

00570

1  
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"DOS NUEVOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE  
Celaenodendron mexicanum STANDL.  
(Euphorbiaceae)"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA FARMACEUTICA)  
P R E S E N T A :  
Q. F. B. DANIEL CHAVEZ VELASCO



MEXICO, D. F.

**TRABAJOS CON  
VALIA DE ORIGEN**

1994



## **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.

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** Dr. Leovigildo Quijano.  
**1er VOCAL:** Dr. Eugene A. Bratoeff.  
**SECRETARIO:** Dr. Rafael Castillo.  
**1er SUPLENTE:** M. en C. Isabel Aguilar.  
**2o SUPLENTE:** Dr. Rogelio Pereda.

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

LABORATORIO DE FITOQUIMICA (LAB. 124), DEPARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

**SUSTENTANTE:** Q. F. B. Daniel Chávez Velasco.

**ASESOR:** Dra. Rachel Mata Essayag.

# INDICE.

Resumen. ....	iv
Abstract. ....	v
Lista de Abreviaturas. ....	vi
Lista de Cuadros. ....	vii
Lista de Espectros. ....	viii
Lista de Esquemas. ....	ix
Lista de Figuras. ....	x
Agradecimientos. ....	xi
Dedicatorias. ....	xiii
<b>I INTRODUCCION. ....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes sobre <i>Celaenodendron mexicanum</i> Standl. ....	1
1.2 Generalidades sobre picrotoxanos del tipo de la pretoxina. ....	8
<b>II OBJETIVOS. ....</b>	<b>15</b>
<b>III PARTE EXPERIMENTAL. ....</b>	<b>18</b>
3.1 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS. ....	18
3.1.1. Materiales y métodos. ....	18
3.1.1.1 Material vegetal. ....	18
3.1.1.2 Extracción y fraccionamiento. ....	18
3.1.1.3 Análisis cromatográficos. ....	20
3.1.2 Aislamiento de los compuestos del extracto metanólico de las semillas de <i>C. mexicanum</i> . ....	21

3.1.2.1 Aislamiento de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	21
3.1.2.2 Aislamiento del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	21
3.1.2.3 Aislamiento del b-D-glucositolsterol ( <b>30</b> ). .....	21
3.1.3 Caracterización de los compuestos aislados. ....	21
3.1.3.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas. ....	21
3.1.3.2 Obtención del derivado acetilado del compuesto <b>28</b> . ....	22
3.2 ESTUDIO QUIMICO DE LA CORTEZA. ....	22
3.2.1 Materiales y métodos. ....	22
3.2.1.1 Material vegetal. ....	22
3.2.1.2 Extracción y fraccionamiento. ....	23
3.2.1.3 Análisis cromatográficos. ....	23
3.2.2 Estudio químico de las fracciones XI, XV y XXI del extracto clorofórmico de la corteza. ....	23
3.2.2.1 Aislamiento de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). ....	23
3.1.2 Aislamiento del eter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O-b-D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). ....	23
3.2.2.3 Aislamiento del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). ....	24
3.2.3 Caracterización de los compuestos aislados. ....	24
3.2.3.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas. ....	24
3.2.3.2 Obtención del derivado acetilado del compuesto <b>31</b> . ....	24
3.2.3.3 Hidrólisis ácida del compuesto <b>31</b> . ....	24
3.2.3.4 Hidrólisis enzimática del compuesto <b>31</b> . ....	25
3.2.3.5 Prueba de Molish. ....	25

<b>3.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS</b> .....	<b>26</b>
3.3.1 Determinación de la actividad antimicrobiana. ....	26
3.3.1.1 Microorganismos de prueba. ....	26
3.3.1.2 Preparación de los inóculos. ....	26
3.3.1.3 Preparación de las muestras. ....	27
3.3.1.4 Procedimiento del ensayo. ....	27
3.3.2 Determinación de la actividad alelopática. ....	27
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
4.1 Estudio químico de las semillas de <i>C. mexicanum</i> . ....	28
4.2 Caracterización de compuestos del extracto clorofórmico de la corteza. ....	64
<b>V RESUMEN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>77</b>
<b>VI BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>80</b>

## RESUMEN.

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional mexicana, se realizó la investigación química y la evaluación del potencial antimicrobiano y alelopático de las semillas y corteza de *Celaenodendron mexicanum* Standl.

El estudio del contenido metabólico de las semillas permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios: un derivado de la prolina [ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico], el  $\beta$ -D-glucositosterol, y un nuevo picrotoxano, el cual fué nombrado como la celaenodendrólida I.

Del extracto clorofórmico de la corteza, se aisló y caracterizó un derivado novedoso del ácido elágico cuya estructura se estableció como el éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico. También se obtuvieron la celaenodendrólida I y el ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico.

La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos, metanólico de las semillas, clorofórmico de la corteza y cloroformo-metanólico de las partes aéreas, así como la actividad de los compuestos aislados de la corteza y semillas proporcionó resultados negativos en todos los casos. Estos resultados preliminares no permiten establecer conclusiones en relación con el uso medicinal como agente antiséptico de esta especie.

Los extractos, metanólico de semillas y clorofórmico de la corteza, así como los metabolitos secundarios aislados, no presentaron ningún efecto significativo sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*.

## ABSTRACT.

As a part of an ongoing systematic study on Mexican plants used in traditional medicine, the seeds and the stem bark of *Celaenodendron mexicanum* Standl. were chemically and biologically investigated.

Phytochemical investigation of the methanolic extract of the seeds resulted in the isolation and characterization of three secondary metabolites: (-)-(2S, 4R)-1-methyl-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid,  $\beta$ -D-glucositolsterol and a novel picrotoxane. The new picrotoxane was named celaenodendrolide I.

On the other hand, from the chloroformic extract of stem bark a novel ellagic acid derivative (ellagic acid 4-O- $\beta$ -D-xylopyranoside-3,3'-dimethylether), celaenodendrolide I and (-)-(2S, 4R)-1-methyl-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid were isolated.

The structures of the isolated compounds were elucidated by chemical and spectroscopic evidence.

None of the extracts and isolated compounds from *Celaenodendron mexicanum* Standl. demonstrated significant allelopathic or antimicrobial activities.



## LISTA DE ABREVIATURAS.

ml	Mililitros.	CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo.
mm	Milímetros.	MeOH	Metanol.
g	Gramos.	KBr	Bromuro de Potasio.
mg	Miligramos.	NaCl	Cloruro de Sodio.
ccf	Cromatografía en capa fina.	GABA	Acido $\gamma$ -amino butírico.
p. f.	Punto de fusión.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico.
°C	Grados centígrados.	CL <sub>50</sub>	Concentración letal media.
ir	Infrarrojo.	cel/ml	Células por mililitro.
uv	Ultravioleta.	ppm	Partes por millón.
s	Singulete.	d	Doblete.
sa	Singulete ancho.	m	Multiplete.
$\delta$	Desplazamiento químico.	TMS	Tetrametilsilano.
Py-d <sub>5</sub>	Piridina pentadeuterada.	CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado.
dd	Doblete de dobletes.		
ddd	Doblete de dobletes de dobletes.		
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado.		
rmn <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13.		
rmn <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica.		
nOe	Efecto nuclear de Overhauser.		
NOESY	Espectroscopía bidimensional del efecto nuclear de Overhauser.		
COSY	Espectroscopía bidimensional homonuclear.		
HETCOR	Espectroscopía bidimensional heteronuclear.		

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.	Efecto del lixiviado acuoso y del extracto cloroformo-metanólico de las hojas y ramas de <i>C. mexicanum</i> Standl. sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus</i> y <i>Echinochloa</i> .	4
Cuadro 2.	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto cloroformico de la corteza <i>C. mexicanum</i> Standl. (Bahena, 1992).	7
Cuadro 3.	Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto metanólico de las semillas de <i>C. mexicanum</i> Standl.	19
Cuadro 4.	Agentes cromógenos utilizados para los análisis en capa fina.	20
Cuadro 5.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto <b>28</b> .	30
Cuadro 6.	Datos espectroscópicos de $\text{rmn } ^1\text{H}$ y $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ de la picodendrina E ( <b>18</b> ) (Koike <i>et al.</i> , 1991b) y de $\text{rmn } ^1\text{H}$ de la pretoxina ( <b>13</b> ) (Corbella <i>et al.</i> , 1969b).	32
Cuadro 7.	Datos espectroscópicos de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ y $\text{rmn } ^1\text{H}$ del compuesto <b>28</b> .	34
Cuadro 8.	Interacciones basadas en el espectro de NOESY del compuesto <b>28</b> .	47
Cuadro 9.	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto <b>29</b> .	49
Cuadro 10.	Análisis comparativo de datos de $\text{rmn } ^1\text{H}$ y $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ de la 4-hidroxi-N-metil prolina (Sciuto <i>et al.</i> , 1983) y del compuesto <b>29</b> .	50
Cuadro 11.	Datos físicos y espectroscópicos del compuesto <b>31</b> .	67
Cuadro 12.	Datos de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ del compuesto <b>31</b> , del eter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil elágico y del eter 3,3'-dimetilico del ácido elágico (Nawwar <i>et al.</i> , 1982).	76
Cuadro 13.	Rendimiento de los metabolitos secundarios aislados de las semillas y la corteza de <i>C. mexicana</i> Standl.	77

## LISTA DE ESPECTROS.

Espectro 1.	Espectro de ir de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	29
Espectro 2.	Espectro de masas de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	31
Espectro 3.	Espectro de ${}^{13}\text{C}$ de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	35
Espectro 4.	Espectro de ${}^{13}\text{C}$ -DEPT de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	36
Espectro 5.	Espectro de ${}^1\text{H}$ de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). .....	37
Espectro 6.	Espectro de ${}^1\text{H}$ -HETCOR de la celaenodendrólida I ( <b>28</b> ). ..	39
Espectro 7.	Espectro de ${}^1\text{H}$ de la celaenodendrólida I acetilada ( <b>28A</b> ). .....	43
Espectro 8.	Espectro de ir del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	52
Espectro 9.	Espectro de masas del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	53
Espectro 10.	Espectro de ${}^1\text{H}$ (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	54
Espectro 11.	Espectro de ${}^1\text{H}$ -COSY (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	55
Espectro 12.	Espectro de ${}^{13}\text{C}$ (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	56
Espectro 13.	Espectro de ${}^{13}\text{C}$ -APT (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	57
Espectro 14.	Espectro de ${}^1\text{H}$ -HETCOR (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	58
Espectro 15.	Espectro de ${}^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	59
Espectro 16.	Espectro de ${}^1\text{H}$ -COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	60

Espectro 17.	Espectro de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ y APT ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	61
Espectro 18	Espectro de $\text{rmn } ^1\text{H}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	62
Espectro 19.	Espectro de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO-d}_6$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). .....	63
Espectro 20.	Espectro de ir del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). .....	65
Espectro 21.	Espectro de uv del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). .....	66
Espectro 22.	Espectro de $\text{rmn } ^1\text{H}$ del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). .....	69
Espectro 23.	Espectro de $\text{rmn } ^1\text{H}$ del derivado acetilado del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31A</b> ). .....	70
Espectro 24.	Espectro de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). .....	71
Espectro 25.	Espectro de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ -DEPT del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). .....	72

## LISTA DE ESQUEMAS.

Esquema 1.	Preparación del extracto clorofórmico de la corteza de <i>C. mexicanum</i> Standl. (Bahena, 1992). .....	6
Esquema 2.	Preparación del extracto metanólico de las semillas de <i>C. mexicanum</i> Standl. ....	18

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.	Metabolitos aislados de las partes aéreas de <i>C. mexicanum</i> Standl. ....	2
Figura 2.	Metabolitos aislados de la corteza de <i>C. mexicanum</i> Standl. ...	3
Figura 3.	Efecto sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus</i> y <i>Echinochloa</i> de los compuestos aislados de las partes aéreas de <i>C. mexicanum</i> Standl. (Castañeda <i>et al.</i> , 1992). ....	5
Figura 4.	Esqueleto base de los picrotoxanos. ....	8
Figura 5.	Tipos estructurales de los picrotoxanos. ....	8
Figura 6.	Picrotoxanos del tipo de la pretoxina ( <b>13</b> ). ....	10
Figura 7.	Biosíntesis del núcleo picrotoxano. ....	12
Figura 8.	Estructuras parciales derivadas del análisis del espectro COSY. ....	40
Figura 9.	Correlación homonuclear de la celaenodendrolida I ( <b>28</b> ). ....	41
Figura 10.	Estructura del núcleo picrotoxano derivada del análisis del espectro COSY. ....	44
Figura 11.	Espectro de $\text{rmn } ^1\text{H-NOESY}$ de la celaenodendrolida I ( <b>28</b> ). ...	46
Figura 12.	Estructura de la celaenodendrolida I ( <b>28</b> ). ....	47
Figura 13.	Vista estereoscópica generada por rayos X del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> ). ....	51
Figura 14.	Estructura del ácido elágico. ....	73
Figura 15.	Posibles estructuras para el compuesto <b>31</b> . ....	74
Figura 16.	Espectro de $\text{rmn } ^1\text{H-NOESY}$ del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> ). ....	75

## AGRADECIMIENTOS.

- A la B. Nora Martijena del Instituto de Biología de Jalisco, por proporcionar e identificar el material vegetal usado en este estudio.
- A la M. en C. Lourdes Hernández por su colaboración en la realización de las evaluaciones antimicrobianas.
- A la Dra. Ana Luisa Anaya y a la Q. B. Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular por el apoyo brindado para la evaluación como agentes alelopáticos de los extractos y los compuestos aislados en este trabajo.
- Al M. en C. Atilano Gutiérrez del Instituto de Química por el registro de los espectros de rnm.
- A la Q. F. B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutierrez por la medida de los espectros de ir, uv y rotación óptica; A la Q. Georgina Duarte por la obtención de los espectros de masas (Facultad de Química). Al I. Q. Luis Velasco del Instituto de Química por el registro de los espectros de masas.
- A la M. en C. Perla Castañeda, a la Q. F. B. Alma Bahena y al Q. F. B. Eric García por su colaboración en la realización del trabajo experimental correspondiente al estudio químico de la corteza.
- A todos los miembros del jurado por sus valiosas observaciones y comentarios.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante el, "Programa de Fortalecimiento del Posgrado Nacional" (Convenio PFPN/112/92).
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (UNAM) (Proyecto DGAPA IN202493).
- A la Coordinación General de Estudios de Posgrado (UNAM) a través de su programa de apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (Proyecto PADEP No. FQ9204).
- A los prestadores de servicio social del laboratorio 124.
- A mis amigos del laboratorio 124.

## DEDICATORIAS.

- A mis Padres:

José Chávez V.

Reyna Velasco de C.

Por el apoyo que siempre me brindaron.

A mis hermanos:

Jaime,

Sara,

Gerardo,

Arturo.

Porque siempre confiaron y creyeron en mí.

A mi sobrino:

Jaime Dean.

Deseando ser un ejemplo para él.

A María Sánchez.

Por su gran amor, comprensión,  
por estar a mi lado aún en los  
momentos más difíciles y por  
darme la oportunidad de amar.



- **A mis amigos :**

César Flores,	Gregoria Flores,	Juan Manuel Portillo,
Luis Santos,	María Elena Palomino,	Mario Martínez,
Sandra Mendoza,	Silvia Montiel y	Elías Vásquez.

- **Por los consejos, confianza y ayuda que me brindaron, dedico esta tesis a las familias:**

Santos López.

Palomino del Valle.

**A la Dra. Rachel Mata.**

**Mi gratitud, por su inapreciable contribución para mi formación.**

# I INTRODUCCION.

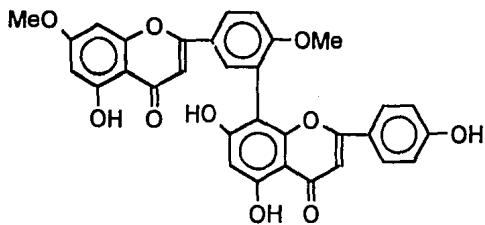
## 1.1 Antecedentes sobre *Celaenodendron mexicanum* Standl.

*Celaenodendron mexicanum* Standl [familia Euphorbiaceae; tribu Hyaenancheae] es un árbol endémico de México y su distribución se limita a los estados de Jalisco y Sinaloa (Martínez, 1987). Popularmente, esta planta se conoce con el nombre de "palo prieto" (Jury, 1987) y sus partes aéreas se emplean en la medicina popular por sus propiedades antisépticas. Además la madera se utiliza en la construcción de casas ya que es altamente resistente al ataque de insectos y de microorganismos.

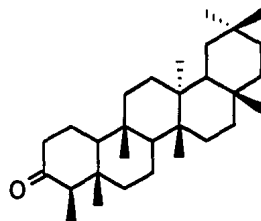
*C. mexicanum* tiene la característica de crecer en selvas caducifolias de la costa del Pacífico y mantener las hojas durante el otoño, forma bosques densos bajo los cuales no crece ningún tipo de vegetación. Esta última observación sugiere que la especie contiene metabolitos secundarios de importancia ecológica (Castañeda, 1991). Por último, el género *Celaenodendron* tiene la particularidad de ser monotípico.

El primer trabajo químico realizado sobre la especie fué un estudio químico convencional de las partes aéreas. Esta investigación condujo al aislamiento de tres biflavonas: la ginkgetina (1), la bilobetina (2) y la amentoflavona (3); tres triterpenoides: la friedelina (4), la maytensifolina B (5) y el 3- $\beta$ -hidroxi-16-oxo D:A friedelano (6); y el  $\beta$ -sitosterol (7), (Castañeda *et al.*, 1992). Las estructuras de los metabolitos secundarios aislados en esta investigación de las partes aéreas se muestran en la Figura 1.

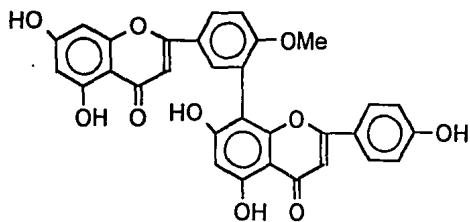
Posteriormente, una segunda investigación química de algunas de las fracciones cromatográficas de un extracto clorofórmico de la corteza de la especie (Bahena, 1992; García, 1993), permitió el aislamiento y caracterización



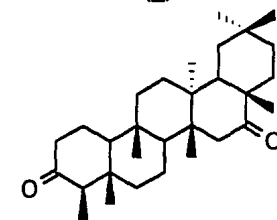
Ginkgetina (1)



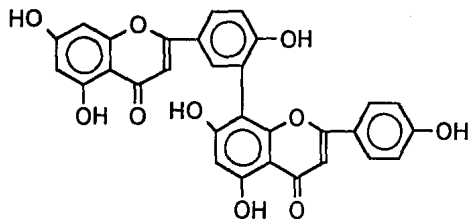
Friedelina (4)



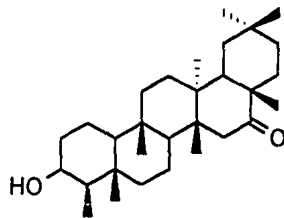
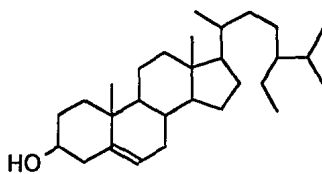
Bilobetina (2)



Maytensifolina B (5)



Ametoflavona (3)

3-β-hidroxi-16-oxo-D: A  
friedelano (6)

β-sitosterol (7)

Figura 1. Metabolitos aislados de las partes aereas de *C. mexicanum* Standl.

de dos friedelanos: la friedelina (4) y el friedelan 3- $\beta$ -ol (8); un esteroil: el estigmasterol (9) (Bahena, 1992) y un picrotoxano: la dihidroisohyenanchina (10), (García, 1993). Las estructuras de los metabolitos aislados de la corteza se ilustran en la Figura 2.

Durante la realización de los estudios fitoquímicos iniciales de *C. mexicanum*, se determinó el efecto de los extractos (acuoso y orgánico) de las partes aéreas (Castañeda, 1991) sobre el crecimiento radicular de las plantas arvenses, *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*; el extracto orgánico demostró un efecto inhibitor selectivo sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus* (Cuadro 1). Por otra parte, de los compuestos aislados de las partes aéreas, la friedelina (4) y la maytensifolina B (5) mostraron un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa*, en tanto que las biflavonas presentarón un efecto inhibitor sobre *Amaranthus* (Figura 3).

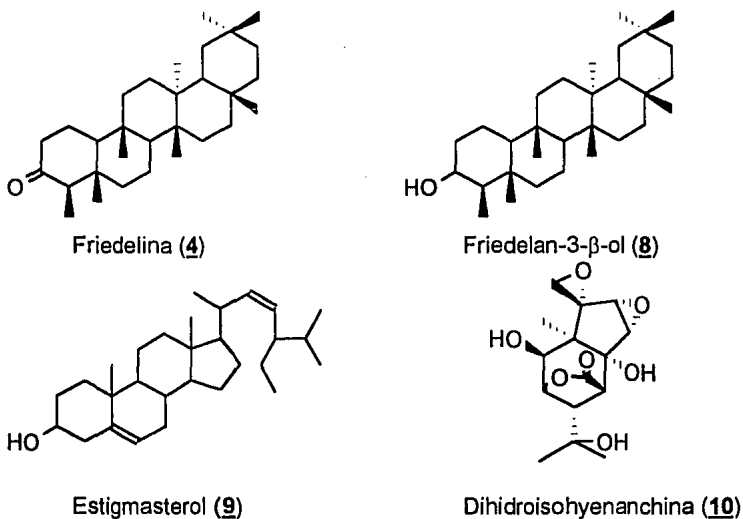


Figura 2. Metabolitos aislados de la corteza de *C. mexicanum* Standl.

También se determinó la actividad potencial antifúngica del extracto y los compuestos aislados en el estudio previo, sobre *Alternaria*, *Fusarium* y *Helminthosporum*, en ningún caso se observó un efecto inhibitor significativo sobre el crecimiento de los hongos objeto de estudio (Castañeda, 1991).

Por último, los extractos de partes aéreas y corteza, así como los compuestos aislados fueron inocuos para *Artemia salina* Leach; en todos los casos la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fué mayor a 1000 ppm. (Castañeda, 1991; Bahena, 1992 y García, 1993).

Tratamiento	<i>Amaranthus</i>		<i>Echinochloa</i>	
	Crecimiento radicular (mm)	% de inhibición (Estimulación)	Crecimiento radicular (mm)	% de inhibición (Estimulación)
Lixiviados acuosos				
Control	9.25 ± 0.65	0	12.45 ± 3.45	0
Hojas secas	11.47 ± 2.24	(24)*	15.42 ± 0.38	(24)*
Hojarasca	9.07 ± 0.04	2.2	13.92 ± 1.35	(8)
Extracto CHCl <sub>3</sub> -MeOH				
Control	16.0 ± 1.46	0	118.55 ± 2.77	0
Hojas secas	8.82 ± 0.1	45*	20.05 ± 3.43	(12.4)*
Ramas	11.27 ± 2.9	30	23.15 ± 2.95	(24.3)*

\* P < 0.05

Cuadro 1. Efectos del lixiviado acuoso y del extracto cloroformo-metanólico de las hojas y ramas de *C. mexicanum* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus* y *Echinochloa* (Castañeda *et al.*, 1992).

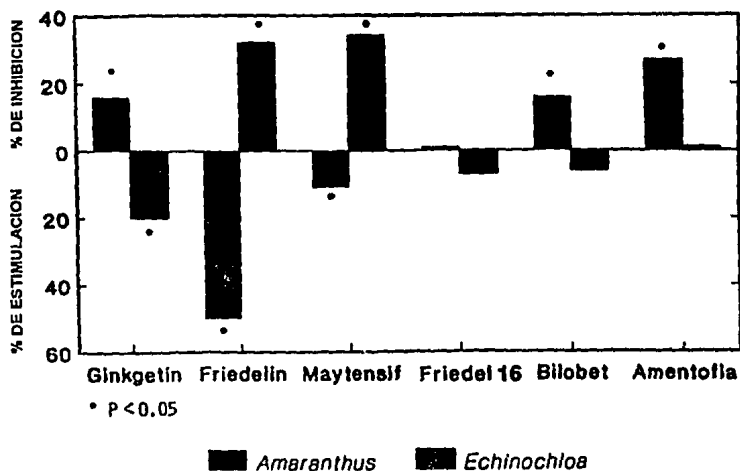
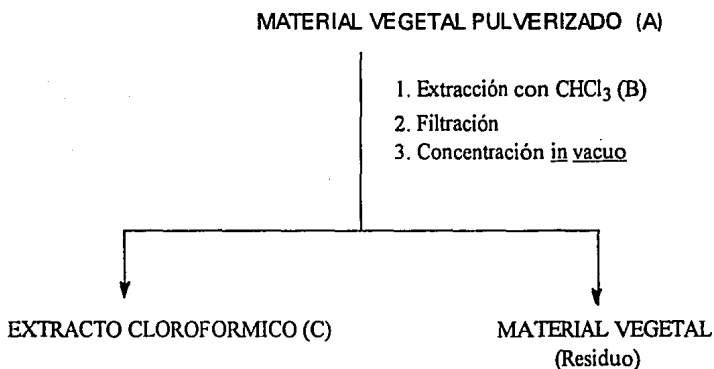


Figura 3. Efecto sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus* y *Echinochloa* de los compuestos aislados de las partes aéreas de *C. mexicanum* (Castañeda *et al.*, 1992).

Para el estudio fitoquímico preliminar de la corteza el material vegetal seco y molido procedente del municipio La Huerta, Jalisco se extrajo de acuerdo al procedimiento que se ilustra en el Esquema 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 mezclas de hexano-cloroformo (1:1 → 0:1) y de cloroformo-metanol (1:0 → 0:1), obteniéndose un total de 369 fracciones de 150 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. El Cuadro 2 resume los sistemas de eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada

uno de ellos y las fracciones combinadas (Bahena, 1992). Los compuestos aislados en el estudio anterior fueron los siguientes: la friedelina (4) y el fridedelan 3- $\beta$ -ol (8) obtenidos de las fracciones 41-57 (Cuadro 2); el estigmasterol (9) (aislado de las fracciones 86-96, Cuadro 2) y por último la dihidroisoihyenanchina (10) que se aisló de las fracciones 142-147 del Cuadro 2.



A) Cantidad de material vegetal (0.857 kg).

B) Extracción vía maceración (seis veces por periodos de 48 horas cada vez, con un volumen aproximado de cuatro litros).

C) Cantidad de extracto clorofórmico 59.3 g.

Esquema 1. Preparación del extracto clorofórmico 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	90:10	228-301	XVII
Cloroformo-metanol	80:20	302-319	XVIII
Cloroformo-metanol	70:30	320-349	XX, XXI
Cloroformo-metanol	60:40	350-356	XXII
Cloroformo-metanol	50:50	357-363	XXIII
Metanol	100	364-369	XXXIV

\*Fracciones investigadas en estudios previos.

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto clorofórmico de *C. mexicanum* (Bahena, 1992).



## 1.2 Generalidades sobre picrotoxanos del tipo de la pretoxina.

Los picrotoxanos constituyen un grupo de sesquiterpenoides que tienen como esqueleto base la estructura ilustrada en la Figura 4.

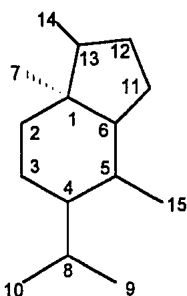


Figura 4. Esqueleto base de los picrotoxanos.

A la fecha se conocen tres tipos estructurales de picrotoxanos: (i) los picrotoxanos simples del tipo de la picrotoxinina (**11**), (ii) los picrotoxanos alcaloideos, del tipo de la dendrobina (**12**) y (iii) los picrotoxanos del tipo de la pretoxina (**13**); (Figura 5). Algunos autores clasifican incorrectamente a este último grupo como sustancias norditerpenoides (Ohmoto *et al.*, 1989), a pesar de que se generan por la adición de un residuo de cuatro átomos de carbono en la posición C-14 del núcleo base.

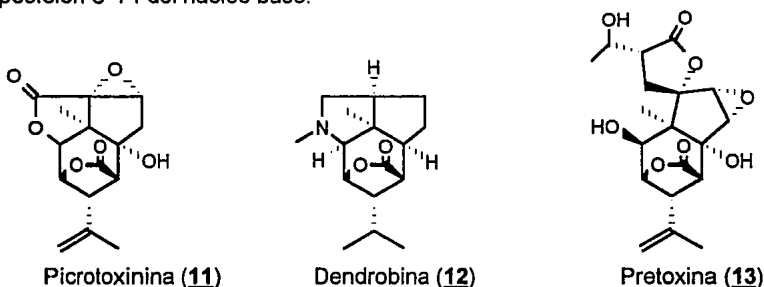


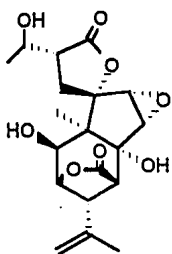
Figura 5. Tipos estructurales de los picrotoxanos.

Su distribución en la naturaleza es bastante restringida encontrándose solamente en algunos géneros de las siguientes familias de plantas: menispermáceas, simarubáceas, orquidáceas y euforbiáceas.

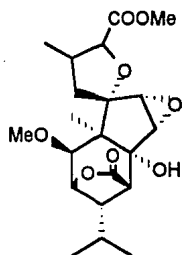
Los picrotoxanos del tipo de la picrotoxinina (**11**) y los alcaloideos (**12**) fueron revisados recientemente por García (1993) y constituyen los más abundantes. Los picrotoxanos del tipo de la pretoxina (**13**) son escasos y a la fecha se han aislado y caracterizado 15 productos de esta naturaleza. En la Figura 6 se muestran las estructuras correspondientes.

Las características estructurales más relevantes de este tipo de picrotoxanos son las siguientes: i) La mayoría posee un residuo de cuatro átomos de carbono (C-16 - C-19) unidos en la posición C-14 del núcleo base, sin embargo **15**, **17** y **21** presentan un residuo de tres átomos de carbono. En la mayoría de los casos dos de los carbonos (C-16 y C-17) de este residuo se encuentran formando un anillo de tipo espiro y de naturaleza  $\gamma$ -lactónico (ver compuestos **13**, **16-19**, **22-27**). Alternativamente, estos dos carbonos pueden formar anillos del tipo furano como en los compuestos **14**, **15**, **20**, y **21** de la Figura 6. Los restantes carbonos del residuo, es decir C-18 y C-19, constituyen una cadena lateral de uno o dos átomos de carbono, generalmente  $\beta$  orientada en C-16, con la excepción del compuesto **13** que la presenta  $\alpha$  orientada. Dicha cadena puede estar insaturada (**16**, **23**, **24** y **27**) o presentar grupos hidroxilos (**13**, **18**, **19**, **22**, **25** y **26**) y carbonilos (**17** y **20**). ii) Al igual que los picrotoxanos simples, estos picrotoxanos presentan un anillo  $\gamma$ -lactónico que incluye a los carbonos C-3, C-4, C-5 y C-15. El residuo isopropilo en C-4 puede estar como isopropileno o isopropanol y algunos tienen hidroxilada la posición C-4. Con la excepción del compuesto **26**, el resto posee un grupo hidroxilo en C-6; y a excepción de **19** el resto tiene una función oxigenada en C-2, que puede ser un hidroxilo o un metoxilo. Por último todos poseen una función epóxido entre C-11 y C-12.

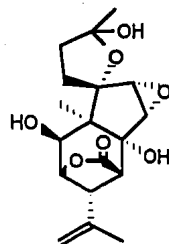
(Porter, 1967; Corbella *et al.*, 1969b; Ohmoto, *et al.*, 1989; Koike *et al.*, 1991a; Koike *et al.*, 1991b y Suzuki *et al.*, 1992).



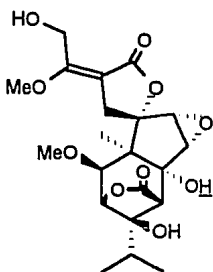
Pretoxina (**13**)



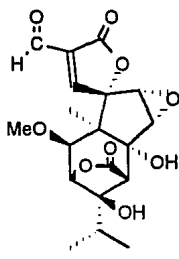
Capenicina (**14**)



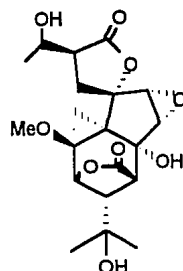
Lambicina (**15**)



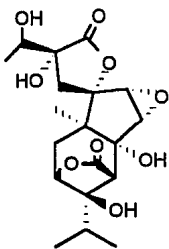
Picondendrina A (**16**)



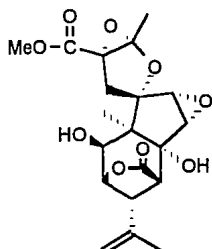
Picondendrina B (**17**)



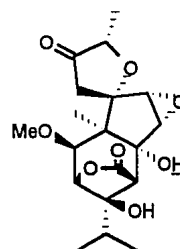
Picondendrina E (**18**)



Picondendrina F (**19**)



Picondendrina G (**20**)



Picondendrina K (**21**)

Figura 6. Picrotoxanos del tipo de la pretoxina.

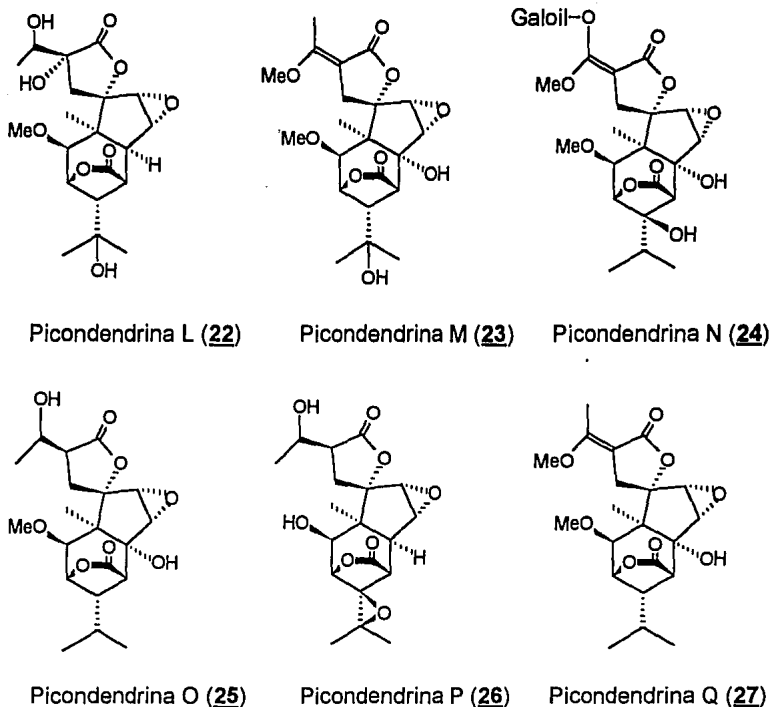


Figura 6. Picrotoxanos del tipo de la pretoxina. (continuación)

Los sesquiterpenoides del tipo picrotoxano se biosintetizan por la ruta del acetato-mevalonato, a partir del 2-trans-farnesol (a), y de acuerdo a la secuencia biogénica de la Figura 7 (Mannito, 1981; Herbert, 1989).

La mayoría de los experimentos sobre la biosíntesis de picrotoxanos se han realizado con la dendrobina (12) (Corbella *et al.*, 1973), la coriamirtina (Biollaz *et al.*, 1969) y la tutina (Corbella *et al.*, 1969a).

En la década de los sesentas para la elucidación estructural de los picrotoxanos se utilizaron complejas degradaciones químicas, mismas que en varias

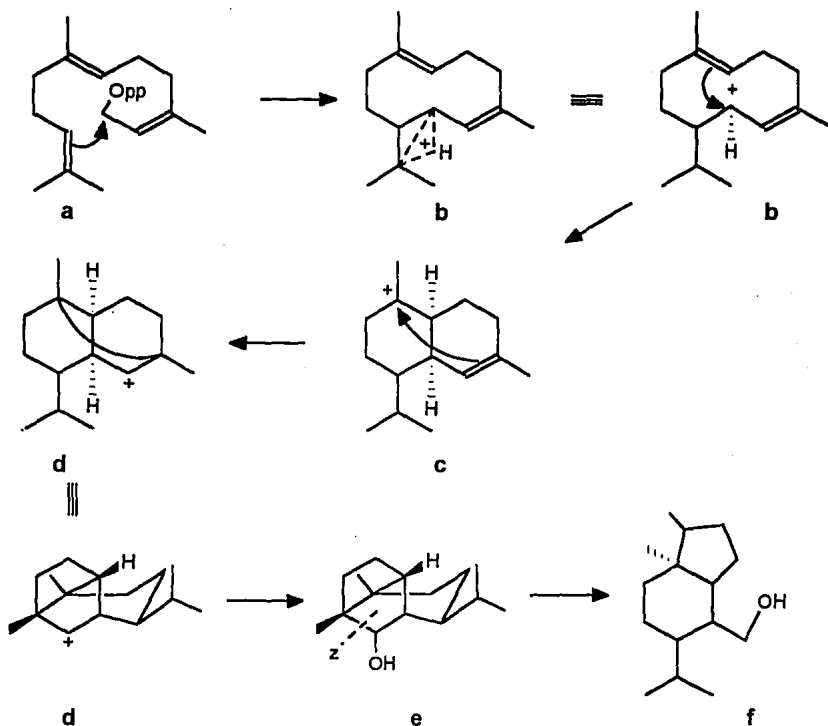


Figura 7. Biosíntesis del núcleo picrotoxano.

ocasiones condujeron a resultados erróneos, como en los casos de la caracterización de la coriamirtina y la tutina (Porter, 1967). También, se realizaron reacciones de transformación para convertir compuestos desconocidos en un picrotoxano conocido, y así correlacionar la estructura (Okuda y Yoshida, 1965; Porter, 1967; Dahmén y Leander, 1978). Recientemente, los métodos espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos han demostrado ser de gran utilidad para la caracterización de estos

compuestos. De manera particular, la resonancia magnética nuclear (rmn) es la técnica más utilizada debido a que los espectros presentan un perfil característico (Blunt *et al.*, 1979), y por lo tanto son de gran utilidad en el proceso de elucidación estructural. Por otra parte, el uso de experimentos en la rmn, tales como: espectroscopía bidimensional homonuclear (COSY), espectroscopía bidimensional a larga distancia  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , efecto nuclear de Overhauser (nOe) y espectroscopía bidimensional del efecto nuclear de Overhauser (NOESY), permiten determinar la estereoquímica relativa de los centros quirales de los picrotoxanos (Koike *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992).

Algunos picrotoxanos como la picrotoxina, la tutina y la hyenanchina son extremadamente tóxicos y son responsables de la muerte del ganado por consumir plantas con este tipo de metabolitos secundarios; sus efectos tóxicos son causados por una estimulación del sistema nervioso central particularmente de los centros respiratorio, vasomotor y cardíaco (Manitto, 1981). La mayoría de los picrotoxanos presentan efectos farmacológicos similares y los más importantes son los siguientes: excitación muscular, incremento de la irritabilidad del centro respiratorio, incremento de la sensibilidad del centro del dolor, convulsionantes, incremento de la actividad visceral, del metabolismo de carbohidratos y de la secreción glandular. También, poseen propiedades analgésicas y antipiréticas (Porter, 1967). Los picrotoxanos se utilizaron como antídoto para los envenenamientos inducidos por hidrato de cloral, como analépticos en casos de intoxicación aguda por barbitúricos y para el tratamiento de la ectoparasitosis (Porter, 1967).

La picrotoxinina presenta propiedades insecticidas (Kuwano *et al.*, 1980) y esta se debe al efecto antagonista de la picrotoxinina sobre el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Takeuchi y Takeuchi, 1969; Ticku *et al.*, 1978). Los picrotoxanos actúan posiblemente por un efecto antagonista en el sitio receptor del

neurotransmisor GABA, (Ozoe y Matsumura, 1986), Los requerimientos estructurales de los picrotoxanos para esta actividad son las siguientes:

- i) Una disposición  $\alpha$  de la cadena isopropílica o isopropenilica en C-4.
- ii) La presencia de la  $\gamma$ -lactona en el ciclohexano.
- iii) Por último, requiere un grupo hidroxilo angular en C-6.

La función lactónica es el requerimiento imprescindible para la actividad, debido a que junto con la cadena isopropílica en C-4 conforman dos centros farmacofóricos en la molécula. Se ha encontrado que una doble ligadura entre C-8 y C-9 potencia el efecto insecticida y que los grupos epóxidos en C-11/C-12 o C-12/C-13 no modifican la actividad insecticida (Kuwano *et al.*, 1980; Ozoe y Matsumura, 1986).

## II OBJETIVOS

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional que tiene por objetivos primordiales el aislamiento de compuestos bioactivos a partir de la flora medicinal mexicana y contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la misma (Rodríguez, 1991; Castañeda, 1991; Bahena, 1992; García, 1993; *inter alia*), el propósito de la presente investigación es complementar el estudio químico de las diferentes partes vegetales de *C. mexicanum*, con la finalidad de investigar la potencialidad biológica de los metabolitos secundarios obtenidos de la planta.

Para ello se realizó la investigación química de las semillas de *Celaenodendron mexicanum* Standl. y se prosiguió con el estudio de tres fracciones cromatográficas derivadas del extracto clorofórmico de la corteza (Bahena, 1992). Los objetivos planteados para implementar el proyecto fueron los siguientes:

- Realizar el estudio químico de las semillas de *C. mexicanum* Standl.
- Complementar el estudio químico del extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum* Standl.
- Determinar el potencial antimicrobiano de los extractos de las hojas, corteza y semillas de *C. mexicanum* Standl.



- Determinar el potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios aislados del extracto metanólico de las semillas y del extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum* Standl.
- Determinar el efecto alelopático del extracto metanólico de las semillas y del extracto clorofórmico de la corteza de *C. mexicanum* Standl. así como de los compuestos aislados.

Para el cumplimiento de los objetivos generales se consideraron pertinentes los siguientes objetivos particulares:

- Establecer mediante ensayos fitoquímicos preliminares el método más adecuado para efectuar la extracción de las semillas.
- Fraccionar el extracto de las semillas mediante métodos cromatográficos.
- Separar y purificar los constituyentes mayoritarios de las fracciones obtenidas en el proceso de fraccionamiento del extracto original de las semillas y de las fracciones restantes del extracto clorofórmico de la corteza.
- Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.

- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos de las diferentes partes vegetales y de los compuestos aislados de las semillas y corteza, utilizando las técnicas cualitativas de difusión en agar. Como organismos de prueba se emplearan dos bacterias Gram (+) (*B. subtilis* y *S. aureus*), dos Gram (-) (*P. aeuroginosa* y *E. coli*) y una levadura (*C. albicans*).
- Determinar el efecto de los extractos de las semillas y la corteza así como los compuestos obtenidos sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*.

## III PARTE EXPERIMENTAL.

### 3.1 ESTUDIO QUIMICO DE LAS SEMILLAS.

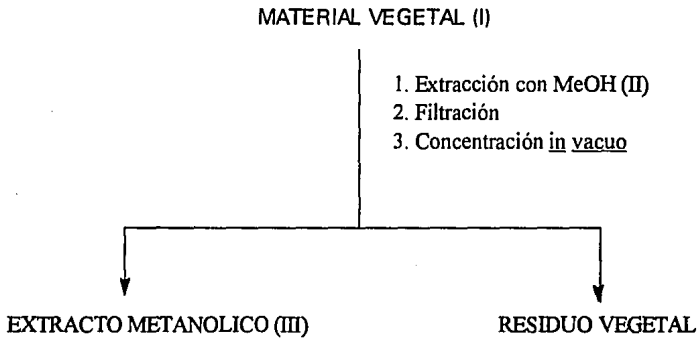
#### 3.1.1 Materiales y métodos.

##### 3.1.1.1 Material vegetal.

El material vegetal (semillas) 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. Las semillas se molieron en mortero de porcelana, hasta reducir las a fragmentos pequeños.

##### 3.1.1.2 Extracción y fraccionamiento.

El material vegetal (195 g) se extrajo con metanol mediante un proceso de maceración de acuerdo al procedimiento señalado en el Esquema 2.



I) Cantidad total del material vegetal 0.195 Kg.

II) Extracción vía maceración (dos veces por periodos de dos días c/u).

III) Cantidad del extracto metanólico 35 g.

Esquema 2. Preparación del extracto metanólico de las semillas de *C. mexicanum* Standl.

El extracto metanólico se fraccionó mediante una cromatografía en columna utilizando como adsorbente gel de sílice (350 g de sílica gel 60 Merck, gránulos 0.2-0.5 mm). El proceso de elución se llevó a cabo con mezclas de hexano-cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones. Se obtuvo un total de 93 fracciones reuniéndose aquellas que fueran cromatográficamente similares. El Cuadro 3 resume el número de eluatos, eluyentes y fracciones combinadas.

ELUYENTE	PROPORCION %	NUMERO DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS
Hexano-cloroformo	50:50	1-10	1-8
Hexano-cloroformo	35:65	11-19	9-19
Hexano-cloroformo	20:80	20-28	20-33
Hexano-cloroformo	10:90	29-40	34-41
Cloroformo	100	41-49	42-52
Cloroformo-metanol	99:1	50-56	53-62
Cloroformo-metanol	98:2	57-70	63-70
Cloroformo-metanol	96:4	71-78	71-73, 75-81
Cloroformo-metanol	94:6	79-85	82-88
Cloroformo-metanol	85:15	86-92	89-92,
Cloroformo-metanol	70:30	93-102	93-94, 95-102

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto metanólico de las semillas de *C. mexicanum* Standl.

### 3.1.1.3 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF-254, Merck), varios eluyentes y los agentes reveladores que se incluyen en el Cuadro 4.

AGENTE REVELADOR	COMPOSICION	REFERENCIA
Sulfato cérico	Sulfato cérico amoniacal ..... 12 g Acido sulfúrico conc. .... 22.5 ml Hielo ..... 350 g	Sthal, 1969
Dragendorff	Carbonato de bismuto ..... 6 g Yoduro de sodio ..... 7 g Acido acético glacial ..... 25 ml	
Anisaldehído	Anisaldehído ..... 0.5 ml Etanol ..... 9 ml Acido sulfúrico conc. .... 0.5 ml Acido acético ..... 1 ml	

Para el desarrollo de color es necesario calentar por dos minutos a 110 °C.

Cuadro 4. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

### 3.1.2 Aislamiento de los compuestos del extracto metanólico de las semillas de *C. mexicanum* Standl.

#### 3.1.2.1 Aislamiento de la celaenodendrólida I (**28**).

De las fracciones 75-81 de la columna original (Cuadro 3) se purificó mediante recristalizaciones sucesivas de metanol, 142 mg de un polvo de color blanco. Este producto presentó un punto de fusión de 254 °C.

#### 3.1.2.2 Aislamiento del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).

La fracción combinada 95-102 (Cuadro 3) se disolvió en metanol y la solución resultante se decoloró con carbón activado. De la solución decolorada, precipitaron 1.27 g de un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 230-232 °C.

#### 3.1.2.3 Aislamiento del $\beta$ -D-glucositosterol (**30**).

La fracción combinada 82-88 de la columna original (Cuadro 3) se disolvió en MeOH. Al cabo de 24 horas, precipitaron 20 mg de un polvo cristalino blanco con un punto de fusión de 274-276 °C, el cual resultó idéntico a una muestra auténtica de  $\beta$ -D-glucositosterol (p.f., ir, ccf).

### 3.1.3 Caracterización de los compuestos aislados.

#### 3.1.3.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

- Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher Johnes, y no están corregidos.

- Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer modelo 599 B, en pastilla de KBr o en película.
- Los espectros de RMN se obtuvieron en el Instituto de Química de la UNAM, en un aparato Varian VXR-3005, utilizando como disolventes: piridina-d<sub>5</sub>, CDCl<sub>3</sub>, dioxano-d<sub>8</sub> y DMSO-d<sub>6</sub>, y como referencia interna TMS.
- Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5995-B.
- Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital Jasco Dip 360.

### 3.1.3.2 Obtención del derivado acetilado del compuesto 28.

Para obtener el derivado acetilado del compuesto 28, 10 mg del mismo se trataron con 0.1 ml de piridina y 0.2 ml de anhídrido acético; la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 72 horas, al cabo de este tiempo la mezcla se procesó de la manera convencional (Shriner, 1980). El producto resultante de esta reacción estaba constituido por una mezcla de productos. La ccf utilizando una mezcla de cloroformo-metanol (95:5) como fase móvil permitió la separación del producto mayoritario 28A. El rendimiento del producto fué de 6 mg y se obtuvo como un sólido vítreo.

## 3.2 ESTUDIO QUIMICO DE LA CORTEZA.

### 3.2.1 Materiales y métodos.

#### 3.2.1.1 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 pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4.

### 3.2.1.2 Extracción y fraccionamiento.

Los procesos de extracción y fraccionamiento preliminares utilizados para el estudio de la corteza se resumen en el Esquema 1 y el Cuadro 2, respectivamente (Bahena, 1992).

### 3.2.1.2 Análisis cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas descritas en la sección 3.1.1.3.

## 3.2.2 Estudio químico de las fracciones XI, XV y XXI del extracto clorofórmico de la corteza.

### 3.2.2.1 Aislamiento de la celaenodendrólida (28).

De la fracción XI de la columna original (Cuadro 2), cristalizaron de metanol 140 mg de un polvo de color blanco con punto de fusión de 254 °C. Este compuesto resultó idéntico en todos sus aspectos (ir, p. f. y  $rmn^1H$ ) a la celaenodendrólida I (28) aislada del extracto metanólico de las semillas (inciso 3.1.2.1).

### 3.2.2.2 Aislamiento del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-Q-β-D-xilopiranosil elágico (31).

De la fracción XV de la columna original (Cuadro 2), precipitó un producto amorfo. Sucesivos lavados de este producto con hexano permitieron la obtención de 250 mg de un polvo color crema con un punto de fusión de 240-242 °C.



### 3.2.2.3 Aislamiento del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).

La fracción XXI (Cuadro 2) se disolvió en metanol y la solución resultante se decoloró con carbón activado. De la solución decolorada precipitaron 1.32 g de un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 230-232 °C que resultó idéntico al ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29) aislado del extracto metanólico de las semillas (inciso 3.1.2.2).

## 3.2.3 Caracterización de los compuestos aislados.

### 3.2.3.1 Determinación de constantes físicas y espectroscópicas.

El registro de las constantes físicas y espectroscópicas se realizó de la misma forma que se especificó en el inciso 3.1.3.1

### 3.2.3.2 Obtención del derivado acetilado del compuesto 31.

Para obtener el derivado acetilado del compuesto 31, 10 mg del mismo se trataron con 0.1 ml de piridina y 0.2 ml de anhídrido acético; la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 48 horas, al cabo de este tiempo la mezcla se procesó de la manera convencional (Shriner, 1980), para obtener el compuesto 31A.

### 3.2.3.3 Hidrólisis ácida del compuesto 31

Cinco mg del compuesto 31 se sometieron a una hidrólisis con 2 ml de HCl 1 N. La mezcla se mantuvo en calentamiento a reflujo durante dos horas. Al cabo de este tiempo, la solución se extrajo dos veces con 5 ml de AcOEt; la fase acuosa remanente se pasó a través de una columna intercambiadora de iones básica (Intercambiador de aniones debilmente alcalino II Merck) con la finalidad de

neutralizar la solución. El eluato resultante se utilizó para la detección cromatográfica de azúcares.

La Xilosa se detectó mediante una cromatografía en capa fina utilizando ocho patrones de azúcares obtenidos comercialmente de la casa Merck; las placas de vidrio cubiertas con gel de sílice fueron previamente rociadas con ácido bórico 0.036 M. Se utilizó como sistema de elución una mezcla de acetona:agua 9:1 (Anaya *et al.*, 1990) y como agente cromógeno el anisaldehído (Cuadro 4).

#### 3.2.3.4 Hidrólisis enzimática del compuesto **31**.

En un tubo de ensayo conteniendo dos mg del compuesto **31** disueltos en dos ml de agua se adicionaron dos mg de celulasa; la mezcla se mantuvo en un baño de agua a 36 °C durante 72 horas y al cabo de este tiempo se extrajo dos veces con 5 ml de AcOEt. La detección del azúcar se realizó en la fase acuosa de la misma forma como se describe en el inciso anterior.

#### 3.2.3.5 Prueba de Molish.

Una pequeña cantidad del compuesto **31** se disolvió en tres ml de agua destilada, se le adicionó un ml del reactivo de  $\alpha$ -naftol (10% en etanol); en seguida se agregó por las paredes del tubo de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos; la coloración fué indicativa de una prueba positiva para la identificación de carbohidratos.

### 3.3 PRUEBAS BIOLÓGICAS.

#### 3.3.1 Determinación de la actividad antimicrobiana.

La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos de las hojas, semillas y corteza así como de los metabolitos aislados de corteza y semillas se realizó utilizando las técnicas cualitativas de difusión en agar (Rojas *et al.*, 1992).

##### 3.3.1.1 Microorganismos de prueba.

MICROORGANISMOS	ATCC No.	CLASIFICACION
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Gram (+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	8739	Gram (-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Gram (-)
<i>Candida albicans</i>	10231	Levadura

##### 3.3.1.2 Preparación de los inóculos.

Las bacterias se incubaron en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37 °C. *Candida albicans* se cultivó en caldo glucosa 2% Saboraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28 °C.

La concentración final de los organismos en cada uno de los cultivos preparados se ajustó mediante una solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta obtener la turbidez equivalente al estándar No. 1 de McFarland (0.1 ml de BaCl<sub>2</sub> 1% y 9.9 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%) correspondiente a un número aproximado de 3 x10<sup>8</sup> cel/ml (Finegold, 1986).

### 3.2.1.3 Preparación de las muestras.

Las muestras a evaluar se suspendieron en una solución acuosa de tween al 10% hasta obtener una concentración de 1000 ppm para los extractos y de 500 ppm para los compuestos puros. Como controles positivos se utilizaron soluciones de sulfato de estreptomicina (1 mg/ml) y de nistatina (3 mg/ml).

### 3.3.1.4 Procedimiento del ensayo.

Un mililitro de la suspensión de microorganismos se sembró en cajas Petri (100 x 15 ml) conteniendo 15 ml de medio agar-tripticasa soya para las bacterias y agar-Sabouraud para *C. albicans*, y se uniformó con un triángulo de vidrio. Con un horador cilíndrico se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 5 mm; posteriormente, se adicionaron 50 y 100  $\mu$ l de la solución muestra y 100  $\mu$ l del control positivo para así ocupar la tres perforaciones. Las cajas Petri se mantuvieron a temperatura ambiente durante dos horas para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido este tiempo se incubaron durante 24 horas a 37 °C las bacterias y por 48 horas a 28 °C para *C. albicans*; para cada muestra de prueba, el ensayo se realizó por triplicado. La actividad antimicrobiana se determinó midiendo el diámetro de inhibición que circunda a cada una de las perforaciones.

### 3.3.2 Determinación de la actividad alelopática.

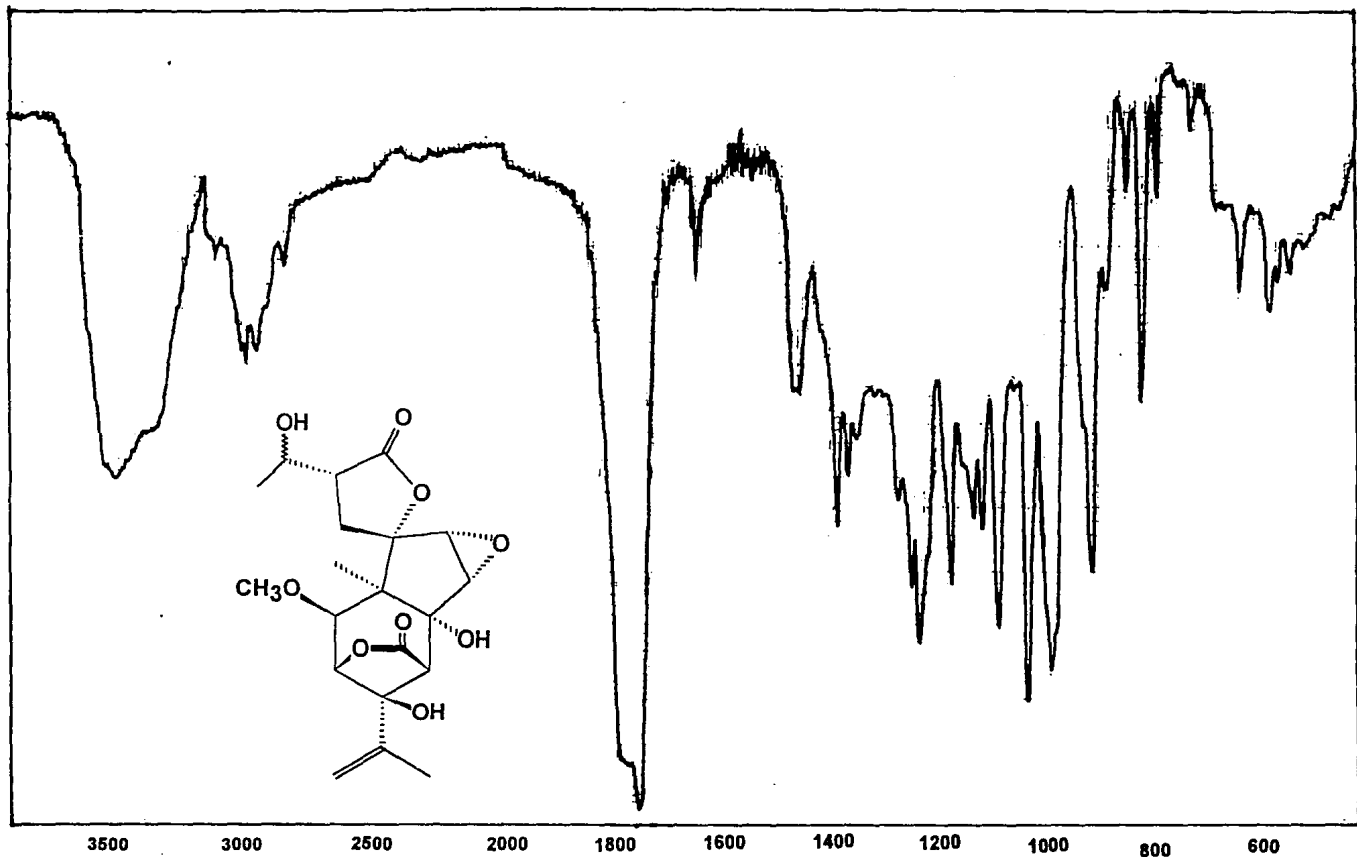
Las evaluaciones alelopáticas fueron realizadas por la Q. B. Blanca Hernández en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, la metodología seguida es la descrita por Anaya y colaboradores (1990). El potencial alelopático de los extractos de semillas y corteza, así como el de los compuestos aislados fué evaluado sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli*.

## IV RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Estudio químico de las semillas de *C. mexicanum*.

El extracto metanólico de las semillas de *Celaenodendron mexicanum* Standl. se fraccionó mediante una cromatografía en columna empacada con gel de sílice. Como resultado de este proceso se obtuvieron 102 fracciones primarias (Cuadro 4). Sucesivas cromatografías de las fracciones primarias 75-81, 82-88 y 95-102 (Cuadro 4) permitieron el aislamiento de tres metabolitos secundarios: un esteroles, un derivado de la prolina y un picrotoxano, representando este último un nuevo producto natural. En general los compuestos fueron caracterizados por métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los dos productos previamente descritos en la literatura fueron identificados como el  $\beta$ -D-glucositosterol (**30**) y el ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**). En el caso del  $\beta$ -D-glucositosterol (**30**), su caracterización se realizó por comparación con una muestra auténtica. Por otra parte, en el caso del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**), la determinación estructural se realizó por comparación directa de sus constantes físicas y espectroscópicas con las previamente descritas en la literatura para la 4-hidroxi-N-metil prolina (Sciuto *et al.*, 1983), por lo que en la presente discusión sólo se describirán sus parámetros espectrométricos y espectroscópicos más característicos. Por último, el establecimiento de la estructura molecular del nuevo picrotoxano, denominado como la celaenodendrólida I (**28**), se describirá con mayor detalle.

La celaenodendrólida I (**28**) se obtuvo como un sólido cristalino de punto de fusión 254 °C, ópticamente activo. Su espectro en el ir (Espectro 1) mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (3500  $\text{cm}^{-1}$ ), carbonilo de lactona

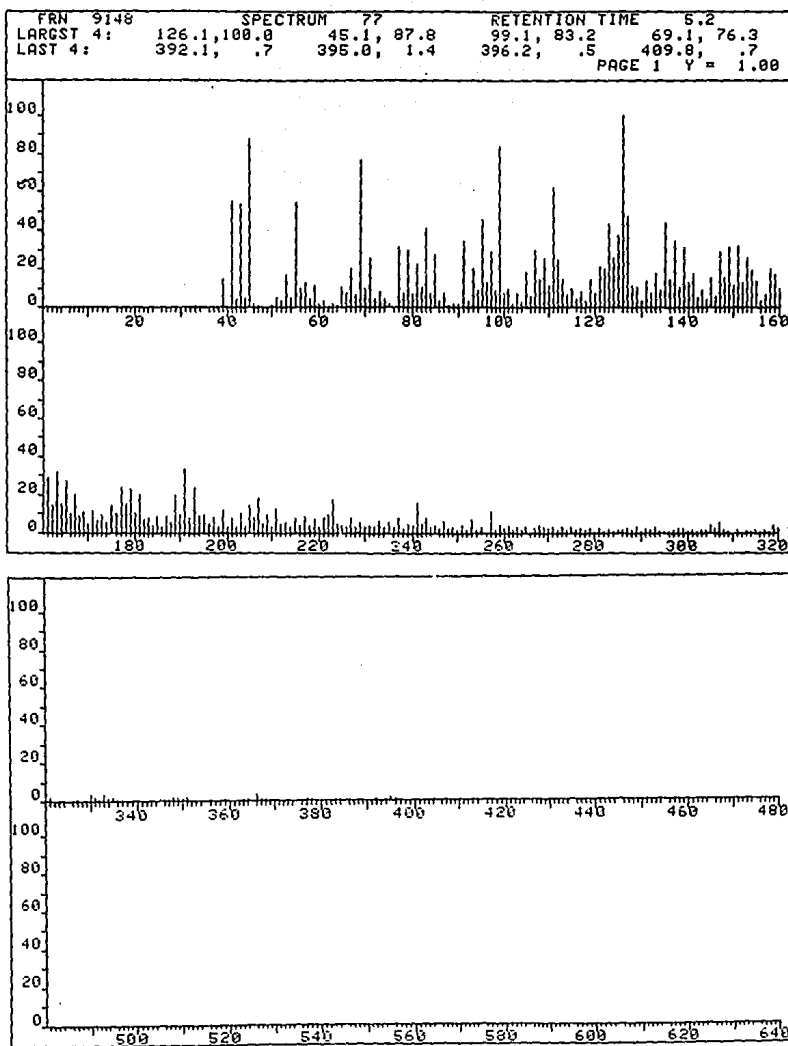


(1772, 1760  $\text{cm}^{-1}$ ) y para doble ligadura (980  $\text{cm}^{-1}$ ). Su fórmula molecular se estableció como  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_9$  por espectrometría de masas (Espectro 2), esta fórmula permite calcular ocho grados de insaturación (Cuadro 5).

Los espectros de rmn presentaron el perfil típico de un picrotoxano (Corbella *et al.*, 1969b; Blunt *et al.*, 1979; Ohmoto *et al.*, 1989; Koike *et al.*, 1991a; Koike *et al.*, 1991b y Suzuki *et al.*, 1992) y en particular eran muy similares a los descritos para la picodendrina E (**18**) (Koike *et al.*, 1991b) y la pretoxina (**13**) (Corbella *et al.*, 1969b). Los datos de la picodendrina E (**18**) y la pretoxina (**13**) se indican en el Cuadro 6 y se utilizarán como base para la discusión de la elucidación estructural del producto **28**.

p f =	255 °C
$[\alpha]^{20} =$	+ 18 (C=1 MeOH)
Fórmula molecular	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_9$
i r v max (KBr)	3500, 1772, 1760, 1630, 1230, 1080, 1030, 980, 900, 820 $\text{cm}^{-1}$ .....Espectro 1.
eims, m/z: (rel. int.)	$\{M\}^+$ 410 (0.7), $\{M-\text{H}_2\text{O}\}^+$ 392 (0.7), $\{M-15\}^+$ 395 (1.4), $\{M-\text{H}_2\text{O}-15\}^+$ 377 (1), 366 (15), 330 (18), 126 (100), 111 (50), 99 (83), 69 (76), 45 (88). .Espectro 2.

Cuadro 5. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **28**.



Espectro 2. Espectro de masas de la celaenodendrólida I (28).



Posición	Picodendrina E ( <b>18</b> ).		Pretoxina ( <b>13</b> ). $\delta^1\text{H}$ (py-d <sub>5</sub> )
	$\delta^1\text{H}$ (py-d <sub>5</sub> )	$\delta^{13}\text{C}$ (py-d <sub>5</sub> )	
1	-	55.49	-
2	4.38 sa	8 5.29	4.98 sa
3	5.24 da (4)	77.89	5.36 m
4	2.81 t (4)	54.75	3.5 m
5	3.39 d (4)	49.52	3.75 m
6	-	77.21	-
7	1.76 s	24.40	1.93 s
8	-	68.12	
9	1.54 s	30.48	2.12 s
10	1.47 s	28.65	4.98 da
11	4.17 d (2.8)	63.53	4.03 d (3)
12	4.11 d (2.8)	62.43	4.26 d (3)
13	-	91.50	-
14	$\alpha$ 4.17 dd (14.0, 12.0) $\beta$ 2.63 dd (14.0, 7.0)	33.07	a 4.63 dd (13.0, 5.0) b 2.97 dd (13.0, 8.0)
15	-	174.72	-
16	3.14 m	48.25	ND
17	-	177.13	-
18	4.27 m	68.25	4.6 m
19	1.63 d (6.4)	59.19	1.55 d (6)
O-Me	3.37	59.19	-

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, el estándar interno es TMS y las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz.

Cuadro 6. Datos espectroscópicos de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  y  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  de la picodendrina E (**18**) (Koike *et al.*, 1991b) y de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  de la pretoxina (**13**) (Corbella *et al.*, 1969b).

El espectro de  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  (Espectro 3) presenta señales para 20 carbonos en armonía con la fórmula molecular calculada. Tomando en consideración la teoría del desplazamiento químico, dos señales son fácilmente asignables a grupos carbonilos de lactona, dos a carbonos vinílicos y ocho a carbonos unidos a funciones oxigenadas. En el Cuadro 7 se incluyen los datos espectroscópicos del compuesto **28**.

Para determinar la naturaleza de los carbonos en general se registró el espectro de  $\text{rmn } ^{13}\text{C-DEPT}$  (Espectro 4). De acuerdo con éste, cuatro carbonos pertenecen a metilos, uno de los cuales debería corresponder a un metoxilo ( $\delta$  58.9), dos carbonos corresponden a metilenos, uno de ellos vinílico ( $\delta$  112.7) sugiriendo que la molécula posea un metileno exocíclico o un metileno terminal. De manera adicional, se pudo comprobar la presencia de cinco metinos y con la excepción de los metinos en  $\delta$  48.4 y  $\delta$  58.2 los otros tres se encuentran unidos a funciones oxigenadas. Del análisis derivado del espectro de  $\text{rmn } ^{13}\text{C-DEPT}$  se concluyó que la molécula contiene siete carbonos cuaternarios: dos de ellos como se indicó anteriormente pertenecen a carbonilos de lactona, uno a un carbono vinílico, tres a funciones unidas a oxígeno y el último a un carbono cuaternario de carácter alifático. Hasta este punto, el número de hidrógenos determinado por el número de carbonos protonados en los espectros de  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  evidencian 23 de los 26 hidrógenos requeridos por la fórmula molecular, en consecuencia era factible que los tres hidrógenos restantes pertenecieran a grupos hidroxilo.

Las características más relevantes del espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  (Espectro 5) del producto **28** se describen a continuación.

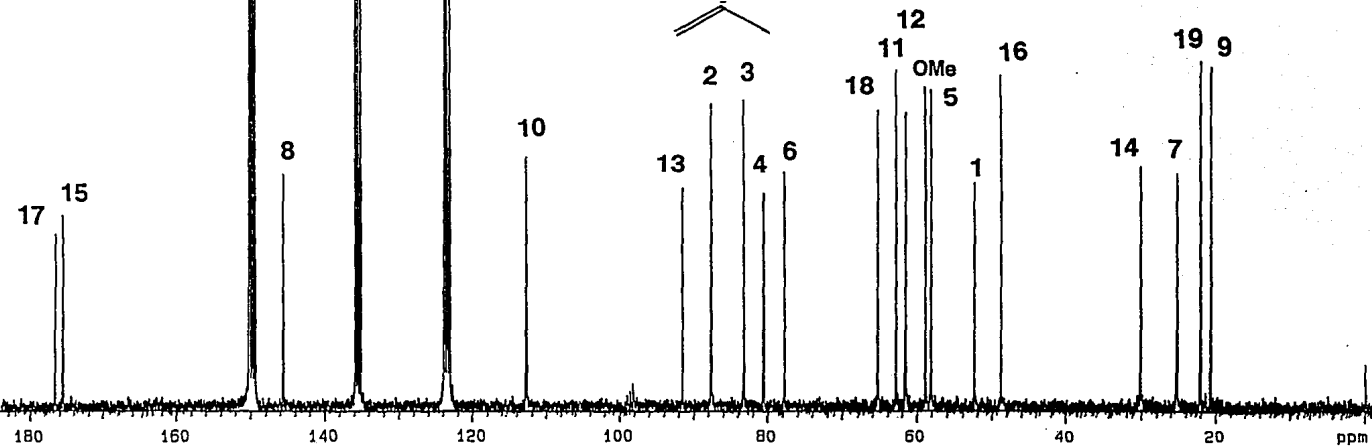
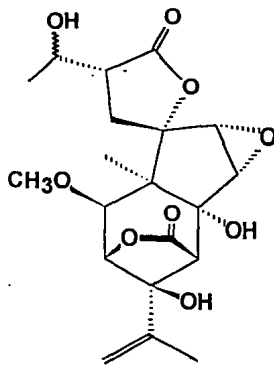
a) El espectro confirma la presencia de cuatro metilos: en  $\delta$  1.45 aparece el metilo C-19 de carácter secundario debido a que se observa como un doblete ( $J = 6.5$  Hz). En  $\delta$  1.87 se aprecia un metilo unido a un centro cuaternario,

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (Py-d <sub>5</sub> )	$\delta^{13}\text{C}$ (DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta^1\text{H}$ (Py-d <sub>5</sub> )	$\delta^1\text{H}$ (DMSO-d <sub>6</sub> )
1	52.4	50.82	-	-
2	87.7	86.02	4.30 s	3.88 s
3	83.3	81.3	5.41 sa	4.82 d (3.2)
4	80.6	79	-	-
5	58.2	58.4	3.65 sa	2.98 d (3.2)
6	77.8	75.8	-	-
7	25.3	23.8	1.87 s	1.32 s
8	145.6	143.2	-	-
9	20.8	19.5	2.40 sa	1.95 s
10	112.7	112.08	5.22 da	5.03 da
11	62.9	61.1	4.07 d (2.7)	3.48 d (3)
12	61.6	60.3	4.22 d (2.7)	3.7 d (3)
13	91.5	90.17	-	-
14	30.2	28.7	$\alpha$ 4.40 dd (13.2, 12) $\beta$ 3.05 dd (13.2, 9.0)	$\alpha$ 3.50 dd (13.6, 12.0) $\beta$ 2.25 dd (13.6, 9.2)
15	175.9	173.8	-	-
16	48.4	46.9	3.30 ddd (12, 9, 3.6)	2.82 ddd (11.7, 9.3, 4)
17	176.6	176.4	-	-
18	65.4	64.6	4.67 m	4.13 m
19	22.2	20.1	1.45 d (6.4)	1.25 d (6.4)
-OCH <sub>3</sub>	58.9	60.3	3.33 s	3.43 s
-OH	-	-	5.18 s	4.22 s
-OH	-	-	8.01 s	5.18 s
-OH	-	-	8.15 s	5.18 s

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, el estandar interno es TMS y las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz.

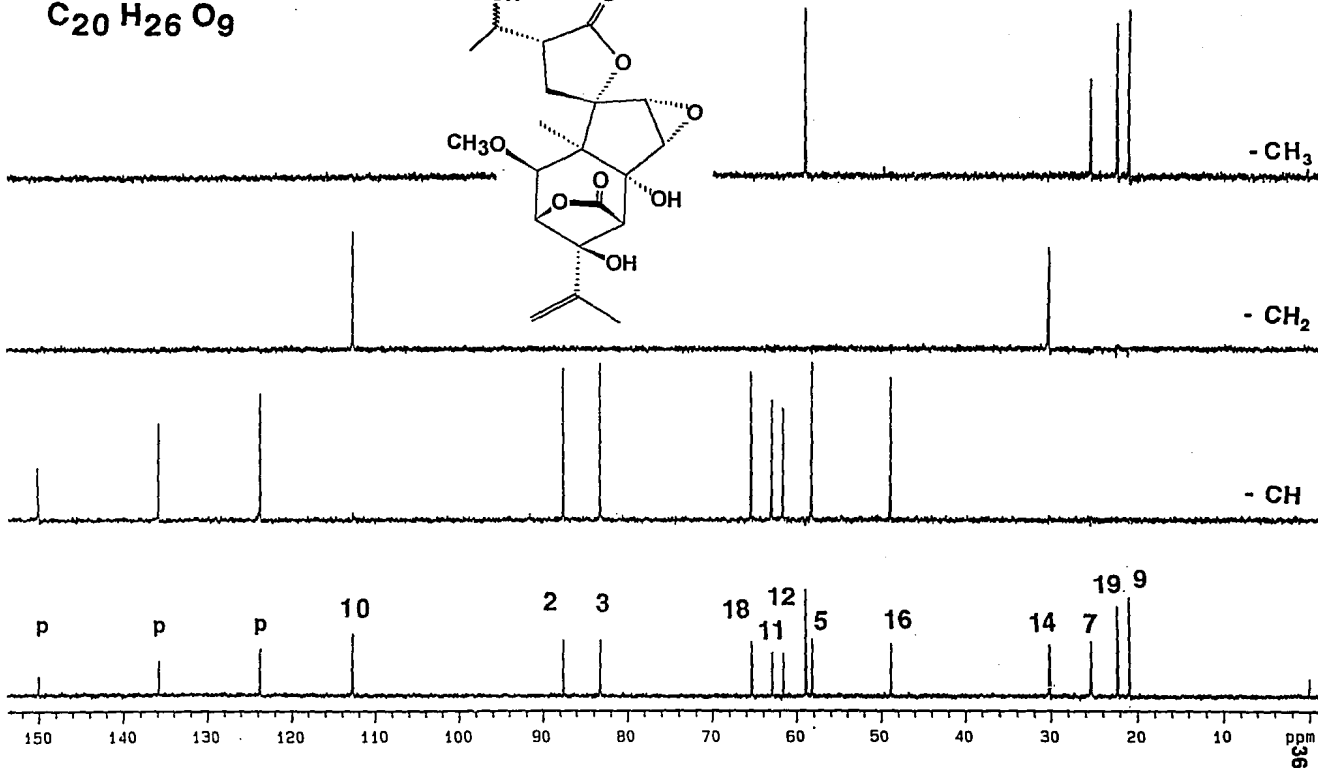
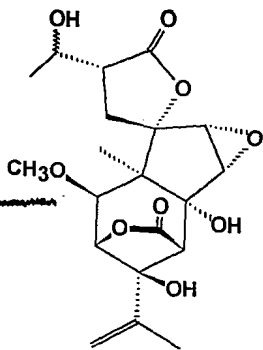
Cuadro 7. Datos espectroscópicos de  $\text{rmn}^{13}\text{C}$  y  $\text{rmn}^1\text{H}$  del compuesto **28**.

C<sub>20</sub> H<sub>26</sub> O<sub>9</sub>

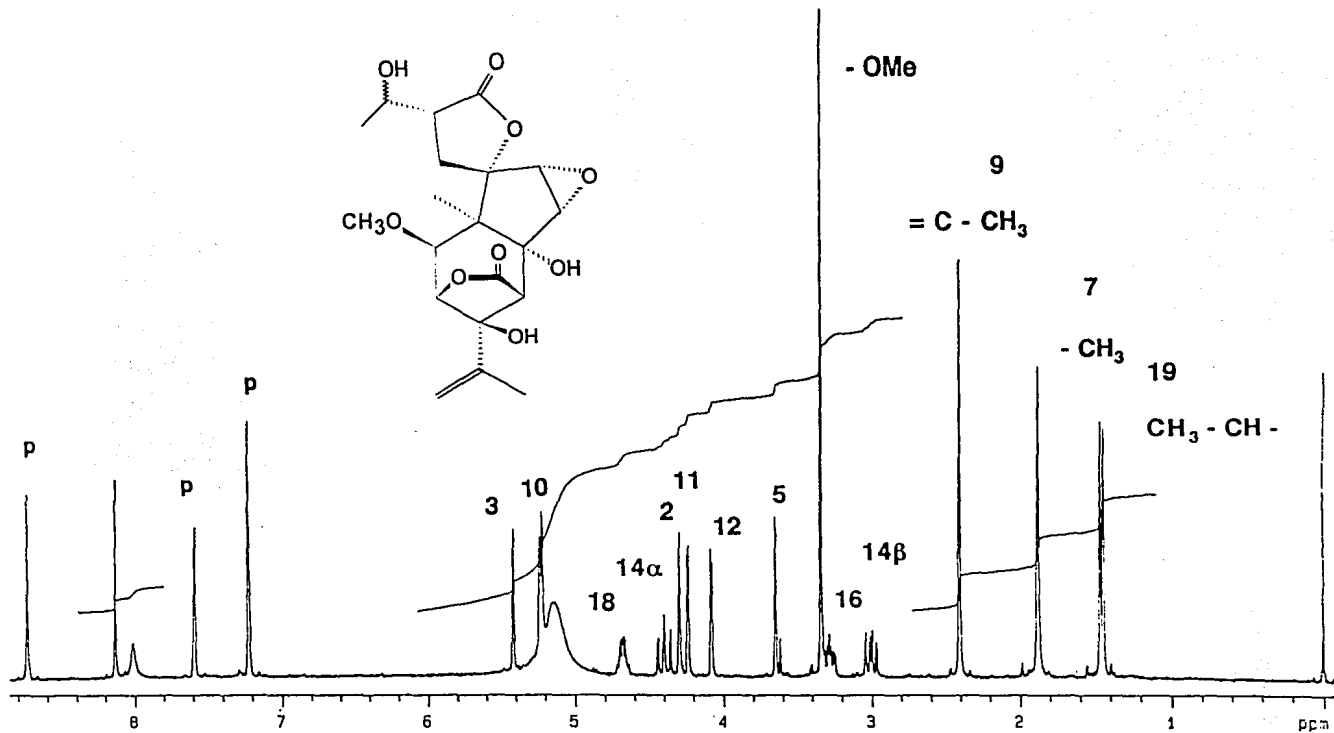


Espectro 3. Espectro de  $\text{rnm } ^{13}\text{C}$  de la celenodendrólida I (28).

$C_{20}H_{26}O_9$



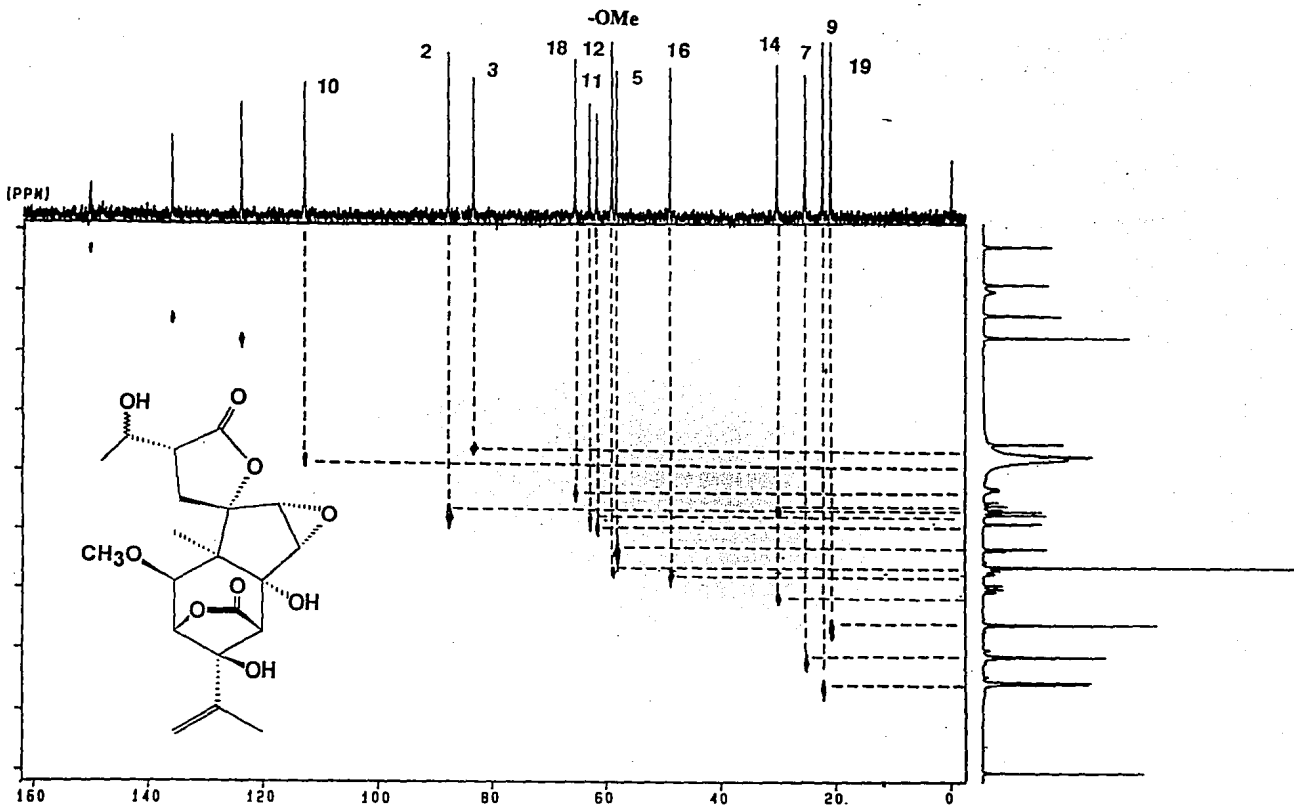
Espectro 4. Espectro de  $^{13}C$ -DEPT de la celenodendrolida I (**28**).



Espectro 5. Espectro de rmn <sup>1</sup>H de la celaenodendrólida I (28).

asignada al metilo en C-1. En  $\delta$  2.4 se encuentra un singulete ancho asignable a un metilo sobre una doble ligadura. Por último, al igual que en el espectro de la picodendrina E (Koike, *et al.*, 1991b) se observa un singulete en  $\delta$  3.33 que corresponde al grupo metoxilo evidenciado en el espectro de  $\text{rmn }^{13}\text{C}$  ( $\delta$  58.9).

- b) Se observan señales para 5 hidrógenos unidos a funciones oxigenadas (Confirmadas con base en las correlaciones observadas en el espectro HETCOR, Espectro 6), una de las señales es fácilmente asignable al hidrógeno geminal de una función lactónica en  $\delta$  5.41, la cual correlacionó con la señal en  $\delta$  83.3 en el espectro HETCOR. Por analogía con los datos de la picodendrina E (**18**) y la pretoxina (**13**) (Cuadro 6), los dobletes en  $\delta$  4.07 y  $\delta$  4.22 ( $J=2.7$  Hz) se asignaron a los hidrógenos de un grupo epóxido entre C-11 y C-12, estas señales correlacionan en el espectro HETCOR (Espectro 6) con las resonancias en  $\delta$  62.9 y  $\delta$  61.6, respectivamente. Las dos señales restantes en  $\delta$  4.30 y  $\delta$  4.67 que correlacionan en el espectro HETCOR con las señales en  $\delta$  87.7 y  $\delta$  65.4, respectivamente deben de corresponder a los protones geminales de dos funciones oxigenadas secundarias que en principio se asignan a H-2 y a H-18, respectivamente,
- c) En  $\delta$  5.22 se encuentra un doblete ancho correspondiente a dos hidrógenos vinílicos. Por analogía con la pretoxina (**13**), esta señal y la correspondiente al metilo sobre doble ligadura son congruentes con la presencia de un grupo isopropileno en la molécula.
- d) En  $\delta$  3.65 se aprecia una señal ancha que se asignó al hidrógeno  $\alpha$  al carbonilo de una lactona (H-5).



Espectro 6. Espectro de mn-HETCOR de la celaenodendrólida I (**28**).



- e) En  $\delta$  3.05,  $\delta$  3.30 y  $\delta$  4.40 se observan multipletes. La multiplicidad y el desplazamiento químico de cada uno de los multipletes permitieron asignarlos a los hidrógenos de C-14 y al hidrógeno de C-16.
- f) Por último, se observaron señales para tres hidroxilos en  $\delta$  5.18,  $\delta$  8.01 y  $\delta$  8.15 confirmando lo propuesto por el análisis del espectro  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  (Cuadro 7). Al equilibrar el espectro con agua deuterada las tres señales desaparecen. Por otra parte, estas señales no demostraron ninguna correlación con otras señales en el espectro HETCOR (Espectro 6).

El análisis detallado del espectro COSY (Figura 9) permitió establecer las dos unidades aisladas que se ilustran en la Figura 8.

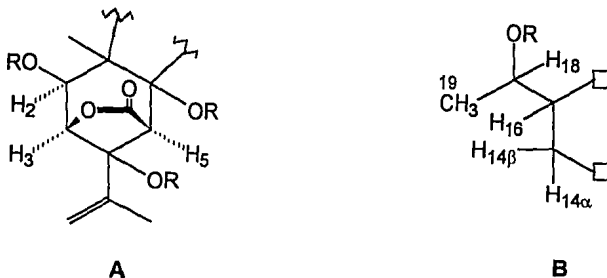


Figura 8. Estructuras parciales derivadas del análisis del espectro COSY.

Las correlaciones homonucleares más importantes que permitieron establecer las secuencias anteriores se describen a continuación:

- a) La señal correspondiente al protón geminal de la función lactona en  $\delta$  5.41, (H-3) muestra una interacción con la señal en  $\delta$  3.65 (H-5), debido a un acoplamiento a larga distancia tipo W, característico de picrotoxanos con una función lactónica entre C-3 y C-5 (Ohmoto *et al.*, 1989; Koike *et al.*, 1991a; Koike *et al.*, 1991b y Suzuki *et al.*, 1992). Por otra parte, H-3 además de correlacionar con H-5, lo hace también con la señal en  $\delta$  4.30

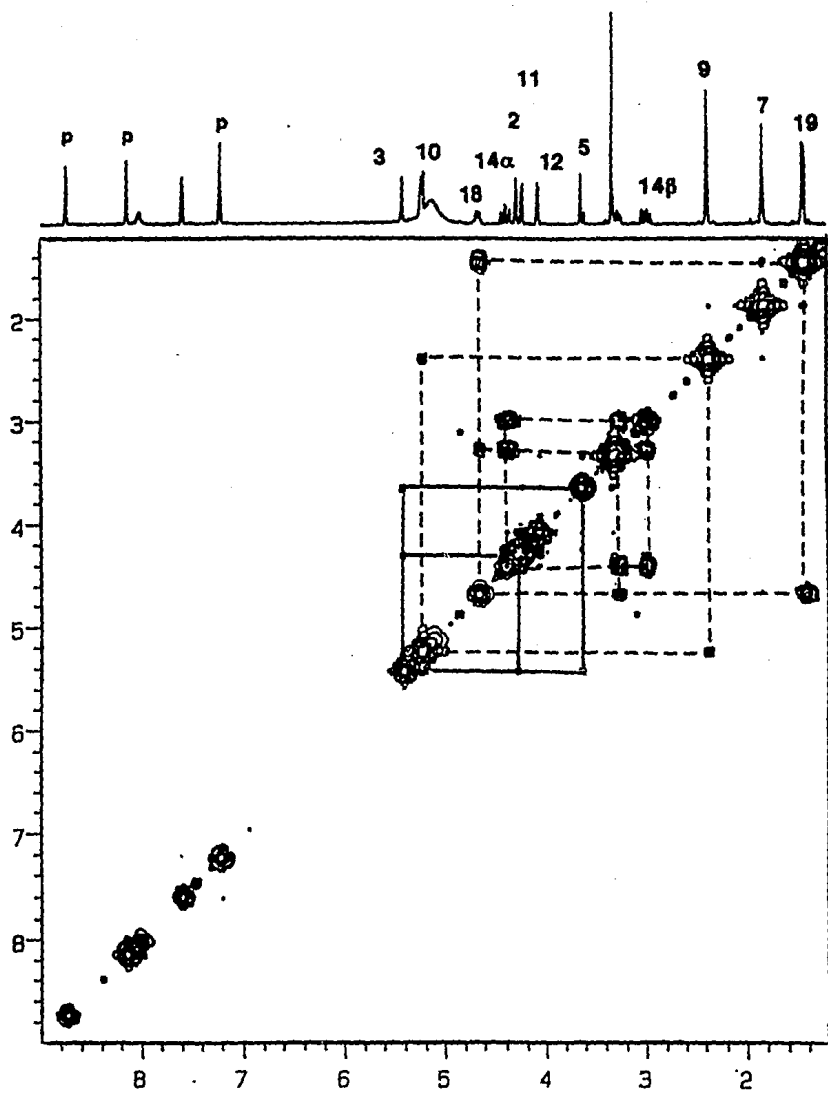


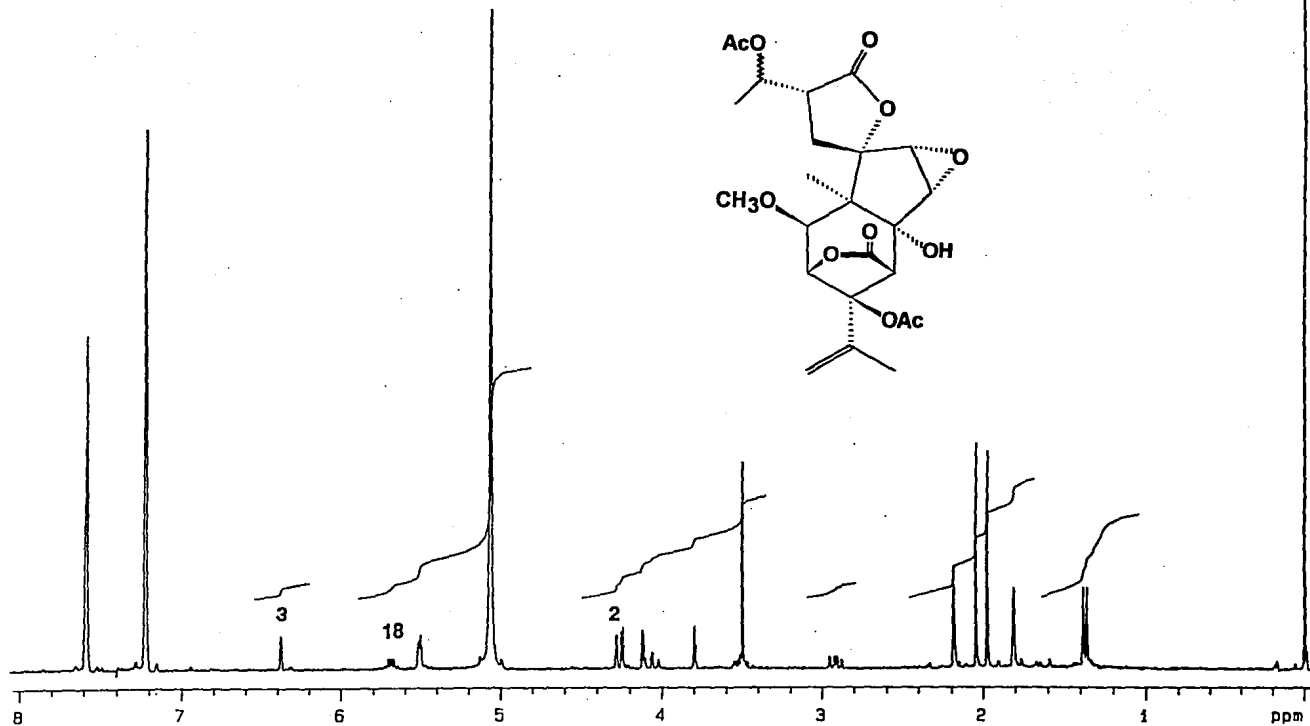
Figura 9. Correlación homonuclear de la celaenodendrolida I (28).

correspondiente a H-2. La ausencia de correlaciones adicionales para H-3 indicaron claramente que en C-4 debería encontrarse uno de los sustituyentes oxigenados.

- b) El cuadro de conectividad observado entre el metilo en  $\delta$  2.40 (C-9) y los hidrógenos vinílicos en  $\delta$  5.22 comprueba la presencia de un grupo isopropileno. Las correlaciones descritas en este inciso y el anterior permitieron integrar la estructura parcial **A** de la Figura 8.
- c) El metilo de carácter secundario que aparece en  $\delta$  1.45 (H-19,  $J_{19-18} = 6.4$  Hz) correlaciona con el multiplete en  $\delta$  4.67 (H-18), este último a su vez lo hacía con el multiplete en  $\delta$  3.30 (ddd H-16,  $J_{16-14\alpha} = 12.0$  Hz,  $J_{16-14\beta} = 9.0$  Hz,  $J_{16-18} = 3.6$  Hz). Por último, el multiplete en  $\delta$  3.30 también correlaciona con los dos dobletes de dobletes en  $\delta$  3.05 (H-14 $\beta$ ,  $J_{14\beta-14\alpha} = 13.2$  Hz,  $J_{14\beta-16} = 12.0$  Hz) y  $\delta$  4.40 (H-14 $\alpha$ ,  $J_{14\alpha-14\beta} = 13.2$  Hz,  $J_{14\alpha-16} = 9.0$  Hz). Estos cuadros de conectividades permitieron proponer al fragmento **B** de la Figura 8.

A fin de satisfacer el número de insaturaciones requeridas, los carbonos del fragmento **B** de la Figura 8 deberían formar parte del segundo anillo lactónico en la molécula. La unión de las dos estructuras parciales de la Figura 8, y el epóxido en C-11/C-12 evidenciado en el análisis comparativo con la picodendrina E (**18**) y la pretoxina (**13**) (Cuadro 6) permitió proponer el arreglo estructural que se indica en la Figura 10, restando por asignar la disposición relativa del metoxilo y de los tres hidroxilos y, para ello el análisis del espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  del derivado acetilado **21A** fué de gran utilidad.

El derivado **21A** se obtuvo por tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina. Las señales que principalmente se afectaron a consecuencia de la acetilación fueron dos: la asignada a H-3 que se desplazó de  $\delta$  5.41 a  $\delta$  6.4 ( $\Delta = 0.99$ ) y el multiplete correspondiente a H-18 que de estar en  $\delta$  4.67 apareció en  $\delta$  5.67 ( $\Delta = 1.00$ ) (Espectro 7). Estos resultados son consistentes



Espectro 7. Espectro de rnm <sup>1</sup>H de la celaenodendrólida I acetilada (**28A**).

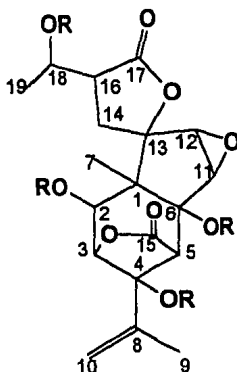


Figura 10. Estructura del núcleo picrotoxano, derivado del análisis del espectro COSY.

con la disposición de un grupo hidroxilo secundario en C-18 y de un grupo hidroxilo terciario en C-4, por lo tanto el metoxilo debía estar ubicado en C-2 y el restante hidroxilo terciario en C-6. En este sentido el desplazamiento químico observado en el espectro de  $\text{rnm } ^{13}\text{C}$  para el metilo sobre C-1 ( $\delta$  25.3) es consistente con la presencia de un sustituyente oxigenado en C-6 (Blunt *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 1992). La ausencia de un grupo hidroxilo en C-6 trae como consecuencia un desplazamiento paramagnético del metilo, el cual aparece entonces en  $\delta$  29.

Por último, a fin de determinar la estereoquímica relativa de los sustituyentes se hicieron una serie de experimentos nOe, y las conclusiones mas importantes son las siguientes:

1) La irradiación de H-10 indujo nOe en H-3 (13.5 %), H-5 (7.4 %) y H-9 (4.6 %).

Asimismo, la irradiación de H-9 indujo nOe en H-5 (11 %), y H-10 (3 %). Estos

resultados son consistente con la estereoquímica  $\alpha$  del grupo isopropileno en C-4.

- 2) Por otra parte, la irradiación del metilo sobre C-1 indujo nOe en H-2 (10.4 %), confirmando la estereoquímica  $\alpha$  en H-2.
- 3) La irradiación de H-11 incrementó las señales correspondientes a H-5 (13 %), y H-12 (8 %), y la irradiación en H-12 indujo nOe no sólo en H-11 (11 %), sino también en una de las señales correspondientes a uno de los protones del metileno en C-14 (2.5 %), que en consecuencia se asignó como 14 $\beta$ .

La estereoquímica relativa en el centro quiral C-16 no fué posible determinarla mediante los experimentos nOe por lo que se registró el espectro NOESY (Figura 11).

El análisis detallado de los cuadros de conectividades permitió observar correlaciones entre el metilo C-19 y el metilo C-7 y entre el H-14 $\alpha$  y H-18. Estas interacciones sólo eran factibles si la cadena lateral en C-16 presentaba una orientación  $\alpha$ . Los desplazamientos químicos observados para los hidrógenos de C-14 en el producto natural **28**, son similares a los descritos para la Pretoxina (**13**) (Cuadro 6) que también presenta el residuo en C-16  $\alpha$  orientado (Corbella, 1969b). Sin embargo, éstos desplazamientos difieren notablemente de los observados para la picodendrina E (**18**) (Cuadro 6) y otros análogos cuya estructura se ha evidenciado por estudios de difracción de rayos X, y que presentan el sustituyente en C-16  $\beta$ -orientado (Koike *et al.*, 1991b).

Las otras interacciones observadas en el espectro NOESY se indican también en el Cuadro 8 y se encuentran en armonía con los resultados derivados de los experimentos nOe.

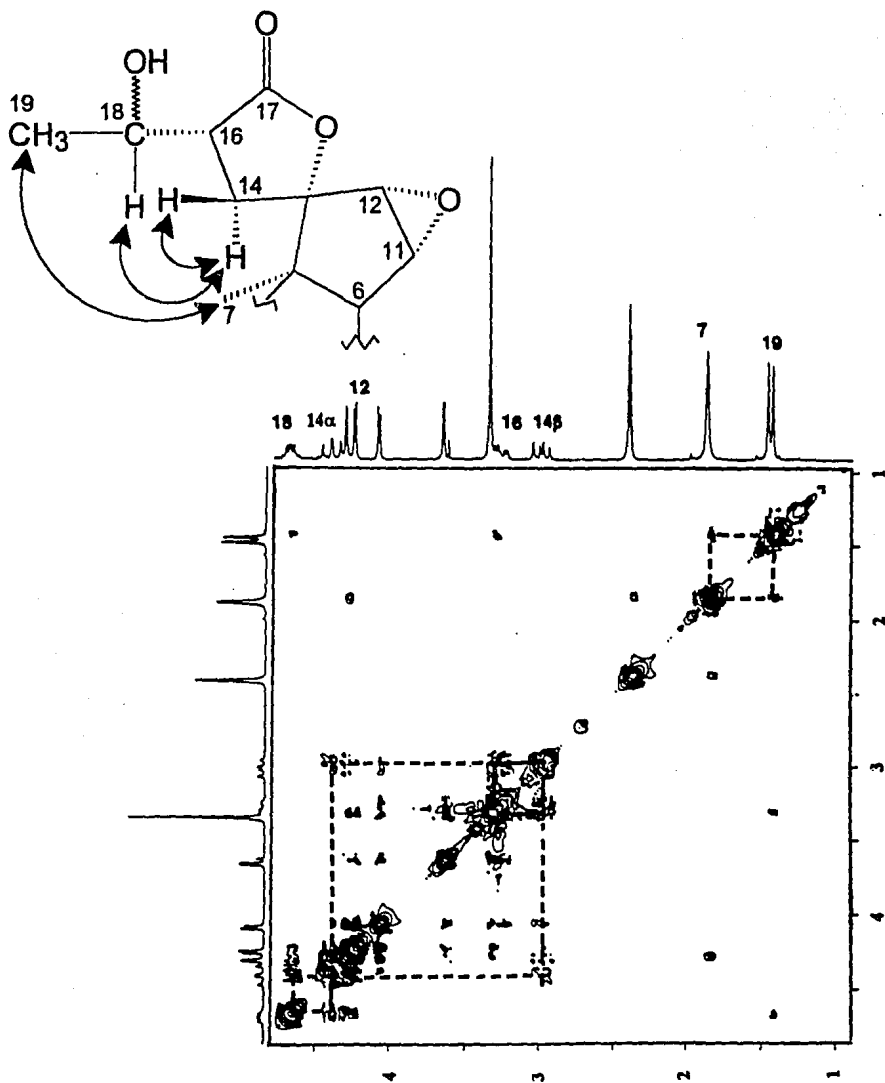


Figura 11. Espectro de  ${}^1\text{H}$ -NOESY de la cetaenodendrolida (**28**).

Hidrógeno ( $\delta$ )	nOe
H-2 (4.30)	H-3, H-7
H-3 (5.42)	H-2, H-5
H-5 (3.65)	H-3, H-11
H-7 (1.87)	H-2, H-10, H-19
H-9 (5.23)	H-10
H-10 (2.40)	H-7, H-9
H-11 (4.24)	H-5, H-12
H-12 (4.08)	H-11, H-14 $\beta$
H-14 $\alpha$ (4.4)	H-14 $\beta$ , H-18
H-14 $\beta$ (3.0)	H-12, H-14 $\alpha$ , H-16
H-16 (3.28)	H-14 $\beta$
H-18 (4.68)	H-14 $\alpha$ , H-19
H-19 (1.45)	H-7, H-18

Cuadro 8. Interacciones basadas en el espectro NOESY del compuesto **28**.

Con base en la información presentada para el compuesto se propone la estructura de la Figura 12 para el nuevo picrotoxano el cual se denominó como la celaenodendrólida I. Por último, la estereoquímica relativa del centro quiral C-18 no se estableció en el presente estudio.

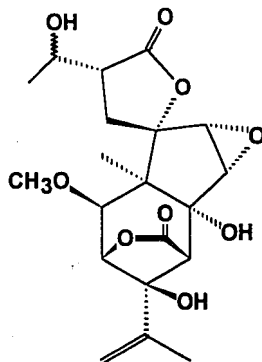


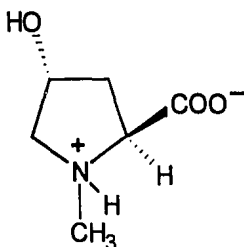
Figura 12. Estructura de la celaenodendrólida I (**28**).



El producto **29** se aisló como un sólido blanco cristalino soluble en disolventes polares, con un punto de fusión de 230-232 °C, ópticamente activo. Su espectro en el ir (Espectro 8) mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (3260  $\text{cm}^{-1}$ ) y carboxilato (1630  $\text{cm}^{-1}$ ). El espectro de masas (Espectro 9) permitió calcular la fórmula molecular como  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ; El espectro de masas mostró fragmentos iones a  $m/z$  100 y  $m/z$  82 atribuibles a la pérdida del carboxilo y a la pérdida consecutiva del carboxilo y agua a partir del ión molecular en  $m/z$  145, respectivamente. También se observó el ión  $m/z$  42 correspondiente al fragmento  $\text{Me-N}^+\text{CH}$  (Cuadro 9).

En el Cuadro 10 se muestran comparativamente los datos de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  y  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  descritos para la 4-hidroxi-N-metil prolina (Sciuto *et al.*, 1983) y los obtenidos para el compuesto **29**. Los espectros de  $\text{rmn}$  (Espectros 10-19) del compuesto **29** se registraron en tres diferentes disolventes (dioxano- $\text{d}_8$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{DMSO-d}_6$ ) y en todos los casos se observaron siete grupos de señales en los espectros de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  y seis señales para carbonos en los espectros de  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ .

Como se observa en el Cuadro 10, las propiedades espectroscópicas de resonancia magnética nuclear del producto **29** fueron muy similares a los de la 4-hidroxi-Metil prolina. La determinación inequívoca de la estructura del producto **29** se realizó mediante un análisis de difracción de rayos X. La Figura 13 muestra una vista estereoscópica del producto natural **29**. Las evidencias anteriores, así como el valor negativo de la rotación óptica, permitieron caracterizar al producto como el ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico



Acido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).

pf =	230-232 °C
$[\alpha]^{20} =$	- 95.45 (C=1.1mg/ml CHCl <sub>3</sub> )
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> N
ir v max (KBr)	3257, 2933, 1626, 1404, 1368, 1310, 1211, 1078, 710 cm <sup>-1</sup> .....Espectro 8.
eims, m/z: (rel. int.)	{M} <sup>+</sup> 145 (2.5), {M-CO <sub>2</sub> } <sup>+</sup> 101 (9.7) {M-COOH} <sup>+</sup> 100 (100), {M-COOH -H <sub>2</sub> O} <sup>+</sup> 82 (83.2), {Me-N≡CH} <sup>+</sup> 42 (18.5) .....Espectro 9.

Cuadro 9. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto **29**.

Posición	4-hidroxi-N-metil prolina		Compuesto <u>29</u>					
	CD <sub>3</sub> OD		DIOXANO-d <sub>8</sub>		DMSO-d <sub>6</sub>		D <sub>2</sub> O	
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
1 (COO <sup>-</sup> )	170.2	-	173.8	-	171.5	-	174.0	-
2	69.7	4.05	71.1	4.15	70.8	3.68	71.2	5.1
3	38.7	α 2.43 β 2.20	39.3	α 2.42 β 2.20	39.21	α 2.18 β 1.98	39.2	α 3.40 β 3.15
4	69.1	4.48	70.0	4.58	69.9	4.28	70.4	5.5
5	62.4	α 3.10 β 3.82	63.7	α 3.14 β 3.90	63.5	α 2.76 β 3.57	63.8	α 4.1 β 4.88
N-Me	43.4	2.96	44.1	2.99	43.9	2.72	44.1	3.94

Cuadro 10. Análisis comparativo de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  y  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  de la 4-hidroxi-N-metil prolina (Sciuto *et al.*, 1983) y del compuesto 29.

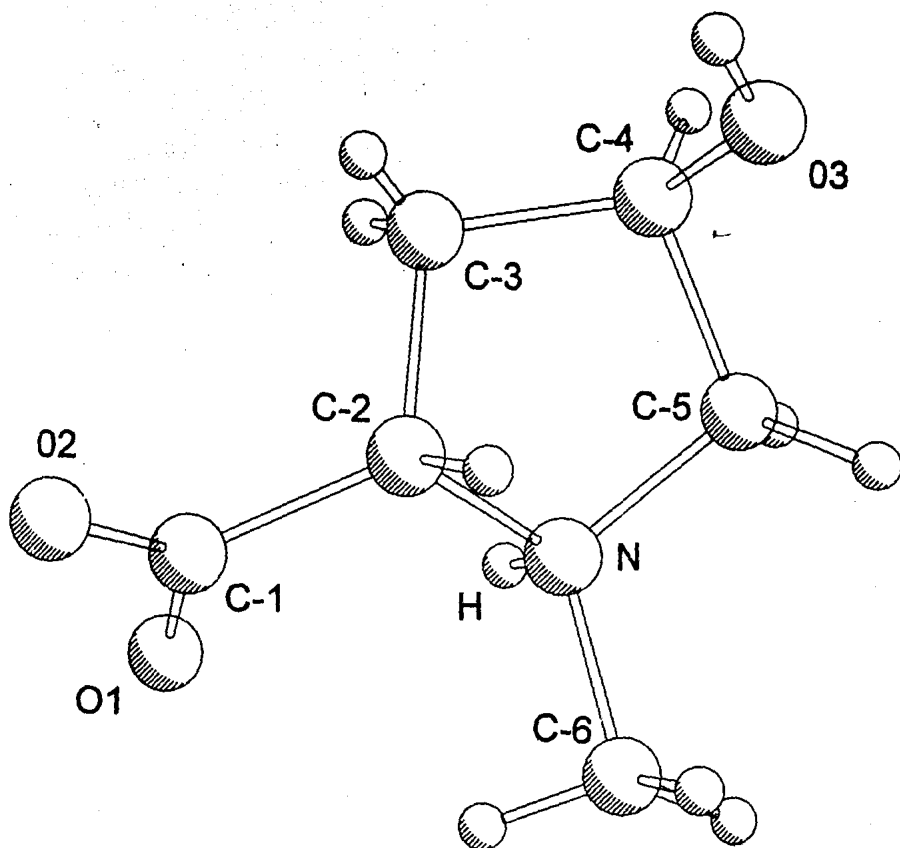
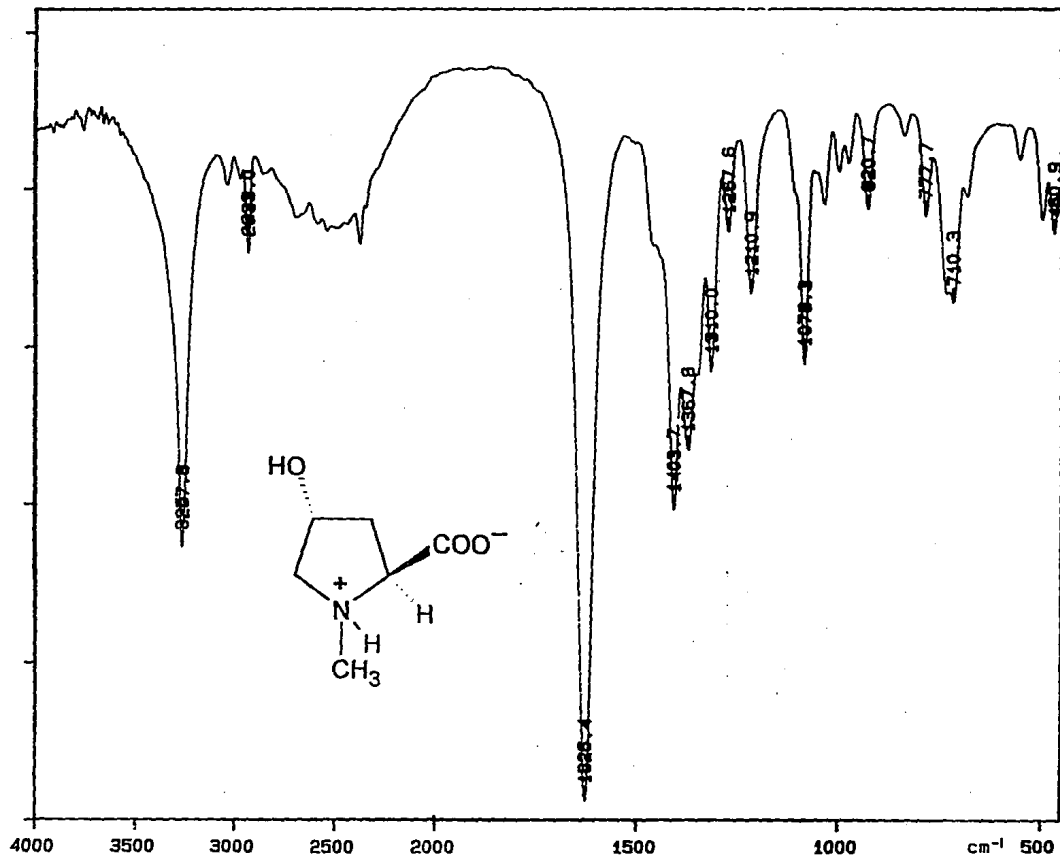
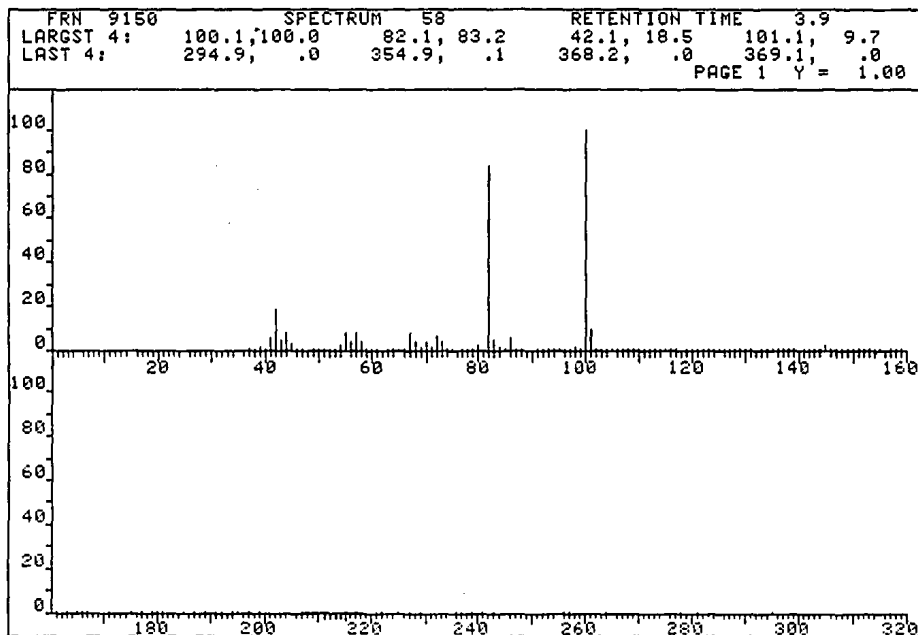


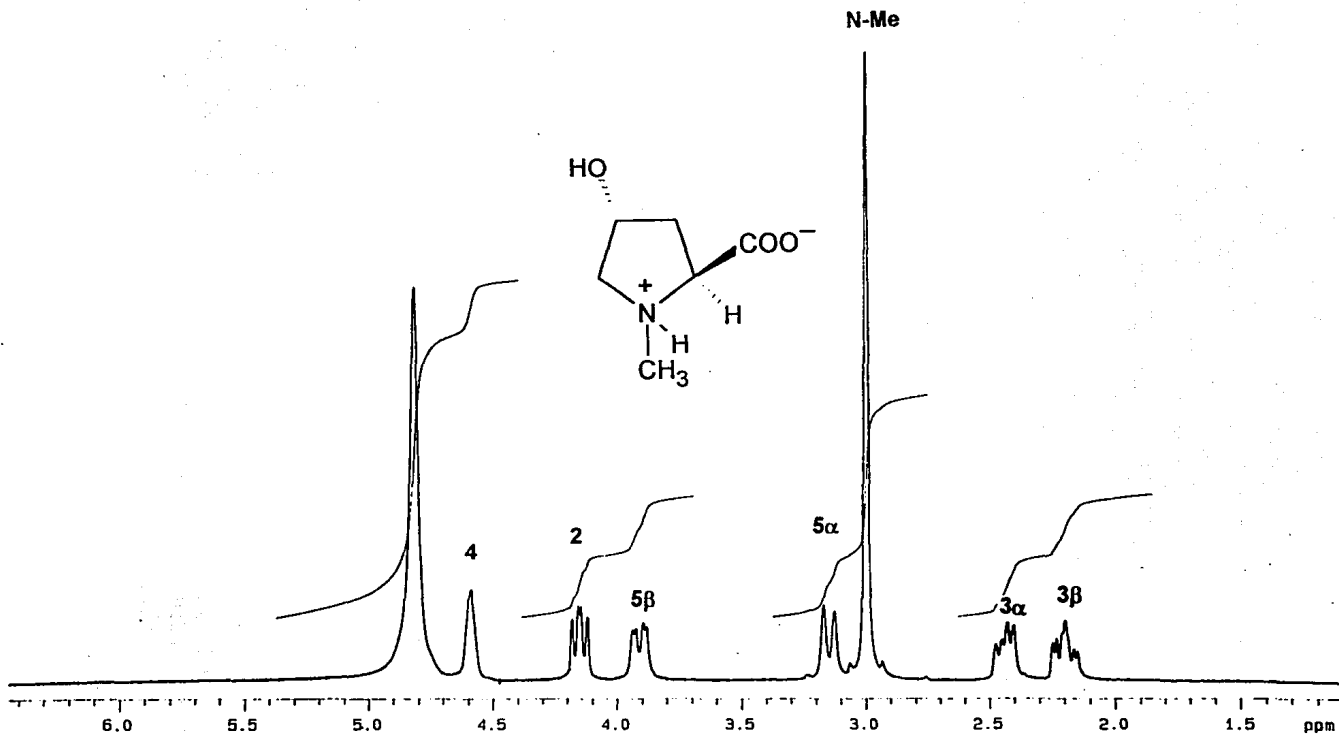
Figura 13. Vista estereoscópica generada por rayos X del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxi-pirrolidin-2-carboxílico (**29**).



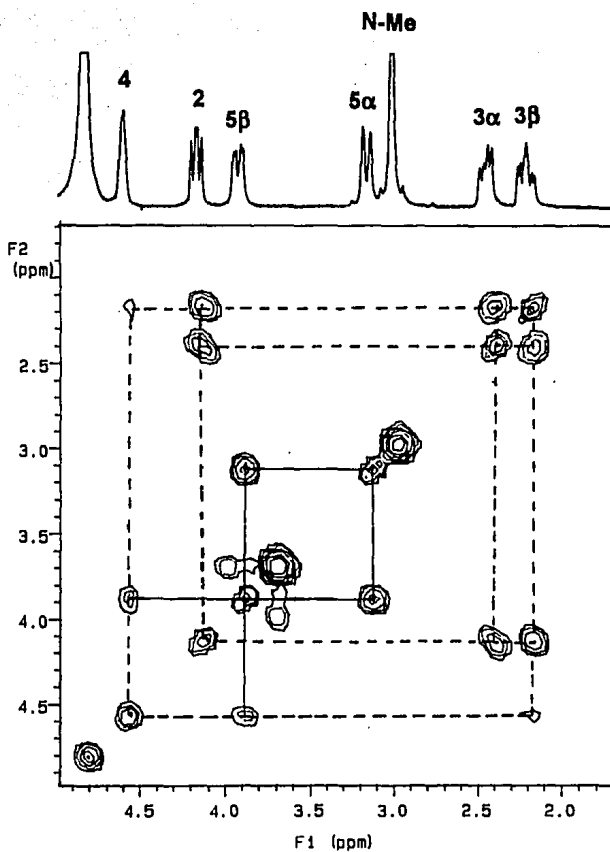
Espectro 8. Espectro de ir del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).



Espectro 9. Espectro de masas del ácido(-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).

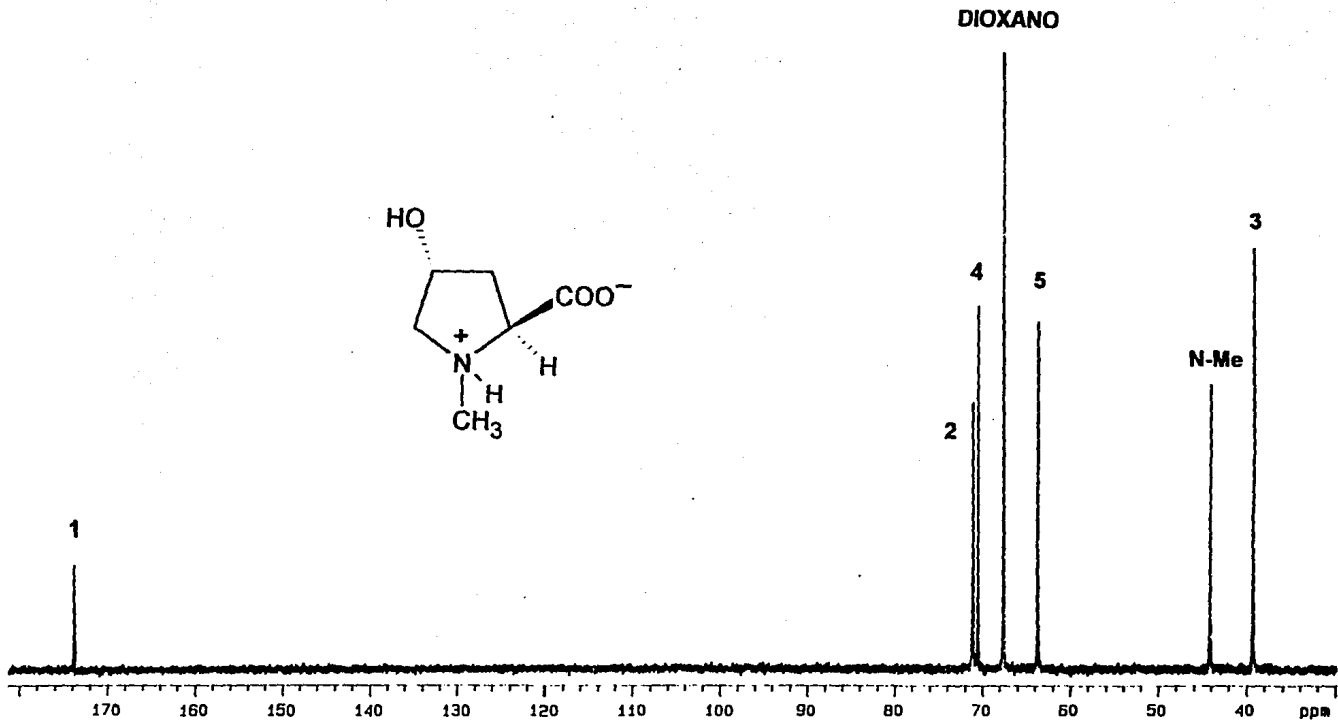


Espectro 10. Espectro de  $\text{rnm } ^1\text{H}$  del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).



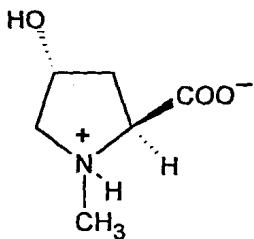
Espectro 11. Espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$ -COSY (Dioxano- $d_6$ ) del ácido(-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxi-pirrolidin-2-carboxílico (**29**).





Espectro 12. Espectro de  $mn^{13}C$  (Dioxano- $d_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).

DIOXANO



1

5

3

2

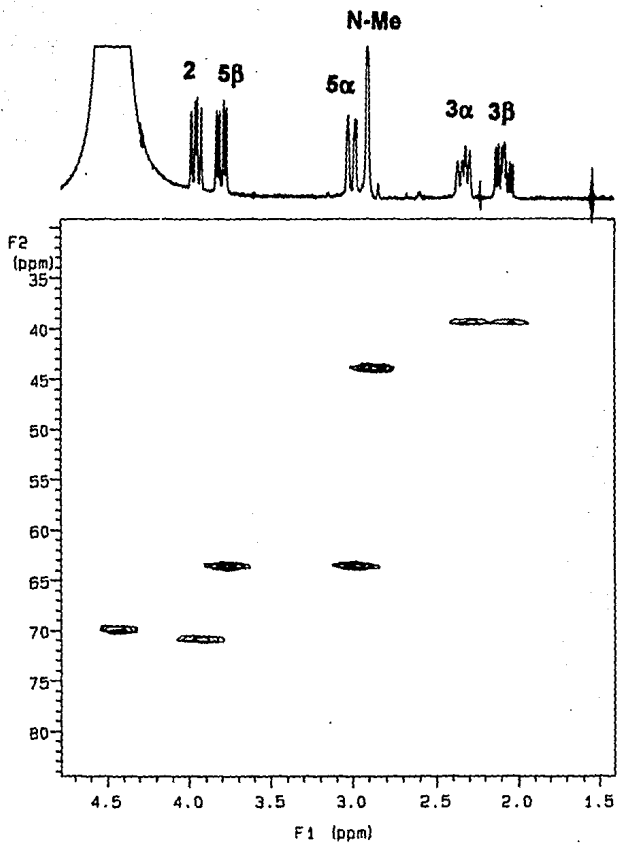
N-Me

4

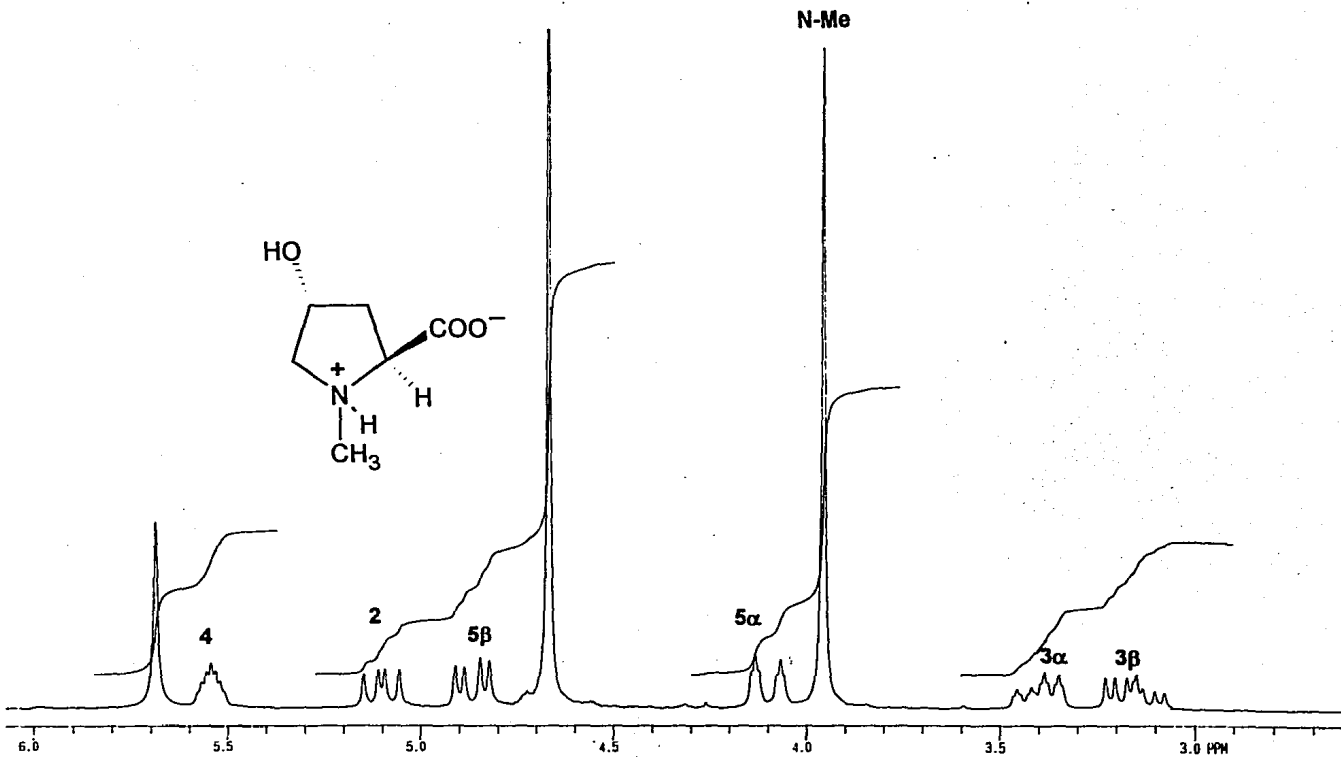
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 ppm

57

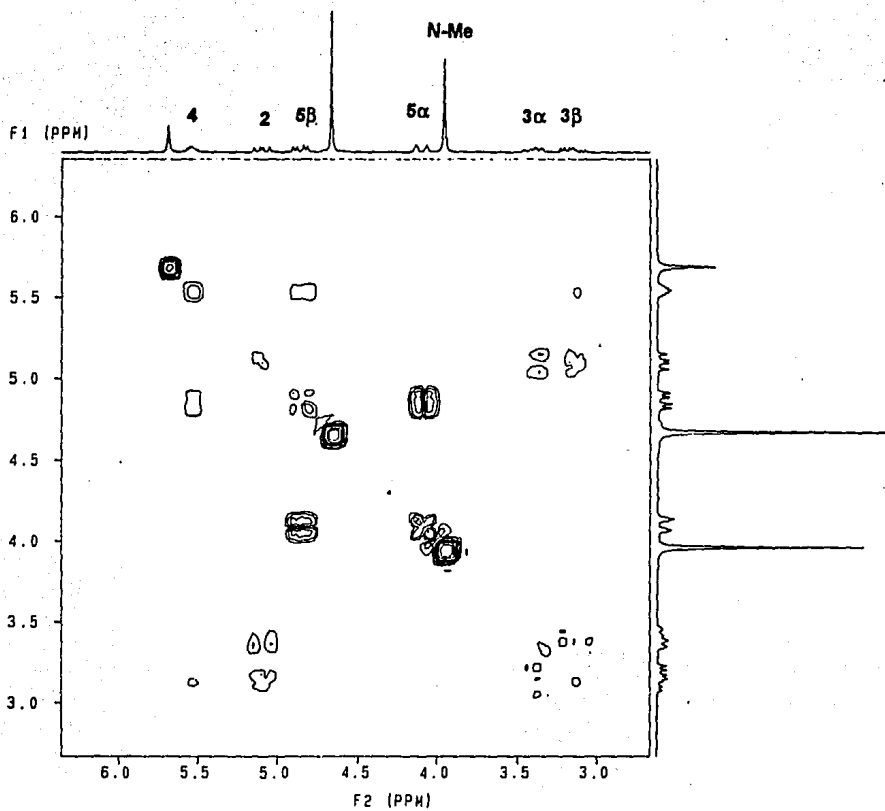
Espectro 13. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT(Dioxano- $\text{d}_8$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).



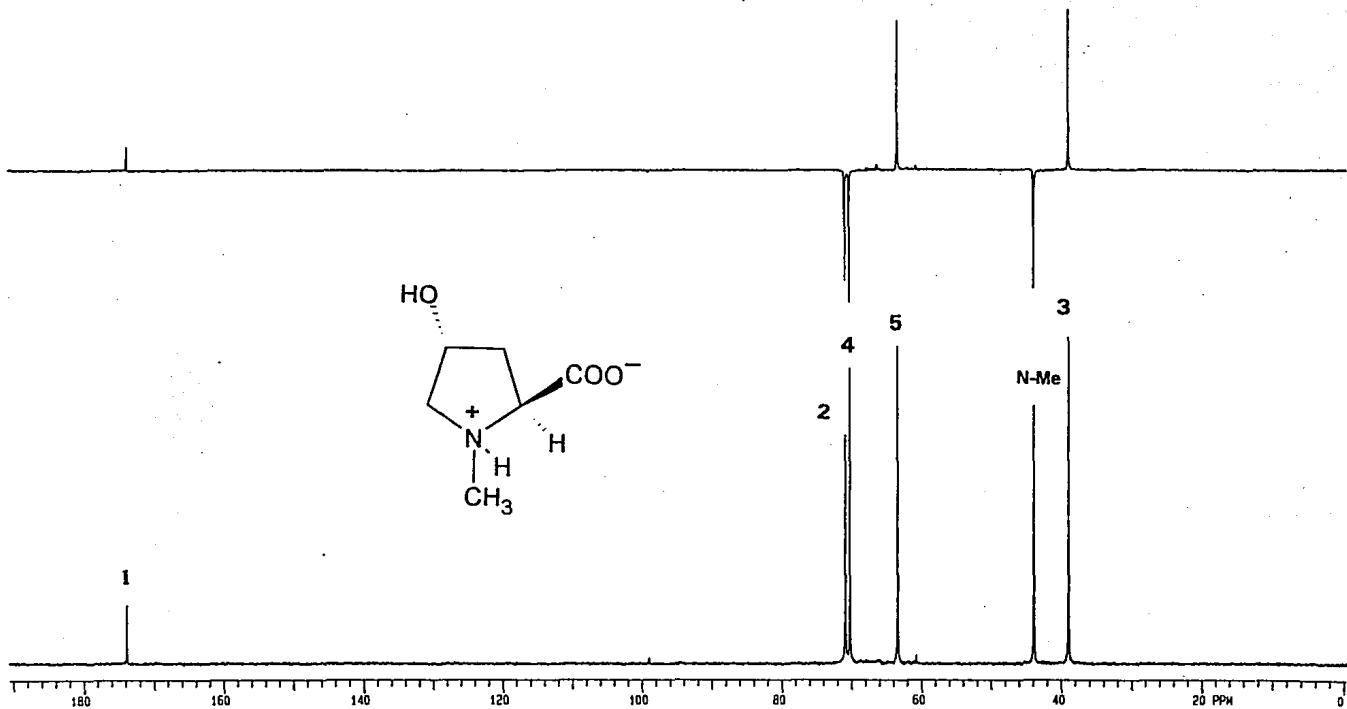
Espectro 14. Espectro de <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-HETCOR (Dioxano-*d*<sub>8</sub>) del ácido(-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).



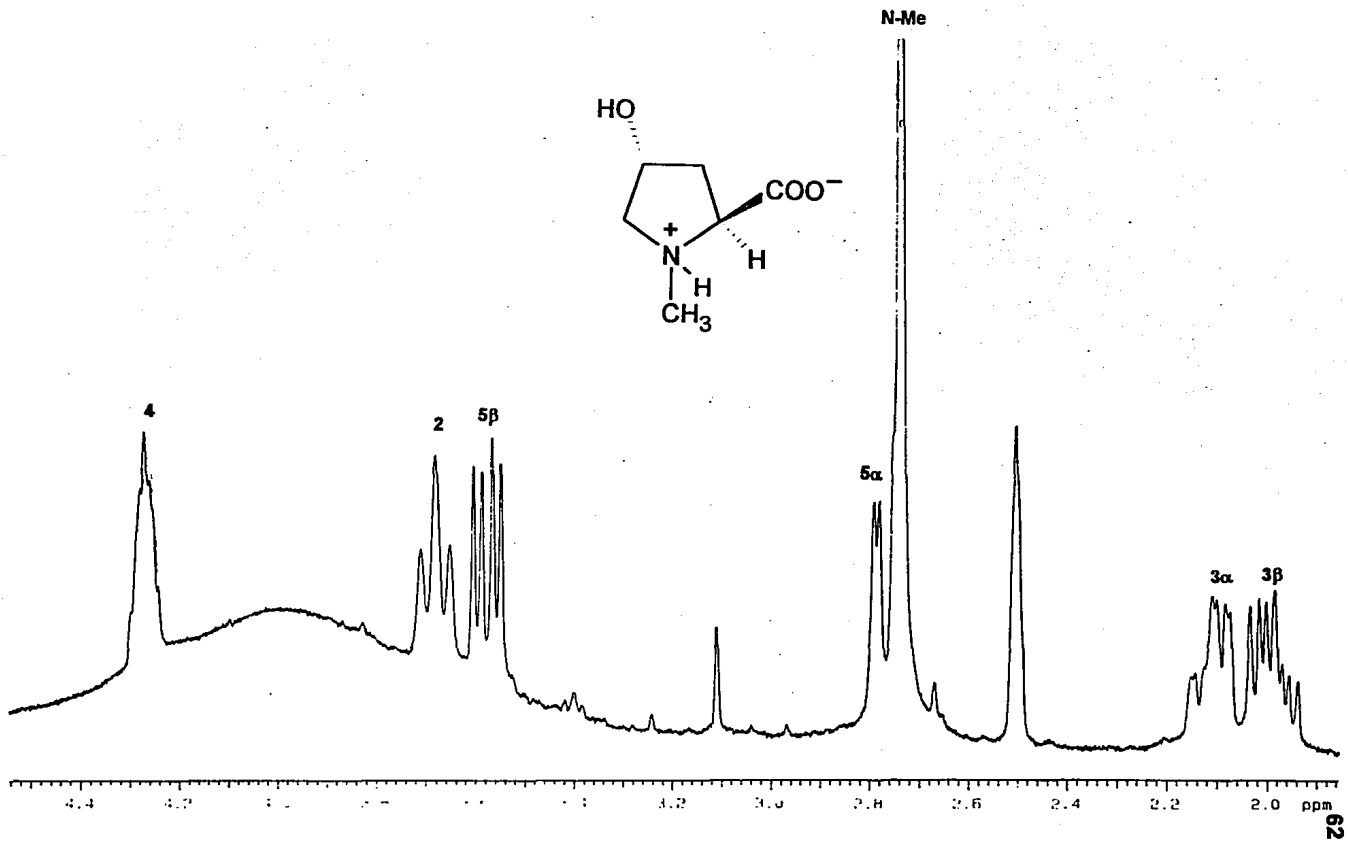
Espectro 15. Espectro de  $\text{rnm } ^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).



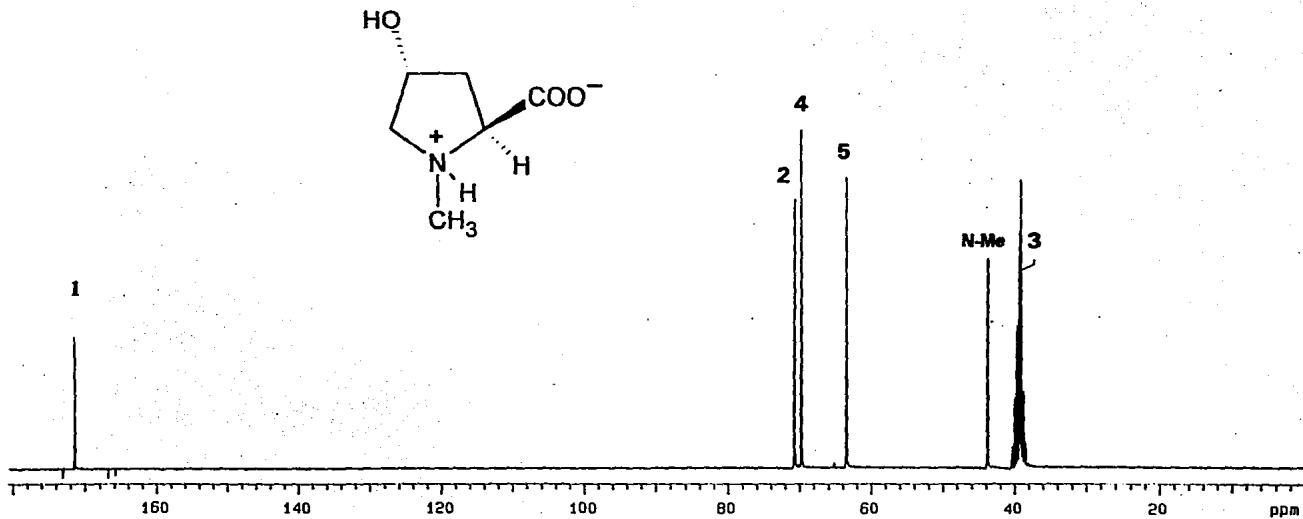
Espectro 16. Espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$ -COSY ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido(-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).



Espectro 17. Espectro de  $\text{rnm } ^{13}\text{C}$  y APT ( $\text{D}_2\text{O}$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**).



Espectro 18. Espectro de  $mn$   $^1H$  (DMSO- $d_6$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxi-pirrolidin-2-carboxílico (29).



Espectro 19. Espectro de  $\text{rnm } ^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ) del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (29).

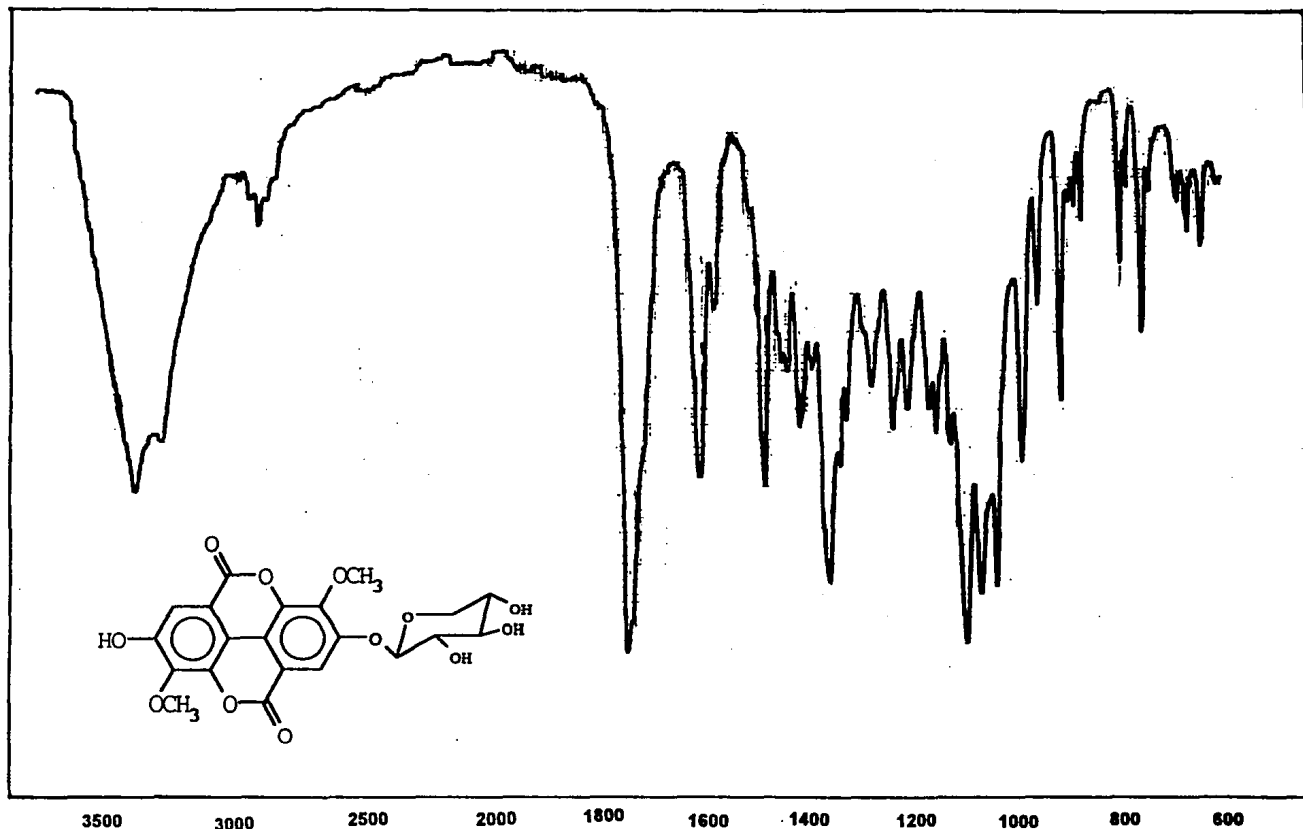


#### 4.2 Caracterización de compuestos del extracto clorofórmico de la corteza.

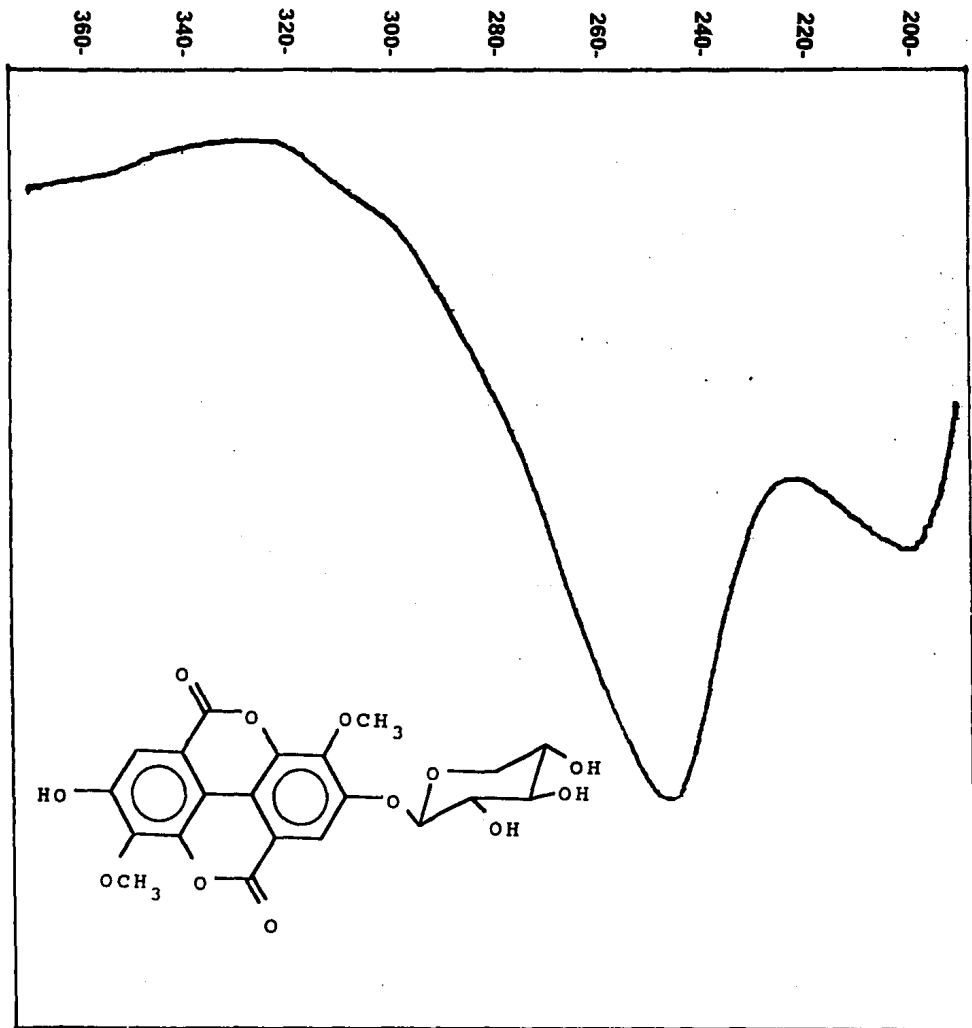
Con la finalidad de completar el estudio químico de la corteza, algunas fracciones (XI, XV y XXI, Cuadro 2) del extracto clorofórmico que no habían sido estudiadas se retomaron para su investigación. El estudio químico de las tres fracciones permitió el aislamiento y la caracterización de tres metabolitos secundarios. De la fracción XI se separó por recristalización en metanol un polvo cristalino blanco el cual se caracterizó por comparación directa con una muestra auténtica como la celaenodendrólida I (**28**), el mismo picrotoxano aislado del extracto metanólico de las semillas. De la fracción XXI, se purificó un sólido cristalino, que se caracterizó por comparación con una muestra auténtica del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**). Este último metabolito también se aisló del extracto metanólico de las semillas. Por último el tercer metabolito (Fracción XV) aislado corresponde a un glicósido del ácido elágico (Compuesto **31**) que resultó ser un nuevo producto natural, y su elucidación estructural será descrita en detalle a continuación.

El compuesto **31** se aisló como un sólido color crema, con un punto de fusión de 240-242 °C, ópticamente activo. Su espectro en el ir (Espectro 20) mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (banda amplia 3400-3290  $\text{cm}^{-1}$ ), carbonilo de lactona (1745  $\text{cm}^{-1}$ ) y aromaticidad (1605 y 1590  $\text{cm}^{-1}$ ). Los máximos de absorción observados en el espectro de uv (Espectro 21)  $\lambda_{\text{max}} = 202, 293$  y 356 nm confirmaron el carácter aromático del producto. La fórmula molecular se estableció por análisis elemental como  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$ , la cual permite trece grados de insaturación.

La reacción positiva del producto natural frente al reactivo de Molish indicó la naturaleza glicosídica, misma que se confirmó mediante la hidrólisis ácida y enzimática (celulasa) del compuesto. El único carbohidrato presente en los

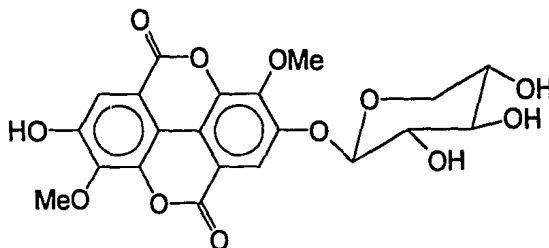


Espectro 20. Espectro de ir del éter 3,3-dimetílico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico (31).



Espectro 21. Espectro de uv del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico (31).

productos de hidrólisis fue la xilosa, la cual se detectó mediante ccf. En el cuadro 11 se resumen los datos físicos y espectroscópicos del producto **31**.



éter 3,3'-dimetilfílico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico (**31**).

p f =	240-242 °C
[α] <sup>20</sup> =	-22.7 (c=2, piridina)
ir λ max (KBr)	3400-3290, 1745, 1605, 1590, 1480, 1355, 1095, 1065, 990, 910 cm <sup>-1</sup> .....Espectro 20.
u v λ max (MeOH)	262, 293 (h), 356 .....Espectro 21.
Análisis elemental	C 54.42, H 3.83
Calculada para C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	C 54.54, H 3.89
Prueba de Molish	(+)

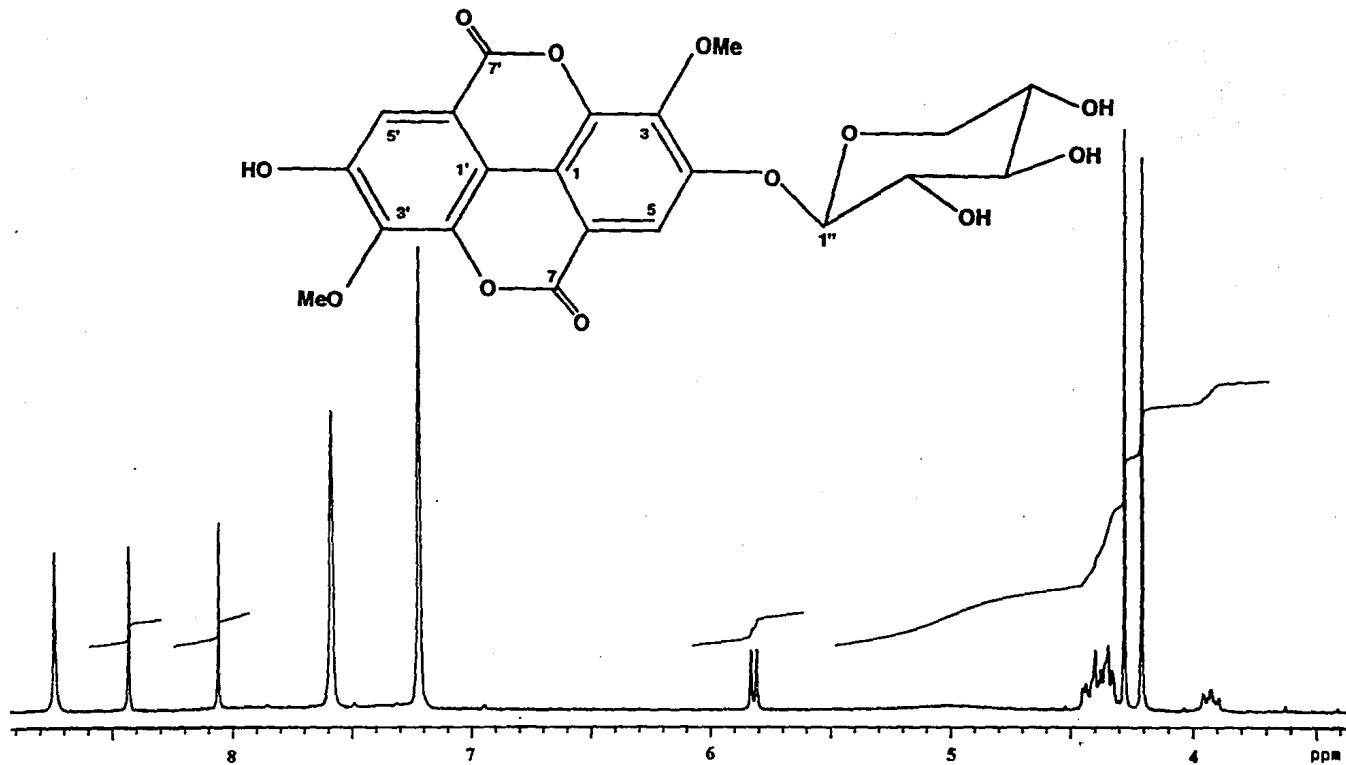
Cuadro 11. Datos físicos y espectroscópicos del compuesto **31**.

El espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  en piridina (Espectro 22) del producto natural resulta bastante simple y confirma la naturaleza glicosídica del mismo ya que en  $\delta$  5.82 se observa el doblete ( $J = 6.6$  Hz) característico del hidrógeno anomérico de una piranosa. De manera adicional, se observan resonancias para cinco hidrógenos unidos a carbonos oxigenados en la zona comprendida entre  $\delta$  3.93 y  $\delta$  4.45. El espectro presenta también señales para dos grupos metoxilos ( $\delta$  4.20 y  $\delta$  4.28) y para dos metinos ( $\delta$  8.04 y  $\delta$  8.42) de naturaleza aromática.

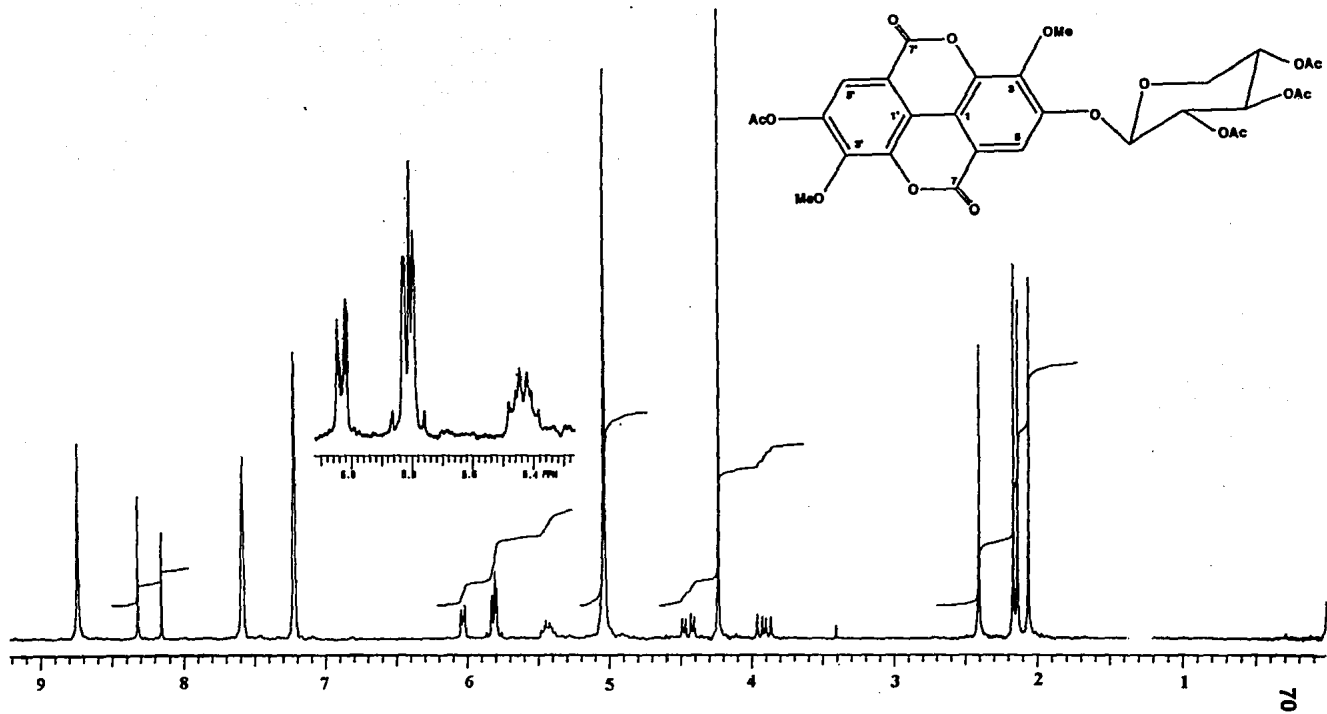
El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina generó un derivado tetraacetilado. La magnitud del desplazamiento químico de uno de los metilos ( $\delta$  2.4) de los cuatro grupos acetato observados en el espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  (Espectro 23) del derivado, claramente evidencia la presencia de una función fenólica en la molécula.

El espectro de  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$  (Espectro 24) presenta señales para 21 átomos de carbono en concordancia con la fórmula molecular establecida, de las cuales cinco ( $\delta$  103.7, 78.1, 74.5, 70.7 y 67.3) son asignables a la  $\beta$ -D-xilosa, por comparación con modelos adecuados (Aquino *et al.*, 1988).

El análisis del espectro de  $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ -DEPT (Espectro 25) y consideraciones de la teoría del desplazamiento químico permitieron asignar las otras señales de la siguiente forma: dos resonancias ( $\delta$  159.0 y  $\delta$  159.0) son atribuibles a carbonilos de lactona. Las señales en  $\delta$  61.3 y  $\delta$  61.9 deberían corresponder a los grupos metoxilos, evidenciados en la  $\text{rmn } ^1\text{H}$ . Por último, las doce señales restantes son asignables a los carbonos de dos anillos aromáticos. De los carbonos aromáticos, dos corresponden a metinos ( $\delta$  113.2 y  $\delta$  113.0) y los otros a carbonos cuaternarios, dos de los cuales ( $\delta$  113.9 y  $\delta$  112.7) son bases de un carbonilo de una y lactona. Los otros seis carbonos cuaternarios se encuentran unidos a funciones oxigenadas [dos a metoxilos ( $\delta$  143.0 y  $\delta$  141.3), dos a las

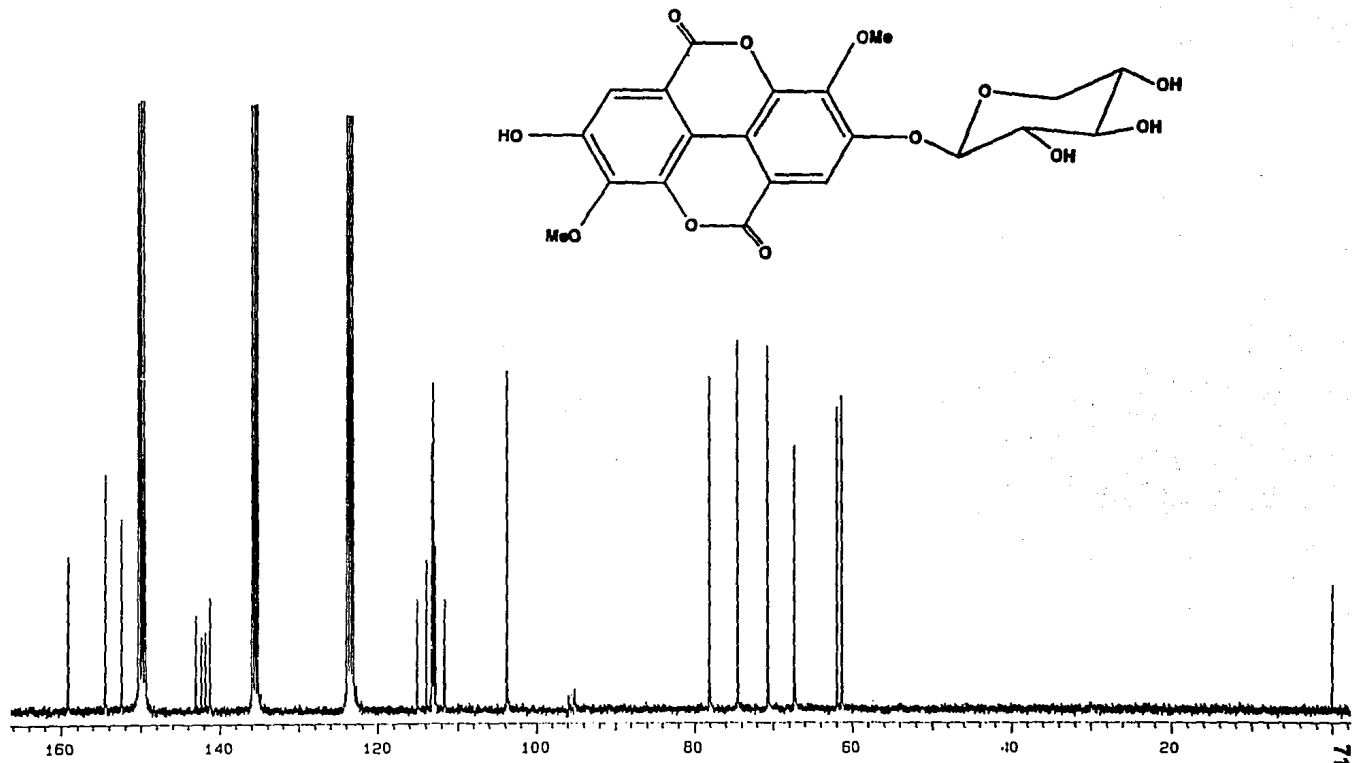


Espectro 22. Espectro de  $\text{rnm } ^1\text{H}$  del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico (31).



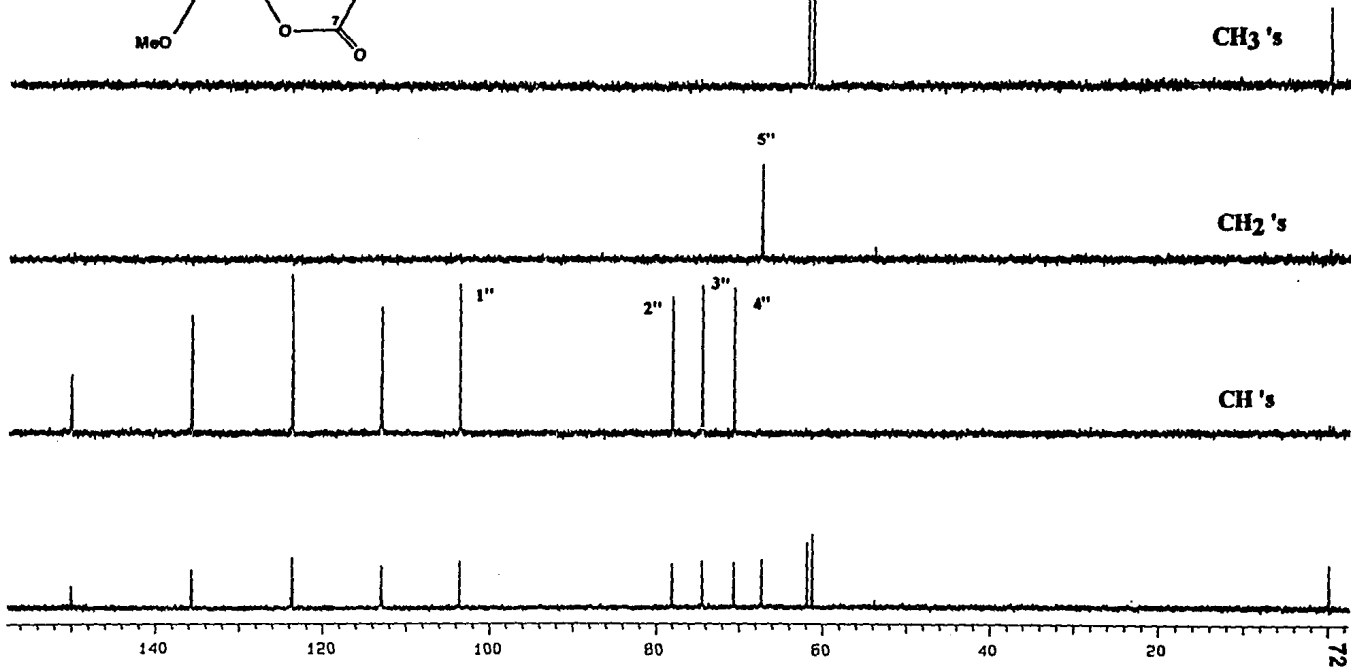
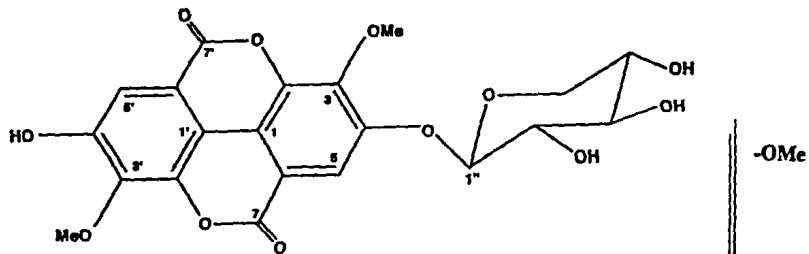
Espectro 23. Espectro de  $\text{rmn } ^1\text{H}$  del derivado acetilado del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico

(31A).



Espectro 24. Espectro de  $\text{rnm } ^{13}\text{C}$  del éter 3,3-dimetílico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico (31).





Espectro 25. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -DEPT del éter 3,3-dimetílico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico (31).

funciones lactonas ( $\delta$  142.3 y 141.8), uno a un hidroxilo ( $\delta$  154.3) y el último al grupo xilopiranosiloxi ( $\delta$  152.3).

La información derivada de los espectros de rmn permitió asignar los 13 grados de insaturación a partir de la fórmula molecular y permitió proponer que el producto natural es un derivado del ácido elágico (Figura 14) (Nawwar *et al.*, 1982).

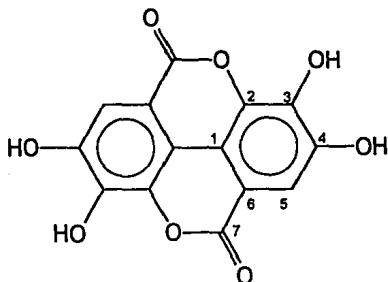


Figura 14. Estructura del ácido elágico.

Las evidencias presentadas hasta el momento permitieron sugerir dos posibles estructuras (Figura 15, A y B). Para discriminar entre ellas se analizaron los cuadros de conectividades en el espectro NOESY (Figura 16). La correlación entre el protón anomérico y uno de los protones aromáticos ( $\delta$  8.42) permitió ubicar el punto de unión del azúcar a la aglicona en la posición 4. Asimismo, la ausencia de correlaciones entre los metoxilos con alguno de los protones aromáticos permitió ubicar a estos grupos funcionales en las posiciones 3 y 3' y al hidroxilo restante en la posición 4'. Por lo tanto, la estructura correspondiente al compuesto **31** es la A de la Figura 15.

Los datos espectroscópicos del compuesto **31** se compararon con los descritos para el éter 3,3'-dimetilíco del ácido 4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil elágico (Nawwar *et*

al., 1982) encontrándose que son muy similares (Cuadro 12) a excepción de las señales para la porción sacárida de la molécula.

Con las evidencias presentadas para este nuevo producto natural, se propone la estructura A (Figura 15) para el compuesto **31** el cual corresponde al éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O-β-D-xilopiranosil elágico.

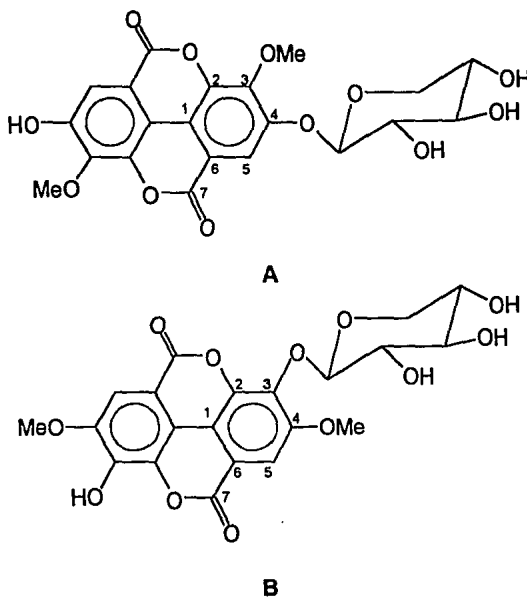


Figura 15. Posibles estructuras para el compuesto **31**.

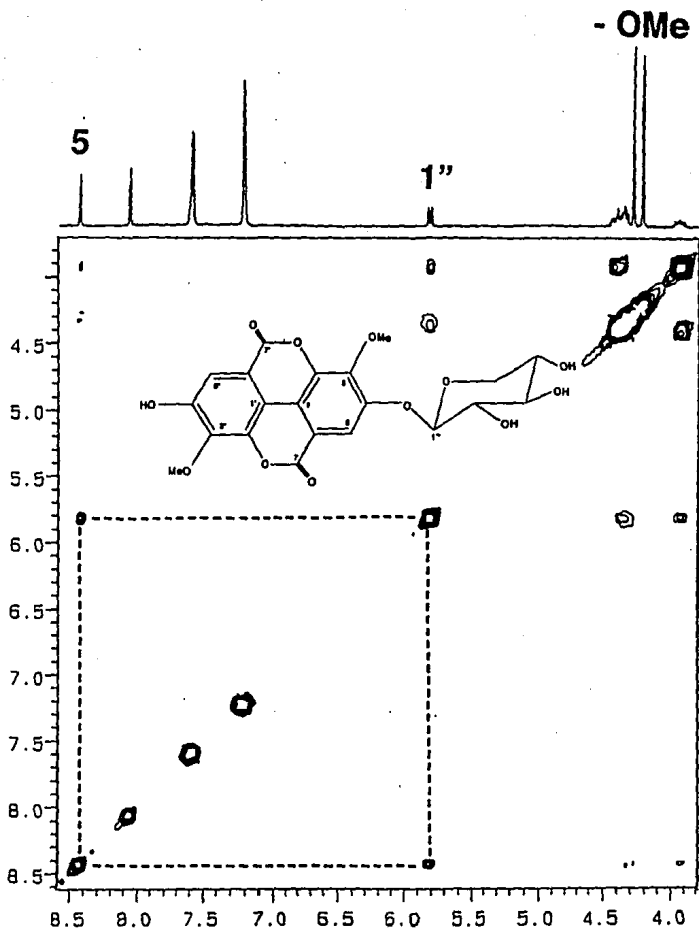


Figura 16. Espectro de  $\text{nm}^1\text{H}$ -NOESY del éter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico (**31**).

Carbono No.	Compuesto <u>31</u> ( $\delta$ ).	eter 3,3'-dimetílico del ácido -4- <u>O</u> - $\beta$ -D-glucopiranosil elágico ( $\delta$ ).	eter 3,3'-dimetílico del ácido elágico ( $\delta$ ).
1	115.0	114.7	118.8
2	142.3	141.9	141.1
3	143.0	142.5	140.2
4	152.3	151.9	153.0
5	113.2	112.7	111.4
6	113.9	113.0	112.0
7	159.0	159.0	158.3
1'	111.7	111.6	
2'	141.8	141.3	
3'	141.3	140.8	
4'	154.3	152.1	
5'	113.0	112.2	
6'	112.7	112.2	
7'	159.0	159.0	
1'' (Anom.)	103.7	101.9	
3'-OMe	61.3	61.7	
3 -OMe	61.9	62.3	60.9

Cuadro 12. Datos de  $rmn$   $^{13}C$  del compuesto 31, del eter 3,3'-dimetílico del ácido -4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil elágico y del eter 3-3'-dimetílico del ácido elágico (Nawwar *et al.*, 1982).

## V RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El estudio del contenido metabólico de las semillas de *C. mexicanum* Standl. permitió el aislamiento de tres metabolitos secundarios: la celaenodendrólida I (**28**), (un nuevo picrotoxano), un derivado de la prolina [ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico (**29**)] y el  $\beta$ -D-glucositosterol (**30**). La continuación del estudio del extracto clorofórmico de la corteza permitió el aislamiento de un derivado del ácido elágico [eter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico (**31**)]. Este último compuesto resulto ser un nuevo producto natural. De manera adicional se obtuvieron el picrotoxano (**28**) y el derivado de la prolina (**29**) que también fueron aislados de las semillas. El rendimiento de los metabolitos aislados de las semillas y de la corteza en el presente estudio, se muestran en el Cuadro 13.

COMPUESTO	mg OBTENIDOS	% DE RENDIMIENTO EN BASE A PLANTA SECA
Celaenodendrólida I ( <b>28</b> )	Semillas: 142	0.073
	Corteza: 140	0.016
ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico ( <b>29</b> )	Semillas: 1,270	0.653
	Corteza: 1,320	0.154
$\beta$ -D-glucositosterol ( <b>30</b> )	20	0.010
Eter 3,3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico ( <b>31</b> )	250	0.029

Cuadro 13. Rendimiento de los metabolitos secundarios aislados de las semillas y la corteza de *C. mexicana* Standl.

- La celaenodendrólida I constituye el segundo ejemplo de picrotoxanos del tipo pretoxina con una cadena lateral en C-16  $\alpha$  orientada. El análisis de las correlaciones observadas para H-18 con H-14 $\alpha$  y H-19 con H-7 en el espectro NOESY resultan la principal evidencia que permiten determinar la estereoquímica  $\alpha$  de la cadena lateral en C-16.
- El aislamiento de un derivado del ácido elágico (eter 3-3'-dimetilico del ácido 4-O- $\beta$ -D-xilopiranosil elágico) resulta relevante debido a que recientemente se ha descrito que este tipo de compuestos presentan actividad anticancerígena (Heur *et al.*, 1992).
- El aislamiento del ácido (-)-(2S, 4R)-1-metil-4-hidroxipirrolidin-2-carboxílico, podría relacionarse con el tiempo de recolección del material vegetal en la época de sequía, ya que se ha demostrado que este tipo de metabolitos se encuentran en las plantas como un regulador hídrico (Karamanos *et al.*, 1983).
- La evaluación del potencial antimicrobiano de los extractos de las semillas, corteza y partes aéreas, así como compuestos aislados de la corteza y semillas proporcionó resultados negativos en todos los casos. Estos resultados preliminares no permiten establecer conclusiones en relación al uso medicinal como agente antiséptico de esta especie.
- Los extractos de semillas y corteza, así como los metabolitos secundarios aislados, no presentaron ningún efecto significativo sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus* y *Echinochloa*.

- Por último, se recomienda evaluar al nuevo picrotoxano (celaenodendrólida I) como posible agente insecticida. En primer lugar, por las características de resistencia al ataque de insectos que se le atribuyen a la madera (Martijena, comunicación personal, 1990) y por otra parte debido a que este picrotoxano cumple con los requisitos estructurales necesarios para desarrollar un efecto antagónico sobre el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Kuwano, *et al.*, 1980; Ozoe and Matsumura, 1986). Los picrotoxanos del tipo de la pretoxina (**13**) no han sido evaluados como posibles agentes insecticidas, en consecuencia se desconoce la variación en la actividad biológica que pudiera derivarse de la influencia de los cuatro carbonos adicionales (C-16 - C-19) y sus diferentes arreglos, en relación a las estructuras de la picrotoxina (**11**) y sus análogos.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



**BIBLIOGRAFIA**

1. Anaya, A. L.; Calera, M.; Mata, R. y Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potencial of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.*, **16**(7), 2145-2152.
2. Aquino, R.; D'Agostino, M.; De Simone, F. y Pizza, C. (1988). 4-arylcumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, **27**(6), 1827-1830.
3. Bahena, A. (1992). Estudio fitoquímico de la corteza y semillas de *Celaendendron mexicanum* Standl. (Euphorbiaceae). Tesis de licenciatura, UNAM.
4. Biollaz, N. y Arigoni D. (1969). Biosynthesis of coriaryrtin and tutin. *Chem. Comm.* 633-634.
5. Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. and Swallon, W. H. (1979). Carbon-13 N. M. R. Analysis of tutin and related substances: Application to the identification of minor components of toxic honey. *Aust. J. Chem.* **32**, 1339-1343.
6. Castañeda, P. (1991) Aislamiento e identificación de un nuevo ent-labdano de la *Dodonea viscosa* (L.) Jacq (Sapindaceae) Estudio químico y biológico de *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM.
7. Castañeda, P.; García M. R.; Hernandez, B. E.; Torres B. A.; Anaya, A. L. y Mata, R. (1992). Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytopathogenic fungi. *J. of Chemical Ecology*, **18**(7), 1025-1037.

8. Corbella, A.; Gariboldi, P.; Jommi, G. y Scolastico, C. (1969a). Biosynthesis of titin. *Chem. Comm.* 634-635.
9. Corbella, A.; Gariboldi, P. y Jommi, G. (1973). Aspects of the biosynthesis of the terpenoid dendrobine. *J. C. S. Chem comm.* 729-730.
10. Corbella, A.; Jommi, G.; Rindone, B. y Scolastico, C. (1969b). Structure of pretoxin and lambicin. *Tetrahedron*, **25**, 4835-4841.
11. Dahmén, J. y Leander, K. (1978). Amotin and amoenin two sesquiterpenes of the picrotoxane group from *Dendrobium amoenum*. *Phytochemistry*, **17**, 1949-1952.
12. Finegold, S. M. y Baron, E. S. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, (1986) The C. U. Mosby Company, 7<sup>a</sup> Ed. Cap. 13, 173-175.
13. García, E. (1993). Aislamiento y caracterización de la dihidroisohyenanquina de *Celaenodendron mexicanum* Standl. (Euphorbiaceae) y estudio fitoquímico preliminar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). Tesis de licenciatura, UNAM.
14. Herbert, R. B. (1989). The biosynthesis of secondary metabolites, London, New York Chapman and Hall. 2<sup>a</sup> Ed. cap. 4, 83-84

15. Heur, Y. H.; Zeng, W.; Stoner, G. D.; Nemeth, G. A. y Hilton, B. (1992). Synthesis of ellagic acid O-alkyl derivatives and isolation of ellagic acid as a tetrahexanoyl derivative from *Fragaria ananassa*. *Journal of Natural Products*, **55** (10) 1402-1407.
16. Jury, S. L. (1987). The Euphorbiales: Chemistry, Taxonomi and Economics.  
**63**
17. Karamanos, A. S.; Drossopoulos, J. B. y Niavis, L. A. (1983). Free proline accumulation during development of two wheat cultivars with water stress. *Journal of Agricultural Science*. **100**, 429-439.
18. Koike, K.; Fukuda, H.; Mitsunaga, K. y Ohmoto, T. (1991a). Picodendrins B, G and J, nex picrotoxane terpenoids from *Picrodendron baccatum*. *Chem. Pharm. Bull.*, **39** (4), 934-936
19. Koike, K.; Ohmoto, T.; Kawai, T. y Sato, T. (1991b). Picrotoxane terpenoids from *Picrodendron baccatum*. *Phytochemistry*, **30**(10), 3353-3356.
20. Kuwano, E.; Ohshima, K. y Eto, M. (1980). Syntheses and insecticidal activity of 8-Isopropyl-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-7-one, a partial skeleton of picrotoxinin, and related compounds. *Agric. Biol Chem*. **44**(2), 383-386.
21. Mannito, P. (1981). Biosynthesys of Natural Products. Ellis Hornod, ltd. publishers. Cap. 5, 242-244.
22. Martineja, N.; Comunicación personal, (1990).

23. Martínez, M. (1979). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. 1ª Ed. Fondo de Cultura Económica, México.
24. Nawwar, M. A. M.; Buddrus, J. y Bauer, H. (1982). Dimeric phenolic constituents from the root of *Tamarix nilotica*. *Phytochemistry*, **21**, 1755-1758.
25. Ohmoto, T.; Koike, K.; Fukuda, H.; Mitsunaga, K.; Kagei, K.; Kawai, T. y Sato, T. (1989). Studies on the constituents of *Picodendron baccatum* growing in Indonesia. Structure of a norditerpene lactone, picodendrin A. *Chem Pharm Bull.*, **37**(7), 1805-1807.
26. Okuda, T. y Yoshida, T. (1965). Establishment of the structural correlation between coriamyrtin and tutin. *Tetrahedron Letters.*, **47**, 4191-4197.
27. Ozoe, Y. y Matsumura, F. (1986). Structural requirements for bridged bicyclic compound acting on picrotoxinin receptor. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 126-134.
28. Porter, L. A. (1967). Picrotoxinin and related substances. *Chem. Rev.* **67**, 441-463.
29. Rodríguez, V. (1991). Dos nuevos glicosidos diterpenicos de tipo ent-atisenos de las raices de *Stevia salicifolia* Cav. una planta medicinal Mexicana. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, UNAM,
30. Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R. y Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extract and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **35**, 275-283

31. Sciuto, S.; Chillemi, R.; Piattelly, M. y Impelliseri, G. (1983). The identification of 4-hydroxy-N-methyl proline in the red alga *Chondria cuorulescens*-spectral information. *Phytochemistry*, **22** (10), 2311-2312
32. Shriner, R. L.; Fuson, R. C. y Curtin, D.Y. (1986) Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos, Cap. 10, 1ª Ed. Limusa, México.
33. Sthal, E. (1969). Thin Layer Chromatography, Ed. Bollinger, G., Berlín.
34. Suzuki, Y.; Koike, K. y Ohmoto, T. (1992). Eight picotoxane terpenoids, picodendrins K-R from *Picodendron baccatum*. *Phytochemistry*, **31**(6), 2059-2064
35. Takeuchi, A. and Takeuchi, N. (1969). *J. Physiology*, **205**, 377.
35. Ticku, M. K.; Ban, M. and Olser, R. W. (1978). *Mol Pharmacol.*, **14**, 39.