

50  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA  
DIHIDROISOHYENANCHINA DE CELAENODENDRON  
MEXICANUM STANDL (EUPHORBIACEAE) Y ESTUDIO  
FITOQUIMICO PRELIMINAR DE ANNONA GLABRA L.  
(ANNONACEAE)"



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
ERIC GARCIA GOMEZ



MEXICO, D. F.  
TESIS CON  
FALLA DE COPIA

1993



## **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	III

## CAPITULO 1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA DIHIDROISOHYENANCHINA DE *CELAENODENDRON MEXICANUM*.

1	INTRODUCCION	1
1.1	Generalidades y antecedentes sobre <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl	1
1.2.1	Características estructurales y distribución	8
1.2.2	Biosíntesis	9
1.2.3	Propiedades físicas	13
1.2.4	Determinación estructural	13
1.2.5	Actividad Biológica	15
2	HIPOTESIS	16
3	OBJETIVOS	16
4	PARTE EXPERIMENTAL	17
4.1	Estudio fitoquímico y biológico de la corteza	17
4.1.1	Materiales y métodos	17
4.1.1.1	Material vegetal	17
4.1.1.2	Análisis cromatográficos	17
4.1.1.3	Métodos de extracción y fraccionamiento	17
4.1.1.4	Estudio de las fracciones eluidas con $\text{CHCl}_3$ -MeOH 95:5 del cuadro 1.1	19

4.1.1.4.1	Aislamiento de la dihidroisohyenchina (21) y del producto (A).	19
4.1.2	Caracterización de las sustancias aisladas	20
4.1.2.1	Determinación de constantes físicas y espectroscópicas	20
4.1.2.2	Obtención de los derivados acetilados del compuesto (21) y del producto (A)	20
4.1.2.3	Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach	21
4.1.2.4	Ensayos biológicos	21
5	Resultados y discusión	22
6	Conclusiones	31

**CAPITULO 2 ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR DE *ANNONA GLABRA* L. (ANNONACEAE)**

1	INTRODUCCION	40
1.1	Antecedentes sobre <i>Annona glabra</i> L.	40
2	JUSTIFICACION	41
3	HIPOTESIS	43
4	OBJETIVOS	43
5	PARTE EXPERIMENTAL	45
5.1	Material vegetal	45
5.2	Análisis cromatográficos	45
5.3	Métodos de extracción y fraccionamiento	45
5.4.1	Aislamiento de fanostenina (48)	47
5.4.2	Aislamiento del $\beta$ -D-glucositolsterol	47
6	RESULTADOS Y DISCUSION	50
7	CONCLUSIONES	56
	BIBLIOGRAFIA	66

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto clorofórmico de <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl	6
Cuadro 1.2	Fuentes naturales de algunos picrotoxanos	12
Cuadro 1.3	Propiedades físicas de los picrotoxanos	14
Cuadro 1.4	Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos	18
Cuadro 1.5	Constantes físicas y espectroscópicas de <u>21</u>	23
Cuadro 1.6	Constantes físicas y espectroscópicas de <u>21a</u>	29
Cuadro 2.1	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto alcaloideo de <i>Annona glabra</i> L.	48
Cuadro 2.2	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto III del esquema 2.1	49
Cuadro 2.3	Constantes físicas y espectroscópicas de <u>4a</u>	

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro de IR de la dihidroisohyenanquina ( <b>21</b> )	32
Espectro 2	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (piridina-d <sub>5</sub> ) de <b>21</b>	33
Espectro 3	Espectro de RMN <sup>13</sup> C APT (piridina-d <sub>5</sub> ) de <b>21</b>	34
Espectro 4	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (piridina-d <sub>5</sub> ) de <b>21</b>	35
Espectro 5	Espectro de RMN <sup>13</sup> C HETCOR de <b>21</b>	36
Espectro 6	Espectro de masas de <b>21</b>	37
Espectro 7	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>21a</b>	38
Espectro 8	Espectro de RMN <sup>1</sup> H COSY de <b>21a</b>	39
Espectro 9	Espectro de IR de la fanostenina ( <b>48</b> )	59
Espectro 10	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (piridina-d <sub>5</sub> ) de <b>48</b>	61
Espectro 11	Espectro de RMN <sup>1</sup> H COSY de <b>48</b>	62
Espectro 12	Espectro de RMN <sup>13</sup> C (piridina-d <sub>5</sub> ) de <b>48</b>	63
Espectro 13	Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT de <b>48</b>	64
Espectro 14	Espectro de masas de <b>48</b>	65

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1	Preparación del extracto clorofórmico de la corteza de <i>C. mexicanum</i>	5
Esquema 2.1	Preparación y fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de <i>Annona glabra</i> L.	46

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Metabolitos aislados de las diversas partes vegetales de <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl.	3
Figura 1.2	Estructura base de los picrotoxanos	8
Figura 1.3	Ejemplos de picrotoxanos naturales	10
Figura 1.4	Origen biogenético del núcleo picrotoxano	13
Figura 1.5	Espectro COSY (piridina- $d_5$ ) del compuesto <u>48</u>	27
Figura 1.6	Estructuras parciales del compuesto <u>21</u> derivadas del análisis del espectro COSY.	26
Figura 1.7	Estructura probable del compuesto <u>21</u>	28
Figura 2.1	Metabolitos secundarios aislados de <i>Annona glabra</i> L.	42
Figura 2.2	Estructura base de los alcaloides aporfínicos	53
Figura 2.3	Patrón de fragmentación del compuesto <u>48</u>	

## CAPITULO I

### AISLAMIENTO DE LA DIHIDROISOHYENANCHINA DE CELAENODENDRON MEXICANUM STANDL (EUPHORBIACEAE).

#### I. INTRODUCCION

##### 1.1 Generalidades y antecedentes sobre *Celaenodendron mexicanum* Standl.

*Celaenodendron mexicanum* Standl es una planta endémica de México perteneciente a la familia Euphorbiaceae [subfamilia Oldfieldioideae, tribu Hyaenancheae, subtribu Pairvaeusinae] (Webster, 1975). 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.

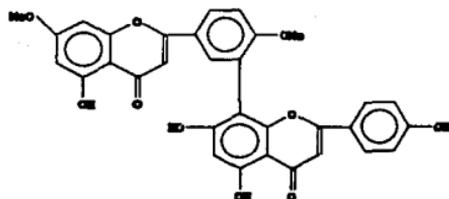
*C. mexicanum* Standl es empleada en la medicina popular como un agente antiséptico, su corteza se utiliza principalmente para la construcción de casas ya que es altamente resistente al ataque de insectos y de microorganismos; además tiene la característica de crecer en selvas caducifolias formando bosques, 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, semillas y algunas de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico de la corteza de la planta han sido recientemente objeto de estudio (Castañeda et al, 1992; Bahena, 1992), constituyendo estos los únicos trabajos que se

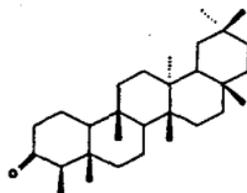
han descrito sobre la especie. Estas investigaciones permitieron el aislamiento y caracterización de varios metabolitos secundarios, mismos que se resumen en la Figura 1.1. Es importante destacar que el único metabolito común encontrado hasta el momento de las diferentes partes vegetales analizadas, es la sustancia nitrogenada (Z). Para el estudio fitoquímico preliminar de la corteza, el material vegetal molido y desecado procedente del municipio la Huerta, Jalisco, se extrajo de acuerdo al procedimiento resumido en el Esquema 1.1. El extracto resultante (59.3 g) se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía preparativa en columna abierta, utilizando como adsorbente gel de sílice; el proceso de elución se efectuó con hexano-cloroformo en diferentes proporciones, cloroformo, cloroformo con cantidades crecientes de metanol y metanol, obteniéndose un total de 369 fracciones de 150 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 1.1 se resume, los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada una de ellos, las fracciones combinadas y los compuestos aislados. (Bahena, 1992). Las fracciones combinadas I-X y XXII-XXIV (Cuadro 1.1) fueron investigadas desde el punto de vista fitoquímico por Bahena (1992), restando por analizar las fracciones XII-XXI (Cuadro 1.1) .

Adicionalmente, se evaluó el efecto del extracto total de las partes aéreas, corteza y semillas sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* y *Amaranthus leucocarpus*, y sobre hongos fitopatógenos. El extracto total de las partes aéreas mostró un efecto selectivo inhibitorio sobre el crecimiento de *Amaranthus* y una acción estimulante sobre *Echinochloa*, (Castañeda *et al.*, 1991), en tanto que con el extracto de semillas se observó un efecto selectivo al estimular el crecimiento de

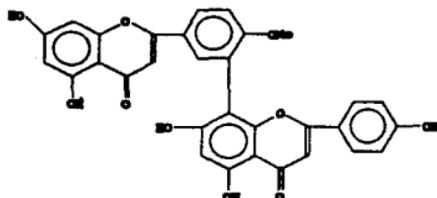
## Metabolitos secundarios de partes aereas



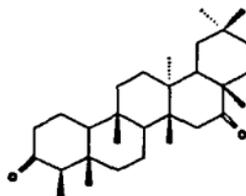
Ginkgetina (1)



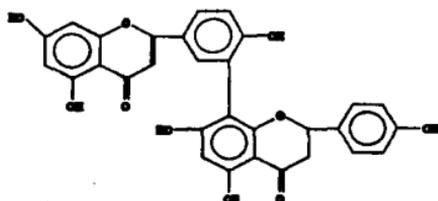
Friedelina (4)



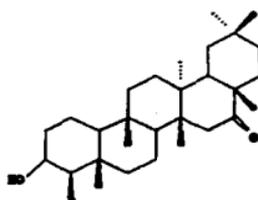
Bilobetina (2)



Maytenifolina B (3)

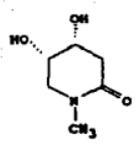


Amentoflavona (2)

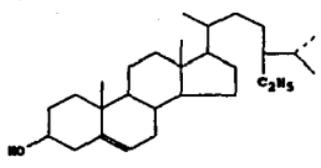


3-β-hidroxi-16-oxo-D:A friedelano (5)

Figura 1.1 Metabolitos aislados de las diversas partes vegetales de *C. mexicanum* S.

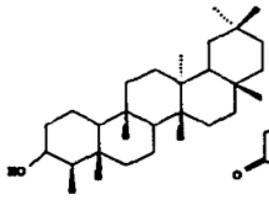


4- $\alpha$ , 5- $\alpha$ -dihidroxi-N-metil-2-piperidona (7)

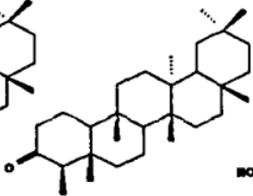


$\beta$ -D-sitosterol (10)

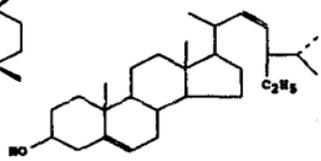
Metabolitos secundarios aislados de Corteza.



Epifriedenol (9)

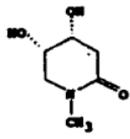


Friedelina (10)



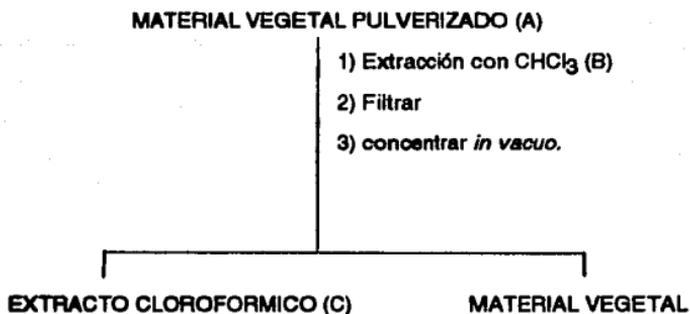
Estigmastrol (11)

Metabolitos secundarios aislados de semillas.



(7)

Figura 1.1 Metabolitos aislados de las diversas partes vegetales de *C. mexicanum* S. (Cont.)



**A) Cantidad de material vegetal (0.857 Kg).**

**B) Extracción via maceración (6 veces por periodos de 48 Hrs. con un volumen aproximado de 4 Lts.).**

**C) Cantidad de extracto cloroformico 59.3 g.**

**Esquema 1.1 Preparación del extracto cloroformico de la corteza de *C.mexicanum* (Bahena 1992).**

ELUYENTE	PROPORCION	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano-cloroformo	50:50	1-40	I*
Hexano-cloroformo	40:60	41-68	II
			III*
			IV
Hexano-cloroformo	30:70	69-85	V*
Hexano-cloroformo	25:75	86-111	VI*
			VII*
Hexano-cloroformo	20:80	112-127	VIII*
Cloroformo	100%	128-135	IX*
Cloroformo-metanol	95:5	136-227	X*
			XI
			XII
			XIII
			XIV
			XV
			XVI*
Cloroformo-metanol	80:20	302-319	XVIII*
Cloroformo-metanol	70:20	320-349	XX**
			XXI
Cloroformo-metanol	60:40	350-356	XXII*
Cloroformo-metanol	50:50	357-363	XXIII
Metanol	100%	364-369	XXXIV

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

\*\*Fracciones investigadas en estudios previos.

**Cuadro 1.1** Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto clorofórmico de *C. mexicanum* (Bahena, 1992)

*Amaranthus* e inhibir el de *Echinochloa* (Bahena, 1992). Por último, el extracto total clorofórmico de la corteza inhibió de manera poco significativa el crecimiento radicular de ambas especies (Bahena, 1992).

Con respecto a los ensayos contra hongos fitopatógenos el lixiviado acuoso de las semillas de *C. mexicanum* S. presentó un efecto estimulante sobre *Pythium*. En cuanto al extracto metanólico de las semillas, este inhibió el crecimiento radial de *Helminthosporium* sp y *Fusarium* sp (Bahena, 1992). Finalmente, en el caso del extracto total de las partes aéreas los resultados fueron poco alentadores ya que no se observó inhibición significativa del crecimiento de los hongos objeto de estudio (Castañeda et al., 1991).

Con respecto a los compuestos aislados hasta el momento solo se han evaluado los obtenidos de las partes aéreas incluyendo la sustancia nitrogenada (7). La friedelina (4) y la maytensifolina B (5) mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre *Echinochloa* en tanto que sobre *Amaranthus* el efecto fué estimulante. Por el contrario las biflavonas presentaron un efecto estimulante sobre *Echinochloa* e inhibitorio sobre *Amaranthus*. El compuesto nitrogenado inhibió de manera poco significativa el crecimiento radicular de *Amaranthus* y *Echinochloa*. En relación a la actividad antifúngica de los compuestos en general los resultados fueron negativos, no encontrándose inhibición o estimulación alguna sobre el crecimiento radial de los hongos objeto de ensayo (Castañeda et al., 1991; Bahena, 1992).

Por último, se determinó la toxicidad de los extractos ya mencionados y compuestos aislados para *Artemia salina* Leach, (Anderson, 1991). En todos los casos la  $LC_{50}$  calculada (concentración letal media) fue mayor a  $1000 \mu\text{g/ml}$ . (Castañeda, 1991; Bahena, 1992).

## 1.2 Generalidades sobre picrotoxanos simples.

### 1.2.1 Características estructurales y distribución.

Los picrotoxanos simples son sesquiterpenoides que tienen como esqueleto base la estructura indicada en la Figura 1.2.

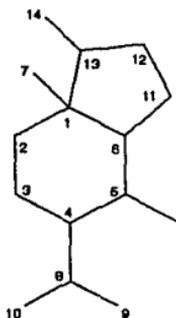


Figura 1.2 Estructura base de los picrotoxanos

La mayoría de los picrotoxanos naturales descritos tienen como característica común un anillo lactónico de cinco miembros que incluye a los carbonos C-3, C-4, C-5 y C-15 del esqueleto base (ver la Figura 1.2). Estos compuestos generalmente presentan funciones oxigenadas de diferente

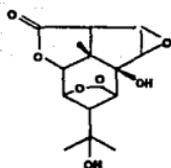
naturaleza (hidroxilo, metoxilo, epóxido, ceto, etc) en diversas posiciones, principalmente en C-2, C-6, C-8, C-7, C-13 y C-11 y con menor frecuencia en C-4. Algunos presentan insaturaciones entre C-8 y C-9 como es el caso de los compuestos (13) - (19) de la Figura 1.3, otros presentan otro grupo lactónico entre las posiciones C-13 y C-2 como la picrotina (12) y la aduncina (20). En la Figura 1.3 se ilustran algunos ejemplos de picrotoxanos simples.

Varios picrotoxanos son de naturaleza alcaloidea, siendo el prototipo estructural la dendrobina (27); otros ejemplos lo constituyen la dendramina (28) y la 2-Hidroxidendrobina (29).

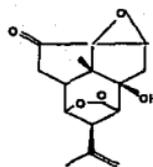
En cuanto a su distribución en la naturaleza podemos decir que los picrotoxanos se han descrito solo en cuatro familias de plantas, las Menispermáceas, Simarubáceas, Euforbiáceas y Orquidáceas, conteniendo la última principalmente picrotoxanos alcaloideos. En el Cuadro 1.2 se ilustran algunas fuentes naturales de estos compuestos.

### 1.2.2 Biosíntesis.

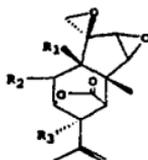
Los sesquiterpenoides del tipo picrotoxano se biosintetizan por la ruta acetato-mevalonato teniendo como precursor al 2-trans-farnesol (34) y de acuerdo a la secuencia metabólica señalada en la Figura 1.4. Cabe destacar, que la mayoría de los estudios experimentales acerca de la biosíntesis de estos compuestos se han realizado sobre el alcaloide dendrobina (27) (Herbert, 1989).



picrotina (12)



picrotoxinina (13)

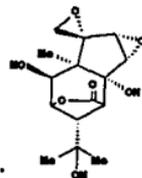


coriamyrtina: R1=OH, R2=R3=H (14)

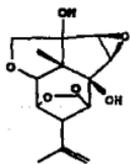
Tutina: R1=R2=OH, R3=H (15).

Hyananchina: R1=R2=R3=OH (16).

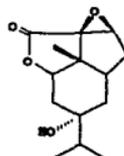
Substancia C: R1=R3=OH, R2=OMe (17).



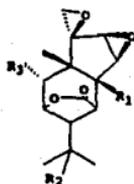
Picodendrina J (18)



Corianina (19)



Aduncina (20)



Dihidroisohananchina R1=R2=R3= OH (21)

Substancia D R1=R3= OH, R2= OMe (22).

Figura 1.3 Ejemplos de picrotoxanos naturales.

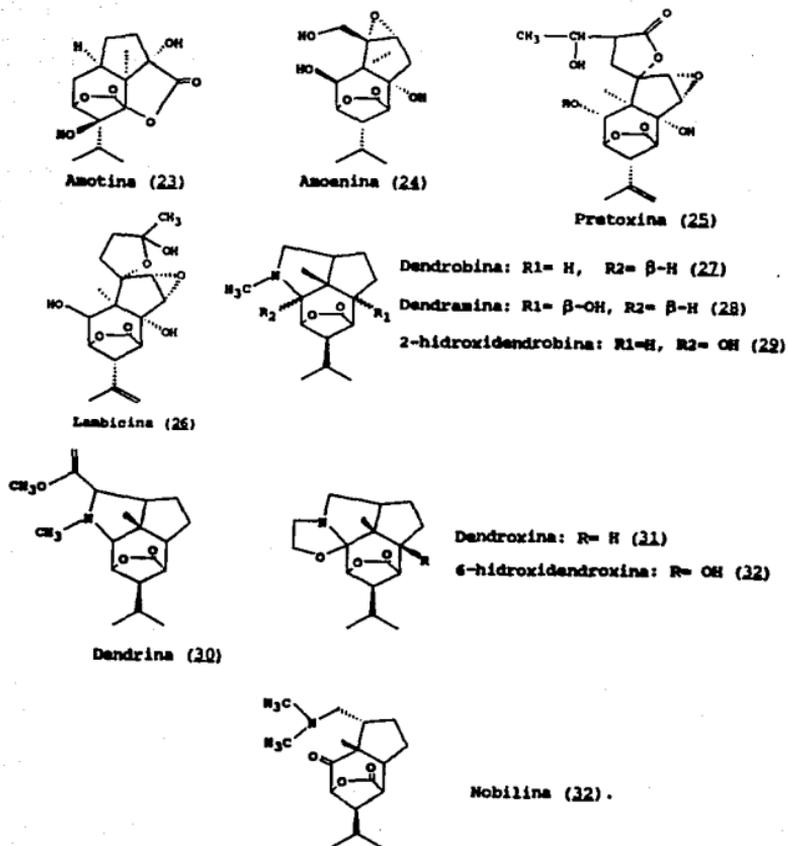
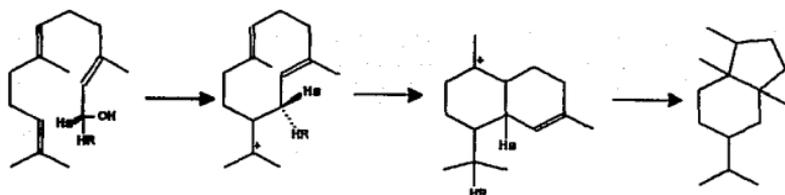


Figura 1.3 Ejemplos de picrotoxanos naturales (continuación)

FUENTE NATURAL	COMPUESTO AISLADO	REFERENCIA
<i>Orchidaceae.</i>		
<i>Dendrobium amoensum</i>	<u>23, 24</u>	Dahmun, 1978
<i>Dendrobium aduncum</i>	<u>20</u>	Gawell, 1976
<i>Dendrobium nobile</i>	<u>27</u>	Corbella, 1975
	<u>28</u>	Inubushi, 1966
	<u>30</u>	Granelli, 1970
	<u>31, 32</u>	Okamoto, 1966
	<u>33</u>	Yamamura, 1964
<i>Dendrobium findlayanum</i>	<u>29</u>	Granelli, 1970
<i>Euphorbiaceae.</i>		
<i>Hyenanche globosa</i>	<u>21, 16</u>	Jommi, 1964
	<u>17</u>	Corbella, 1967
	<u>22</u>	Jommi, 1965
	<u>25, 26</u>	Corbella, 1969
<i>Menispermaceae.</i>		
<i>Toxicodendrum capense</i>	<u>15</u>	Jommi, 1970
<i>Coraria japonica</i>	<u>14</u>	Okuda, 1964
	<u>19</u>	Okuda, 1971
	<u>15</u>	Jommi, 1970
<i>Coraria myrtifolia</i>	<u>14</u>	Okuda, 1964
<i>Coraria arborea</i>	<u>16</u>	Jommi, 1965

Cuadro 1.2 Fuentes naturales de algunos picrotoxanos.



(34)

Figura 1.4 Origen biogénico del núcleo picrotoxano (Herbert, 1989).

### 1.2.3 propiedades físicas.

Los picrotoxanos simples son sólidos, ópticamente activos y en general son solubles en metanol y cloroformo. En el Cuadro 1.3 se indican las propiedades físicas de algunos de ellos.

### 1.2.4 Determinación estructural.

Para la elucidación estructural de los picrotoxanos simples se han utilizado tanto métodos químicos como físicos (espectroscópicos, espectrométricos, difracción de rayos X, y quiroópticos, etc). En la década de los sesentas, la determinación estructural se realizó fundamentalmente mediante complejas degradaciones químicas, misma que en muchas ocasiones condujeron a resultados erróneos, como en los casos de la determinación estructural de la coriamirtina (14) y tutina (15) (Porter, 1967). Mas recientemente los métodos espectroscópicos y espectrométricos han demostrado ser de gran utilidad para la caracterización de estos compuestos.

COMPUESTO	FORMULA	P.F (°C)	[ + ] D
Anducina (20)	$C_{18}H_{18}O_6$	-	-
Amoenina (24)	$C_{18}H_{22}O_6$	255-256	-13
Amotina (23)	$C_{16}H_{20}O_6$	195-199	+55
Coriamirtina (14)	$C_{15}H_{18}O_6$	229-230	-
Corianina (19)	$C_{16}H_{18}O_6$	215-216	-
Dendramina (28)	$C_{16}H_{26}O_3N$	187	-27
Dendrina (30)	$C_{16}H_{26}O_4N$	191	-114
Dendrobina (27)	$C_{16}H_{26}O_2N$	135-136	-
Hidroxidendrobina (29)	$C_{16}H_{26}O_3N$	104	-45
Dendroxina (31)	$C_{17}H_{26}O_3N$	115	-30
Hidroxidendroxina(32)	$C_{17}H_{26}O_4N$	-	-
Hyenanchina (16)	$C_{18}H_{18}O_7$	225-240	-
Isohyenanchina (21)	$C_{16}H_{18}O_7$	298	-
Lambicina (26)	$C_{18}H_{24}O_7$	180-182	-16.7
Nobilina (33)	$C_{17}H_{27}O_3N$	88	-
Picodendrina (18)	$C_{15}H_{18}O_7$	-	-
Picrotina (12)	$C_{16}H_{18}O_7$	252	-
Picrotoxina (13)	$C_{16}H_{18}O_6$	210	-
Pretoxina (25)	$C_{18}H_{24}O_6$	128-130	+3
Substancia C (17)	$C_{16}H_{20}O_7$	-	-
Substancia D (22)	$C_{16}H_{22}O_7$	213	-59
Tutina (15)	$C_{16}H_{18}O_6$	212-213	-

CUADRO 1.3 PROPIEDADES FISICAS DE PICROTOXANOS.

La espectroscopía IR es importante para indicarnos los grupos funcionales que tienen las moléculas. Los espectros de RMN de la mayoría de los picrotoxanos presentan un perfil característico y por lo tanto son de gran utilidad en el proceso de elucidación estructural, (Blunt *et al.*, 1979; Corbella *et al.*, 1969; Dahmén, 1978; Okuda *et al.*, 1965,1971; Hui *et al.*, 1989; Gawell *et al.*, 1976; Ohmoto *et al.*, 1989).

## 2.5 Actividad Biológica.

Los primeros estudios descritos en relación a la actividad biológica de estos compuestos datan de principio de siglo. La mayoría de los picrotoxanos presentan efectos farmacológicos similares y entre los más importantes destacan los siguientes: excitación muscular, aumento de la irritabilidad del centro respiratorio, efecto convulsivante, analgésico, antipirético y analéptico, este último en caso de intoxicaciones severas por barbitúricos. (Porter, 1967).

En estudios más recientes se ha demostrado las propiedades insecticidas de la picrotoxina (Kuwano, 1980) y dicha actividad se ha atribuido al efecto antagonista de la picrotoxina sobre el GABA (Takeuchi, 1969; Ticku *et al.* 1978).

## 2.- HIPOTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que la medicina tradicional constituye un indicador importante para la selección de especies con principios activos potenciales.

## 3.- OBJETIVOS.

Con la finalidad de ampliar el conocimiento del contenido metabólico secundario de la corteza de *C. mexicanum*, y obtener en lo posible constituyentes bioactivos de esta especie medicinal, se considero pertinente proseguir con el estudio fitoquímico de las fracciones cromatograficas XII-XXI, especificadas en el Cuadro 1.1 (Bahena, 1992) .

Es importante destacar que este estudio forma parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional.

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

- 3.1.- Separar mediante métodos fitoquímicos convencionales los constituyentes mayoritarios de las fracciones XI-XXII del Cuadro 1.1.
- 3.2.- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
- 3.3.- Determinar la actividad de los compuestos aislados en contra de *Artemia salina* L. y de la larva (fase 3) del coleóptero *Tenebrio molitor*.

## **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 fué recolectado en el Km 59 de la carretera Barra de Navidad-Puerto Vallarta, municipio la Huerta en el estado de 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 1.4.

##### **4.1.1.3 Metodos de extracción y fraccionamiento.**

Ver Cuadro 1.1 y Esquema 1.1 (Bahena 1992).

AGENTE REVELADOR	COMPOSICION	REFERENCIA
Reactivo de Dragendorff	2.6 g de carbonato de bismuto 7 g de yoduro de sodio 25 ml de ácido acético glacial.	Sthal, 1969
Sulfato Cérico*	Sulfato Cérico amoniacal 12 g Acido 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 1.4 Agentes reveladores utilizados para los análisis cromatográficos.

#### 4.1.1.4 Estudio de las fracciones eluidas con $\text{CHCl}_3$ -MeOH 95:5 del Cuadro 1.1.

El presente trabajo se concretó exclusivamente al estudio de las fracciones eluidas con cloroformo-metanol 95:5 de la columna del extracto clorofórmico original (fracciones XI-XXII, Cuadro 1.1, página 6).

##### 4.1.1.4.1 Aislamiento de la dihidroisohyenchina (21) y del producto A.

De la fracción XI del Cuadro 1.1, precipitó un sólido blanco amarillento amorfo (341 mg) el cual resultó ser una mezcla de dos compuestos. La mezcla anterior se resolvió en sus componentes individuales mediante una cristalización fraccionada, utilizando cloroformo como disolvente; el compuesto (21) cristalizó casi totalmente de la mezcla obteniéndose 95 mg de un polvo cristalino de punto de fusión 296-297 °C soluble en cloroformo y metanol.

Para separar el otro constituyente, el remanente de la mezcla se disolvió en cloroformo por calentamiento. A la mezcla anterior, en caliente, se adicionaron gotas de hexano hasta observar turbidez; la mezcla turbia se dejó en reposo por 24 horas. Al cabo de este tiempo se observaron cristales de color blanco, que fueron separados por filtración. Este procedimiento se repitió hasta obtener cristales finos, este segundo compuesto que denominaremos producto A presentó un punto de fusión de 273-274 °C y se obtuvo en un rendimiento de 140 mg.

#### 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 Johnes y se reportan sin corregir.
- b) Los espectros de IR fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer modelo 599 B en pastilla de KBr.
- c) Los espectros de masas fueron determinados en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5995-B.
- d) Los espectros de RMN fueron obtenidos en el Instituto de Química de la UNAM, en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente piridina- $d_5$  o mezcla de  $CDCl_3$ -DMSO- $d_6$ , y como referencia interna TMS.
- e) La rotación óptica fué medida en un polarímetro digital Jasco Dip 360

##### 4.1.2.2 Obtención de los derivados acetilados del compuesto (21) y del producto (A).

Para obtener los derivados acetilados de los compuestos (21) y producto (A), 10 mg de cada uno y por separado se trataron con 0.1 ml de piridina y 0.1 ml de anhídrido acético; la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 horas, al cabo de este tiempo las mezclas se procesaron por separado de la manera convencional. En el caso del compuesto (21) se obtuvieron 5 mg del producto acetilado (21A) con un punto de fusión de 235-237 °C. En el caso del producto (A) el producto de la reacción estaba constituido por una mezcla de productos. Una cromatografía preparativa de la mezcla anterior utilizando cloroformo-metanol 95:5 como eluyente, permitió la separación del producto mayoritario (6 mg) como un sólido vítreo.

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

##### Preparación de la muestra:

Las muestras (compuestos puros, y/o fracciones) 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 ml y por último el disolvente se evapora al vacío.

##### Bioensayo.

Después de haber desarrollado los huevecillos de *Artemia salina* Leach. durante 48 horas en un medio salino artificial, se transfirieron 10 crustáceos 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 crustáceos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentajes de mortalidad o mediante la concentración letal media (LC<sub>50</sub>).

#### 4.1.2.4 Determinación del efecto de la dihidroisohyananchina (21) sobre la larva (estadio 3) del coleóptero *Tenebrio molitor*.

Se determinó el efecto del compuesto (21) sobre el crecimiento de la larva del coleóptero de *T. molitor*. El compuesto se evaluó a las dosis de 100 y 200 mg/ml, de acuerdo a la metodología previamente descrita por Zhang y colaboradores (1992). Esta evaluación se realizó en el laboratorio de la Doctora Ana Luisa Anaya, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

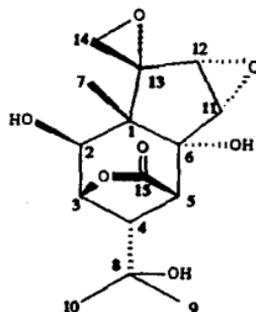
## 5.- RESULTADOS Y DISCUSION

El extracto clorofórmico preparado a partir de la corteza de *Celaenodendron mexicanum* Standl. se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna de gel de sílice (Bahena, 1992). El estudio fitoquímico de las fracciones cromatográficas eluidas con cloroformo-metanol 95:5 (Cuadro 1.1) condujo al aislamiento de dos sustancias de naturaleza terpenoide. Uno de los compuestos aislados fué caracterizado como el picrotoxano dihidroisohyenanchina (21) cuya elucidación estructural será el objetivo principal de la presente sección. En el Cuadro 1.5 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas utilizadas en el proceso de caracterización del compuesto (21).

El compuesto (21) fué aislado como un sólido cristalino con un punto de fusión de 296-297°C; su fórmula molecular fué establecida como  $C_{15}H_{20}O$ , por espectrometría de masas. El espectro de IR mostró bandas características para grupo hidroxilo ( $3520\text{ cm}^{-1}$ ) y para carbonilo de  $\gamma$ -lactona ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ). Los espectros de RMN mostraron el perfil característico de un sesquiterpeno tipo picrotoxano (Okuda *et al.*, 1965, 1971; Corbella *et al.*, 1969; Gawell *et al.*, 1976; Dahmén, 1978; Blunt *et al.*, 1979; Hui *et al.*, 1989; Ohmoto *et al.*, 1989).

El espectro de RMN<sup>13</sup>C mostro 15 señales en concordancia con la fórmula molecular establecida. El análisis del espectro de RMN<sup>13</sup>C modalidad DEPT permitió discriminar las quince señales de la siguiente manera: tres grupos metilos ( $\delta$  21.57, 28.64, 30.64), un metileno ( $\delta$  52.34), seis metinos

CUADRO 1.5 Constantes físicas y espectroscópicas de (21)

RMN<sup>1</sup>H (piridina-d<sub>5</sub>).

$\delta$	m	J (Hz)	H
1.38	s	-	H-10
1.55	s	-	H-9
1.98	s	-	H-7
2.74	t	4.10	H-4
3.12	d	6.21	H-14
4.87	d	6.21	H-14'
3.61	d	3.19	H-12
4.28	d	3.19	H-11
3.44	d	3.90	H-5
5.17	d	4.10	H-3
5.16	d	5.8	H-2
7.32	d	5.8	OH
7.44	s	-	OH
9.17	s	-	OH

Cuadro 1.5: Constantes físicas y espectroscópicas de (21) (continuación).

RMN<sup>13</sup>C

$\delta$	C
175.56	C-15
84.89	C-3
77.41	C-6
73.12	C-2
68.39	C-8
67.06	C-13
61.21	C-11
60.43	C-12
54.61	C-5
52.34	C-14
50.32	C-4
46.36	C-1
30.64	C-10
28.64	C-9
21.57	C-7

$[\alpha]_D^{20} = -54$  (MeOH, 1mg/1ml)

IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  : 3520, 3250, 2960, 1740, 1150.

Punto de fusión: 296-297°C .

E.M.I.E. m/z (int. rel.): 330 (1.2), 315 (M-15,1), 177 (21), 141 (30), 125 (37), 95 (44), 59 (100), 43 (70), 41 (44).

( $\delta$  50.32, 54.61, 60.43, 61.21, 73.12, 84.89), y cinco carbonos cuaternarios incluyendo el carbonilo de una  $\gamma$ -lactona ( $\delta$  46.36, 67.06, 68.39, 77.41 y 175.56).

De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico ocho de estas señales se encontraban unidas a carbonos con funciones oxigenadas. La resonancia correspondiente al metileno en  $\delta$  52.34 y las señales en  $\delta$  61.21 y  $\delta$  60.43 indicaban en principio la presencia en la molécula de dos epóxidos. La resonancia  $\delta$  84.89 era fácilmente asignable al carbono base de la  $\gamma$ -lactona; en consecuencia, las tres señales oxigenadas restantes debían corresponder a los carbonos geminales a tres funciones carbinólicas, una secundaria ( $\delta$  73.12) y dos terciarias ( $\delta$  77.41 y  $\delta$  68.39). Las señales correspondientes a los grupos metilo se encontraban en perfecta armonía con las previamente descritas para los metilos C-7 ( $\delta$  21.57), C-10 ( $\delta$  30.64) y C-9 ( $\delta$  28.64) de picrotoxanos simples con sustituyentes oxigenados en C-8 y C-6. (Blunt *et al.* 1979; Ohmoto *et al.* 1989). Por último, las tres señales restantes en  $\delta$  50.32,  $\delta$  54.61 y  $\delta$  46.36 eran atribuibles a los carbonos C-4, C-5 y C-1, respectivamente.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H en piridina-d<sub>5</sub> presentó las siguientes características:

- a) En la zona de  $\delta$  1.38 a 1.98 se observaron tres singuletes en  $\delta$  1.38, 1.55 y 1.98, atribuibles a tres metilos. La señal a campo más bajo es característica del metilo C-7 de picrotoxanos. (Ohmoto, *et al.* 1989).
- b) Entre  $\delta$  7.32 y 9.17 se apreciaron las señales correspondientes a los tres grupos hidroxilos (7.32, 7.44 y 9.17). Estas señales desaparecieron al

registrar el espectro en presencia de D<sub>2</sub>O y confirmaron la presencia de tres carbinoles en la molécula.

c) Por último, entre  $\delta$  2.74 y 5.17 se apreciaron ocho señales, integrando siete de ellas para un protón y la última para dos hidrógenos. De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico, las resonancias observadas por arriba de  $\delta$  3.0 debían corresponder a hidrógenos unidos a funciones oxigenadas. El análisis de las correlaciones observadas para este grupo de señales en el espectro COSY (Figura 1.5) en CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>, así como de las constantes de acoplamiento, permitieron deducir las estructuras parciales que se ilustran en la Figura 1.6.

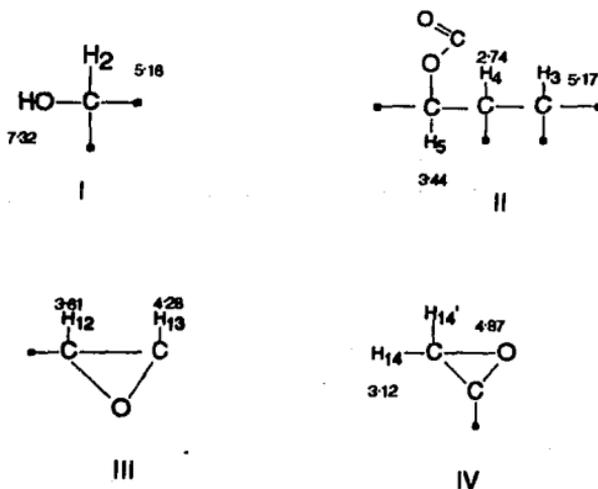


Figura 1.6 Estructuras parciales del compuesto (21) derivadas del análisis del espectro COSY.

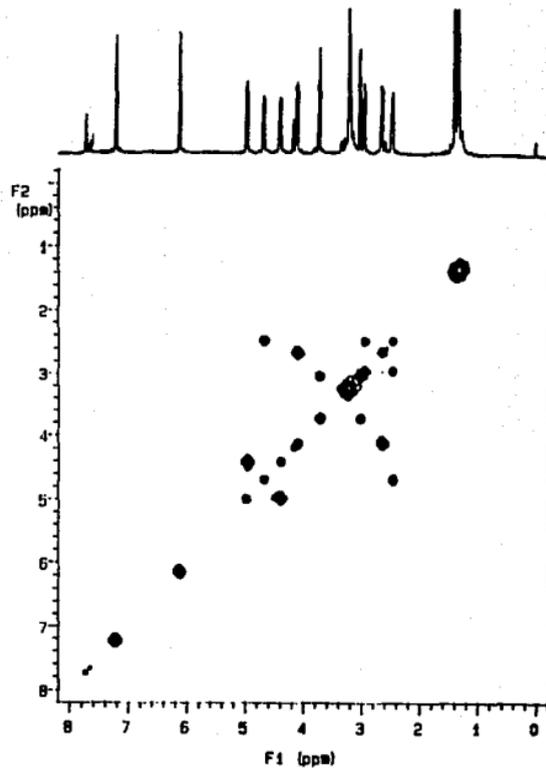
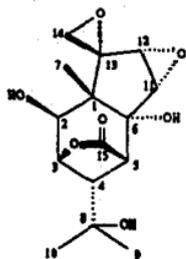


Figura 1.5 Espectro COSY de la dihidroisohyenchina (21).

Considerando que el producto presentaba el núcleo de picrotoxano, la conjunción de las estructuras parciales indicadas en la Figura 1.6, y las observaciones de los desplazamientos químicos de los metilos en el espectro de RMN<sup>13</sup>C, permitieron proponer la estructura que se indica a continuación. (Figura 1.7) (Blunt *et al.*, 1979). El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina permitió la obtención del derivado diacetilado (**21a**), confirmando químicamente la presencia de una función carbinólica secundaria y de una de las terciarias. En el Cuadro 1.6 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de este producto.

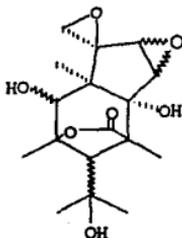
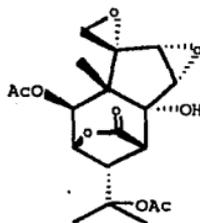


Figura 1.7 Estructura probable del compuesto **21**.

El desplazamiento paramagnético de los hidrógenos correspondientes a H-2 ( $\Delta\delta$  0.86) y H-5 ( $\Delta\delta$  0.96) en el espectro de RMN<sup>1</sup>H de (**21a**) era consistente con la ubicación del grupo hidroxilo secundario en C-2 y con la ubicación de uno de los hidroxilos terciarios en C-6 (Koike, *et al.*, 1991).

La acetilación del hidroxilo terciario en C-6 ha sido previamente descrita en compuestos relacionados (Koike *et al.*, 1991).

Cuadro 1.6 Constantes físicas y espectroscópicas de (21a).

RMN<sup>1</sup>H (Piridina-d<sub>5</sub>).

$\Delta\delta$	m	J(Hz)	H
0.01	s	-	H-10
0.01	s	-	H-9
0.24	s	-	H-7
0.03	t	4.10	H-4
0.03	d	6.21	H-14
0.26	d	6.21	H-14'
0.05	d	3.19	H-12
0.79	m	3.19	H-11
0.96	d	3.90	H-5
0.02	d	4.10	H-3
0.86	s	-	H-2
0.84	s	-	OH-8
5.41	s	-	OAc
7.02	s	-	OAc

E.M.I.E. m/z (int. rel.): 414(m<sup>+</sup>, 5), 372 (M-AC, 1), 340 (4), 43 (100).

Punto de fusión : 235-237°C

La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente en este trabajo con los previamente descritos para la dihidroisohyenanchina permitieron concluir que el producto natural (21) obtenido de *Celaenodendron mexicanum* Standl. era idéntico en todos los aspectos a la dihidroisohyenanchina, previamente aislado de *Hyaenanche globosa* (Porter, 1967). Este constituye el segundo reporte en la naturaleza de este picrotoxano. En ambos casos el producto se ha aislado de una especie perteneciente a la familia de las Euforbiaceas y a la tribu, Hyaenancheae.

La dihidroisohyenanchina no presentó toxicidad para *Artemia salina* L. ( $LC_{50} > 1000$  ppm). Igualmente, no inhibió el crecimiento de las larvas en fase III del coleóptero *Tenebrio molitor*.

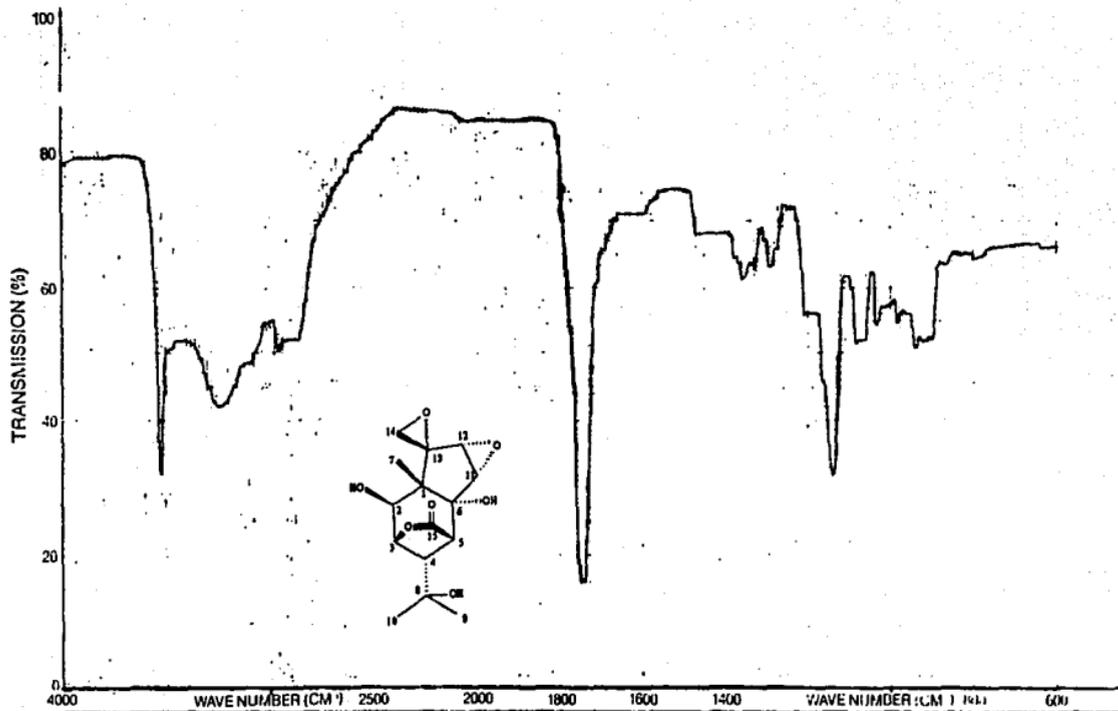
En relación al producto A, cabe mencionar que se encuentra en proceso de caracterización.

## CONCLUSIONES

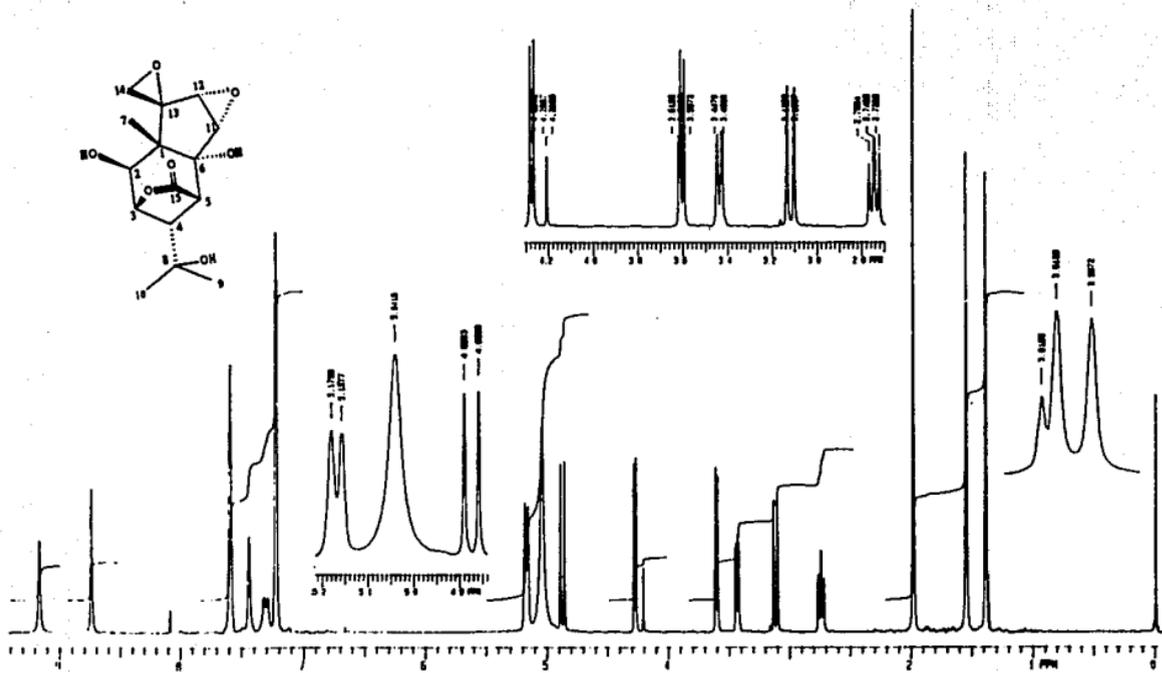
1) El estudio de algunas fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum* Standl permitió el aislamiento de dos productos naturales adicionales. Uno de estos compuestos fué caracterizado como la dihidroisohyenanchina, mediante métodos químicos y espectroscópicos. El otro producto se encuentra en proceso de caracterización.

2) La dihidroisohyenanchina resultó inactiva en la evaluación de la determinación de la toxicidad contra *Artemia salina* Standl.

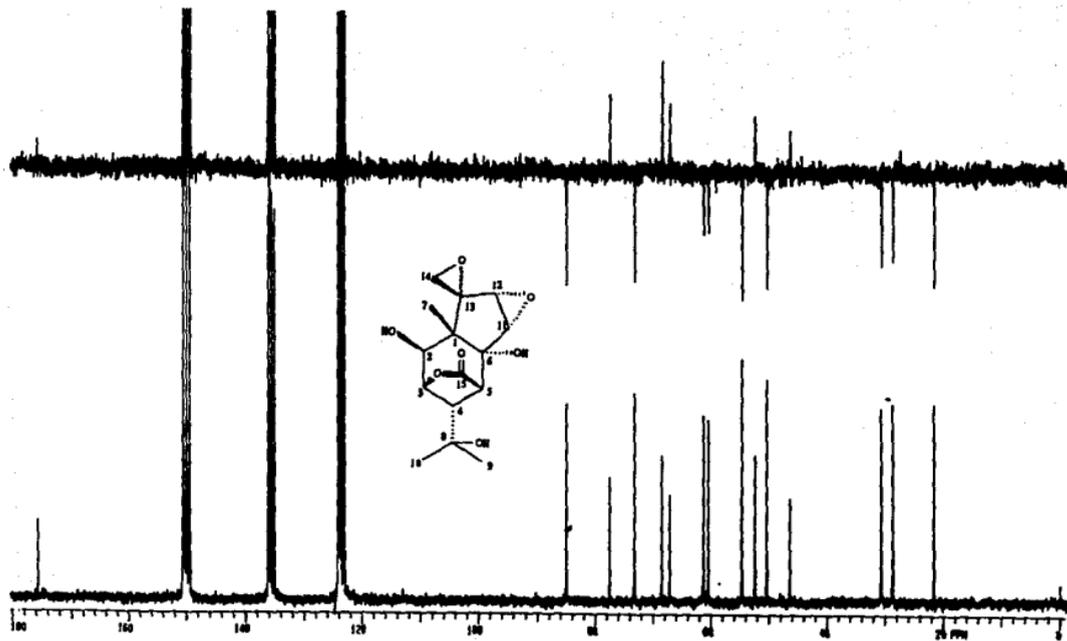
3) La dihidroisohyenanchina no afectó el crecimiento de la larva en fase III del coleóptero *Tenebrio molitor*.



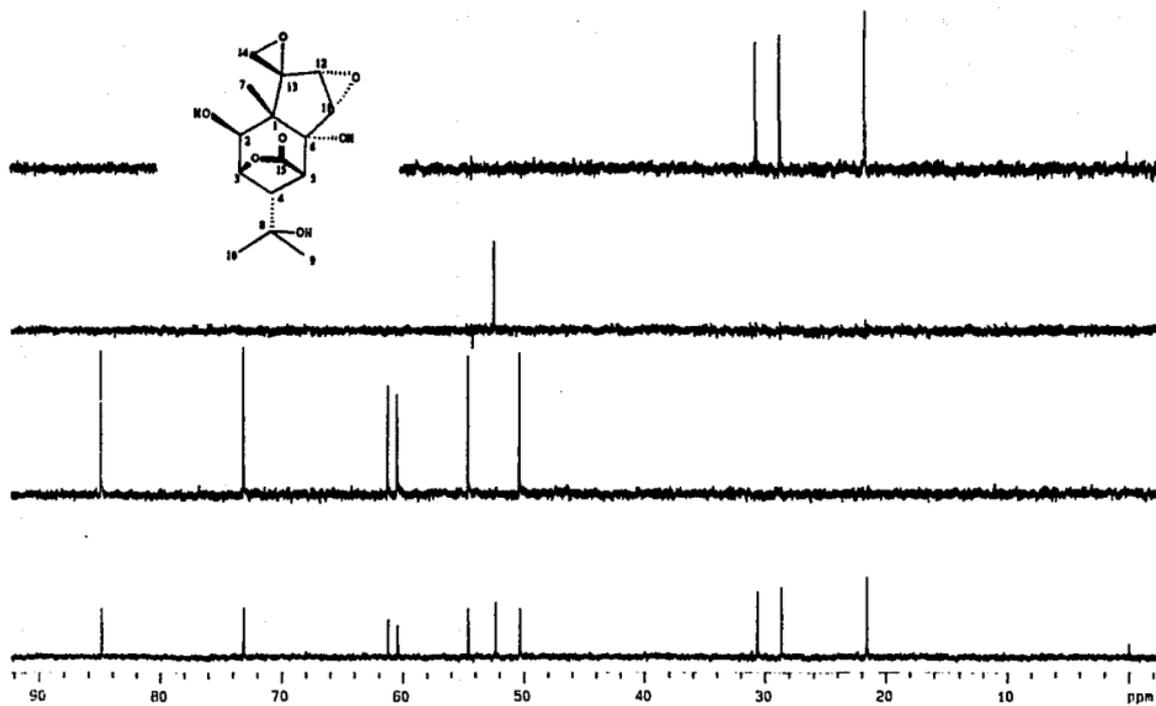
Espectro 1



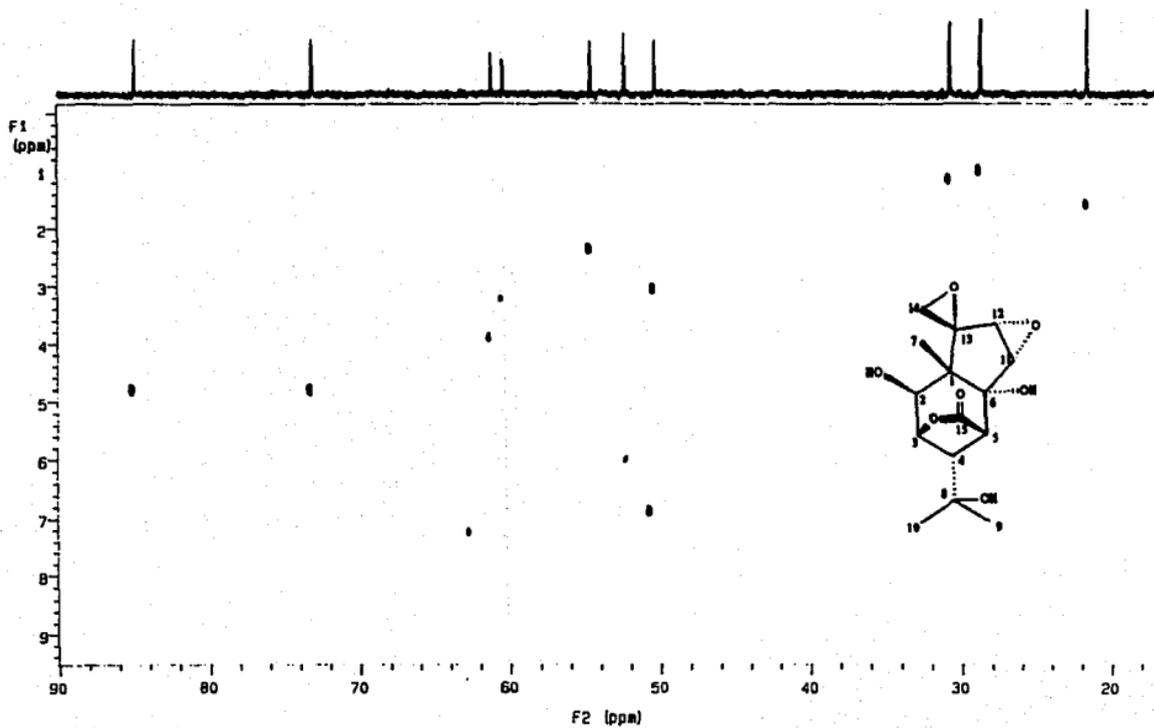
**Espectro 2**



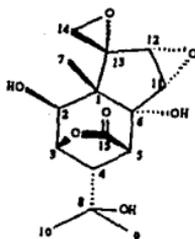
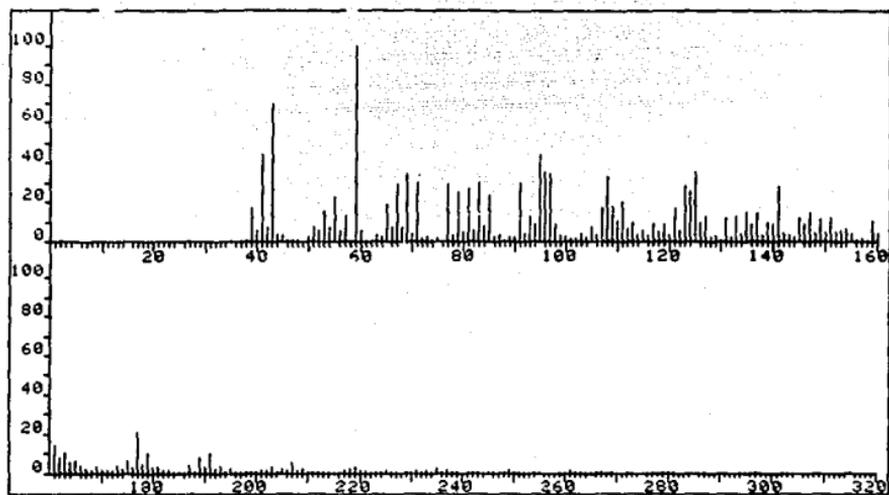
Espectro 3



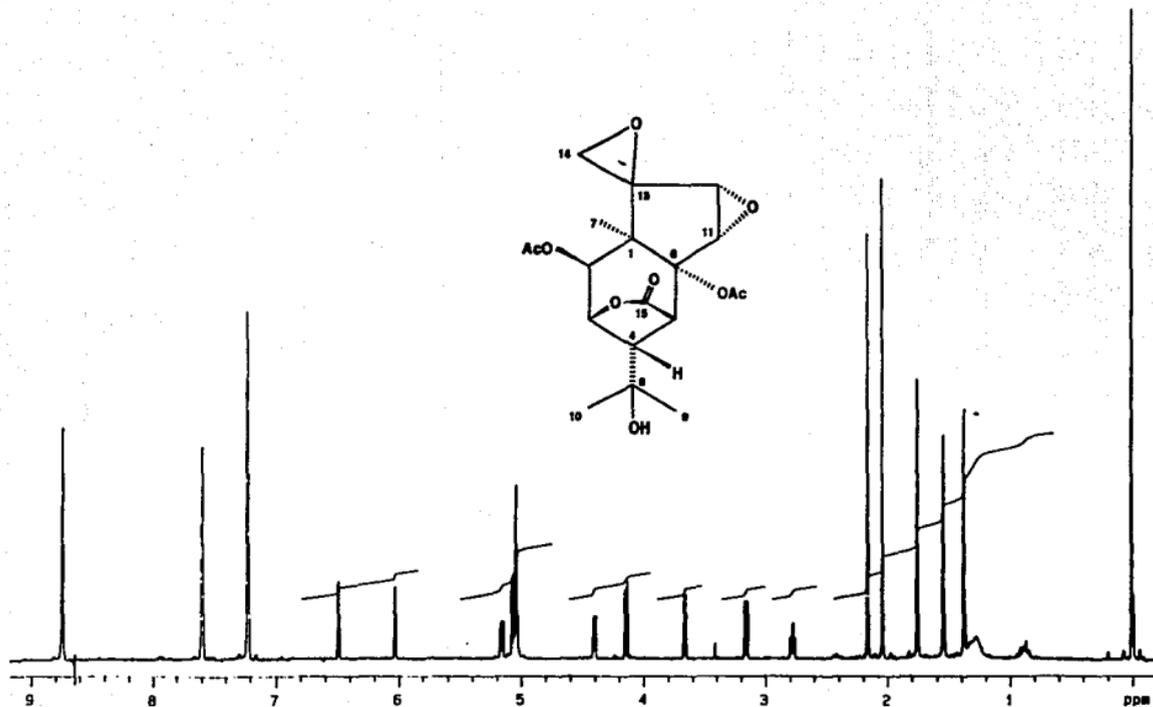
Espectro 4



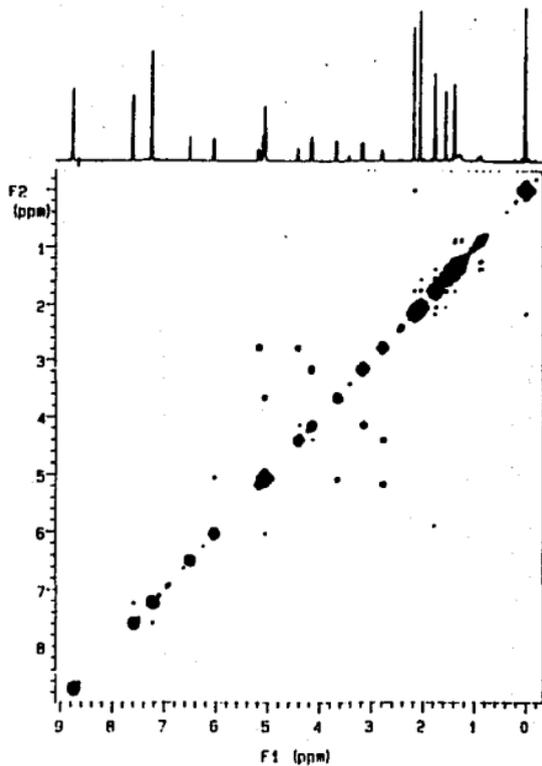
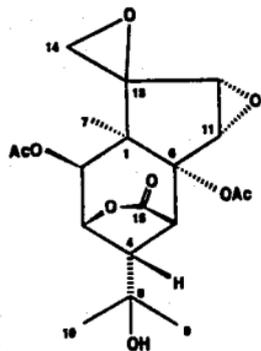
Espectro 5



Espectro 6



Espectro 7



Espectro 8

## CAPITULO 2

### ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR DE *ANNONA GLABRA* L.

#### 1.- INTRODUCCION.

##### 1.1 Antecedentes sobre *Annona glabra* L. (Annonaceae).

*Annona glabra* L. es una planta que pertenece a la familia Annonaceae la cual es económicamente de gran importancia. (Leboeuf *et al.* 1982). En México la especie se encuentra distribuida en los estados de Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Tabasco y Yucatán; se le conoce popularmente como corcho (Guerrero, Tabasco, Yucatán, Puerto Rico), árbol de corcho (Veracruz), palo de corcho y "Mag" (Maya, Yucatán) entre otros.

En la medicina popular mexicana, la especie se emplea como remedio para el tratamiento de las primeras fases de la tuberculosis y contra la ictericia. (Martinez, 1990).

La especie es un arbusto o árbol que llega a medir hasta 12 metros de altura, de hojas ovales, oblongas u ovadas de 6 a 15 cm, agudas acuminadas; flores de pétalos exteriores amarillentos con una mancha roja cerca de la base, fruto ovoide de 6 a 12 cm amarillo y de madera muy ligera.

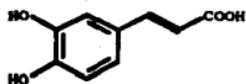
Desde el punto de vista químico, la planta ha sido objeto de varios estudios mismos que han permitido el aislamiento y caracterización de sustancias alcaloideas [estructuras (38) a la (47)], un flavonoide (36), un

diterpenoide (37) y un fenilpropanoide (37). (Leboeuf, 1982). en la Figura 2.1 se ilustran las estructuras correspondientes.

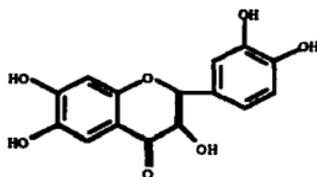
Es importante destacar, que muchas especies del género *Annona*, han originado una gran diversidad de metabolitos de importancia medicinal entre las que destacan algunas sustancias alcaloideas (Gellert, 1972) y mas recientemente las acetogeninas. Estas últimas han demostrado propiedades citotóxicas, antitumorales, antiparasitarias y pesticidas. (Xin-Ping Faug. et al., 1993). La mayoría de las acetogeninas bioactivas aisladas de especies del género *Annona* se han obtenido mediante estudios fitoquímicos biodirigidos, utilizando como bioensayo preliminar la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* L.

## 2.- JUSTIFICACION

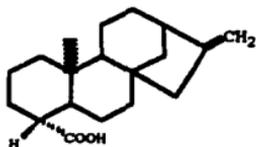
Como ya se especificó en la sección de antecedentes, numerosas plantas del género *Annona* han originado gran diversidad de principios activos entre los que destacan no solamente los alcaloides sino también las acetogeninas. Sin embargo a la fecha en México no se ha realizado ningún estudio sistemático o aislado sobre plantas de este importante género; por tal motivo, en el presente trabajo se consideró conveniente estudiar desde el punto de vista químico y biológico la especie *Annona glabra* L. que junto con la *Annona cherimola* Mill, *A. muricata* L. y *A. purpurea* Moc et Sesse, constituyen las especies medicinales mas importantes de este género en México.



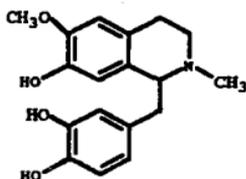
Ac. Cafeico (35)



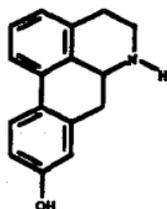
Quercetina (36)



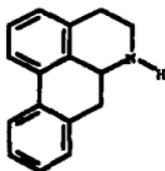
Acido (-) kaurenico (37)



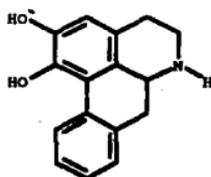
Reticulina (38)



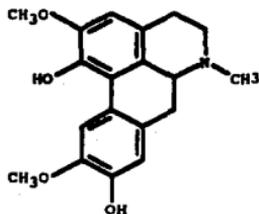
Anolobina (39)



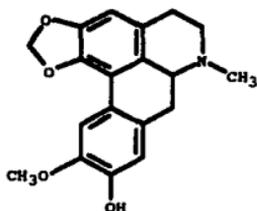
Anonina (40)



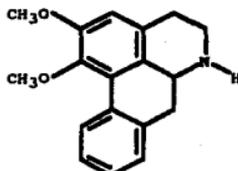
Anamilobina (41)



Isoboldina (42)



N-metilactinodafnina (43)



Nornociferina (44)

Figura 2.1 Metabolitos secundarios aislados de Annona glabra L. (Laboef, 1982)



Figura 2.1 Metabolitos secundarios aislados de *Annona glabra* L. (continuación).

### 3.- HIPOTESIS

La hipótesis del presente trabajo considera que la medicina tradicional constituye un indicador importante para la selección de plantas con principios activos potenciales.

### 4.- OBJETIVOS

Al igual que el estudio correspondiente al Capítulo 1, esta investigación forma parte de un estudio sistemático de plantas Mexicanas utilizadas en medicina tradicional. Los objetivos generales planteados para la realización de este trabajo son los siguientes:

- 1) Determinar el contenido metabólico de las hojas de *Annona glabra* L.
- 2) Obtener en lo posible constituyentes bioactivos de esta especie medicinal.

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

- 4.1 Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales.
- 4.2 Preparar el extracto de hojas de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlo mediante los métodos adecuados.
- 4.3 Separar mediante métodos fitoquímicos convencionales los constituyentes mayoritarios de las diferentes fracciones.
- 4.4 Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.
- 4.5 Determinar la actividad biológica de los compuestos aislados en contra de *Artemia salina* Leach.

## **5.- PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.1 Estudio fitoquímico y biológico de las hojas**

#### **3.1.1 Materiales y métodos.**

##### **3.1.1.1 Material vegetal.**

El material vegetal (partes aéreas) utilizado en este estudio fue recolectado en las vecindades del Instituto de Ecología, Km 25 de la antigua carretera a Coatepec Xalapa, en el estado de Veracruz, por el Dr Victor Rico.

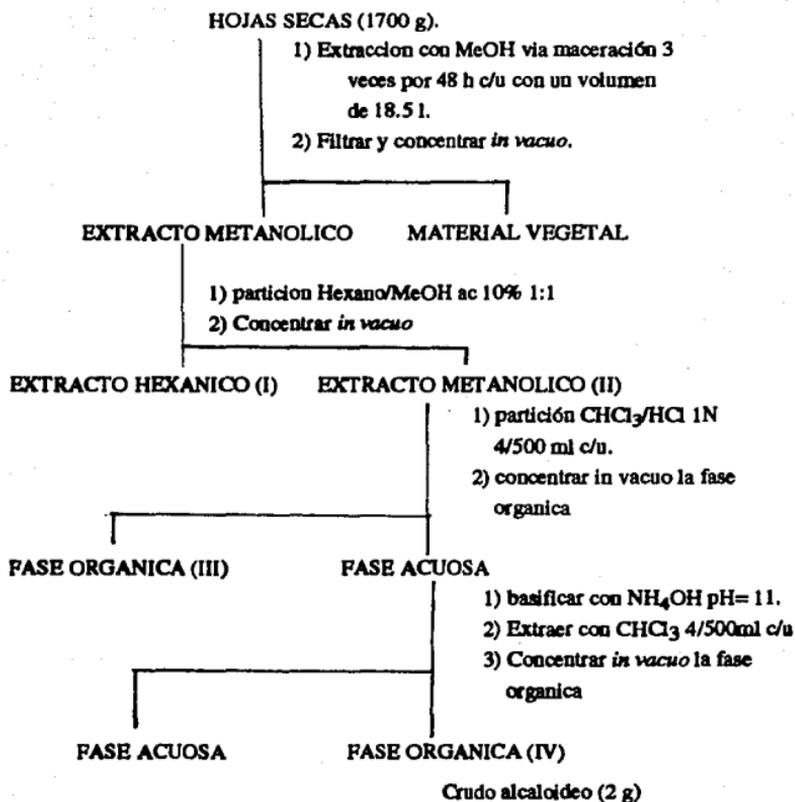
Las hojas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se fragmentaron manualmente en trozos pequeños.

##### **3.1.1.2 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), utilizando como agentes reveladores los especificados en el Cuadro 1.4 de la Sección 4, del Capítulo 1.

##### **3.1.1.3 Métodos de extracción y fraccionamiento.**

El material vegetal (1700 g de hojas secas) se extrajo de acuerdo al procedimiento que se especifica en el Esquema 2.1. El extracto resultante (361.1 g) se fracciona de manera preliminar mediante una partición entre hexano y metanol acuoso (10%); posteriormente la fracción metanólica (fracción II) se fraccionó de manera adicional mediante



Esquema 2.1 Preparación y fraccionamiento del extracto metanólico de las hojas de *Annona glabra* L.

una partición ácido-base, obteniéndose como resultado de este proceso una fracción neutra (III, 21.3 g) y un crudo alcaloideo (fracción IV, 3 g).

#### 3.1.1.4.1 Aislamiento de la Fanostenina (48).

La fracción alcaloidea (IV) se sometió a una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (55 g de sílica gel G-60 Merck con tamaño de partícula 0.2-0.5).

El proceso de elución se efectuó con cloroformo-metanol en diferentes proporciones obteniéndose un total de 76 fracciones de 50 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 2.1 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada una de ellos y las fracciones combinadas.

La fracción combinada 15-24 (65 mg) del Cuadro 2.1 se sometió a una cromatografía preparativa en capa delgada de gel de sílice, empleando como eluyente cloroformo-metanol 9:1; se utilizaron 4 placas de 20 X 20 cm y en cada una se aplicaron aproximadamente 16 mg de la muestra objeto de la separación. Una vez procesadas las placas de acuerdo a los procedimientos convencionales se obtuvieron 11 mg del compuesto (48) con un punto de fusión de 79-80°C.

#### 3.1.1.4.2 Aislamiento del $\beta$ -D-glucositosterol.

El extracto III (fracción neutra) del Esquema 2.1 se sometió a una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (426 g de sílica gel G-60 Merck).

**Cuadro 2.1** Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto alcaloideo de *Annona glabra* L.

Eluyente	proporción	Fracciones	Fracc. combinadas
Cloroformo-metanol	98:2	1-33	1-7
			8-14
			15-24
Cloroformo-metanol	95:5	34-65	25-32
			33-38
			39-46
Cloroformo-metanol	80:20	66-75	47-65
			66-75
Cloroformo-metanol	1:1	76	76

con tamaño de partícula 0.2-0.5). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo en diferentes proporciones y cloroformo con cantidades crecientes de metanol, obteniéndose un total de 331 fracciones de 100 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 2.2 se resumen los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno y las fracciones combinadas.

De la fracción combinada 232-244 del Cuadro 2.2 (eluidas con cloroformo-metanol 93:7) precipitó un sólido blanco amorfo, el cual se purificó por recristalización obteniéndose 1 g con un punto de fusión de 274-276°C.

Cuadro 2.2 Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto III del Esquema 2.1.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano	100	1-24	1-10
Hexano-cloroformo	9:1	25-41	
Hexano-cloroformo	8:2	42-55	
Hexano-cloroformo	7:3	56-62	11-84
Hexano-cloroformo	6:4	63-69	
Hexano-cloroformo	1:1	70-84	
Hexano-cloroformo	4:6	85-97	85-97
Hexano-cloroformo	3:7	98-106	98-124
Hexano-cloroformo	2:8	107-119	
Cloroformo	100	120-138	125-157
Cloroformo-metanol	99:1	139-155	
Cloroformo-metanol	98:2	156-184	158-161 162-184
Cloroformo-metanol	97:3	185-206	185-200 201-207
Cloroformo-metanol	95:5	207-228	208-214 215-231
Cloroformo-metanol	93:7	229-244	232-244
Cloroformo-metanol	92:8	245-268	245-247 248 249-252
Cloroformo-metanol	9:1	269-282	253-260
Cloroformo-metanol	85:15	283-298	261-289
Cloroformo-metanol	8:2	299-311	290-311
Cloroformo-metanol	75:25	312-317	312-317
Cloroformo-metanol	7:3	318-329	318-328
Cloroformo-metanol	1:1	330	329-331
Metanol	100	331	

### 3.1.1.5 Determinación de alcaloides por medio de los reactivos de Meyer y Dragendorff.

Se disolvió una pequeña cantidad de los extractos objeto de prueba en una pequeña cantidad de metanol, la solución resultante se acidificó mediante HCl 1N y finalmente se le agrego cada uno de los reactivos. En ambos casos se utilizo un blanco y un patron adecuado para confirmar la veracidad de las reacciones.

### 3.1.1.1.6 Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* L.

La determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach. se especificó en el Capítulo 1 (en el punto 4.1.2.3.)

## 4- RESULTADOS Y DISCUSION

El extracto metanólico de las hojas de *Annona glabra* L. se fraccionó de manera preliminar mediante una partición entre hexano y metanol acuoso (10%), generando las fracciones I y II del Esquema 2.1. Tanto el extracto metanólico original como la fracción II del Esquema 2.1 reaccionaron positivamente frente a los reactivos de Dragendorff y Mayer, consecuentemente la fracción metanólica acuosa se sometió a un fraccionamiento adicional, mediante una partición ácido-base (ver Esquema 2.1), con la finalidad de separar selectivamente los alcaloides previamente detectados. Como resultado de este proceso se generó una fracción neutra (Fracción III, Esquema 2.1) y una fracción alcaloidea (Fracción IV, Esquema 2.1).

Con la finalidad de separar los constituyentes alcaloideos mayoritarios, la fracción IV se sometió a una cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose numerosas fracciones de complejidad menor al crudo alcaloideo original (ver Cuadro 2.1).

Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de las fracciones 15-24 del Cuadro 2.1 permitieron la obtención de una sustancia pura de naturaleza alcaloidea, de acuerdo a su comportamiento frente a los reactivos de Dragendorff y Mayer. El alcaloide fue caracterizado como fanostenina (48) mediante el análisis de sus constantes físicas y espectroscópicas (Cuadro 2.3). El producto (48) se obtuvo como un sólido cristalino de color café-rojizo, ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{19}H_{19}O_4N$  mediante espectrometría de masas; la fórmula calculada permite once insaturaciones.

El espectro de IR mostró bandas características para hidroxilo ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ) y aromaticidad ( $1606$  y  $1516\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de RMN<sup>1</sup>H presentó las siguientes características:

1) En  $\delta$  7.63, 6.81 y 6.52 se observaron señales para tres hidrógenos aromáticos.

2) En  $\delta$  5.93 y 6.09 se observó un sistema AB característico para un grupo metilendioxi sobre anillo aromático.

3) Finalmente en  $\delta$  3.92 y 2.52 se observaron las señales características para un -OMe aromático y un grupo N-metilo, respectivamente.

El espectro de RMN<sup>13</sup>C presentó 19 señales en concordancia con la fórmula molecular y presentó el perfil típico de una aporfina (Guinaudeau *et al.*, 1975; Broadbeut y paul, 1983; Guinaudeau, Leboeuf y Cave, 1988). La naturaleza de estas señales se discriminaron con base en la teoría del desplazamiento químico y el espectro de RMN<sup>13</sup>C, modalidad DEPT (Espectro 1 ). El análisis del espectro DEPT permitió determinar inequívocamente que el compuesto (48) debía contener nueve carbonos cuaternarios, cuatro metinos, cuatro metilenos y dos metilos. De acuerdo a la teoría del desplazamiento químico los nueve carbonos cuaternarios son de naturaleza aromática y cuatro de ellos deben encontrarse unidos a funciones oxigenadas ( $\delta$  146.67, 145.45, 145.12 y 141.5). De los cuatro metinos presentes tres son de carácter aromático ( $\delta$  106.65, 109.89 y 114.36) y el último de naturaleza alifática ( $\delta$  62.26). En relación a los cuatro metilenos, el desplazado a campo más bajo ( $\delta$  100.61) era fácilmente asignable a un grupo metilendioxi, dos corresponden a metilenos alifáticos ( $\delta$  28.86 y 33.70) y el último a un metileno  $\alpha$  a una función nitrogenada ( $\delta$  43.54). Finalmente, los dos metilos observados son atribuibles a un metoxilo unido a un carbono aromático ( $\delta$  56.16) y a un N-metilo ( $\delta$  43.54).

Cabe hacer mención en este punto de la discusión que de los cuatro carbonos aromáticos oxigenados dos se encontraban unidos al metilendioxi, el tercero a un metoxilo y el último debía entonces estar

unido a un grupo hidroxilo a fin de satisfacer el número de hidrógenos y oxígenos requeridos por la fórmula molecular.

Considerando que el compuesto (48) presenta un núcleo de aporfina (ver Figura 2.2) solo resta entonces determinar la disposición de los grupos funcionales detectados mediante el análisis anterior. Como los hidrógenos aromáticos evidenciados en los espectros de RMN aparecen como singuletes en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, cada uno de los anillos aromáticos (A y D) del alcaloide (48) debían sostener dos sustituyentes oxigenados. En este

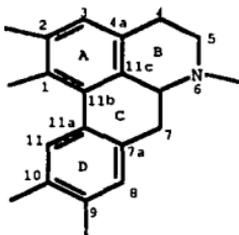


Figura 2.2 Estructura base de los alcaloides aporfínicos

sentido el patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (ver Figura 2.3) es consistente con el de aporfina con sustituyentes oxigenados en las posiciones C-1, C-2, C-9 y C-10, ya que el pico M -1 representó el pico base del espectro (Shama, 1972).

Por otra parte la apariencia de las señales asignables al grupo metilendioxí como dos dobletes ( $J = 2.1$  Hz) en  $\delta$  5.93 y  $\delta$  6.09 indicaban que este debía encontrarse entre las posiciones C-1 y C-2 del anillo A del núcleo base (Shama, 1972).

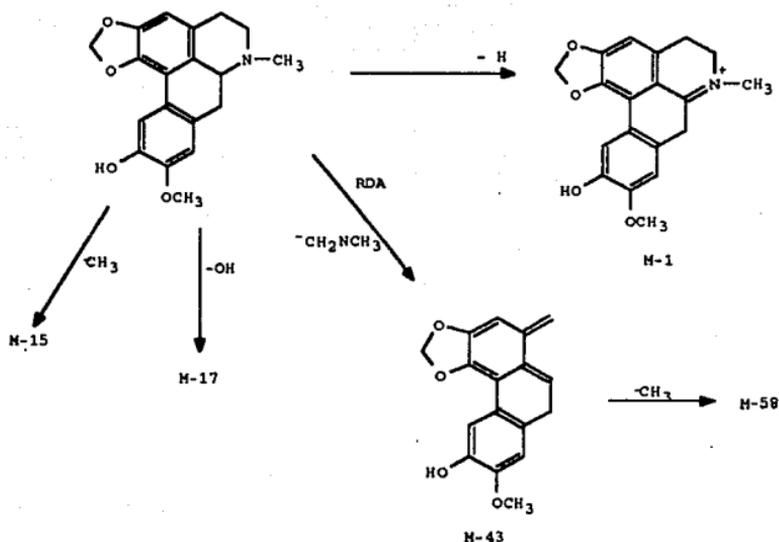
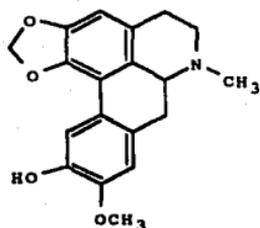


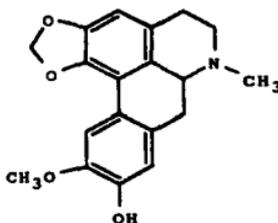
Figura 1.3 Patrón de fragmentación del compuesto 48.

Si este grupo se hubiese encontrado entre C-10 y C-9 del anillo D (que es la única posibilidad de sustitución en el anillo D de acuerdo al espectro de masas) las señales correspondientes se hubiese observado como un singulete (Shama, 1972). En consecuencia el grupo metoxilo e hidroxilo debían encontrarse en C-9 y C-10.

Con base en la discusión anterior se podían proponer dos estructuras posibles, mismas que se indican a continuación:



(A)



(B)

La estructura (B) corresponde a la N-metilactinodafnina (43) previamente aislada de esta especie. La comparación de los datos físicos y espectroscópicos del producto (48) con los previamente descritos para (43), indicaron que los dos productos eran diferentes, por lo tanto se propone que el alcaloide aislado en este estudio corresponde a la estructura (A). El análisis comparativo de las constantes físicas y espectroscópicas del producto (48) con el de una serie de aporfina semejantes permitieron concluir que la estructura del mismo corresponde a la fanostenina (48) (estructura A) previamente aislada de varias especies de la familia Menispermaceae. (Guinaudeau *Et al*, 1975).

#### Identificación de β-D-glucositosterol.

Este compuesto fué aislado como un sólido blanco amorfo, con un punto de fusión de 274-276°C, la comparación directa de este compuesto con una muestra auténtica, permitió identificarlo como el β-D-glucositosterol.

#### Ensayo biológico.

El extracto metanólico de *Annona glabra* L. y las fracciones del Esquema 2.1 no demostraron toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* L. (LC50 > 1000 ppm) igualmente el alcaloide (48) fue inactivo en el mismo ensayo.

### CONCLUSIONES.

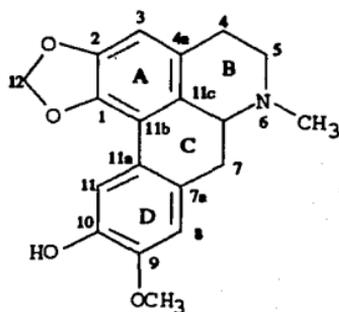
1) El estudio químico preliminar de las hojas de *Annona glabra* L. permitió el aislamiento y caracterización de la fanostenina (48) y del  $\beta$ -D-glucositosterol. Ambos productos resultaron inactivos en la prueba de toxicidad para *Artemia salina* L.

2) Aunque se detectaron otras sustancias de naturaleza alcaloidea, solo fue posible aislar en forma pura el producto (48).

3) En el presente estudio no se encontraron ninguno de los metabolitos previamente aislados, lo cual puede ser debido a variaciones ontogénicas.

## RESULTADOS

Cuadro 2.3 Constantes físicas y espectroscópicas de (48).



### RMN<sup>1</sup>H

$\delta$	m	J(Hz)	H
2.57	s	-	H-13
3.92	s	-	O-CH <sub>3</sub>
5.93	d	2.1	H-12
6.09	d	2.1	H-12'
6.52	s	-	H-3
6.81	s	-	H-8

Cuadro 2.3 Constantes físicas y espectroscópicas de **(48)**. (continuación)RMN<sup>13</sup>C

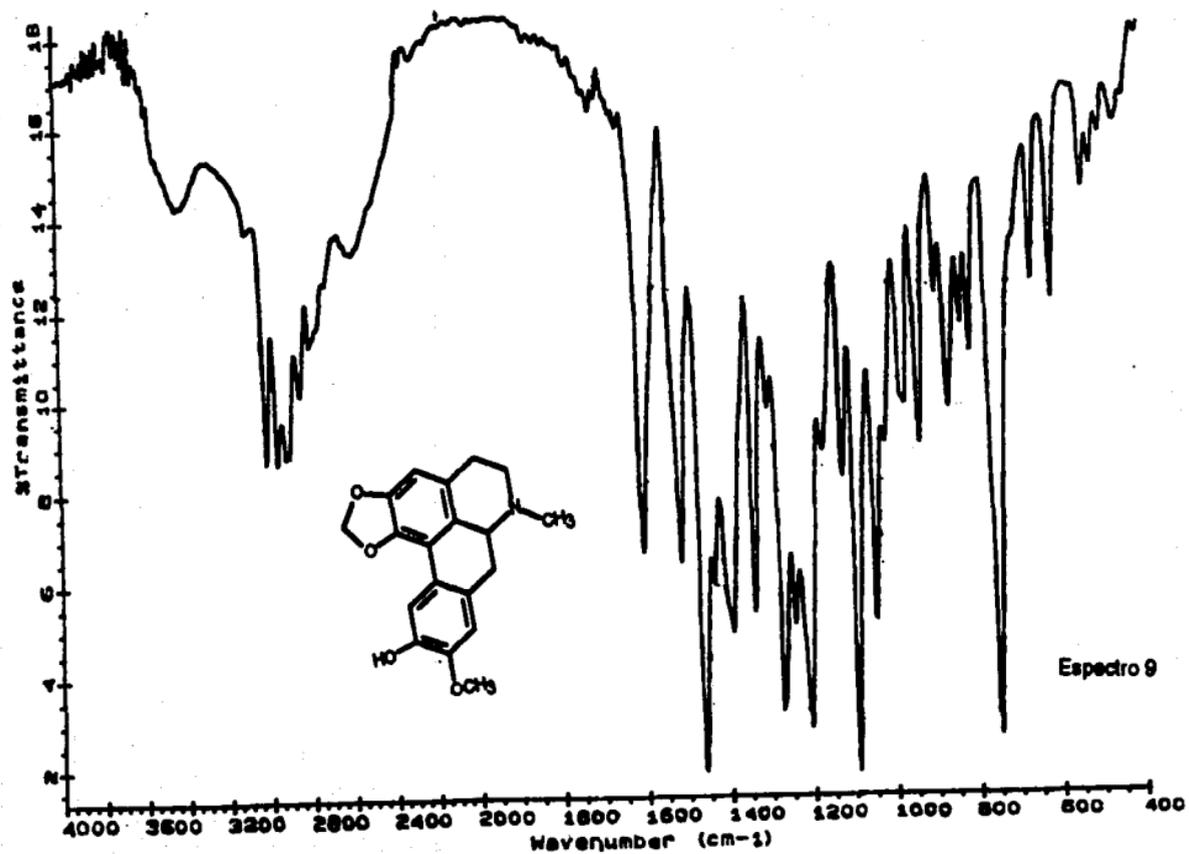
$\delta$	C	$\delta$	C
146.67	C-2	109.89	C-8
145.45	C-10	106.65	C-3
145.12	C-9	100.61	C-12
141.5	C-1	62.26	C-6a
128.87	C-4a	56.16	C-10a
126.43	C-7a	53.45	C-5
125.74	C-11b	43.54	C-13
122.84	C-11c	33.70	C-7
116.76	C-11a	28.86	C-4
114.36	C-11		

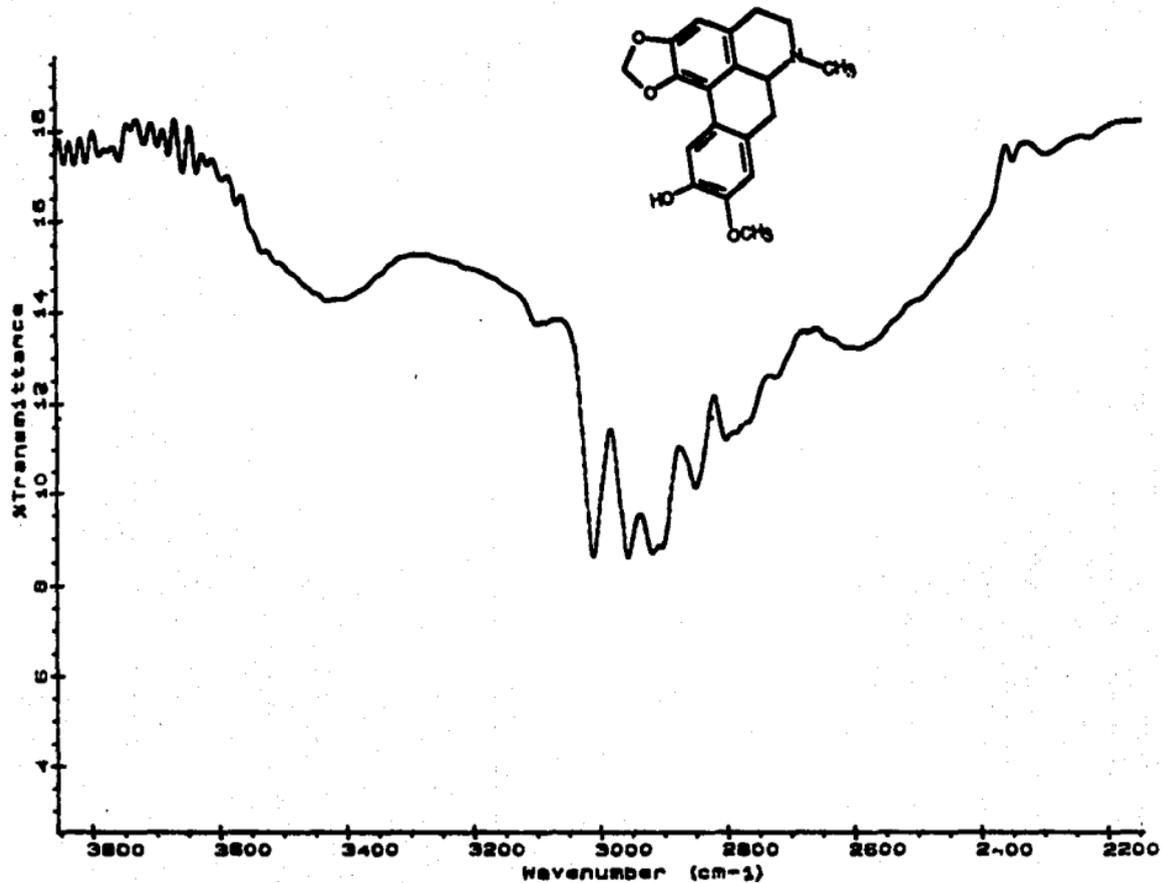
$[\alpha]_D^{20} = -21$  (1mg/ml, CHCl<sub>3</sub>).

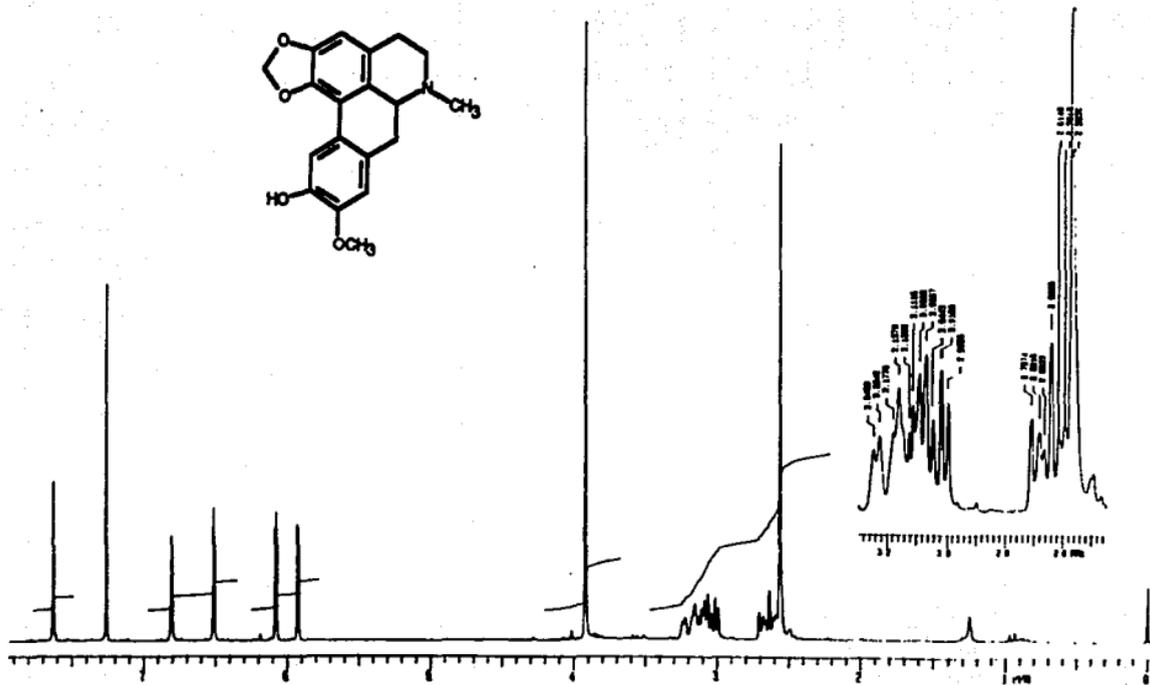
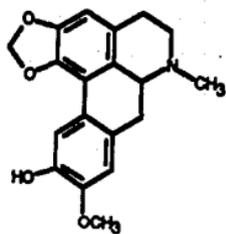
P.F. = 79-82°C

IR (cm<sup>-1</sup>) 3011.2, 1606.6, 1516.8, 1174.8, 1125.4, y 1047.6

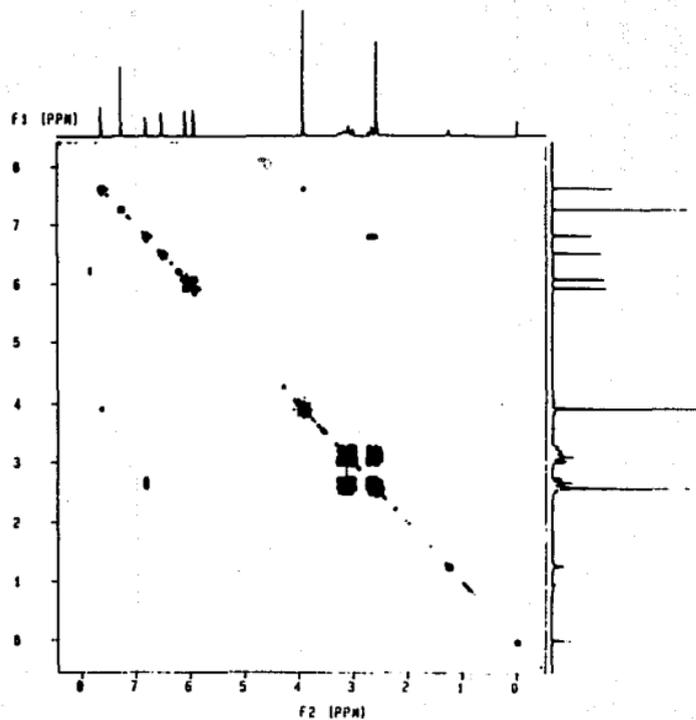
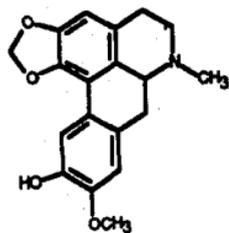
EMIE m/z (Int. rel.) 325 (11), 324 (M-1, 100), 310 (M-15, 13), 308 (M-17, 6), 292 (14), 282 (M-43, 27), 251 (M-71, 6), 44 (40).



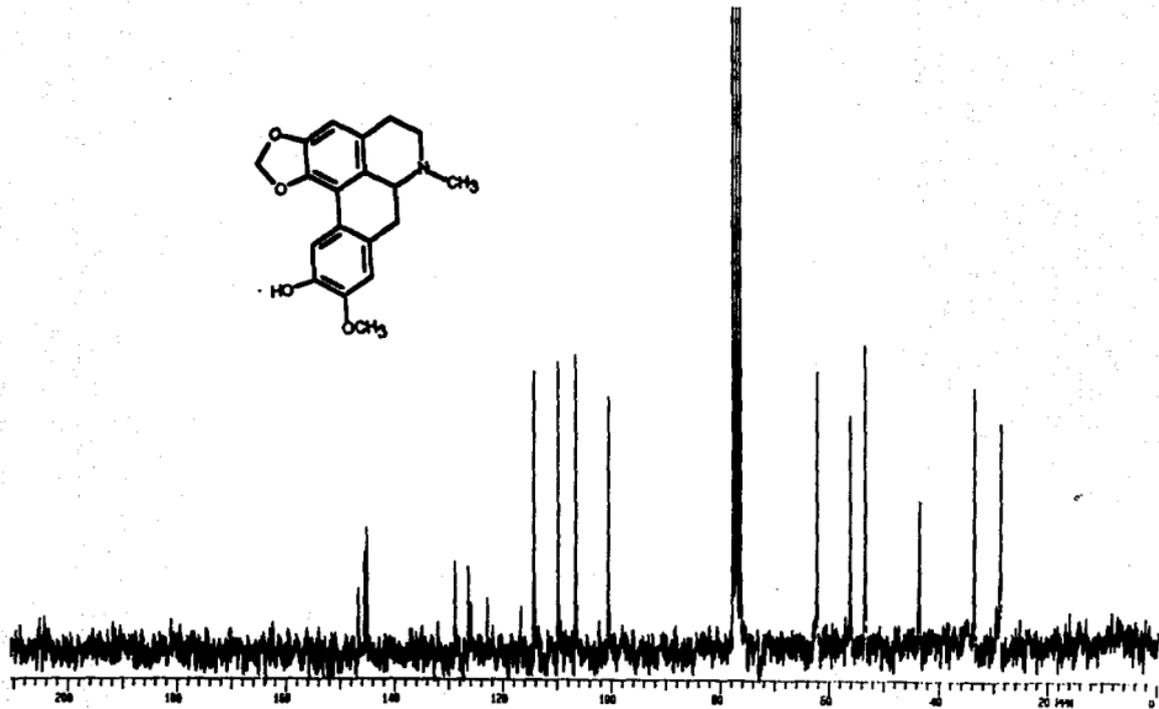
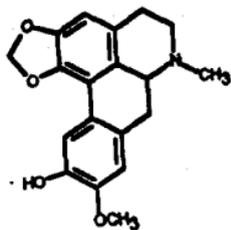




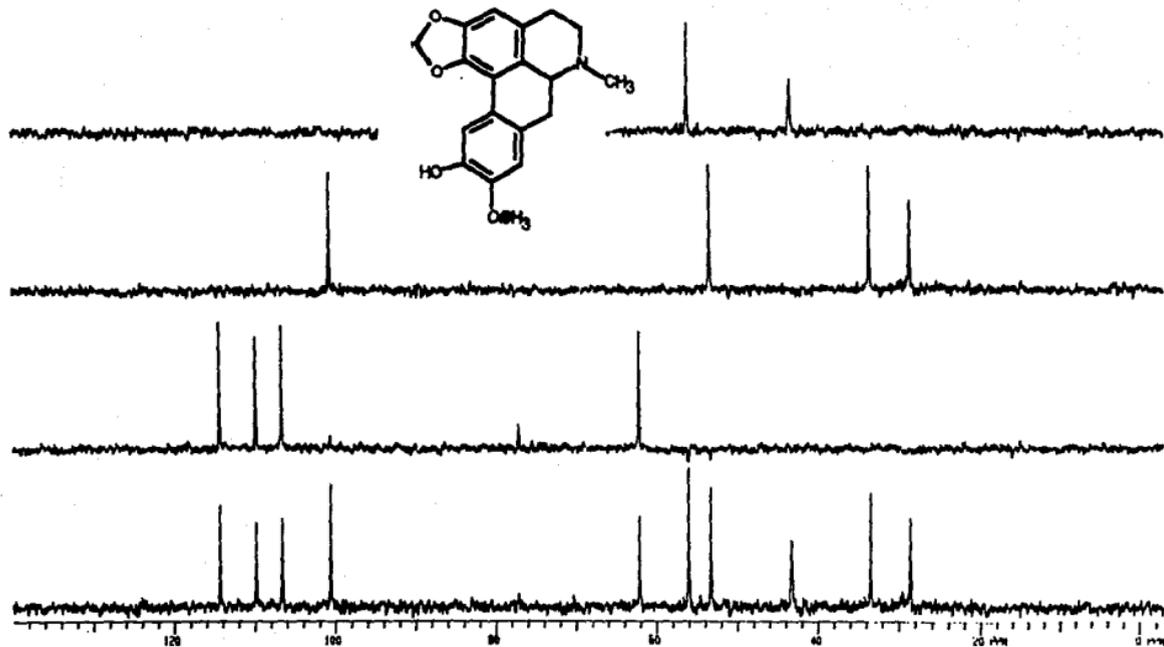
Espectro 10 .



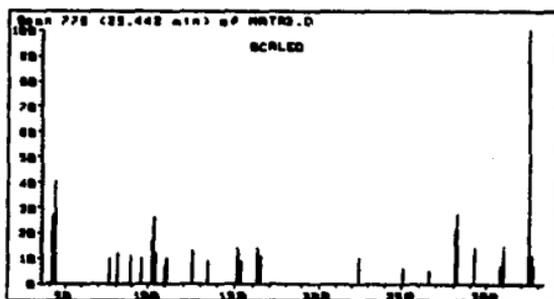
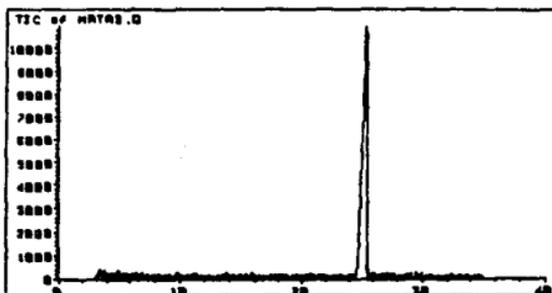
Espectro 11



Espectro 12



Espetro 13



Scan 779 (25.442 min) of MATA3.0 EG-I-45 B Dis. CHCl<sub>3</sub>

m/z	abund	m/z	abund	m/z	abund	m/z	abund
42.06	27	108.75	7	164.70	11	282.80	14
43.96	40	110.15	10	224.00	10	307.65	7
75.96	10	125.15	13	250.80	6	307.90	7
81.20	12	134.25	9	265.20	5	308.50	6
89.25	11	151.70	14	281.05	21	310.00	13
98.16	10	152.30	8	281.45	20	324.00	100
102.16	17	152.70	9	281.70	19	325.00	11
103.25	26	162.55	14	282.20	27	326.50	7
104.25	12						

Espectro 14.

**BIBLIOGRAFIA**

Bahena, A.; Estudio fitoquímico de la corteza y semillas de *Celaenodendron maxicanum* Standl. (Euphorbiaceae). Tesis UNAM, (1992).

Blunt, J.W.; Murray, H.G.; Swallow, H.M.; Swallow, H.W.; *Aust. J. Chem.*; **32**, 1339, (1979).

Broadbent, A. T. and Paul, G. E.; *Heterocycles*, **20**, 5, (1983).

Castañeda, P.; Aislamiento de un nuevo ent-labdano de la *Dodonaea viscosa* (L) Jacq (Spindaceae). Estudio químico y biológico de *Celanodendron maxicanum* Standl (Euphorbiaceae), Tesis UNAM, (1991).

Castañeda, P.; Garcia, M.R.; Hernandez, B.E.; Torres, B.A.; Anaya, A.L.; Mata, R.; *J. of Chemical Ecology*, **18** 1025, (1992).

Corbella, A.; Jommi, G.; Rindone, B.; Scolastico, C., *Tetrahedron*, **25** 4835, (1969).

Corbella, A., Gariboldi, G. Jommi; and Sisti, M., *Chem. Commun*, 288, (1975).

Dahamán, J.; Kurt, L., *Phytochemistry*, **17**, 1949, (1978).

Gawwell, L.; Leander, K., *Phytochemistry*, **15**, 1991, (1976).

Gellert, E.; Rudzats, R., *Aust. J. Chem.*, **25**, 2477, (1972).

Granelli, I.; and Leander, K., *Acta Chem Scand*, **24**, 1108, (1970).

Granelli, I.; Leander, K.; Luning, B., *Acta. Chem. Scand*, **24**, 1209, (1970).

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., *Journal of Natural Products*, **41**, 4, 325, (1979).

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., *J. Nat. Prod.*, **46**, 6, 761-835, (1983).

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A., *J. Nat. Prod.*, **51**, 3, 389, (1988).

Herbert, B.R., *Biosynthesis of Secondary Metabolites*; 2ª edición, Ed. Chapman and Hall; p.p 79-84 New York (1989).

Hui, H.Y.; Ruprecht, J.K.; Liu, Y.M.; Anderson, J.E.; Smith, D.C.; Chang, C.J.; McLaughlin, J.L., *Journal of Natural Products*, **52**, 463-, (1989).

Inubushi, Y.; Tsuda, Y.; Katarao, E., *Chem-Pharm. Bull*, **14**, 688, (1966).

Jommi, G., *Corsi. Semin. Chim*, **11**, 44, (1968).

Jommi, G.; Manitto, P.; Pelizzoni, F.; Scolastico, C., *Chim. Ind*, **46**, 549, (1964).

Jommi, G.; Manitto, P.; Scolastico, C.; *Chim Ind*, **47**, 407, (1965).

Jommi, G.; Pelizzoni, F.; Scolastico, C., *Chim. Ind*, **47**, 865, (1965).

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

Kinoshita, K.; *J.Chem. Soc.*, 51, 99, (1930).

Kuwano, E.; Oshima, K.; Eto, M., *Agric. Biol. Chem*, 44 (2), 383, (1980).

Leboeuf, M.; Cave, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R., *Phytochemistry* 21 2783, (1982).

Martinez, M.; *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.* (1989).

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

Ohmoto, T.; Koike, K.; Fukuda, H.; Mitsunaga, K.; Kagei, K.; Kawai, T.; Sato, T., *Chem Pharm. Bull.*, 37 (7) 1805-07 (1989).

Okamoto, T.; Natsuma, M.; Onaka, T.; Uchimaru, F.; Shimizu, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 14, 672, (1966).

Okamoto, T.; Natsuma, M.; Onaka, T.; Uchimaru, F.; Shimizu, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 14, 676, (1966).

Okuda, T.; Yoshida, T., *Tetrahedron. Letters.*, 25, 694, (1964).

Okuda, T.; Yoshida, T., *Tetrahedron Letters*, **26**, 2137, (1965).

Okuda, T.; Yoshida, T., *Tetrahedron Letters*, **47**, 4449, (1971).

Porter, L. A., *Chem. Rev.*, **67**, 441, (1967).

Shamma, M. The Isoquinoline Alkaloids. (Chemistry and pharmacology). Vol 25,  
Ed. Academic Press. N.Y. (1972).

Sthal, E., Thin Layer Chromatography. Academic Press, New York, pp 487,  
(1969).

Takeuchi, A., Takeuchi, N., *J. Physiology.*, **205**, 377, (1969).

Toku, M. K., Ban, M., Olsen, R. W., *Mol. Pharmacol.*, **14**, 391, (1978).

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

Xin-Ping, F., Rieser, M. J., Zhe-Ming, G., Geng-Xian, Z., McLaughlin, J. L.;  
*Phytochemical analysis.*, **4**, 27, (1993).

Yamamura, S., Hirata, Y. *Tetrahedron. Letters.*, **79**, (1964).

Zhang, M., Ying, B. P., Kubo, I., *J. Nat. Prod.*, **55**, 1057, (1992).