Ind. Chem. Soc.* 42,573 (1965). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Chatterjee, D.; Chakraborty, D. P.; *J. Ind. Chem. Soc.* 45, 285 (1968). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Corbett, R. E.; Young, H.; Wilson, R. S.; *Australian J. Chem.* 17, 712 (1964). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Dahanayake, M.; Kitagawa, I.; Somanathan, R.; Sultanbawa, M. U. S.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 22, 2510-14 (1974). *Chem. Abstr.* 83, 183933j (1975).

De Sousa, E.; Mara, J. G. S.; *Phytochemistry* 25(7), 1776-8 (1988); *Chem. Abstr.* 105, 112019f (1988).

De Sousa, J. R.; Demuner, A. J.; Pinheiro, J. A.; Breitmaier, E.; Cassels, B. K.; *Phytochemistry* 29(11) 3853-55 (1990).

De Sousa, J. R.; Silva, G. D. F.; Pedersoli, J. L.; Alves, R. J.; *Phytochemistry* 29(10), 3259-61 (1990).

Dhasmana, H.; Garg, H. S.; *Fitoterapia* 51(4), 379-80 (1990); *Chem. Abstr.* 114, 139817n (1991).

Dominguez, X. A.; Rojas, P.; Duenas, W.; Escarria, S.; *Phytochemistry* 12(1), 224 (1973); *Chem. Abstr.* 78, 108255m (1973).

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

Farkas, L.; *Journal of Ethnopharmacology* 2, 145 (1988).

Farnsworth, N.; *Journal of Ethnopharmacology* 2, 173 (1980).

Farnsworth, N.; Bingel, S.; *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, Springer Verlag, N. Y., Berlin (1977).

Flor, S. C.; Coorenbos, N. J.; Suoboda, G. H.; Knapp, J. E.; Schiff, P. L. Jr.; *J. Pharm. Sci.* 63(4), 818-19 (1974). *Chem. Abstr.* 81, 117058p (1974).

Fokina, G. A.; *Khm. Prir. Soedin* 8(1), 137-8 (1970); *Chem. Abstr.* 73, 73829v (1970).

Fokina, G. A.; Belova, N. V.; *Kim. Prir. Soedin* 7(1), 30-3 (1971). *Chem. Abstr.* 74, 11252t (1971).

Fokina, G. A.; Belova, N. V.; Gorovoi, P. G.; *Kim. Prir. Soedin* 7(3), 377 (1971). *Chem. Abstr.* 75, 115849z (1971).

García, M.; 4-aril coumarinas de la *Exotema caribaeum* Jacq; Tesis UNAM (1987).

Ghosar, S.; Jaiswal, D. K.; Biswas, K.; *Phytochemistry* 17(12) (1978). *Chem. Abstr.* 81, 57394q (1978).

Ghosal, S.; Chaudhuri, R. K.; Nath, A.; *Phytochemistry* 12(7), 1763-6 (1973). *Chem. Abstr.* 79, 89500q (1973).

González, G. A.; Amaro, L. J. A.; Gutiérrez, L. J.; *Rev. Latinoam. Quím.* 17(1-2), 56-8. *Chem. Abstr.* 105, 112019f (1985).

González, G. A.; Díaz, J. G.; Domínguez, B.; Bermejo, B. J.; *Rev.*

Latinoam. Quim. 18(1), 51-2 (1987).

González, A.; Fraga, B.; González, P.; González, C. M.; Ravelo, A.; Domínguez, X. A.; Martínez, M.; Perales, A.; *J. Org. Chem.* 48(21), 3759-81 (1983). *Chem. Abstr.* 99, 155179h (1973).

González, G. A.; García, F. C.; Freire, B. R.; Hernández, R.; Salazar, R. J. A.; Suárez, L. E.; *Phytochemistry* 14(4) 1067-70, (1975). *Chem. Abstr.* 83, 55702z (1975).

González, G. J.; Cuellar, V.; Betancourt, A.; Pinzón, N. I.; *Phytochemistry* 22(9) 2088-90 (1983). *Chem. Abstr.* 100, 64952c (1984).

Goren, N.; Jakupovic, J.; *Phytochemistry* 29(9) 3031-2 (1990).

Graleffi, C.; *Journal of Ethnopharmacology* 2, 129 (1980).

Gunaherath, G. M. K. B.; Gunatilaka, A. A. L.; Sultanbawa, M. U. S.; Wazeer, M. I. M.; *Tetrahedron Letters* 21, 4749 (1980).

Gunasekera, S. P.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R.; *J. Nat. Prod.* 46(1), 118-22 (1983). *Chem. Abstr.* 98, 176185b (1983).

Gunasekera, S. P.; Sotheeswaras, S.; Sultanbawa, M. U. S.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (7), 1831-5 (1981). *Chem. Abstr.* 95, 111696n (1981).

Gunasekera, S. P.; Sultanbawa, M. U. S.; *Chem. and Ind.* 19 Agosto, 790-791 (1973). Pant, P.; Rastogi, R. P.; *Phytochemistry* 18, 1095-1108 (1979).

Gunasekera, S. P.; Sultanbawa, M. U. S.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (22) 2215-20 (1975). *Chem. Abstr.* 84, 90030w (1975).

Gunasekera, S. P.; Sultanbawa, M. U. S.; *Tetrahedron letters* 2837 (1973).

Gunatilaka, A. A. L.; Jasmin de Silva, A. M. Y.; Sotheswarah, S.; Balasubramaniam, S.; Wazeer, M. I. M.; *Phytochemistry* 23(2) 323-8 (1984). *Chem. Abstr.* 101, 35865s (1984).

Gunatilaka, A. A. L.; Nanayakkara, N. P. D.; Sultanbawa, M. U. S.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 434-5 (1979).

Gunatilaka, A. A. L.; Nanayakkara, N. P. D.; Sultanbawa, M. U. S.; *Phytochemistry* 21(8), 2061-3 (1982). *Chem. Abstr.* 98, 104253c (1983).

Gunatilaka, A. A. L.; Nanayakkara, N. P. D.; Sultanbawa, M. U. S.; *Tetrahedron letters* (19), 1727-30 (1979). Das, M. C.; Mahato, S. B.; *Phytochemistry* 22(5) 1071-95 (1983).

Gunatilaka, A. A. L.; Nanayakkara, N. P. D.; Wazeer, M. I. M.; *Phytochemistry* 22(4) 991-2 (1983).

Gunatilaka, A. A. L.; Sultanbawa, M. U. S.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* (11), 1157-7 (1973). *Chem. Abstr.* 79, 18884g (1973).

Gupta, M. M.; Verma, R. K.; *Phytochemistry* 30(3), 975-8 (1991).

Han, G. Q.; Che, C. T.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; *Fitoterapia* 59(3) 242-4 (1988). *Chem. Abstr.* 110, 33439s (1989).

Hirota, H.; Moriyama, Y.; Tsuyuki, T.; Tanahashi, Y.; Takahashi, T.; Katon, Y.; Satoh, H.; *Bull. of Chem. Soc. Japan* 48(8) 1884-8 (1975).

Hui, W. H.; Ho, C. T.; *Australian J. Chem.* 21, 1675 (1968).

- Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Hui, W. H.; Lam, W. K.; Tye, S. M.; *Phytochemistry* 10(4), 903-4 (1971). *Chem. Abstr.* 75, 18100s (1971).
- Hui, W. H.; Li, M. M.; Lee, Y. C.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*(7), 817-19 (1975). *Chem. Abstr.* 83, 10489u (1975).
- Hui, W. H.; Li, M. M.; Na, K. K.; *Phytochemistry* 14(3), 816-17 (1975). *Chem. Abstr.* 83, 93848j (1975).
- Hui, W. H.; Sung, M. L.; *Australian J. Chem.* 21, 2137 (1968).
Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Hui, W. H.; Szeto, S. K.; *Phytochemistry* 6, 443 (1967). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Jain, M. P.; Singh, J.; *Indian Drugs* 24(5), 273 (1987). *Chem. Abstr.* 107, 172428q (1987).
- Jefferies, P. R.; *J. Chem. Soc.* 473 (1954). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Joshi, B. S.; Kamat, V. N.; Vishwanathan, N.; *Tetrahedron* 29, 1365 (1973).
- Joshi, K. C.; Bansal, R. K.; Patni, R.; *Planta Med.* 34(2) 211-14 (1978). *Chem. Abstr.* 90, 19048b (1979).
- Joshi, K. C.; Singh, P.; Singh, R. K.; *J. Indian Chem. Soc.* 62(5) 409-10 (1985). *Chem. Abstr.* 101, 17899v (1986).
- Jury, S. L.; *The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomy and Economic* 63 (1987).

- Jyoti, M.; Rastogi, R. P.; *Indian J. Pharm.* 32(6) 167-8 (1970). *Chem. Abstr.* 75, 1225h (1971).
- Kamal, G. M.; Gunaherath, B.; Gunatilaka, A. A. L.; *Tetrahedron Letters* 24(19) 2025-8 (1983). *Chem. Abstr.* 99, 122802s (1983).
- Kamaya, R.; Tanaka, Y.; Hiroshima, R.; Ageta, H.; *Chem. Pharm. Bull.* 38(8) 2130-2 (1990).
- Kikuchi, T.; Niwa, M.; *Yakugaku Zasshi* 93, 1378 (1973). *Chem. Abstr.* 80, 2740z (1974).
- Kikuchi, T.; Shingu, T.; Niwa, M.; Yokoi, T.; *Chem. Pharm. Bull.* 21(6) 1396-7 (1973).
- Kikuchi, T.; Takayama, M.; Toyoda, T.; Arimoto, M.; Niwa, M.; *Chem. Pharm. Bull.* 21(10) 2243-51 (1973). *Chem. Abstr.* 80, 35079m (1974).
- Kikuchi, T.; Toyoda, T.; *Tetrahedron Letters* 3181 (1967). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Kikuchi, T.; Yokoi, T.; Shingu, T.; Niwa, M.; *Chem. Pharm. Bull.* 29(9) 2531-9 (1981).
- Kimura, K.; Hashimoto, I.; Agata, I.; *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 8, 1145 (1960). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).
- Knudsen, F. S.; Villegas, W.; Oliveira, F.; Roque, N. F.; *Phytochemistry* 25(5), 1240-2 (1986). *Chem. Abstr.* 105, 57912q (1986).
- Koyama, S.; Kumazawa, Z.; Mie, D.; Nogakubu, G.; *Hokoku* 47- 325-34 (1974). *Chem. Abstr.* 81, 101857n (1974).

Kulshreshtha, D. K.; Rastugi, R. P.; *Phytochemistry* 10(11) 2831-2 (1971). *Chem. Abstr.* 76, 1797w (1972).

Kumar, N. S.; Muthukuda, P. M.; Balasubramaniam, S.; *Phytochemistry* 24(10) 2454-5 (1985).

Le Quesne, P. W.; Lavery, S. B.; Menachery, M. D.; Brennan, T. F.; Raffauf, R. F.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*(12) 1572-80 (1978). *Chem. Abstr.* 90, 152398g (1979).

López, R.; Estudio fitoquímico preliminar de la *Hippocratea excelsa*. Tesis UNAM, (1989).

Martijena, N.; Comunicación personal, 1990.

Martin, J. D.; *Tetrahedron* 29(17) 2553-9 (1973). *Chem. Abstr.* 80, 3856f (1974).

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

Mathur, S. B.; *Phytochemistry* 11(4) 1513-4 (1972). *Chem. Abstr.* 77, 18592v (1972).

Mazaki, T.; Aritomi, M.; Yakugoku, Z.; 79, 980 (1959). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Mc Laughlin, J. L.; *Planta Medica* 45, 31 (1982).

Murao, T.; Namikawa, M.; Hosokawa, K.; Miyazaki, H.; Ishibashi, M.; Tsuki, T.; *Tennenyuki kagobutsu toronkai koen yoshishu* 21, 560 (1978). Das, M. C.; Mahato, S. B.; *Phytochemistry* 22(5) 1071-95 (1983).

- Muthukuda, P. M.; *Chem. Sri Lanka* 2(2) 13-5 (1985). *Chem. Abstr.* 106, 118493z (1987).
- Nagem, T. J.; Faria, T. de J.; *Phytochemistry* 29(10), 3362-4 (1990).
- Nees, H.; Pachaly, P.; Zymalkowski, F.; *Planta Med.* 24(4) 320-8 (1973). *Chem. Abstr.* 80, 68383j (1974).
- Nonomura, S.; *J. Pharm. Soc. Japan* 75, 80 (1955).
- Nozaki, H.; Suzuki, H.; Hiroyama, T.; Kasai, R.; Wu, R. Y.; Hsiung, K.; *Phytochemistry* 25(2) 479-85 (1986).
- Nozaki, H.; Suzuki, H.; Lee, K. H.; Mc Phail, A. T.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 18, 1048-51 (1982). *Chem. Abstr.* 98, 86212d (1983).
- Pagani, F.; *Boll. Chim. Farm.* 114(8) 450-5 (1976). *Chem. Abstr.* 84, 56478p (1978).
- Pasich, B.; Bishay, D. W.; Kowalewski, Z.; Rompel, H.; *Herba Pol.* 26(2) 91-4 (1980). *Chem. Abstr.* 94, 153499k (1981).
- Pasich, B.; Bishay, D. W.; Kowalewski, Z.; Rompel, H.; *Planta Med.* 39(4) 391 (1980). *Chem. Abstr.* 93, 148389a (1980).
- Patra, A.; Chaudhuri, S.; *Magn. Resonance in Chem.* 25, 95-100 (1987).
- Patra, A.; Mukhopadhyay, A. K.; Mitra, A. K.; *J. Indian Chem. Soc.* 58(11) 1124-5 (1981). *Chem. Abstr.* 96, 48991h (1982).
- Pegel, K. H.; Rogers, C. B.; *Phytochemistry* 7, 655 (1968).
Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Rangaswami, S.; Sambamurthy, K.; *Proc. Ind. Acad. Sci. (sect. A)* 53, 98 (1961). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Rangaswami, S.; Tewari, N. C.; *Curr. Sci.* 40(2) 36 (1971). *Chem. Abstr.* 75, 1271z (1971).

Rao, R. B.; Sukumar, E. K. A. B.; Patra, A.; *Phytochemistry* 29(6) 2027-9 (1990). *Chem. Abstr.* 113, 129362q (1990).

Riabnin, A. A.; Lopovnova, V. F. *Zh. Obshch. Khim.* 31, 3478 (1961). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Ribo, J. M.; Raventus, J.; *Phytochemistry* 11(10), 3089 (1972). *Chem. Abstr.* 77, 149703d (1972).

Rizvi, S. H.; Shoeb, A.; Kapil, R. S.; Popli, S. P.; *Experientia* 36(2) 146-7 (1980). *Chem. Abstr.* 92, 143276e (1980).

Rogers, D.; Phillips, F. L.; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1048-50 (1980).

Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; *Journal of Ethnopharmacology* 35, 275-83 (1992).

Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970).

Sakakibara, J.; Kaiya, T.; Yasue, M.; *Yakugaku Zasshi* 93(2) 164-70 (1973). *Chem. Abstr.* 78, 145234z (1973).

Salama, A. M.; *Rev. Latinoam. Química* 16(4) 117-18 (1985). *Chem. Abstr.* 105, 15790p (1987).

Salemink, C. A.; *J. of Ethnopharmacology* 2, 135 (1980).

Sambamurthy, K.; Babu, M. R.; *Curr. Sci.* 39(5), 110-11 (1970).
Chem. Abstr. 73, 22115a (1970).

Sengupta, P.; Chakraborty, A. K.; *Tetrahedron* 24, 1205-13 (1968).

Sengupta, P.; Das, P. B.; *J. Ind. Chem. Soc.* 42, 255 (1965).
Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970).

Sengupta, P.; Dey, A. K.; *J. Indian. Chem. Soc.* 47(7), 713-14
(1970). *Chem. Abstr.* 73, 713-14 (1970). *Chem. Abstr.* 73, 117185f
(1970).

Sengupta, P.; Mukherjee, J.; *Tetrahedron* 24, 6259 (1968).
Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970).

Shannon, J. S.; Mac Donald, C. G.; *Tetrahedron Letters* 173 (1963).
Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970).

Shoppee, C. W.; Howden, M. E. H.; Johnston, G. A. R.; *J. Chem.
Soc.* 498 (1952). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-15 (1970).

Silbernagel, E.; Spreitzer, H.; Buchover, G.; *Monatsh. Chem.*
121(5) 433-6 (1990). *Chem. Abstr.* 113, 112515e (1990).

Sorm, F.; Bazant, V.; *Collection Czech. Chem. Commun.* 15, 73
(1950). Droke, N. L.; Jacobsen, R. P.; *J. Am. Chem. Soc.* 57, 1570
(1935). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Sthal, E.; *Thin Layer Chromatography*, Academic Press Inc.; New York
487 (1969).

Suga, T.; Kondo S.; *Phytochemistry* 13(2) 522-3 (1974). *Chem.
Abstr.* 80, 105850s (1974).

Sukumar, E.; Rao, R. B.; Kundu, A. B.; *Phytochemistry* 29(9) 3044-6 (1990). *Chem. Abstr.* 113, 3459q (1990).

Tada, H.; Takahashi, T.; Koyama, H.; *Phytochemistry* 13(3) 670-1. *Chem. Abstr.* 81, 1311m (1974).

Takahashi, M.; Kamisako, W.; Ishimasay, S.; Miyamura, K.; Yakugoku, Z.; 79, 1281 (1959). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Takahashi, K.; Tanabe, Y.; Hosoda, N.; *Yakugaku Zasshi*; 85, 854 (1965). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Takemoto, T.; Yahagi, N.; *Yakugaku Zasshi* 78, 304 (1958). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Talapatra, B.; Chaudhuri, P. K.; Mallik, A. K.; Talapatra, S. K.; *Phytochemistry* 22(11) 2559-62 (1983). *Chem. Abstr.* 100, 171519p (1984).

Talapatra, S. K.; Chakravarti, R.; Talapatra, B.; *Indian J. Chem. Sect. B* 17B (3) 298-9 (1979). *Chem. Abstr.* 92, 37782g (1980).

Talapatra, S. K.; Karmacharya, B.; De Sambhu, C.; Talapatra, B.; *Indian J. Chem. Sect. B* 28B (4) 356-7 (1990). *Chem. Abstr.* 111, 4295h (1990).

Tewari, N. C.; Ayengar, K. N. N.; Rangaswami, S.; *Indian J. Chem.* 11, 1334 (1973).

Tewari, N. C.; Ayengar, K. N. N.; Rangaswami, S.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, (1) 145-52 (1974). *Chem. Abstr.* 80, 133647q (1974).

Torsell, K. B. G.; *Natural Product Chemistry. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism.*

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

Weeratunga, G.; Kumar, V.; Sultanbawa, U. M.; *Tetrahedron letters* 23(19) 2031-2 (1982).

Wijeratne, D. B. T.; Kumar, V.; Sultanbawa, M. U. S.; Balasubramaniam, S.; *Phytochemistry* 21(9) 2422-3 (1982). *Chem. Abstr.* 98, 140522v (1983).

Wrzeczono, U.; *Roczniki Chem.* 36, 1063 (1962); 3 (1963); 37, 1457 (1963). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).

Yasue, M.; Itaya, M.; Oshima, H.; Funahashi, S.; *Yakugku Zasshi* 85, 553 (1965). Sainsbury, M.; *Phytochemistry* 9, 2209-11 (1970).