



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

198

**"Swietenia humilis Zuccarini (Meliaceae) y Malmea
depressa (Baill.) R. E. Fries (Annonaceae) COMO FUENTES
POTENCIALES DE AGENTES PESTICIDAS".**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

(FARMACIA)

P R E S E N T A:

M. EN C. MA. ADELINA JIMENEZ ARELLANES

MEXICO, D.F.,

1997.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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. Alfonso Romo de Vivar
Primer Vocal	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Segundo Vocal	Dr. Blas Lotina Hensen
Tercer Vocal	Dr. John Thor Arnason
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer Suplente	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Segundo Suplente	Dra. Ma. Alejandra Rojas Molina

Sustentante

M. en C. Ma. Adelina Jiménez Arellanes.

Asesor

Dra. Rachel Mata de Espíndola.

Sitios de realización de la Tesis

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

Laboratorio 6 de la Unidad de Plantas Medicinales del Instituto de Química de la UNAM.

Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Ottawa, Ottawa Canadá. Realización de los ensayos para determinar la potencialidad insecticida de los limonoides de *Swietenia humilis*.

Laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Química de la UNAM. Realización de los ensayos para determinar el efecto del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre varias actividades fotosintéticas.

Laboratorio de Endocrinología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Realización de los ensayos para determinar el efecto sobre la contractilidad del músculo liso de la humilínolida A.

Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Determinación de la potencialidad antifúngica contra hongos fitopatógenos del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN206795, IN205197, IN203394 e IN 202493; PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) Nos. 005328, 005361, 005384 y FQ-5006; y al CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) convenios 400313-5-2576PM y 400313-5-2358PN. Para la realización de mis estudios de posgrado resulté beneficiada con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. A estas organizaciones y dependencias mi gratitud.

Agradezco también a los siguientes investigadores y personal técnico por su contribución al desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Investigadora del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por proporcionar el material vegetal correspondiente a la corteza y madera de la especie *Malmea depressa* y por su asesoría para la realización de los ensayos de actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos.

Al Dr. Blas Lotina-Hennsen, investigador del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por su valiosa dirección para la determinación del efecto del compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)-benceno sobre diversas actividades fotosintéticas.

Al Dr. John Thor Arnason, Investigador del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Ottawa, Canadá por su valiosa asesoría y por las facilidades brindadas para la determinación del potencial insecticida de los limonoides obtenidos de *Swietenia humilis*.

A la Dra. Mercedes Perusquía Nava, Investigadora del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su diligente apoyo para determinar el efecto espasmogénico de la humilinólida A.

Al Dr. Robert Bye, Director del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, por su colaboración en la colecta e identificación de las semillas de *Swietenia humilis*.

Al Biólogo Gustavo Carmona Díaz por la colecta de las hojas de *Malmea depressa*.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera, Investigador del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por la realización de los ensayos encaminados a determinar la posible actividad antiprotozoaria de los limonoides aislados de *S. humilis*.

Al Dr. Jerry McLaughlin, Investigador de la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos, por facilitar los trámites necesarios para la determinación de la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos en el presente estudio.

A los miembros de mi comité tutelar integrado por los Doctores Rogelio Pereda Miranda, Ana Luisa Anaya y Blas Lotina-Hennsen por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto de tesis.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de algunos de los espectros de IR.

A la Q.B.F. Rocío Patiño del laboratorio de espectroscopia del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de UV, IR, rotación óptica y dicroísmo circular.

Al I.Q. Luis Velasco I. y al M. en C. Javier Pérez del laboratorio de espectroscopía de masas del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas y por el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

A los prestadores de servicio social del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia y del Laboratorio 6 de la Unidad de Investigación en Plantas Medicinales del Instituto de Química de la UNAM.

A la M. en C. Imelda Velázquez Montes del Centro de Información Química de la Facultad de Química de la UNAM, por la revisión bibliográfica computarizada.

Deseo agradecer a los miembros del jurado designado para la revisión de la presente disertación por su diligente colaboración durante el proceso de revisión. En particular agradezco al Dr. Rogelio Pereda Miranda por sus valiosos comentarios que permitieron mejorar notablemente la versión final de la tesis.

Por último, agradezco de manera especial a mi asesora, Dra. Rachel Mata de Espíndola, por su invaluable dirección para llevar a buen término el presente trabajo de investigación, quién por su constante superación académica y gran calidad humana, constituye un ejemplo para las futuras generaciones de investigadores en el campo de los productos naturales.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis padres, Marcos y Carmen, y de mi Abue Cris por su gran ejemplo de lucha y superación. Que Dios los tenga en su gloria.

A mis hermanos Eulalia, Nereo y Martha, Estela y Avelino, Abel y María y René y Minerva, por estar conmigo en todo momento, por su consejos y apoyo. Simplemente gracias.

A todos mis sobrino

esperando que nunca dejen de luchar y que alcancen todos sus metas.

A mi tía Juanita y a mi prima Doris y Familia por su gran apoyo, cariño y comprensión en todo momento. Gracias.

A las familias Ramírez Vargas, Hernández de Jesús y Castañeda López, les agradezco su amistad.

A mis amigas y amigos, Perlita, Leda, Martha, Susana, Dora E. , José Cano, Sadot, Mustafa, por los momentos compartidos.

A Carlos G. H. con afecto y cariño.

A la Dra. Rachel Mata, por el apoyo académico y moral en los momentos difíciles, mil gracias.

ÍNDICE

	Páginas
LISTA DE TABLAS.	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ESPECTROS.	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.	xiii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xx

CONTENIDO

CAPITULO I. ANTECEDENTES GENERALES Y JUSTIFICACIÓN.

I.1. Productos naturales de origen vegetal como una fuente potencial de agentes pesticidas.	1
I.2. Limonoides de Meliáceas como una fuente potencial de agentes insecticidas.	9
I.3. Generalidades sobre la especie <i>Swietenia humilis</i> Zuccarini.	18
I.3.1. Consideraciones botánicas y etnobotánicas.	18
I.3.2. Metabolitos secundarios del género <i>Swietenia</i> .	20
I.3.3. Propiedades biológicas de extractos y limonoides aislados del género <i>Swietenia</i> .	32
I.4. Generalidades del gusano barrenador del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i> Hübner).	33
I.5. Generalidades sobre <i>Malmea depressa</i> .	36
I.6. El proceso de la fotosíntesis.	37
I.6.1. Consideraciones generalidades.	37
I.6.2. Reacciones luminosas de la fotosíntesis.	43
I.6.3. Transporte de electrones.	44
I.7. La fotosíntesis como blanco de acción de fitotoxinas de origen natural.	46

CAPITULO II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

II.1. Hipótesis.	53
II.2. Objetivos principales.	53
II.3. Objetivos particulares.	54
II.3.1. Objetivos específicos para el estudio de la especie <i>Malmea depressa</i> .	54
II.3.2. Objetivos específicos para el estudio de la especie <i>Swietenia humilis</i> .	55

CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL.

III.1. Procedimientos experimentales generales.	57
III.1.1. Métodos cromatográficos.	57
III.1.2. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos naturales.	58
III.2. Procedimientos para la evaluación del potencial biológico de los extractos y productos naturales derivados de <i>S. humilis</i> y <i>M. depressa</i> .	59
III.2.1. Determinación de la actividad insecticida de los extractos y productos derivados de <i>S. humilis</i> .	59
III.2.1.1. Preparación de la dieta del insecto (control y problema).	60
III.2.1.2. Procedimiento del bioensayo.	61
III.2.2. Determinación del efecto de la humilínolida A sobre la contracción espontánea de íleon de cobayo.	63
III.2.3. Determinación del potencial fitotóxico de los extractos y productos naturales derivados de <i>M. depressa</i> .	64
III.2.3.1. Método bioautográfico.	64
III.2.3.2. Método de la caja Petri.	65
III.2.4. Determinación del potencial antifúngico de los extractos y de los productos de <i>M. depressa</i> .	66
III.2.4.1. Efecto sobre hongos patógenos para el hombre.	66
III.2.4.1.1. Preparación del inóculo.	67
III.2.4.1.2. Bioensayo	67
III.2.4.2. Efecto sobre hongos fitopatógenos <i>Phytium</i> spp., <i>Helminthosporium</i> spp. y <i>Fusarium oxysporum</i> .	68
III.2.5. Determinación del potencial citotóxico del extracto y compuestos puros de <i>S. humilis</i> y <i>M. depressa</i> .	68
III.2.6. Evaluación del efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno obtenido de <i>M. depressa</i> sobre varias actividades fotosintéticas en cloroplastos aislados de espinacas.	68
III.2.6.1. Aislamiento de cloroplastos.	68
III.2.6.2. Cuantificación de clorofila.	69
III.2.6.3. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno sobre el transporte de electrones no cíclico.	69
III.2.6.3.1. Determinación del transporte de electrones basal no cíclico de H ₂ O a MV.	71
III.2.6.3.2. Determinación del transporte de electrones desacoplado no cíclico de H ₂ O a MV.	71
III.2.6.3.3. Determinación del transporte de electrones fosforilante no cíclico de H ₂ O a MV.	71
III.2.6.4. Síntesis de ATP.	72
III.2.6.5. Captación de protones.	73
III.2.6.6. Reacciones parciales de los fotosistemas I y II (FSI y FSII)	73
III.2.6.6.1. Determinación del transporte de electrones desacoplado	

en el FSII de H ₂ O a DCPIP/K ₃ Fe(CN) ₆	73
III.2.6.6.2. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSII de H ₂ O a SiMo	74
III.2.6.6.3. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSII de DCP a DCPIP	74
III.2.6.6.4. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP/reducido a MV	75
III.2.6.6.5. Determinación del transporte de electrones desacoplado en el FSI de PMS/reducido a MV	75
III.3. Obtención de los principios bioactivos de <i>S. humilis</i> .	76
III.3.1. Material vegetal.	76
III.3.2. Preparación del extracto orgánico (CHCl ₃) de las semillas de <i>S. humilis</i> .	76
III.3.3. Fraccionamiento preliminar del extracto CHCl ₃ de las semillas de <i>S. humilis</i> .	77
III.3.4. Aislamiento y caracterización de los constituyentes de <i>S. humilis</i> .	78
III.3.4.1. Aislamiento de la humilinólida B (27) y humilinólida C (28)	78
III.3.4.2. Aislamiento de la humilinólida A (26), humilinólida D (29) y swietemahonina C (36).	79
III.3.4.3. Aislamiento de la humilina B (30) y swietenina C (44)	81
III.3.4.4. Aislamiento del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a), metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglató (25b), humilinólida E (55) y humilinólida F (56).	83
III.4. Obtención de los principios activos de <i>M. depressa</i> .	85
III.4.1. Material vegetal.	85
III.4.2. Obtención del aceite esencial a partir de las hojas y de la madera de <i>M. depressa</i> .	86
III.4.3. Preparación del extracto orgánico (CHCl ₃) de <i>M. depressa</i> .	86
III.4.4. Fraccionamiento biodirigido del extracto CHCl ₃ de la madera de <i>M. depressa</i> .	87
III.4.5. Aislamiento de los constituyentes fitoinhibidores de <i>M. depressa</i> .	88
III.4.6. Aislamiento de la alantoina.	89
III.4.7. Cuantificación y caracterización de los constituyente de los aceites esenciales preparados a partir de las hojas y de la madera de <i>M. depressa</i> .	89
 CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE <i>Malmea depressa</i> .	
IV.1. Preselección y selección de la especie <i>M. depressa</i> como una fuente potencial de agentes fitotóxicos.	90
IV.2. Caracterización de los compuestos fitotóxicos obtenidos del extracto clorofórmico de la corteza de <i>M. depressa</i> .	97
IV.3. Evaluación del potencial fitoinhibidor de los metabolitos secundarios de <i>M. depressa</i> .	105

IV.4. Evaluación del compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre diversas actividades fotosintéticas.	108
IV.4.1. Síntesis de ATP y captación de protones.	109
IV.4.2. Transporte de electrones.	110
IV.4.3. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre las reacciones parciales de la cadena redox en el transporte de electrones a nivel de los FSI y II.	113
IV.5. Identificación de los constituyentes presentes en los aceites esenciales derivados de las hojas, de la corteza y de la madera de <i>M. depressa</i> .	118
IV.6. Potencial citotóxico y antifúngico de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno.	122
IV.7. Conclusiones.	123
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN SOBRE EL ESTUDIO DE LOS PRINCIPIOS INSECTICIDAS DE <i>Swietenia humilis</i> Zuccarini.	
V.1. Determinación de la potencialidad insecticida de <i>Swietenia humilis</i> .	125
V.2. Aislamiento de los metabolitos secundarios del extracto clorofórmico activo de las semillas de <i>S. humilis</i> .	126
V.3. Caracterización de las mexicanólidas obtenidas del extracto clorofórmico de las semillas de <i>S. humilis</i> .	130
V.3.1. Identificación de la humilinólida E (55), el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	132
V.3.2. Identificación de la humilinólida F (56)	144
V.4. Evaluación del potencial insecticida de los limonoides aislados de <i>S. humilis</i> sobre las larvas de <i>Ostrinia nubilais</i> .	150
V.5. Otras actividades biológicas exploradas para los limonoides de <i>S. humilis</i> .	158
V.6. Conclusiones.	161
PERSPECTIVAS GENERALES DEL PRESENTE TRABAJO.	163
BIBLIOGRAFIA.	167
APÉNDICE I. ESPECTROS.	186
APÉNDICE II. RESULTADOS ADICIONALES DE LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INSECTICIDA DE LOS LIMONOIDES DE <i>S. humilis</i> .	245
APÉNDICE III. ARTICULOS GENERADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.	258

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación química de limonoides.	11
Tabla 2. Limonoides aislados en el género <i>Swietenia</i> .	23
Tabla 3. Periodos de desarrollo del gusano barrenador del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i>).	35
Tabla 4. Fraccionamiento preliminar del extracto CHCl ₃ de las semillas de <i>S. humilis</i> .	77
Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la fracción SII.	78
Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción SIII.	80
Tabla 7. Recromatografía en columna de la fracción secundaria SIIIG.	82
Tabla 8. Fraccionamiento preliminar biodirigido del extracto orgánico de la corteza de <i>M. depressa</i> .	87
Tabla 9. Efecto fitoinhibidor de los extractos clorofórmicos de la corteza y de la madera de <i>M. depressa</i> .	92
Tabla 10. Fragmentos presentes en los espectros de masas de los compuestos 59-61 .	97
Tabla 11. Desplazamientos químico (ppm) obtenidos en RMN- ¹ H para los cinco metabolitos secundarios aislados del extracto clorofórmico de la corteza de <i>M. depressa</i> .	99
Tabla 12. Desplazamientos químico (ppm) obtenidos en RMN- ¹³ C para los cinco metabolitos secundarios aislados del extracto clorofórmico de la corteza de <i>M. depressa</i> .	99
Tabla 13. Efecto fitoinhibidor de los compuestos puros de <i>M. depressa</i> .	106
Tabla 14. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre las reacciones generales de la fotosíntesis.	111
Tabla 15. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre las diversas reacciones parciales de los FSI y II.	115
Tabla 16. Actividad citotóxica del extracto orgánico de la corteza de <i>M. depressa</i> y del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil) benceno.	122
Tabla 17. Metabolitos secundarios aislados de las semillas de <i>S. humilis</i> .	127
Tabla 18. Datos de RMN- ¹ H para los compuestos 25a, 25b, 28, 29, 44 y 55 .	135
Tabla 19. Datos de RMN- ¹³ C para los compuestos 25a, 25b, 28, 29, 44 y 55 .	136
Tabla 20. Datos de RMN- ¹ H para los compuestos 26, 27, 30,36 y 56 .	145
Tabla 21. Datos de RMN- ¹³ C para los compuestos 26, 27, 30,36 y 56 .	146
Tabla 22. Efecto de las humilínolidas A-D (26-29) sobre el crecimiento y mortalidad de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	151
Tabla 23. Efecto de la humilínolida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-	

meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el crecimiento y mortalidad de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	246
Tabla 24. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el crecimiento y mortalidad de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	247
Tabla 25. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre otros parámetros de desarrollo de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	248
Tabla 26. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre otros parámetros de desarrollo de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	249
Tabla 27. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre otros parámetros de desarrollo de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	
Tabla 28. Actividad citotóxica de los limonoides aislados de las semillas de <i>S. humilis</i> .	159
Tabla 29. Resultados de la actividad antiamebiana de las humilinólidas A-D (26-29) sobre <i>Entamoeba histolítica</i> y <i>Giardia lamblia</i> .	160
Tabla 30. Efecto de la humilinólida A (26) sobre la contracción espontánea de íleon de cobayo.	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formación del núcleo apotirucalol.	9
Figura 2. Formación del núcleo tetranortriperpenoide.	9
Figura 3. Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides.	12
Figura 4. Distribución del género <i>Swietenia</i> (<i>S. humilis</i>).	18
Figura 5. Distribución del género <i>Swietenia</i> (<i>S. macrophylla</i>).	19
Figura 6. Distribución del género <i>Swietenia</i> (<i>S. mahogani</i>).	19
Figura 7. Biosíntesis del núcleo mexicanólida.	22
Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género <i>Swietenia</i> .	26
Figura 9. Representación de la estructura esquemática de un cloroplasto.	39
Figura 10. Representación esquemática de la grana.	40
Figura 11. Organización de los componentes de la fotosíntesis en la membrana tilacoidal. A) Distribución de los FS II y II y el complejo Cit b ₆ /f. B) Ampliación de un fotosistema mostrando el centro de reacción, clorofilas antena y pigmentos antena.	42
Figura 12. Esquema Z. Representa a las enzimas redox del transporte de electrones en la membrana del tilacoide ordenadas por su potencial estándar de reducción, las flechas más largas indican fotoexcitación y las cortas indican transporte de electrones.	45
Figura 13. Efecto del extracto clorofórmico de la corteza de <i>M depressa</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	92
Figura 14. Actividad antifúngica del extracto CHCl ₃ de <i>M. depressa</i> .	93
Figura 15. Bioautografía de la fracción primaria MI.	95
Figura 16. Estructura de los metabolitos secundarios aislados de la corteza de <i>M. depressa</i> .	96
Figura 17. Espectro COSY (¹ H- ¹ H) del compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57).	100
Figura 18. Espectro COSY (¹ H- ¹ H) del compuesto 2,3,4,5-trametoxibenzaldehído (58).	103
Figura 19. Experimento de asociación NOE del compuesto 2,3,4,5-trametoxibenzaldehído. A) Irradiación de la señal en δ _H 10.29 (58). B) Irradiación de la señal en δ _H 7.10 (58).	104
Figura 20. Efecto del extracto clorofórmico del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .	106
Figura 21. Efecto del extracto clorofórmico del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre la síntesis de ATP y	

captación de protones.	110
Figura 22. Efecto del extracto clorofórmico del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado son 580, 488 y 1280 $\mu\text{eqe}^- \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{mg clorofila}^{-1}$.	112
Figura 23. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el FSII de H ₂ O a DCPIP/K ₃ Fe(CN) ₆ (Cit b ₆ /f)	114
Figura 24. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el FSII de H ₂ O a SiMo (FeO)	115
Figura 25. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el FSII de DCP (H ₂ O) a DCPIP (Cit b ₆ /f)	116
Figura 26. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el FSI de PMS reducido (P ₇₀₀) a MV (NADPH)	116
Figura 27. Determinación del flujo de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP reducido (Cit b ₆ /f) a MV (NADPH)	117
Figura 28. Cromatograma del aceite esencial de la madera de <i>M. depressa</i> .	119
Figura 29. Cromatograma del aceite esencial de la corteza de <i>M. depressa</i> .	120
Figura 30. Cromatograma del aceite esencial de las hojas de <i>M. depressa</i> .	120
Figura 31. Estructura de los limonoides aislados de las semillas de <i>S. humilis</i> .	128
Figura 32. Vista estereoscópica de la humilinólida D (29).	131
Figura 33. Vista estereoscópica de la swietemahonina C (36).	131
Figura 34. Correlaciones de H-6 con C-5, C-4 y C-28 en el espectro de HMBC (500 MHz, CHCl ₃ -d) de la humilinólida E (55).	137
Figura 35. Correlaciones de H-6 con el carbonilo C-7 y con el carbonilo de la función acetoxi en C-6 en el espectro de HMBC (500 MHz, CHCl ₃ -d) de la humilinólida E (55).	138
Figura 36. Correlación homonuclear de los protones H-5 y H-6, H-26 y H-32 en el espectro COSY de la humilinólida E (55).	138
Figura 37. Correlaciones de H-32 con el carbonilo C-24 y con los carbonos C-25 y C-26 en el espectro de HMBC (500 MHz, CHCl ₃ -d) de la humilinólida E (55).	139
Figura 38. Fragmentación característica de los limonoides con núcleo mexicanólida (Kadota <i>et al.</i> , 1990a, 1990b).	140
Figura 39. Correlaciones homonucleares de H-3/H-29, H-28; H-5/H-3, H-6; H-19/H-6; H-18/H-14, H-21; H-26/H-29, H-6, H-5 y H-32 en el espectro NOESY de la humilinólida E (55).	141
Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de la humilinólida E (55).	142
Figura 41. Correlaciones más importantes observadas para la humilinólida F (56).	148
Figura 42. Correlaciones homonucleares de H-3/H-29, H-28; H-5/H-3,	

H-6; H-19/H-6; H-18/H-14, H-21; H-26/H-29, H-6, H-5 y H-32 en el espectro NOESY de la humilinólida F (56).	149
Figura 43. Espectro de dicroísmo circular de la humilinólida E (55).	150
Figura 44. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	152
Figura 45. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso máximo de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	250
Figura 46. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso promedio de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	250
Figura 47. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el peso promedio de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	251
Figura 48. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) a la concentración de 50 ppm sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	153
Figura 49. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) a la concentración de 5 ppm sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .	251
Figura 50. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el porcentaje de pupación.	154
Figura 51. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el porcentaje de pupación.	252
Figura 52. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio de las pupas.	252
Figura 53. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso promedio de las pupas.	253
Figura 54. Efecto de la humilina B (30) y de swietenina C (44) sobre el peso promedio de las pupas.	253
Figura 55. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el tiempo promedio de pupación.	154
Figura 56. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el tiempo promedio de pupación.	254
Figura 57. Efecto de la humilina B (30) y de swietenina C (44) sobre el tiempo promedio de pupación.	254
Figura 58. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.	155
Figura 59. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-	

	meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.	255
Figura 60.	Efecto de la humilina B (30) y de swietenina C (44) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.	255
Figura 61.	Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio del adulto.	156
Figura 62.	Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso promedio del adulto.	256
Figura 63.	Efecto de la humilina B (30) y de swietenina C (44) sobre el peso promedio del adulto.	256
Figura 64.	Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.	157
Figura 65.	Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.	257
Figura 66.	Efecto de la humilina B (30) y de swietenina C (44) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.	257
Figura 67.	Efecto de la humilinólida A (26) sobre la actividad contráctil del íleon de cobayo.	165
Figura 68.	Efecto de la humilinólida A (26) sobre la actividad contráctil del íleon de cobayo a la concentración de 250 μ M.	165

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de RMN- ¹ H del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57).	187
Espectro 2. Espectro de RMN- ¹³ C del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57).	188
Espectro 3. Espectro de masas 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57).	189
Espectro 4. Espectro de RMN- ¹ H del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido (58).	190
Espectro 5. Espectro de RMN- ¹³ C del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido (58).	191
Espectro 6. Espectro de masas del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido (58).	192
Espectro 7a. Espectro de masas de la <i>cis</i> -isomiristicina (63).	193
Espectro 7b. Espectro de masas de la <i>cis</i> -isomiristicina (63) generado en el banco de datos Public/NIST.	193
Espectro 8. Espectro de IR de la humilinólida C (28).	194
Espectro 9. Espectro de masas de la humilinólida C (28).	195
Espectro 10. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida C (28).	196
Espectro 11. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida C (28).	197
Espectro 12. Espectro de IR de la humilinólida B (27).	198
Espectro 13. Espectro de masas de la humilinólida B (27).	199
Espectro 14. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida B (27).	200
Espectro 15. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida B (27).	201
Espectro 16. Espectro de IR de la swietemahonina C (36).	202
Espectro 17. Espectro de masas de la swietemahonina C (36).	203
Espectro 18. Espectro de RMN- ¹ H de la swietemahonina C (36).	204
Espectro 19. Espectro de RMN- ¹³ C de la swietemahonina C (36).	205
Espectro 20. Espectro de IR de la humilinólida A (26).	206
Espectro 21. Espectro de masas de la humilinólida A (26).	207
Espectro 22. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida A (26).	208
Espectro 23. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida A (26).	209
Espectro 24. Espectro de IR de la humilinólida D (29).	210
Espectro 25. Espectro de masas de la humilinólida D (29).	211
Espectro 26. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida D (29).	212
Espectro 27. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida D (29).	213
Espectro 28. Espectro de IR de la swietenina C (44).	214
Espectro 29. Espectro de masas de la swietenina C (44).	215
Espectro 30. Espectro de RMN- ¹ H de la swietenina C (44).	216
Espectro 31. Espectro de RMN- ¹³ C de la swietenina C (44).	217
Espectro 32. Espectro de IR de la humilina B (30).	218
Espectro 34. Espectro de RMN- ¹ H de la humilina B (30).	219
Espectro 35. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilina B (30).	221
Espectro 36. Espectro de IR del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).	222
Espectro 37. Espectro de masas del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-	

3-isobutirato (25a).	223
Espectro 38. Espectro de RMN- ¹ H del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).	224
Espectro 39. Espectro de RMN- ¹³ C del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).	225
Espectro 40. Espectro de RMN- ¹ H HMBC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).	226
Espectro 41. Espectro de RMN- ¹ H HMQC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).	227
Espectro 42. Espectro de IR del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	228
Espectro 43. Espectro de masas del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	229
Espectro 44. Espectro de RMN- ¹ H del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	230
Espectro 45. Espectro de RMN- ¹³ C del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	231
Espectro 46. Espectro de RMN- ¹ H HMBC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	232
Espectro 47. Espectro de RMN- ¹ H HMQC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).	233
Espectro 48. Espectro de IR de la humilinólida E (55).	234
Espectro 49. Espectro de masas de la humilinólida E (55).	235
Espectro 50. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida E (55).	236
Espectro 51. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida E (55).	237
Espectro 52. Espectro de RMN- ¹ H HMBC de la humilinólida E (55).	238
Espectro 53. Espectro de RMN- ¹ H HMQC de la humilinólida E (55).	239
Espectro 54. Espectro de IR de la humilinólida F (56).	240
Espectro 55. Espectro de masas de la humilinólida F (56).	241
Espectro 56. Espectro de RMN- ¹ H de la humilinólida F (56).	242
Espectro 57. Espectro de RMN- ¹³ C de la humilinólida F (56).	243
Espectro 58. Espectro de RMN- ¹ H HMBC de la humilinólida F (56).	244

LISTA DE ABREVIATURAS

°A	Amstrong
AcOEt	Acetato de etilo
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
q	Cuarteto
°C	Grados centígrados
ccf	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas
Cit b ₆ /f	Complejo citocromo b ₆ /f
Cit b ₅₆₃	Citocromo b ₅₆₃
Cit f	Citocromo f
CL ₅₀	Concentración letal media
cm	Centímetros
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
D ⁻	Especie básica del desacoplante
d	doblete
da	Doblete ancho
DBMIB	Dibromometilisopropil-p-benzoquinona.
Dq	Doblete cuarteteado
DCCD	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DCMU	3-(3,4-diclorofeno)-1,1-dimetilurea
DCPIP	2,6-diclorofenolindol
DL ₅₀	Dosis letal 50
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de dobles
dddd	Doble de doble de doble de dobles
D ₂ O	Agua deuterada
DNP	Dinitrofenol
DPC	Difenilcarbácida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMIE	Espectro de masas por impacto electrónico
EDTA	Acido etiléndiaminotetraacético
eV	Electron volts
FAD*	Flavin adenina dinucleótido oxidado
FAB	Bombardeo rápido de átomos
FADH ₂	Flavin adenina dinucleótido reducido
Fd	Ferredoxina

FMN	Flavin adenina mono nucleótido
FeO	Feofitina
g	Gramos
H ⁺	Protón
H ⁺ -ATPasa	Complejo multienzimático que se encarga de sintetizar ATP
Ha	Hectárea
H ₂ O	Agua
HD	Especie ácida del desacoplante
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Hrs	Horas
Hv	Luz
HCl	Acido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Acido sulfúrico
COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear (¹ H- ¹ H)
HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear binaria (¹ H- ¹³ C)
HMQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (¹ H- ¹³ C)
HETCOR	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)
J	constante de acoplamiento
K ₃ [Fe(CN) ₆]	Ferricianuro de potasio
KBr	Bromuro de potasio
KCN	Cianuro de potasio
KD	Kilodaltones
Kg	Kilogramo
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio
I.R.	Infrarrojo
m	Multiplete
Me	Metilo
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado
MHz	Megahertz
m	metros
μg	Microgramos
ml	mililitros
μl	microlitros
μM	micromolar
mM	Milimolar
mm	milímetros
μm	micrometros
Mn	Manganeso
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mg	Miligramos

MV	Metilviológeno
NADP*	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
NOESY	Efecto nuclear de Overhauser
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno molecular
P ₆₈₀ *	Centro de reacción oxidado del FSII
P ₇₀₀	Centro de reacción del FSI
P ₇₀₀ *	Centro de reacción oxidado del FSI
PC	Plastocianina
Ph	Feofitina
Pi	Ortofosfato
p.f.	Punto de fusión
PMS	Fenacianometasulfato
ppm	partes por millón
PQ	Plastoquinona
pulg ²	Pulgadas cuadradas
Q	Aceptor primario del FSII
QA	Plastoquinona
QB	Segunda plastoquinona
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
red	Reducido
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
s a	Singulete ancho
SiMo	Silicomolibdato
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
uma	Unidades de masa carga
UV	Ultravioleta
α	Alfa
β	Beta
δ	delta
λ _{max}	longitud de onda máxima

RESUMEN

Swietenia humilis Zuccarini (Meliaceae) y *Malmea depressa* (Baill.) R. E. Fries (Annonaceae) COMO FUENTES POTENCIALES DE AGENTES PESTICIDAS.

El presente proyecto de investigación doctoral tuvo como objetivo principal la determinación del potencial insecticida y herbicida de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Swietenia humilis* Zuccarini (Meliaceae) y *Malmea depressa* (Baill.) R.E. Fries (Annonaceae) respectivamente con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes pesticidas.

La selección de las especies vegetales objeto de este proyecto de investigación se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos en una serie de ensayos biológicos preliminares. En el caso de la especie *Swietenia humilis*, se utilizó como prueba de selección la determinación de la actividad insecticida sobre el gusano barrenador del maíz, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lep. Pyralifae). Para el inicio de la investigación química de *Malmea depressa*, las evaluaciones biológicas de selección incluyeron: (1) la determinación del efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* L. y *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.; (2) la evaluación de la actividad fungicida sobre tres especies de hongos fitopatógenos (*Phyitium* spp., *Helminthosporium* spp. y *Fusarium oxysporum*) y tres especies de hongos patógenos para el hombre (*Aspergillus niger*, *Trychophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*).

El desarrollo de este proyecto comprendió dos etapas. En la primera, se realizó el estudio biodirigido del extracto activo de *M. depressa*. El fraccionamiento biodirigido del extracto activo de la corteza, empleando como bioensayo la determinación del crecimiento radicular y la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, permitió el aislamiento de cinco metabolitos secundarios, los cuales se caracterizaron con base en sus datos espectroscópicos y espectrométricos como el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno, el tetrametoxibenzaldehído, la *trans*-iso-miristicina, el alcohol tetrametoxicinámico y el aldehído tetrametoxicinámico. Cabe destacar que el tetrametoxibenzaldehído representa un nuevo producto natural.

La determinación de la actividad fitoinhibidora de estos metabolitos secundarios sobre la germinación y el crecimiento vegetal permitió comprobar que el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno es el responsable de la actividad biológica demostrada por el extracto original. Este compuesto inhibió de manera significativa el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* ($IC_{50} = 43 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, este producto fue poco activo contra *E. crusgalli* ($IC_{50} = 810 \mu\text{g/ml}$).

Con la finalidad de explorar en forma más detallada el potencial herbicida del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno se evaluó su efecto sobre varios procesos fotosintéticos empleando cloroplastos aislados de espinacas (*Spinacea oleraceae*). Las actividades fotosintéticas evaluadas incluyeron: la síntesis de ATP, la captación de protones y los transportes de electrones basal,

fosforilante y desacoplado. Los resultados obtenidos, indicaron que el compuesto inhibe de manera significativa ($DE_{50} = 1.4-5.0 \mu\text{M}$) las actividades antes mencionadas. En todos los casos, el efecto observado fue dependiente de la concentración. Con base en los resultados obtenidos mediante el empleo de estos ensayos biológicos se concluyó que el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno actúa como un inhibidor de la reacción de Hill. Con la finalidad de determinar específicamente el sitio de acción en la cadena transportadora de electrones, se evaluó el efecto del mismo sobre las reacciones parciales de los fotosistemas I y II. Mediante estos estudios se determinó que el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno inhibe el transporte de electrones entre los sitios P_{680} y Q_A del fotosistema II.

Con respecto a la actividad fungicida, se determinó el efecto del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre las especies de hongos patógenos y fitopatógenos de prueba. Los resultados indicaron que este producto presenta una moderada actividad fungicida contra *Fusarium oxysporum* (CIM = 400 $\mu\text{g/ml}$) y *Trychophyton mentagrophytes* (CIM = 300 $\mu\text{g/ml}$). La actividad fungicida del compuesto fue similar a la desarrollada por el extracto orgánico total. Por último, la actividad citotóxica sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos [A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma mamario) y HT-29 (adenocarcinoma de colon)] indicó que el compuesto es inactivo ($DE_{50} > 20 \mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, el conjunto de estos resultados permite concluir que el compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno representa un prototipo estructural novedoso para su desarrollo como un posible agente herbicida.

Durante la segunda etapa del presente proyecto de investigación, se realizó el aislamiento, la caracterización estructural y la evaluación del potencial insecticida de los limonoides de las semillas de *S. humilis*. El fraccionamiento del extracto clorofórmico activo de *S. humilis* permitió el aislamiento de once compuestos de tipo tetranortriterpenoide.

En todos los casos, las estructuras de los once compuestos aislados se establecieron mediante el empleo de las técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM) contemporáneas. Los compuestos se identificaron como las humilinólidas A-F, la humilina B, la swietenina C, la swietemahonina C, el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato. De los once compuestos aislados, nueve correspondieron a estructuras descritas en la literatura y dos de ellas constituyeron nuevos productos naturales y se les designó con los nombres triviales de humilinólida E y F. Cabe aclarar, que las estructuras de la humilinólida D y de la swietemahonina C se determinaron de manera inequívoca mediante un análisis de rayos X.

Los limonoides aislados se evaluaron como posibles agentes insecticidas. Esta actividad biológica se determinó empleando las larvas en tercer estadio de crecimiento del gusano barrenador del maíz. Estas evaluaciones biológicas indicaron que las humilinólidas C y D, limonoides que desarrollaron la mayor actividad insecticida, constituyen candidatos idóneos para su posible comercialización como nuevos agentes insecticidas. Estos dos

compuestos afectaron de manera significativa el peso promedio de las larvas, los porcentajes de pupación y sobrevivencia del adulto a una concentración de 50 ppm. Al mismo tiempo, esta actividad biológica fue superior a la observada para el que el control positivo; la toosendanina, un limonoide de origen natural con una aplicación comercial como agente agroquímico de uso insecticida.

Respecto a la actividad citotóxica estos compuestos no mostraron actividad sobre las líneas celulares de prueba [A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma mamario) y HT-29 (adenocarcinoma de colon)]. En todos los casos la DE_{50} fue mayor a 20 $\mu\text{g/ml}$.

ABSTRACT

The present investigation comprises two parts. The first one is an attempt to establish the herbicide potential of *Malmea depressa*. The second part deals with the investigation of the insecticide potential of *Swietenia humilis*.

Malmea depressa (Baill) R. E. Fries (Annonaceae) is commonly known by the Maya people as "elemuy", "sufricaya" and "nazareno prieto". This species is distributed in Central America and Mexico, from Veracruz to the Peninsula of Yucatan. In the tropical forest it is a dominant species and it is used in traditional medicine as an analgesic agent and for the treatment of diseases such as pellagra and liver and kidney stones. No previous studies on the phytochemistry and biological properties of this species have been reported.

The phytotoxic potential of this species was demonstrated by measuring the inhibitory activity of CHCl_3 extract of the stem bark of *M. depressa* on seedling growth of *Amaranthus hypochondriacus* (IC_{50} = 134 $\mu\text{g/ml}$) and *Echinochloa crusgalli* (IC_{50} = 457 $\mu\text{g/ml}$). The active extract was fractionated by column chromatography over Si gel using the BPIP (bioautographic phytogrowth inhibitory bioassay) at each step for activity-directed fractionation. These procedures led to the isolation of four known phenylpropanoids: 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene, 2,3,4,5-tetramethoxycinnamaldehyde, *trans*-isomyristicin and 2,3,4,5-tetramethoxycinnamyl alcohol, and one new natural product which was identified as 2,3,4,5-tetramethoxybenzaldehyde. The isolated compounds were identified by spectroscopic and spectrometric means. 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene exhibited significant phytogrowth-inhibitory activity on seedlings of *A. hypochondriacus* (IC_{50} = 43 $\mu\text{g/ml}$) and *E. crusgalli* (IC_{50} = 810 $\mu\text{g/ml}$) and moderate antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes* (MIC = 500 $\mu\text{g/ml}$) and *Fusarium oxysporum* (MIC = 250 $\mu\text{g/ml}$). Analysis of the essential oil prepared from the leaves stem bark and the wood of the plant revealed that 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene was the major constituent of the different vegetal parts of the species.

In order to further explore the herbicidal potential of the major phytotoxic compound from *M. depressa*, its effect on several photosynthetic activities was investigated using freshly lysed spinach chloroplasts. The results indicate that this compound inhibits proton-uptake, ATP-synthesis and electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) in a concentration dependent manner, therefore acting as a Hill reaction inhibitor. Uncoupled electron transport through photosystem I is unaffected by this compound. On the other hand, uncoupled electron transport through photosystem II from water to dichlorophenol-indophenol, from water to silicomolibdate and from diphenylcarbazide to dichlorophenol-indophenol are inhibited by this phenylpropanoid, suggesting that the site of inhibition is located in the span from P_{680} to Q_A . In addition the cytotoxic activity of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene was determined against three human solid tumor cell line [lung carcinoma (A-549), breast carcinoma (MCF-7) and colon adenocarcinoma (HT-29)]. It was inactive in these cell lines.

Swietenia humilis Zucarini (Meliaceae) is locally known as "zopilote", "cobano" and "cobilla". The plant is a tree up to 20 m high that grows in the tropical areas of Mexico, in Guerrero, Michoacan Colima, Sinaloa and Chiapas. The seeds of this plant are used in traditional medicine as an antihelmintic agent and for the cure of amebiasis. In this investigation we describe the isolation and structure determination of two new tetranortriterpenoids (humilinolide E and humilinolide F) together with nine known compounds (humilinolides A-D, humilin B, swietenin C, swietemahonin C, methyl-2,3-dihydroxy-meliac-8(30)-enate-3-isobutyrate and methyl-2,3-dihydroxy-meliac-8(30)-enate-3-tiglate) from the seeds of *Swietenia humilis* Zucarini (Meliaceae). The structures of humilinolide D and swietemahonin C were unequivocally confirmed by single crystal X-ray diffraction studies. The structures of the humilinolides E and F were elucidated on one basis of spectroscopic and spectrometric analyses including ¹H-¹H COSY, HETCOR, NOESY, HMBC and HMQC experiments. The insecticidal activity against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner of humilinolides A-E, humilin B, swietenin C, methyl-2,3-dihydroxy-meliac-8(30)-enate-3-isobutyrate and methyl-2,3-dihydroxy-meliac-8(30)-enate-3-tiglate was also investigated. When incorporated into artificial diets of neonate larvae at 50 ppm all compounds caused larval mortality as well as growth reduction and increased the development time of survivors in a concentration-dependent manner. Only humilinolide C reduced growth and survivorship at 5 ppm. Additional effects observed in many of the treated groups included a significant delay in time to pupation and adult emergence. Humilinolides A-D showed comparable activity to toosendanin, a commercial insecticide.

CAPITULO I

ANTECEDENTES GENERALES.

I.1. PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES PESTICIDAS.

Los pesticidas son agentes capaces de controlar o eliminar aquellas plantas, animales o microorganismos perjudiciales a la salud y economía humanas. Estos agentes indudablemente han jugado un papel importante en la protección de los cultivos de importancia hortícola, agrícola y forestales (Cremllyn, 1991; Worsham, 1989; Terry, 1991; Klocke, 1989a).

En la actualidad los pesticidas de mayor uso comercial son de origen sintético y muchos de ellos se han diseñado mediante la aplicación de estrategias bioracionales. Se calcula que existen aproximadamente 1200 ingredientes activos con propiedades pesticidas a partir de los cuales se producen cerca de 30,000 productos comerciales. De estas 1200 sustancias, 250 sirven para la elaboración de agentes herbicidas y 450 se emplean para la producción de insecticidas (Cremllyn, 1991). Por otro lado, las estadísticas indican también que anualmente se producen cerca de 800,000 toneladas de pesticidas a nivel mundial; de esta producción, el 52% corresponde a herbicidas, el 22% a insecticidas, el 20% a fungicidas y el 6% restante, a reguladores del crecimiento vegetal (Cremllyn, 1991). La mayoría de estos agentes pesticidas son de amplio espectro y por lo tanto son eficaces contra una amplia variedad de insectos y plantas nocivas. Desafortunadamente, estos productos ocasionan severos daños ecológicos debido a sus altos índices de persistencia. También debido a su poca selectividad resultan tóxicos para los organismos blanco, el hombre y otros animales. Así, por ejemplo, en la literatura se ha descrito que algunos pesticidas como el DDT (insecticida), el aldrin (insecticida), el DNOC, el DMCU y el dinoceb (herbicidas) son altamente tóxicos para algunas aves de rapiña y para los mamíferos. En el primer caso, es bien conocido que el águila blanca esta desapareciendo a nivel mundial como una consecuencia de los efectos tóxicos del DDT (Sharon, 1981;

Morgan, 1985; Cremllyn, 1991; Schmutterer, 1995; Arnason *et al.*, 1993; Perkins, 1985; Klocke *et al.*, 1989b; Duke y Abbas, 1995; *inter alia*).

Por último, el uso recurrente de los pesticidas contemporáneos ha ocasionado la aparición de numerosas especies de plagas resistentes a los tratamientos. Por ejemplo, se ha descrito que algunas especies de plantas nocivas (*Senecio vulgaris*, *S. rugosus*, *S. tuberosus*, *Lolium rigidum*, *Alopecurus myosuroides*, *Brassica campestris*, *B. napus* y varias especies de *Amaranthus*) que dañan los cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo, y sorgo han desarrollado resistencia a las triazinas, específicamente a la atrazina y azimacina. Por otro lado, la especie *Echinochloa crusgalli*, la cual ocasiona pérdidas hasta de un 59% de los cultivos de arroz, es resistente al propanil y al metil-diclofob (Cremllyn, 1991, Collins, 1991 y Terry, 1991). El desarrollo de resistencia a los agentes herbicidas se ha atribuido a que algunas de estas sustancias son mutagénicas ocasionando alteraciones en los blancos de acción a nivel molecular en las plantas nocivas, por ejemplo, modificando la conformación estructural de una enzima blanco, induciendo la activación de sistemas enzimáticos o bien provocando una sobre-producción del sitio de acción (Baker, 1991; Moreland, 1980; Cremllyn, 1991, Collins, 1991 y Terry, 1991).

En el caso de los insecticidas, también la literatura describe la aparición de numerosas especies de artrópodos e insectos resistentes a los piretroides sintéticos y al DDT. El desarrollo de la resistencia a los insecticidas sintéticos se debe principalmente a que la mayoría presenta un mecanismo de acción neurotóxico (Klocke, 1998a, 1989b; Arnason *et al.*, 1993; Schmutterer, 1995).

Considerando los severos y diversos problemas toxicológicos, ambientales y de salud ocasionados por el uso de los pesticidas sintéticos, recientemente se han propuesto estrategias alternas con la finalidad de proteger los cultivos de importancia económica. Estas estrategias implican la rotación y sincronización de cultivos, el uso de cultivos de cobertura, el desarrollo de especies resistentes al ataque de plantas e insectos mediante la aplicación de procedimientos genéticos, el empleo de herbicidas biológicos y el uso de pesticidas de origen natural. Estos

últimos, son generalmente menos tóxicos para el hombre y otros animales, sus índices de bioacumulación son menores y los mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto pesticida son específicos. Esta última característica es de gran importancia para el diseño de pesticidas mediante un método bioracional.

Con la finalidad de encontrar estos pesticidas naturales con las características antes señaladas, en los últimos años se ha intensificado la investigación de los productos naturales tanto de origen vegetal como microbiano. En este contexto, cabe recordar que las plantas biosintetizan y acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios (semioquímicos) que les sirven como mecanismo de defensa contra el ataque de insectos, microorganismos y plantas nocivas. Así, muchas de estas sustancias juegan un papel importante en las interacciones alelopáticas de tipo planta-planta y planta-microorganismo, y en las interacciones planta-insecto en los distintos ecosistemas. Estas interacciones regulan la densidad y distribución de plantas, insectos y microorganismos y se establecen en todo tipo de ecosistemas, tanto naturales como en los agroecosistemas (Holm, 1977; Terry, 1991; Klocke, 1989a). En consecuencia, no resulta sorprendente que el reino vegetal constituya una fuente valiosa de agentes pesticidas. De tal forma que en la literatura contemporánea se describe que aproximadamente 200 especies de plantas (Klocke, 1989a, 1989b) y cerca de 2500 metabolitos secundarios vegetales, con una gran diversidad estructural, presentan propiedades insecticidas y/o herbicidas (Macías *et al.*, 1986; Rodríguez *et al.*, 1976; Shetell *et al.*, 1993; Harbone, 1988; Klocke, 1989a, 1989b; Duke y Lyda, 1993; Duke y Abbas, 1995; Fisher, 1986, 1991; Fisher *et al.*, 1994; Einhellig, 1986, 1995; Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Mata, 1993; Arnason *et al.*, 1993; *inter alia*). Los procedimientos utilizados para el descubrimiento de este tipo de principios activos han sido objeto de numerosas revisiones en la literatura científica (Ghisalberti, 1993; Macías, 1995; Benner, 1993; *inter alia*).

Los primeros insecticidas empleados por el hombre para erradicar las plagas ocasionadas por insectos en los cultivos de importancia económica fueron de origen natural (Boutler, 1993; Klocke, 1989a, 1989b; Plapp, 1981, Cremlym,

1991). Dioscorides (40-90 AC) mencionaba, que el opio, el colchico y el aconito se empleaban tanto en la medicina como en la agricultura para erradicar a los insectos. Además, cita que las especies *Veratrum album* y *V. nigrum* (Liliaceae) eran empleados como agentes insecticidas por los Romanos. Otras plantas empleadas para tal fin en el siglo V DC, fueron el ajenjo, el laurel, el cedro, el ajo, el higo, el roble, la cebolla, la casia y el pepino, por tan solo mencionar algunos. Posteriormente, en el siglo XVII, la nicotina, principal alcaloide del tabaco, la sebadilla, el pyretrum derivado de *Crysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) y los extractos de especies de *Derris* y *Lonchocarpus* (Leguminosae) se emplearon como potentes agentes insecticidas. En esa época, el tabaco y su principio activo fueron muy comercializados en América; en tanto que el pyretrum se comercializó en Europa (Klocke, 1989a, Cremlyn, 1991). A principios del presente siglo, los extractos derivados de plantas de los géneros *Derris* y *Lonchocarpus* se empleaban como agentes insecticidas en China. En 1911 se patentó el uso de los mismos en Inglaterra (Klocke, 1989a, Morgan *et al.*, 1985). Posteriormente, se demostró que el principio activo de las especies de *Derris* y *Lonchocarpus* era la rotenona, un potente inhibidor del proceso metabólico de la respiración. A principios de los años 40's, la compañía Merck introdujo en el mercado un producto derivado de la madera de varias especies de *Ryania* (Flacourtiaceae). El principio activo fue caracterizado como un alcaloide de naturaleza compleja denominado ryanodina (Klocke, 1989a).

Hoy en día, se conocen un mayor número de insecticidas verdes muchos de los cuales se usan comercialmente, algunos de ellos inclusive se han empleado como moléculas prototipo para el desarrollo sintético y semisintético de nuevos agentes insecticidas. En este último contexto, merecen una mención especial los piretroides derivados del pyretrum, en particular la piretrina I, que ha permitido el desarrollo de una gran variedad de insecticidas comerciales como los β -metoxiacrilatos (Pillmor *et al.*, 1993; Benner, 1993).

Otros ejemplos de insecticidas vegetales importantes pertenecen a las categorías de metabolitos secundarios de los limonoides y las *iso*-butilamidas

insaturadas. Los primeros son particularmente abundantes en las familias de las meliáceas y rutáceas y han atraído recientemente la atención de numerosos grupos de investigación, tanto a nivel académico como industrial, por su potente actividad insecticida. A la fecha se han aislado 300 compuestos de este tipo, de los cuales la azadiractina (8) y la tusendanina (3) se han desarrollado como insecticidas de uso comercial.

Las *iso*-butilamidas son principios pungentes que se biosintetizan en grandes cantidades en especies de las familias piperáceas y rutáceas. Estos productos ejercen su efecto insecticida mediante el bloqueo de los canales de sodio voltaje-dependientes. La piperida y la afinina son ejemplo de este grupo de insecticidas, que desafortunadamente no se han comercializado debido a su alta inestabilidad química. Cabe mencionar, sin embargo, que la investigación conducente al desarrollo de derivados semisintéticos más estables se encuentra aún en pleno desarrollo.

Además de los productos antes mencionados, que sin duda alguna constituyen los insecticidas verdes más importantes, se han caracterizado otros metabolitos con propiedades repelentes de insectos tales como el geraniol, el *p*-cimeno, el eugenol, el aldehído cinámico, la nepelactona y el 1,8-cineol, por tan solo mencionar algunos. Por último, otros como la juvabiona y la echinolona poseen propiedades reguladoras del crecimiento (Holyoke *et al.*, 1987; Klocke, 1989a, Isman *et al.*, 1993; Jermy, 1990; Govindachari *et al.*, 1996; *inter alia*).

En comparación con los insecticidas verdes, el número de metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad herbicida que ha alcanzado un desarrollo de tipo comercial es mínimo. Esto debido a que pocos productos naturales de origen vegetal *per se* reúnen las características necesarias para competir con los mejores herbicidas sintéticos de uso comercial. Hay muchas razones que podrían explicar el porque las plantas constituyen fuentes más pobres de agentes herbicidas que de insecticidas. En primer lugar, la presión de selección ejercida por otras plantas en un mismo ecosistema es a menudo mucho menor que la presión ocasionada por microorganismos e insectos, los cuales

provocan a menudo daños muy severos; por lo tanto, la biosíntesis de compuestos herbicidas no confiere tanto beneficio a las plantas de ese mismo ecosistema como la producción de metabolitos insecticidas. En segundo lugar, cualquier planta productora de un herbicida potencial debe ser inmune a los efectos del mismo, de otra manera su biosíntesis no le conferiría ninguna ventaja durante su proceso evolutivo.

Sin embargo, y a pesar de las consideraciones anteriores, muchos autores han postulado que las interacciones alelopáticas en un ecosistema particular pueden constituir la base para el descubrimiento de aleloquímicos de utilidad para el desarrollo de herbicidas (Benner, 1993; Macías, 1995; Enhellig, 1995; Duke y Abbas, 1995). Más importante aún, estos aleloquímicos pueden servir como prototipos estructurales para la síntesis de compuestos herbicidas más eficaces y potentes que el producto natural toxóforo (Benner, 1993; Duke y Abbas, 1995; Macias, 1993; *inter alia*). De ahí, que la búsqueda de agentes herbicidas a partir del reino vegetal se encuentre también justificada. Entre los aleloquímicos que han demostrado una mayor actividad fitotóxica figuran los terpenoides (Macias, 1995; Fischer, 1991; Duke, 1991; Duke y Abbas, 1995). En 1964 Muller y Muller, descubren que el monoterpenoide 1,8-cineol es uno de los terpenoides fitotóxicos producido por una series de arbustos altamente alelopáticos en comunidades desérticas. Posteriormente la compañía Dupont sintetizó el cinmetilinio, tomando como molécula base el 1,8-cineol; este herbicida es poco tóxico y no se acumula en el medio ambiente, además es altamente efectivo para combatir pastos nocivos. Tanto el 1,8-cineol como su derivado semisintético inhiben el proceso de la respiración. Otros monoterpenoides con actividad herbicida son el camfeno y la pulegona. El primero, sirvió de materia prima para la síntesis del toxafeno, mezcla de derivados clorados del camfeno. Por razones toxicológicas y a pesar de su eficacia, el uso de este producto fue discontinuado (Duke y Abbas, 1995).

Otros terpenoides que han demostrado una notable actividad herbicida son los sesquiterpenoides artemisinina y estrigol. Sin embargo, la imposibilidad de

obtener estos productos en buenos rendimientos por la vía de síntesis, ha impedido la comercialización de los mismos.

Los compuestos aromáticos también constituyen aleloquímicos útiles para el desarrollo de agentes herbicidas y quizás el más importante a la fecha es el ácido benzoico, el cual permitió el desarrollo comercial del cloramben, el dicamba y el picloram, por tan solo mencionar algunos. Otros productos aromáticos con una buena actividad inhibidora del crecimiento vegetal incluyen la hypericina, la juglona, el DIBOA, algunos derivados de los ácidos cinámico y salicílico y compuestos de naturaleza cumarínica (Duke y Abbas, 1995). La hypericina al igual que el α -tertienilo, potente fitotoxina producida por varias especies del género *Tagetes* (Asteraceae), ejercen su efecto fitotóxico por un mecanismo mediado por la luz ultravioleta, es decir son productos fotodinámicos; esta última característica ha impedido la comercialización de ambos productos ya que resultan tóxicos no solo para las plantas sino también para el hombre y otros animales (Benner, 1993). Varias quinonas fenólicas como la sorgoleona, la juglona y la lawsona destacan también por sus propiedades fitotóxicas significativas.

Recientemente, el fraccionamiento biodirigido del extracto fitotóxico de *Ipomoea tricolor* permitió el aislamiento del principio fitotóxico, el cual correspondió a la mezcla de resinas glicosídicas características del metabolismo secundario de las especies de convolvuláceas. En esa oportunidad, se aisló y caracterizó el glicolípido mayoritario el cual se denominó con el nombre trivial de tricolorina A. Este glicolípido demostró un potente efecto inhibidor del crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crusgalli* (Anaya et al., 1990; Pereda-Miranda et al., 1993). Posteriormente, los otros glicolípidos presentes en la mezcla de resinas glicosídicas se aislaron y caracterizaron (Bah y Pereda-Miranda, 1996 y 1997). Las especies *Ipomoea tricolor* y *Sorghum vulgare* (fuente de la sorgoleona) son muy empleados como cultivos de cobertura para el control de plantas nocivas en distintos agroecosistemas.

Las sustancias con actividad herbicida tanto naturales como sintéticas presentan diversos mecanismos de acción. Por ejemplo, pueden inhibir la síntesis de aminoácidos, proteínas, lípidos, clorofila y/o carotenoides, o bien, pueden interferir con la división celular o el metabolismo energético (fotosíntesis y respiración). La alteración de estos procesos metabólicos esenciales para las plantas trae como consecuencia alteraciones en los procesos de germinación, y/o desarrollo vegetal. En la literatura se han publicado numerosas revisiones acerca del mecanismo de acción de los agentes herbicidas y/o alelopáticos (Einhelling, 1995; Worsham, 1989; Agrio, 1991; Fisher, 1991; Fisher *et al.*, 1994; Duke y Lydon, 1993; Duke y Abbas, 1995; Holyoke *et al.*, 1987; *inter alia*).

Esta breve revisión acerca de los productos naturales de origen vegetal con propiedades herbicidas e insecticidas, deja claro, no solo la potencialidad del reino vegetal como una fuente útil para el desarrollo de nuevos pesticidas, si no también la necesidad de encontrar nuevos agentes efectivos y menos dañinos que permitan el control de las plagas que afectan los cultivos de mayor importancia económica. En este contexto, la presente disertación pretende obtener agentes pesticidas biodegradables menos tóxicos para el hombre y otros animales a partir de *Swietenia humilis* Zuccarini y *Malmea depressa* (Baill.) R. E. Fries.

I.2.- LIMONOIDES DE MELIACEAS COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES INSECTICIDAS.

Los limonoides son metabolitos secundarios, altamente oxidados, que derivan biogénicamente de los triterpenoides tetracíclicos Δ^7 -eufol ($20\text{-}\beta\text{H}$) o Δ^7 -tirucalol ($20\text{-}\alpha\text{H}$). Estos precursores sufren dos modificaciones importantes. En primer término, se oxidan en C-7 y en C-8 y el metilo en C-14 migra a C-8 para formar el apotirucalol o el apoefol (Figura 1).

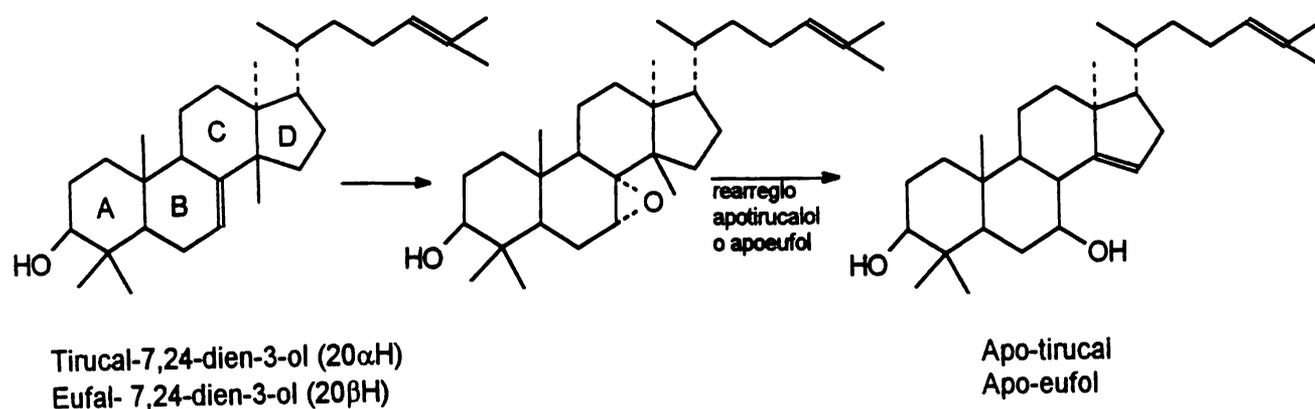


Figura 1. Formación del núcleo apotirucalol.

La segunda modificación, es la pérdida de cuatro átomos de carbono de la cadena lateral para formar un anillo furano en C-17 (Figura 2).

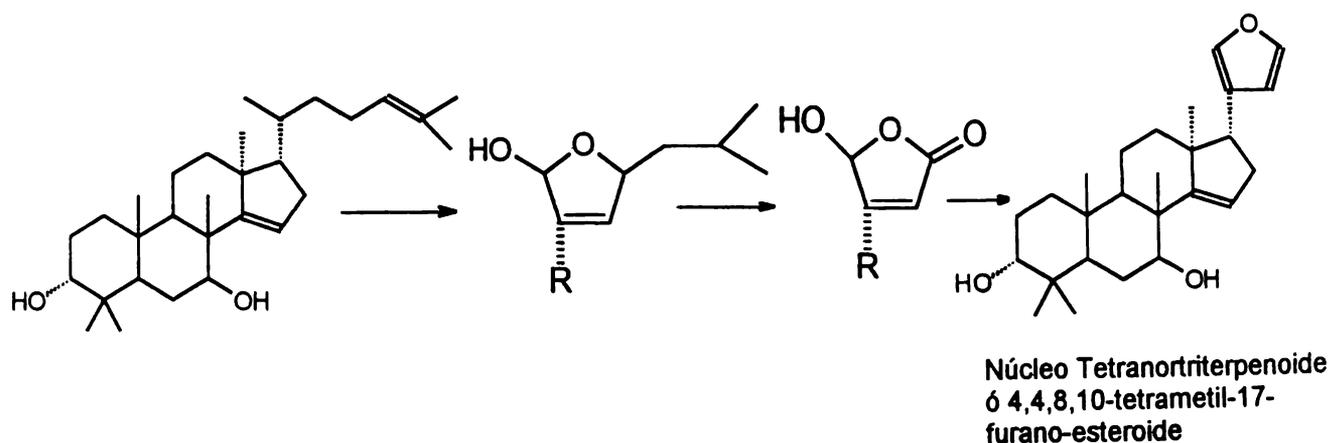


Figura 2. Formación del núcleo tetranortriterpenoide.

Mediante estas modificaciones se forma el núcleo base de los limonoides de primer paso biogénico, que se caracteriza por conservar el núcleo tetracíclico del triterpenoide precursor (Bevan *et al.*, 1965; Taylor y Taylor, 1983a, Taylor, 1983b; Connolly, 1983; Da Silva *et al.*, 1984; Banerji *et al.*, 1984).

Los limonoides de primer paso biogénico pueden sufrir subsecuentes oxidaciones, especialmente de tipo Baeyer-Villiger, rompimientos y rearrreglos de los anillos A, B, C y/o D para dar origen a los diversos esqueletos de limonoides. Considerando las distintas modificaciones de los anillos de los limonoides del primer paso biogénico se han propuesto once grupos mayoritarios de limonoides, (Connolly, 1983, Taylor, 1983b y 1984; Da Silva *et al.*, 1984). En la Tabla 1 se indican los once grupos, el tipo de modificación principal que experimenta el esqueleto base del limonoide de primer paso biogénico y un ejemplo de cada grupo. En la Figura 3 se ilustran las estructuras de los ejemplos seleccionados. Por último, en el Esquema 1 se ilustra la relación biogénica entre los distintos grupos de limonoides.

Es importante mencionar, que los limonoides se acumulan en todas las partes vegetales de las plantas que los biosintetizan pero principalmente se localizan en las semillas (Taylor, 1983b; Champagne *et al.*, 1992).

El aislamiento y purificación de los limonoides se ha realizado mediante el empleo de técnicas cromatográficas (capa fina, columna abierta y HPLC) [Taylor, 1983b, 1984; Nakatani y Nakatashi, 1981; Nakatani *et al.*, 1985; 1994; Kadota *et al.*; 1989a, 1990a, 1990b; Segura-Correa *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 1996 *inter alia*).

Tabla 1. Clasificación química de limonoides.

Grupo	Tipo	Ejemplo
I	Limonoides con el núcleo base intacto	Tusendanina (1)
II	Limonoides con el anillo D abierto	Gedunina (2)
IIIa	Limonoides con los anillos B y D abierto	Metil angolensato (3)
IIIb	Limonoides con los anillos B y D abierto	Mexicanólida (4)
IIIc	Limonoides con los anillos B y D abierto	Pragmalina (5)
IV	Limonoides con los anillos A, B y D abiertos	Metil ivorensato (6)
V	Limonoides con los anillos A y D abiertos	Obacunol (7)
VI	Limonoides con los anillos C abierto	Azadiractina (8)
VII	Limonoides con el anillo B abierto	Tunafilina (9)
VIII	Limonoides con el anillo A abierto	Evodulona (10)
IX	Limonoides con los anillos A y B abiertos	Prieuranina (11)

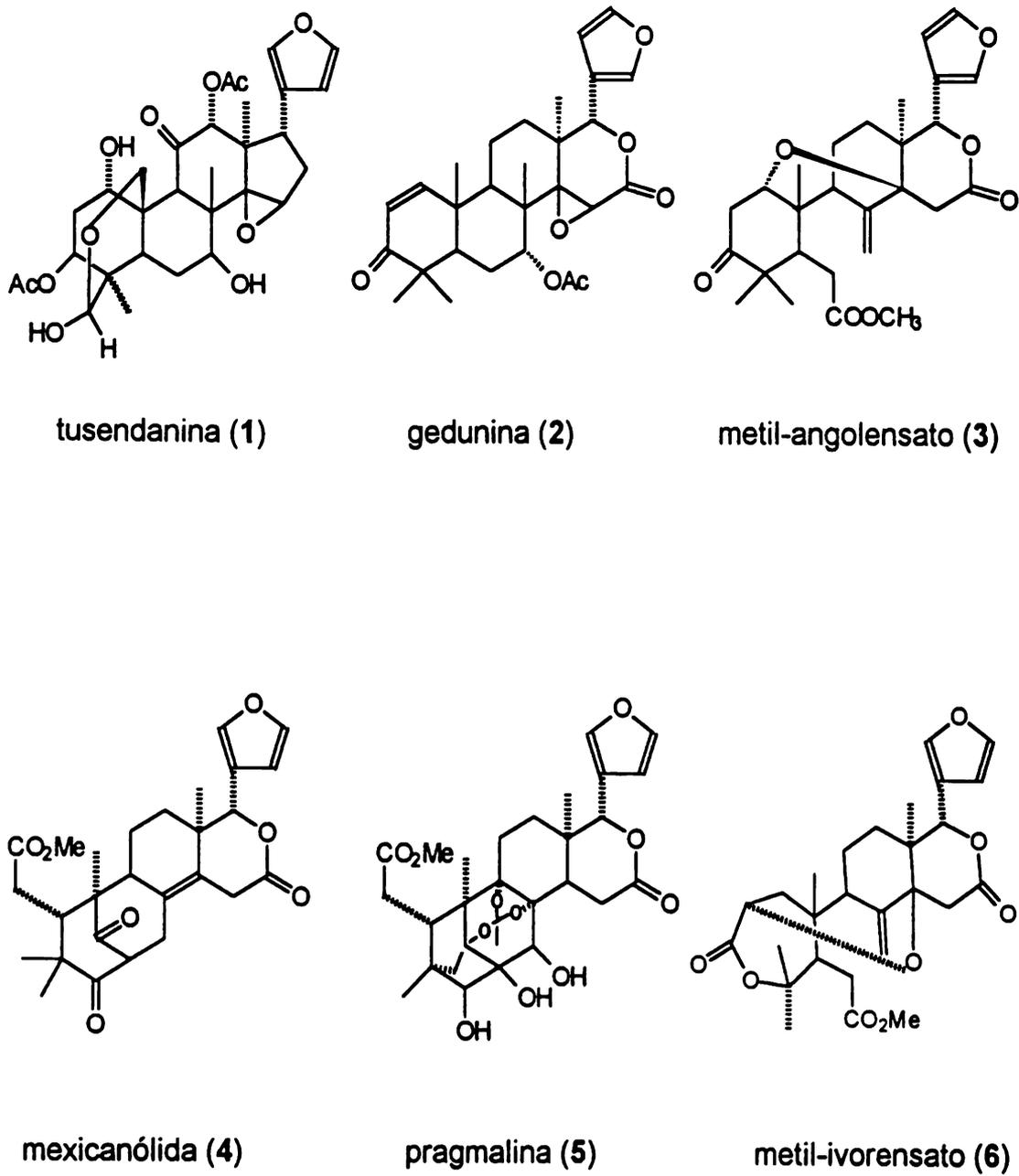
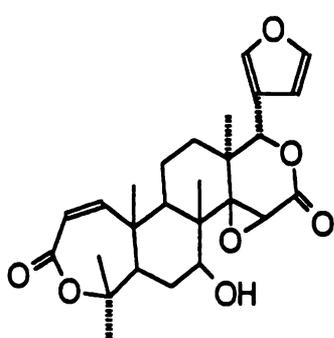
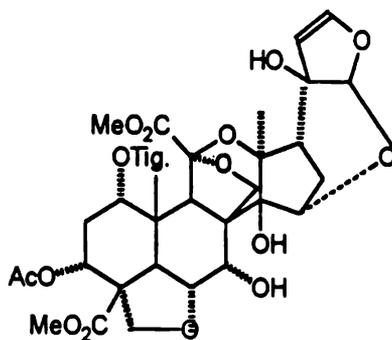


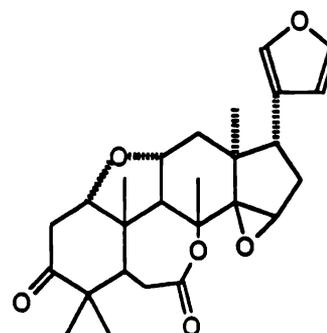
Figura 3. Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides.



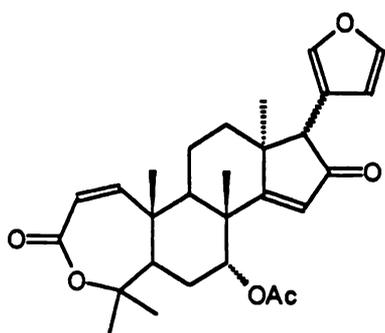
obacunol (7)



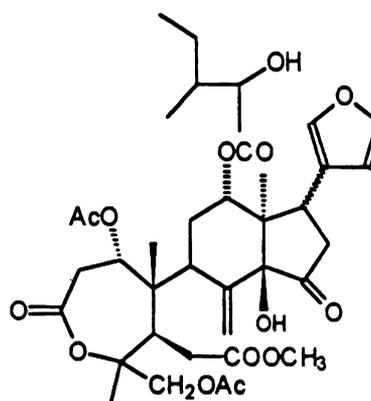
azadiractina (8)



tunafilina (9)

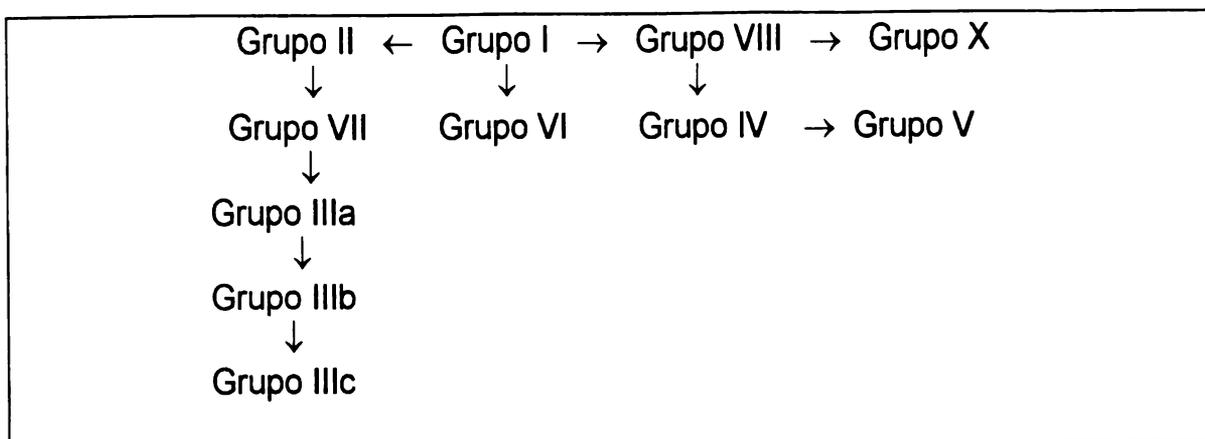


evodulona (10)



prieuranina (11)

Figura 3. Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides.
(Continuación).



Esquema 1. Relación biogénica entre los diferentes grupos de limonoides.

Los limonoides aislados a la fecha se han identificado por métodos espectroscópicos principalmente de RMN, espectrométricos y químicos (acetilación, saponificación, oxidación y degradaciones) (Banerji, 1984; Taylor, 1984; Khalid *et al.*, 1989; Macleod *et al.*, 1990; Kadota *et al.*, 1989a, 1990a, 1990b, Segura-Correa *et al.*, 1993 y 1994, *inter alia*). Es importante mencionar, que también se han publicado varios estudios de cristalografía de rayos X para este tipo de compuestos (Mikolajczak *et al.*, 1988; Baldwin *et al.*, 1992; Segura-Correa *et al.*, 1993 y 1994; Soriano-García *et al.*, 1996; Toscano *et al.*, 1996; *inter alia*).

Desde el punto de vista biológico los limonoides de las meliáceas y rutáceas han demostrado diversas propiedades biológicas destacándose su potente actividad insecticida (Klocke, 1989a; Macleod *et al.*, 1990; Arnason *et al.*, 1987, 1993; Champagne *et al.*, 1989, 1992; Nakatani *et al.*, 1985, 1994; Mikolajczak *et al.*, 1987, 1988; Kubo *et al.*, 1991, 1993; Schmutterer, 1995; Zhou *et al.*, 1996; Isman *et al.*, 1996; *inter alia*). Otras actividades biológicas importantes incluyen las siguientes: la antimalárica (Khalid *et al.*; 1989; Bray *et al.*, 1990; Champagne *et al.*, 1992 MacKinnon *et al.*, 1997;), la anticancerígena (Polonski *et al.*, 1979; Petit *et al.*, 1983; Fujiwara *et al.*, 1982, 1984; Mikolajczak *et al.*, 1987; Champagne *et al.*, 1992), la inmunoestimulante (Van der Nat *et al.*, 1991), la antihelmíntica, la antifúngica, la antibacteriana, la antiviral, la antiprotozoaria (Ara

et al., 1989; Champagne *et al.*, 1992; Waterman, 1993) y la fitotóxica (Segura-Correa *et al.*, 1993; Villarreal, 1996).

En relación a la actividad insecticida, en fechas recientes se ha descrito que estos compuestos afectan el desarrollo y/o crecimiento de aproximadamente 200 especies de insectos y aradores, que atacan principalmente a los cultivos de importancia económica (agrícola y forestal) [Mikolajczak *et al.*, 1987; Arnason *et al.*, 1985, 1987; Champagne *et al.*, 1992, Isman *et al.*, 1991, 1995; 1996; Schmutterer, 1987, 1995; Govindachari *et al.*, 1996]. Estos compuestos actúan como repelentes, inhibidores de la reproducción, inhibidores de la ovipación, fago-inhibidores y como inhibidores o retardadores del crecimiento del insecto. Todos estos efectos traen como consecuencia el desequilibrio de algunos procesos fisiológicos vitales para el insecto tales como la habilidad para caminar, volar, brincar, comer, ovipar y copular (Champagne *et al.*, 1992; Rembold y Puhlmann, 1993; Schmutterer, 1995).

Las investigaciones realizadas a la fecha sobre el potencial insecticida de los limonoides, no han permitido establecer claramente una relación estructura-actividad entre los diferentes grupos de limonoides evaluados, debido a que estos trabajos han sido desarrollados por diversos grupos de investigadores, los cuales han empleado diferentes especies de insectos y diferentes métodos para realizar las evaluaciones biológicas (Champagne *et al.*, 1992).

En este contexto, los limonoides constituyen un grupo de metabolitos secundarios promisorios para el control y la erradicación de insectos. En los últimos 20 años, la búsqueda de metabolitos secundarios en la familia de las meliáceas, como posibles agentes insecticidas, ha permitido el desarrollo comercial de insecticidas verdes, los cuales constituyen una nueva generación de pesticidas. Los limonoides que hoy en día se comercializan como insecticidas son la azadiractina (**8**), obtenida de *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* y la tusendanina (**1**), obtenida de *Melia toosendan* y de *Melia azedarach*. Este último compuesto fue recién identificado y es ampliamente comercializado como insecticida verde en China. De manera adicional, el extracto de esta planta es

muy empleado en China y Cuba para eliminar diferentes especies de insectos (Schmutterer, 1995; Isman *et al.*, 1996). En otros países, como Canadá y Alemania, los extractos de varias especies de meliáceas se emplean en los programas de control integral de plagas con la finalidad de mejorar el potencial insecticida de otras sustancias y disminuir los problemas de contaminación.

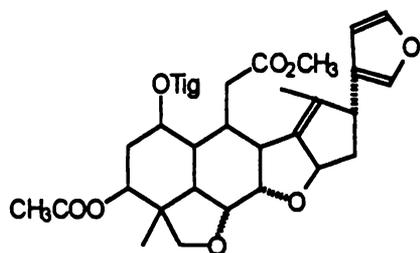
La actividad insecticida y el mecanismo de acción de la azadiractina (8) han sido ampliamente investigados, ya que hoy por hoy es el insecticida verde de mayor uso en los países desarrollados. La azadiractina (8) inhibe principalmente la ingesta de alimento debido a que ocasiona perturbaciones en el sistema endocrino e interfiere con los quimiorreceptores del insecto. También produce inhibición de la fecundidad, de la copulación, de la oviposición y provoca esterilidad. Estos últimos efectos se deben a que el compuesto induce una alteración de los sistemas hormonales y neuroendocrinos; así por ejemplo, se ha demostrado que la azadiractina reduce los niveles de las hormonas β -ecdisona y protoracicotropica a nivel cerebral en el insecto. Así mismo, interfiere con la transmisión de ciertas señales dentro del sistema neurotransmisor del complejo retrocerebral del insecto (Rembold, 1989; Rembold y Puhlman, 1993; Schmutterer, 1995).

La tusendanina (1), actúa como un inhibidor del crecimiento y el mecanismo de acción aun no está bien establecido. Sin embargo, es necesario aclarar que este compuesto al igual que la mayoría de limonoides evaluados a la fecha no presenta un mecanismo de acción neurotóxico (Isman *et al.*, 1996).

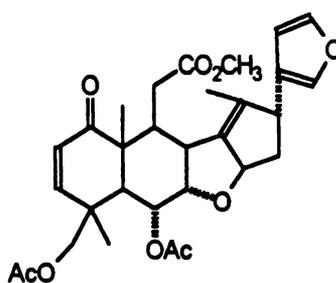
Otros limonoides que se están investigando ampliamente como posibles insecticidas comerciales son la salanina (12), la nimbina (13), la 6-desacetilnimbina (14), la nomilina (15), las tunacilinas (16), las tunacilidas (17) y las toonafilinas (9) (Yamasaki, 1988; Klocke, 1989a, 1989b; Rembold y Puhlman, 1993; Klocke, 1993; Isman *et al.*, 1996; Govindachari *et al.*, 1996).

Por último, cabe aclarar, que a la fecha se han aislado más de 300 limonoides en la familia de las meliáceas, de los cuales solo algunos han sido

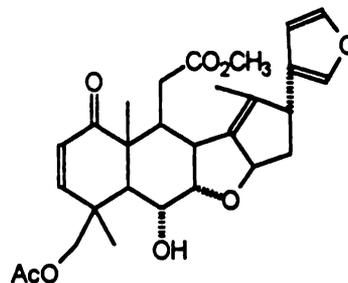
evaluados como posibles agentes insecticidas (Champagne *et al.*, 1992; Xie, 1994).



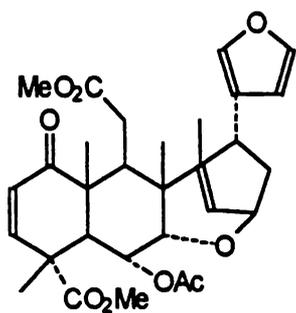
salanina (12)



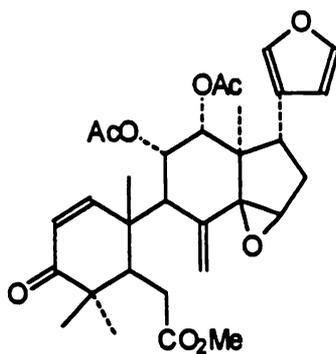
nimbina (13)



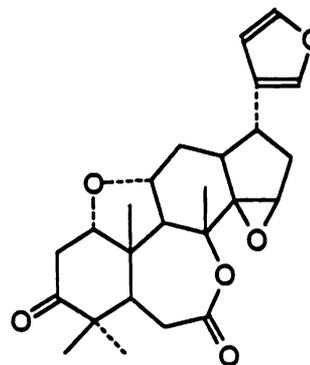
6-desacetilnimbina (14)



nomilina (15)



tunacilina (16)



tunacilidas (17)

I.3. GENERALIDADES SOBRE LA ESPECIE *Swietenia humilis*.

I.3.1. CONSIDERACIONES BOTANICAS Y ETNOBOTANICAS.

El género *Swietenia* (Meliaceae) esta constituido por tres especies: *Swietenia humilis*, *S. mahogani* y *S. macrophylla*. La distribución de las tres especies esta restringida al Continente Americano, desde México hasta el Norte de Sur América, incluyendo las Antillas Mayores. (Pennington, 1981). La especie *S. mahogani* se distribuye exclusivamente en las Islas del Caribe. Las especies *S. humilis* y *S. macrophylla* se cultivan hoy en día en diferentes regiones del mundo. En las Figuras 4, 5 y 6 se muestra la distribución de las tres especies de este género.

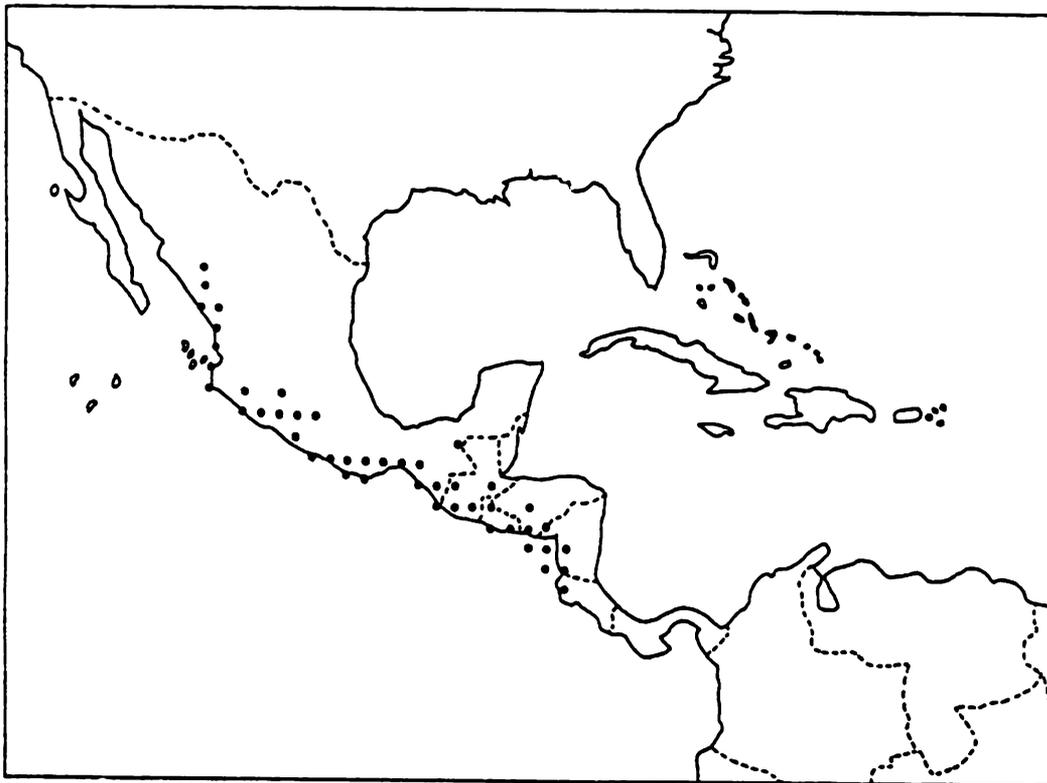


Figura 4. Distribución del género *Swietenia* (*S. humilis*)

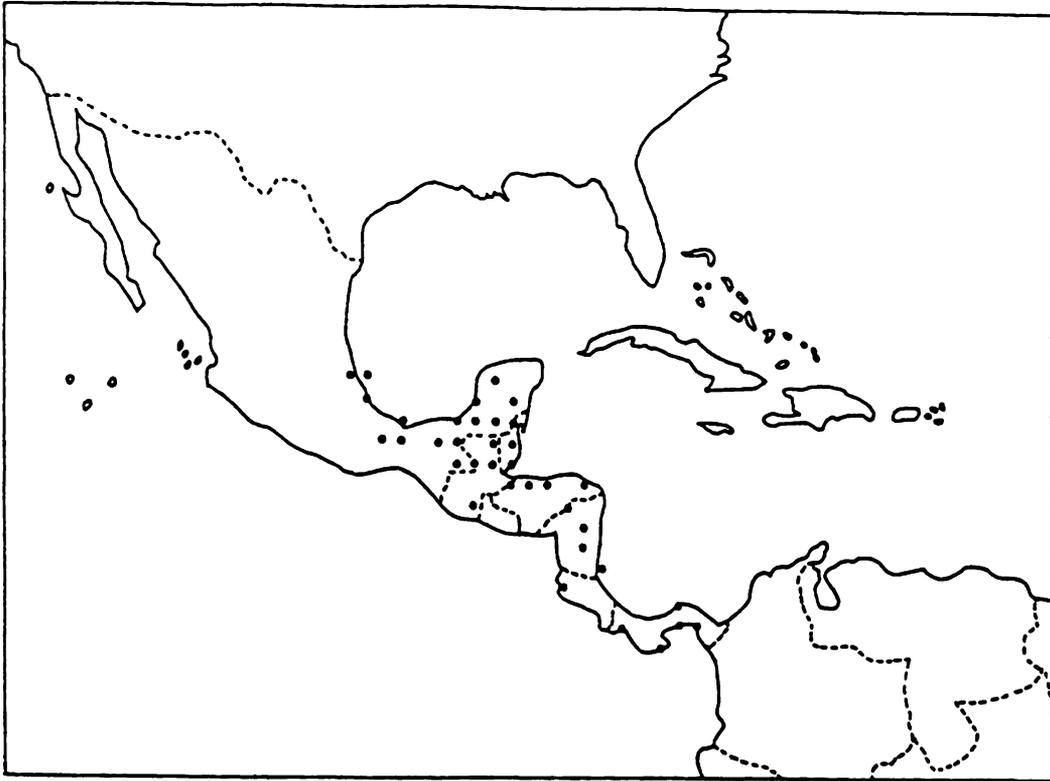


Figura 5 Distribución del género *Swietenia* (*S. macrophylla*)



Figura 6. Distribución del género *Swietenia* (*S. mahogani*).

S. humilis se distribuye principalmente en México, específicamente se localiza en la vertiente del Pacífico, desde Sinaloa y Durango hasta Chiapas (Rzendowski, 1978; Pennington, 1981) y se conoce comúnmente como mahogani del Pacífico, caoba (América latina), cobano, caobilla, gateado, venadillo y zopilote.

La especie es un árbol de hasta 20 m de altura que crece desde nivel del mar hasta 1200 m sobre nivel del mar. El tronco llega a medir hasta 50 cm de diámetro, es de color gris oscuro o castaño oscuro. Estos arboles crecen de manera dispersa y aislados (Standley 1968; Styles, 1981). Florecen en Abril y Mayo y sus frutos tardan hasta un año en madurar; las flores son de color blancas o cremas y de olor dulce. La forma del fruto (ovoide) permite reconocer fácilmente a la especie. Los troncos y las ramas desprenden una goma incolora cuando son dañadas. La madera de *S. humilis* se emplea para la fabricación de casas muebles y otros objetos. Recientemente, se ha descrito que esta especie está en peligro de extinción, por lo que es necesario tomar medidas para la conservación de la misma. Cabe mencionar que el género *Swietenia*, al igual que los géneros *Khaya*, *Cedrela*, *Melia*, *Entandrophragma* y *Guarea*, son géneros económicamente importantes por la calidad de su madera (Banerji, 1984, Isman *et al.*, 1996).

Las especies *S. humilis* y *S. macrophylla* son empleadas en la medicina tradicional de las distintas regiones donde se distribuye. Así, las semillas de *S. macrophylla* se emplean para el tratamiento de la hipertensión, la diabetes y la malaria en Indonesia (Kadota *et al.*, 1990b). Las semillas de *S. humilis* se emplean para el tratamiento de la amibiasis y la helmintiasis en México (Martínez, 1989, Soto-Nuñez, 1987). También se les considera útil para el tratamiento del cáncer, la tos y de los dolores de pecho (Díaz, 1976).

I.3.2. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GENERO SWIETENIA.

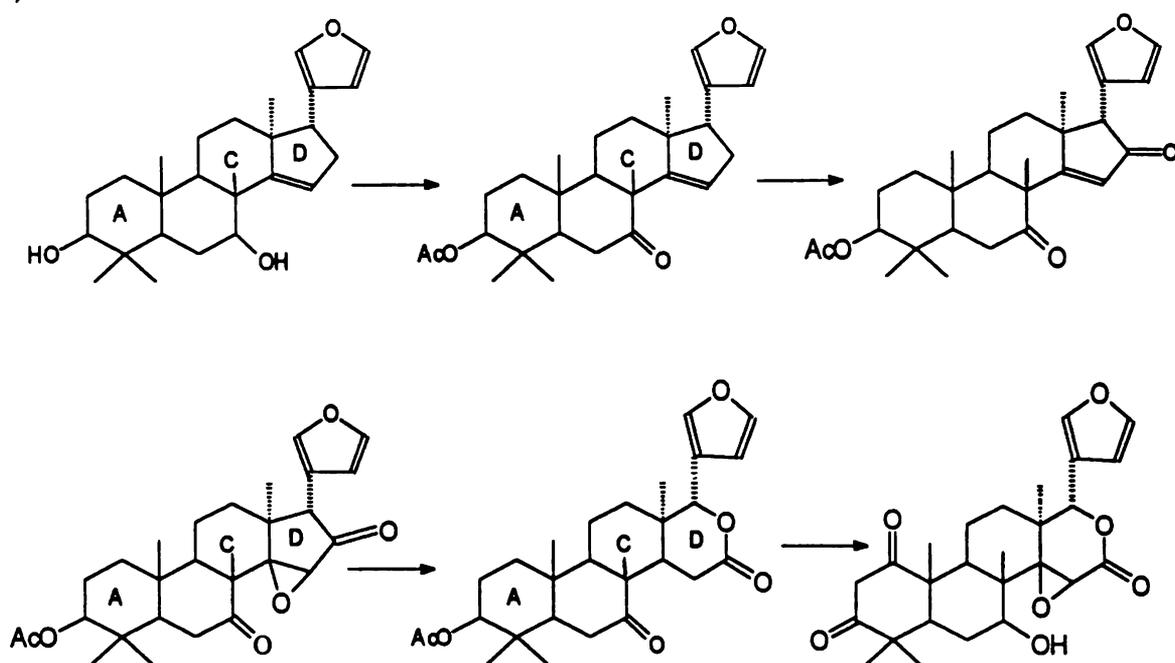
Las tres especies del género *Swietenia* han sido objeto de numerosas investigaciones químicas. Estos estudios han permitido el aislamiento y

caracterización de numerosos limonoides, principalmente del tipo de la mexicanólida (grupo IIIb).

Cabe mencionar que los limonoides con núcleo del tipo mexicanólida están ampliamente distribuidos en la familia Meliaceae y a la fecha se conocen aproximadamente 150 limonoides con este núcleo, los cuales han sido aislados de las especies *Swietenia mahogani* (Kadota *et al.*, 1989a, 1989b, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d), *S. humilis* (Okorie, 1971, Segura-Correa *et al.*, 1993), *S. macrophylla* (McPhail *et al.*, 1964, Connolly *et al.*, 1965, 1968, Chan *et al.*, 1976), *Entandrophragma candollei* (Adesida *et al.*, 1967), *E. utile* (Daniewski *et al.*, 1994), *E. angolense* (Akisanya *et al.*, 1960), *Carapa procera* (Mikolajczak *et al.*, 1988; Sondegan *et al.*, 1980; Taylor *et al.*, 1974), *Khaya niasica* (Taylor, 1969), *K. madagascariensis* (Taylor, 1970; Adesogan *et al.*, 1968), *K. senegalensis* (Adesogan, 1967, 1996) *K. ivorensis* (Olmo *et al.*, 1996, Adesogan, 1970), *Rugea glabra* (Mootoo *et al.*, 1996), *K. grandifolia* (Adesogan *et al.*, 1968, 1967), *Xilocarpus granatum* (Alvi *et al.*, 1991; Okorie y Taylor, 1970), *X. moluccensis* (Connolly, 1970, 1976, 1983), *Capuronianthus mahafalensis* (Mulholland *et al.*, 1988), *Pseudocedrela kotschyii* (Ekong *et al.*, 1967), *Cedrela angustifolia* (Lavie *et al.*, 1970), *C. odorata* (Chang *et al.*, 1967; Adeoye *et al.*, 1965; Okorie *et al.*, 1968), *C. mexicana* (Connolly *et al.*, 1965a, 1965b, 1968; Okorie *et al.*, 1968; Sanni, 1987) y *C. glaziovii* (Connolly *et al.*, 1969).

Del género *Swietenia*, se han aislado aproximadamente 40 limonoides con núcleo mexicanólida (Taylor, 1969; Okorie y Taylor, 1971; Chan *et al.*, 1976; Taylor *et al.*, 1983a, 1983b; Kadota *et al.*, 1989a, 1989b, 1990a, 1990b, 1990c, 1990d; Segura-Correa *et al.*, 1993). La biogénesis de este núcleo fue propuesto por Halsall (1975). En la Figura 7 se ilustra la secuencia biogenética propuesta por este autor y de la misma se desprende que la formación del núcleo implica una ruptura y rearreglo del anillo B, así como la oxidación del anillo D del limonoide de primer paso biogenético.

a) oxidación del anillo D.



b) ruptura y rearreglo del anillo B.

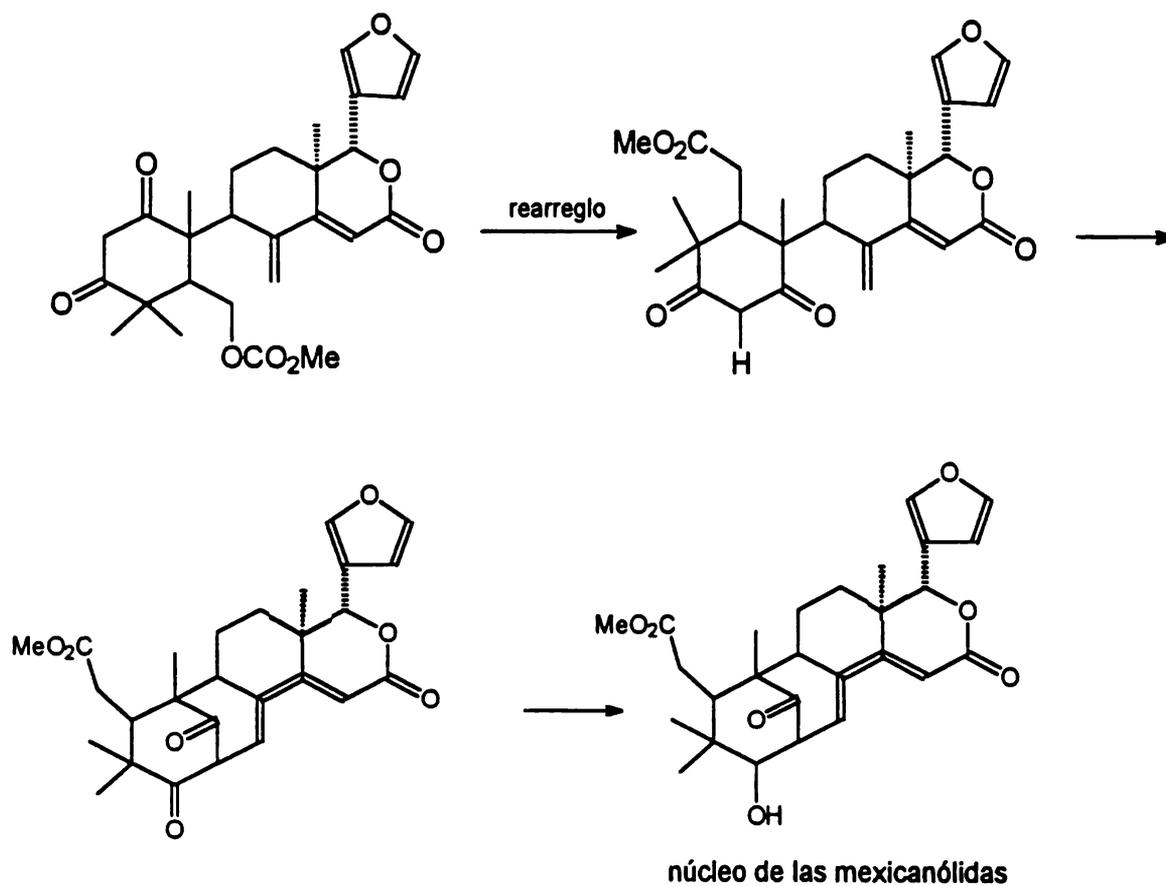


Figura 7. Biosíntesis del núcleo mexicanólida.

Otros limonoides presentes en el género *Swietenia* incluyen compuestos del grupo I como la mahonina (32) (Kadota et al., 1990c y 1989b); del grupo IIIa como la secomahonina (33), el metil-angolensato (3) y el metil 6-hidroxiangolensato (53) (Okorie y Taylor, 1971; Kadota et al., 1989b, 1990c y 1990a); y del grupo II como la gedunina (2), la acetoxigedunina (54) y la desacetoxigedunina (42) (Kadota et al., 1990a).

Por último, cabe mencionar que de este género se han obtenido otros metabolitos secundarios que incluyen triterpenoides como el cicloeugenol, la α -amirina, la β -amirina, el benzoato de lupeol, la hederagenina, el ciclomahogonol, el cicloswietenol, el cicloeucanenol y la melianona (Amorós-Marin et al., 1959, Basak et al., 1970; Okorie y Taylor, 1971; Chakraborty et al., 1971; Anjaneyulu, 1978; Banerji, 1984); ácidos grasos (palmítico, estéarico, oleico, linoléico, linolénico y araquidónico) y una cumarina identificada como la escopoletina. Tanto los ácidos grasos, así como la cumarina se obtuvieron de las hojas y corteza de *S. mahogani* y *S. macrophylla* (Basak et al., 1970; Chan et al., 1976).

En la Tabla 2 y Figura 8 se resumen los limonoides con núcleo mexicanólida obtenidos a la fecha de las distintas especies del género *Swietenia*.

Tabla 2. Limonoides aislados en el género *Swietenia*.

Nombre	Fuente	Clasificación	Referencia.
Swietenina (19) ¹	<i>S. macrophylla</i> <i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Taylor et al., 1883 Sigar et al., 1951, Kadota et al., 1989a
Swietenólida (20) ¹	<i>S. macrophylla</i> <i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Taylor et al., 1983, Sigar et al., 1951, Kadota et al., 1989a
3-Acetil- swietenólida (21)	<i>S. macrophylla</i>	Grupo IIIb	Taylor et al., 1983.
3,6-diacetil- swietenólida (22)	<i>S. macrophylla</i> <i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Chang et al., 1967, 1976, Kadota et al., 1990a, 1989a

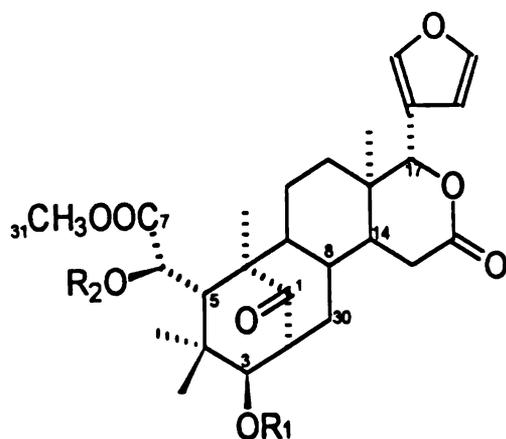
Tabla 2. Limonoides aislados en el género *Swietenia* (Continuación).

3-tigloil- swietenólida (23)	<i>S. macrophylla</i>	Grupo IIIb	Taylor <i>et al.</i> , 1983
Acetato de 8(30) epoxi-swietenina (24)	<i>S. macrophylla</i>	Grupo IIIb	Taylor <i>et al.</i> , 1983
2,3-dihidroxi- meliac- 8(30)-enato-3- isobutirato (25a) *	<i>S. humilis</i>	Grupo IIIb	Okorie <i>et al.</i> 1971.
2,3-dihidroxi- meliac- 8(30)-enato-3- tiglato (25b)*	<i>S. humilis</i>	Grupo IIIb	Okorie <i>et al.</i> 1971.
Humilínolidas A-D ³ (26-29)	<i>S. humilis</i>	Grupo IIIb	Segura-Correa <i>et al.</i> , 1993
Humilina B (30)	<i>S. humilis</i>	Grupo IIIb	Okorie <i>et al.</i> 1971.
Mahoganina (31)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1990d.
Mahonina (32)	<i>S. mahogani</i>	Grupo I	Kadota <i>et al.</i> , 1990c, 1989b.
Secomahonina (33)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIc	Kadota <i>et al.</i> , 1990c, 1989b
Swietemahoninas A ¹ -G (34-40)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1990b, 1989a.

Tabla 2. Limonoides aislados en el género *Swietenia* (Continuación).

Swietamahonólida (41)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1990b
7-desacetoxi-7-oxogedunina (42)	<i>S. mahogani</i>	Grupo II	Kadota <i>et al.</i> , 1990b, Champagne, <i>et al</i> 1992.
Swieteninas B-F (43-47)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1990a.
6-acetil-swietenólida (48)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1989a.
3-tigloil-6-acetil-swietenólida (49)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1990a.
6-acetil-swietenina (50)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1989a.
Kayasina T (51)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1989a
Proceranólida (52)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIb	Kadota <i>et al.</i> , 1989a
Metilango - lensato ² (3)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIa	Kadota <i>et al.</i> , 1990a
6-hidroxi -metil-angolensato (53)	<i>S. mahogani</i>	Grupo IIIa	Taylor, 1969.
6-desacetoxi-gedunina (54)	<i>S. mahogani</i>	Grupo II	Kadota <i>et al.</i> , 1990a

¹presenta actividad antiplaquetaria (Kadota *et al.*, 1989a), ²Presenta actividad antialimentaria (Champagne *et al.*, 1992), ³inhibe el crecimiento vegetal (Segura-Correa *et al.*, 1993), * se aislaron como la mezcla binaria (Okorie y Taylor, 1971).



19 $\Delta^{8,30}$, $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3) = \text{CH}(\text{CH}_3)$ $R_2 = \text{H}$

20 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = R_2 = \text{H}$

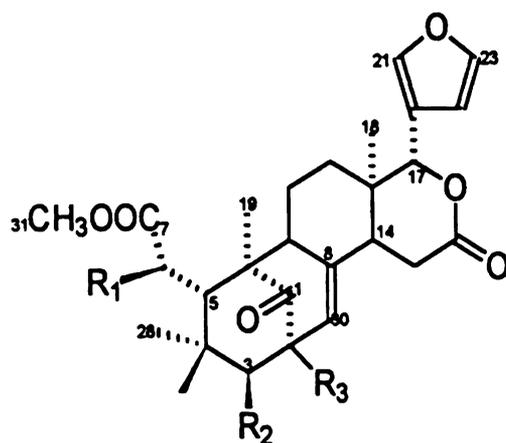
21 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = \text{COOCH}_3$ $R_2 = \text{H}$

22 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = R_2 = \text{COOCH}_3$

23 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = \text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$

48 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{COCH}_3$

49 $\Delta^{8,14}$, $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3) = \text{CHCH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_3$



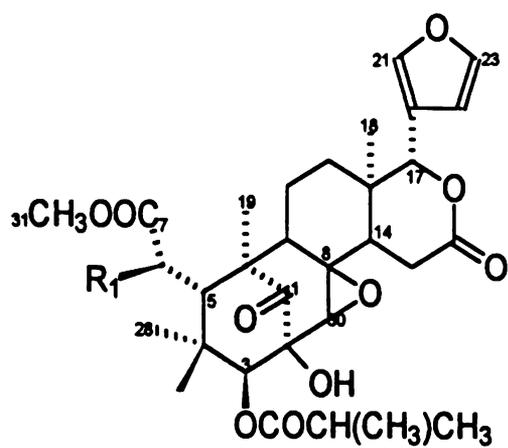
25a $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{O-isobutiril}$ $R_3 = \text{OH}$

25b $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{O-tigloil}$ $R_3 = \text{OH}$

28 $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{O-tigloi}$ $R_3 = \text{OAc}$

29 $R_1 = R_2 = \text{OAc}$ $R_3 = \text{OH}$

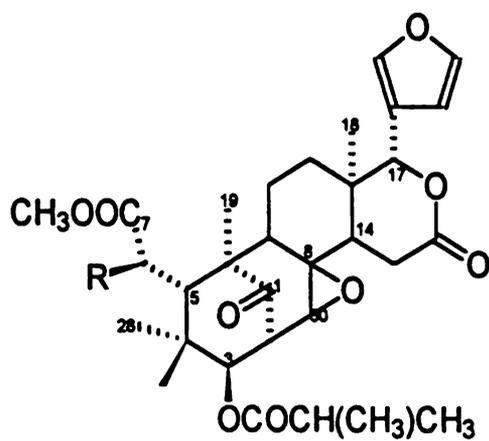
Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*:



26 $\text{R}_1 = \text{OH}$

27 $\text{R}_1 = \text{OAc}$

30 $\text{R}_1 = \text{H}$



24 $\text{R} = \text{OH}$

41 $\text{R} = \text{H}$

Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*. (Continuación)

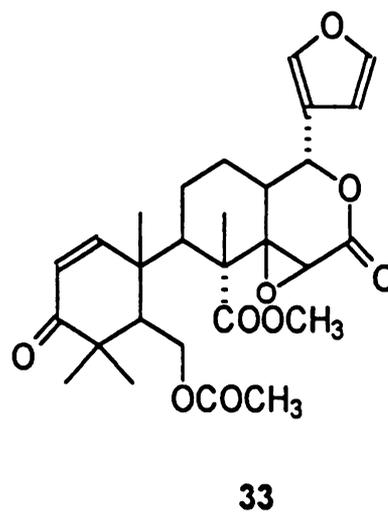
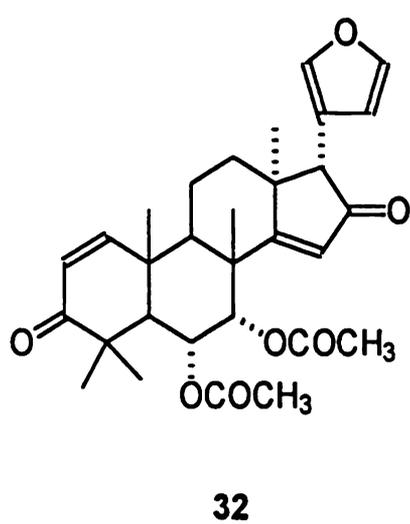
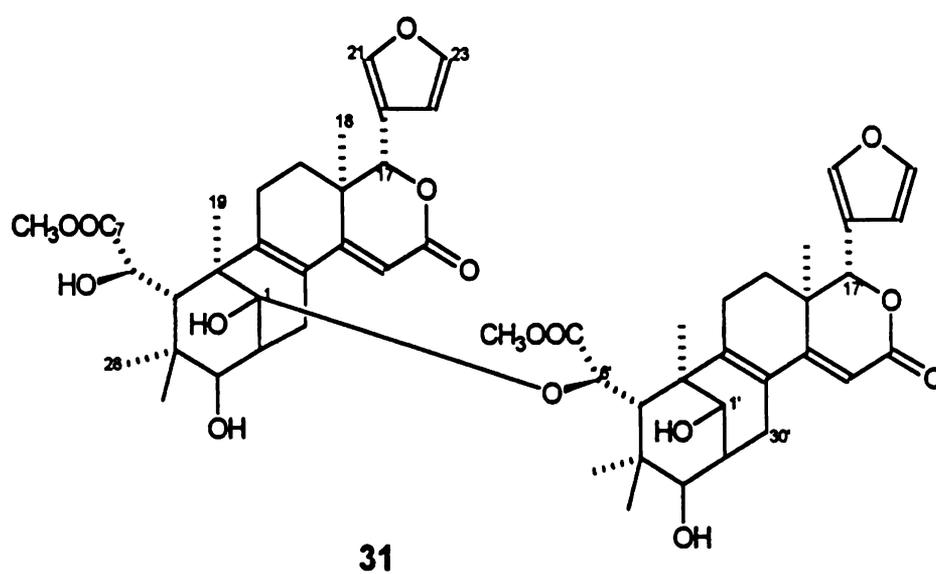
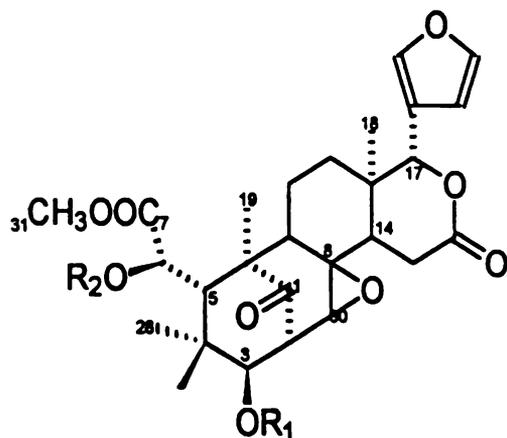
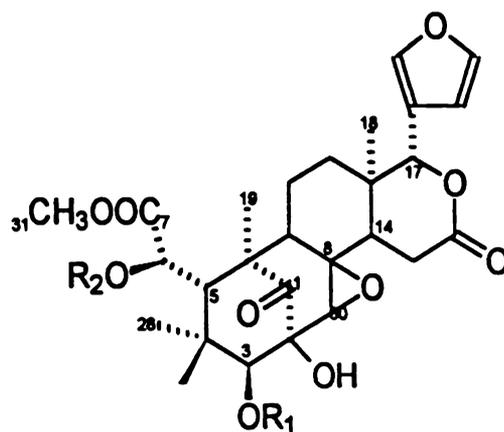


Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*. (Continuación)

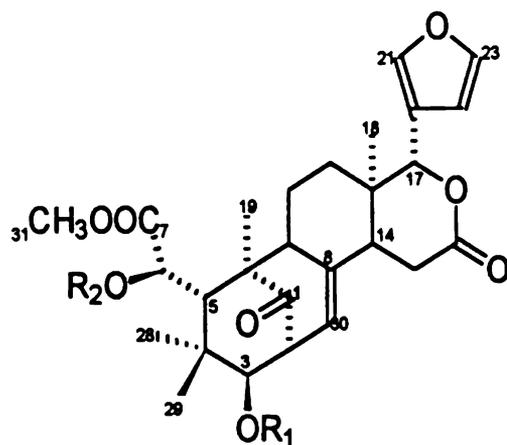


- 34 $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 35 $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_3$
 36 $R_1 = \text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_3$
 37 $R_1 = \text{COCH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 38 $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ $R_2 = \text{H}$
 39 $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ $R_2 = \text{COCH}_3$

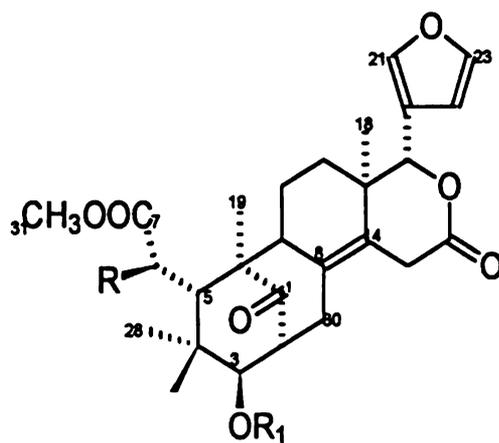


- 40 $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$ $R_2 = \text{OH}$

Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*. (Continuación)



- 43 $R_1 = \text{COCH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 44 $R_1 = \text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 45 $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$ $R_2 = \text{H}$
 46 $R_1 = \text{COCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ $R_2 = \text{H}$
 47 $R_1 = \text{COC}_6\text{H}_5$ $R_2 = \text{H}$
 50 $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$ $R_2 = \text{COCH}_3$



- 51 $R = \text{H}$ $R_1 = \text{COC}(\text{CH}_3)=\text{CHCH}_3$
 52 $R = R_1 = \text{H}$

Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*. (Continuación)

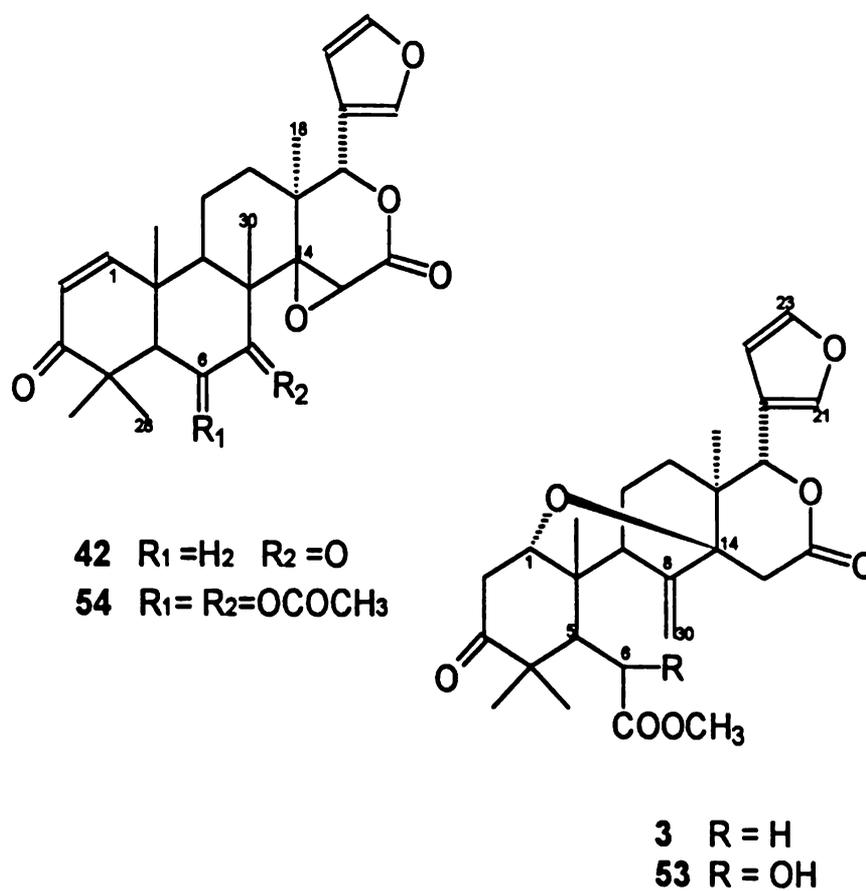


Figura 8. Estructura de los limonoides de tipo mexicanólida aislados del género *Swietenia*. (Continuación)

I.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS Y LIMONOIDES AISLADOS DEL GÉNERO *SWIETENIA*.

En lo que respecta a la actividad biológica del género *Swietenia*, en la literatura se ha descrito el potencial insecticida de los extractos orgánicos de las tres especies del género. De tal forma que los extractos metanólicos de las partes aéreas de *S. humilis* y *S. mahogani* demostraron actividad contra el insecto *Peridroma saucia* (Champagne *et al.*, 1989). Por otro lado, Mikolajczak y colaboradores (1987) evaluaron el efecto de los extractos etanólicos y hexánicos de las semillas de *S. mahogani* y *S. macrophylla* sobre *Spodoptera frugiperda* y encontraron que el extracto etanólico de *S. macrophylla* inhibe la ingesta de alimentos y provoca el 20% de mortalidad del insecto. El extracto etanólico de *S. mahogani* inhibió la ingesta de alimento y provocó un 90% de mortalidad. Sin embargo, los extractos hexánicos de las dos especies no demostraron efecto alguno contra el insecto de prueba.

Arnason y colaboradores (1993) determinaron el potencial insecticida del extracto etanólico de *S. macrophylla* y *S. mahogani*, empleando como insecto de prueba *Ostrinia nubilalis* y *Peridroma saucia*. Esta investigación permitió determinar que el extracto de la madera de *S. mahogani* es muy activo contra las dos especies de prueba y que el extracto etanólico de la madera de *S. macrophylla* es activo solo contra *Ostrinia nubilalis*. Con esta investigación se pudo determinar que los extractos de la madera fueron más activos que los extractos de las hojas.

Recientemente, se demostró la actividad fitotóxica del extracto metanólico de las semillas de *S. humilis* sobre dos especies de malezas (*Amaranthus hyphochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*). La concentración inhibidora media (CI₅₀) fue de 275.95 µg/ml para *A. hyphochondriacus* y de 171.54 µg/ml para *E. crusgalli* (Segura-Correa *et al.*, 1993).

Los estudios sobre la actividad biológica de los limonoides aislados del género *Swietenia*, son muy escasos y a la fecha solo se ha explorado la actividad fagoinhibidora de los limonoides metil-angolensato (3) y de la 7-

desacetoxigedunina (**42**). El metil-angolensato (**3**) inhibe en un 50% el crecimiento de *Pectinophora gossypiella* (CE_{50} =15 ppm) y es menos efectivo contra *Spodoptera frugiperda* (CE_{50} = 40 ppm) y *Heliothis zea* (CE_{50} = 60 ppm) (Mikolajczak *et al.*, 1988; Champagne *et al.*, 1992). La 7-desacetoxigedunina (**42**) ha sido evaluada contra *Spodoptera frugiperda* (CE_{50} =60 ppm), *Pectinophora gossypiella* (CE_{50} =22 ppm) y contra *Heliothis zea* (CE_{50} =165 ppm) (Champagne *et al.*, 1992). De la información anterior se desprende que la potencialidad insecticida de las mexicanólidas aisladas del género *Swietenia*, no ha sido objeto de investigación alguna.

Otra evaluación biológica que se ha explorado en los limonoides de este género es la actividad fitotóxica. Así, las humilinólidas A y C (**26**, **28**) obtenidas de *S. humilis*, inhiben el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli* (IC_{50} = 99.06 y 163 μ g/ml) y *Amaranthus hypochondriacus* (IC_{50} = 199.0 y 215 μ g/ml) [Segura-Correa *et al.*, 1993].

Por último, también se exploró el efecto antagonista sobre el factor activador de las plaquetas (Anti-PAF) de los compuestos 3-acetil-swietenólida (**21**), swietemahonina A (**34**), swietemahonina E (**38**), swietenina (**19**) y swietenólido (**20**). En esta investigación se determinó que la swietemahonina A (**34**) fue el compuesto mas potente ya que demostró una actividad inhibidora del 97.4 % (Kadota *et al.*, 1989a).

I.4.- GENERALIDADES SOBRE EL GUSANO BARRENADOR DEL MAIZ (*Ostrinia nubilalis* Hübner).

Ostrinia nubilalis Hübner pertenece a la familia Lepidoptera, la cual esta formada por mas de 1230 especies de insectos. La mayoría de estos insectos infestan a diferentes especies de cultivos de importancia agrícola, hortícola y forestal, ocasionando severos problemas en la producción. La familia se caracteriza porque las larvas se alimentan de hojas, frutos y tallos tiernos y en muchas ocasiones, también se alimentan de las raíces.

El gusano barrenador del maíz es una clase de insecto que ataca principalmente a los cultivos de maíz, ocasionando grandes pérdidas económicas. También se ha descrito que ataca aproximadamente a 200 especies de plantas cultivables de importancia agrícola como el sorgo, el trigo, el mijo, el frijol, la soya, la papa, el camote, la avena, la caña de azúcar, la cebada, el haba, la remolacha, el apio, el chícharo, el cáñamo, el pimiento, las acelgas, la zanahoria, la cebolla, el tabaco, el jitomate, el tomate, la alfalfa, entre otros (Davidson *et al.*, 1979; Daviero *et al.*, 1988).

Este insecto es nativo de Europa Central y en la actualidad se distribuye por todo el mundo. El insecto fue introducido en 1917 en los Estados Unidos, específicamente a través de los estados de Massachusetts y Pennsylvania. Hoy en día se distribuye en la mayor parte de los Estados Unidos y Canadá. En 1973, se reportó que en el territorio de Quebec hubo pérdidas hasta de un 50% en la producción del maíz por la presencia de este insecto. En 1962, en los Estados Unidos de América del Norte se invirtieron 10 millones de dólares para la erradicación de este insecto. Sin embargo, los resultados fueron poco satisfactorios y las pérdidas alcanzaron niveles sin precedentes, evaluándose en unos 210 millones de dólares. Hoy en día se estima que del 25 al 35% de los cultivos de cereales son infestados por el gusano barrenador del maíz (Davidson *et al.*, 1979; Borrer, 1981; Daviero *et al.*, 1988).

Durante su periodo de expansión en el Continente Americano, este insecto se reproducía una vez por año. Sin embargo, en 1930 se descubrió que en algunas zonas, aparecían dos generaciones por año y conforme el insecto se fue adaptando a las condiciones ambientales, este desarrolló la capacidad de reproducirse hasta cuatro veces por año. La reproducción depende de la latitud y altitud, por ejemplo en climas fríos, como el Norte de Canadá, se llegan a presentar una o dos generaciones por año y en climas templados se han detectado hasta 4 generaciones al año (Davidson, 1979; Guthrie *et al.*, 1985). Su ciclo de vida comprende cuatro estadios (Tabla 3).

Tabla 3. Periodos de desarrollo del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*)

Estado	Primera generación (días)	Segunda generación (días)
huevo	7.4	6.1
larva	44	25.7
pupa*	8.5	17.1
adulto	16	24

*es el periodo de invernación.

El adulto hembra es capaz de poner, en el envés de la hoja del maíz, de 14 a 20 huevecillos en cada oviposición; después del periodo de incubación (siete días) emerge la larva y es precisamente durante esta fase que el insecto ocasiona los problemas mas severos. El estado larvario comprende cinco fases y dura en promedio 30 días; posteriormente, el insecto alcanza el estado de pupación, el cual dura 12 días (en climas templados, dura apenas 5 días). La pupa es de color café rojizo y mide aproximadamente 1 cm. Por último, emerge el adulto. El adulto es una mariposa nocturna de color amarillo pálido o café claro; la diferencia entre el macho y la hembra adulto es la forma del abdomen (la hembra tiene el abdomen ovalado y el macho lo tiene redondo) y el tamaño de la mariposa (el macho es más pequeño que la hembra). El adulto se alimenta del tallo del maíz y llega a vivir hasta 24 días. La hembra durante su periodo reproductivo tiene la capacidad de ovipositar aproximadamente 2000 huevecillos.

Las larvas en la segunda y tercera fase de desarrollo se alimentan de la superficie de la hoja tierna, haciendo una especie de espiral. En la tercera y cuarta etapa de desarrollo, la larva se alimenta principalmente de la cubierta y de la vena central de la hoja y del fruto tierno. En la última fase, la larva se alimenta básicamente del tallo tierno (Davidson *et al.*, 1979; Guthrie *et al.*, 1985).

Los insecticidas de mayor uso para controlar o combatir este insecto, incluyen el DDT, el diazon, el endrin, el carbaril, el paration, el folato y el toxafeno, entre otros. Además se han empleado diversos métodos biológicos, como por ejemplo, la infección de las larvas del insecto con *Bacillus thuringiensis*. La

infección inducida por este bacilo provoca la muerte de las larvas; otro ejemplo lo constituye el uso de la mosca *Lyndella thomponi* y de escarabajos, los cuales se alimentan de las larvas.

Aunado a los métodos químicos y biológicos para la eliminación del gusano barrenador, en la actualidad se están desarrollando especies agrícolas resistentes al ataque del insecto mediante la aplicación de métodos de ingeniería genética. Por ejemplo, se descubrió que las plantas del maíz biosintetizan el metabolito secundario DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-benzoxazin-3-ona), compuesto que impide que la planta sea atacada por el gusano barrenador del maíz. A la fecha se han desarrollado aproximadamente 25 especies de híbridos del maíz resistentes al ataque de *Ostrinia nubilalis*, todas estas especies vegetales producen grandes cantidades de DIMBOA. (Guthrie *et al.*, 1985; Daviero *et al.*, 1988; Amason *et al.*, 1993). Otros métodos que también se han empleado para erradicar este insecto son la rotación y sincronización de cultivos. Es importante destacar que la mayoría de los métodos empleados a la fecha para el control de esta plaga han sido poco satisfactorios.

1.5. GENERALIDADES SOBRE *Malmea depressa*.

La especie *Malmea depressa* [Sinónimo *Guatteria leiophylla* (Dane. Sm. Saff ex Standl.)] pertenece a la familia Annonaceae. Esta familia esta constituida por 120 géneros y por mas de 2000 especies, las cuales son arboles, arbustos o enredaderas. Algunas especies de esta familia son fuente importante de frutos comestibles (chirimoya, anona, guanábana, etc.), aceites esenciales y aceites comestibles. Además, la madera de algunas especies se utiliza para la producción de alcohol. Por último, cabe mencionar que algunas especies de esta familia, tienen amplio uso en la medicina tradicional. La familia Annonaceae se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Se ha descrito que en América se distribuyen 48 géneros y 450 especies (Leboeut *et al.*, 1982).

M. depressa se distribuye en los bosques tropicales húmedos y en las zonas costeras de América Central y México (Standley *et al.*, 1946; Rzendowski, 1978; Cabrera *et al.*, 1982) y constituye una especie dominante en su ecosistema natural. Esta observación de índole ecológico sugiere que la especie vegetal contiene aleloquímicos capaces de interferir con el crecimiento de otras plantas.

En nuestro país, esta especie crece en la vertiente del Golfo de México, desde Veracruz hasta Campeche y la Península de Yucatán (Standley *et al.*, 1946, Cabrera *et al.*, 1982). En Quintana Roo la planta se distribuye en la selva mediana subperennifolia de todo el Estado (Cabrera *et al.*, 1982). *M. depressa* se conoce popularmente como elemuy (Yucatán, Veracruz), sufricaya (Campeche y Quintana Roo), elemuy-box (Yucatán) y nazareno prieto (Oaxaca) (Martínez, 1969 y Cabrera *et al.*, 1982) y es un árbol caducifolio, que crece hasta 10 m de alto. El tronco del árbol llega a medir hasta 20 cm de diámetro, es recto y de copa ramificada, de corteza escamosa de color gris o pardo oscuro, la madera es de color crema y de olor agradable. Las hojas son lanceoladas o elípticas en forma de punta de lanza y lisas de 7 a 12 cm de largo y de 2 a 5 cm de ancho; presenta inflorescencia terminal u opuesta a las hojas; las flores son de color amarillo verdoso y florecen entre junio y septiembre. Los frutos son bayas y en algunas regiones de nuestro país son comestibles (Standley *et al.*, 1946; Cabrera *et al.*, 1982). *M. depressa* se emplea en la medicina tradicional maya como agente analgésico, para el tratamiento de la pelagra y para destruir los cálculos renales y hepáticos (Cabrera *et al.*, 1982). La especie vegetal no ha sido objeto de investigación química o biológica alguna.

1.6. EL PROCESO DE LA FOTOSÍNTESIS.

1.6.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La fotosíntesis es un proceso metabólico, en donde la energía de la luz solar se convierte en energía química. Los productos de la reacción fotosintética son la glucosa, el almidón, la celulosa y el O₂ el cual se genera por la

descomposición (fotólisis) del agua. La fotosíntesis comprende dos procesos conocidos como la fase luminosa y la fase oscura. En la fase luminosa se produce O_2 , NADPH y ATP. Los dos últimos productos son utilizados en la fase oscura para reducir el CO_2 ambiental y transformarlo principalmente en carbohidratos (Hiller y Goodchild, 1981; Voet y Voet, 1995).

Las enzimas que actúan en el proceso fotosintético se localizan en los cloroplastos. En las plantas superiores estos organelos son cuerpos elipsoidales (discos lenticulares) de 3 a 10 μm de diámetro y de 1 a 2 μm de espesor y de color verde. Cada cloroplasto consta de una doble membrana, una externa llamada envoltura y otra interna, separadas por un espacio intermembranal (Figura 9). La membrana interna es una barrera permeable que regula el paso de los sustratos y productos de la fotosíntesis hacia adentro y afuera del cloroplasto. La membrana externa es permeable a todo tipo de moléculas de bajo peso molecular y tiene canales por donde penetran macromoléculas como las proteínas. El sistema interior del organelo se llama estroma el cual posee DNA, plastorribosomas, plastoglobulos, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, iones y por lo menos 200 tipos de proteínas, muchas de las cuales tienen actividad enzimática. Dentro del estroma hay una serie de sacos llamados tilacoides, los cuales se apilan para formar las granas. Las granas están interconectadas mediante unas membranas llamadas interlamelas (Ellis, 1989, Voet y Voet, 1995). Las granas corresponden a los gránulos verdes que se distinguen en el interior del cloroplasto. Cada cloroplasto contiene entre 40 y 60 granas, estrechamente unidas (Figura 9 y 10).

La membrana tilacoidal contiene glucolípidos (38%), pigmentos (12%) y lipoproteínas (50%). Las enzimas de la fase luminosa de la fotosíntesis se encuentran formando parte de las membranas de los tilacoides, mientras que las enzimas de la fase oscura, que fijan el CO_2 y lo reducen, se localizan en la fase acuosa del estroma.

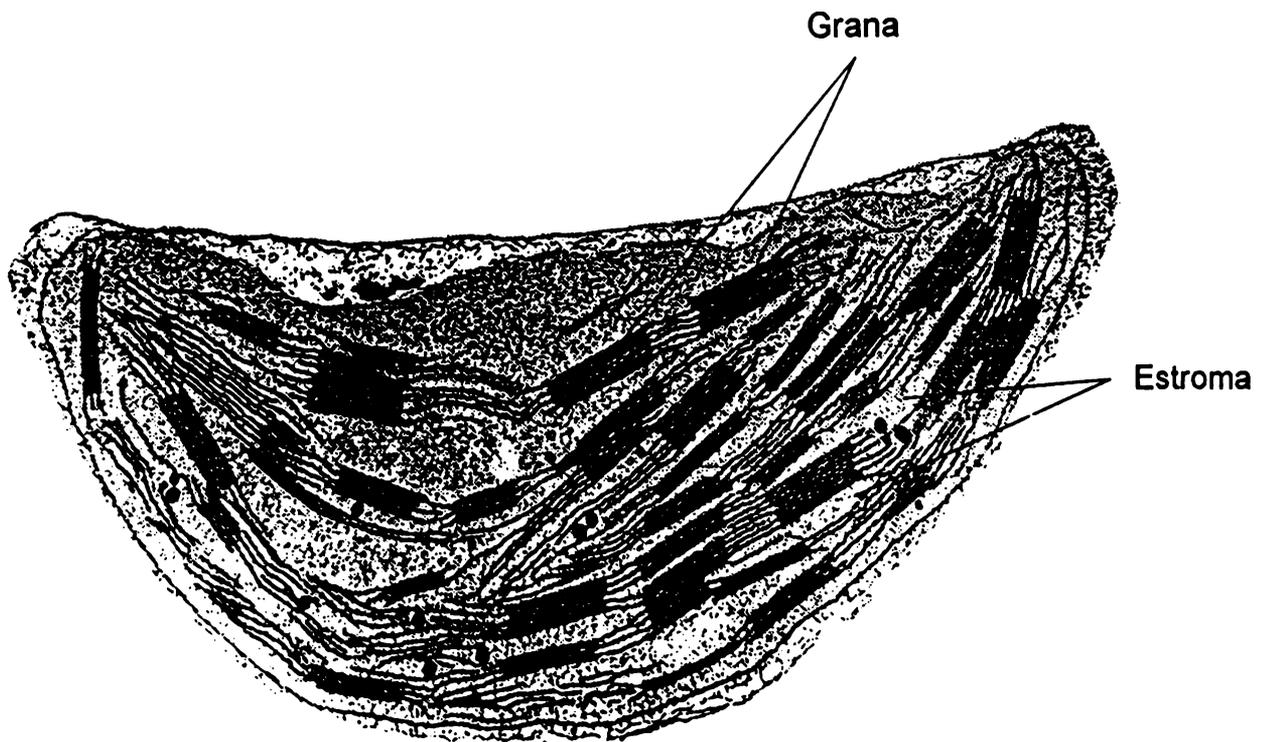
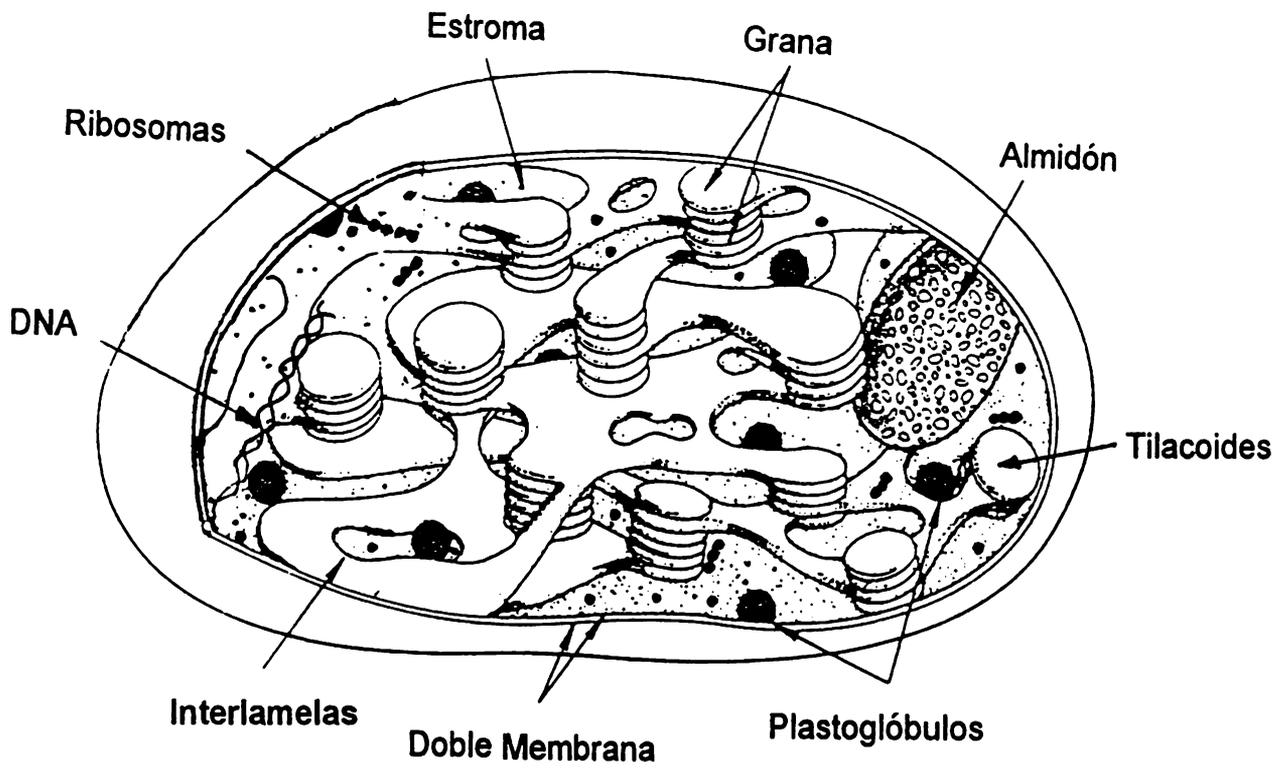


Figura 9. Representación de la estructura esquemática de un cloroplasto.

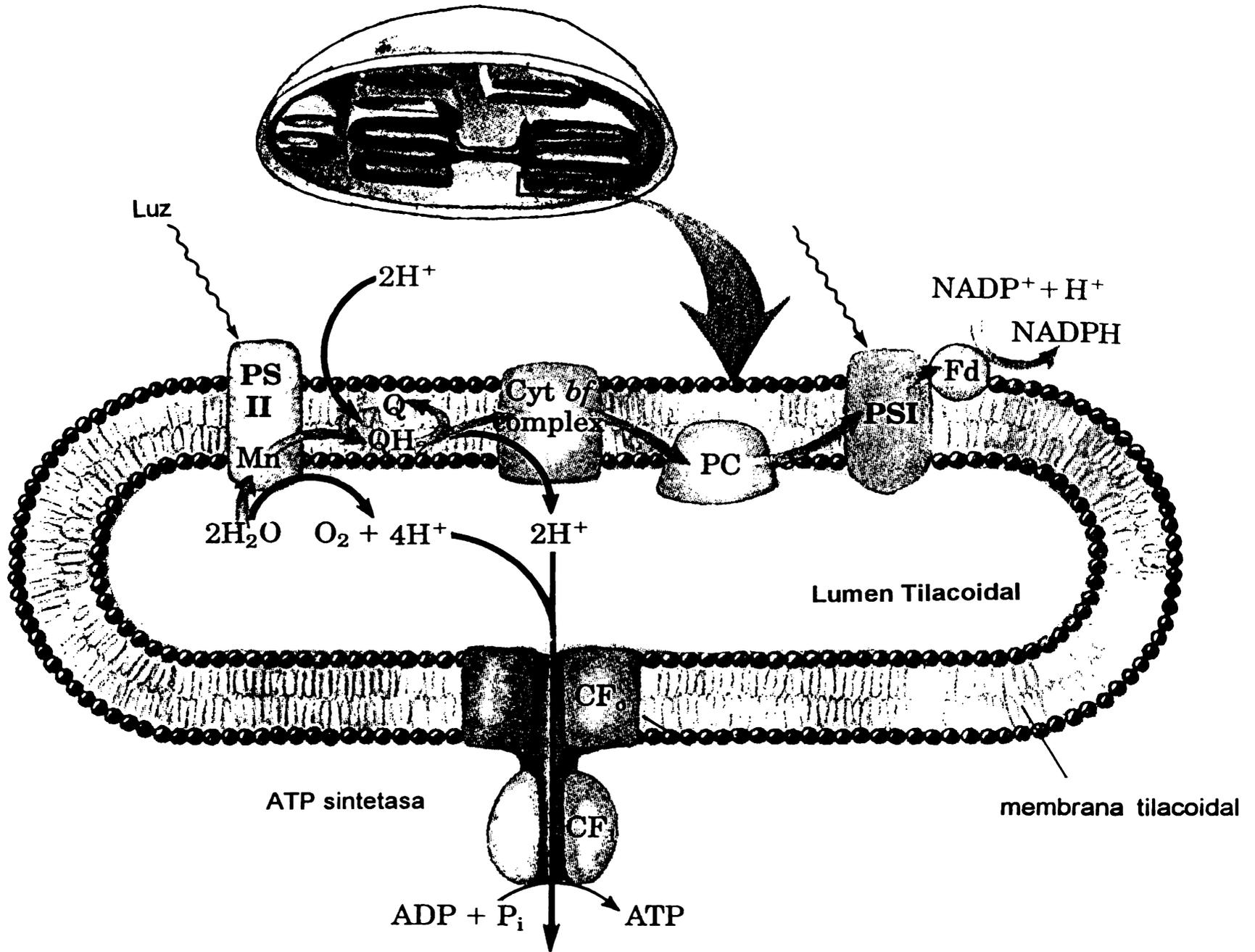


Figura 10. Representación esquemática de la grana.

Las reacciones dependientes de la luz son las que corresponden a la reacción de Hill o cadena transportadora de electrones. A través de estas reacciones de oxidoreducción, se genera un gradiente electroquímico de protones, que es usado en la síntesis de ATP. Los eventos asociados a la reacción de Hill son los siguientes: en primer lugar, la luz se absorbe por los pigmentos antena (clorofilas y carotenos) y se transfiere a los centros de reacción fotoquímico (Figura 11). En seguida se lleva a cabo un transporte de electrones de un donador (agua) a un aceptor de electrones (NADP^*), a través de una serie de componentes multienzimáticos redox. Además del flujo de electrones, se efectúa un transporte vectorial de protones hacia el interior de la membrana del tilacoide, con la consecuente generación de un gradiente a través de la membrana. La energía libre que contiene este gradiente electroquímico es utilizado para la fosforilación del ADP con fosfato inorgánico (P_i). Esta última reacción es catalizada por la enzima H^+ -ATPasa, por lo tanto, el flujo de electrones está acoplado a la síntesis de ATP mediante el gradiente electroquímico de protones.

El poder reductor del NADPH y la energía del ATP producido en la fase luminosa son utilizados directamente para los procesos secundarios, como la fijación de CO_2 y la síntesis de carbohidratos.

Cada cadena transportadora de electrones se considera como una unidad fotoquímica o fotosintética (Fotosistema) y se compone de proteínas acarreadoras de electrones, pigmentos antena y un centro de reacción. Las plantas superiores contienen dos fotosistemas: el fotosistema I (FSI) y el fotosistema II (FSII).

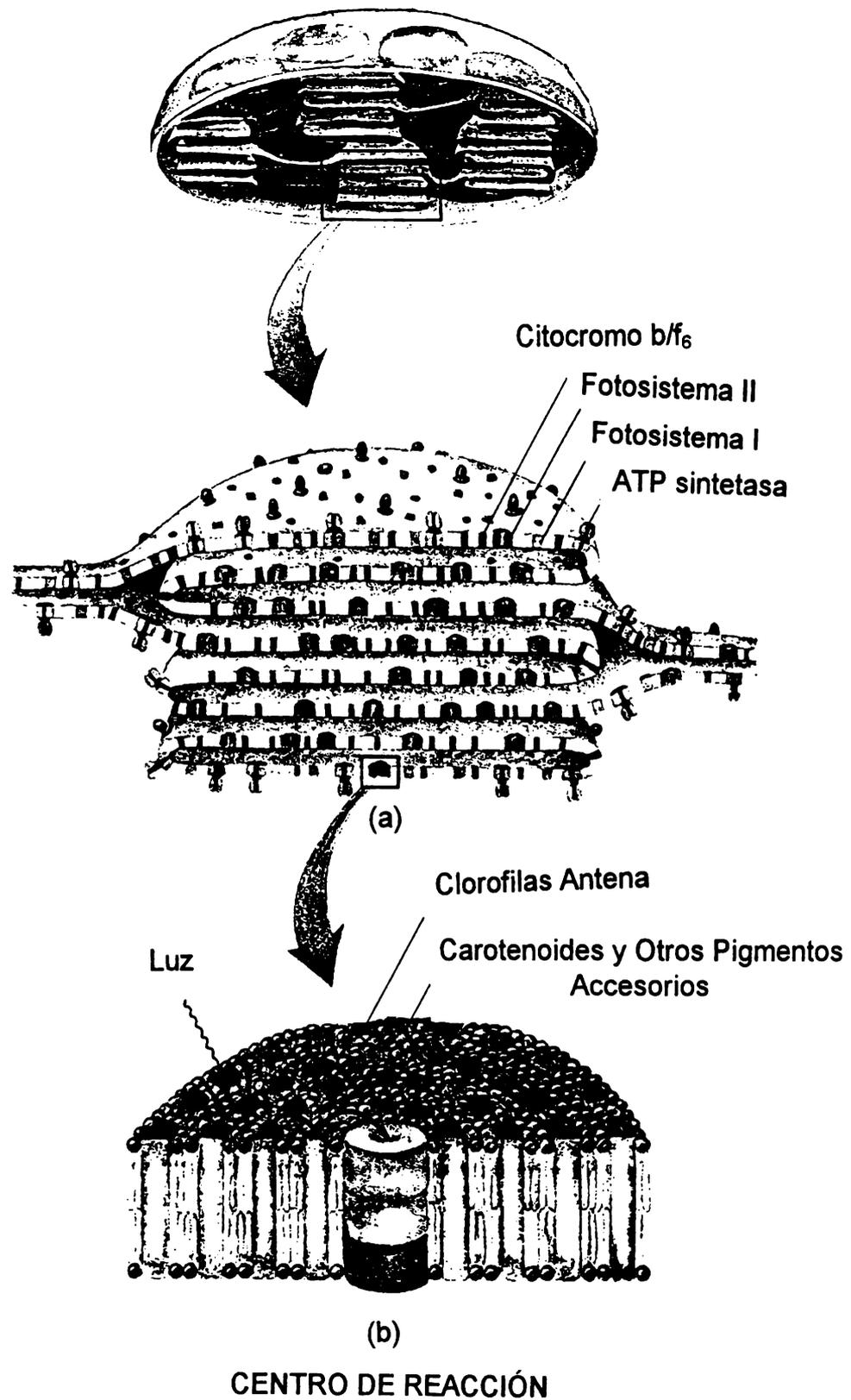


Figura 11. Organización de los componentes de la fotosíntesis en la membrana tilacoidal. A) distribución de los FSI y II, ATPasa y el complejo Cit b_6/f . B) ampliación de un fotosistema mostrando el centro de reacción, clorofilas antena y pigmentos accesorios.

1.6.2. REACCIONES LUMINOSAS DE LA FOTOSÍNTESIS.

En los cloroplastos de las plantas superiores la luz es absorbida por unos pigmentos específicos que son las clorofilas *a* y *b*. Existen otros tipos de pigmentos de importancia denominados pigmentos accesorios secundarios ya que su capacidad de absorción de luz complementan al de las clorofilas. Entre ellos se encuentran los carotenoides en las plantas y las ficobilinas en las cianobacterias.

Las clorofilas y los carotenoides conocidos como pigmentos antena tienen la función de absorber la luz y canalizar su energía a las clorofilas *b* y *a* y éstas a su vez a los centros de reacción. Estos centros contienen moléculas de clorofila *a* formando generalmente dímeros. Cuando una molécula de clorofila absorbe un cuanto de luz, ésta eleva su energía y desplaza uno de sus electrones a un nivel energético mayor. La molécula de clorofila puede disipar esa energía mediante diferentes mecanismos (Anderson y Beardall, 1991, Voet y Voet, 1995) y los más importantes se describen a continuación:

- a) La transferencia de energía a otra molécula de clorofila. La energía liberada cuando un electrón excitado de una molécula de clorofila regresa al estado basal, se utiliza para elevar al estado excitado un electrón de la molécula vecina. Los pigmentos cosechadores de luz disipan su energía de esta forma y los fotones absorbidos pasan de una molécula a otra hasta que alcanzan los pigmentos de los centros de reacción.
- b) El regreso de la molécula de clorofila del estado excitado al basal se realiza por medio de una reacción química que generalmente involucra la pérdida de un electrón de la molécula del pigmento. La clorofila de los centros de reacción disipa su energía de esta forma. Se conocen dos centros de reacción en las plantas superiores, P_{680} y P_{700} para el FSII y el FSI, respectivamente. La pérdida de un electrón en la molécula de clorofila deja una carga neta positiva que se neutraliza con un electrón proveniente de alguna molécula donadora. En el FSII los electrones provienen de la oxidación del agua, mientras que en el FSI la molécula donadora de electrones es la plastocianina.

I.6.3. TRANSPORTE DE ELECTRONES.

La secuencia en que operan los componentes multienzimáticos de la cadena redox es en serie y se representan en la Figura 12 (Anderson y Beardall, 1991). La absorbancia de la luz en el centro de reacción del FSII provoca la transferencia de un electrón a la feofitina (Ph) y como resultado, el P_{680} queda como un oxidante (P_{680}^*) que debe regresar al estado reducido (P_{680}) para continuar con las fotoreacciones. El electrón necesario para su reducción proviene de la fotólisis del agua (Trebst, 1972). El sitio de oxidación del agua contiene cuatro iones Mn con números de oxidación que varían entre 2^+ y 4^+ . En este proceso dos moléculas de agua se fotolisan generando cuatro electrones, cuatro protones y una molécula de O_2 .



El centro de reacción P_{680}^* dona un electrón cuando está reducido, el electrón llega por vía de la feofitina (una molécula de clorofila a sin Mg) al aceptor primario Q_A (Golbeck, 1977), una quinona unida a su apoproteína transformándose en semiquinona. Después el electrón es transferido a la enzima redox Q_B (quinona unida a una proteína de 32 KD que acepta dos electrones y dos protones para reducirse a plastoquinol) conocida como el aceptor secundario del FSII. Los electrones viajan por la membrana y llegan a la siguiente molécula aceptora de electrones que es la plastoquinona (PQ); esta última transfiere el electrón al complejo de citocromo b_6/f (Cit b_6/f). El complejo Cit b_6/f contiene a los citocromos f, b_{563} y Fe-S (Hurt y Hauska, 1981). Este complejo oxida a la PQ y reduce a la plastocianina (PC) por lo que tiene la actividad de plastoquinona oxidasa y PC reductasa. La PC es el siguiente acarreador, la cual dona los electrones al centro de reacción del FSI (Armstrong, 1989). El centro de reacción del FSI oxidado (P_{700}^*) se produce al ser excitado (con la luz visible) simultáneamente con P_{680} . El P_{700} excitado dona electrones de uno en uno al aceptor primario del FSI, que se ha identificado como A_0 y que es una molécula de clorofila a unida a una proteína y después dona su electrón a la enzima redox A_1 (una plastoquinona) y a los centros Fe-S (llamados F_A , F_B y F_{AB}). A

continuación los electrones son transportados a la ferredoxina (Fd), la cual se encuentra en la cara externa de la membrana tilacoidal. La Fd es una proteína que contiene dos centros Fe-S, de aquí los electrones son transferidos a la ferredoxina-NADP^{*}-reductasa (FP), la cual contiene flavin adenin dinucleótido (FAD^{*}). Esta última se reduce con los electrones y con los dos protones que toma del medio externo para formar el FADH₂. Por último, el NADP^{*} acepta los electrones y un protón del FADH₂ para formar el NADPH. El transporte de electrones de la proteína Fe-S al NADP^{*} se efectúa en favor de un gradiente electroquímico.

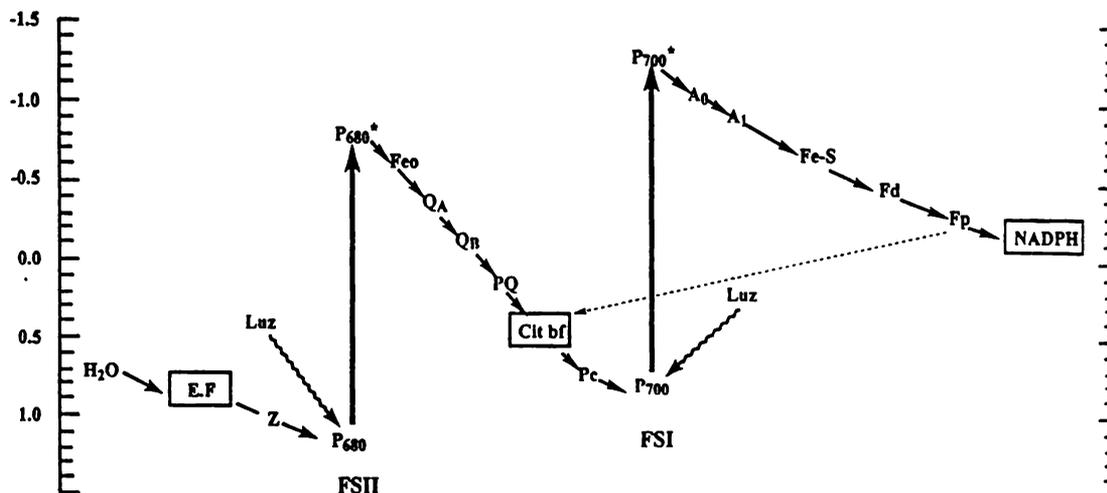


Figura 12. Esquema Z. Representa a las enzimas redox del transporte de electrones en la membrana del tilacoide ordenadas por su potencial estándar de reducción. Las flechas más largas indican fotoexcitación y las cortas indican transporte de electrones. Este esquema muestra el camino de la transferencia de electrones no cíclico desde el H₂O hasta NADP^{*}. La línea punteada representa la transferencia de electrones cíclica, la cual involucra únicamente al FSI; donde los electrones proyectados al aceptor primario del FSII pueden retornar al P₇₀₀^{*} mediante el citocromo b₆/f.

El transporte de electrones antes mencionado se conoce como transporte de electrones no cíclico en donde los electrones fluyen del agua al NADPH (Danks *et al.*, 1983; Voet y Voet, 1995). Existe otro tipo de transporte de electrones que es cíclico en el cual, los electrones son transferidos desde el P_{700}^* (centro de reacción excitado del FSI) a la Fd y luego al complejo de Cit b_6/f mediado por el flavin adenin mononucleótido (FMN). Los protones son bombeados por este complejo a la vez que los electrones regresan al centro de reacción a través de la PC; este flujo de electrones cíclico origina un gradiente de protones a través de la membrana, que contiene la energía libre para la síntesis de ATP. En este proceso se genera ATP sin la formación de NADPH y O_2 . El ATP formado en el flujo de electrones cíclico complementa la cantidad de ATP que se requiere para la reducción de CO_2 a carbohidratos (Anderson y Beardall, 1991; Lehninger *et al.*, 1993; Voet y Voet, 1995).

I.7- LA FOTOSÍNTESIS COMO BLANCO DE ACCIÓN DE FITOTOXINAS DE ORIGEN NATURAL.

Las fitotoxinas ejercen su efecto a través de diversos mecanismos, mismos que afectan algunos de los procesos esenciales del metabolismo o la fisiología de los vegetales. Entre los mecanismos de acción de mayor importancia destacan aquellos que interfieren con el abastecimiento de energía, por ejemplo, el transporte de electrones mitocondrial, la fosforilación oxidativa, el transporte de electrones fotosintético, la biosíntesis de carotenoides y clorofilas y la destrucción de pigmentos fotosintéticos; la organización estructural mediante la alteración de la biosíntesis de lípidos y la integridad de la membrana celular y el crecimiento y la reproducción de la célula vegetal, i. e. la división celular, la síntesis de ácidos nucleicos, el metabolismo del nitrógeno incluyendo la biosíntesis de aminoácidos y la biosíntesis de celulosa (Einhellig, 1995; Moreland, 1980). El 70% de los agentes herbicidas de uso comercial tiene como blanco de acción el proceso de la fotosíntesis. En consecuencia, este proceso constituye un blanco de acción

altamente específico (vegetales vs. animales) para las fitotoxinas (Macías, 1995; Duke y Abbas, 1995; Moreland, 1980).

De acuerdo a Moreland (1980), las sustancias con actividad herbicida (sintéticas o naturales) que afectan el proceso de la fotosíntesis se dividen en cuatro grupos: los inhibidores del transporte de electrones, los compuestos desacoplantes, las sustancias inhibidoras de la transferencia de energía y lasceptoras de electrones.

a) Inhibidores del transporte de electrones.

Son sustancias que inactivan o inhiben uno o más de los sistemas enzimáticos que intervienen en el transporte de electrones de la cadena fotosintética, principalmente a nivel de la enzima redox Q_B que se ubica en el FSII, interfiriendo así con el transporte de electrones del H_2O al $NADP^+$ (Moreland, 1980). Algunos ejemplos de sustancias que actúan como inhibidores del transporte de electrones son el tris (tris-hidroximetilaminometano), el cual inhibe a la enzima que fotolisa el agua (Veron, 1969; Izawa y Ort, 1974); el DCMU [3-(3,4-diclorofenol)-1,1-dimetilurea] y el diurón, los cuales inhiben el transporte de electrones entre Q_A y Q_B (Moreland, 1980) y el DBMIB (dibromoetilisopropil-p-benzoquinona), que inhibe a la PC (Ouitrakul e Izawa, 1973). Entre los herbicidas sintéticos que actúan como inhibidores del transporte de electrones se encuentran las triazinas (atrazina, prometrina), las piridazinonas (pyrazon, norflurazon), los carbamatos (fenmedifan, barban), las fenilureas (diuron) y los uracilos (lenacil) [Moreland, 1980]. Las fenilureas y las triazinas inhiben la reoxidación del aceptor primario (Q_A) del FSII (Mathis y Rutherford, 1984; Moreland, 1980; Mersie, 1993). En tanto que los herbicidas fenólicos inhiben la fotólisis del agua, por inhibición de un polipéptido de 41 KD del centro de reacción del FSII (Mathis y Rutherford, 1984; Moreland, 1980).

b) Desacoplantes.

Los herbicidas que actúan como agentes desacoplantes son aquellos que interfieren con el acoplamiento que existe entre el transporte de electrones

y la síntesis de ATP, inhibiendo la velocidad de la fotofosforilación debido a una disipación del gradiente electroquímico. La mayoría de los desacoplantes son ácidos débiles lipofílicos, los cuales en su forma iónica atraviesan la membrana tilacoidal tomando protones del medio interno; una vez protonados, estos viajan nuevamente a la parte externa del tilacoide donde se disocian liberando al protón. Sólo un herbicida sintético comercial, la perfluidona, actúa como un desacoplante. Sin embargo, existen muchas sustancias sintéticas o naturales que presentan este comportamiento. Entre ellos destacan el dinitrofenol (DNP), el cloruro de amonio (NH_4Cl), la cloropromacina, el atebriin, el carbonilciano-*p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), el carbonilciano-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) y los antibióticos nigericina y gramicidina (Moreland, 1980).

c) Inhibidores de la transferencia de energía.

Estos compuestos actúan directamente sobre la fotofosforilación, inhibiendo la actividad de la H^+ -ATPasa de esta manera interfieren con la actividad de las subunidades CF_1 y/o Cf_0 . Estas sustancias inhiben tanto el flujo de electrones como la síntesis de ATP. Entre los herbicidas que presentan esta actividad se encuentran las fenilureas, como las 1,2,3-triadiazolil-fenilureas. Otras sustancias que actúan como inhibidores de la transferencia de energía son la N-etil-meleimida (NEM) [Melandri, 1975], la N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCCD) [McCarty y Racker, 1975], el Dio-9, la sintalina (Moreland, 1980), la N,N-dimetil-formamida (Peña-Valdivia *et al.*, 1991) y la florizina (Flo) [Moreland, 1980].

d) Aceptores de electrones.

Los aceptores de electrones son aquellos que compiten por los electrones con algunas enzimas oxidoreductoras de la cadena transportadora de electrones. Estos compuestos presentan potenciales redox muy similares al de algunas enzimasceptoras de electrones de la cadena fotosintética, por lo que pueden competir con las mismas, desviando el transporte de

electrones. Este tipo de compuestos son muy empleados para estudiar las reacciones parciales de los fotosistemas (I y II), como ejemplo, se pueden mencionar al silicomolibdato (SiMo), el cual actúa como un aceptor primario de electrones a nivel de Q_A (FSII); el diclorofenolindofenol (DCPIP) y el ferricianuro de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$), los cuales actúan entre PQ y Citocromo b_6/f ; la fenacina metasulfato (PMS), que actúa a nivel de P_{700} y el metilviológeno que acepta electrones a nivel de los centros de reacción Fe-S del FSI. Entre los herbicidas que actúan como aceptores de electrones están los que pertenecen a las sales de bipyridinio como el paraquat y el diquat (Moreland, 1980).

Al igual que los herbicidas sintéticos, antes mencionados, numerosas fitotoxinas vegetales afectan también los procesos de la fotosíntesis. Así por ejemplo, el ácido ferúlico reduce drásticamente la fotosíntesis en las concentraciones de prueba de 500 y 750 μM . Los ácidos benzoico, cinámico y clorogénico también inhiben el proceso fotosintético, en un rango de concentración de 100 a 2000 μM . La escopoletina inhibe la fotosíntesis de *Nicotiana tabacum*, de *Helianthus annuus* y de *Amaranthus retroflexus* (Einhellig, 1970). Einhellig (1986) y Mersie (1993) reportaron que el ácido cinámico y algunas cumarinas inhiben la fotosíntesis de *Lemna minor*. Sin embargo, estos autores no reportan el sitio de acción de estos compuestos.

Por otro lado, Mersie y colaboradores (1993), reportaron que los ácidos *p*-cumárico, ferúlico, clorogénico y vainílico inhiben la fotosíntesis de *Abutilon theophrasti* a la concentración de 100 μM . Estas determinaciones se realizaron mediante la evaluación de la incorporación de $^{14}CO_2$ en células en suspensión. De los compuestos ensayados, el que presentó una mayor potencia fue el ácido vainílico, ya que inhibió en un 65% la incorporación de CO_2 . El ácido clorogénico fue el que desarrollo menor potencia, ya que inhibió la toma de CO_2 en un 57%. Los dos compuestos restantes fueron menos activos. De manera adicional, estos autores describen que los ácidos *p*-cumárico y ferúlico reducen el proceso fotosintético en las hojas de soya (*Glicina max*) a una concentración de 1000 μM .

Sin embargo, estos compuestos son inactivos en las concentraciones de 100 y 500 μM . Estos resultados permitieron determinar que los compuestos evaluados por Mersie y colaboradores (1993) son más activos en células aisladas que en la planta intacta.

De manera adicional, Einhellig (1979) descubrió que los ácidos vainílico, *p*-cumárico y ferúlico reducen el contenido de clorofila en las hojas de *Glicina max*, y no alteran el contenido de clorofila en las hojas de *Sorghum bicolor*.

Otro metabolito secundario con una potente actividad sobre la fotosíntesis es la sorgoleona. Esta quinona inhibe de manera significativa la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Pisum sativum*. La actividad que muestra este compuesto es similar a la que presenta la atrazina, un herbicida comercial, sobre las malezas de hoja ancha (Einhellig *et al.*, 1993). La sorgoleona se evaluó a 10, 50 y 100 μM y los porcentajes de inhibición obtenidos fueron de 66, 89 y 100, respectivamente. Estudios posteriores, sobre tilacoides, permitieron determinar que el sitio de acción de la sorgoleona es el fotosistema II, específicamente inhibe el transporte de electrones entre los sistemas enzimáticos Q_A y Q_B , por lo que el metabolito se clasificó como un inhibidor de la transferencia de electrones, según la clasificación propuesta por Moreland (1980). Cabe mencionar que este metabolito secundario es el constituyente mayoritario de diferentes especies de sorgo (*Sorghum halapense*, *S. vulgare*, *S. sudanense*, *S. bicolor*), de la avena (*Avena sativa*), del maíz (*Zea mays*), del centeno (*Secale cereale*) y del trigo (*Triticum aestivum*). Muchas de estas especies vegetales son empleadas en la agricultura tradicional para suprimir el crecimiento de plantas nocivas (Einhellig y Souza, 1992; Einhellig, 1995; Worsham, 1989). La sorgoleona inhibe totalmente el crecimiento de *Eragrotis* spp. a una concentración de 125 μM ; a la concentración de 10 μM reduce significativamente el crecimiento de las malezas *Abutilon theophrasti*, *Datura stramonium*, *Amaranthus retroflexus*, *Setaria viridis*, *Digitaria sanguinalis* y *Echinochloa crusgalli* y a una concentración de 250 μM inhibe completamente la germinación de *Lemna minor* (Einhellig y Souza, 1992; Putnam *et al.*, 1983). Con estas determinaciones, se llegó a la conclusión de que la

sorgoleona representa un potente inhibidor del crecimiento vegetal (Einhellig *et al.*, 1993).

Otro metabolito secundario que inhibe la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Lemna minor* es la juglona (aislado de *Juglans nigra*). Este metabolito secundario a una concentración de 40 μM reduce tanto el contenido de clorofila como la fotosíntesis de *L. minor*. La I_{50} fue de 2.0 μM (Hejl *et al.*, 1993; Einhellig, 1995). Sin embargo, a la fecha no se ha descrito el blanco de acción específico, pero se cree que este compuesto no desacopla el flujo de electrones de la fotosíntesis (Hejl *et al.*, 1993). De manera adicional, se observó que este compuesto inhibe el crecimiento de *L. minor* a muy bajas concentraciones.

Además de los metabolitos antes mencionados, se ha descrito que las flavonas, quercetina y glucoquercetina a una concentración de 10^{-5} M inhiben la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinacas (Harbone, 1975). El camperol a 25 μM inhibe el transporte de electrones y la fotofosforilación en cloroplastos aislados de chicharos (Einhellig, 1986). Además, el glucósido de la dihidrochalcona y la florizina inhiben la actividad de la Mg-ATPasa (Einhellig, 1986, 1995). El camperol se clasifica como un agente desacoplante y el glucósido de la dihidrochalcona y florizina son inhibidores de la transferencia de energía. El alcaloide gramina actúa como un agente desacoplante de la fotofosforilación [Einhellig, 1995].

Estudios realizados sobre las lactonas sesquiterpénicas, zaluzanina C (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992), ivalina (Bernal-Morales *et al.*, 1994) y cacalol (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991), demostraron que estos metabolitos secundarios inhiben el transporte de electrones en el FSII en cloroplastos aislados de espinacas. Las I_{50} fueron de 0.8, 2.8 y de 0.06 mM para la zaluzanina C, ivalina y cacalol, respectivamente. El cacalol y la ivalina actúan inhibiendo el transporte de electrones entre P_{680} y Q_A (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Bernal-Morales *et al.*, 1994;) y la zaluzanina C inhibe el transporte de electrones del H_2O al P_{680} (Lotina-Hennsen *et al.*, 1992).

Otra lactona que actúa sobre el proceso fotosintético es la artemisinina, este metabolito secundario inhibe la fotosíntesis de *Lemna minor* a una concentración de 1 μ M (Stiles *et al.*, 1994). El terpenoide piquerol A, inhibe la Mg-ATPasa y, por lo tanto, se clasificó como un inhibidor de la transferencia de energía (Mendoza *et al.*, 1994).

Otros metabolitos secundarios recientemente evaluados incluyen a la isoalloalantolactona (Calera *et al.*, 1995a), las cumarinas simples imperatorina, xantiletina, 3-(1',1'-dimetilalil)- xantiletina y chalepensina y cinco 4-fenilcumarinas: la 5,7,3',4'-tetrahidroxi-4-fenilcumarina, la 7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina, la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenil-cumarina, la 5-O- β -D-glucopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenil-cumarina y la 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Calera *et al.*, 1995b, 1996, Macías, 1996). Las determinaciones se realizaron en cloroplastos aislados de espinacas. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las cumarinas actúan como inhibidores de la transferencia de energía.

La isoalloalantolactona y la xantiletina son inhibidores del transporte de electrones en el FSII entre P₆₈₀ y Q_A. La imperatorina y la 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina inhiben la síntesis de ATP y el transporte de electrones, por lo que se les clasificó como agentes desacoplantes (Macías *et al.*, 1996).

Cabe resaltar, que se considera a un metabolito secundario como un inhibidor efectivo del proceso de la fotosíntesis (en células y orgánulos aislados), cuando su actividad se presenta en concentraciones menores de 1000 μ M (Einhellig, 1995). Por último, se puede concluir que son pocos los productos naturales cuyo potencial herbicida ha sido explorado y, en menor medida, sus efectos sobre los procesos fotosintéticos.

CAPITULO II

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II.1. HIPÓTESIS.

La hipótesis del presente trabajo considera que los criterios convencionales de preselección -etnomédico, quimiotaxonómico y ecológico- y de selección, mediante la aplicación de ensayos biológicos apropiados, constituyen los indicadores adecuados para la detección de especies vegetales que proporcionen compuestos bioactivos (fitotóxicos y/o insecticidas) útiles para el desarrollo de nuevos pesticidas de origen natural biodegradables, inocuos para el hombre y otros mamíferos y con mecanismos de acción altamente específicos con una posible aplicación agroquímica.

II.2. OBJETIVOS PRINCIPALES.

- II.2.1. Establecer el potencial herbicida de los metabolitos secundarios de la especie *Malmea depressa* (Annonaceae) mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de diferentes especies vegetales de prueba y sobre diversas reacciones del proceso de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de espinacas, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

- II.2.2. Establecer la potencialidad insecticida de la especie *Swietenia humilis* (Meliaceae) mediante la evaluación del efecto del extracto integro y de sus limonoides sobre el desarrollo del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner) con el propósito de encontrar nuevos insecticidas "verdes".

II.3. OBJETIVOS PARTICULARES.

II.3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESPECIE

Malmea depressa.

- II.3.1.1. Determinar cuantitativamente la potencialidad fitotóxica de los extractos y aceites esenciales derivados de las diferentes partes vegetales de la especie *M. depressa* mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de las especies *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.
- II.3.1.2. Aislar y purificar los constituyentes fitotóxicos de los extractos orgánicos activos mediante la implementación de un estudio fitoquímico biodirigido, monitoreando la actividad fitotóxica a lo largo de todo el proceso utilizando un bioensayo de tipo bioautográfico.
- II.3.1.3. Cuantificar la actividad fitotóxica de los productos puros separados a partir de las fracciones fitotóxicas.
- II.3.1.4. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- II.3.1.5. Evaluar el efecto de los principios fitotóxicos sobre diversas actividades fotosintéticas en cloroplastos aislados de espinacas. Estas actividades incluyen la síntesis de ATP, la captación de protones, el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado y sobre el transporte de electrones en los fotosistemas I y II.
- II.3.1.6. Proponer el modo de acción de los compuestos fitotóxicos sobre el proceso de fotosíntesis mediante el análisis de los resultados del efecto

de los mismos sobre las diversas actividades fotosintéticas indicadas en el inciso II.3.1.5.

II.3.1.7. Determinar el potencial citotóxico de las fitotoxinas obtenidas en el presente estudio, mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento celular de diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos y establecer sus posibles efectos tóxicos indeseables para los mamíferos.

II.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ESPECIE

Swietenia humilis.

II.3.2.1. Determinar la potencialidad insecticida de los extractos preparados a partir de las semillas de la especie *S. humilis* mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el porcentaje de mortalidad y el crecimiento relativo de larvas en fase III (entre 9 y 13 días de desarrollo) del gusano barrenador del maíz.

II.3.2.2 Aislar y purificar los limonoides potencialmente insecticidas del extracto orgánico activo mediante la implementación de un estudio fitoquímico convencional.

II.3.2.3. Determinar la estructura molecular de los compuestos activos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

II.3.2.4. Evaluar el efecto de los limonoides aislados y caracterizados sobre el ciclo de vida del insecto de prueba, desde la fase larvaria hasta la emergencia del adulto. En cada una de las etapas de desarrollo (larva, pupa o adulto) se evalúan los siguientes parámetros: peso de las larvas durante 28 días, peso de las pupas y los adultos; porcentaje de mortalidad de las larvas, pupas y adultos; porcentaje de pupación y de emergencia

de los adultos; y por último, la demora en los tiempos de pupación y de emergencia del adulto.

II.3.2.5. Determinar el potencial citotóxico de los principios insecticidas obtenidos en el presente estudio, mediante la evaluación de sus efectos sobre el crecimiento celular de diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos y así establecer posibles efectos tóxicos no deseables.

II.3.2.7. Validar el uso etnomédico de la especie *S. humilis* como un agente anti-amibiano mediante la evaluación del efecto *in vitro* del extracto y limonoides mayoritarios sobre el crecimiento de trofozoitos de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolítica* desarrollados en cultivos axénicos.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL.

III.1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.

III.1.1. METODOS CROMATOGRÁFICOS.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM). Para la cromatografía en capa fina (ccf) se emplearon placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck de 0.2 (ccf analítica) y 2 mm (ccf preparativa) de espesor y cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (0.2 mm de espesor, ccf analítica). La ccf analítica permitió monitorear el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos; la cromatografía preparativa permitió realizar purificaciones a nivel preparativo. Como agente cromogénico se empleó ácido sulfúrico al 10% (Gringerb, 1991) y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas por 2 minutos a 110°C.

Para realizar el análisis en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se empleó un cromatógrafo marca Waters TM 600 (Millipore Corp., Water Chromatography Division Milford, M.A., USA), equipado con un detector de UV (Water TM, 996) y una computadora Venturis 575. El programa de software Millenium 2000 (Waters) se empleó para controlar el equipo cromatográfico y para manejar y procesar la información cromatográfica. En todos los casos donde se aplicó este método cromatográfico, la purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna preparativa de fase reversa Nova Pak HR C-18 (Waters; 19 x 300 mm, diámetro de partícula 60 A, tamaño de partícula 6 µm). Para estos análisis, la fase móvil consistió de un sistema isocrático de CH₃CN:H₂O (50:50 ó 55:45) con un flujo de 8 ml/minuto a una presión de 1700 lb/pulg². El tiempo para cada desarrollo cromatográfico fue de 70 ó 90 minutos a una longitud de onda programada de 225 nm.

Para el análisis mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-EM) se utilizó un cromatografo Hewlett Packard modelo 5890 serie II conectado a un espectrómetro Jeol AX50HA. La columna de separación fue de tipo PAS-1701 Tested 1702 silicona HP con una longitud de 25 mm por 0.32 mm de diámetro interno; como gas acarreador se empleó helio a una presión de 7 libras/pulgadas² con un flujo de 1 ml/minuto; la temperatura de la columna se programó de 1 a 150°C con una velocidad de 7°C x minuto y la temperatura de inyección fue de 150°C.

III.1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS NATURALES.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros de IR se registraron en un aparato de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr. Las rotaciones ópticas se registraron en un polarímetro Digital Jasco DIP-360.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) se generaron en un aparato Varian VXR-300S, el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz y 75.44 MHz, respectivamente. Todos los espectros se obtuvieron en cloroformo-*d* y los desplazamientos químicos se expresaron en unidades de ppm (δ) referidos al tetrametilsilano (TMS), como una referencia interna. Los experimentos DEPT, COSY, NOESY, HMBC y HMQC se realizaron en un aparato Varian Unity Plus-500. Se emplearon los programas de secuencias de pulsos estándares Varian para el registro de los espectros bidimensionales homonuclear (¹H-¹H-COSY) y heteronuclear (HETCOR). Para los experimentos de HMBC y HMQC se emplearon las siguientes condiciones: $\Delta = 1$ s y $J = 140, 8$ Hz, respectivamente. Los espectros de HMQC se registraron en modo de fase sensible y los espectros de HMBC

fueron procesados mediante la técnica de modo mezclado (fase sensible a la largo de F_1 y valor absoluto a lo largo de F_2).

Los espectros de masas se realizaron en un aparato Hewlett-Packard 5985-B y 5890 serie II, mediante introducción directa a 70eV. Los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB) se registraron en un aparato Jeol DX300 con un sistema JMA-3500, empleando como matriz el alcohol nitrobencílico. El átomo acelerado para la generación del proceso de ionización de la muestra problema fue xenón utilizando un voltaje de 6 KeV.

Los análisis de difracción de Rayos X se determinaron en un difractómetro Siems P4/PC.

Los espectros de masas, de RMN y los análisis de CG-EM, y difracción de rayos X se realizaron en los laboratorios de apoyo analítico del Instituto de Química, de la UNAM.

III.2. PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS Y PRODUCTOS NATURALES DERIVADOS DE *S. humilis* y *M. depressa*.

III.2.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS EXTRACTOS Y PRODUCTOS DERIVADOS DE *S. humilis*.

La actividad insecticida del extracto y de los compuestos puros se determinó empleando como insecto de prueba las larvas del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner). Los bioensayos realizados permitieron determinar el efecto de los fitoquímicos sobre el desarrollo del insecto de prueba durante las diferentes etapas de su ciclo de vida (en promedio 28 días) comenzando desde la etapa larvaria hasta la emergencia del adulto. En todos los casos se evaluó el efecto de los compuestos sobre el peso promedio de las larvas, el peso máximo alcanzado por las larvas, el porcentaje de mortalidad de las larvas, el tiempo promedio de pupación, el peso promedio de las pupas, el porcentaje de mortalidad de las pupas, el tiempo promedio de emergencia de

los adultos, el peso promedio del adulto y el porcentaje de mortalidad de los adultos. Estas evaluaciones se realizaron en el laboratorio del Dr. John Thor Arnason (Universidad de Ottawa, Canadá), de acuerdo al siguiente procedimiento:

III.2.1.1. PREPARACIÓN DE LA DIETA DEL INSECTO (CONTROL Y PROBLEMA).

La composición de la dieta artificial se enlista a continuación:

grenetina	22.35	g
mezcla seca:	147.75	g
germen de trigo (1560 g)		
dextrosa (1200 g)		
caseina (1320 g)		
colesterol (96 g)		
sal wesson (432 g)		
mezcla de vitaminas Vanderzant (276 g)		
ácido ascórbico (360 g)		
aureomicina 14% (81 g)		
ácido sórbico (240 g)		
metilparabeno	6.0	ml
ácido propiónico/ácido fosfórico	6.9	ml
formaldehido	0.6	ml
fumidil B	0.55	g
agua destilada	1038.0	ml

Para la preparación de la dieta se siguió el procedimiento descrito por Arnason y colaboradores (1987) que a continuación se resume brevemente:

En primer lugar, se prepara una suspensión de grenetina, (disolviendo 22.35 g de grenetina en 650 ml de agua caliente); posteriormente, se agrega 388 ml de agua destilada para enfriar la suspensión y en seguida se adiciona la mezcla seca (147.75 g), el metilparabeno (6.0 ml), el ácido propiónico en ácido

fosfórico ((6.9 ml), el formaldehído (0.6 ml), el fumidil (0.55 g) y el compuesto a evaluar previamente solubilizado en un ml de etanol al 95%.

La mezcla anterior se homogeneiza en una licuadora. El material gelatinoso resultante se vierte en moldes de 1 cm³ y se deja solidificar. De igual forma, se prepararon las dietas controles (positivo y blanco). En el caso del control positivo se incorporó a la dieta la tusendanina (solubilizada en un ml de etanol al 95%) y en el caso del blanco sólo se adicionó 1 ml de etanol al 95%. La cantidad de dieta preparada fue de 500 g por cada tratamiento (problema y control) y representa la cantidad necesaria para alimentar a 30 insectos durante su fase larvaria (28 días). Una vez solidificada la dieta, esta se guarda en frascos herméticamente cerrados y en refrigeración.

Los compuestos de prueba se administraron a las larvas del insecto incorporándolos en la dieta artificial. Los compuestos se ensayaron a dos concentraciones (5 y 50 ppm) y para su incorporación en la dieta se solubilizaron en 1 ml de etanol al 95%.

III.2.1.2. PROCEDIMIENTO DEL BIOENSAYO.

Las larvas empleadas en este experimento se obtuvieron de un cultivo de *Ostrinia nubilalis* que se mantiene en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Ottawa, donde se desarrolla este insecto de prueba bajo condiciones controladas de humedad, luz, temperatura y alimentación (Arnason *et al.*, 1987).

Para la realización del bioensayo se utilizaron larvas en 3er estadio (9 días de crecimiento) que pesaban entre 1 y 2 mg. Estas se seleccionaron al azar y, una vez pesadas, se colocaron individualmente en viales de vidrio que contenían un gramo de la dieta problema o control. Algunos compuestos se evaluaron a dos concentraciones (5 y 50 ppm) y otros se evaluaron sólo a 50 ppm. Para cada concentración ensayada se utilizaron un total de 30 larvas.

Las larvas expuestas en forma individual a las dietas problema o control, se pesaron cada cuatro días a partir del inicio del experimento hasta que las

larvas alcanzaron la etapa de pupación que ocurría en un promedio de 28 días. Con esta misma frecuencia de tiempo, se realizó el cambio de la dieta. Una vez alcanzado el estado de pupa y adulto, se determinaron los pesos promedios del insecto en estas etapas.

Todas estas determinaciones permitieron registrar los cambios de peso de las larvas, el peso máximo alcanzado por las mismas, el peso de las pupas y el peso de los adultos con relación al control, durante todo el tiempo de exposición al tratamiento. De manera adicional, durante estos experimentos se determinó el porcentaje de mortalidad de las larvas, el porcentaje de larvas que alcanzaron el estado de pupación y el porcentaje de pupas que alcanzaron el estado adulto. Estos experimentos se desarrollaron en una cámara de incubación donde se controlaron las siguientes condiciones: la humedad del ambiente en un 80%; se estableció un fotoperiodo de 18 hrs de exposición a la luz por 6 hrs de oscuridad; y la temperatura de 25°C a la luz y de 19°C en total oscuridad.

Para determinar la actividad de los extractos hexánico y clorofórmico de las semillas de *S. humilis* (preparados a partir de 20 g de semillas por un proceso de maceración) se evaluó solamente el efecto de los mismos sobre la mortalidad de las larvas del día 9 al día 13 (fase III). Para ello, el extracto se incorporó a la dieta a una concentración del 0.1%. Las larvas neonatas (fase III) se pusieron en contacto con el tratamiento siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. El día 13, se procedió a contar las larvas sobrevivientes. Los ensayos se realizaron por triplicado, utilizando 30 larvas para cada determinación.

Los datos obtenidos en esta determinación fueron analizados mediante el empleo del programa estadístico SAS ANOVA y GLM (SAS Institute, 1982).

III.2.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA HUMILINÓLIDA A SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTANEA DE ÍLEON DE COBAYO.

El efecto de la humilinólida A sobre la contracción espontánea del íleon de cobayo, se realizó de acuerdo al protocolo experimental establecido por Rojas y colaboradores (1996). Los cobayos empleados en este experimento fueron adquiridos en el Laboratorio de crianza Charles River (Wilmington, MA). Para realizar el bioensayo, se emplearon cobayos machos (450-600 gramos) que se mantuvieron en ayuno durante 18 horas con acceso libre al agua. Los animales se sacrificaron por un golpe en la nuca y dislocación cervical. Posteriormente, se extirparon 10 cm del íleon en su porción más cercana al ángulo íleocecal colocando el tejido en una caja Petri con solución Ringer. Este fragmento se limpio perfectamente con la misma solución y posteriormente, se cortaron segmentos de 1 cm de largo. Cada fracción se colocó en una cámara de incubación de tejido aislado, el cual contenía 10 ml de solución Krebs-bicarbonatada, burbujeada constantemente con una mezcla gaseosa de CO₂:O₂ (5:95). Con la finalidad de mantener una solución homogénea de pH 7.4 a una temperatura de 37°C, se utilizó un baño recirculador. En estas condiciones, un extremo del tejido se sujeta al piso de la cámara y el otro extremo se ata al transductor de fuerza Grass modelo FT03, el cual detectó las señales mecánicas de las contracciones y las envía a un polígrafo Grass modelo 79 de cuatro canales.

La fuerza de tensión empleada en el tejido fue de 1 g (10 mN), la cual corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla del graficador. El tejido se tensiona en la solución Krebs-bicarbonatada durante 10 minutos, después de este periodo de tensión, siguió un periodo de estabilización de 20 a 30 minutos, a las condiciones de trabajo. A este último, siguió un periodo de 10 minutos que se consideró como control (100% de actividad contráctil). Después del periodo control se adicionó el compuesto de prueba a la cámara, previamente solubilizada y se registro el efecto durante 10 minutos. Para cada experimento

se utilizó un nuevo segmento de íleon y en todos los casos se realizaron al menos seis réplicas.

La actividad contráctil en el íleon se evaluó porcentualmente midiendo el área bajo la curva de los registros obtenidos (control y problema), con un planímetro digital Tamaya modelo Planix 6. Los datos obtenidos fueron analizados por el método de t de student ($p < 0.05$) para comparar la diferencia entre las medias del control y del tejido tratado. La dosis efectiva que provocó un incremento del 50% de la actividad contráctil del tejido de prueba (DE_{50}) se calculó mediante el método de Litchfield and Wilcoxon (1949).

Para las evaluaciones del compuesto de prueba, la humilínólida A, éste se disolvió en etanol al 0.1% y se adicionó a la cámara que contenía el tejido. El compuesto se evaluó a las concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 μM . En este experimento se empleó la acetilcolina (Sigma) como un control positivo (100% de actividad a 100 nM).

III.2.3. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL FITOTÓXICO DE LOS EXTRACTOS Y PRODUCTOS NATURALES DERIVADOS DE *M. depressa*.

La actividad inhibidora del crecimiento vegetal se determinó mediante los métodos bioautográfico y de caja Petri (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1992; Inoue *et al.*, 1992; Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1996).

Para estos bioensayos se emplearon semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae). Las semillas de *A. hypochondriacus* se adquirieron en el mercado de Tulyehualco, México, D.F. y las semillas de *Echinochloa crusgalli* se adquirieron a través de la distribuidora Valley Service, Fresno, California.

III.2.3.1. MÉTODO BIOAUTOGRÁFICO.

El método bioautográfico se utilizó principalmente para monitorear la actividad fitoinhibidora de los extractos orgánicos y de las fracciones cromatográficas.

Para realizar el bioensayo se aplicó una cantidad apropiada (aproximadamente 10 mg) del extracto orgánico o fracción cromatográfica en una placa de gel de sílice de 5 x 20 cm (Silica gel 60 F₂₅₄); una vez aplicada la muestra, se efectuó el proceso de elución de la manera convencional empleando como sistema de elución una mezcla de benceno:AcOEt (8:2). Posteriormente, se dejó evaporar el disolvente y las cromatoplasmas se cubrieron con 20 ml de una suspensión de agar al 1% (28°C). Al solidificar el agar, se colocaron las semillas de las especies de prueba de manera uniforme hasta cubrir completamente la superficie de la placa (aproximadamente 150 semillas de *E. crusgalli* y 500 semillas de *A. hypochondriacus* por cada placa). Las placas con las semillas se incubaron en una atmósfera húmeda y en total oscuridad a 28°C durante 24 hrs en el caso de *A. hypochondriacus*, y durante 48 hrs en el caso de *E. crusgalli*. El mismo protocolo se utilizó para el control negativo y el control de disolvente. La placa cromatográfica para este último se eluyó de la manera convencional sin la administración de la muestra problema. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a observar y determinar el valor de R_f para las zonas que provocaron la inhibición de la germinación de las semillas. Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra, eluida en el mismo sistema de disolventes, sin agar y revelada con H₂SO₄ al 10%.

III.2.3.2. MÉTODO DE LA CAJA PETRI.

Este método se empleó con la finalidad de determinar cuantitativamente el efecto del extracto orgánico, fracciones cromatográficas, aceite esencial y compuestos puros de *M. depressa* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro, con cuatro replicas por tratamiento. Como control positivo se empleó la tricolorina A (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Cada muestra (extracto o compuesto) se disolvió en CHCl₃ y se prepararon cuatro soluciones stock con

una concentración final de 50, 100, 250 y 500 µg/ml. Un ml de cada una de las soluciones se vertieron en las cajas Petri, sobre un disco de papel filtro (Whatman No.1) y el disolvente se dejó evaporar al vacío.

Posteriormente, se humedeció el papel filtro con 2.5 ml de agua destilada y se colocaron 10 semillas de las especies de prueba en cada caja Petri. El mismo procedimiento se utilizó para los controles positivos y negativos, que contenían tricolorina A y disolvente, respectivamente. Las cajas Petri perfectamente cerradas se mantuvieron en la oscuridad a 28°C y la actividad fitoinhibidora se registro midiendo la longitud de las radículas después de 24 hrs para *A. hypochondriacus* y 48 hrs para *E. crusgalli*.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Anova ($P < 0.05$) y la concentración inhibitoria media (CI_{50}) se calculó mediante análisis de Probit a partir de los porcentajes de inhibición del crecimiento radicular.

III.2.4. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS Y DE LOS PRODUCTOS DE *M. depressa*.

III.2.4.1. EFECTO SOBRE HONGOS PATÓGENOS PARA EL HOMBRE.

Para esta determinación se utilizó el método de dilución en agar descrito por Hufford *et al.*, (1975) y Gutiérrez *et al.*, (1995). La concentración mínima inhibidora (CIM) esta expresada en µg/ml y las especies de prueba fueron las siguientes: *Candida albicans* (ATCC10231), *Aspergillus niger* (ATCC-16888) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC-9129).

En este ensayo se emplearon como controles positivos la anfotericina B (Sigma), 15 µg/ml para *C. albicans* y *A. niger*; y griseofulvina (Sigma), 8 µg/ml para *T. mentagrophytes*.

III.2.4.1.1. PREPARACIÓN DEL INOCULO.

Los microorganismos de prueba se hicieron crecer en agar Emmons modificado durante siete días a 28 °C, después de este tiempo se le agregó 3 ml de solución salina isotónica (SSI) estéril al cultivo y con ayuda de un asa micológica se desprendió el cultivo para preparar una nueva suspensión. La suspensión recién preparada se vertió sobre una superficie de agar dextrosa sabouraud (10 ml) contenida en un matraz Erlenmeyer. Posteriormente este cultivo se incubó a 28 °C durante siete días. Transcurrido este segundo periodo de incubación, al cultivo de microorganismos se le agregó nuevamente 3 ml de SSI estéril, se desprendieron con un asa micológica y se diluyen a 20 ml con SSI estéril con la finalidad de preparar una suspensión homogénea con una turbidez comparable con la del tubo 0.5 de McFarland. En los casos necesarios, se realizan diluciones hasta ajustar (encontrar) la turbidez requerida. El inóculo recién preparado (0.5 ml) se resuspende en 40 ml de agar dextrosa sabouraud con o sin muestra problema.

III.2.4.1.2. BIOENSAYO.

El extracto y los compuestos puros se disolvieron en MeOH y se ensayaron siete concentraciones (100, 200, 400, 500, 600, 800 y 1000 µg/ml). En un matraz Erlenmeyer se colocaron 40 ml de agar dextrosa Sabouraud fundido a 45 °C conteniendo la cantidad del extracto o del compuesto de prueba y 0.5 ml del inóculo. 10 ml de la mezcla anterior se vertieron en cajas de Petri por triplicado. Cada caja contenía como base 10 ml de agar dextrosa Sabouraud solidificado sin muestra y sin inocular. Una vez inoculadas las cajas, éstas se incubaron durante siete días a 28 °C, transcurrido el tiempo de incubación se procedió a interpretar los resultados y determinar la concentración inhibidora mínima (CIM). El mismo procedimiento se empleó para la preparación de los controles positivo (griseofulvina o anfotericina) y negativo (MeOH).

III.2.4.2. EFECTO SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS *Pythium* spp., *Helminthosporium* spp. y *Fusarium oxysporum*.

Para esta determinación se empleó la técnica de dilución en agar previamente descrita. Los microorganismos de prueba empleados fueron *Pythium* spp., *Helminthosporium* spp y *Fusarium oxysporum*. El extracto y los compuestos se ensayaron a 50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. Los resultados se expresan como concentraciones mínimas inhibitoras en µg/ml.

III.2.5. DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL CITOTÓXICO DEL EXTRACTO Y COMPUESTOS PUROS DE *S. humilis* y *M. depressa*.

El potencial citotóxico se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos en los laboratorios del Purdue Cancer Center, Universidad de Purdue, Indiana, EE.UU. Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes: carcinoma de pulmón (A-549), carcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de colon (HT-29). Los resultados se expresan como dosis efectivas medias (DE₅₀) µg/ml (Anderson et al., 1991). La adriamicina se empleó como un control positivo.

III.2.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 1,2,3,4-TETRAMETOXI-5-(2-PROPENIL)BENCENO OBTENIDO DE *M. depressa* SOBRE VARIAS ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS EN CLOROPLASTOS AISLADOS DE ESPINACAS.

III.2.6.1. AISLAMIENTO DE LOS CLOROPLASTOS.

Los cloroplastos se obtuvieron de hojas frescas de espinacas (30 g) lavadas y cortadas en trozos pequeños (eliminando la nervadura central y el ápice). Estas hojas se homogeneizaron por 5 segundos en 150 ml de medio de aislamiento [sacarosa (400 mM), MgCl₂ (5mM), KCl (10 mM), tricina-Na⁺ (30 mM) ajustando el pH a 8 con KOH, además se adicionó KCN (0.1mM) para inhibir la actividad de la catalasa]. El homogeneizado se filtró y se centrifugó a

4000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C en una centrifuga Beckman J2-21. El sedimento se suspendió en 1 ml de medio de aislamiento. El proceso de aislamiento se realizó en frío y en la oscuridad.

III.2.6.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CLOROFILA.

La clorofila se cuantificó empleando el método desarrollado por Strain y colaboradores (1971). Se tomaron 50 µl de la suspensión de cloroplastos y se adicionó acetona al 80% hasta obtener 5 ml de una nueva suspensión. Esta última se agitó en un vortex y se mantuvo en la oscuridad por 5 minutos para permitir la extracción y la solubilización de la clorofila. Posteriormente, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 minutos con el propósito de sedimentar las proteínas. A continuación, se cuantificó el contenido de clorofila mediante la determinación de la absorbancia a 663 y 645 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman (modelo DU 650).

La concentración de clorofila se calculó empleando la siguiente ecuación.

$$[\text{Clorofila}] = [8.05(A_{663}) + 20.29(A_{645})] \quad (5)$$

$$[\text{Clorofila}] = \mu\text{g clorofila ml}^{-1}$$

III.2.6.3. EFECTO DE 1,2,3,4-TETRAMETOXI-5-(2-PROPENIL)BENCENO SOBRE EL TRANSPORTE DE ELECTRONES NO CICLICO.

El transporte de electrones se determinó de manera indirecta al monitorear la producción de oxígeno que se libera durante la fotólisis del agua y se determinó bajo tres condiciones experimentales: basal, fosforilante y desacoplado.

La cantidad de oxígeno que se desprende se calculó a partir de las pendientes de las gráficas obtenidas al registrarse los cambios del potencial redox. A partir de la cantidad de oxígeno desprendido se midió la velocidad del flujo de electrones, la cual se calculó mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$(0.4 \mu\text{equiv de } K_3[Fe(CN)_6] \text{ ó MV ó DCPIP} / X_t)(X_p/1 \text{ min.})(60 \text{ min./1hr})(1/0.060\text{mg de clorofila})$

$$= \mu\text{equiv. de } e^- \times h^{-1} \times \text{mg clorofila}^{-1}$$

donde

X_p es el valor de la pendiente de cada trazo obtenido al transcurrir un minuto y

X_t es el valor de la pendiente del trazo al consumirse 0.4 $\mu\text{equiv. de } K_3[Fe(CN)_6]$ (control).

La cantidad de oxígeno desprendido se expresa en $\mu\text{equiv. de } e^- \times h^{-1} \times \text{mg clorofila}^{-1}$. En todos los casos se realizaron controles al inicio y al final de cada experimento los cuales estaban constituidos por la mezcla de reacción empleada para cada ensayo, con excepción del compuesto a evaluar. La velocidad del flujo de electrones se cuantificó adicionando al medio sin MV, una alícuota de 10 μl de $K_3[Fe(CN)_6]$ (40 mM), como aceptor final de electrones y el equivalente a 60 μg de clorofila, posteriormente se iluminó el tiempo necesario para la reducción total del $K_3[Fe(CN)_6]$. Esta determinación permitió medir la cantidad de oxígeno desprendido en $\mu\text{equiv. de } e^-$ transportados al consumirse los 10 μl de $K_3[Fe(CN)_6]$ 40 mM. Estos datos de velocidad se toman también como referencia cuando se utilizan otros sistemas en los que el aceptor de electrones es un compuesto diferente al $K_3[Fe(CN)_6]$, como por ejemplo el MV o el DCPIP que presentan tienen un potencial redox igual al $K_3[Fe(CN)_6]$. Esta reacción permite determinar la producción de oxígeno por la donación de electrones del agua a la cadena fotosintética, en donde el Fe^{+3} se reduce a Fe^{+2} .

En todos los casos la cuantificación de oxígeno se realizó con un oxímetro YSI y un electrodo Clark conectados a un registrador gráfico Beckman, de acuerdo al protocolo descrito por Calera y colaboradores (1995, 1996). Para determinar el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado se empleó el agua como un donador natural de electrones y el metioviológeno

(MV) como un aceptor artificial de electrones. A continuación se describe el procedimiento experimental utilizado para medir cada tipo de transporte.

III.2.6.3.1. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES BASAL NO CÍCLICO DE H₂O A MV.

En una cubeta de reacción se adicionaron 3 ml de medio de transporte de electrones [sorbitol (100mM), MgCl₂ (5mM), KCl (10 mM), tricina-Na⁺ (1 mM) a pH 8 (KOH, 1M) y metilviológeno (0.05 mM)] y el volumen de cloroplastos equivalente a 60 µg de clorofila y el compuesto de prueba en un intervalo de concentración de 1 a 5 µM. El medio se mantuvo en agitación constante e iluminación. A continuación, se registró la producción de oxígeno en un oxímetro YSI conectado a un registrador gráfico Beckman. La velocidad obtenida se comparó con la del control (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972). En estas condiciones se determinó la velocidad del transporte de electrones basal.

III.2.6.3.2. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO NO CÍCLICO DE H₂O A MV.

Al medio de transporte de electrones utilizado para medir la velocidad del transporte basal (3 ml) se adicionó NH₄Cl [cloruro de amonio (6mM)], y el compuesto de prueba en un intervalo de 1 a 5 µM. La velocidad obtenida también se comparó con la del control (Izawa, 1977; Trebs, 1972; Dilley, 1972).

III.2.6.3.3. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES FOSFORILANTE NO CÍCLICO DE H₂O A MV.

Para esta determinación, al medio de transporte utilizado en los dos casos anteriores (3ml) se adicionó ADP (1mM), K₂HPO₄ (3mM) y el compuesto de prueba en un intervalo de 1 a 5 µM; la velocidad obtenida se comparó con la del control.

Los controles para cada determinación se realizaron al inicio y al final de cada experimento; los controles consistieron en la mezcla de reacción empleada

para cada experimento sin el compuesto a evaluar. La velocidad del flujo de electrones se calculó mediante el empleo de la ecuación descrita en el inciso III.2.6.3.

III.2.6.4. SÍNTESIS DE ATP.

La síntesis de ATP se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre pH 8.0 y 8.1, empleando un potenciómetro Corning (modelo 12) de escala expandida conectado a un registrador gráfico (Gilson) de voltaje y a un electrodo combinado. Para ello, a 3 ml de medio que contiene sorbitol (100 mM), MgCl₂ (5 mM), KCl (10 mM), tricina-Na⁺ (1 mM) ajustado a pH 8 con KOH (10 mM), metilviológeno (0.05 mM) se adicionó ADP (1 mM), K₂HPO₄ (3 mM), el compuesto de prueba en un intervalo de concentración de 1 a 5 μM y el equivalente a 60 μg de clorofila. La mezcla anterior se mantuvo en agitación constante y con iluminación. El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un periodo de iluminación de 1 minuto. El cambio de pH se cuantificó al titular la mezcla de reacción con 10 μl de KOH (0.01N), en presencia de cloroplastos sin iluminar (Peña-Valdivia *et al.*, 1991).

La velocidad de síntesis de ATP se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$V = AH/C$$

donde,

V= velocidad de la síntesis de ATP (μmoles de ATP × mg⁻¹clorofila × hr⁻¹)

A= μmoles de H⁺ usados en la titulación

C= concentración de la clorofila empleada

H= altura de la curva en cm obtenida durante un minuto de iluminación

III.2.6.5. CAPTACIÓN DE PROTONES.

Este experimento se realizó en forma similar que la síntesis de ATP, excepto que no se adicionó ADP y K_2HPO_4 al medio de ensayo (Dilley, 1972).

III.2.6.6. REACCIONES PARCIALES DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II (FSI Y FSII).

La determinación del flujo de electrones en los fotosistemas I y II se efectuó utilizando el mismo medio de reacción utilizado para la determinación del transporte de electrones, sólo que en estos experimentos no se adicionó metilviológeno. El medio se suplementó con agentes desacoplantes, donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena redox como se indica a continuación. La velocidad del flujo de electrones de las reacciones parciales de los fotosistemas I y II se determinó empleando el procedimiento descrito anteriormente para determinar la velocidad del flujo de electrones no cíclico (ver inciso III.2.6.3).

III.2.6.6.1. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO EN EL FSII DE H_2O A DCPIP/ $[K_3Fe(CN)_6]$.

A 3 ml del medio de reacción para los fotosistemas, se adicionó DMBIB [2,5-dibromo-3-metil-6-isopropil-1,4-benzoquinona] ($1 \mu M$) para impedir el paso de electrones hacia el fotosistema I (FSI) a nivel de PQ (plastoquinona) [Giaquinta y Dilley, 1975]. Además, se añadió al medio: DCPIP [2,6-diclorofenol-indofenol] ($50 \mu M$) y $K_3[Fe(CN)_6]$ ($300 \mu M$), NH_4Cl ($6 mM$), el equivalente a $60 \mu g$ de clorofila y el compuesto a evaluar en un intervalo de concentración de 1 a $5 \mu M$. El DCPIP reducido en presencia de $K_3[Fe(CN)_6]$ (ferricianuro de potasio) actúo como un aceptor final de electrones y la velocidad obtenida se comparó con el control (Izawa y Pan, 1978).

III.2.6.6.2. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPADO EN EL FSII DE H₂O A SiMo.

A 3 ml del medio de reacción para los fotosistemas, se adicionó SiMo [silicomolibdato] (200 µM), como un aceptor final de electrones, DCMU [3-(3,4-diclorofenil-1,1-dimetil-urea)] (10 µM) para impedir el paso de electrones hacia el FSI, el equivalente a 60 µg de clorofila y el compuesto a evaluar en un intervalo de concentración de 1 a 5 µM. La velocidad obtenida se comparó con la del control.

III.2.6.6.3. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPADO EN EL FSII DE DCP A DCPIP.

Esta actividad se determinó de manera indirecta en un espectrofotómetro Beckman (modelo DU650). Se utilizaron cloroplastos "envenenados" con tris (Calera *et al.*, 1995, Vernon, 1969).

Al medio de reacción general para los fotosistemas se adicionó tris (0.8 M) con la finalidad de impedir la hidrólisis del agua (pH 8). En este medio de envenenamiento se incubaron los cloroplastos, en una proporción de 1 ml de medio por 0.3 mg de clorofila, durante 30 minutos a 0°C con agitación constante y en la oscuridad. Posteriormente, la suspensión se centrifugó por 5 minutos a 4000 r.p.m. y se determinó el contenido de clorofila de acuerdo al método descrito en el inciso III.2.6.2.

A 3 ml del medio de reacción general para los fotosistemas se le adicionó DPC [difencilcarbocida] (200 µM), como donador de electrones a nivel del centro de reacción del FSII y DCPIP 100 µM como un aceptor final de electrones, el equivalente a 60 µg de clorofila y el compuesto a evaluar en un intervalo de 1 a 5 µM. La mezcla anterior se agitó y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 630 nm. A continuación la mezcla se agitó nuevamente y se iluminó por un minuto. Al finalizar el tiempo de iluminación se determinó nuevamente la absorbancia. Posteriormente, se calculó la diferencia de las absorbancias entre la primera y segunda lectura. La velocidad del transporte de

electrones se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación (basada en la Ley de Lambert y Beer):

$$\Delta A = C\epsilon b$$

donde ΔA = diferencia de las lecturas de absorbancia

C = concentración de DCPIP

ϵ = coeficiente de extinción molar

b = diámetro de la celda

Este es el único flujo de electrones que se determinó mediante la aplicación de un método espectrofotocolorimétrico.

III.2.6.6.4. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO EN EL FSI DE DCPIP/_{reducido} A MV.

Para determinar el transporte de electrones en el fotosistema I se empleó 3 ml del medio de reacción general para los fotosistemas, al cual se adicionó DCMU (10 μ M), DCPIP (100 μ M) reducido con ascorbato (300 μ M), MV [metilviológeno] (50 μ M), el compuesto de prueba en un intervalo de 1 a 5 μ M y el equivalente a 60 μ g de clorofila. El DCMU se empleó como un inhibidor de la enzima Q_B y así impedir el paso de electrones del FS II al FS I (Astier y Eliene, 1984); el DCPIP reducido (con ascorbato), se utilizó como un donador de electrones a nivel del complejo Cit b_6/f ya que compite con la PQ (Gromet-Elhaman *et al.*, 1963) y el MV se empleó como un aceptor final de electrones (Benz y Laughlin, 1983).

III.2.6.6.5. DETERMINACIÓN DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESACOPLADO EN EL FSI DE PMS/_{reducido} A MV.

Para evaluar el efecto del producto sobre el flujo de electrones en el FSI de PMS/_{reducido} a MV se emplearon cloroplastos envenenados con KCN (cianuro de potasio). Para ello, una alícuota equivalente a 300 mg de clorofila se

adicionó a 1 ml de medio para envenenar cloroplastos [sorbitol (100 mM), MgCl₂ (5 mM), KCl (10 mM), tricina-Na⁺ (15 mM), KCN (30 mM), NH₄Cl (6 mM) ajustado a pH 8 (KOH 1M)]. La mezcla anterior se incubó en la oscuridad a 0°C por 30 minutos con agitación constante, posteriormente se centrifugó y se cuantificó el contenido de clorofila por el método ya descrito.

La velocidad del flujo de electrones se determinó en el medio general de fotosistema, al cual se le adicionó, PMS [fenacina-metasulfato] (200 μM) reducido con ascorbato (500 μM), MV (50 μM), el equivalente a 60 μg de clorofila y el compuesto de prueba en un intervalo de concentración de 1 a 5 μM. La velocidad obtenida se comparó con la del control.

El KCN se empleó como un inhibidor del fotosistema I a nivel de PC (plastocianina) (Izawa, 1983; Hipkins, 1986), el PMS reducido con ácido ascórbico actuó como un donador de electrones a nivel de la PC, la cual es un cofactor que dona electrones al FS I a nivel de P₇₀₀ y que se requiere debido a que la plastocianina de los cloroplastos fue desactivada con el KCN (Trebs, 1972). Por último, el MV se empleó como aceptor final de electrones en el FS I.

III.3. OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPIOS BIOACTIVOS DE *Swietenia humilis*.

III.3.1. MATERIAL VEGETAL.

Las semillas de *S. humilis* empleadas para la presente investigación, se recolectaron en el Estado de Guerrero, México, en Julio de 1993. Una muestra de herbario se depositó en la colección Etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU, voucher R. Bye, E. Linares 18824), Instituto de Biología, UNAM. La desecación de las semillas se llevó a cabo a temperatura ambiente y posteriormente se molieron en un molino Wiley No. 4.

III.3.2. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO (CHCl₃) DE LAS SEMILLAS DE *S. humilis*.

Un Kg de semillas secas y molidas fueron desgrasadas con hexano (3 l). Posteriormente, se extrajeron con CHCl₃ (9 l) vía maceración. El proceso se

repitió tres veces, con intervalos de tres días entre cada extracción. El extracto resultante fue concentrado a presión reducida obteniéndose 125 g de extracto clorofórmico.

III.3.3. FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO CHCl₃ DE LAS SEMILLAS DE *S. humilis*.

El extracto clorofórmico concentrado (125 g) se fraccionó de manera preliminar en una columna cromatográfica empacada con 1.25 Kg de gel de sílice 60 F254 Merck, utilizando como sistemas de elución benceno, mezclas de benceno:AcOEt, AcOEt y mezclas de AcOEt:MeOH. Se recolectaron 93 fracciones de 250 ml cada una. En la Tabla 4 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes. El fraccionamiento cromatográfico fue monitoreado mediante ccf y permitió la obtención de tres grupos de fracciones primarias SI-SIII.

Tabla 4. Fraccionamiento preliminar del extracto CHCl₃ de las semillas de *S. humilis*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave Fracción	Peso (g)
benceno	100	1-19	1-47	SI	61.3
benceno:AcOEt	70:30	20-32			
benceno:AcOEt	50:50	33-47			
benceno:AcOEt	30:70	48-59	48-70	SII	22.8
AcOEt	100	60-70			
AcOEt:MeOH	90:10	71-78	71-93	SIII	31.4
AcOEt:MeOH	70:30	79-85			
AcOEt:MeOH	50:50	86-93			

III.3.4. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DE *S. humilis*.

III.3.4.1. AISLAMIENTO DE LA HUMILINÓLIDA B (27) Y HUMILINÓLIDA C (28).

La fracción primaria SII (22.8 g) [Tabla 4] se recromatografió en una columna abierta sobre 456 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano y se continuó con mezclas de polaridad creciente de hexano:AcOEt, AcOEt y AcOEt:MeOH (8:2). De esta columna, se obtuvieron 205 fracciones de 250 ml cada una y se reunieron aquellas cromatográficamente similares. Los sistemas de elución empleados y el número de fracciones obtenidas se resumen en la Tabla 5.

De la fracción secundaria SIIE (Tabla 5) precipitaron espontáneamente 220 mg del producto **28** como un sólido cristalino de color blanco, el cual se identificó como humilinólida C.

Tabla 5. Fraccionamiento secundario de la fracción SII.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Clave Fracción
hexano	100	1-103	4-26	SIIA
hex:AcOEt	9:1	104-137	27-105	SIIB
hex:AcOEt	8:2	138-154	106-133	SIIC
hex:AcOEt	7:3	155-162	134-150	SIID
hex:AcOEt	5:5	163-168	151-167	SIIE
AcOEt:hex.	7:3	169-178	168-171	SIIF
AcOEt	100	179-181	172-181	SIIG
AcOEt:MeOH	8:2	182-205	182-205	SIIH

Por otro lado, de la fracción secundaria SIIG precipitó un compuesto ceroso blanquecino, el cual tras sucesivos lavados con una mezcla de

hex:AcOEt (95:05) y posterior recristalización de una mezcla de AcOEt:éter isopropílico, generó 40 mg del producto **27** que se identificó como la humilinólida B.

Humilinólida C (**28**): tR = 62.5 minutos (CH₃CN:H₂O 55:45), p.f.= 210-213 °C; [α]_D= -55 (CHCl₃); UV= 225 nm; IR ν_{max} (KBr) 1730-1710, 1430, 1370, 1220, 870 cm⁻¹ (Espectro 8); EM-IE m/z (intensidad relativa): 610 [M⁺ (4)] 568 (16), 551 (4), 550 (6), 511 (8), 453 (8), 451 (9), 379 (4), 83 (100) 630 [M⁺ (55)] 542 (20), 525 (5), 492 (30), 483 (10), 411 (15), 383 (15), 295 (5), 235 (5), 43 (100) [Espectro 9].

Humilinólida B (**27**): p.f.= 280-282 °C; [α]_D= -68.5(CHCl₃); UV= 225 nm; IR ν_{max} (KBr) 1736-1720, 1710, 1458, 1374, 1218, 870 cm⁻¹ (Espectro 12); EM-IE m/z (intensidad relativa): 630 [M⁺ (55)] 542 (20), 525 (5), 492 (30), 483 (10), 411 (15), 383 (15), 295 (5), 235 (5), 43 (100)) [Espectro 13].

III.3.4.2. AISLAMIENTO DE LA HUMILINÓLIDA A (**26**), HUMILINÓLIDA D (**29**) Y SWIETEMAHONINA C (**36**).

31.4g de la fracción primaria SIII (ver Tabla 4) se recromatografiaron en una columna abierta sobre 628 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de hex:AcOEt, AcOEt y mezclas de AcOEt:MeOH. De esta columna se obtuvieron un total de 84 fracciones de 250 ml cada una. De nueva cuenta, el monitoreo de la cromatografía en columna se realizó mediante el empleo de la ccf, reuniéndose aquellas fracciones cromatográficamente similares. Este proceso permitió obtener los 10 grupos de fracciones SIIIA-SIIIJ que se indican en la Tabla 6.

De la fracción secundaria SIIIF (Tabla 6) cristalizaron 77.6 mg de un polvo color blanco. Sucesivas cromatografías en placa preparativa de gel de sílice de este polvo, utilizando como sistema de elución benceno:AcOEt (8:2)



permitió la obtención de 38.5 mg de unos cristales blancos solubles en CHCl_3 . Este compuesto se identificó como la swietemahonina C (**36**).

Por otra parte, de la fracción secundaria SIIIG (Tabla 6) precipitaron 277 mg de un polvo color blanco. El análisis cromatográfico en capa fina indicó que el polvo era una mezcla de dos compuestos. Con la finalidad de separar estos compuestos se realizó una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Como eluyente se utilizó una mezcla de hex:AcOEt (1:1) De esta última columna se obtuvieron 171 mg de la humilinólida A (**26**) como un polvo de color blanco.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción SIII.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones recolectadas	Fracciones unidas	Clave Fracción
hexano	100	1-20	1-21	SIIIA
hex:AcOEt	97:03	21-26	21-38	SIIIB
hex:AcOEt	90:10	27-43	39-44	SIIIC
hex:AcOEt	80:20	44-61	45-47	SIIID
hex:AcOEt	70:30	62-68	48-49	SIIIE
hex:AcOEt	50:50	69-81	50-57	SIIIF
AcOEt	100	82-84	58-67	SIIIG
			68-71	SIIIH
			72-76	SIIII
			77-84	SIIIJ

De manera adicional, de esta última cromatografía se obtuvieron 21.4 mg de la humilinólida D (**29**); el producto cristalizó en forma espontánea como un polvo de color blanco.

Swietemahonina C (**36**): t_R = 45 minutos ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50), $p.f.$ = 310-311 °C; $[\alpha]_D^{25}$ = -10.8 (CHCl_3); UV = 225 nm; IR ν_{max} (KBr) 1750-1740, 1720, 1510,

1118, 1026, 880 cm^{-1} (Espectro 16); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 614 [M^+ (29)] 550 (5), 523 (5), 476 (38), 448 (6), 406 (5), 367 (32), 279 (57), 236 (41), 219 (21), 137 (25), 83 (64), 57 (73), 43 (100)) [Espectro 17].

Humilinólida A (**26**): **tR** = 18 minutos ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50), **p.f.**= 256-258 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = -78.5$ (CHCl_3); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{max} (KBr) 3477, 1737-1725, 1710, 1504, 1436, 1387, 1261, 875 cm^{-1} (Espectro 20); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 588 [M^+ (12)] 501 (10), 500 (20), 483 (5), 450 (49), 412 (7), 411 (13), 393 (4), 43 (100)) [Espectro 21].

Humilinólida D (**29**): **tR** = 19.5 minutos ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50), **p.f.**= 262-264 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = -76$ (CHCl_3); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{max} (KBr) 3420, 1740, 1725-1710, 1438, 1375, 1280, 870 cm^{-1} (Espectro 24).; **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 586 [M^+ (15)] 568 (3), 527 (4), 526 (4), 509 (4), 489 (8), 469 (3), 467 (3), 456 (3), 448 (3), 425 (25), 410 (8), 379 (13), 43 (100) [Espectro 25].

III.3.4.3. AISLAMIENTO DE LA HUMILINA B (**30**) Y SWIETENINA C (**44**).

9.5 g de las aguas madres de la fracción SIIIG (Tabla 6) se recromatografiaron en una columna empacada con 190 g de gel de sílice. Para la elución de la columna se empleó benceno y mezclas de benceno:AcOEt. Se recogieron un total de 171 fracciones de 125 ml cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico. El proceso cromatográfico recién descrito se resume en la Tabla 7.

De la fracción terciaria SIIIG1, eluida con benceno precipitaron 17 mg adicionales del compuesto **28**. El rendimiento total de este producto fue de 254 mg.

Tabla 7. Recromatografía en columna de la fracción secundaria SIII G.

Eluyente	Proporción (%)	Fracciones colectadas	Fracciones combinadas	Clave Fracción	Peso
benceno	100	1-27	1-26	SIII G1	0.017
benceno:AcOEt	99:01	28-40	27-46	SIII G2	0.103
benceno:AcOEt	98:02	41-50	41-51	SIII G3	0.172
benceno:AcOEt	97:03	51-72	52-56	SIII G4	0.125
benceno:AcOEt	95:05	73-132	57-70	SIII G5	0.70
benceno:AcOEt	93:07	133-149	71-84	SIII G6	1.28
benceno:AcOEt	90:10	150-162	85-106	SIII G7	0.94
benceno:AcOEt	70:30	163-171	107-122	SIII G8	0.94
			123-129	SIII G9	0.13
			130-133	SIII G10	0.33
			134-149	SIII G11	0.411
			150-151	SIII G12	3.9
			152-171	SIII G13	1.6

Con la finalidad de aislar los constituyentes minoritarios presentes en la fracción terciaria SIII G6 se empleó la cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando una columna cromatográfica de fase reversa Nova Pack HR C-18 (Waters). Para este análisis, la fase móvil consistió de un sistema isocrático de CH₃CN:H₂O (55:45) y el flujo fue de 8 ml/minuto a una presión de 1700 libras/pulgadas². Se inyectaron alícuotas de 500 µl de una solución stock de la fracción SIII G6 preparada, disolviendo 100 mg de la fracción en un ml de CH₃CN. El tiempo para cada una de los desarrollos cromatográficos fue de 70 minutos a una longitud de onda de 225 nm. El procedimiento se repitió en promedio 10 veces para cada muestra con la finalidad de obtener cantidades suficientes (aproximadamente 20 mg) de cada compuesto. En todos los casos las fracciones cromatográficas obtenidas fueron concentradas a sequedad en una bomba de alto vacío.

La resolución de la fracción SIIIG6 permitió la obtención de 23 mg del compuesto **44**. El producto se aisló como un polvo blanco cristalino, el cual se identificó como swietenina C

De manera adicional, de esta misma fracción se obtuvieron 13.8 mg del compuesto **30**, el cual se identificó como la humilina B. Por último, se obtuvieron cantidades adicionales (17 mg) del compuesto **28**. Este compuesto presentó un tiempo de retención de 62.5 minutos.

Swietenina C (**44**): **tR** = 21 minutos (CH₃CN:H₂O 55:45), **p.f.**= 239-240 °C; **[α]_D**= -14.9 (CHCl₃); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{\max} (KBr)) 3500, 1735, 1720-1710, 1500, 1370, 1220, 880 cm⁻¹ (Espectro 28); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 556 [M⁺ (100)], 468 (91), 467 (17), 418 (12), 379 (31), 330 (20), 319 (6), 253 (16), 232 (16), 175 (27), 155 (77), 121 (30), 95 (94), 71 (40), 43 (77) [Espectro 29].

Humilina B (**30**): **tR** = 25 minutos (CH₃CN:H₂O 55:45), **p.f.**= 212-213 °C; **[α]_D**= -20.2 (CHCl₃); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{\max} (KBr)) 1735, 1720-1710, 1500, 1374, 1218, 880.cm⁻¹ (Espectro 32); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 572 [M⁺ (42)], 529 (5), 485 (51), 434 (6), 398 (49), 396 (3), 325 (5), 237 (32), 186 (8), 137 (22), 87 (62), 43 (100) [Espectro 33].

Los compuestos **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **36** y **44** se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los descritos en la literatura (Segura-Correa *et al.*, 1993 y Kadota *et al.*, 1990a, 1990b)

III.3.4.4. AISLAMIENTO DEL METIL-2,3-DIHIDROXI-MELIAC-8(30)-ENATO-3-ISOBUTIRATO (**25a**), METIL-2,3-DIHIDROXI-MELIAC-8(30)-ENATO-3-TIGLATO (**25b**), HUMILINÓLIDA E (**55**) y HUMILINÓLIDA F (**56**).

Dada la complejidad de las fracciones SIIIG12 y SIIIG13 (Tabla 7) observada en ccf, se decidió emplear también la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la separación de sus constituyentes individuales. Este

análisis se realizó, empleando las condiciones descritas en el inciso anterior, excepto que la fase móvil fue CH₃CN:H₂O (50:50) y el tiempo del desarrollo cromatográfico fue de 90 minutos.

De la fracción SIII G12, se obtuvieron los compuestos **26** (17 mg) y **29** (13 mg). Estos compuestos fueron aislados anteriormente e identificados como las humilinólidas A y D. De esta misma fracción se obtuvieron 20.7 mg del compuesto **25a**, 18.8 mg del compuesto **55** y 29.9 mg del compuesto **25b**. Los últimos tres compuestos se obtuvieron como polvos blancos, solubles en solventes pocos polares.

De la fracción SIII G13 se obtuvieron 17.9 mg del compuesto **56**, empleando las mismas condiciones cromatográficas. El compuesto se obtuvo como un polvo blanco soluble en CHCl₃ o AcOEt. Este compuesto se caracterizó como la humilinólida F con base en sus datos espectroscópicos y espectrométricos. De manera adicional, se obtuvieron 9 mg adicionales del compuesto **36** que presentó un tiempo de retención de 45 minutos.

Los compuestos **55** y **56** constituyeron nuevos productos naturales y se denominaron con los nombres triviales de humilinólida E y F, respectivamente. Los últimos cuatro compuestos presentaron las siguientes tiempos de retención, constantes físicas (punto de fusión y rotación óptica), espectroscópicas (IR y UV) y espectrométricas (EM):

Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**): **tR** = 26.5 minutos (CH₃CN:H₂O 50:50), **p.f.**= 89-90 °C; [α]_D= -33.9 (CHCl₃); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{\max} (KBr) 3459, 2957, 1726, 1504, 1224, 1133, 1025, 758 cm⁻¹ (Espectro 36); **EM-IE** *m/z* (intensidad relativa): 556 [**M**⁺ (100)], 486 (8), 453 (23), 435 (9), 379 (54), 367 (10), 269 (12), 196 (14), 134 (39), 95 (52), 83 (17), 71 (39), 43 (61) [Espectro 37].

Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglatato (**25b**): **tR** = 37 minutos (CH₃CN:H₂O 50:50), **p.f.**= 100-102 °C; [α]_D= 15.9 (CHCl₃); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{\max}

(KBr) 3443, 2997, 1732, 1504, 1223, 1158, 1020, 853, 755 cm^{-1} (Espectro 42). **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 568 [M^+ (50)], 550 (4), 486 (6), 453 (14), 435 (3), 395 (19), 296 (5), 191 (7), 173 (5), 134 (10), 95 (20) 83 (100), 54 (48) [Espectro 43].

Humilinólida E (55): **tR** = 33 minutos ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50), **p.f.**= 98-100 °C; $[\alpha]_D = -31.5$ (CHCl_3); **DC** (MeOH) $\Delta\epsilon = -11$ (299 nm); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{max} (KBr) 3453, 2952, 1730, 1668, 1437, 1223, 1127, 873, 755 cm^{-1} (Espectro 48); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 626 [M^+ (44)], 568 (6), 543 (3), 526 (7), 483 (12), 469 (14), 395 (10), 269 (5), 236 (3), 191 (20), 134 (29), 96 (21), 83 (100), 54 (43) [Espectro 49].

Humilinólida F (56): **tR** = 75 minutos ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50), **p.f.**= 112-115 °C; $[\alpha]_D = -41.4$ (CHCl_3); **DC** (MeOH) $\Delta\epsilon = -14$ (290 nm); **UV**= 225 nm; **IR** ν_{max} (KBr) 1756-1744, 1710, 1438, 1372, 1233, 733 cm^{-1} (Espectro 54); **EM-IE** m/z (intensidad relativa): 684 [M^+ (31)], 624 (7), 585 (23), 553 (4), 546 (5), 525 (15), 437 (12), 377 (5), 295 (8), 235 (14), 95 (24), 83 (100), 55 (40), 43 (24) [Espectro 55].

III.4. OBTENCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Malmea depressa*.

III.4.1 MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal correspondiente a la madera y la corteza de *Malmea depressa* (Annonaceae) se recolectó en Marzo de 1994, en el Municipio de Carrillo Puerto, Quintana Roo. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU, voucher Anaya 93-4), Instituto de Biología; Universidad Nacional Autónoma de México. La identificación de la especie estuvo a cargo de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Las hojas de *M. depressa* se recolectaron en Catemaco Veracruz, en Septiembre de 1995. Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario del Instituto de Ecología (XAL), Jalapa.

III.4.2. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL A PARTIR DE LAS HOJAS, LA CORTEZA Y LA MADERA DE *M. depressa*.

El material vegetal seco y fragmentado (hojas, corteza y madera) se sometió por separado a una destilación por arrastre con vapor siguiendo los procedimientos experimentales convencionales para la obtención de aceites esenciales (Vogel, 1989). En el matraz generador de vapor, se colocaron aproximadamente 500 ml de agua destilada y en otro se colocaron 200 g de hojas ó 100 g de madera y 100 g de corteza en experimentos separados. Posteriormente, el matraz generador de vapor se calentó hasta ebullición y el vapor generado se hizo pasar a través del material vegetal. El calentamiento del matraz generador de vapor se suspendió cuando se obtuvieron aproximadamente 250 ml de destilado. El aceite esencial se extrajo del destilado mediante un proceso de partición, empleando diclorometano como disolvente. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, para eliminar la humedad y posteriormente se filtró y se concentró al vacío. Este proceso permitió la obtención de 3.4 g, 3.1 g y 4.8 g del aceite esencial de la madera, de la corteza y de las hojas, respectivamente.

III.4.3. PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *M. depressa*.

La corteza (200 g) se sometió a tres extracciones sucesivas con CHCl_3 vía maceración. Se emplearon 2 l del disolvente para cada extracción. La solución resultante se concentró a presión reducida, obteniéndose 5 g de extracto a partir de la corteza.

III.4.4. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO CHCl₃ DE LA CORTEZA DE *M. depressa*.

Durante el fraccionamiento biodirigido se utilizó como bioensayo de fitotoxicidad el método bioautográfico descrito en el inciso III.2.3.1. Las semillas de prueba utilizadas fueron *Amaranthus hypochondriacus* L. Watts y *Echinochloa crusgalli* L. Beauv. El extracto clorofórmico (5 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna, utilizando como adsorbente 100 g de gel de sílice (Silica gel 60 F254 Merck). El proceso de elución se realizó con benceno, mezclas de benceno:AcOEt y mezclas de AcOEt:MeOH, recogándose un total de 112 fracciones de 100 ml cada una. En la Tabla 8 se describen detalladamente los sistemas empleados y las fracciones recolectadas. Las fracciones se analizaron por ccf, combinándose aquellas cromatográficamente similares. De este proceso se obtuvieron siete grupos de fracciones primarias (MI-MVII) [Tabla 8].

Tabla 8. Fraccionamiento preliminar biodirigido del extracto orgánico de la corteza de *M. depressa*.

Eluyente	Proporción (%)	Fracción colectadas	Fracciones combinadas	Clave Fracción
benceno	100	1-16	8-38	MI*
benceno:AcOEt.	80:20	17-60	39-50	MII*
benceno:AcOEt.	60:40	61-76	51-60	MIII
AcOEt:benceno	60:40	77-83	61-78	MIV
AcOEt:benceno	80:20	84-91	79-89	MV
AcOEt	100	92-97	90-106	MVI
AcOEt:MeOH	90:10	98-106	107-112	MVII
AcOEt:MeOH	80:20	107-110		
AcOEt:MeOH	50:50	111-112		

*fracciones activas.

Se exploró la actividad fitoinhibidora mediante el método bioautográfico de cada grupo de fracciones. Para realizar esta determinación se emplearon

placas de gel de sílice, a las cuales se les aplicó 10 mg de extracto ó fracción a ensayar. Las placas se eluyeron empleando como sistema una mezcla de benceno:AcOEt 8:2. Este proceso permitió determinar que las fracciones MI y MII (Tabla 8) contenían compuestos activos, ya que presentaban zonas de inhibición bien definidas. En el caso de la fracción MI la zona de inhibición correspondió a un cromóforo café con un Rf de 0.75. La zona activa para la fracción MII correspondía a la banda con Rf de 0.40.

III.4.5. AISLAMIENTO DE LOS CONSTITUYENTES FITOINHIBIDORES DE *M. depressa*.

Las fracciones activas MI (2 g) y MII (380 mg) [Tabla 8], eluidas con benceno:AcOEt (8:2), se sometieron a cromatografías preparativas sucesivas en placas recubiertas con gel de sílice, empleando como sistema de elución benceno:AcOEt (8:2).

De la fracción activa MI se obtuvieron 1.42 g del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (compuesto **57**). Este producto constituye el principio responsable de la actividad biológica detectada anteriormente por el método bioautográfico en la fracción MI. El compuesto se aisló como un aceite amarillo de olor agradable, soluble en solventes poco polares.

De la fracción MII (380 mg) se aislaron cuatro compuestos minoritarios: **58** (23 mg), **59** (19 mg), **60** (20 mg) y **61** (17 mg). El compuesto **58** se identificó como tetrametoxibenzaldehído mediante sus datos espectroscópicos y espectrométricos. Este producto se aisló como un aceite de color amarillo y constituye un nuevo producto natural.

Los compuestos restantes se identificaron como el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**), el aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**59**), el trans-iso-miristicina (**60**) y el alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**61**) por comparación de sus datos de IR, RNM y EM con los descritos en la literatura (Lopes *et al.*, 1986; Enríquez *et al.*, 1980; Horada, 1989).

III.4.6. AISLAMIENTO DE LA ALANTOINA.

Del extracto orgánico original precipitó un polvo blanco, el cual mediante sucesivos lavados con una mezcla de CHCl_3 :MeOH (8:2) y posterior recristalización de MeOH permitió el aislamiento de 3 g del compuesto **62**, el cual se identificó como alantoina por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los previamente descritos en la literatura. Este compuesto se aisló previamente de *Platanus orientalis* (Negwer, 1987).

III.4.7. CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES DE LOS ACEITES ESENCIALES PREPARADOS A PARTIR DE LAS DIFERENTES PARTES VEGETALES DE *M. depressa*.

La cuantificación y caracterización de los constituyentes de los aceites esenciales derivados de las hojas, la corteza y la madera de *M. depressa* se realizó por cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas (CG-EM) empleando las condiciones descritas en el inciso III.1.1.

El análisis de los cromatogramas obtenidos indicaron que los tres aceites esenciales se encontraban constituidos por los mismos compuestos y en las mismas proporciones relativas. La identificación de cada uno de los constituyentes se realizó por comparación de los tiempos de retención al realizar experimentos de coelución con muestras auténticas obtenidas del extracto orgánico de la corteza o por comparación de los espectros de masas generados con los registrados en el banco de datos Public/NIST.

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN SOBRE *Malmea depressa*.

IV.1. SELECCIÓN DE LA ESPECIE *M. depressa* COMO UNA FUENTE POTENCIAL DE AGENTES FITOTÓXICOS.

Los estudios conducentes a la obtención de nuevos principios activos vegetales de utilidad tanto terapéutica como agroquímica comprenden varias etapas (Hui *et al.*, 1989, Fang *et al.*, 1993; Farnsworth y Warner, 1990). En primer termino, es necesario realizar la selección de las especies vegetales idóneas para la obtención de los compuestos activos. Para efectuar este proceso se siguen generalmente uno o más criterios, los cuales se pueden basar en la semejanza del metabolismo secundario entre especies vegetales filogenéticamente relacionadas (criterio quimiotaxonómico); en la observación de los efectos que ocasionan las interacciones, a veces complejas, entre dos organismos en su ecosistema natural (criterio ecológico); y por último, en el uso que el hombre hace de numerosas especies vegetales con fines curativos (criterio etnobotánico) [Benner, 1993; Cox and Balick, 1994; Prance, 1994].

Una vez que las materias primas se someten a esta selección primaria con base en los criterios antes mencionados se realizan pruebas biológicas con el objetivo de identificar su potencialidad en algún ensayo preliminar. Aquellas especies que demuestran actividades biológicas significativas, se consideran entonces candidatos apropiados para la realización de sus estudios químicos biodirigidos. Estos permiten la obtención de los principios activos responsables de las actividades biológicas demostradas. Por último, los compuestos activos se identifican y se someten a una serie de evaluaciones biológicas secundarias con la finalidad de obtener una mayor información acerca de sus propiedades biológicas, incluyendo su mecanismo de acción (Farnsworth y Warner, 1990; Benner, 1993; Prance, 1994; Cox and Balick, 1994).

En el caso específico del presente estudio, la selección de la especie *M. depressa* se realizó con base en dos de los criterios antes señalados. En primer

lugar, se consideró que la especie se emplea en la medicina popular Yucateca como un agente fitoterapéutico (criterio etnobotánico). En este contexto, es bien conocido que las plantas con un reconocido uso medicinal han constituido en repetidas ocasiones el punto de partida para la obtención de compuestos activos tanto de aplicación medicinal como agroquímica (Farnsworth y Warner, 1990; Benner, 1993; Cox and Balick, 1994; Prance, 1994). En segundo lugar, los estudios de campo realizados por el biólogo colector permitieron establecer que la especie *M. depressa* es dominante en su ecosistema natural, donde el crecimiento de otras especies vegetales es bastante escaso. Estas observaciones de índole ecológico permitieron inferir *a priori* que la especie vegetal podía contener aleloquímicos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

La identificación y la recolección de la planta, así como las observaciones de campo fueron realizadas por la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Posteriormente, se demostró la potencialidad fitotóxica y fungicida de los extractos derivados de las diferentes partes vegetales de esta especie. La potencialidad fitotóxica se determinó mediante el empleo de bioensayos de crecimiento radicular en dos especies de malezas: *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae). Las técnicas empleadas para realizar estas determinaciones fueron la bioutográfica (Inoue *et al.*, 1992, Hai-Hang *et al.*, 1992) y la de la caja Petri (Anaya *et al.*, 1990 y Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Castañeda *et al.*, 1992; Sánchez y Soto, 1994; *inter alia*). Mediante el empleo de estos bioensayos se determinó que los extractos clorofórmicos de la corteza y la madera de *M. depressa* inhiben el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. En la Tabla 9 se indican los resultados correspondientes y en la Figura 13 se muestra el efecto del extracto de la corteza sobre las especies de prueba. La CI_{50} del extracto de la corteza en el caso de *A. hypochondriacus* fue de 134 $\mu\text{g/ml}$. *E. crusgalli* fue menos sensible al extracto obteniéndose una CI_{50} de 457 $\mu\text{g/ml}$. La actividad del extracto clorofórmico de la

madera fue comparable a la del extracto total de la corteza (Tabla 9). Es importante destacar que los extractos metanólicos de la corteza y de la madera fueron inactivos en estas evaluaciones.

Tabla 9. Efecto fitoinhibidor de los extractos clorofórmicos de la corteza y de la madera de *M. depressa*.

Muestra	Concentración Inhibitoria media (CI ₅₀) en µg/ml (intervalos de confianza)	
	<i>Echinochloa crusgalli</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
Extracto CHCl ₃ de la corteza	457 (500-414)	134 (164-114)
Extracto CHCl ₃ de la madera	600 (570-630)	200 (193-215)
Tricolorina A*	12 (17-7)	37 (46-29)

*control positivo.

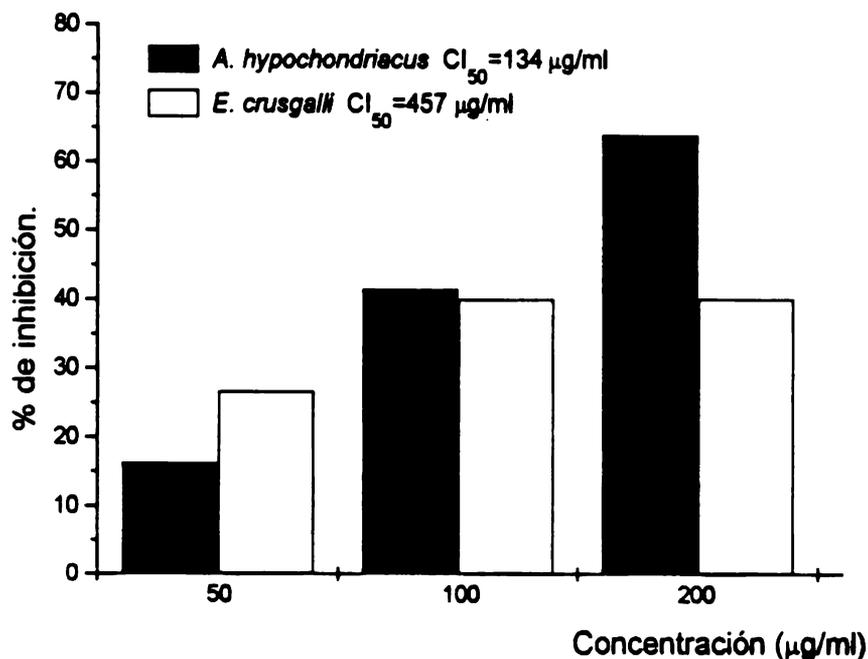


Figura 13. Efecto del extracto clorofórmico de la corteza de *M. depressa* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

Los resultados de la evaluación del potencial fungicida del extracto clorofórmico de la corteza indicaron una moderada actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (MIC = 400 μ g/ml) y *Trichophyton mentagrophytes* (MIC = 400 μ g/ml) [Figura 14].

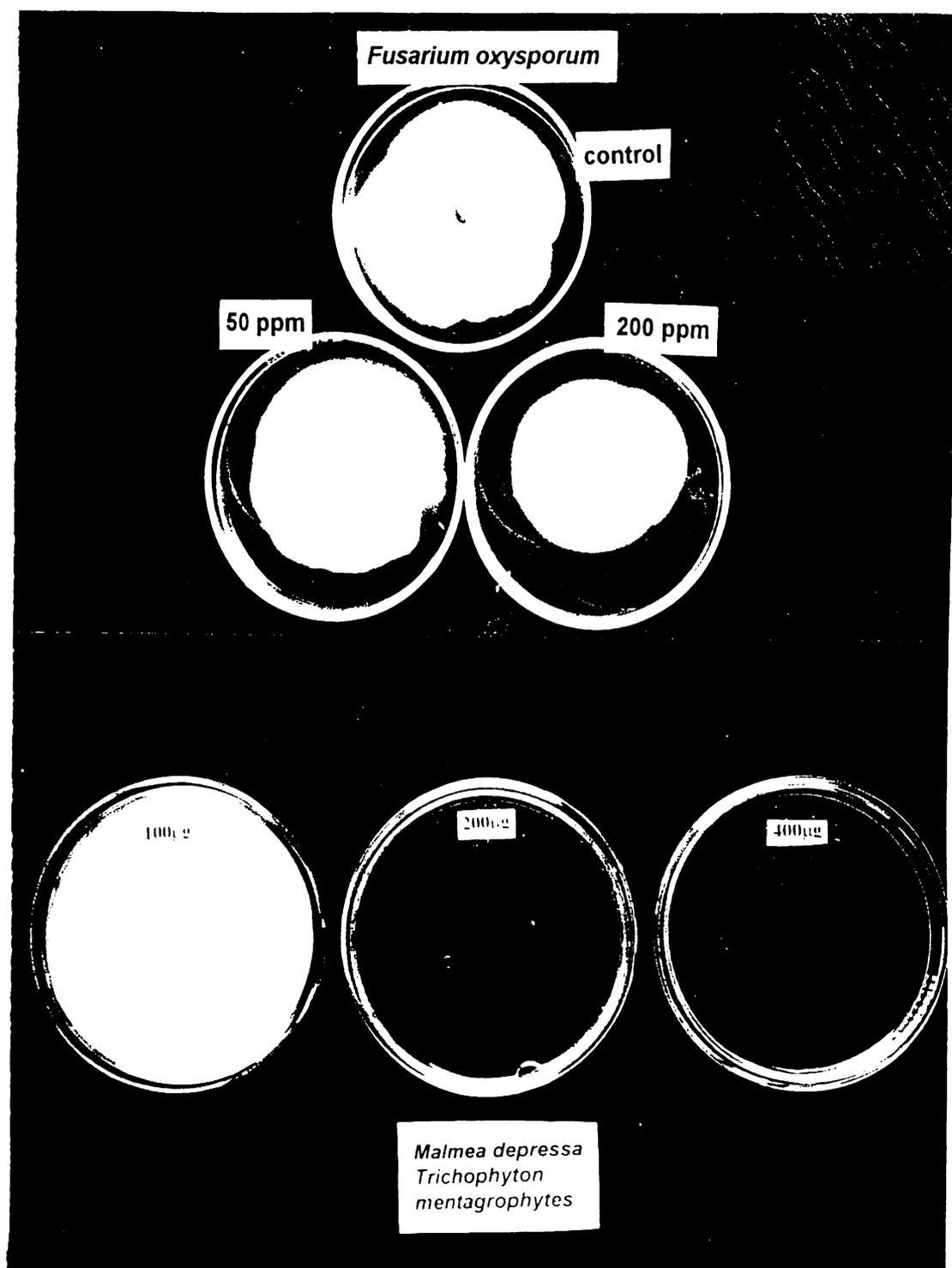


Figura 14. Actividad antifúngica del extracto CHCl_3 de *M. drepressa*.

Las actividades biológicas recién descritas para los extractos orgánicos de la corteza y de la madera de *M. depressa* permitieron la selección de esta especie como un candidato idóneo para la obtención de principios fitotóxicos y fungitóxicos. En consecuencia, se procedió a la preparación del extracto CHCl₃ de la corteza que resultó prácticamente idéntico al de la madera de acuerdo a los análisis cromatográficos realizados en capa delgada. Para ello, el material vegetal se sometió a un proceso de maceración. Posteriormente, el extracto activo fue sometido a un fraccionamiento preliminar utilizando una columna abierta de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de siete grupos de fracciones primarias (MI-MVII). Las siete fracciones se evaluaron mediante el método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992, sección experimental) con la finalidad de determinar su actividad fitoinhibidora en las dos especies de prueba (*A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*). Este proceso permitió establecer que la actividad fitotóxica se concentraba en las fracciones primarias MI y MII.

La fracción MI presentó una zona de inhibición sumamente evidente (Figura 15) en tanto que la fracción MII desarrolló una menor inhibición. Los R_fs de las zonas de inhibición fueron de 0.75 y de 0.4 para MI y MII, respectivamente. Al revelar las placas cromatográficas de las fracciones activas con H₂SO₄ al 10%, se observó que la fracción primaria MI contenía un compuesto mayoritario (Figura 15); en tanto que la fracción MII era una mezcla de por lo menos tres compuestos. Con la finalidad de aislar los constituyentes responsables de la actividad fitotóxica de las fracciones MI y MII, ambas fracciones por separado se sometieron a sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice, empleando como sistema de elución benceno:AcOEt (8:2). Este procedimiento permitió la obtención de 1.42 g del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**) de la fracción MI. Por otra parte, de la fracción activa MII se aislaron los siguientes metabolitos secundarios: el tetrametoxibenzaldehído (**58**), el aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**59**), *trans*-iso-miristicina (**60**) y el alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**61**). El producto **58** representa un nuevo producto natural. Las estructuras de los compuestos **57-61** se ilustran en la Figura 16.

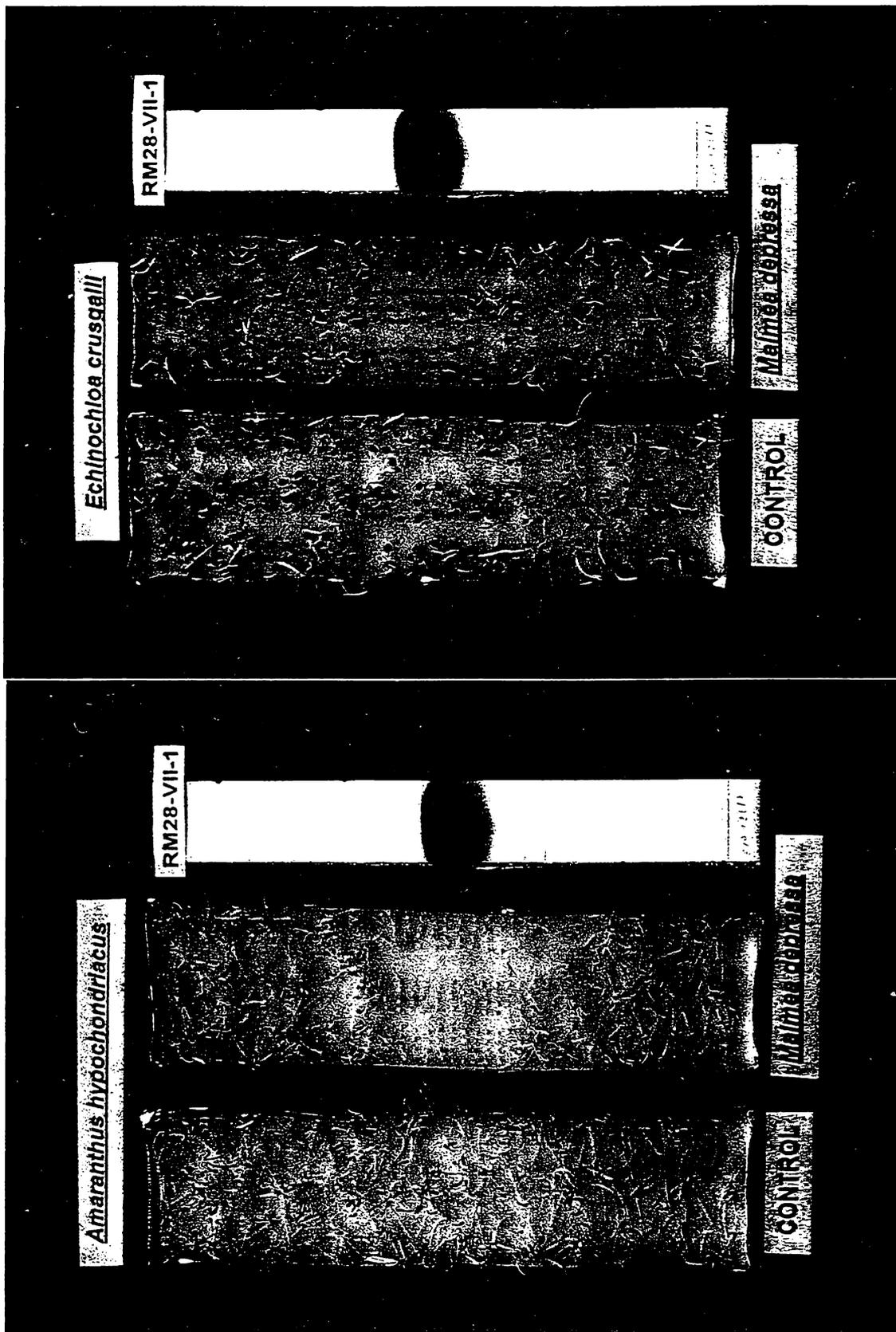
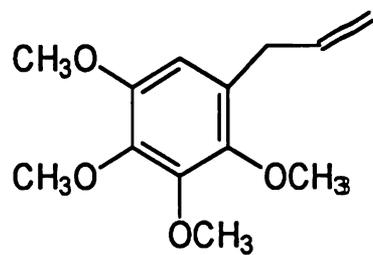
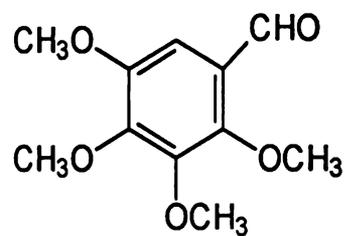


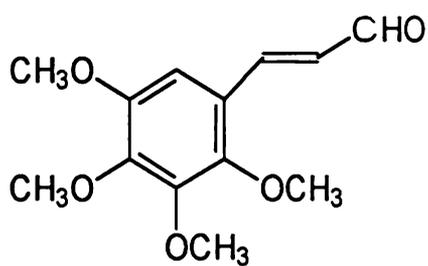
Figura 15. Bioautografía de la fracción primaria MI.



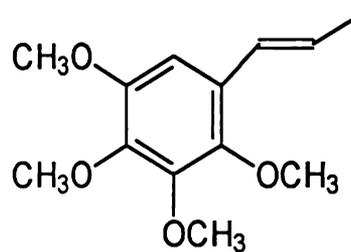
57



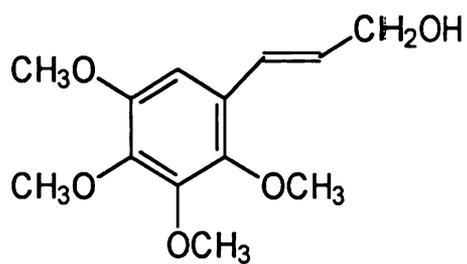
58



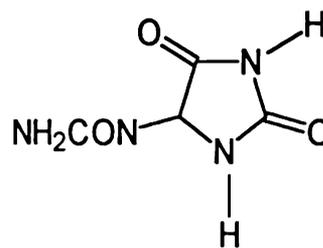
59



60



61



62

Figura 16. Estructura de los metabolitos secundarios aislados del extracto de la corteza de *M. depressa*.

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FITOTÓXICOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LA CORTEZA DE *M. depressa*.

La elucidación estructural de los cinco compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

El compuesto **57** se aisló como un aceite de color amarillo, de olor agradable, soluble en disolventes poco polares. Su fórmula molecular se determinó como C₁₃H₁₈O₄ por espectrometría de masas. En el espectro de masas, el ión molecular (Espectro 3, Tabla 10) se observa en una relación de masa carga (*m/z*) 238.

Tabla 10. Fragmentos presentes en los espectros de masas de los compuestos **57-61**.

Compuesto	Fragmentos (intensidad relativa)
1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57)	238 (97), 223 (100), 192 (70), 191 (67), 163 (50), 149 (28).
2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehído (58)	226 (100), 211 (46), 168 (15), 140 (8), 125 (10), 97 (7).
aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (59)	252 (5), 222 (14), 221 (100), 193 (10), 179 (18), 178 (13), 177 (17), 166 (14), 163 (7), 151 (32), 150 (11).
<i>trans</i> -isomiristicina (60)	238 (100), 223 (22), 195 (17), 192 (63), 180 (7), 177 (9), 165 (7), 109 (7).
alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (61)	254 (100), 239 (33), 211 (16), 196 (14), 151 (7), 136 (4).

Los espectros de RMN (Espectro 1 y 2, Tabla 11 y 12) presentan el perfil típico de un fenilpropanoide (C₆-C₃) tetrametoxilado en el núcleo aromático (Enríquez *et al.*, 1980; Horada *et al.*, 1989). Así, el espectro de RMN-¹³C (Espectro 2, Tabla 12) presenta señales para 13 átomos de carbono en

concordancia con la fórmula molecular establecida. El espectro en su modalidad DEPT indica claramente que cuatro de estas señales corresponden a cuatro metoxilos unidos a carbonos aromáticos [δ_c 56.10 (MeO-1), 61.25 (MeO-2), 56.10 (MeO-3) y 62.85 (MeO-4)], dos grupos metilenos (δ_c 33.85 y 115.59) uno de ellos vinílico y el otro alifático, y dos grupos metino (δ_c 107.44 y 137.16) uno de naturaleza aromática y el otro olefínico. Las cinco señales restantes detectadas en el espectro de ^{13}C desacoplado son asignables a cinco carbonos aromáticos cuaternarios. Cuatro de estas señales [δ_c 149.38 (C-1), 145.20 (C-2), 141.70 (C-3), 147.63 (C-4)] pertenecen a carbonos unidos a funciones oxigenadas y, la quinta corresponde al carbono *ipso* al propenilo. En el espectro de RMN- ^1H (Espectro 1) las señales para el residuo propenilo se observan en δ_H 5.09 (td, H-3'), δ_H 5.96 (ddt, H-2') y 3.36 (d, H-1'). Por otro lado, los metoxilos evidenciados en el espectro de RMN- ^{13}C aparecen en el espectro de RMN- ^1H en δ_H 3.92 (MeO-1), 3.87 (MeO-2), 3.82 (MeO-3) y 3.79 (MeO-4). Por último, la señal del único hidrógeno aromático se encuentra en δ_H 6.44 (H-6).

Los cuadros de conectividades observado en el espectro de RMN- ^1H de correlación homonuclear COSY (Figura 17) confirman, en primer lugar, la naturaleza del residuo C_3 ; y, por otra parte, que el metino aromático se encuentra en disposición *orto* a uno de los metoxilos y al grupo propenilo de tal forma que el anillo aromático se encuentra 1,2,3,4,5 pentasustituido. En el primer caso, se aprecia una clara correlación entre los hidrógenos del metileno bencílico (δ_H 3.36) y el metino vinílico en δ_H 5.96 (H-2'). A su vez, esta última señal correlaciona con los hidrógenos del metileno en δ_H 5.09 (H-3').

Las correlaciones recién descritas indican claramente que el residuo C_3 corresponde a un propenilo. En el segundo caso, la interacción entre los hidrógenos del metileno bencílico (δ_H 3.36) y el metino aromático (δ_H 6.44) confirma la disposición *orto* del grupo propenilo y el metino aromático. Asimismo, la interacción de esta última señal con los hidrógenos del metoxilo en δ_H 3.79 (MeO-4) ponen de manifiesto que el hidrógeno aromático se encuentra también en disposición *orto* a uno de los grupos metoxilos.

Tabla 11. Desplazamiento químicos (ppm) obtenidos en la RMN-¹H para los cinco metabolitos secundarios aislados del extracto clorofórmico de la corteza de *M. depressa*.

Protón	Compuesto				
	57	58	59	60	61
H-6	6.44 s	7.10 s	6.80 s	6.81 s	6.6 s
MeO-1	3.92 s	-	-	3.96 s	-
MeO-2	3.87 s	3.90 s	3.81 s	3.93 s	3.77 s
MeO-3	3.82 s	3.93 s	3.87 s	3.90 s	3.82 s
MeO-4	3.79 s	3.90 s	3.84 s	3.83 s	3.83 s
MeO-5	-	3.83 s	3.87 s	-	3.80 s
H-1'	3.36 d (6)	-	7.63 d (16)	6.49 d (16)	6.32 d (16)
H-2'	5.96 ddt (15, 7, 6)	-	6.50 dd (7, 16)	6.23 dq (16, 5)	5.93 dt (16, 6)
H-3'	5.09 td (7, 1.8)	-	-	1.90 d (5)	4.22 d (6)
	5.04 t (15)		-		
CHO	-	10.29 s	9.67 d (7)	-	-

(constantes de acoplamiento en Hertz)

Tabla 12. Desplazamiento químicos (ppm) obtenidos en la RMN-¹³C para los cinco metabolitos secundarios aislados del extracto clorofórmico de la corteza de *M. depressa*.

Carbono	Compuestos				
	57	58	59	60	61
1	149.38	124.2	144.7	142.6	130.1
2	145.20	149.37	146.4	141.8	142.2
3	141.70	144.83	140.9	148.0	145.1
4	147.63	146.43	148.0	150.9	137.3
5	128.2	152.2	127.1	147.2	149.3
6	107.44	103.8	107.2	113.7	103.5
MeO-1	56.10	-	-	-	-
MeO-2	61.25	61.25	61.3	62.8	60.9
MeO-3	56.10	57.10	56.3	58.3	55.9
MeO-4	62.85	61.25	61.9	56.9	61.1
MeO-5	-	57.10	56.3	56.1	55.9
1'	33.85	-	147.9	124.4	128.8
2'	137.16	-	128.4	123.4	124.8
3'	115.59	-	-	18.7	63.5
CHO	-	188.8	193.5	-	-

(constantes de acoplamiento en Hertz)

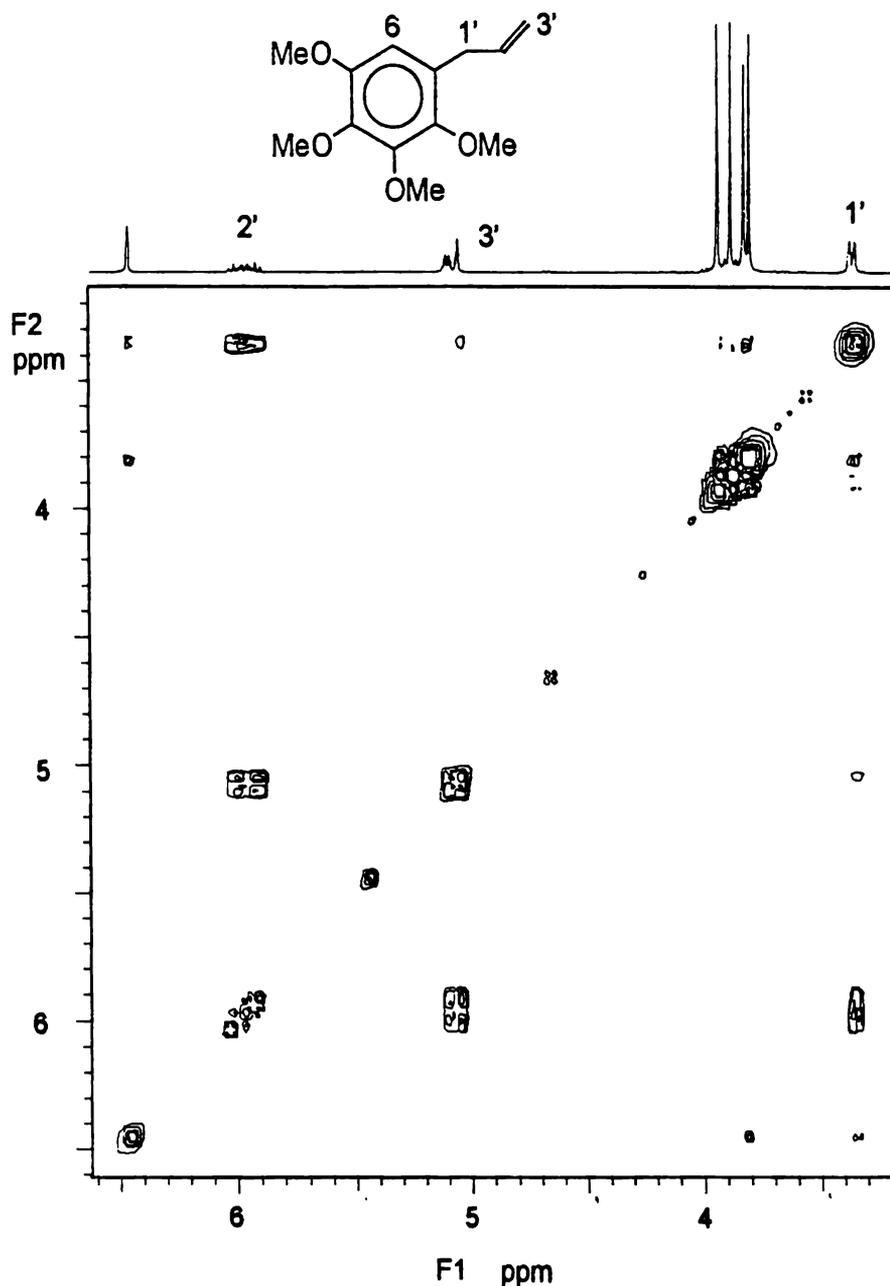


Figura 17. Espectro COSY (^1H - ^1H) del compuesto 1,2,3,4-terametoxi-5-(2-propenil)benceno (57).

Mediante las evidencias espectroscópicas descritas en el párrafo anterior el producto activo se caracterizó como el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno. Es importante señalar que este compuesto se aisló previamente de *Petroselinum sativum* (Horada *et al.*, 1989). Por lo tanto, su aislamiento de

Malmea depressa constituye la segunda descripción de este producto en la naturaleza.

El compuesto **58** constituye un nuevo producto natural y se identificó como el 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehído con base en sus propiedades espectroscópicas. Este metabolito novedoso se aisló como un aceite de color amarillo, soluble en disolventes poco polares. Su fórmula molecular se estableció como $C_{11}H_{14}O_5$ con base en los espectros de RMN- ^{13}C (Espectro 5, Tabla 12) y de masas (Espectro 6, Tabla 10). El espectro de masas presenta el ión molecular en una m/z de 226 uma. Los espectros de RMN (Espectros 4 y 5, Tabla 11, 12) permiten evidenciar que el producto **58** es un compuesto aromático simple de tipo C_6-C_1 (Breitmaier y Voelter, 1989).

El espectro de RMN- ^{13}C del producto **58** (Espectro 5, Tabla 12) presenta señales para 11 átomos de carbono, en concordancia con la fórmula molecular establecida. Cuatro de estas señales se atribuyen a los grupos metoxilos de la molécula (δ_c 61.25, MeO-2; 57.10, MeO-3 y MeO-5 y 62.85, MeO-4); la señal en δ_c 188.80 corresponde a un grupo aldehído; y las seis absorciones restantes pertenecen a los carbonos del anillo aromático. Cuatro de estas últimas señales se encuentran unidas a funciones oxigenadas [δ_c 149.37 (C-2); 149.83 (C3); 146.63 (C-4); 152.3 (C-5)]; la quinta es *ipso* al grupo aldehído [δ_c 124.20 (C-1)] y, la última señal se asigna a un metino aromático [δ_c 103.8 (C-6)]. El espectro de RMN- 1H (Espectro 4, Tabla 11) presenta las señales para los cuatro metoxilos en δ_H 3.90 (MeO-2); 3.93 (MeO-5); 3.90 (MeO-3) y 3.83 (MeO-4); además en δ_H 10.39 el espectro muestra un singulete que integra para un protón, confirmándose así la presencia del grupo aldehído evidenciado anteriormente en el espectro de RMN- ^{13}C . Por último, se observa una señal simple en δ_H 7.10 (H-6) correspondiente al único hidrógeno aromático presente en la molécula.

En síntesis, las características de los espectros de RMN permiten establecer que la molécula presenta cuatro grupos metoxilos y un grupo aldehído unidos a un anillo aromático; sin embargo, resta por establecer la disposición

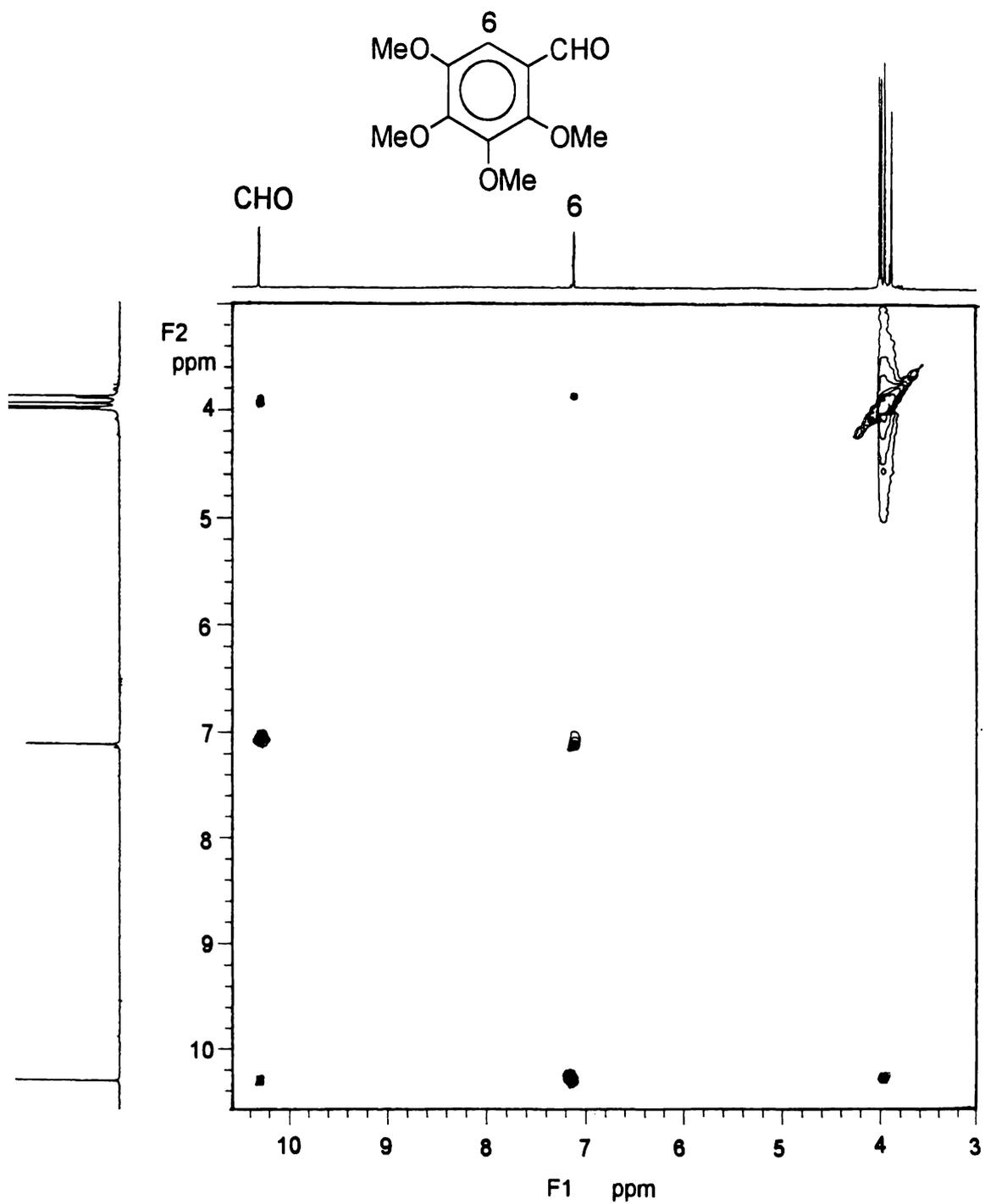
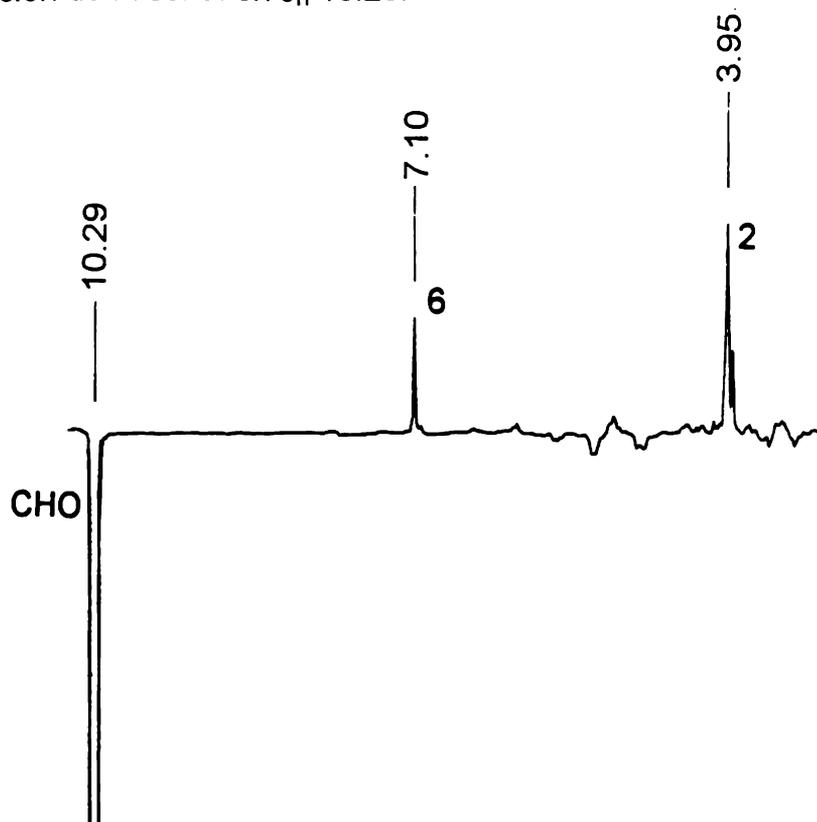


Figura 18. Espectro COSY (^1H - ^1H) del compuesto 2,3,4,5-tetrameto-benzaldehido (58).

a) Irradiación de la señal en δ_H 10.29.



b) Irradiación de la señal en δ_H 7.10.

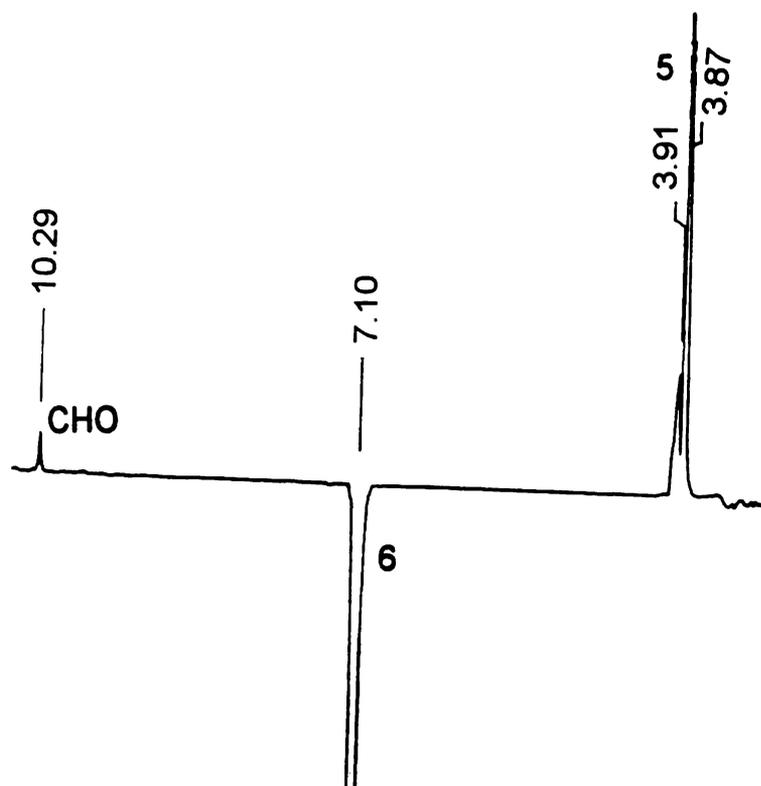


Figura 19. Experimento de asociación NOE del compuesto 2,3,4,5-terametoibenzaldehido (**58**).a) Irradiación de la señal en δ_H 10.29. b). b) Irradiación de la señal en δ_H 7.10.

Los compuestos **59**, **60**, y **61**, se identificaron como el aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico, la *trans*-iso-miristicina y el alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico, respectivamente. Los datos espectroscópicos y espectrométricos que permitieron la elucidación estructural de los compuestos **59-61** se describen detalladamente en las Tablas 10, 11 y 12 y están en perfecta armonía con los descritos en la literatura para estos compuestos. Cabe aclarar, que estos tres fenilpropanoides fueron previamente aislados de *Licaria chrysophylla* (Lopes *et al.*, 1986). En el caso de los productos **59** y **61**, esta investigación constituye también la segunda ocasión en que se obtienen de una fuente natural.

IV.4. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FITOINHIBIDOR DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *M. depressa*.

El potencial fitotóxico de los metabolitos secundarios obtenidos del extracto activo de la corteza de *M. depressa* se determinó de nueva cuenta mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Se evaluaron los compuestos 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**), 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehído (**58**), aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**59**), *trans*-isomiristicina (**60**) y alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**61**).

Los resultados de las evaluaciones realizadas con los compuestos antes señalados se muestran en la Tabla 13 y se expresan en forma de concentraciones inhibitoras medias (CI_{50}). En la Figura 20 se indican los resultados correspondientes al producto más activo (**57**) y en esta oportunidad los resultados se expresan como porcentajes de inhibición a las diferentes concentraciones de prueba.

El compuesto **57** inhibe de manera significativa y selectiva el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, la CI_{50} es de 43 $\mu\text{g/ml}$. Al igual que en el caso del extracto, la especie *E. crusgalli* es menos sensible a los tratamientos de este compuesto ($CI_{50} = 810 \mu\text{g/ml}$).

Tabla 13. Efecto fitoinhibidor de los compuestos puros de *M. depressa*.

Muestra	Concentración Inhibitoria media (CI ₅₀) en µg/ml (intervalos de confianza)	
	<i>Echinochloa crugalli</i>	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>
1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57)	810 (857-765)	43 (51-35)
2,3,4,5-tetrametoxi-benzaldehido (58)	>1000	822 (864-777)
Compuesto 59-61	>1000	345 (425-269)
aldehido 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (59)	>1000	>1000
<i>trans</i> -iso-miristicina (60)	>1000	300 (346-271)
alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (61)	>1000	>1000
Tricolorina A*	12 (17-7)	37 (46-29)

*Control positivo

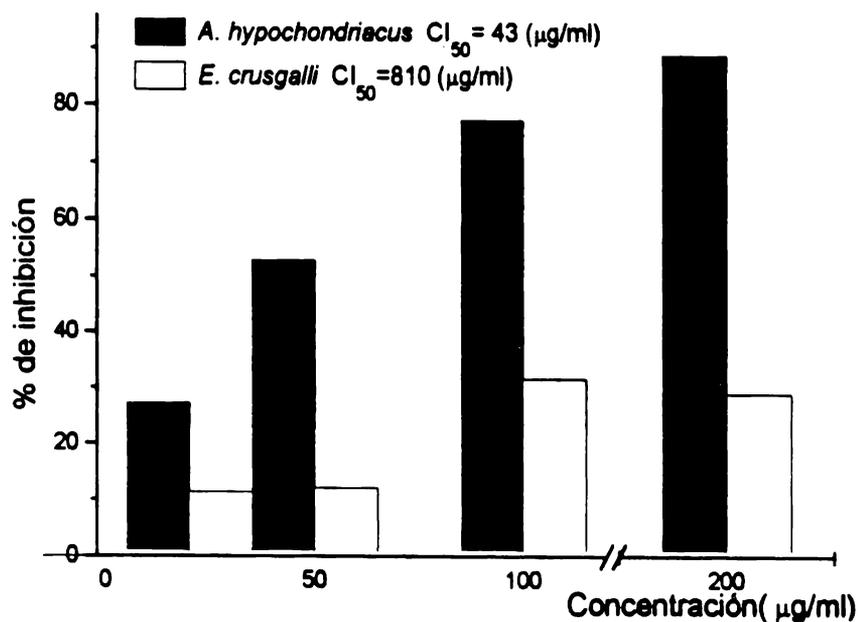


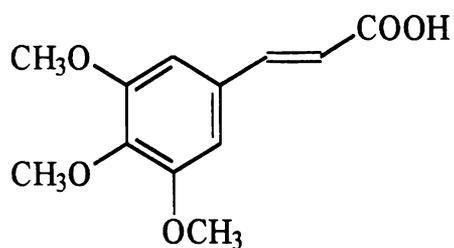
Figura 20. Efecto del compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

El producto **58** es poco activo contra *A. hypochondriacus* ($CI_{50} = 822 \mu\text{g/ml}$) e inactivo contra *E. crusgalli* ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$). Los fenilpropanoides **59** y **61** no afectan el crecimiento de las especies de prueba ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$). El compuesto **60** es moderadamente activo contra *A. hypochondriacus* ($CI_{50} = 300 \mu\text{g/ml}$) pero inactivo contra *E. crusgalli* ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$).

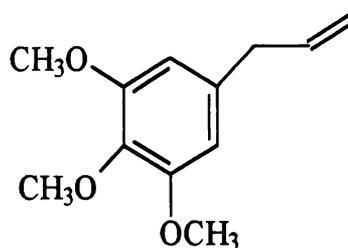
Por último, la mezcla de los compuestos **59-61** presenta una actividad moderada sobre *A. hypochondriacus* ($CI_{50} = 345 \mu\text{g/ml}$). Sin embargo, su efecto contra *E. crusgalli* es insignificante ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$). La poca actividad demostrada por la mezcla de los tres compuestos se puede atribuir a la presencia de la *trans*-isomiristicina (**60**) ya que los compuestos **59** y **61** por si solos no presentan actividad fitotóxica.

Por otro lado, la comparación de la actividad fitoinhibidora del crecimiento vegetal demostrada por los compuestos **57**, **58** y **60** indica que la presencia del radical propenilo confiere una mayor actividad biológica.

Algunos autores han descrito, que al aumentar la lipofiliidad del fenilpropanoide incrementa la actividad fitoinhibidora. Por ejemplo, el ácido trimetoxicinámico (**67**) es inactivo sobre el crecimiento de algas; en cambio el trimetoxipropenilbenceno (**68**) presenta una actividad inhibidora significativa sobre el crecimiento de estos organismos y sobre la germinación de semillas de diferentes especies vegetales (Reynols, 1978; Greca *et al.*, 1992 y 1995). De manera general, los fenilpropanoides fitotóxicos investigados a la fecha ejercen su efecto en un intervalo de concentración comprendido entre 10^{-2} y $10^{-4} \mu\text{M}$ (Einhellig, 1986, 1993; Macías, 1995). En consecuencia, el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(-2-propenil)benceno se encuentra dentro de los fenilpropanoides más activos descritos en la literatura ya que las concentraciones inhibitoras medias del crecimiento encontradas en el presente estudio oscilan entre 1.8×10^{-4} y 3.4×10^{-3} . Asimismo cabe resaltar que la actividad del producto natural es comparable a la de muchos sesquiterpenoides y monoterpenoides, considerados como los productos vegetales con la mayor potencia fitotóxica (Macías, 1995; Duke 1991).



67



68

IV.4. EVALUACIÓN DEL COMPUESTO 1,2,3,4-TETRAMETOXI-5-(2-PROPENIL)BENCENO SOBRE DIVERSAS ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS.

Tomando en cuenta la potente actividad fitoinhibidora del compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno contra la especie *A. hypochondriacus* y con la finalidad de explorar con mayor profundidad su potencial herbicida, se decidió evaluar el efecto de este producto sobre diversas reacciones del proceso fotosintético. De manera específica, sobre las reacciones de la fase luminosa de la fotosíntesis empleando cloroplastos aislados de espinacas.

Las actividades fotosintéticas estudiadas se seleccionaron tomando como referencia el blanco de acción de los herbicidas comerciales y al considerar que algunos fenilpropanopides, como los ácidos cinámico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico, caféico y clorogénico, inhiben el proceso de la fotosíntesis (Einhellig, 1986y 1995; Einhellig *et al.*, 1993; Duke y Lydon, 1993; Duke y Abbas, 1995; Moreland, 1980, Mersie y Singh, 1993).

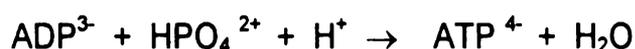
En primer lugar, se determinó el efecto que presenta el 1,2,3,4-tetrametoxi-5(2-propenil)benceno (**57**) sobre la síntesis de ATP. Posteriormente, considerando que el producto inhibe de manera significativa la síntesis de ATP se procedió a dilucidar el mecanismo mediante el cual ejerce su efecto inhibitor sobre el proceso de fotofosforilación. En este sentido, cabe recordar, que la síntesis de ATP se puede inhibir en tres niveles diferentes: i) desacoplando la síntesis de ATP del transporte de electrones, ii) inhibiendo la transducción de energía e iii) inhibiendo la reacción de Hill (Moreland, 1980; Trebs, 1972; Mitchell, 1977). Para discernir entonces, entre estos tres posibles mecanismos

de acción se procedió a evaluar el efecto de diferentes concentraciones del fenilpropanoide sobre el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado, así como sobre la captación de protones.

La interpretación de los resultados indicaron que el producto natural afecta los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado así como la captación de protones y síntesis de ATP. En consecuencia el compuesto actúa a nivel de la cadena transportadora de electrones en los FSI y FSII. Por último, para determinar específicamente el blanco (o el sitio) de acción afectado en la cadena transportadora de electrones se procedió a evaluar el efecto del fenilpropanoide sobre los FSI y FSII.

III.4.1. SÍNTESIS DE ATP Y CAPTACIÓN DE PROTONES.

La síntesis de ATP y la captación de protones se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Dilley (1972)) [inciso III.2.6.4]. Este procedimiento se basa en medir el cambio de pH en el medio de la reacción inducido por la síntesis de ATP en presencia de ADP y Pi (Calera *et al.*, 1996). Cabe destacar que durante la síntesis de ATP a pH 8, la enzima H⁺-ATPasa consume irreversiblemente un protón por cada molécula de ATP sintetizada de acuerdo a la siguiente reacción:



Entonces la variación de pH debido al consumo de protones es proporcional a la cantidad de ATP generada. En la Figura 21 se observa el efecto del compuesto sobre la síntesis de ATP cuando los electrones se transportan del H₂O al MV. Esta Figura muestra que el compuesto inhibe significativamente la síntesis de ATP de manera dependiente de la concentración. El compuesto inhibe en un 98.9% la síntesis de ATP a la concentración de 4.54 μM, observándose que la CI₅₀ es de 1.48 μM (Tabla 14). En la Figura 21 también se muestran los resultados obtenidos sobre la captación de protones; este último ensayo biológico se desarrolló empleando las mismas condiciones excepto que al medio de reacción no se suplemento

con ADP y Pi. El compuesto **57** también inhibe en forma significativa la captación de protones. La CI_{50} para la captación de protones es de $1.95 \mu\text{M}$ (Tabla 14). A la concentración de $4.54 \mu\text{M}$ la captación de protones se inhibe en un 96.5 %.

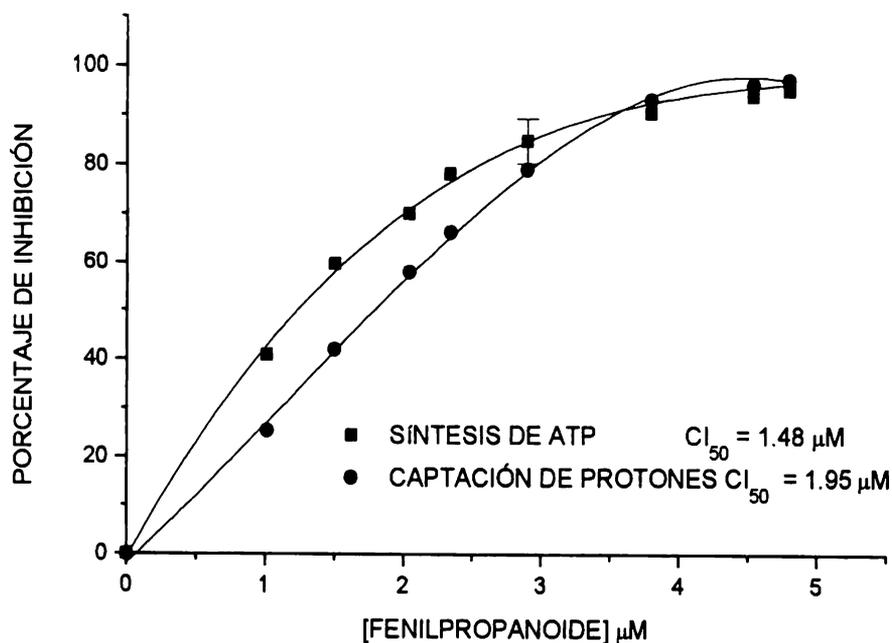


Figura 21. Efecto del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre la síntesis de ATP y sobre la captación de protones.

IV.4.2. TRANSPORTE DE ELECTRONES.

Para determinar el mecanismo mediante el cual el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno inhibe la síntesis de ATP y la captación de protones se determinó el efecto del mismo sobre el transporte de electrones fotosintético (fase luminosa). Para este ensayo se emplearon tres condiciones experimentales diferentes. En primer lugar, se evaluó el transporte de electrones basal (Te^- basal); esta actividad se determinó midiendo el flujo de electrones dependiente de la luz en el medio basal; en este caso, la velocidad del transporte de electrones es baja debido a la ausencia de ADP y Pi en el medio (Trebs, 1972). En la segunda determinación, se midió el transporte de electrones fosforilante (Te^- fosforilante) y para ello se adicionó al medio basal ADP (1mM) y Pi (3mM) para así permitir la actividad catalítica de la enzima H^+ -ATPasa; en este caso, la velocidad del transporte de electrones es de una a

tres veces mayor que la del Te^- basal, ya que el gradiente de pH es utilizado para la fosforilación (Trebs, 1972). Por último, se determinó el transporte de electrones desacoplado (Te^- desacoplado), para lo cual se adicionó al medio de reacción basal NH_4Cl (6mM) como un agente desacoplante. Este último promueve la disipación del gradiente de H^+ generado en la cadena fotosintética, observándose una velocidad máxima de flujo de electrones. Si un compuesto inhibe el transporte de electrones bajo estas condiciones se le considera como un inhibidor clásico de la reacción de Hill (McCarty, 1977; Trebs, 1972; Mitchell, 1977). El efecto del compuesto sobre el transporte de electrones fotosintético se determinó *in vitro* empleando al agua como un donador natural de electrones y al MV como un aceptor artificial de electrones. Estos ensayos se realizaron empleando cloroplastos intactos de espinacas iluminados y lisados al momento del ensayo.

Los resultados indicados en la Figura 22 y en la Tabla 14 indican que el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno inhibe significativamente los transportes de electrones basal, desacoplado y fosforilante en el intervalo de concentración de 1 a 5 μM . Las concentraciones inhibitoras medias (CI_{50}) calculadas son de 3.6, 5.0 y 2.7 μM , respectivamente. Según los resultados obtenidos, el transporte de electrones desacoplado es el más afectado, inhibiéndose en un 85% a una concentración de 2.7 μM .

Tabla 14. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5(2-propenil)benceno sobre las reacciones generales de la fotosíntesis de agua a MV.

Reacciones Generales	Concentración del compuesto (μM)	% de inhibición ($\pm\text{DS}$)	CI_{50} (μM)
Flujo de electrones basal	4.54	74.0 (3.6)	3.60
Flujo de electrones fosforilante	4.54	50.0 (2.5)	5.00
Flujo de electrones desacoplado	4.54	85.0 (4.2)	2.70
Síntesis de ATP	4.54	98.9 (0.0)	1.48
Captación de protones	4.54	96.5 (0.0)	1.95

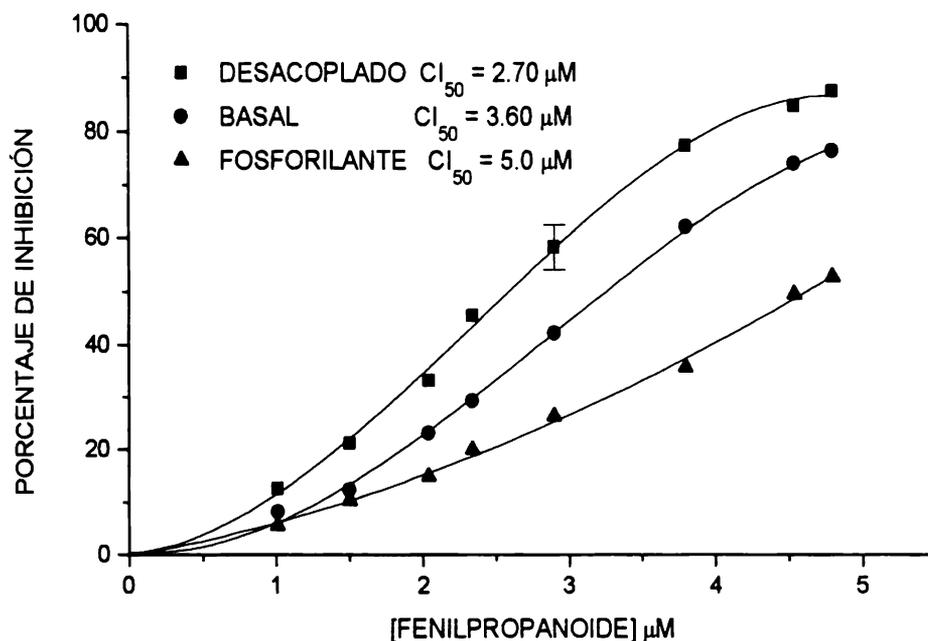


Figura 22. Efecto del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre el transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado. Las velocidades del control para los transportes de electrones basal, fosforilante y desacoplado son 580, 488 y 1280 $\mu\text{equiv. de } e^- \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{mg}$ de clorofila.

El efecto inhibitor que demostró el compuesto sobre el Te^- (basal, fosforilante y desacoplado), la síntesis de ATP y la captación de protones fueron dependientes de la concentración. Con base en estos resultados, el compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno se caracterizó como un inhibidor clásico de la reacción de Hill. Cabe mencionar que los compuestos que inhiben los flujos de electrones basal, fosforilante y desacoplado no permiten que se genere el gradiente electroquímico de protones y, por lo tanto, no se dispone de la energía libre necesaria para la síntesis de ATP.

El mecanismo de acción demostrado para el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno es similar a los descritos para algunos compuestos naturales como el piquerol A, el diacetilpiquerol (Mendoza *et al.*, 1994), el cacalol (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991), la ivalina (Bernal-Morales *et al.*, 1994), la zaluzanina C

(Lotina-Hennsen *et al.*, 1992), la isoallolantolactona (Calera *et al.*, 1995) y la juglona (Hejl *et al.*, 1993).

IV.4.3. EFECTO DEL 1,2,3,4-TETRAMETOXI-5-(2-PROPENIL)-BENCENO SOBRE LAS REACCIONES PARCIALES DE LA CADENA REDOX EN EL TRANSPORTE DE ELECTRONES A NIVEL DE LOS FOTOSISTEMAS I Y II.

Con la finalidad de ubicar específicamente el sitio y las enzima redox de la cadena transportadora de electrones afectados por el fenilpropanoide **57**, se determinó su efecto sobre el transporte de electrones en los fotosistemas I y II. En el caso del FSI se determinó el efecto del compuesto sobre las siguientes reacciones parciales: de PMS a MV y de DCPIP_{reducido} a MV. En el caso del fotosistema II, se ensayo el efecto sobre tres reacciones parciales ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$ y $\text{DCP} \rightarrow \text{DCPIP}$). Para estas determinaciones, se emplearon diferentes donadores y aceptores de electrones artificiales e inhibidores de la cadena fotosintética, los cuales se describen detalladamente en la sección experimental.

En primer lugar, se determinó la actividad en el fotosistema II en donde se midió el Te^- de H_2O a $\text{DCPIP}/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. En esta reacción, el agua actuó como un donador natural de electrones y el $\text{DCPIP}/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ actuó como un aceptor artificial de electrones, equivalente al aceptor natural Cit b_6/f (ver Figura 23). Para inhibir el paso de electrones hacia el FSI se adicionó DBMIB a la mezcla de reacción. Los resultados obtenidos de estos ensayos permitieron comprobar que el transporte de electrones de H_2O a $\text{DCPIP}/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ se inhibe en un 81% a la concentración de $9.08 \mu\text{M}$. La CI_{50} fue de $4.3 \mu\text{M}$ (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto de 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre las diversas reacciones parciales de los FS I y II.

Reacciones parciales	Concentración del compuesto (μM)	% de inhibición ($\pm\text{DS}$)	CI_{50} (μM)
FSI			
$\text{PMS}_{\text{reducido}} \rightarrow \text{MV}$	13.61	41.0 (3.1)	20.50
$\text{DCPIP} \rightarrow \text{MV}$	13.61	27.0 (4.7)	29.60
FSII			
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{DCPIP}$	9.80	81.60 (1.5)	4.32
$\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SiMo}$	6.05	96.10 (2.3)	2.86
$\text{DCP} \rightarrow \text{DCPIP}$	9.08	51.00 (3.6)	8.90

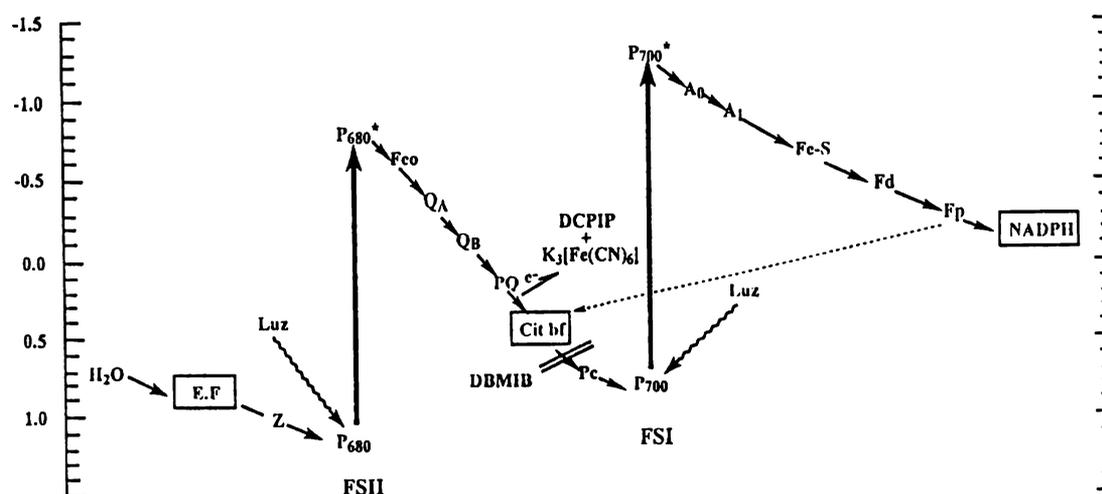


Figura 23. Determinación de electrones desacoplado en el FSII de H_2O a $\text{DCPIP}/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Cit b₆/f)

Posteriormente, se determinó el efecto del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno sobre la segunda reacción parcial (del H_2O al SiMo) y de nueva cuenta, el agua actuó como un donador natural de electrones y el SiMo (equivalente a FeO, ver Figura 24) actuó como un aceptor artificial de electrones. El DCMU se empleó para inhibir el transporte de electrones hacia el FSI, específicamente inhibe el Te^- de FeO a Q_A . En esta ocasión, el

fenilpropanoide inhibió el transporte de electrones en un 96% a la concentración de 6.05 μM y la Cl_{50} calculada fue de 2.8 μM .

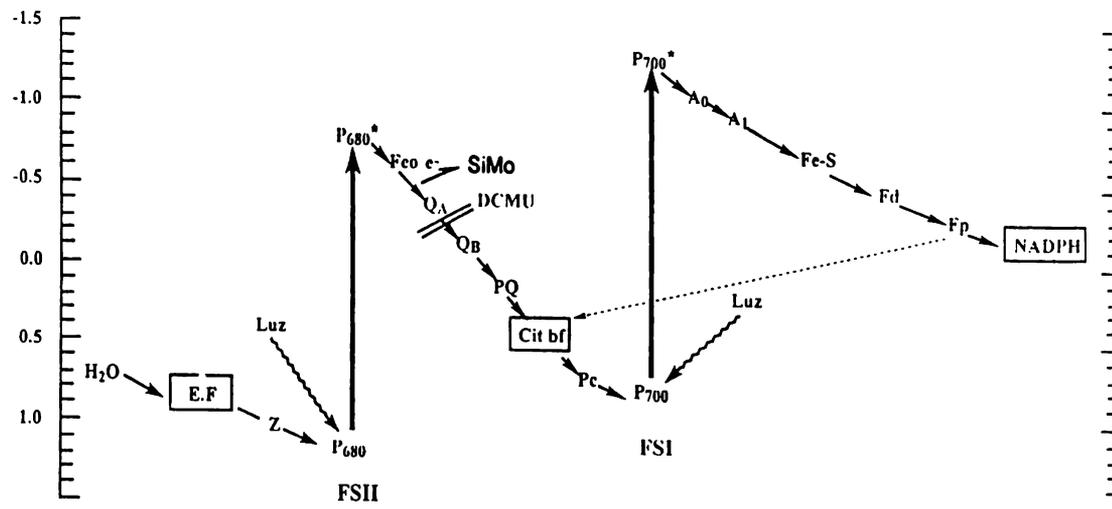


Figura 24. Determinación de electrones desacoplado en el FSII de H_2O a SiMo (FeO)

Finalmente, se determinó la velocidad del transporte de electrones en el intervalo de DPC a $\text{DCPIP}_{\text{reducido}}$. En esta última determinación se adicionó al medio del ensayo tris con la finalidad de impedir la hidrólisis del agua. El DCP actuó como un donador artificial de electrones a nivel de P_{680} y el $\text{DCPIP}_{\text{reducido}}$ con ascorbato actuó como un aceptor final de electrones equivalente al aceptor natural Cit b_6/f (ver Figura 25). A la concentración de 9.8 μM el transporte de electrones se inhibió en un 51% y el valor de Cl_{50} fue de 8.9 μM (Tabla 15).

El transporte de electrones en el FSI se determinó primero sobre la reacción que va de $\text{PMS}_{\text{reducido}}$ a MV. Para este bioensayo se utilizaron cloroplastos tratados con KCN, el cual inhibe la actividad de la plastocianina e inactiva el transporte de electrones del FSII al FSI (Izawa, 1977). El PMS reducido con ascorbato actúa como un donador artificial de electrones a nivel de P_{700} en el FSI y el MV actúa como un aceptor final de electrones (ver Figura 26). El compuesto de prueba se ensayo en un intervalo de concentración de 1 a 5 μM . Como se puede deducir a partir de los resultados resumidos en la Tabla

15, el transporte de electrones en esta parte del FSI no se afectó significativamente por el fenilpropanoide.

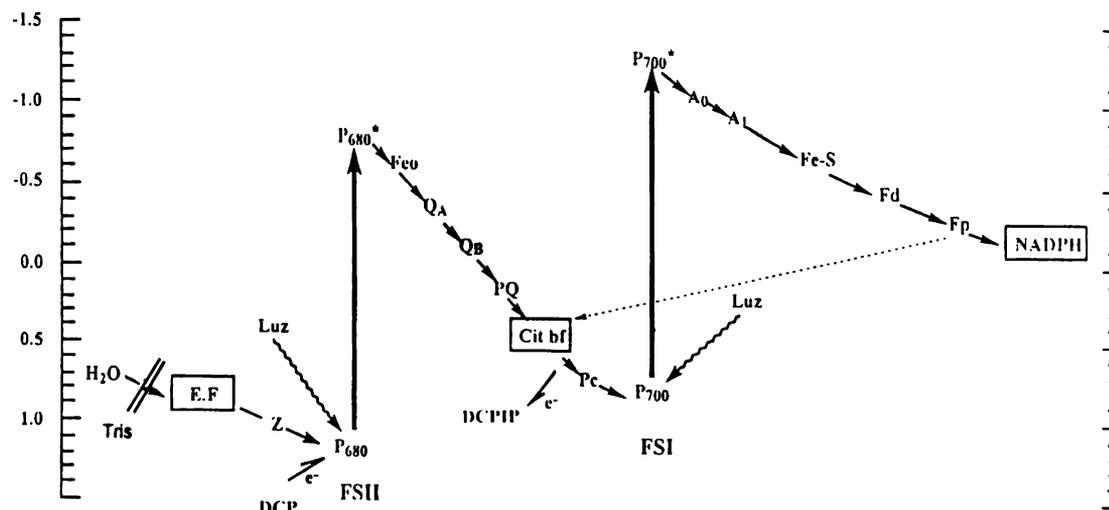


Figura 25. Determinación de electrones desacoplado en el FSII de DCP (H_2O) a DCPIP (Cit b_6/f)

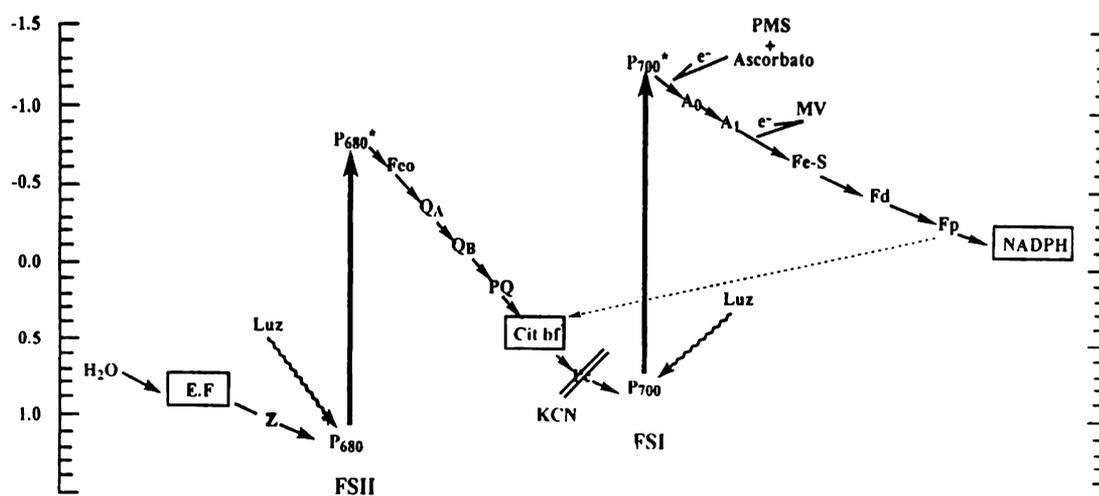


Figura 26. Determinación de electrones desacoplado en el FSI de PMSred (P_{700}) a MV (NADPH).

La segunda reacción parcial del FSI investigada en presencia del producto natural fue de $DCPIP_{reducido}$ a MV. El $DCPIP_{reducido}$ con ascorbato actúa como un donador artificial de electrones a nivel del complejo b_6/f . En este caso, al igual que en la reacción anterior se empleó el MV como un aceptor final de electrones, y el DCMU se adicionó a la mezcla de reacción con la finalidad de inhibir el flujo de electrones del fotosistema II al fotosistema I a nivel de Q_B .

(ver Figura 27). El NH_4Cl se empleó como un agente desacoplante para estudiar el efecto del compuesto sólo en el flujo de electrones del FSI.

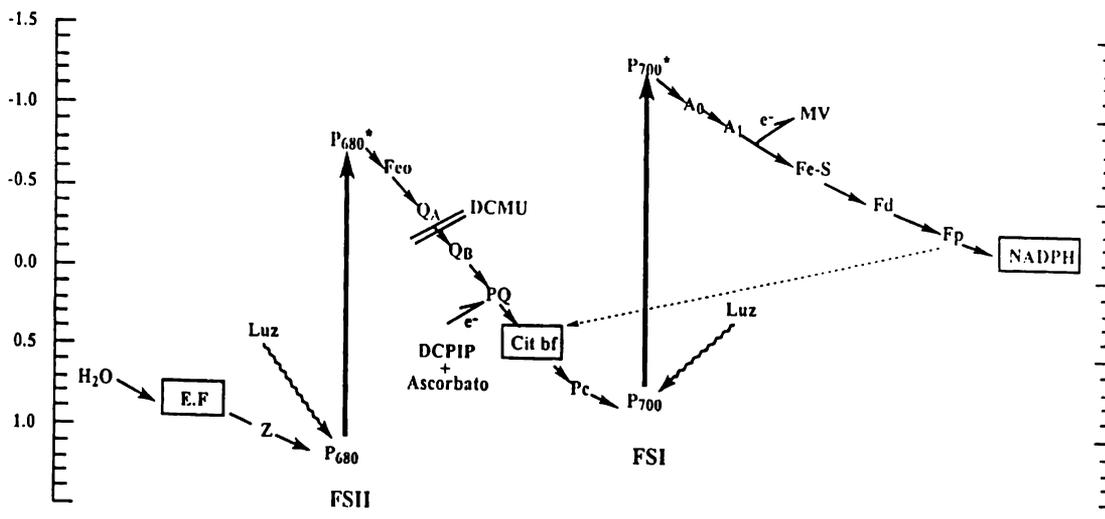


Figura 27. Determinación de electrones desacoplado en el FSI de DCPIP reducido (Cit b_6/f) a MV (NADPH).

Los resultados de los experimentos sobre esta última reacción indicaron que el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno no afectó este transporte de electrones.

El análisis global de los resultados obtenidos sobre las reacciones parciales de los fotosistemas I y II, indican que el fenilpropanoide inhibe en forma significativa las tres reacciones parciales del fotosistema II. Por lo que su sitio de acción se ubica específicamente entre P_{680} y Q_A . El sitio de inhibición del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno, es igual al de algunos compuestos naturales y sintéticos. Dentro de los sintéticos podemos mencionar al DCMU, el cual inhibe en un 50% el transporte de electrones entre P_{680} y Q_A a una concentración de $10 \mu\text{M}$.

La isoalloalantolactona, el piquerol A, el cacalol, la zaluzanina C, la juglona, la ivalina; todos productos naturales, también inhiben el transporte de electrones a este mismo nivel. Sin embargo, ninguno de estos compuestos desarrolla equiparable con la del fenilpropanoide **57**.

Cabe señalar que el producto natural 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno fue aproximadamente 370 veces más activo que los

fenilpropanoides previamente investigados (Einhellig, 1975, 1986, Mersie *et al.*, 1993). Por ejemplo, los ácidos caféico, *p*-cumárico, sinápico y ferúlico reducen la actividad fotosintética en las hojas de soya (*Glicina max*) a una concentración de 1000 μM (1mM); pero en las concentraciones de 100 y 500 μM no afectaron este proceso. En estudios mas recientes, se encontró que los ácidos ferúlico y *p*-cumárico inhiben en un 33 y 37%, respectivamente, la fotosíntesis de *Abutilon theoprasti* a una concentración de 100 μM (Mersie y Singh, 1993).

IV.5. IDENTIFICACIÓN DE LOS CONSTITUYENTES PRESENTES EN LOS ACEITES ESENCIALES DERIVADOS DE LAS HOJAS Y DE LA MADERA DE *M. depressa*.

Considerando, por un lado el nivel de actividad demostrada por el fenilpropanoide **57** como un agente fitotóxico y, por el otro, que los fenilpropanoides son constituyentes de un gran número de esencias, se consideró pertinente demostrar la presencia del compuesto activo **57** en los aceites esenciales preparados a partir de la corteza y de las otras partes vegetales (hojas y madera) de *M. depressa*. De esta forma, se podría proponer *a posteriori* un procedimiento más simple y económico para obtener el compuesto fitotóxico en una posible escala industrial. De manera adicional, al determinar la presencia del compuesto activo en las hojas se contribuiría a la preservación de la especie, en el caso de que el producto natural o sus análogos resultaran apropiados para una futura comercialización.

La composición de los aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor a partir de la madera, hojas y corteza de *M. depressa* se determinó mediante un análisis por cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas (CG-EM) empleando las condiciones descritas en el inciso III.1.1.

Los cromatogramas obtenidos de este análisis indicaron que los aceites esenciales derivados de las diferentes partes vegetales están constituidos por cinco compuestos con diferentes tiempos de retención (Figuras 28-30). En todos

los casos, cuatro de los cinco picos corresponden a los compuestos **57-60** aislados previamente del extracto orgánico de la corteza.

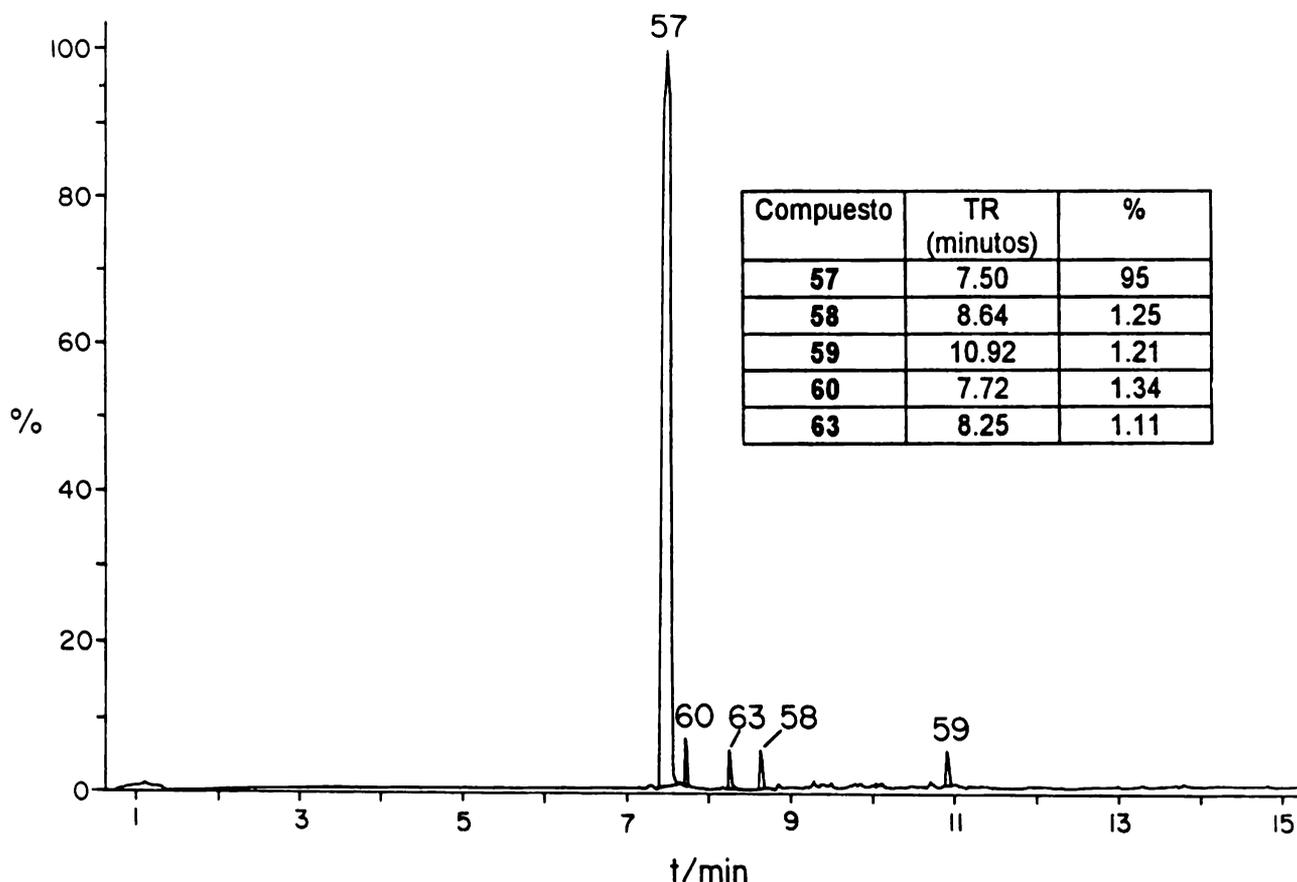


Figura 28. Cromatograma del aceite esencial de la madera de *M. depressa*.

Estos constituyentes fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención, al realizar experimentos de coelución con muestras obtenidas anteriormente del extracto orgánico. Por otro lado, los espectros de masas de los cuatro componentes resultaron idénticos a los de los compuestos **57-60** (ver Tabla 10). El quinto compuesto aparentemente se trata de la *cis*-isomiristicina (**63**) ya que el espectro de masas resulta idéntico al registrado para este compuesto en el banco de datos Public /NIST. Para caracterizar inequívocamente a este producto se requiere aislarlo en forma pura y determinar sus parámetros espectroscópicos.

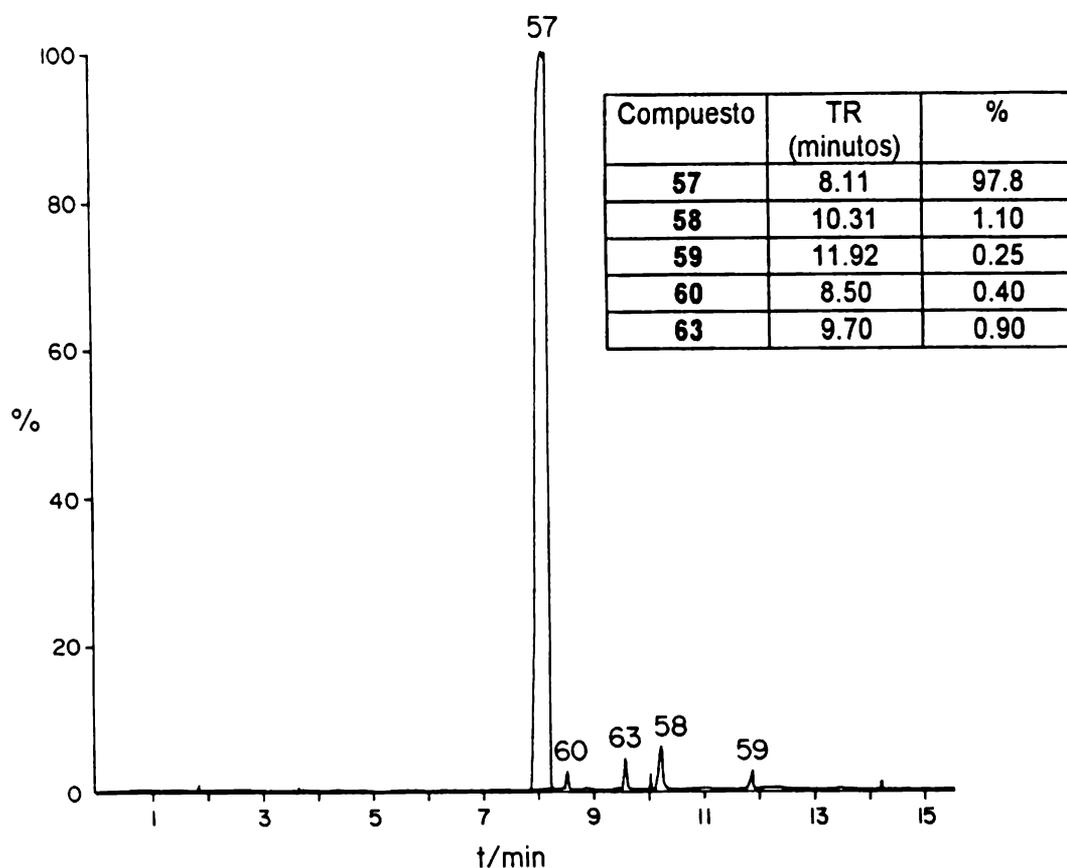


Figura 29. Cromatograma del aceite esencial de la corteza de *M. depressa*

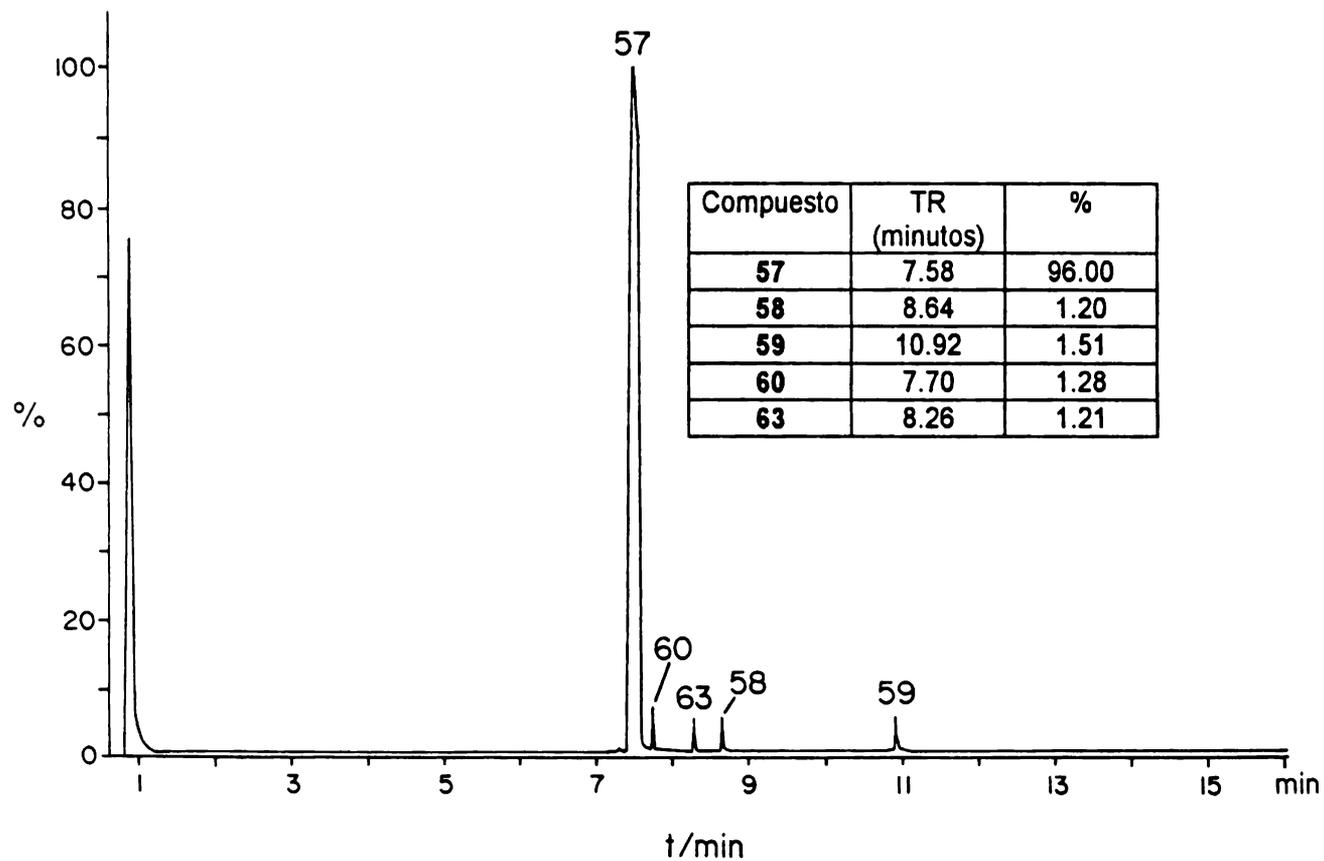


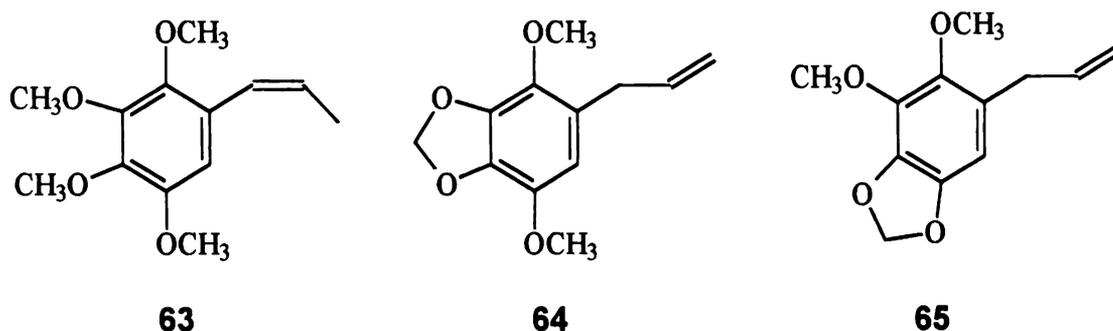
Figura 30. Cromatograma del aceite esencial de las hojas de *M. depressa*

Los espectros 7a y 7b corresponden a los espectros de masas generados por el compuesto de **63**, de origen natural, de tiempo de retención de 8.25 minutos y el registrado para la *cis*-isomiristicina en el banco de datos antes mencionados.

Con relación a la concentración relativa de los constituyentes detectados en los aceites esenciales, el constituyente mayoritario corresponde al fenilpropanoide activo **57**, cuya proporción osciló entre un 94 y un 97.8 %. La concentración de los otros constituyentes fueron comparables en todos los casos (ver Figuras 28-30).

Cabe aclarar que el alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**59**) aislado del extracto orgánico de la corteza no estuvo presente en ninguno de los aceites esenciales analizados (hojas, corteza y madera).

La presencia de compuestos aromáticos tetrametoxilados en las distintas partes vegetales de *M. depressa* podría ser de relevancia quimiotaxonómica, ya que la biosíntesis de compuestos aromáticos simples tetraoxigenados es rara en la naturaleza. A la fecha, sólo se han descrito siete de estos productos naturales [*trans*-isomiristicina (**60**), *cis*-isomiristicina (**63**), alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**61**), aldehído 2,3,4,5-tetrametoxicinámico (**59**), 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**), apiol (**64**) y dilapiol(**65**)] (Lopes et al., 1986).



IV.6. POTENCIAL CITOTÓXICO Y ANTIFÚNGICO DE 1,2,3,4-TETRAMETOXI-5-(2-PROPENIL)BENCENO.

Considerando los resultados de las evaluaciones biológicas demostrados por el 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (**57**) se decidió determinar el efecto citotóxico del compuesto y del extracto clorofórmico de la corteza de *M. depressa* sobre diferentes líneas celulares con la finalidad de conocer la toxicidad o inocuidad del producto sobre los mamíferos. Las líneas celulares empleadas para este bioensayo fueron: el carcinoma mamario (MCF-7), el carcinoma de pulmón (A-549) y el adenocarcinoma de colon (HT-29) y como un control positivo se utilizó la adriamicina. Los resultados de estas evaluaciones se muestran en la Tabla 16 e indican que el fenilpropanoide **57** y el extracto no demostraron un efecto citotóxico significativo sobre las líneas celulares ensayadas ya que las DE₅₀ fueron mayores a 4 y 20 µg/ml, respectivamente.

Tabla 16. Actividad citotóxica del extracto orgánico de la corteza de *M. depressa* y del 1,2,3,4-terametoxi-5-(2-popenil)benceno (**57**).

Línea celular (DE ₅₀ µg/ml)			
Muestra	A-549	MCF-7	HT-29
Extracto orgánico	20.57	20.86	20.46
Compuesto 57	70.80	46.40	29.30
Adriamicina	3 x 10 ⁻²	3 x 10 ⁻¹	7 x 10 ⁻³

*Control positivo. A-549, carcinoma de pulmón; MCF-7, carcinoma mamario HT-29, adenocarcinoma de colon.

Los criterios de actividad previamente establecidos para definir la actividad citotóxica de extractos y compuestos puros indican que un extracto es activo cuando presenta una DE₅₀ < 20 µg/ml; para el caso de compuestos puros la DE₅₀ debe ser < a 4 µg/ml (Anderson *et al.*, 1991).

De manera adicional, se exploró el potencial fungicida del fenilpropanoide sobre las mismas especies de hongos empleados durante el proceso de selección de esta especie. Los resultados de esta evaluación indicaron que el producto natural, al igual que el extracto original, únicamente muestra actividad contra *T. mentagrophytes* (CIM = 500 µg/ml) y contra el fitopatógeno *F. oxysporum* (CIM = 250 µg/ml). Sin embargo, el nivel de actividad detectado no es comparable al de los fungicidas comerciales pero podría ser de utilidad en los mecanismos de defensa de la especie productora.

IV.7. CONCLUSIONES.

Los resultados derivados de la presente investigación confirman una vez más que las observaciones de tipo ecológicas y etnomédicas constituyen criterios importantes para la preselección de materias primas como una fuente potencial de principios herbicidas. La aplicación de estos criterios para la selección de la especie *M. depressa* en conjunto con la implementación de un estudio fitoquímico biodirigido y la realización de ensayos biológicos secundarios apropiados condujeron a demostrar que el compuesto 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno, presente en altos rendimientos en la especie *M. depressa*, constituye un agente fitotóxico capaz de inhibir el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* e interferir con el metabolismo energético vegetal inhibiendo el transporte de electrones fotosintético, en cloroplastos aislados de espinacas, a nivel del fotosistema II en el rango de la cadena transportadora de electrones comprendido entre P₆₈₀ y Q_A. El nivel de actividad demostrado por este compuesto en las distintas evaluaciones biológicas realizadas fue significativo y permite proponer que el producto natural constituye un candidato apropiado para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y menos tóxicos.

La simplicidad en la estructura molecular del producto natural activo permite inferir *a priori* que su síntesis y la de análogos con una mayor potencia no debe implicar una gran dificultad.

Por otro lado, el producto **57** se encuentra en *M. depressa* en altos rendimientos tanto en la corteza como en la madera y las hojas. La presencia del producto natural en las hojas en altos rendimientos es de gran importancia ya que de lograrse una eventual comercialización del producto y de determinarse que la especie vegetal constituye la única fuente para su obtención, no se ocasionaría un daño irreversible a la fuente natural mediante la recolección de la corteza o de la madera del árbol.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN SOBRE EL ESTUDIO DE LOS PRINCIPIOS INSECTICIDAS DE *Swietenia humilis* Zuccarini.

V.1. DETERMINACIÓN DE LA POTENCIALIDAD INSECTICIDA DE *Swietenia humilis*.

La selección primaria de *S. humilis* se realizó considerando como criterio primordial que la mayoría de las especies de la familia Meliaceae biosintetizan metabolitos secundarios de tipo tetranortriterpenoide (criterio quimiotaxonómico), los cuales poseen una potente actividad insecticida entre otras actividades biológicas (Mikolajczak y Reed, 1987; Champagne *et al.*, 1992; Rembold y Puhlman, 1993; Kubo, 1993; Arnason *et al.*, 1993; Segura-Correa *et al.*, 1993; Schmutteter, 1995; Govindachari *et al.*, 1995, 1996; Isman *et al.*, 1996; *inter alia*). Posteriormente, durante la realización de un ensayo biológico preliminar conducente a la determinación de la potencialidad insecticida de los extractos totales derivados de las semillas de la planta, se comprobó que este material vegetal contiene principios activos capaces de inhibir el desarrollo de las larvas del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis*).

Para determinar la actividad insecticida preliminar de los extractos hexánico y clorofórmico derivados de las semillas de *S. humilis* se evaluó el efecto de los mismos sobre la mortalidad de las larvas neonatas (Fase III, entre los días 9 y 13) de *Ostrinia nubilalis*. Para ello, los extractos se incorporaron a la dieta artificial de las larvas del insecto a una concentración del 0.1% al inicio de la fase III (día 9 del desarrollo larvario). Al cabo de esta fase (día 13) se procedió a contar las larvas sobrevivientes para determinar el porcentaje de mortalidad. De acuerdo a los resultados obtenidos, únicamente el extracto clorofórmico afectó significativamente la sobrevivencia de las larvas, ocasionando un 75% de mortalidad con relación al control. Por otro lado, el extracto hexánico ocasionó un porcentaje de mortalidad de las larvas de un 25 % con respecto al control.

V.2. AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO ACTIVO DE LAS SEMILLAS DE *S. humilis*.

Con base en los resultados previamente presentados, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico convencional de las semillas de *S. humilis* con la finalidad de aislar los principios activos. Para preparar el extracto en gran escala, se procedió en primer lugar a desgrasar el material vegetal con hexano. Posteriormente, este material se extrajo con cloroformo mediante un proceso de maceración.

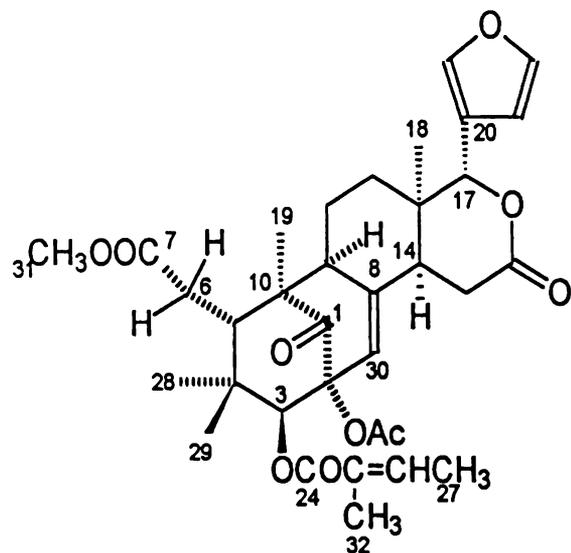
El extracto resultante de las semillas de *S. humilis* se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de tres grupos de fracciones primarias (SI-SIII) [Tabla 4]. El análisis de los espectros de IR de las fracciones primarias permitió detectar que las fracciones II y III contenían compuestos de naturaleza limonoide. En ambos casos, los espectros presentan absorciones típicas para grupos furano, cetona y éster de δ -lactona, entre otros. Estas absorciones son características de los limonoides previamente descritos en el género *Swietenia* (Kadota *et al.*, 1990a, 1990b; Segura-Correa *et al.*, 1993; Okorie y Taylor, 1971). Las fracciones primarias SII y SIII fueron sometidas a diversos procesos cromatográficos incluyendo la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La aplicación de estos procedimientos analíticos permitió el aislamiento de once limonoides del tipo mexicanólida, dos de los cuales representan nuevos productos naturales y se denominaron con los nombres triviales de humilinólidas E (**55**) y F (**56**). Los restantes productos aislados y caracterizados incluyen: el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**); el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (**25b**); las humilinólidas A (**26**), B (**27**), C (**28**) y D (**29**); la humilina B (**30**); la swietemahonina C (**36**) y la swietenina C (**44**). Los dos últimos constituyen nuevos metabolitos secundarios para la especie; en tanto que las humilinólidas A-D (**26-29**), la humilina B (**30**), el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**) y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (**25b**) habían sido previamente aislados de las

semillas de *S. humilis* (Okorie y Taylor, 1971; Segura-Correa *et al.*, 1993). Cabe destacar que los productos **25a** y **25b** fueron inicialmente aislados en mezcla (Okorie y Taylor, 1971) y en esa oportunidad los investigadores propusieron tentativamente la estructura molecular de los dos compuestos con base en el análisis de los espectros de masas y RMN-¹H de la mezcla. En la Figura 31 se muestran las estructuras de los productos aislados y en la Tabla 17 se resumen sus rendimientos.

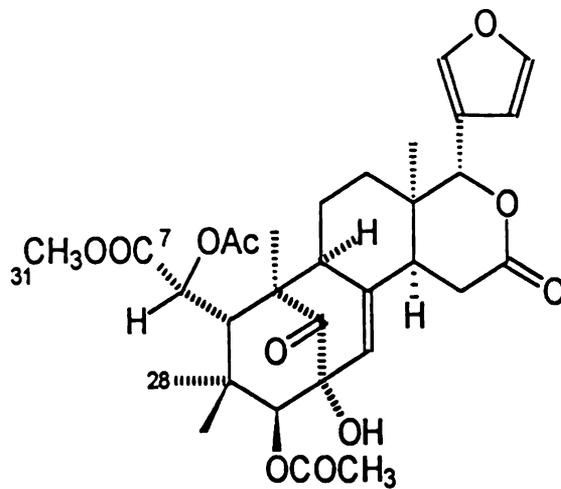
Tabla 17. Metabolitos secundarios aislados de las semillas de *S. humilis*

Nombre	Fracción	Rendimiento (%)*
humilinólida A (26)	SIII	0.290
humilinólida B (27)	SII	0.045
humilinólida C (28)	SII	0.290
humilinólida D (29)	SIII	0.054
humilina B (30)	SIII	0.021
swietamahonina C (36)	SIII	0.076
swietenina C (44)	SIII	0.036
metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato 3-isobutirato (25a)	SIII	0.032
metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato 3-tiglato (25b)	SIII	0.047
humilinólida E (55)	SIII	0.029
humilinólida F (56)	SIII	0.036

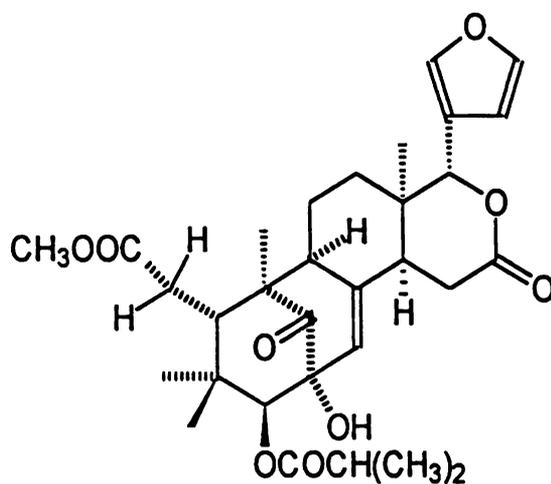
*el rendimiento se expresa en porcentaje con respecto al peso total del material vegetal seco.



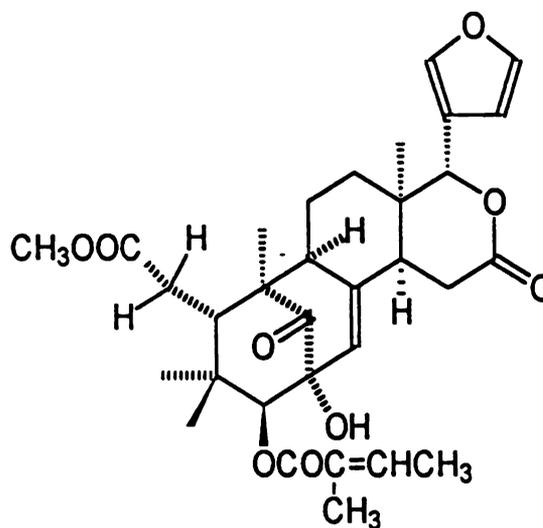
humilinólida C (28)



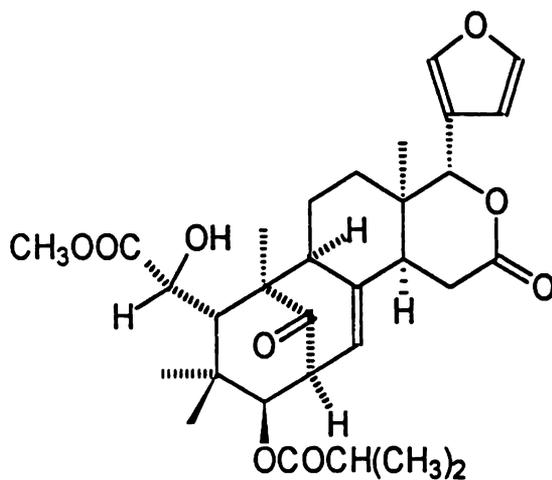
humilinólida D (29)



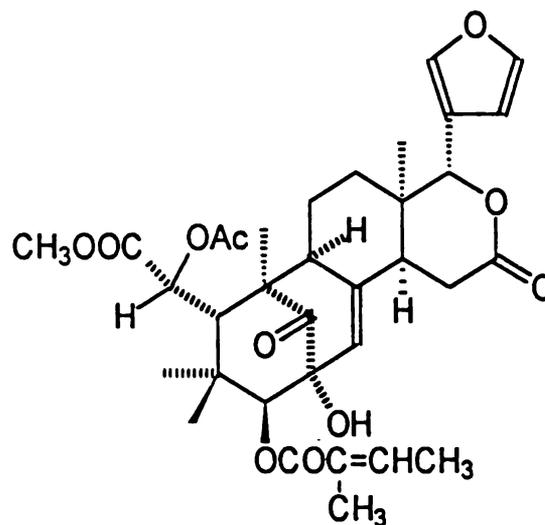
metil-2,3-dihidroxi-meliac-
8(30)-enato-3-isobutirato (25a)



metil-2,3-dihidroxi-meliac-
8(30)-enato-3-tiglato (25b)

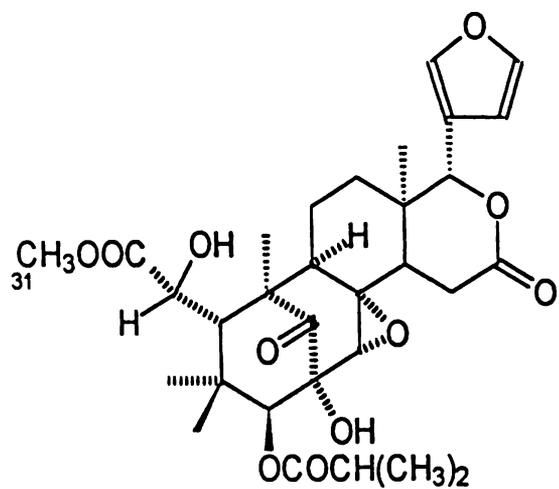


swietenina C (44)

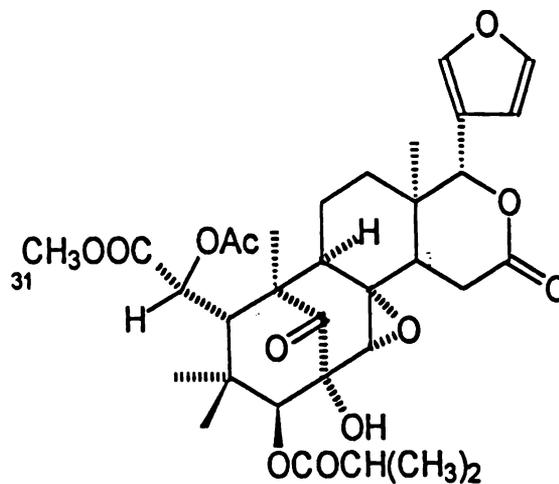


humilinólida E (55)

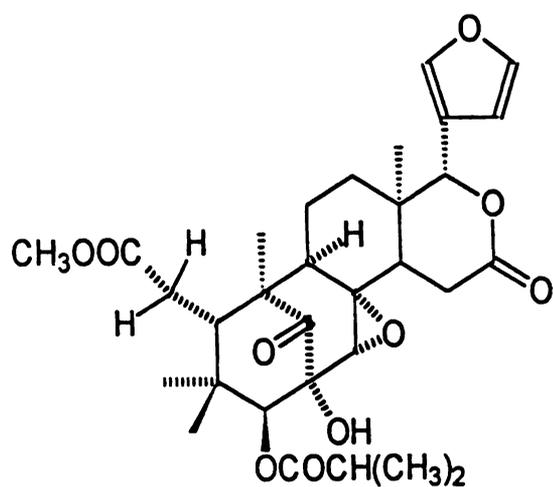
Figura 31. Estructura de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis*.



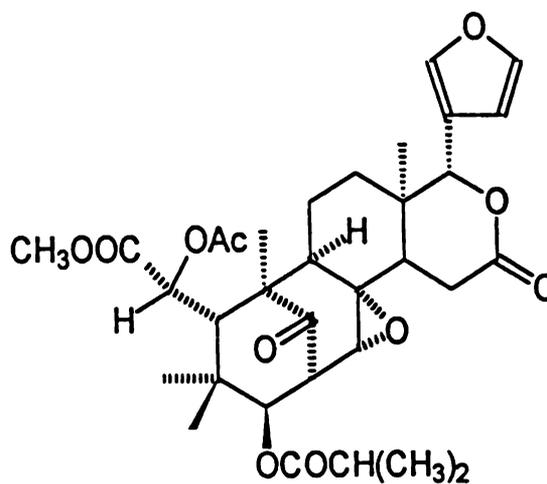
humilinólida A (26)



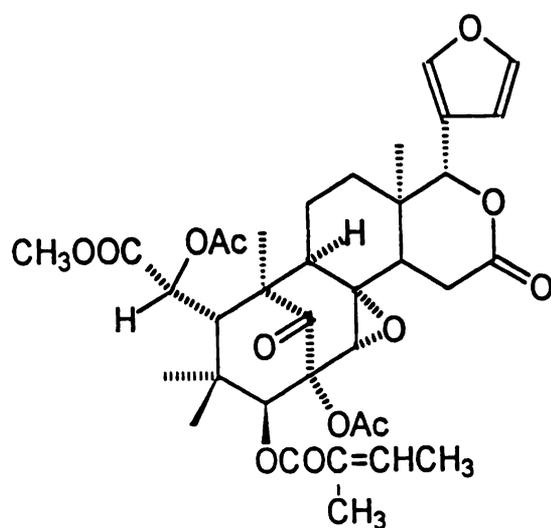
humilinólida B (27)



humilina B (30)



swietemahonina C (36)



humilinólida F (56)

Figura 31. Estructura de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis*.
(Continuación).

V.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MEXICANÓLIDAS OBTENIDAS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS SEMILLAS DE *S. humilis*.

La identificación de las humilinólidas A-D (**26-29**) se realizó por comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con aquellas de muestras auténticas; la humilina B (**30**), la swietemahonina C (**36**) y la swietenina C (**44**) se identificaron mediante la comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las previamente descritas en la literatura (Kadota *et al.*, 1990a, 1990b). En el caso de los compuestos **25a**, **25b**, **55** y **56**, su caracterización se realizó mediante la interpretación cuidadosa y detallada de sus espectros de IR, RMN y EM. Para los compuestos **25a**, y **25b**, ésta investigación constituye la primera, que describe en forma precisa y completa sus constantes espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de IR, EM, RMN de las humilinólidas A-D (**26-29**), de la humilina B (**30**), de la swietemahonina C (**36**) y de la swietenina C (**44**), así como de los compuestos **25a**, **25b**, **55** y **56** se presentan en el Apéndice I. Por último, cabe destacar que las estructuras de los compuestos **29** y **36** se confirmaron de manera inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X. En las Figuras 32 y 33 se muestra una vista estereoscópica de estos dos últimos compuestos.

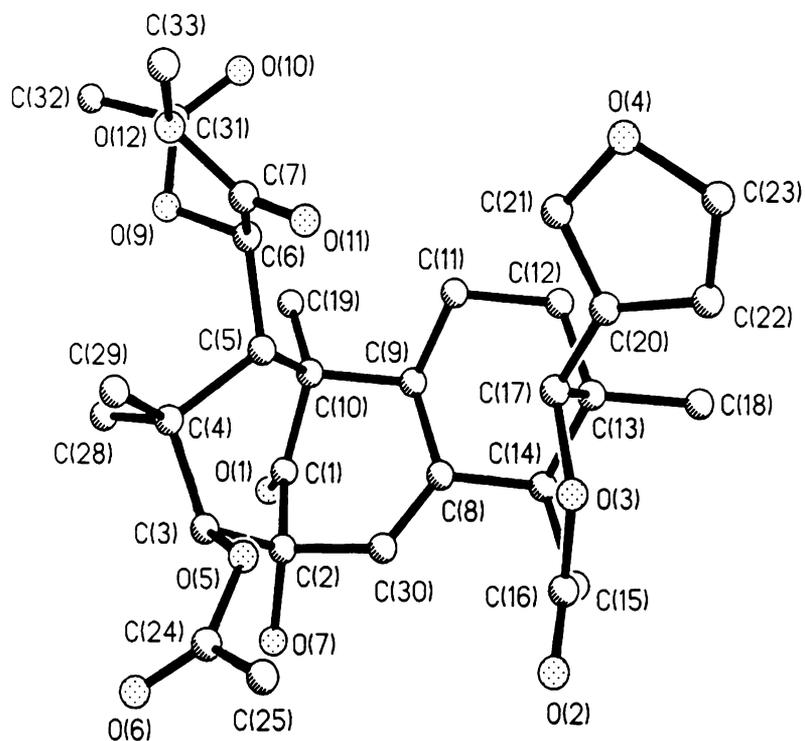


Figura 32. Vista estereoscópica de la humilinólida D (**29**).

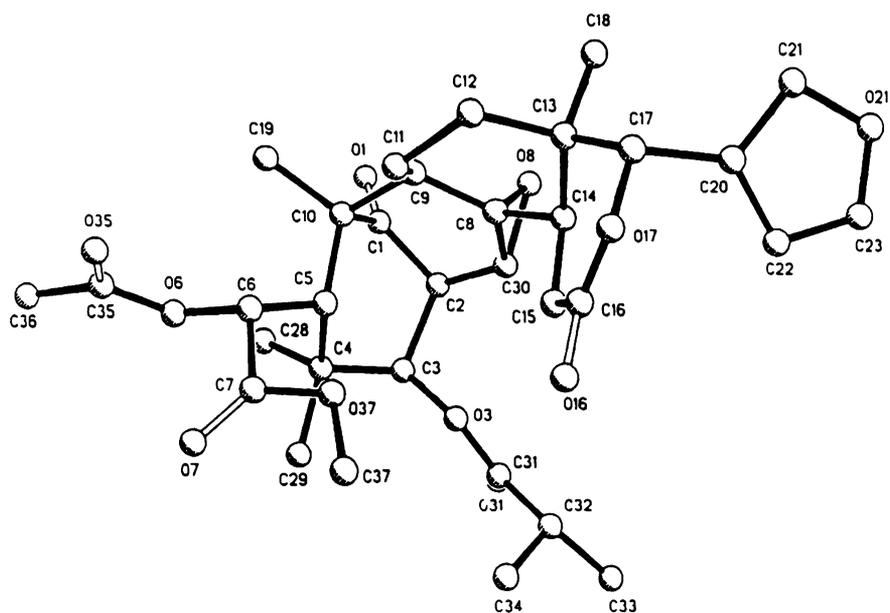


Figura 33. Vista estereoscópica de la swietemahonina C (**36**).

V.3.1. IDENTIFICACIÓN DE LA HUMILINÓLIDA E (**55**), EL METIL-2,3-DIHIDROXI-MELIAC-8(30)-ENATO-3-ISOBUTIRATO (**25a**) Y EL METIL-2,3-DIHIDROXI-MELIAC-8(30)-ENATO-3-TIGLATO (**25b**).

Las mexicanólidas aisladas de *S. humilis* en la presente investigación se clasifican en dos grupos: (1) aquellas que presentan una doble ligadura entre los carbonos C-8 y C-30 y (2) las que presentan una función epóxido en las mismas posiciones. Evidentemente, ambos grupos presentan características espectroscópicas y espectrométricas comunes (Tabla 18-21), distinguiéndose el uno del otro fácilmente por la presencia en sus espectros de IR y RMN de las absorciones relacionadas con la función olefínica trisubstituida ó epoxídica, según sea el caso (Kadota *et al.*, 190a, 1990b; Segura-Correa *et al.*, 1993; Mikolajczak y Reed, 1988).

En primer lugar, se discutirá la elucidación estructural de la humilinólida E (**55**) y de los compuestos **25a** y **25b**, los cuales presentan como característica común una doble ligadura entre los carbonos C-8 y C-30 y un grupo hidroxilo en el carbono C-2 del núcleo base.

Los espectros en el IR (Espectros 36, 42, 48; Apéndice I) de los tres compuestos (**25a**, **25b** y **55**) presentan absorciones asociadas con la presencia de grupos carbonilos de cetona (ν_{\max} 1710 cm^{-1}), lactona y éster (ν_{\max} ~ 1735 cm^{-1}), y grupos hidroxilo (ν_{\max} 3450-3430 y 1230-1215 cm^{-1}), vinílico (ν_{\max} ~ 1640 cm^{-1}) y furano (ν_{\max} 1440-1430, 780-760 cm^{-1}).

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico de los compuestos **25a**, **25b** y **55** (Espectros 37, 43, 49; Apéndice I) presentan iones moleculares en una relación de masa carga (m/z) de 556, 568 y 626 uma, respectivamente. Estos iones moleculares corresponden a las fórmulas moleculares $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_9$, $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_9$ y $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_{11}$, respectivamente.

La comparación de los espectros de RMN (Tablas 18 y 19, Espectros 38, 39, 44, 45, 50, 51; Apéndice I) de estos tres productos con los de las humilinólidas C (**28**) y D (**29**) y la swietenina C (**44**) confirman la presencia de un núcleo mexicanólida del tipo metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato en sus

estructuras. En todos los casos, los espectros de RMN presentaron las siguientes señales diagnósticas:

- a) Tres multipletes en $\delta_H \sim 6.10$, ~ 7.5 y ~ 7.8 , asignables a los hidrógenos (H-21-H-23) del anillo de furano ubicado en la posición C-17 del núcleo base (ver Tabla 18). En el espectro de RMN- ^{13}C , las señales para este grupo funcional se observan en $\delta_C \sim 109$ (C-22), ~ 140 (C-21), ~ 120 (C-20) y ~ 143 (C-23).
- b) Un singulete en el intervalo de $\delta_H 5.55 - 5.74$, atribuible al hidrógeno base de la función lactónica del anillo D-seco (H-17) [Kadota *et al.*, 1990a]. Las absorciones correspondientes a los grupos carbonilo y oximetino de esta unidad se observan en los espectros de RMN- ^{13}C entre $\delta_C 78-79$ (C-17) y $\delta_C 169-171$ (C-16), respectivamente.
- c) Una absorción vinílica en $\delta_H 5.3$ correspondiente a la doble ligadura trisustituida ubicada entre C-8 y C-30. Cabe hacer notar que la multiplicidad de esta señal es diagnóstica para establecer la presencia o ausencia de un sustituyente en la posición C-2 del núcleo mexicanólida. Cuando en C-2 existe un sustituyente como en caso de los compuestos **25a**, **25b** y **55** esta señal se observa como un triplete ($J_{30-14} = J_{30-9} = 1.8$ Hz) debido al acoplamiento alílico de H-30 con H-9 y H-14. Cuando en C-2 no existe sustituyente (caso del compuesto **44**) la señal se observa como un doblete tripleteado ($J_{2-30} = 7.2$ Hz, $J_{2-8} = 1.8$ Hz) debido al acoplamiento de H-30 con H-2, H-9 y H-14 (Kadota *et al.*, 1990a, 1990b, Segura-Correa *et al.*, 1993).

En el espectro de Carbono-13 las señales para los carbonos de la doble ligadura aparecen alrededor de $\delta_C 137$ (C-8) y $\delta_C 129$ (C-30).

- d) Un singulete en el intervalo entre $\delta_H 4.78$ y 5.65 asignable al oximetino en C-3. La mayoría de las mexicanólidas presentan en esta posición una función éster de diferente naturaleza (Champagne *et al.*, 1992; Mikolajczak *et al.*, 1988; Vanucci *et al.*, 1992). La multiplicidad de esta señal dependerá también de la presencia o ausencia de un sustituyente en C-2. En los tres casos que se discuten, esta señal aparece como un singulete, lo cual corrobora que en C-2

existe un sustituyente. El carbono correspondiente absorbe en el espectro de RMN-¹³C entre $\delta_c \sim 79$ y ~ 85 .

- e) Una señal simple centrada en δ_H 3.71 correspondiente al metoxilo de la función carboximetilo que se encuentra presente en todas las mexicanólidas (H-31). La señal del carbonilo de esta función absorbe en $\delta_c \sim 173$, en tanto que el metilo lo hace en $\delta_c \sim 52$ (C-31).
- f) Una señal atribuible a un carbono cuaternario unido a una función oxigenada alrededor de δ_c 77 en los espectros de RMN-¹³C (Tabla 19). Esta señal es característica para el C-2 de las mexicanólidas y su desplazamiento químico depende de la naturaleza del sustituyente oxigenado. En el caso específico de los compuestos **25a**, **25b** y **55** el desplazamiento químico observado ($\delta_c \sim 77$) es congruente con la presencia de un grupo hidróxilo en esta posición (C-2).
- g) Por último, en la zona comprendida entre δ_H 0.76 y 1.44 y δ_c 15 y 29 se observan cuatro señales para cuatro metilos alifático unidos a centros cuaternarios (Tabla 18).

En el caso del compuesto **55** los espectros de RMN, además de las señales antes mencionadas presentan absorciones asociadas con la presencia de un residuo tigloilo, un acetilo y de una función oxigenada unida a un carbono secundario. Las señales correspondientes al residuo tigloilo se encuentran en δ_H 6.91 (H-26, qq), 1.74 (H-27, d) y 1.82 (H-32, s) en el espectro de RMN-¹H (Espectro 50); y en δ_c 167.08 (C-24), 127.53 (C-25), 139.71 (C-26), 14.62 (C-27) y 11.82 (C-32) en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 51). Las del grupo acetilo se observan en δ_H 2.19 (6-COMe) y δ_c 168.28 (6-COMe) y 20.93 (6-COMe). Por último, las del oximetino se detectan en δ_c 72.47 (C-6) y en δ_H 5.57 (H-6); esta última señal se observa en el Espectro de RMN-¹H como un singulete.

Tabla 18. Datos de RMN-¹H para los compuestos 25a, 25b, 28, 29, 44 y 55.

Protón	25a	25b	28	29	44	55
H-2	4.10 s (OH)	4.10 s (OH)	-	4.10 s (OH)	3.49 ddd (9.6, 1.5)	4.10 (OH)
H-3	4.89 s	4.80 s	5.65 s	4.75 s	4.61 d (9.6)	4.78 s
H-5	3.33 dd (4.2, 9.5)	3.39 dd (3.6, 8.1)	3.36 dd (8.8, 3)	3.29 dd (3.9, 8.1)	3.43 s	3.62 s
H-6	2.37 dd (16, 2.5)	2.38 dd (17, 2.5)	2.37 dd (15.6, 2)	5.73 s	4.55 s	5.57 s
	2.18 dd (16, 9.5)	2.41 dd (17, 9)	2.40 dd (15.6, 9)			
H-9	2.33 m	2.30 m	2.30 m	2.28 m	2.31 m	2.25 ddd (13.8, 3.8, 1.5)
H-17	5.68 s	5.60 s	5.68 s	5.74 s	5.60 s	5.56 s
H-18	1.23 s	1.10 s	0.98 s	1.10 s	1.00 s	1.05 s
H-19	1.11 s	1.24 s	1.20 s	1.19 s	1.44 s	1.27 s
H-21	7.8 dd (1.8, 1.1)	7.80 dd (1.8, 0.9)	7.80 dd (1.8, 0.8)	7.80 dd (1.8, 0.8)	7.53 dd (1.8, 1.0)	7.71 dd (0.9, 1.9)
H-22	6.47 dd (1.8, 1.1)	6.48 dd (1.8, 0.9)	6.45 dd (1.8, 0.8)	6.47 dd (1.8, 0.8)	6.37 dd (1.8, 1.0)	6.45 dd (0.9, 1.9)
H-23	7.42 t (1.8)	7.43 t (1.8)	7.40 t (1.8)	7.42 t (1.8)	7.43 t (1.8)	7.44 t (1.9)
H-25	2.67 sept (7)	-	-	-	2.62 sept	-
H-26	1.20 d (7)	6.81 qq (1.5, 7.2)	6.90 qq (7, 1.5)	-	1.16 d (7)	6.91 qq (7, 1.5)
H-27	1.18 d (7)	1.75 d (7.2)	1.77 d (7)	-	1.17 d (7)	1.74 d (7)
H-28	0.81 s	0.80 s	1.08 s	0.92 s	1.11 s	1.00 s
H-29	0.76 s	0.84 s	0.73 s	0.89 s	0.87 s	0.95 s
H-30	5.38 t (1.8)	5.35 t (1.8)	5.35 t (1.8)	5.38 t (1.8)	5.37dt (7.2, 1.5)	5.32 t (1.5)
H-31	3.71 s	3.72 s	3.69 s	3.74 s	3.74 s	3.73 s
H-32	-	1.85 s	1.81 s	-	-	1.82 s
2-COMe	-	-	-	-	-	-
6-COMe	-	-	-	2.19 s	-	2.19 s
3-COMe	-	-	-	2.20 s	-	-

Los desplazamientos químicos están expresados en ppm, referidos al TMS y las constantes de acoplamiento (en parentesis) en Hz. Las asignaciones se realizaron por una combinación de los experimentos COSY y HETCOR.

Tabla 19. Datos de RMN-¹³C para los compuestos 25a, 25b, 28, 29, 44 y 55.

Carbón	25a	25b	28	29	44	55
C-1	215.00	215.03	208.02	213.80	216.50	213.95
C-2	76.90	76.53	85.09	77.42	48.82	77.39
C-3	84.56	84.87	79.22	85.52	78.90	85.64
C-4	39.44	39.47	40.48	39.39	39.07	39.84
C-5	41.44	41.38	41.37	44.81	45.53	44.95
C-6	32.67	32.64	32.62	72.37	72.78	72.47
C-7	173.76	173.85	173.82	170.89	175.94	171.02
C-8	136.57	136.79	137.52	136.25	138.17	136.69
C-9	56.63	56.69	56.41	56.91	57.43	57.34
C-10	49.41	49.31	50.21	49.55	50.39	49.50
C-11	20.46	20.53	20.42	20.34	21.20	21.05
C-12	34.39	34.40	34.27	34.18	34.58	34.40
C-13	36.83	36.92	35.85	36.50	36.61	36.74
C-14	45.01	44.98	45.09	44.81	45.13	44.64
C-15	29.81	29.63	29.66	29.87	29.72	29.51
C-16	169.05	168.56	168.77	170.47	169.14	169.66
C-17	76.90	76.53	76.82	76.58	78.38	77.18
C-18	21.85	21.63	21.72	20.71	21.45	21.43
C-19	15.67	15.73	15.62	15.53	16.41	15.54
C-20	120.61	120.70	120.57	120.63	121.19	120.82
C-21	141.95	141.92	141.86	141.24	140.54	141.31
C-22	109.72	109.69	109.58	109.43	109.23	109.44
C-23	142.97	143.03	142.94	142.98	143.15	143.18
C-24	176.58	167.36	166.49	-	174.19	167.08
C-25	34.00	127.50	127.28	-	33.87	127.53
C-26	19.11	139.86	139.59	-	18.44	139.71
C-27	18.56	14.65	14.61	-	18.87	14.62
C-28	19.85	22.06	21.49	22.04	22.99	22.34
C-29	21.85	19.70	22.10	21.78	22.74	22.06
C-30	129.00	129.13	125.52	129.24	123.41	129.40
C-31	52.24	52.24	52.17	53.27	53.34	53.25
C-32	-	11.92	11.95	-	-	11.82
2-COMe	-	-	169.05	-	-	-
2-COMe	-	-	20.68	-	-	-
6-COMe	-	-	-	169.5	-	168.28
6-COMe	-	-	-	20.93	-	20.93
3-COMe	-	-	-	169.00	-	-
3-COMe	-	-	-	22.04	-	-

Los desplazamientos químicos están expresados en ppm. Las asignaciones se comprobaron por el experimento DEPT y por comparación de los desplazamientos con los modelos descritos en la literatura.

La ubicación relativa de estas unidades estructurales se realizó con base en el análisis de las correlaciones observadas para los oximetinos en δ_H 4.78 (H-3) y 5.57 (H-6) en los espectros de correlación homonuclear (COSY) y heteronuclear (HMBC).

De tal forma que las correlaciones detectadas en el espectro HMBC (Figura 34 y 35) entre el oximetino en δ_H 5.57 (H-6) y las señales asignables a C-5 (δ_C 44.95), al carbonilo de la función carboximetilo [δ_C 172.02 (C-7)] y al carbonilo de la función acetoxi [δ_C 168.28 (6-COMe)] permiten ubicar al residuo acetoxi en la posición C-6. De manera adicional, la señal correspondiente al hidrógeno H-5 (δ_H 3.62) correlacionó en el espectro COSY (Figura 36) con el oximetino en δ_H 5.57, confirmando así la asignación de este último como H-6 y, en consecuencia la ubicación del residuo acetoxi en C-6.

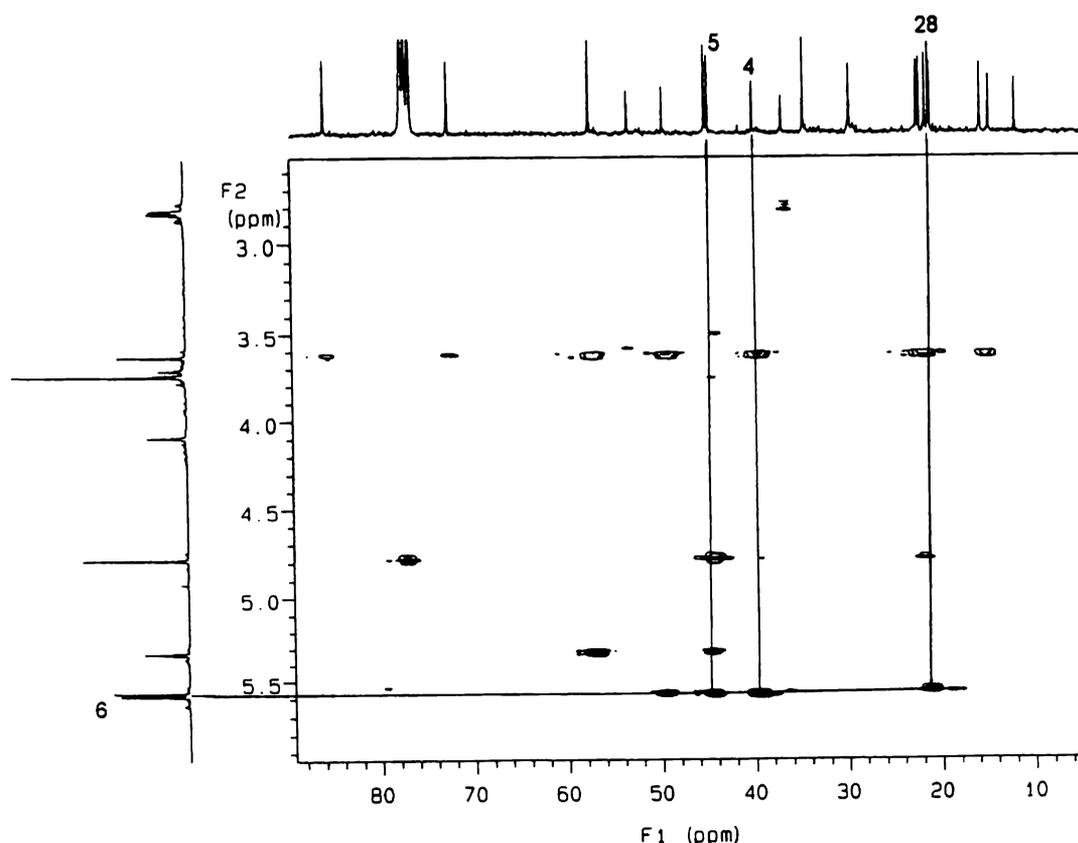


Figura 34. Correlaciones de H-6 con C-5, C-4 y C-28 en el Espectro de HMBC (500, MHz, $CHCl_3-d$) de la humilinólida E (**55**).

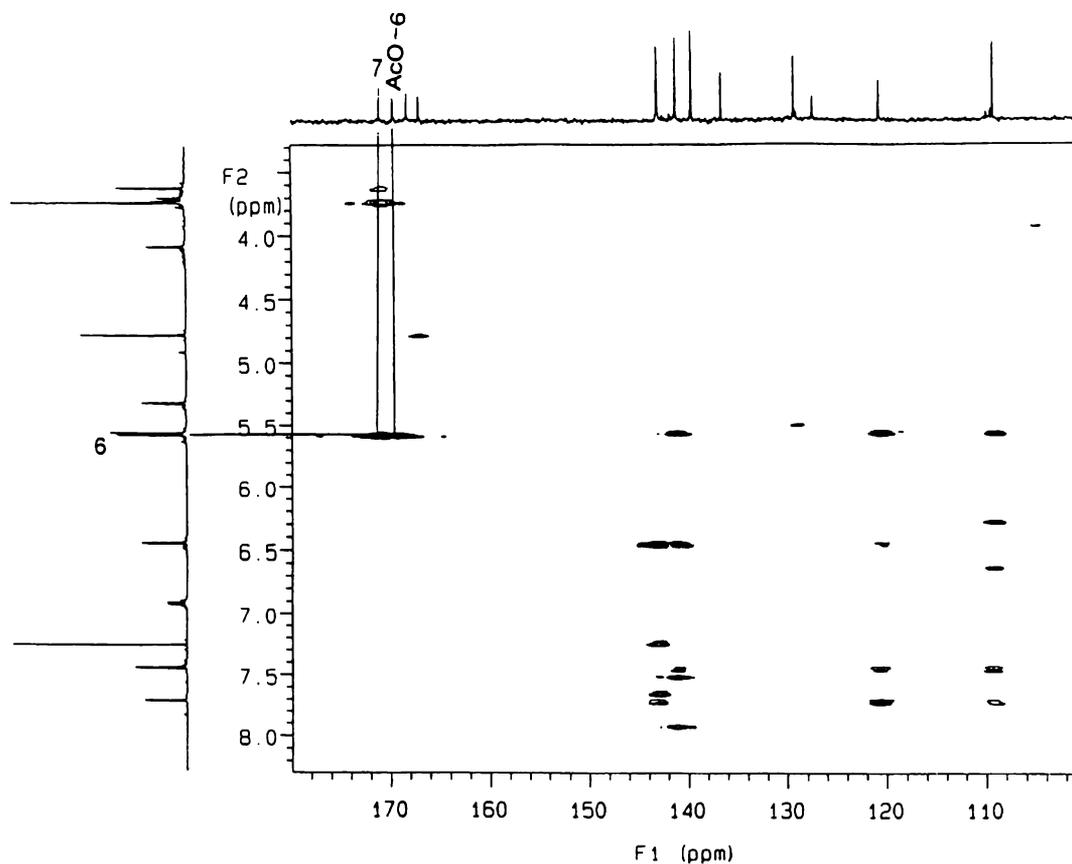


Figura 35. Correlaciones de H-6 con el carbonilo C-7 y con el carbonilo de la función acetoxi en C-6 en el Espectro de HMBC (500, MHz, CHCl₃-d)

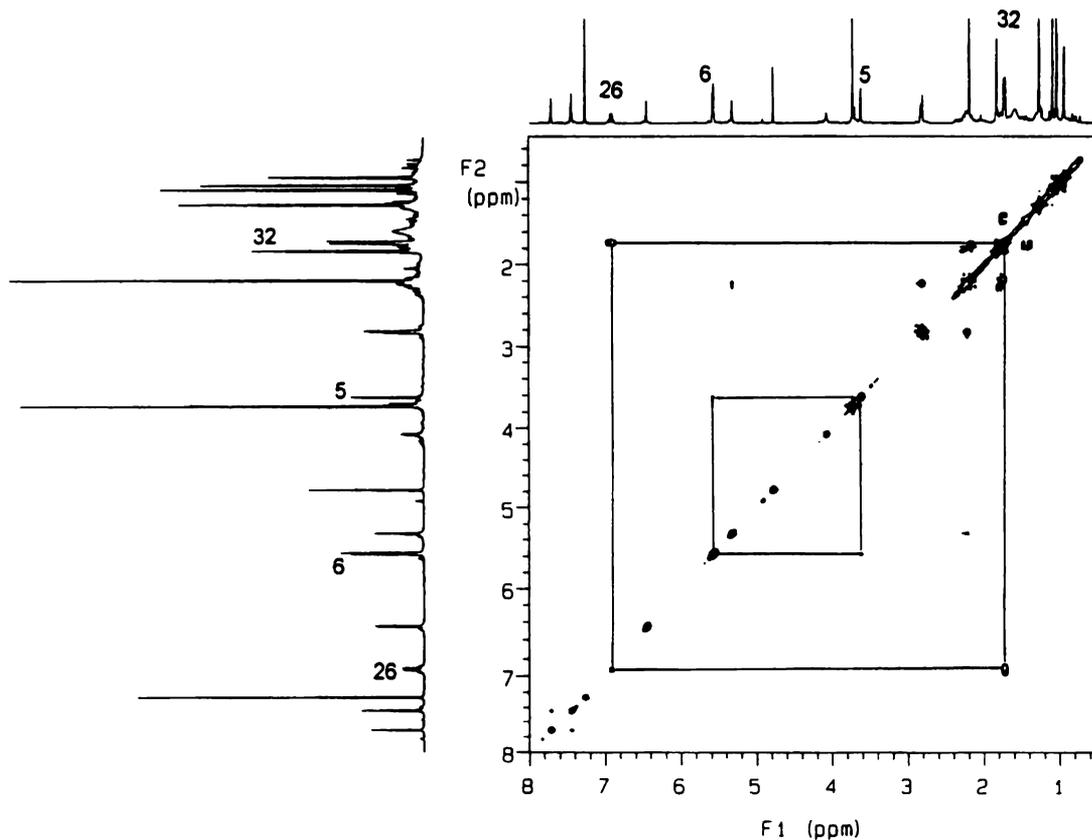


Figura 36. Correlación homonuclear de los protones H-5 y H-6; H-26 y H-32 en el Espectro COSY de la humilínólida E (55).

Por otro lado, las interacciones detectadas en el Espectro HMBC entre el oximetino en δ_H 4.78 (H-3) y los carbonos δ_C 22.34 (C-28), δ_C 22.06 (C-29) y δ_C 167.08 (C-24) confirman la ubicación del residuo tigloiloxi en C-3 (Figura 34, 35 y 37).

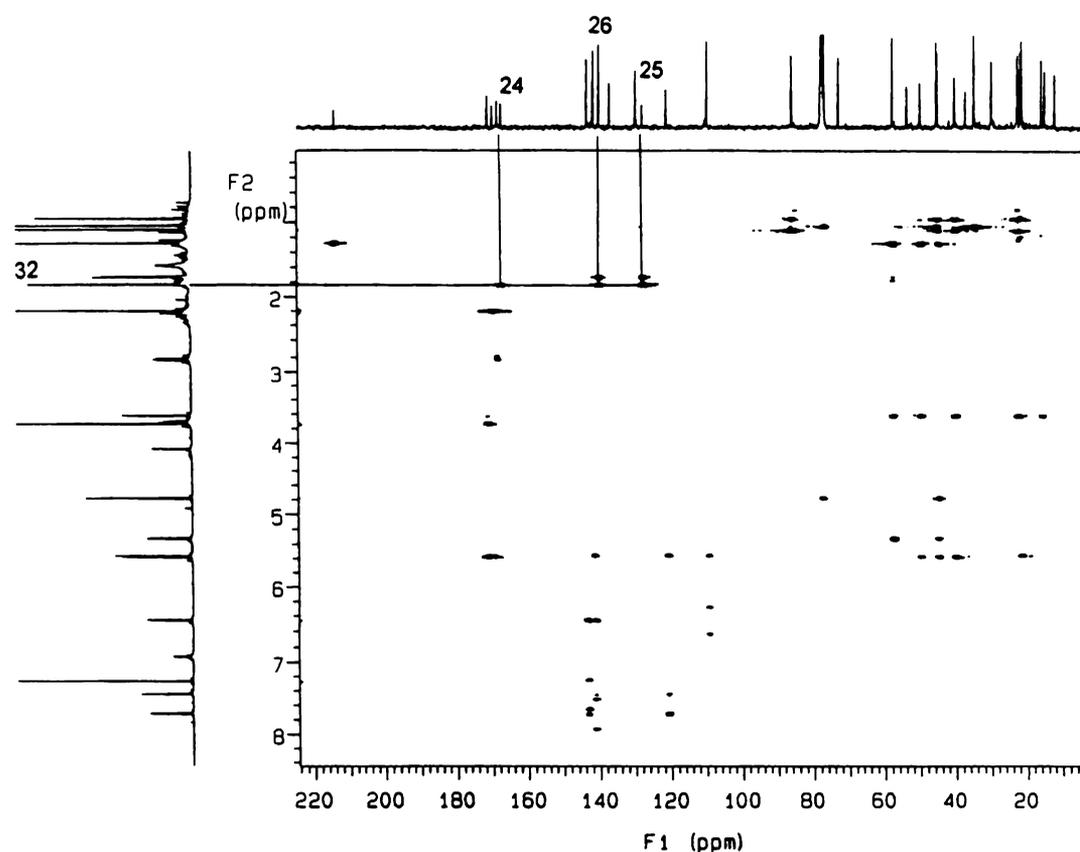
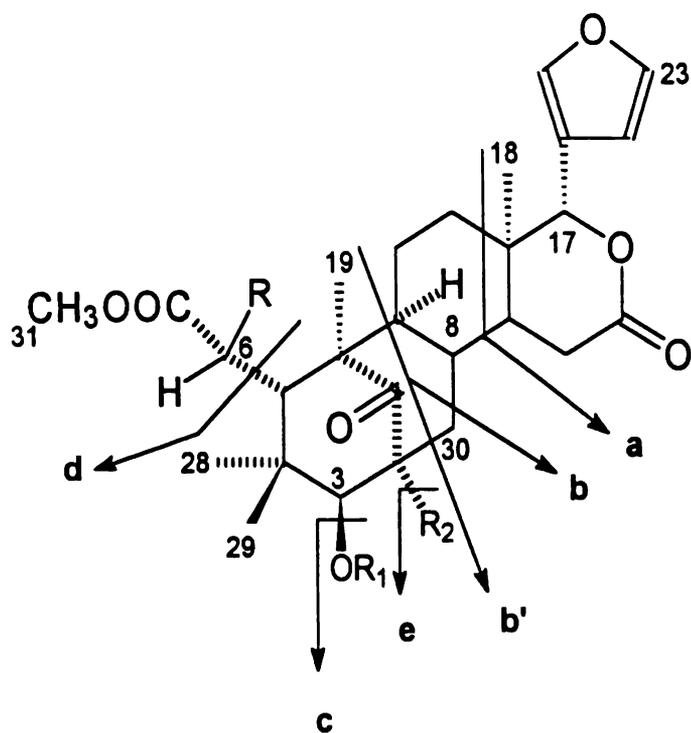


Figura 37. Correlación del proton H-32 con el carbonilo C-24 y con los carbonos C-25 y C-26 en el Espectro de HMBC (500 MHz, CHCl_3-d) de la humilínolida E (**55**).

Los fragmentos con una relación m/z de 527, 526, 495 y 494 observados en el espectro de masas del producto **55** (Espectro 49; Apéndice I) confirman también la ubicación de los grupos tigloiloxi y acetoxi en C-3 y C-6, respectivamente. Estos fragmentos se generan a partir del ion molecular debido a las rupturas $c, c + H$, $d, d + H$, respectivamente, que se ilustran en la Figura 38.



fragmento	<i>m/z</i>	residuo
a	138	
b	231	$\Delta^{8,39}$
	247	epóxido ^{8,30}
b'	244	$\Delta^{8,39}$
	260	epóxido ^{8,30}
c	99	R ₁ = tigloil
	87	R ₁ = isobutiril
	58	R ₁ = OAc
d	131	R = OAc
	89	R = OH
	73	R = H
e	17	R ₂ = OH
	59	R ₂ = OAc

Figura 38. Fragmentación característica de los limonoides con núcleo mexicanólida (Kadota *et al.*, 1990a, 1990b).

La estereoquímica relativa de la molécula se determinó con base en las constantes de acoplamiento observados para cada protón y mediante el análisis de los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY (Figura 39).

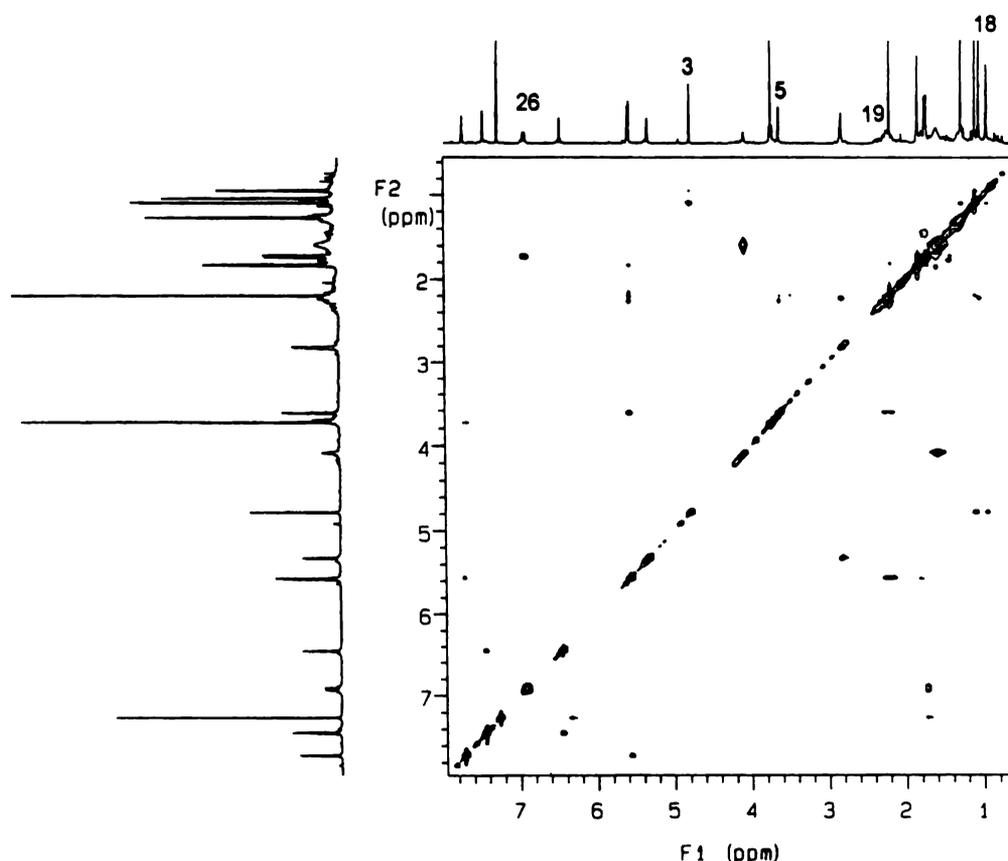


Figura 39. Correlación homonuclear de H-3/H-29, H-28; H-5/H-3, H-6; H-19/H-6; H-18/H-14, H-21; H-26/H-29, H-6, H-5 y H-32 en el Espectro NOESY de la humilínolida E (**55**).

Las interacciones más importantes detectadas en el espectro son las siguientes: H-3/H-29, H-28 y H-5; H-5/H-3, H-6; H-19/H-9, H-6; H-18/H-14, H-21; H-26/H-29, H-6, H-5 y H-32.

Las interacciones de H-29 con H-5 y H-26 son congruentes con la orientación β del metilo axial en C-4 (C-29), del residuo tigloiloxi y de H-5. Por otro lado, la interacción H-19 / H-9 es consistente con la disposición α del

metilo en C-10 y de H-9. Por último, las interacciones de los hidrógenos del grupo metilo en C-3 con H-21 y H-14 indican la disposición α del furano en C-17 y del hidrógeno H-14. La estereoquímica absoluta de este producto se comprobó que era la misma que la swietenina (McPhail y Sim, 1964), con base en el efecto Cotton negativo alrededor de 300 nm observado en el espectro de dicroísmo circular (Figura 40).

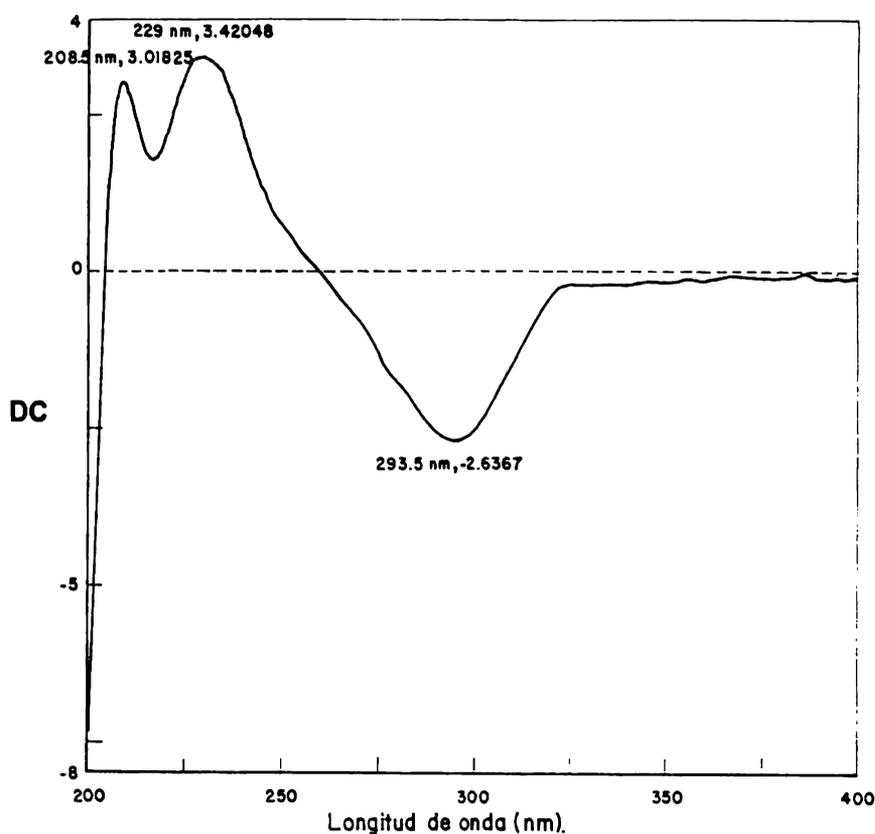


Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de la humilinólida E (**55**).

Los espectros de RMN del producto **25b** resultaron prácticamente idénticos a los de la humilinólida E (**55**) difiriendo tan sólo en la ausencia de las señales asociadas con la presencia del grupo acetoxi en C-6. En el caso del espectro de RMN- ^1H (Espectro 44; Apéndice I) en lugar de las señales para el

grupo acetilo y para el oximetino correspondiente a H-6 presentes en el espectro del compuesto **55**, se observa un sistema AB asignable a los hidrógenos de un metileno. La rama B de este sistema aparece como un doblete de doblete ($J = 16, 2.5$ Hz) centrado en δ_H 2.35 y la rama A aparece como un doblete de doblete ($J = 3.6$ y 9 Hz) centrado en δ_H 2.18. Por otro lado, en el espectro de RMN- ^{13}C la señal para este metileno se observa en δ_C 32.67 (Espectro 45; Apéndice I). La presencia de este conjunto de señales en los espectros de RMN del producto **25b** indican entonces que el compuesto no presenta sustituyente en C-6. Es importante mencionar que los fragmentos con una m/z de 73 (fragmento d, Figura 38) y 74 (fragmento d + H, Figura 38) una observados en el espectro de masas del producto **25b** (Espectro 43; Apéndice I) confirman la afirmación anterior.

El análisis comparativo de los espectros de RMN y de masas de los compuestos **25a** y **25b** permiten establecer que la única diferencia entre los dos compuestos es la naturaleza del éster en la posición C-3. La presencia en los espectros de RMN del limonoide **25a** (Espectros 38 y 39; Apéndice I) de las señales en δ_H 2.76 (H-25), 1.20 (H-26) y 1.18 (H-27) y en δ_C 176.58 (C-24), 34.0 (C-25), 19.11 (C-26) y 18.56 (C-27) indican que la función carbinólica en C-3 del núcleo metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato de **25a** se encuentra esterificado por un residuo de ácido isobutírico en lugar de uno de ácido tíglico como en el caso de la mexicanólida **25b**. El fragmento de m/z 87 una detectado en el espectro de masas del producto **25a** (Espectros 37; Apéndice I y Figura 38) proporciona una evidencia adicional de la presencia de un residuo isobutiriloxi en la molécula. Tanto en el compuesto **25a** como en el compuesto **25b** la ubicación del residuo en C-3 se determinó mediante el análisis de los espectros de HMBC (Espectro 40 y 46; Apéndice I). Al igual que en el caso del compuesto **55**, el hidrógeno del oximetino en C-3 de los dos compuestos muestra una correlación con los carbonos C-28, C-29 del núcleo base y con el carbonilo (C-24) del tigloiloxi (**25b**) o del isobutiriloxi (**25a**). Con base en las evidencias antes descritas, los compuestos **25a** y **25b** se caracterizaron como el metil-2,3-

dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato, respectivamente. Asimismo las evidencias analizadas confirman las propuestas estructurales de Okorie y Taylor (1971). La estereoquímica relativa de los sustituyentes se determinó también con base en las mismas consideraciones que para el compuesto **55**.

V.3.2. IDENTIFICACION DE LA HUMILINÓLIDA F (**56**).

Del segundo grupo de mexicanólidas aisladas de *S. humilis* sólo se discutirá la elucidación estructural del nuevo producto natural, es decir de la humilinólida F. Como ya se indicó previamente, este conjunto de limonoides presenta como característica común la presencia de un epóxido entre C-8 y C-30 en lugar de una doble ligadura que presenta el grupo que se discutió en el inciso anterior.

La formula molecular del producto **56** se determinó por espectrometría de masas como $C_{36}H_{44}O_{12}$ a partir del ion molecular observado en una m/z de 684 uma (Espectro 55; Apéndice I). Su espectro en el IR (Espectro 54; Apéndice I), al igual que el caso del producto **55**, presenta absorciones características para grupos lactona, éster, furano y cetona. Sin embargo, en lugar de la absorción para una doble ligadura trisustituida entre C-8 y C-30 se observa una señal de intensidad moderada para un grupo epóxido (ν_{max} 1233 y 733 cm^{-1}). Los espectros de RMN (Tabla 20 y 21) muestran una gran similitud a los del producto **55** y las otras mexicanólidas (Tablas 18-21) aisladas en el presente estudio.

Tabla 20. Datos de RMN-¹H para los compuestos 26, 27, 30, 36 y 56.

Proton	26	27	30	36	56
H-2	-	-	-	3.5 dd (2.7, 9.6)	-
H-3	4.93 s	5.02 s	5.10 s	4.99 d (9.6)	5.72 s
H-5	3.15 s	3.36 s	3.31 dd (8.5, 3)	3.44 s	3.45 s
H-6	4.45 s	5.48 s	2.34 dd (17, 3)	5.48 s	5.49 s
			2.39 dd (17, 8.5)		
H-9	1.94 m	1.94 m	1.98 dd (14, 4)	1.96 m	1.95 m
H-17	5.16 s	5.18 s	5.15 s	5.14 s	5.18 s
H-18	1.01 s	1.01 s	1.04 s	1.02 s	1.01 s
H-19	1.39 s	1.07 s	1.53 s	1.09 s	1.29 s
H-21	7.49 dd (1.8, 1)	7.44 dd (1.8, 1)	7.49 dd (1.8, 0.9)	7.48 dd (1.0, 1.8)	7.46 dd (1.8, 0.9)
H-22	6.42 dd (1.8, 0.8)	6.44 dd (1.8, 0.8)	6.45 dd (1.8, 0.9)	6.44 dd (1.0, 1.8)	6.41 dd (1.8, 0.9)
H-23	7.46 t (1.8)	7.44 t (1.8)	7.43 t (1.8)	7.43 t (1.8)	7.43 t (1.8)
H-25	2.82 sept	2.77 m	2.8 sept	2.75 sept	-
H-26	1.28 d (7)	1.29 d (7)	1.27 d (7)	1.27 d (6.9)	6.98 qq (7.5, 1.8)
H-27	1.25 d (7)	1.26 d (7)	1.29 d (7)	1.29 d (6.9)	1.94 d (7.5)
H-28	1.07 s	1.06s	1.11 s	1.08 s	1.18 s
H-29	0.87 s	0.91 s	0.92 s	0.94 s	0.92 s
H-30	3.45 s	3.49 s	3.5 s	3.26 d (2.7)	3.48 s
H-31	3.83 s	3.79 s	3.75 s	3.79 s	3.82 s
H-32	-	-	-	-	1.93 s
2-COMe					2.18 s
6-COMe		2.19 s		2.18 s	2.19 s
3-COMe					

Los desplazamientos químicos están expresados en ppm, referidos al TMS y las constantes de acoplamiento (en paréntesis) en Hz. Las asignaciones se realizaron por una combinación de los experimentos COSY y HETCOR.

Tabla 21. Datos de RMN-¹³C para los compuestos **26,27, 30, 36 y 56**.

Carbono	26	27	30	36	56
C-1	212.41	211.82	213.03	212.90	206.02
C-2	80.71	79.27	79.31	48.71	80.81
C-3	85.74	85.22	84.87	77.80	85.57
C-4	40.42	40.37	39.47	39.95	42.06
C-5	46.06	45.18	41.31	45.50	45.13
C-6	72.03	71.80	32.62	72.25	72.04
C-7	175.15	170.73	171.39	171.16	171.11
C-8	62.73	62.62	61.04	60.11	62.57
C-9	54.55	55.19	55.30	56.13	55.34
C-10	49.25	49.19	49.20	48.48	50.57
C-11	20.45	19.73	19.85	19.78	19.91
C-12	32.54	33.02	33.09	33.39	33.44
C-13	35.70	36.01	36.55	36.32	36.09
C-14	43.43	44.74	44.70	45.40	44.85
C-15	32.21	33.02	33.41	33.51	33.07
C-16	170.56	170.73	170.88	171.76	169.20
C-17	78.03	78.06	79.10	79.14	79.48
C-18	26.90	26.37	26.47	26.59	26.71
C-19	17.11	15.98	16.03	15.93	16.07
C-20	120.64	120.01	120.09	120.12	120.21
C-21	140.55	140.81	140.82	140.99	140.93
C-22	109.55	109.94	109.73	110.18	110.06
C-23	143.47	143.13	143.30	143.26	143.30
C-24	175.41	175.31	175.48	175.95	166.59
C-25	34.20	34.02	34.17	34.18	127.74
C-26	18.70	18.65	19.08	18.82	139.77
C-27	19.55	19.44	19.05	19.50	14.68
C-28	22.40	22.44	22.38	23.33	20.93
C-29	21.00	21.74	21.03	22.52	21.33
C-30	67.20	67.34	66.47	63.25	65.18
C-31	53.50	53.32	53.39	53.34	53.34
C-32	-	-	-	-	12.59
2-COMe	-	-	-	-	171.05
2-COMe	-	-	-	-	22.50
6-COMe	-	169.50	-	169.62	169.70
6-COMe	-	20.81	-	53.34	23.85

Los desplazamientos químicos están expresados en ppm. Las asignaciones se comprobaron por el experimento DEPT y por comparación de los desplazamientos con los modelos descritos en la literatura.

Las principales diferencias observadas entre los espectros del producto **55** y **56** corresponden a las absorciones relacionadas con la naturaleza de los grupos funcionales presentes entre C-8/C-30 y en C-2. A continuación se resumen estas diferencias:

1. En primer término, en lugar de las señales para la doble ligadura trisustituida ubicada entre C-8/C-30 se observan absorciones atribuibles a una función epoxídica [δ_H 3.48 (H-30, s) y δ_C 62.57 (C-8), 65.18 (C-30)] (Espectros 56 y 57; Apéndice I). Al igual que en el caso de los compuestos de tipo metil-2,3,-dihidroxi-meliac-8(30)-enato la multiplicidad del hidrógeno base del epóxido (H-30) permite determinar la ausencia o presencia de un sustituyente en C-2. En el caso del compuesto **56**, la señal se observa como singulete en congruencia con la presencia de un sustituyente en C-2. De este segundo grupo de mexicanólidas, el único compuesto que no presenta sustituyente en C-2 es la swietemahonina C (**36**) [Espectro 18; Apéndice I]. En consecuencia, el hidrógeno base para la función epoxídica se observa como un doblete ($J_{30-2} = 2.7$ Hz). A diferencia de los compuestos de la serie vinílica, H-30 no muestra acoplamiento con los hidrógenos H-14 y H-9. Otros cambios asociados con la presencia del grupo epóxido son: el desplazamiento paramagnético ($\Delta\delta_H = \sim + 0.4$) de la señal de H-9 en el espectro de RMN- 1H y el desplazamiento diamagnético de esta misma señal (C-9) en el espectro de RMN- ^{13}C ($\Delta\delta_C = - 2.0$).
2. En segundo lugar, la señal para C-2 (δ_C 80.81) se encuentra paramagnéticamente desplazada alrededor de 3 ppm en el producto **56** (Espectro 57, Apéndice I). Además, los espectros de RMN del limonoide **56** (Espectros 56 y 57, Apéndice I) presentan una señal adicional para un grupo acetilo; las señales para este grupo se observan en δ_H 2.18 (2-COMe) y δ_C 171.05 (2-COMe) y 22.50 (2-COMe). Estas observaciones en conjunto con el patrón de

fragmentación observados en el espectro de masas (Espectro 55, Apéndice I) confirman que el compuesto **56** presenta una función acetoxi en C-2 en lugar de un grupo hidroxilo.

Al igual que el producto **55** los espectros de la humilinólida F presentan señales atribuibles a la presencia de un grupo tigloiloxi en C-3 [δ_H 6.98 (H-26), 1.94 (H-27), 1.93 (H-32) y δ_C 171.05 (C-24), 127.74 (C-25), 139.77 (C-26), 14.68 (C-27) 12.59 (C-32)] y de un acetoxi en C-6 [δ_H 2.19 (6-COMe) y δ_C 169.70 (6-COMe), 23.85 (6-COMe)]. De nueva cuenta, la ubicación de los sustituyentes antes mencionados se estableció mediante el análisis del espectro HMBC (Espectro 58, Apéndice I). Las correlaciones más importantes observadas en el espectro para este compuesto natural se indican en la Figura 41.

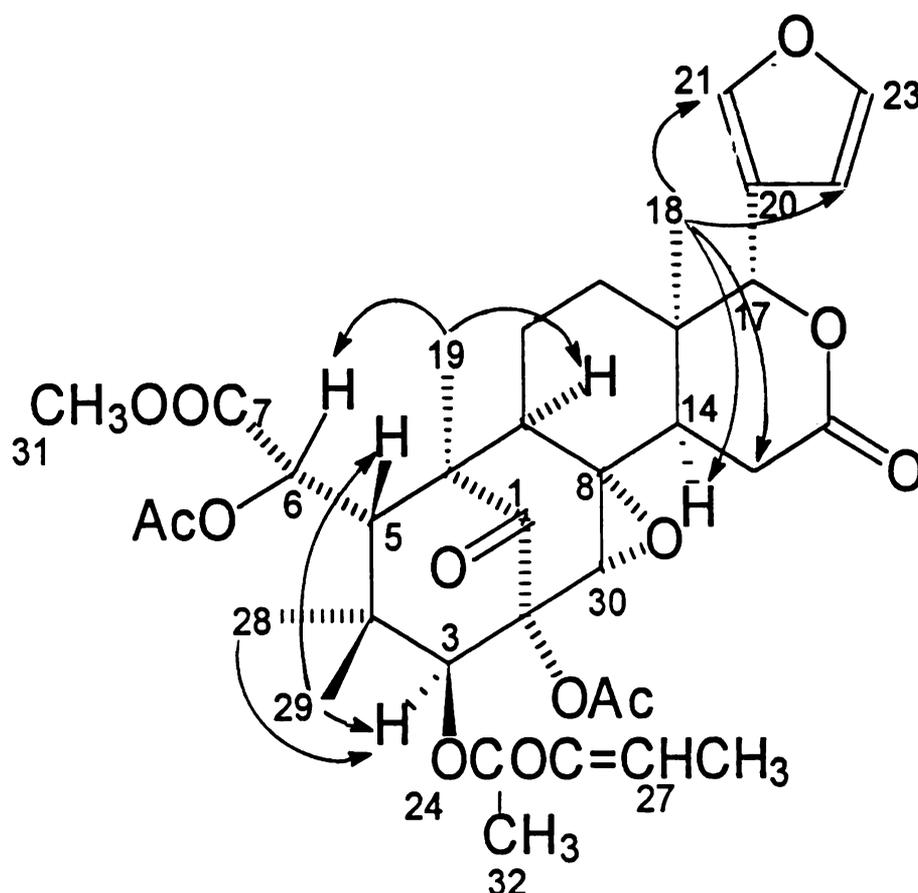


Figura 41. Correlaciones más importantes observadas en la humilinólida F (**56**).

La estereoquímica relativa se determinó de la misma forma que para los compuestos descritos en el inciso anterior. En la Figura 42 se indican las correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY. Por último, la estereoquímica absoluta resultó igual que la del compuesto 55 al observarse en el espectro de dicroísmo circular un efecto Cotton negativo en 330 nm (Figura 43).

Las evidencias antes descritas permitieron proponer la estructura **55** para el producto natural.

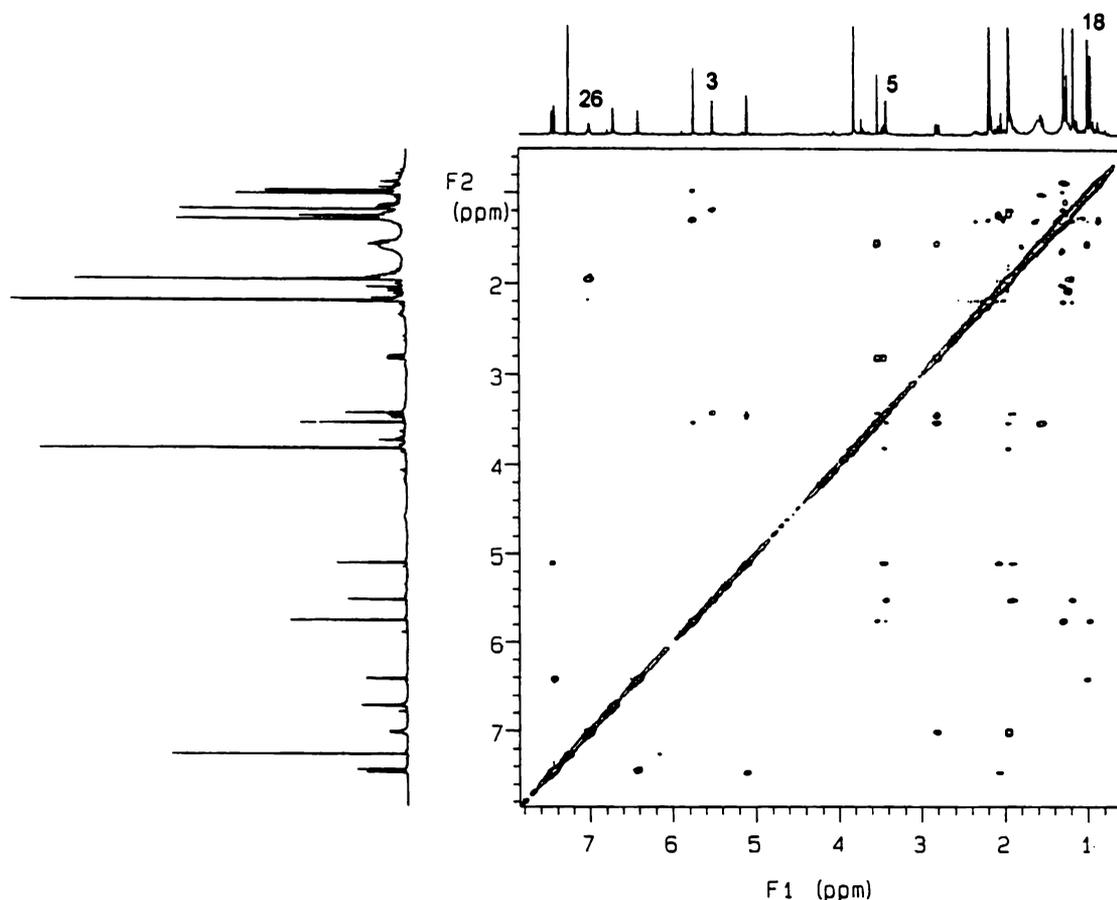


Figura 42. Correlación homonuclear de H-3/H-29, H-28; H-5/H-3, H-6; H-19/H-6; H-18/H-14, H-21; H-26/H-29, H-6, H-5 y H-32 en el Espectro NOESY de la humilinólida F (**56**).

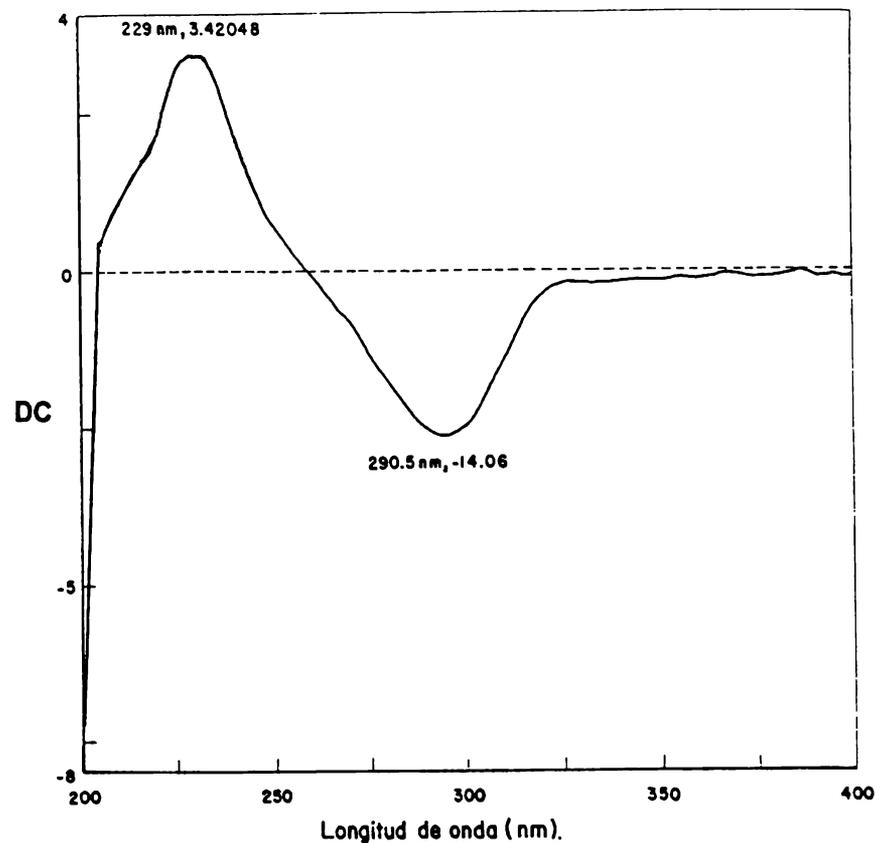


Figura 43. Espectro de dicroísmo circular de la humilinólida F (56).

V.4. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INSECTICIDA DE LOS LIMONOIDES AISLADOS DE *S. humilis* SOBRE LAS LARVAS DE *Ostrinia nubilalis* (Hübner).

La evaluación del potencial insecticida de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis* se determinó empleando como insecto de prueba las larvas de *Ostrinia nubilalis* (gusano barrenador del maíz) en tercer estadio de crecimiento, desarrolladas bajo condiciones controladas de luz, humedad, temperatura y alimentación (Arnason *et al.*, 1987). La metodología empleada para esta determinación fue desarrollada por Arnason y colaboradores (1987). Mediante el empleo de este bioensayo se puede determinar el efecto de extractos y productos puros sobre los diferentes parámetros de crecimiento del insecto de prueba como son: el peso promedio y el porcentaje de mortalidad de las larvas, el porcentaje de pupación, el peso promedio de las pupas, el tiempo promedio de pupación, el tiempo promedio de emergencia del adulto, el porcentaje de emergencia y el peso promedio del adulto.

Las humilinólidas A-D (**26**, **27**, **28** y **29**) se ensayaron a las concentraciones de 5 y 50 ppm; la swietenina C (**44**), la humilina B (**30**), la humilinólida E (**55**), el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**) y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (**25b**) se ensayaron a la concentración de 50 ppm. La tusendanina (**3**), un limonoide insecticida de uso comercial se empleó como un control un positivo.

Con relación al peso promedio de las larvas, se observó que las humilinólidas A-D (**26-29**) evaluadas a 50 ppm afectan en forma significativa el peso promedio de las larvas durante su desarrollo. La humilinólida C (**28**) presenta una actividad similar a la demostrada por el control positivo [Figura 44, Tabla 22]; los compuestos más activos en orden decreciente de potencia fueron las humilinólidas A (**26**), B (**27**), D (**29**) y la swietenina C (**44**) [Figuras 45-47; Tablas 23 y 24; Apéndice II].

Tabla 22. Efecto de las humilinólidas A-D (**26-29**) sobre el crecimiento y la mortalidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso máximo alcanzado (mg)	Mortalidad de larvas (%)
Control		68.0 ± 5.7	3.3
Humilinólida A (26)	5	55.5 ± 8.0	36.6
	50	19.6 ± 3.3	43.3
Humilinólida B (27)	5	80.1 ± 7.9	36.6
	50	25.8 ± 3.4	50.0
Humilinólida C (28)	5	36.1 ± 6.4	43.3
	50	17.1 ± 5.6	50.0
Humilinólida D (29)	5	80.3 ± 6.1	40.0
	50	38.8 ± 8.9	63.3
Toosendanina (control positivo)	5	51.1 ± 4.1	26.7
	50	17.0 ± 2.5	36.7

Los valores representan los promedios de 30 insectos de prueba ($P < 0.05$). ± error estándar.

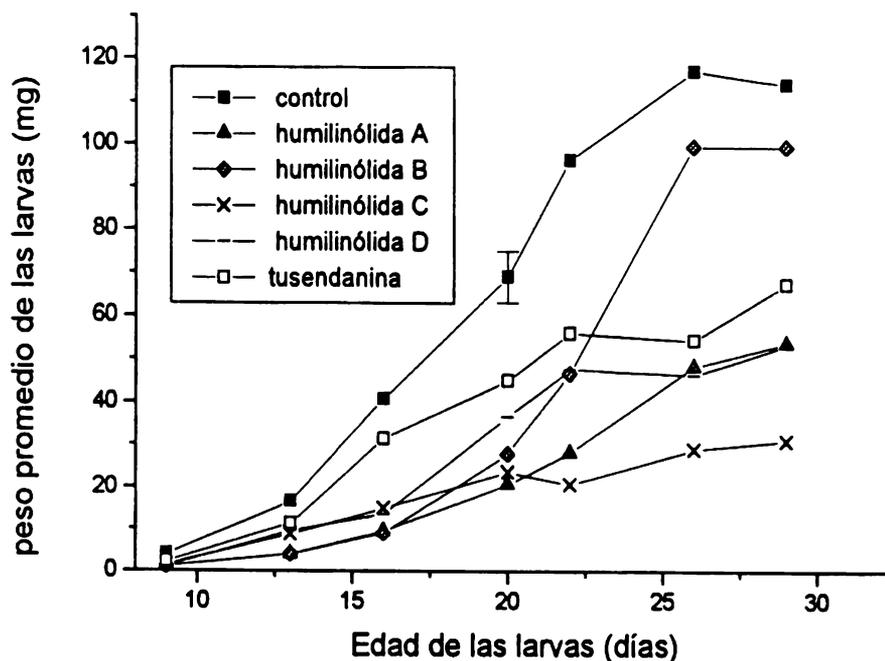


Figura 44. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

A la concentración de 5 ppm sólo la humilinólida C afecta el peso promedio máximo alcanzado por las larvas (Tabla 22). De nueva cuenta, el efecto es similar al desarrollado por el control.

La mortalidad de las larvas se ve afectada en forma significativa por las humilinólidas A-D (26-29), incluso los cuatro compuestos resultan mucho más activos que el control positivo a la concentración de 50 ppm (Figura 48, Tabla 22). A la concentración de 5 ppm los limonoides de prueba no afectan en forma significativa la mortalidad larvaria [Tabla 22 y Figura 49 (Apéndice II)]. Por otro lado, el efecto tóxico de la humilinólida E (55) sobre las larvas es similar al del control positivo (Tabla 23, Apéndice II). El resto de los limonoides objeto de estudio no altera la sobrevivencia de las larvas con respecto al control.

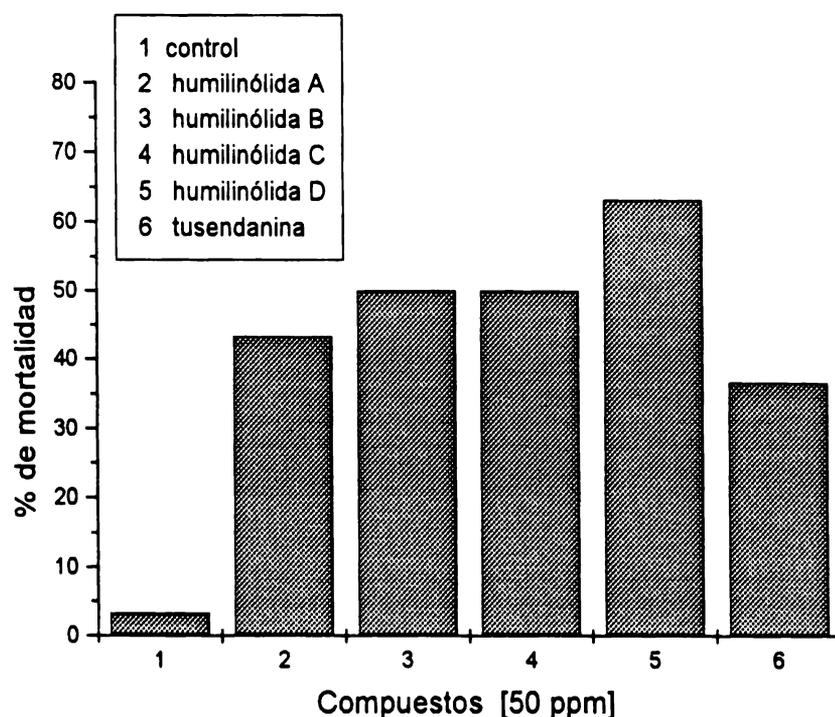


Figura 48. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) a la concentración de 50 ppm sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

Un segundo parámetro de desarrollo del insecto que se altera como una consecuencia de la toxicidad de los compuestos de prueba es el porcentaje de larvas que alcanzan el estado de pupación; este parámetro se afecta en forma significativa por las humilinólidas C (28) y D (29). El efecto de estas dos mexicanólidas es mucho mayor que el demostrado por el control positivo (Figura 50, Tabla 25; Apéndice II). Con relación a las otras mexicanólidas, los compuestos 55 y 25a presentan un efecto similar al del control positivo en esta etapa de desarrollo del insecto (Figura 51 y Tabla 26; Apéndice II).

En general, el peso promedio de las pupas no se afecta por ninguno de los siete compuestos ensayados (Figuras 52-54; Tablas 25-27; Apéndice II).

Por otro lado, el tiempo promedio de pupación se afecta en forma significativa por la humilinólida B (27), a la concentración de 50 ppm (Figura 55); el compuesto retarda hasta en seis días el tiempo necesario para alcanzar el estado de pupa. El efecto es similar al demostrado por el control positivo. El resto

de los compuestos evaluados no alteran en forma significativa el tiempo de pupación (Figuras 56 y 57; Tablas 25-27; Apéndice II).

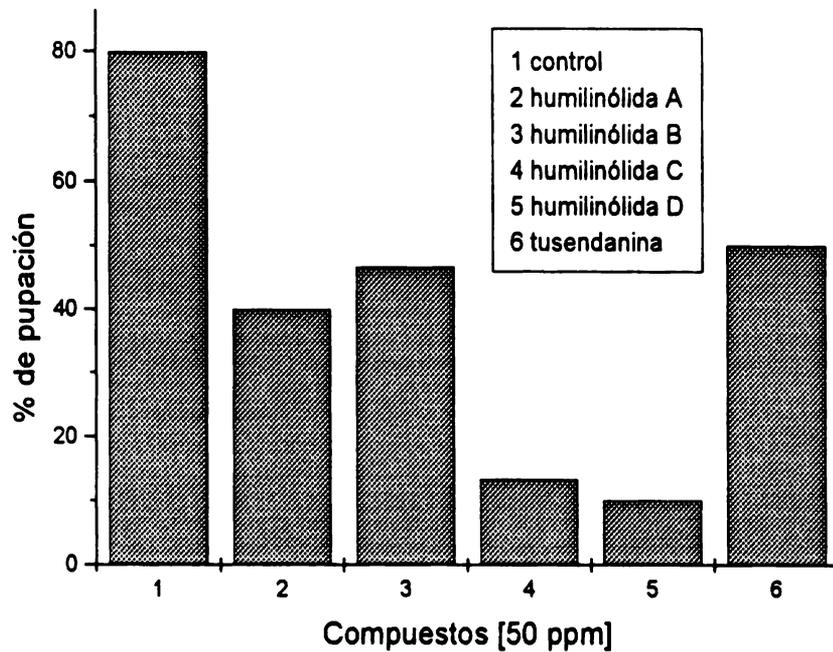


Figura 50. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el porcentaje de pupación.

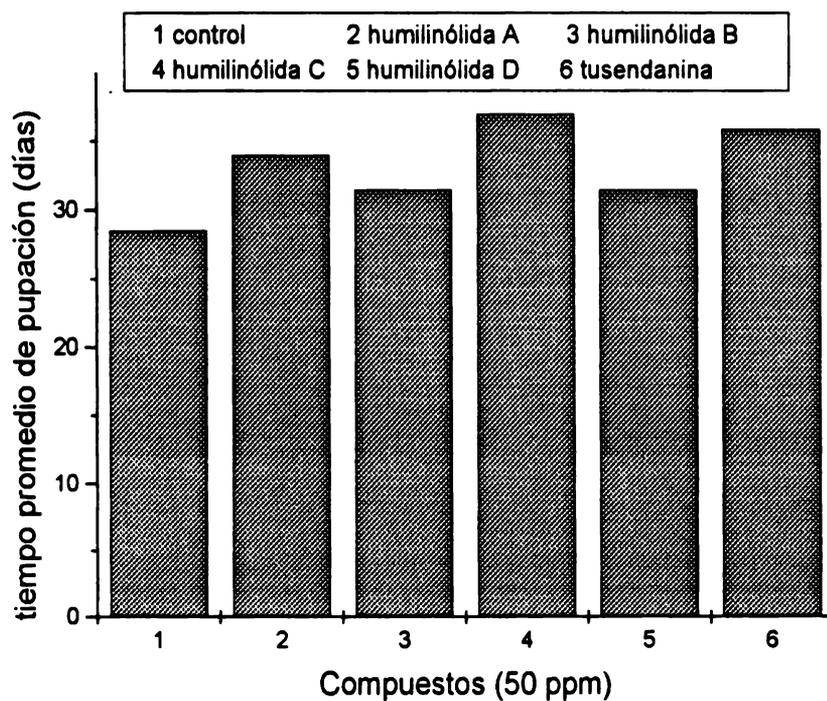


Figura 55. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el tiempo promedio de pupación.

El tiempo promedio de emergencia del adulto se afecta, de nueva cuenta, por las humilinólidas A-D. Específicamente, las humilinólidas A-D (26-29) retardan en forma significativa la emergencia del adulto. A una concentración de 50 ppm estos compuestos ocasionan un retraso en el tiempo de emergencia del adulto de hasta ocho días (Figura 58; Tabla 25 (Apéndice II)). Los demás limonoides no alteran este parámetro de desarrollo (Figuras 59 y 60; Tablas 26 y 27; Apéndice II).

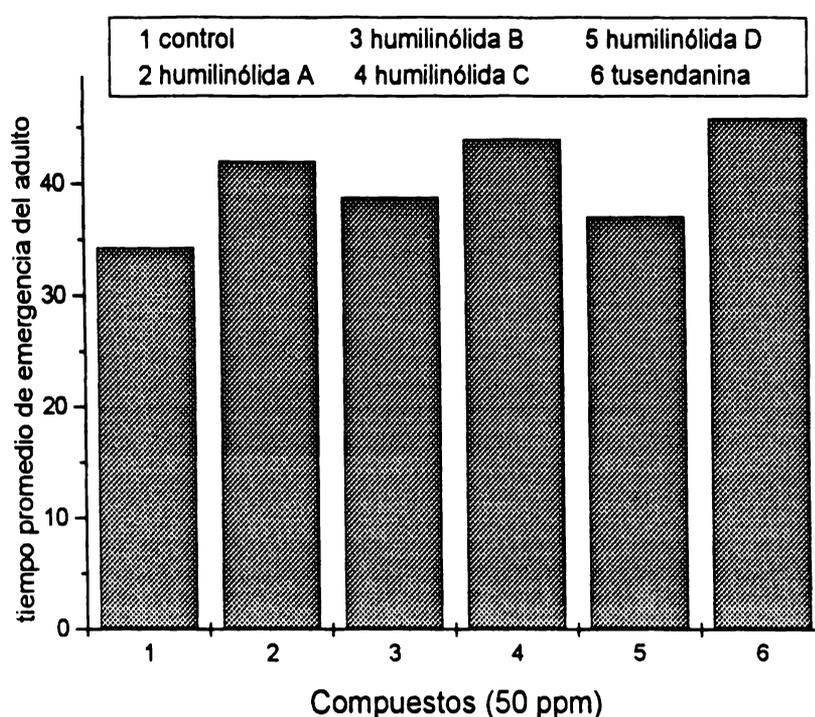


Figura 58. Efecto de las humilinólidas A-D (26- 29) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.

Con respecto, al peso promedio alcanzado por el adulto, la humilinólida A (26) disminuye en forma similar que la tusendanina el peso del adulto, le sigue en actividad la humilinólida C (28). Las humilinólidas B y D (27 y 29) prácticamente no alteran esta etapa de desarrollo del insecto de prueba (Tabla 25 (Apéndice II) y Figura 61). El resto de las mexicanólidas ensayadas no muestran un efecto significativo sobre el peso promedio de los adultos (Figuras 62 y 63; Tablas 26 y 27; Apéndice II).

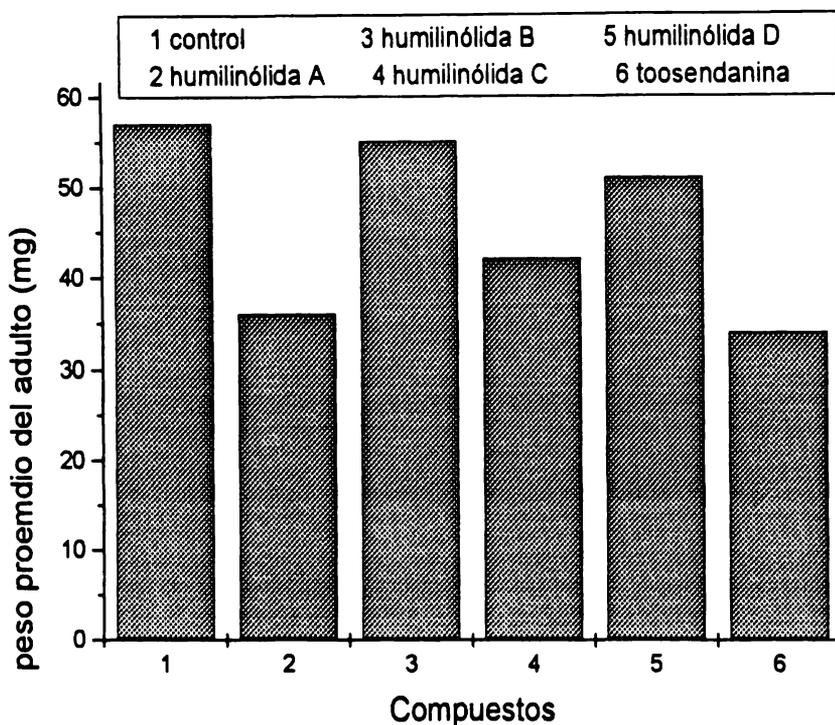


Figura 61. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio del adulto.

Por último, el porcentaje de emergencia del adulto se modifica en forma apreciable por las humilinólidas A-D (26-29) a la concentración de 50 ppm; la humilinólida C (28) demostró una mayor potencia, seguida por las humilinólidas D (29), A (26) y B (27). Cabe aclarar, que la actividad de las humilinólidas A-D sobre este parámetro es mucho mayor que la demostrada por la tusendanina [Figura 64, Tabla 25 (Apéndice II)]. La humilinólida E (55) y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) modifican el porcentaje de emergencia del adulto de manera similar al demostrado por el control positivo (Figuras 65 y 66; Tablas 26 y 27; Apéndice II).

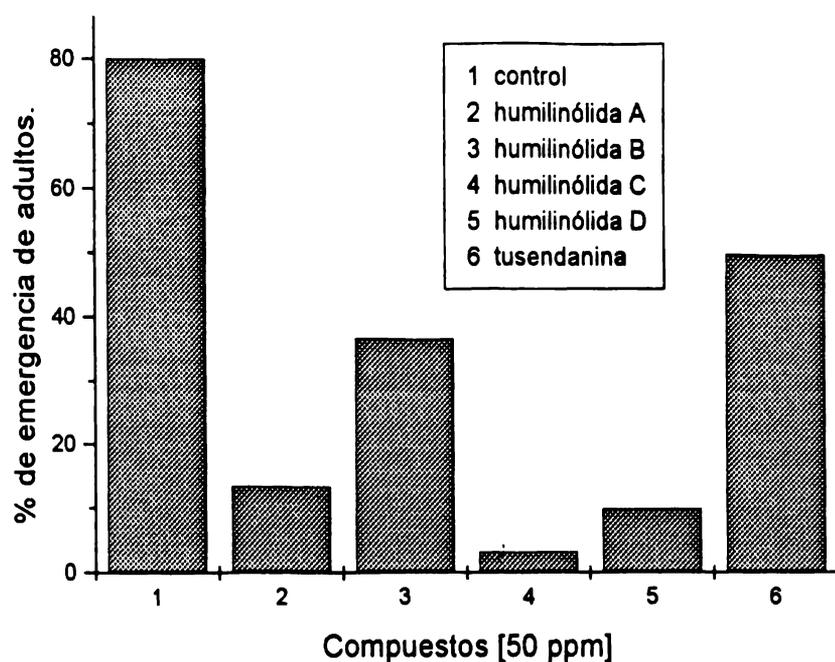


Figura 64. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que las humilinólidas C (28) y D (29) constituyen los compuestos más activos, y por lo tanto, se pueden considerar como candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos agentes insecticidas de origen natural. Ambos compuestos demostraron una actividad mayor que la tusendanina, sobre la mortalidad larvaria y emergencia del adulto. Por otro lado, la humilinólida C altera el peso promedio de las larvas de igual forma que el control positivo.

El efecto de las humilinólidas A-D (26-29), a la concentración de 50 ppm, sobre el ciclo de vida de *O. nubilalis* es comparable al efecto previamente demostrado por otros limonoides como el antotocol, la cedrelona, la nomilina, la gedunina, la buseina y la entandropragmina (Arnason et al., 1987, 1993). Otro ejemplo importante lo constituye la azadiractina (8), la cual reduce el crecimiento larvario y aumenta el índice de mortalidad de las larvas de *O. nubilalis* a la concentración de 10 ppm. Este limonoide también reduce en un 50% el

crecimiento de las larvas de *Schistocerca gregaria*, *S. frugiperda*, *Pectinophora gossypiella*, entre otros, a la concentración e 0.04 ppm (Champagne *et al.*, 1992).

A la fecha sólo se ha descrito la actividad insecticida de cinco limonoides de tipo mexicanólida. Estos compuestos incluyen al 3- β -isobutiriloxi-1-oxo-meliac-8(30)-enato, la xilocarpina, las rugeninas A y B y el 3- β -butiriloxi-1-oxo-meliac-8(14)-enato. Los cuatro primeros compuestos presentan actividad fagoinhibidora contra *S. frugiperda* (Mikolajczak *et al.*, 1988; Mootoo *et al.*, 1996). Específicamente, la actividad insecticida de la xilocarpina y de las rugeninas A y B contra *Spodoptera frugiperda* a 1000 ppm es comparable a la de la azadiractina (insecticida comercial) (Mootoo *et al.*, 1996). Por último, el 3- β -butiriloxi-1-oxo-meliac-8(14)-enato ha demostrado actividad fagoinhibidora contra *Agrotis segetum* a una concentración de 100 ppm (Vanucci *et al.*, 1992). Aunque resulta difícil comparar los niveles de actividad insecticida de las mexicanólidas de *S. humilis* con las mexicanólidas antes mencionadas, debido a que las evaluaciones se realizaron con diferentes especies de insectos y con diferentes técnicas, es evidente que las humilinólidas A-D (26-29) son activas contra *O. nubilalis* a concentraciones menores.

V.5. OTRAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EXPLORADAS PARA LOS LIMONOIDES DE *S. humilis*.

Con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades biológicas de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis* se realizaron una serie de ensayos biológicos que escapan del objetivo central de la presente disertación.

En primer lugar, se determinó el efecto citotóxico de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis* sobre tres líneas celulares derivados de tumores humanos. Las líneas celulares ensayadas incluyeron A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma mamario) y HT-20 (adenocarcinoma de colon), para este bioensayo se empleo a la adriamicina como un control positivo (Anderson *et al.*, 1991).

Tabla 28. Actividad citotóxica de los limonoides aislados de las semillas de *S. humilis* sobre tres líneas celulares.

Compuesto	A-549	MCF-7	HT-29
Extracto CHCl ₃	91.29	50.10	32.56
humilinólida A	64.4	79.5	59.6
humilinólida B	>100	>100	81.1
humilinólida C	37.7	94.1	>100
humilinólida D	60.6	65.0	53.6
humilinólida E	>100	72	>100
humilinólida F	66.5	53.0	>100
swietenina C	82.9	>100	>100
swietemahonina C	74.7	57.3	89.5
humilina B	>100	>100	>100
metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)- enato-3-isobutirato	50.8	76.9	87.3
metil-2,3-dihidroxi- meliac-8(30)- enato-3-tiglato	67.5	>100	86.4
adriamicina	7.9×10^{-3}	3.5×10^{-3}	3.5×10^{-2}

Los resultados son expresados como DE₅₀ (µg/ml). A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma mamario) y HT-29 (adenocarcinoma de colon).

Los resultados de estas evaluaciones permitieron determinar que los once compuestos evaluados no mostraron actividad citotóxica, ya que los valores de DE₅₀ fueron mayores a 20 µg/ml (Tabla 28). Esto indica que estos compuestos posiblemente carecen de efecto citotóxico sobre el hombre y otros animales, lo cual representa una ventaja si se considera un posible desarrollo comercial de estos productos como agentes insecticidas de origen natural. Claro está que se requiere de la realización de experimentos *in vivo* para sustentar esta afirmación.

Por otro lado, se determinó el efecto de los humilínolidas A-D (26-29) sobre los protozoarios *Entamoeba histolítica* y *Giardia lamblia*. Esta actividad biológica se exploró tomando en cuenta que la planta se emplea a nivel popular como un agente antiamebiano. Cabe mencionar que estos ensayos se realizaron en el laboratorio de parasitología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 29.

Los resultados obtenidos de las evaluaciones anteriores no permiten validar científicamente el uso popular de las semillas de la especie vegetal para el tratamiento de la amebiasis y el cáncer ya que ni el extracto ni los compuestos puros demostraron actividad antiprotozoaria o citotóxica, respectivamente.

Tabla 29. Resultados de la actividad antiamebiana de las humilínolidas A-D (26-29) sobre *Entamoeba histolítica* y *Giardia lamblia*.

	<i>E. histolítica</i>	<i>G. lamblia</i>
Compuesto	Concentración Inhibidora media (CI ₅₀) µg/ml	
Extracto CHCl ₃	159.81	260.78
	(172.8-129.2)*	(362.4-214.2)*
humilínolida A	98.62	79.83
	(118.9-81.78)*	(99.21-64.24)*
humilínolida B	77.64	95.03
	(89.17-67.14)*	(127.4-74.65)*
humilínolida C	91.03	151.53
	(122.4-67.65)*	(185.5-129.1)*
humilínolida D	144.81	250.78
	(168.8-124.2)*	(365.4-197.2)*
metronidazol	0.04	0.21

*Intervalos de confianza. Análisis probit.

V.6. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos de la investigación sobre el potencial insecticida de las semillas de *S. humilis* confirman que la aplicación del criterio quimiotaxonómico en ciertos casos es apropiado para la preselección de especies vegetales como fuentes potenciales de principios insecticidas.

El estudio fitoquímico convencional del extracto orgánico de las semillas de *S. humilis* permitió el aislamiento de once limonoides de tipo mexicanólida, dos de los cuales constituyen nuevos productos naturales (humilinólida E y humilinólida F). Otros dos compuestos constituyeron nuevos productos para la especie vegetal (swietenina C y swietemahonina C) y los siete restantes (humilinólida A-D, metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato y metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato y humilina B) habían sido aislados previamente en la especie investigada.

La actividad insecticida se determinó empleando larvas del insecto *Ostrinia nubilalis* (gusano barrenador del maíz). Con respecto a este bioensayo, únicamente se evaluaron nueve compuestos, los cuales incluyeron a la humilinólida A-E, la humilina B, la swietenina C, el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato y el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato. De los nueve compuesto evaluados, sólo las humilinólidas C y D resultaron altamente activos, afectando diversos parámetros del crecimiento del insecto *Ostrinia nubilalis*.

Mediante el análisis de los resultados obtenidos de esta evaluación biológica, se observó que los compuestos que mostraron una mayor actividad insecticida sobre el insecto de prueba son aquellos que presentan en sus estructuras una doble ligadura entre los carbonos C-8 y C-30 y un grupo acetoxi en las posiciones 2 ó 6. Por el contrario, los limonoides con grupo epóxido en las mismas posiciones son menos activos y además requieren de la presencia de funciones oxigenadas (OH o AcO) en C-2 y C-6 para ejercer su efecto.

Cabe mencionar que ninguno de los once compuestos aislados ni el extracto integro demostró actividad citotóxica contra las tres diferentes líneas celulares derivados de tumores humanos ensayados. Estos resultados aunque muy preliminares contribuyen a la compilación de datos biológicos relativos a la inocuidad de estos productos para el hombre y otros mamíferos.

PERPECTIVAS GENERALES DEL PRESENTE TRABAJO.

- 1.- Explorar el efecto del compuesto fitotóxico [1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno] de *M. depressa* sobre otros posibles sitios de acción en el metabolismo vegetal.
- 2.- Determinar el efecto postemergente del compuesto fitotóxico sobre distintas especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas.
- 3.- Cuantificar el compuesto fitotóxico [1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)-benceno] de *M. depressa* en el material vegetal (hojas) colectado en distintas épocas del año y en distintos sitios geográficos, para determinar las posibles influencias de las variaciones en las condiciones climáticas y geográficas sobre la biosíntesis del compuesto activo.
- 4.- Explorar el mecanismo de acción como agentes insecticidas de los limonoides más activos (humilinólidas A-D) sobre *Ostrinia nubilalis*.
- 5.- Determinar la actividad insecticida de los once limonoides sobre otras especies de insectos.
- 6.- Realizar estudio de toxicidad *in vivo* de los limonoides con mayor actividad insecticida.
- 7.- Comprobar si el uso medicinal de la especie *S. humilis* como agente antiparasitario está relacionado con un efecto sobre la actividad contráctil del músculo liso del tracto gastrointestinal. La inducción de un efecto de relajación de la musculatura lisa podría representar un efecto benéfico para el tratamiento de los cólicos asociados con la disentería amibiana. En tanto que un efecto contrario favorecería la expulsión de parásitos intestinales. En este sentido, durante la realización de la presente investigación, se determinó el efecto del compuesto mayoritario (humilinólida A) de *S. humilis* sobre la contracción espontánea del íleon de cobayo, utilizando la metodología descrita en el inciso III.2.2. El compuesto de prueba, se evaluó a las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 250 μM . La insolubilidad del compuesto en el vehículo utilizado y en otros disolventes orgánicos, impidió

su evaluación a concentraciones mayores. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Efecto de la humilinólida A (26) sobre la contracción espontánea de íleon de cobayo.

Concentración del compuesto (μM)	Porcentaje de actividad (DS) n = 8
control (0.01% DMSO)	2.71 \pm 1.90
12.5	7.26 \pm 2.05
25	32.30 \pm 9.1
50	37.48 \pm 6.05
250	59.71 \pm 5.27
acetilcolina*	100 \pm 3.10

*control positivo (0.1 μM).

Estos resultados indican que la humilinólida A (26) aumenta el tono y la amplitud de la contracción espontánea del íleon de cobayo. El efecto observado es dependiente de la concentración (Figura 67) y la CE_{50} calculada fue de 120 μM . En la Figura 68 se muestra el registro obtenido a la concentración de 250 μM donde claramente se observa el incremento del tono y la frecuencia de la contracción espontánea del íleon de cobayo aislado luego de la aplicación de la humilinólida A a la concentración antes indicada.

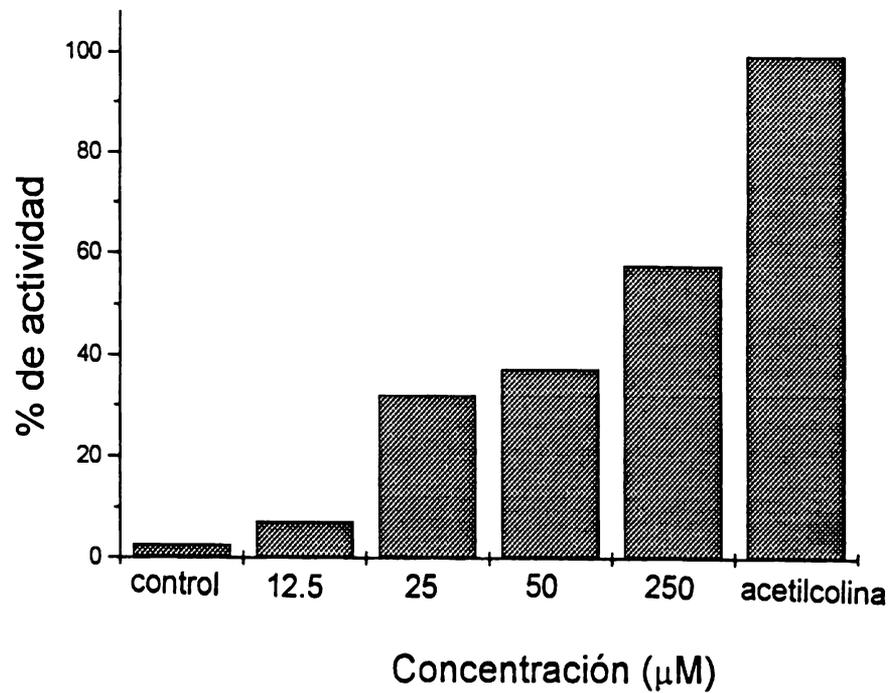


Figura 67. Efecto de la humilinólida A (26) sobre la actividad contráctil del íleon de cobayo.

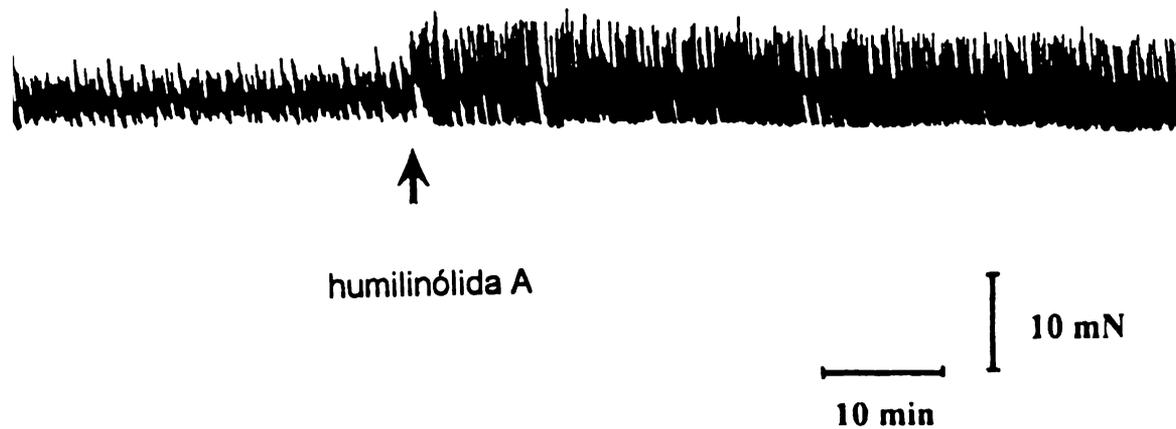


Figura 68. Efecto de la humilinólida A (26) sobre la actividad contráctil del íleon de cobayo a la concentración de 250 µM.

Lamentablemente, estos resultados no son concluyentes para determinar si la especie vegetal ejerce un efecto espasmolítico o espasmogénico debido a que solamente se evaluó el compuesto mayoritario. Sin embargo, los resultados contribuyen al conocimiento del potencial farmacológico de los limonoides, ya que a la fecha no se ha descrito la actividad sobre la contractilidad del músculo liso de ningún otro limonoide. En consecuencia, esta investigación preliminar constituye la primera descripción sobre este tipo de actividad farmacológica para estos metabolitos secundarios.

Con base en estos resultados sería pertinente continuar con la investigación farmacológica del extracto integro y de los demás tetranortriterpenoides presentes en las semillas de la especie vegetal con la finalidad de validar el uso popular de la planta.

BIBLIOGRAFIA

- Adeoye, S. A. and Bekeo, D. A. (1965) The molecular structure of *Cedrela odorata*. Subatance B. Chem. Comm. 14, 301-302.
- Adesida, G. A. and Taylor, D. A. H. (1967) The Chemistry of the Genus *Entandrophragma*. *Phytochemistry*, **6**, 1429-1433.
- Adesogan, E. K. and Taylor, D. A. H. (1967). Grandifolina, a New Limonoid From *Khaya grandifolia* C. Dc. *Chem. Comm.* **10**, 225-227.
- Adesogan, E. K. and Taylor, D. A. H. (1968). Extractives from *Khaya senegalensis* (Desr).A. Juss. *J. Chem. Soc. C*, 1974-1981.
- Adesogan, E. K. and Taylor, D. A. H. (1970). Limonoid extractives from *Khaya ivorensis*. *J. Chem. Soc C*, 1710-1714.
- Agrios, G.N. (1991). Control de Enfermedades de las Plantas. En: Fitopatología. 5a Ed. Editorial Limusa. pp 139-170.
- Akisanya, A.; Bevan, C. W. L.; Hirst, J.; Hasall, T.G. and Taylor, D. A. H. (1960). West African Timbers. Part III. Petroleum extracts from the Genus *Entandrophragma*. *J. Chem. Soc.*, **137**, 3827-3829.
- Alvi, K. A.; Crews, P.; Aalbersberg, B. and Prasad, R. (1991). Limonoids from the Fijian Medicinal Plant Dabi (*Xilocarpus*). *Tetrahedron* **47**, 8943-8948.
- Amorós-Marin, L.; Torres, W. I. and Asenjo, C. F. (1959). Isolation of cycloeucaleanol from West Indian Mahogany Wood. *J. Org. Chem* **24**, 411-413.
- Anaya, A. L.; Calera, M. R.; Mata, R. and Pereda-Miranda, R. (1990). Allelophatic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2145-2152.
- Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. C. and Sufness, M. (1991). A Blind Comparasion of simple Bench-Top, Bioassays an Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analisis.* **2**, 107-111.
- Anderson, J. W. and Beardall, J. (1991). Molecular Activities of Plant Cell. En: Introduction to Plant Biochemistry, 1ª Ed. Blackwell Scientific Publications. USA.

- Ara, F.; Siddiqui, B. S.; Faizi, S. and Siddiqui, S. (1989). Structurally Novel Deterpenoid Constituents from the Stem Bark of *Azadirachta indica* (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 343-345.
- Armstrong, F. B. (1989). *Biochemistry*, 3^a Ed. Oxford University Press, pp 329-357, New York.
- Arnason, J. T.; MacKinnon, S.; Durst, A.; Philogene, B. J. R, Hasbun, C.; Sánchez, P.; Poveda, L.; San Roman, L.; Isman, M. B.; Satasook, C.; Towers, G. H. N.; Wiriyaichitra, P. and McLaughlin, J. L. (1993). Insecticides in Tropical Plants with Non-Neurotoxic Modes of Action. En *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (Eds.). Plenum Press, **27**, pp 107-131.
- Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Donskov, N. and Kubo, I. (1987). Limonoids from Meliaceae and Rutaceae reduce feeding growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **43**, 221-226.
- Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Donskov, N.; McDougall, C.; Fortier, G.; Morand, P.; Gardner, D; Lambert, J.; Morris, C and Nozzolillo C. (1985). Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **38**, 29-39.
- Astier, Ch.; Boussac, A. and Eline, A. (1984). Evidence for different binding sites on 33-kDa protein for DCMU, atrazine and Q_B. *FEBS Letters*, **167**, 312-326.
- Bah, M. and Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR Investigations of Tricolorins A-E, individual Oligosaccharides from the Resins of *Ipomoea tricolor*. *Tetrahedron*, **52**, 13063-13080.
- Bah, M. and Pereda-Miranda, R. (1997). Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type Dimers from the Resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*, **53**, 9007-9022.
- Baker, F. W. G. (1991). Herbicide Resistance. En: *Tropical Grassy Weeds*. F.W.G. Baker and P.J. Terry (Eds). C.A.B. International for CASAFA. Gran Bretaña. Cap. 6, pp 96-105.

- Baldwin, M. A.; Motoo, B. S.; Jatiro, C.; Tinto, W. F.; Reynolds, W. F.; Mclean. (1992). Ecuadorin a novel tetranortriterpenoid of *Guarea Kunthiana*: structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy. *Can. J. Chem.* **70**, 1260-1263.
- Banerji, B.; Nigam, S. K. (1984). Wood Constituents of Meliaceae. A Review. *Fitoterapia*, **LV**, 3-36.
- Basak, S. P. and Chakrabarty, D. P. (1970b). Scopoletin from the leaves of *Swietenia mahagoni* Jacq. *J. Indian Chem. Soc.* **47**, 722.
- Basak, S. P.; Islam, A. and Chakrabarty, D. P. (1970a). Melianona from *Swietenia mahagoni* Jacq. *J. Indian Chem. Soc.* **47**, 501-502.
- Benner, J. P. (1993). Pesticidal Compound from Higher Plants. *Pesticide Science*, **39**, 95-105.
- Benz, R. and McLaughlin, M. (1983). *Biophysical Journal*, **41**, 381-398.
- Bernal-Morales, E.; Romo de Vivar, A.; Sánchez, B.; Aguilar, M.; and Lotina-Henssen, B. (1994). Inhibition of oxygen evolution by ivalina. *Can. J. Bot.*, **72**, 177-181.
- Borkovec, A. B. (1987). Chemosterilants. En: Handbook of Natural Pesticides. Insect Growth Regulators. E. D. Morgan y N. B. Mandava (Eds.) CRC Press, **IIIB**, pp 1-19.
- Borror, D. J. (1981). An Introduction to the Study of Insects. Saunders College Publishing 5th Ed. pp 520-524.
- Boutler, D. (1993). Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*, **34**, 1453-1466-
- Bray, D. H.; Warrhurst, D. C.; Connolly, J. D.; O'Neil, M. J. and Phillipson, J. D. (1990). Plant as Sources of Antimalarial drugs. Part 7. Activity of Some species of Meliaceae Plants and Their Constituent Limonoids. *Phytoterapy Research*, **4**, 29-35.
- Breitmaier, E and Voelter, W. (1989). Carbo-13 NMR Spectroscopy. High-Resolutio Methods and Aplications in Organic Chemistry and Biochemistry. Trirdh Edition, Weinhein, Federal Republic of Germany, pp 216-22.

- Cabrera, C. E.; Sousa, S. M.; Tellez, V. O. (1982). *Imágenes de la Flora Quintanarroense*; centro de Investigaciones de Quintana Roo, A.C. Quintana Roo, pp 127.
- Calera, M. R.; Soto, F.; Sánchez, P.; Bye, R.; Hernández, B.; Anaya, A. L.; Lotina-Hennsen, B. and Mata, R. (1995a). Biochemically active sesquiterpene lactons from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry*, **40**, 419-425.
- Calera, M. R.; Mata, R.; Anaya, A. L. and Lotina-Hennsen, B. (1995b). 5-O- β -D-galactopyranosyl-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-phenylcoumarin an inhibitor of photophosphorylation in spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research*, **45**, 105-110.
- Calera, M. R.; Lotina-Hennsen, B.; Mata, R. and Anaya, A. L. (1996) Uncoupling behavior on the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts. Structure-Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2966-2969.
- Castañeda, P.; García, M. R. Hernández, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L. and Mata, R. (1992). Effects of Some Compounds Isolated from *Celaenodendrum mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on Seeds and Phytopathogenic Fungi. *J. Chem. Ecol.* **18**, 1025-1037.
- Collins, S. C. (1991). Chemical Control of Grassy Weeds. En: *Tropical Grassy Weeds*. F.W.G. Baker and P. J. Terry (Eds.) C.A.B. International for CASAFA. Gran Bretaña. Cap. 4, 73-84.
- Connolly, J. D. (1970). Limonoids from *Xilocarpus moluccensis*. *J. Chem. Soc.* © 211.
- Connolly, J. D. (1983). Chemistry of the Limonoids of the Meliaceae and Cnroraceae. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **22**, 171-213.
- Connolly, J. D, McCrindle, Overton, K. H. and Warnock, W. D. C. (1965). Swietenolide. *Tetrahedron letters*. **33**, 2937-2940.
- Connolly, J. D, McCrindle, Overton, K. H. and Warnock, W. D. C. (1968). Tetranortriterpenoids VII. (Bicyclononanolide-V). The constitution and stereochemistry of swietenolide. *Tetrahedron*, **24**, 1507-1515.
- Connolly, J. D. and Handa, K. L. (1969). Tetranortriterpenoids and related substances. Part XII. 6-hydroxycarapin and a tetracyclic triterpenoid pentaol from *Cedrela glaziovii*. *J. Chem. Soc. C*, **24**, 35-36.

- Connolly, J. D.; Maclellan, M., Okorie, D. A. and Taylor, D. A. H. (1976). Limonoids from *Xilocarpus moluccensis* (Lam) M. Roem. *J. Chem Soc. Perkin I*, 1993-1996.
- Cremllyn, R. J. (1991). Agrochemical. Preparation and mode of action. John Wiley and Son. Cap. 1, 4, 5,6, 8, 14 y 16.
- Champagne, D. E.; Isman, M. B. and Towers, G. H. N. (1989). Insecticidal activity of phytochemicals and extracts of the Meliaceae. En: Insecticides of Plant Origin. J.T. Arnason; B.J.R. Philogene and P. Morand (Eds.). A.C.S. Symp. Ser. **387**, pp 95-109.
- Champagne, D. E.; Koul, O.; Isman, M. B.; Scudder, G. G. E. and Towers, G. H. N. (1992). Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, **31**, 377-394.
- Chan, K. C.; Tang, T. S. and Toh, H. T. (1976). Isolation of swietenolide diacetate from *Swietenia macrophylla*. *Phytochemistry*, **15**, 429-430.
- Chang, W. R., Magnus K. E. and Mootoo B. S. (1967). Extractives from *Cedrela odorata*. The structure of metil-angolensate. *J. Chem Soc. C*. 171-177.
- Cox, P. A. and Balick, M. J. (1994). The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery Scientific American, pp 82-88.
- Danks, S.; Evanás, E. H. y Whittaker, P. (1983). Photosynthetic Sistem. Ed. Willey and Sons Inc. New York. pp 345-374
- Davidson, R. H. Lyon, W. F. (1979). Insects Pests of Farm, Garden and Orchard. 7th. Ed. John Wiley and Sons Inc. New York, pp 150-153.
- Daviero, R. G. and Chapman, H. (1988). Outlines of Entomology. 7th Ed. pp 301-303.
- Da Silva, M. F. D.; Gottlieb, O. R. and Dreyer, D. L. (1984). Evolution of Limonoids in the Meliaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 299-310.
- Diaz, J. L. (1976). Uso de las Plantas Mediicinales de México. Monografías Científicas II. IMEPLAN, México. pp 116.
- Dilley, R. A. (1972). Ion Transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). *Methods Enzimology*. **24**, 68-74.
- Duke, S. O. (1990). Overview of Herbicides Mechanisms of Action. *Enviromental Health Perspectives*. **87**, pp 263-271.

- Duke, S. O.(1991). Plant Terpenoids as Pesticides. En: Handbook of Natural Toxins. R. F. Keeler and A.T. Tu (Eds.). Marcel Dekker Inc. Cap 6, pp 269-290.
- Duke, S. O. and Lydon J. (1993). Natural Phytotoxins as Herbicides. En : Pest Control with Enhanced Environmental Safety. American Chemical Society. Symposium Series 524. Cap. 9, pp 110-124.
- Duke, S. O. and Abbas, H. K. 1995. Natural Products with Potential Use as Herbicides. En: Allelopathy: Organisms, Processes and Applications. Inderjit, M. M. Dakshini and Frank. A. Einhellig (Eds.). American Chemical Society. Symposium Series pp 582, Cap. 8 pp 348-362.
- Einhellig, F. A. (1986). Mechanism and modes of action of allelochemicals. En : The Science of allelopathy. A. R. Putnam and Chung-Shih T. (Eds.) John Willey and Soc. Inc. Cap. 10, pp 171-189.
- Einhellig, F. A. (1995). Mechanism of action of allelochemicals in Allelopathy. En: Allelopathy Organisms, Processes and Applications. K. Inderjit; M. Dakshini and F. A. Einhellig. (Eds.) ACS. Symposium Serie, 582, Cap. 7, pp 96-116.
- Einhellig, F. A.; and Souza, J. F.(1992). Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *J. Chem. Ecol.*, 18, 1-11.
- Einhellig, F. A.and Rasmussen, J. A. (1979). *J. Chem. Ecol.*,5, 815-824.
- Einhellig, F. A.; Rasmussen, J. A.; Hejl, M. A. and Souza, I. F. (1993). Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis. *J. Chem. Ecol.*, 19, 369-375.
- Einhellig, F. A.; Rice, E. L.; Risser, P. G. and Wender, S. H. (1970). *Bull Torrey Bot. Club.*, 97, 22-23.
- Ekong, D. E. V. and Olagbemi, O. E. (1967). Novel Meliacins (limonoids) from the Wood of *Pseudocedrela kotschyii*. *Tetrahedron letters*, 3525-3527.
- Ellis, R. J. (1989). Chloroplast Biogenesis. Cambridge University Press. London. Cap. 3 y 4.
- El-Zik, K. H. and Frisbie, R. E. (1985). Integrated Crop Management Systems for Pest Control. En: Handbook of Natural Pesticides: Methods, Theory, Practice and Detection. N.B. Nandava (Eds) CRC Press, Cap. I, pp. 21-122.

- Enriquez, R. G.; Cháves, M. A. and Jauregui C. (1980). Propenylbenzenes from *Guatteria gaumeri*. *Phytochemistry*, **19**, 2024-2025.
- Escoubas, P.; Fukushi, Y.; Lajide, L. and Mizutani, J. (1992). A New Method for Fast Isolation of Insect Antifeedant Compounds from Complex Mixture. *J. Chem. Ecol.*, **18**, 1819-1832.
- Fang, X.; Rieser, M. J.; Gu, Z.; Zhao, G. and McLaughlin. (1993). Annonaceae Acetogenins: An Updated Review. *Phytochemical Analysis*, **4**, 27-48.
- Farnsworth, N. R. and Wagner, H. (1990). Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 4 y 6 pp 38-56.
- Fisher N. H.; 1986. The function of mono- and sesquiterpenes as plant germination and growth regulator. En: *The Science of Allelopathy*. A.R. Putman and C.S. Tang (Eds.). John Wiley, New York, pp 203-218.
- Fisher, N. H. 1991. Plant terpenoids as allelopathic agents. En: *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*. J.B. Harbone and F.A. Tomas Barberan (Eds.). Oxford University Press, Oxford, U.K. pp 377-398.
- Fisher, N. H.; Williamson, G. B.; Weidenhamer, J. D. and Richardson, D. R. 1994. In Search of Allelopathy in the Florida Scrub The Role of Terpenoids. *J. Chem. Ecol.* **20**, 1355-1380.
- Ghisalberti, E. (1993). Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. En: *Bioactive Natural Detection, Isolation and Structural Determination*. Colegate, S. and Molyneux, R. (Eds.). C. R. C. Press., U.S.A. pp 10-49.
- Giaquinta, R. T. and Dilley, R. A. (1975). A Partial Reaction in FS II: Reaction of Silicomolibdate prior to the Site of Dichlorophenyldimethylurea Inhibition. *Biochemical and Biophysical Acta*, **387**, 288-305.
- Greca, M. D.; Monaco, P.; Polio, A. and Previtera L (1992). Structure-Activity relationship of Phenylpropanoids as Growth inhibitors of the Green Alga *Selenastrum capricornutum*. *Phytochemistry*, **31**, 4119-4125.
- Greca, M. D.; Monaco, P.; Pinto, G.; Polio, A. and Previtera, L. (1995). Mimics of Natural Phenylpropanoids. *In vitro* antifungal activity. *Allelopathy Journal*, **2**, 37-41.

- Grinberg, N. (1991). Modern Thin Layer Chromatography. En: Chromatography Science, Series Series N. Grinberg (Ed.) 52, New York, Marcel Dekker.
- Gromet-Elhaman, Z. And Auron, M. (1963). *Biochemical and Biophysical Acta Reseach Communication*, 10, 215-218 and *Z. Naturforsch*, 34, 1010-1014.
- Golbeck, J. H. (1977). Electron transport in chloroplasts. *Enciclopetia of Plant Physiology*, 5, 94-115.
- Govindachari, T. R.; Narasimhan, N. S.; Suresh, G.; Partho, P. D. and Gapalakrishnan, G. (1996). Insect Antifeedant and Growth-Regulating Activities of Salanin and Other C-seco limonoids from Neem Oil in Relation to Azadirachtin. *J. Chem. Ecol.*, 22, 1453-1461.
- Govindachari, T. R.; Narasimhan, N. S.; Suresh, G.; Partho, P. D.; Gapalakrishnan, G. and Krishna, K. G. (1995). Structure-related Insect Antifeedant and Growth Regulating Activities of some Limonoids. *J. Chem. Ecol.*, 21, 1585-1600.
- Gutiérrez, L. T. y Barrientos B. T. (1994). Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial de extractos derivados de treinta especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. México, D.F.
- Guthrie, W. D., Robinson, J. C., Jarvis, J. L. (1985). *Ostrinia nubilalis*. En: Handbook of Insect Rearing, Singh, P.; Moore, R.F.(Eds.). Elsevier Science. N.Y. II, pp 407-413.
- Hai-Hang, L.; Nishimura, H.; Hasegawa, K.; Mituzani, J. (1992). Allelopathy of *Sasa cernue*. *J. Chem. Ecol.* 18, 1785-1796.
- Halsall, T. G.; Troke, J. A. (1975). Biogenesis of the mexicanolide group. *J. Chem. Soc. Perkin*, 1, 1758-1769.
- Hamburger, M.; Hostettman, K. (1991). Bioactivity in plants: The link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*, 30, 3864-3874.
- Hartley, G. S. and West, T. F. (1969). Chemical for Pest Control. Pergamon Press, Cap. 3-8.
- Harbone, J. B. (1988). Introduction to Ecological Biochemistry. 3rd Ed. Academic Press. London.
- Hejl, A. M.; Einhellig, F. A.; Rasmussen, J. A. (1993). Effects of Juglone on Growth, Photosynthesis and Respiration. *J. Chem. Ecol.*, 19, 559-568.

- Hiller, R. G. y Goodchild, D. J. (1981). Thylakoid membrane and pigment organization. En: *The Biochemistry of plants* Academic Press. New York 8, pp 1-49.
- Holm, L. G.; Plucknett, D. L.; Pancho, J. V. and Herberger, J. P. (1977). *The World's Worst Weeds. Distribution and Biology.* The University Press of Hawaii. Honolulu, pp 109.
- Holyoke Jr., C. W.; Reese, J. C. (1987). Acute Insect Toxicans from Plants. En: *Handbook of Natural Pesticides. Insect Growth Regulators.* E. D. Morgan and N. B. Mandava (Eds.). CRC Press, IIIB, 68-118.
- Horada, J. and Nakayama, M (1989). *Weed Res. Jpn*, **34**, 65-69.
- Hufford, C. D.; Funderburh, M. J.; Morgan, S. M. y Robertson, C. W. (1975). Two antimicrobial Alkaloids from heart wood of *Liriodendrom tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciencies.* **64**, 789-792.
- Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C. J. and McLaughlin, J. C.
- Hurt, E. y Hauska, G. (1981). A cytochrome b₆/f complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductada activity from spinach Chloroplasts. *European Journal Biochemistry*, **117**, 591-599.
- Inoue, M.; Nishimura, H.; Li, H. H.; and Mizutlón, J. (1992). Allelochemicals from *Polygonum sachalinense* F. R. Shm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 1833-1841.
- Isman, M. B. (1993). Growth inhibitory and antifeedant effects of azadirachtin on six noctuids of regional economic importance. *Pestic. Sci.*, **38**, 57-63.
- Isman, M. B. (1995). Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev. Pestic. Toxic.*, **3**, 1-20.
- Isman, M. B.; Matsuura, H.; Makinnon, S.; Durst, T.; Tower, G. H. N. and Arnason, J. T. (1996). Phytochemistry of the Meliaceae. En: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions.* John T. Romeo, Pedro Barbosa and James A. Sounders (Eds.). Plenum Press, New York and London **30**, pp 154-178.
- Izawa, S. and Ort, D. R. (1974). *Biochemical and Biophysical Acta*, **357**, 127.

- Izawa, S.(1977). Inhibitors of Electron Transport. *Enciclopedia of Plant Physiology, New series*, **5**, 226-282.
- Izawa, S. and Pan, R. L. (1978). *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **5**, 1171-1175.
- Izawa, S. and Good, N. E. (1983). Inhibition of Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. *Methods Enzimology*, **24**, 355-359.
- Jermy, T. (1990). Prospects of Antifeedant Approach to Pest Control. A Critical Review. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 3151-3166.
- Jiménez, A. A.; Mata, R.; Lotina-Hennsen, B.; Anaya, A. L. and Velasco, I. (1996). Phytogrowth-inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *J. Nat. Products*, **54**, 202-204.
- Kadota, S.; Marpaung, L.; Kikuchi, T and Ekimoto, H. (1989b). Mahonin and Secomahonin, New Tetranortriterpenoids from *Swietenia mahogani* Jacq. *Chemical Pharmaceutical. Bull.* **37**, 1419-1421.
- Kadota, S.; Marpaung, L.; Kikuchi, T. and Ekimoto, H. (1989a). Antagonists of Platelet Activating Factor from *Swietenia mahogani* Jacq. *Tetrahedron letters*, **30**, 1111-1114.
- Kadota, S.; Marpaung, L.; Kikuchi, T. and Ekimoto, H. (1990a). Constituents of the seeds of *Swietenia mahogani* Jacq.I. Isolation, Structures, and ¹H- and ¹³C-Nuclear Magnetic Resonance Signal Assignments of New Tetranortriterpenoids Related to Swietenine and Swietenolide. *Chemical Pharmaceutica Bull.* **38**, 639-651.
- Kadota, S.; Marpaung, L.; Kikuchi, T. and Ekimoto, H. (1990b). Constituents of the seeds of *Swietenia mahogani* Jacq.II. Structures of Swietemahonin A, B, C, D, E, F and G and Swietemahonolide. *Chemical Pharmaceutical. Bull.* **38**, 894-901.
- Kadota, S.; Marpaung, L.; Kikuchi, T. and Ekimoto, H. (1990c). Constituents of the seeds of *Swietenia mahogani* Jacq.III. Structures of Mahonin and Secomahoganin. *Chemical Pharmaceutical. Bull.* **38**, 1495-1500.
- Kadota, S., Yanagawa, K.; Kikuchi, T. and Tanaka, K. (1990d). Mahoganin, a Novel Dimeric Tetranortriterpenoid from *Swietenia mahogani* Jacq. *Tetrahedron letters*, **31**, 59433-5946.

- Khalid, S. A.; Duddeck, H.; González-Sierra, M. (1989). Isolation and Characterization of an Antimalarial Agent of the Neem Tree *Azadirachta indica*. *Journal Natural Products*, **52**, 922-927.
- Klocke, J. A. y Barny, M. A. (1989b). Plant Allelochemicals as sources and models of insect control agents. En: *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. C.H. Chou, G.R. Waller (Eds.). Institute of Botany, Academia Sinica. Taipei, Roc.Monograph Series, **9**, pp 455-465.
- Klocke, J. A.; Balandrin, M. F.; Barny, M. A. and Yamasaki, R. B.; Tlaipei, ROC. (1989c). Limonoids, Phenolics and Furocoumarins as Insect Antifeedant, Repellents and Growth Inhibitory Compounds. En: *Insecticides of Plant Origen*. J.T. Arnason, B.J.R. Philogene and P. Morand (Eds.). A.C.S. Symp. Ser. **387**, pp 137-149.
- Klocke, K. A. (1989a). Plants compounds as sources and models of insect-control agents. En: *Economic and Medicinal Plant Research*. H. Wagner, H. Hikino, and N. R. Farnsworth (Eds.) Academic Press. **3**, pp 104-144.
- Kubo, I. (1991). Screening Techniques for Plant-insect Interaction. En: *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*. Hostteman K. (Eds.). C. A. Academic Press. London, **6**, pp 179-193.
- Kubo, I. (1993). Insect Control Agents from Tropical Plants. En: *Phytochemical Potential of Tropical plants*. K. R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (Eds.). Plenium Press. New York. **27**, pp 133-151.
- Lavie, D.; Levy, E. C.; Rosito, C. and Zelnik, R. (1970). Studies on Tetranortriterpenoids from *Cedrela augustifolia* Seseé and Moc. *Tetrahedron*, **26**, 219-226.
- Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjec, B.; and Mukherjec, K. (1982). The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2783-2813.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. C.; Cox, M. M. (1993). *Principles of Biochemistry*, Ed. Worth, 2^a Ed. New York.
- Litchfield, J. T. and wilcoxon, F. A (1949). A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**, 99-113.
- Lopes, M. N.; Da Siva, M. S.; Barbosa, J. M.; Ferreira, Z. S.; Yoshida, M and Gottlieb, O. R. (1986). Unusual benzofuranoid neolignans from *Licaria chrysophylla*. *Phytochemistry*, **25**, 2609-2612.

- Lotina-Henssen, B.; Bernal-Morales, E. L.; Jiménez, M. y Aguilar, M. (1991). Inhibition of oxygen evolution by cacalol and its derivatives. *Z. Naturforsch*, **46**, 777-780.
- Lotina-Henssen, B.; Bernal-Morales, E.; Romo de Vivar, A.; Perez-C., A. L.; Castro-R., A.; and Aguilar-Martínez, M. (1992). Inhibition of oxygen evolution by zaluzanin. *C. J. Chem. Ecol.*, **18**: 1891-1900.
- Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Massanet, G. M. Rodríguez-Luis and Zubía E. (1993). Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.*, **19**, 1372-1379.
- Macías, J. (1995). Allelopathy in the search for natural herbicide models. En: *Allelopathy: Organisms, Processes and Applications*. Inderjit Dakshini, K. M. N. and Einhellig, F. A. (Eds.). ACS Symposium Series 582, USA. pp 310-329.
- Macías R. M. (1996). Determinación del Potencial Herbicida de los Principios Fitotóxicos de *Esenbeckia yaxhoob* y *Stauranthus perforatus*. B. S. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad nacional Autónoma de México.
- Mackinnon, S.; Durst, T.; Arnason, J. T.; Angerhofer, C.; and Pezzuto, J. (1997). Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and Gedunin Derivatives. *J. Nat. Prods.*, **60**, 336-341.
- Macleod, J. K.; Moeller, P. D. R.; Molinski, T. F. and Koul, O. (1990). Antifeedant activity against *Spodoptera litura* larvae and (¹³C) NMR spectral assignments of the meliatoxins. *J. Chem. Ecol.*, **16**, 2511-2518.
- Martínez, M. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*. Ediciones Bota, México. 6a Ed., pag. 390.
- Mata, R. (1993) Chemical Studies and Biological Aspects of some Mexican Plants Used in Traditional Medicine. En: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Downum, K. R.; Romeo, J. T.; Stafford, H. A. (Eds.). Plenum Press, N. Y. *Recent Advances in Phytochemistry*, **27**, pp 41-64.
- Mathis, P. and Rutherford, A. W. (1984). Effect of phenolics herbicides on the oxygen-evolving side of photosystem II. *Biochemica of Biophysica Acta*, **767**, 217-222.
- McCarty, R. E. and Racker, E. (1965). Dio-9 an Inhibitor of Coupled Electron Transport and Phosphorylation in Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**, 4822-4823.

- McCarty, R. E. (1977). Energy Transfer Inhibitors of Photophosphorilation in Chloroplasts. *Enciclopedia of Plant Physiology. New Series*, pp 436-447.
- McPhail A. T. and G. A. Sim. (1964). The constitution and absolute stereochemistry of Swietenine. *Tetrahedron letter*, **37**, 2599-2601.
- Melandry, B. (1975). *Biochemistry and Biophysical Acta*, **376**, 72-81
- Mendoza, J. L.; Jiménez, M. and Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and Diacetyl-Piquerol Act as Energy Transfer Inhibitor of Photosynthesis. *Pesticides Science*, **40**, 37-40.
- Mersie, W. Y.; Singh, M. (1993). Phenolic Acids Effect Photosynthesis and Protein Synthesis by Isolated Leaf Cells of velvet-leaf. *J. Chem. Ecol.*, **19**, 1293-1301.
- Mikolajczak, K. L. and Reed, D. K. (1987). Extractives of seeds of the Meliaceae. Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.) and *Artemia salina* Leach. *Journal Chemical Ecology*, **13**, 99-111.
- Mikolajczak, K. L and Weisleder, D. (1988). A limonoid antifeedant from seed of *Carapa procera*. *Journal of Natural Products*, **51**, 606-610.
- Mitchel, P. (1977). A Comentary an Alternative Hypothesis of Protonic Couplin in the Membrane system Catalisis Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *FEBS Letters*, **78**, 1-20.
- Mootoo, B. S.; Ramsewak, R.; Khan, A.; Tinto, W. F., Reynolds, W. F.; Mclean, S. and Yu, M. (1996). Tetranortriterpenoids from *Ruagea glabra*. *Journal Natural Products*, **59**, 544-547.
- Moreland, D. E. (1980). Mechanisms of action at herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 597-638.
- Morgan, E. D. and Wilson, I. D. (1985). Methods and Techniques for Isolation of Pesticides. En: *Handbook of Natural Pesticides: Methods. Isolation and Identificatio*. N.B. Mandava (Eds.) CRC Press, II, pp 3-81.
- Mulholland, H. and Taylor, D.A.H. (1988). Limonoids extractives from the genera *Capuronianthus neobeguea* and *C. quivisinathe*. *Phytochemistry*, **27**, 1741-1743.

- Nakatani, M. J. C.; Nakanishi, J. K. (1981). Isolation and Structure of Trichilins. Antifeedants the Southern Army Worm. *J. Amer. Chem. Soc.* **103**, 1228-1230.
- Nakatani, M.; Iwashita, T. and Hase, T. (1985). Structure of limonoids antifeedant from *Trichilia rokka*. *Phytochemistry*, **24**, 195-197.
- Nakatani, M.; Huang, R. C.; Okamura, H; Naoki, H. and Iwagawa, T. (1994). Limonoids antifeedant from Chinese *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, **36**, 39-41.
- Negwer, M. (1987). Organic-Chemical Drugs and their Synonyms. 6th De. Akademie-Verlag Berlin. pp.184.
- Okorie, D. A. and Taylor, D. A. H. (1968). Extractives from the seed of *Cedrela odorata* L.. *Phytochemistry*, **7**, 1683-1686.
- Okorie D. A and Taylor D. A. H. (1970). Limonoids from *Xilocarpus granatum* Koenig. *J. Chem. Soc.* 212-213.
- Okorie, D. A. and Taylor, D. A. H. (1971). Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*, **10**, 469-470.
- Olmo, L. R. V.; Da Silva, D. M. F.; Fo, E. R; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Marsaioli, A. J.; Pinheiro, A. L. and Vilela, E. F. (1996). Rearranged limonoids from *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry*, **42**, 831-837.
- Ouitrakul, R. and Izawa, S. (1973). Electron transport and Phosphorilation in Chloroplasts as a Funtion of the Electron Transport. *Biochemical and Biophysical Acta*, **305**, 105-118.
- Pennington, T. D. (1981). *Swietenia humilis*. En: Flora Neotropica A Monograph (28) of neotropical Meliaceae. (Eds.). The New York Botanical Gardean, Bronx, N.Y. **28**, 389-406.
- Peña-Valdivia, C. B.; Rodríguez-Flores, L.; Tuena de gómez Puyou and Lotina-Hennsen, B. (1991). Inhibition of Photophosphorylation and electron transport by N, N-dimethylformamide. *Biochemical Chemical*, **41**, 169-174.
- Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Wickramaratne, D. B. M.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. (1993). Tricolorina A, Major Phytogrowth Inhibitor from *Ipomea tricolor* *Journal of Natural Products*, **56**, 571-582.

- Perkins, J. H. (1985). Naturally occurring pesticides and the pesticide crisis 1945 to 1980. En: Handbook of Natural Pesticides: Methods. Theory, Practice and Detection. N.B. Mandava (Eds.) CRC Press, I, pp 297-325.
- Pettit, G. R.; Barton, D. H. R.; Harold, C. L.; Polonsk, K. L. Schmidt, J. M. and Connolly, J.D. (1983). Evaluation of limonoids against the murine P388 lymphocytic leukemic cell line. *Journal Natural Products*, **46**, 379-390.
- Pillmoor, J. B.; Wright, K. And Terry, A. S. (1993). Natural Products as a Source of Agrochemicals and Leads for Chemical Synthesis. *Pestic. Sci.*, **39**, 131-140.
- Plapp Jr, F. W. (1981). The Nature Modes of Action and Toxicity of Insecticide. En: Handbook of Pest Management in Agriculture. D. Pimentel (Eds.) III, pp 3-16.
- Polonski, J.; Varon, Z.; Marazano, C.; Arnaux, B. Pettit, G. R.; Schmidt, J. M.; Och, M. and Katsuki, H. (1979). The structure of amoorastanone and the cytotoxic limonoid 12-hydroxyamoorastanin. *Experimentia*, **35**, 987-989.
- Prancee, G. T. (1994) Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba Foundation Symposium 185. (Eds)John Wiley and Sons. New York.
- Putman, A. R.; Detrank, J.; and Barnes, J. P. (1983). Exploitation of allelopathy for weed control in annual and perennial cropping systems. *J. Chem. Ecol.*, **14**, 845-853.
- Rembold, H. (1989). The azadirachtins- Their Potential for Insect Control. En: Economic and Medicinal Plat Research. H. Wagner, H. Hikiro, N.R. Farnsworth (Eds.). Academic Press, **3**, pp 57-71
- Rembold, H. and Puhlman, I. (1993). Phytochemistry and Biological Activity of Metabolites from Tropical Meliaceae. En: Phytochemical Potential of Tropical Plants. K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (Eds.). Plenum Press. New York. **27**, pp 153-165.
- Reynols T. (1978). Comparative Effects of Aromatic Compounds on Inhibition of Lettuce Fruit Germination. *Ann. Bot.*(London), **42**, 419-422.
- Rice, E. L. (1987). Allelopathy: An overview. In. George R. Waller (Eds.) Allelochemicals Role in Agriculture and Foresty American Chemical Society Washington, pp. 9-22.

- Rodriguez, E.; Tower, G. H. and Mitchell, J. C. (1976) Biological activities of serquiterpene lactone. *Phytochemistry*, **15**, 1573-1580.
- Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México, De. Limusa. Cap. 11, pp 159-178.
- Sánchez, M. P. N. and Soto, C. D. F. (1994). Compuestos bioactivos de *Ratibida mexicana* (Wats) Sharp. (Asteraceae). Tesis Licenciatura. Facultad de Química U.N.A.M.
- Sanni, B. S.; Behm, H. and Beurskens, P. T. (1987). Structure and absolute configuration of *Cedrela odorata* substance B (Mexicanolide). *Acta Cryst C* **43**, 1400-1403.
- Schmutterer, H. (1987). Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chinaberry trees. En: Handbook of Natural Pesticides. Insect Growth Regulators. E.D. Morgan y N.B. Mandava (Eds.) CRC Press, **IIIB**, pp 119-170.
- Schmutterer, H. (1995). The Neem Tree. *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceus Plants. Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes. V.C.H. Weinheim. Cap. 1 and 8, pp 1-25, 453-468.
- Segura, R.; Calderon, J.; Toscano, R.; Gutiérrez, A.; Mata, R. (1994). Cedrelanolide I, a new limonoid from *Cedrela salvadorensis*. *Phytochem. Soc. N. Amer. Newslett.* **4**, 29.
- Segura-Correa, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Hernández-Bautista, B.; Villena, R.; Soriano-García, M. and Bye, R. (1993). New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J. Prod. Nat.* **56**, 1567-1574.
- Sharon, M. S; McEwen, F. L. and Harris, C. R. (1981). Movement of Insecticides in the Environment and biodegradability. En: Handbook of Pest Management in Agriculture. D. Pimentel (Eds.) **III**, pp 143-166.
- Shettel, N. L. and Balke, N. E. (1993). Plant Growth Response to Several Allelopathic Chemicals. *Weed Sci.*, **31**, 293-298.
- Sigar, G. S. S and Chakravarty, T. W. (1951). The chemical investigation of the seeds of *Swietenia macrophylla*. Part I. The non-bitter principle. *J. Indian Chem. Soc.* **28**, 207-210.
- Sondengan, B. L.; Kamga, C. S. and Connolly J. D. (1980). Proceranolide, a novel tetranortriterpenoid from *Carapa procera*. *Phytochemistry*, **19**, 2488.

- Soriano-Garcia, M.; Jiménez, M. A.; Mata, R. and Segura-Correa, R. (1996). Humilinolide D. *Acta Cryst.* **C25**, 1527-1529.
- Soto-Núñez, J. C. (1987). La Plantas Medicinales y su Uso Tradicional en la Cuenca del Rio Balsas: Estados de Michoacán y Guerrero, México. B. S. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, pag. 98.
- Standley and Steyermark. (1946). Flora de Guatemala. *Fieldiana Botany*, **24**, 270-295.
- Standley, P. C. S. (1968). Trees and Shrubs of Mexico. United States National Herbarium (1920-1926), 560.
- Stiles, L. H.; Leather, G. R.; Chen, P. K. (1994). Effects of Two Sesquiterpene Lactones Isolated from *Artemisia annua* on Physiology of *Lemna minor*. *J. Chem. Ecol.* **20**, 969-978.
- Strain, H. H.; Cuppe, B. T. and Suec, W. A. (1971). Analytical Procedures for the Isolation, Identification, Estimation and Investigation of the Chlorophylls. *Methods Enzimology* **23**, 452-476.
- Styles, B. T. (1981). Flora neotrópica, **28**, 359.
- Taylor, D. A. H. (1969). Extractives from *Swietenia mahogani* (L.) Jacq. *Chem. Comm.* 58.
- Taylor D. A. H. (1974). ¹³C Nuclear Magnetic Resonance spectra of some limonoids. Part I. The structure and procerin an extractive from *Carapa procera*. *L. Chem. Soc. Perkin I*, 437-441.
- Taylor, A. R. H. and Taylor, A. H. (1983a). Limonoids extractives from *Swietenia macrophylla*. *Phytochemistry*, **22**, 2870-2871.
- Taylor, D. A. (1983b). Biogenesis, Distribution and Systematic Significance of Limonoids in the Meliaceae, Cneoraceae and Allied Taxa. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **22**, 353-375.
- Taylor, D. A. H. (1984). The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae. *Fortschritte J. Chem. Org. Naturst.* **455**, 1-102.
- Terry, P. J. (1991). Grassy Weeds. A General Overview. En: Tropical Grassy Weeds. F. W. G. Baker and P. J. Terry (Eds). C.A.B. International for CASAFA. Gran Bretaña. Cap. 1, pp 5-38.

- Trebst, A. (1972). Measurement of Hill reactions and photoreduction, *Methods in Enzimology*, **24**, 146-165.
- Toscano, R. A.; Mata, R.; Calderon, J. and Segura, R. (1996). Gedunin a D-seco limonoids. *J. of Chem. Crystallography*, **26**, 707-711.
- Van der Nat, J. M.; Vander, S. L.; Hart, L. A.; Van-Dijk, H.; Da Silva, K. T. D. and Labadie, R. P. (1991). Activity-guided Isolation and Identification of *Azadirachta indica* Bark Extract Constituents which Specifically Inhibit Chemiluminescence Production by Activated Human Polimorphonuclear Leukocytes. *Planta Medica*, **57**, 65-68.
- Venucci, C.; Lange, C.; Lhommet, G.; Dupont, B.; Davoust, D.; Vauchot, B.; Clement, J. T. and Brunck, F. (1992). An Insect Antifeedant Limonoid From Seed of *Khaya ivorensis*. *Phytochemistry*. **31** 3003-3004.
- Veron, L. P. and shaw, E. R. (1969). Photoreduction of 2,4-dichlorophenolindophenol by Diphenylcarbazine; a Photosystem II Reaction Catalized by Tris-washed Chloroplast Fragments. *Plant Physiology*, **44**, 1645-1649.
- Villarreal, I. C. (1996). Protolimonoides y Limonoides Bioactivos de *Guarea grandifolia* A.P. de Candolle (Meliaceae). B.S. Tesis. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Voet, D. and Voet, J. G. (1995). Biochemistry, 2a Ed. John Willey and Sons Inc. Cap. **22** pp. 364-429.
- Vogel, A. Y. (1989). Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. 5th Ed. Longman Scientific and Technical, U. K. pp 1225.
- Waterman, P. G. (1993). Phytochemical Diversity in the Order Rutales . En: Phytochemical Potential of Tropical Plants. K. R. Downum, J. T. Romeo, H. AS. Stafford (Eds.). Plenum Press. **27**, 203-234.
- Worsham, A. D. (1989). Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. En: Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones. C. H. Chou, G. R. Waller. (Eds). Institute of Botany Academia Sinica Monograph Series Nº 9. Taipei ROC. pp 275-291.
- Xie, Y. S.; Isman, M. B.; Gunning, P.; Mackinnon, S.; Arnason, J. T.; Taylor, D. R.; Sánchez, P.; Hasbun, C.; Towers, G. H. N. 1994. *Biochem. System. Ecol.* **22**, 129-136.

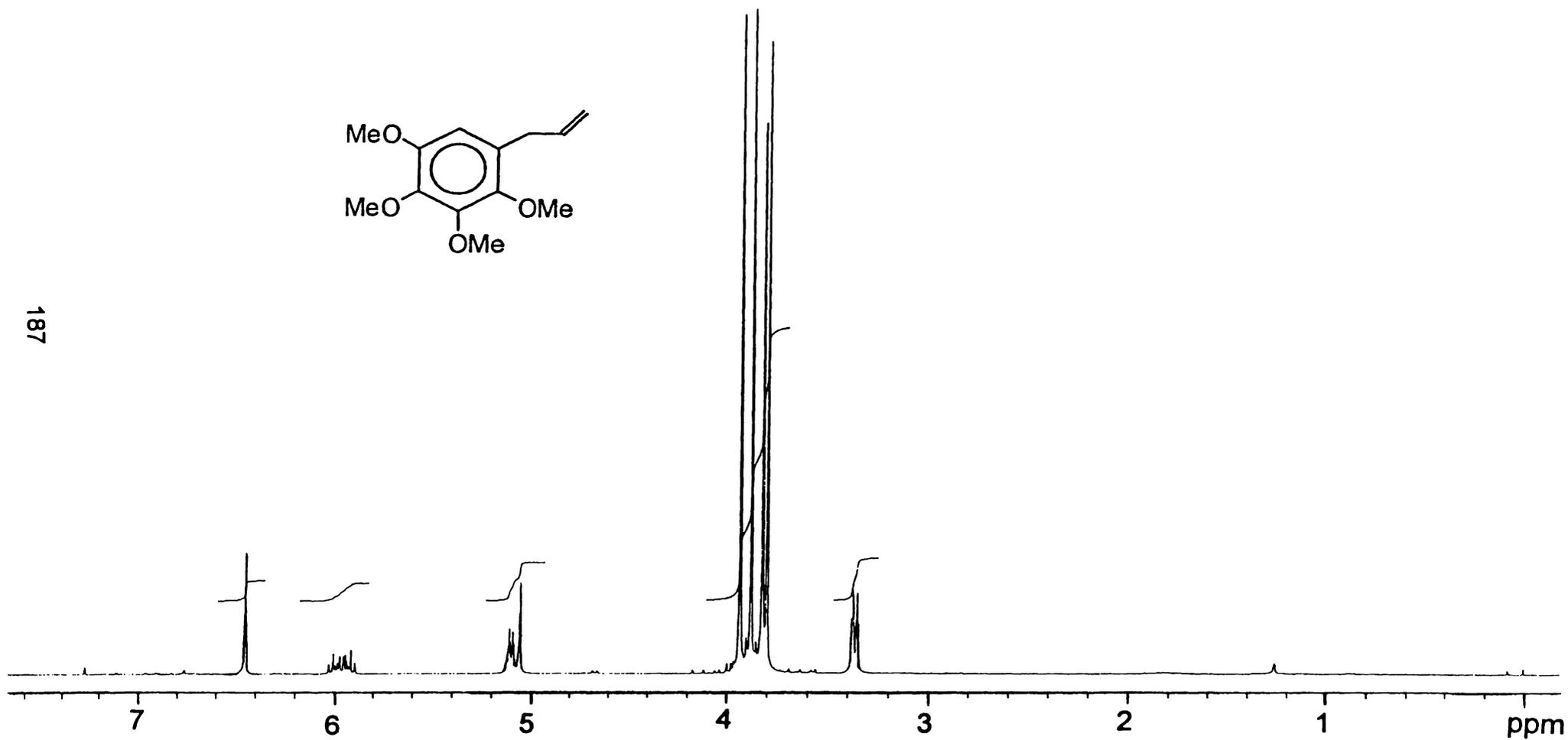
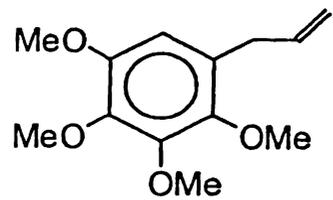
Yamasaki, R. B., Ritland, T. G.; Barny, M. A. and Klocke, J. A. (1988). Isolation and purification of salanin from neem seeds and its quantification neem and chinaberry seeds and leaves. *J. Chromatogr.*, **477**, 277-283.

Zhou, J. B.; Okamura, H.; Iwagawa, T. and Nakatani, M. (1996). Limonoids Antifeedant from *Melia toosendan*. *Phytochemistry*, **41**, 117-120.

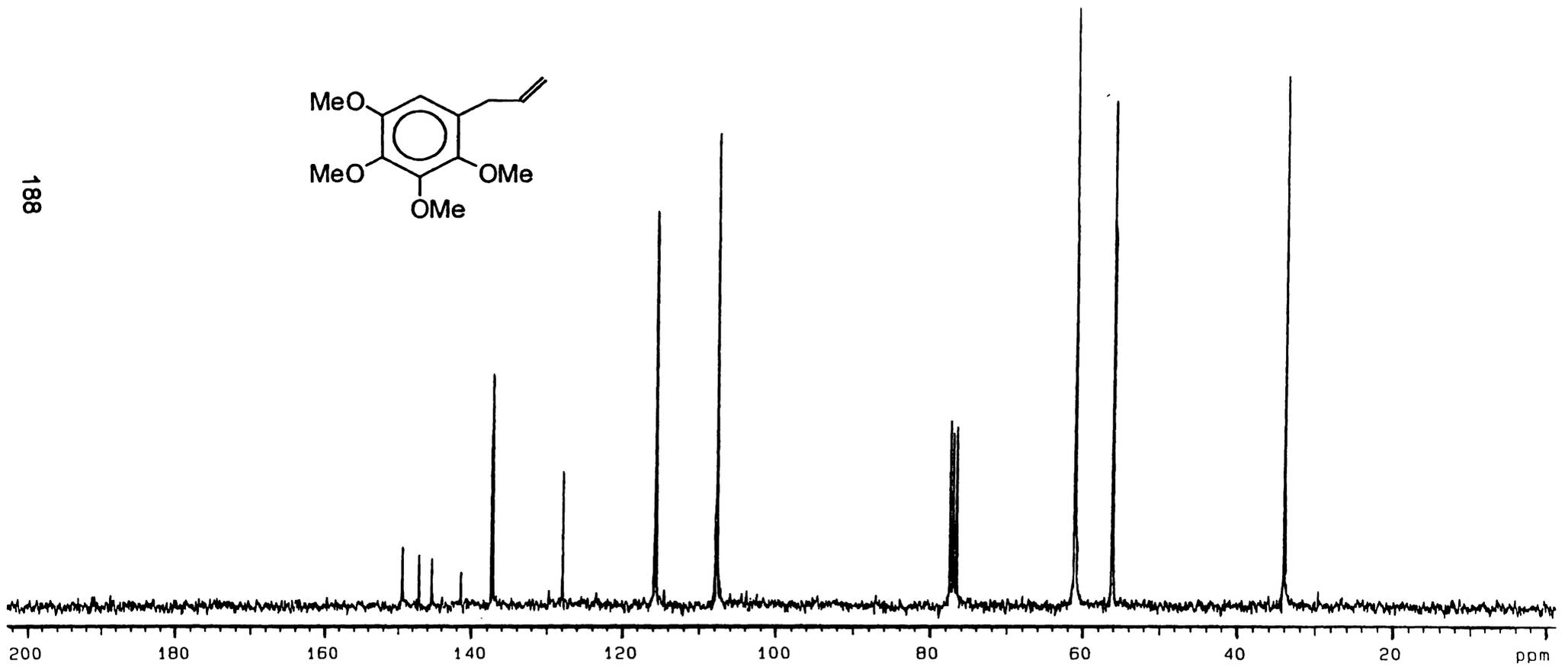
Apéndice I

Espectros.

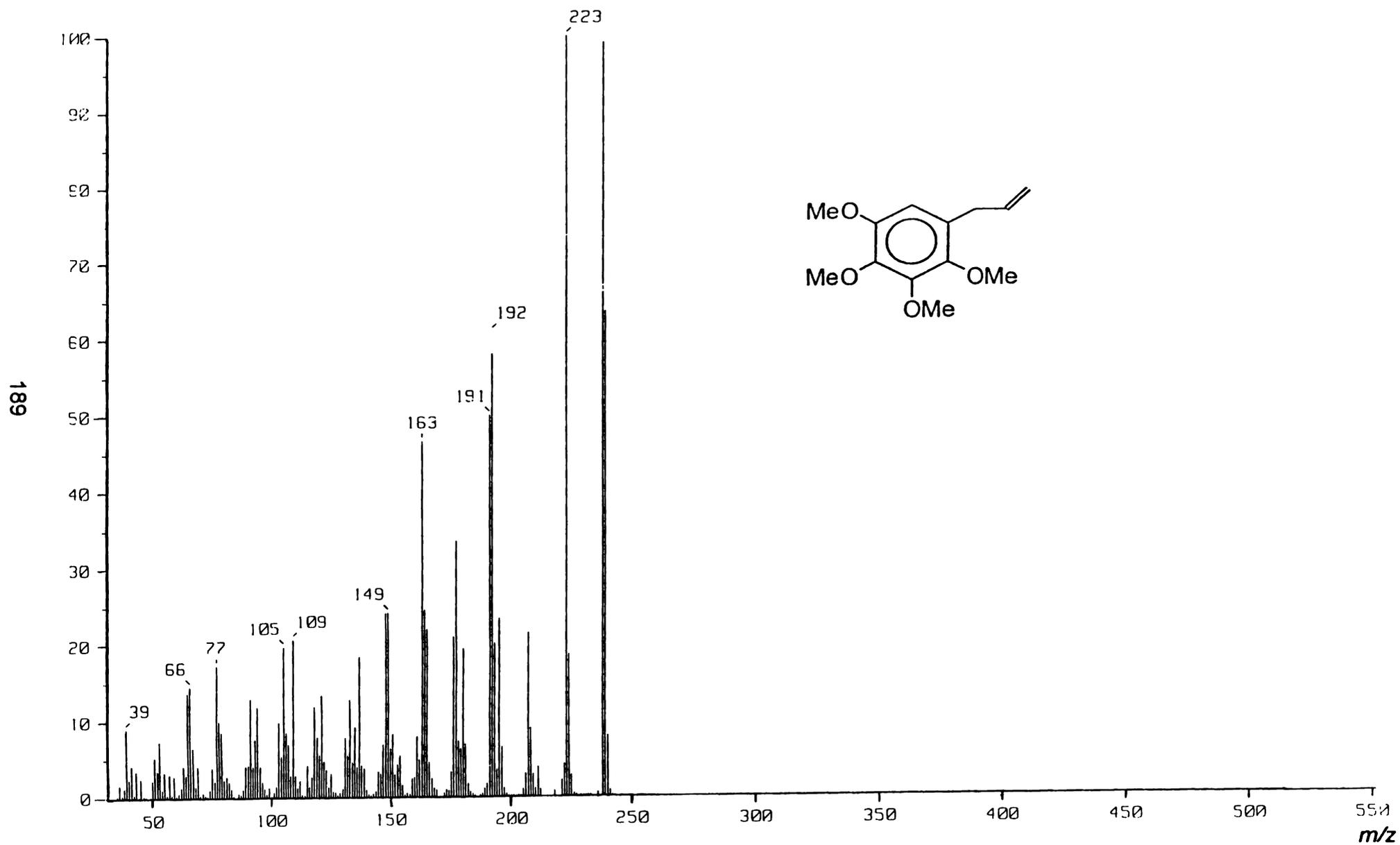
187



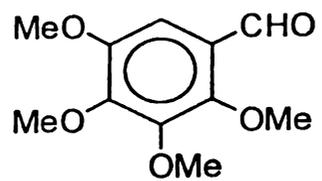
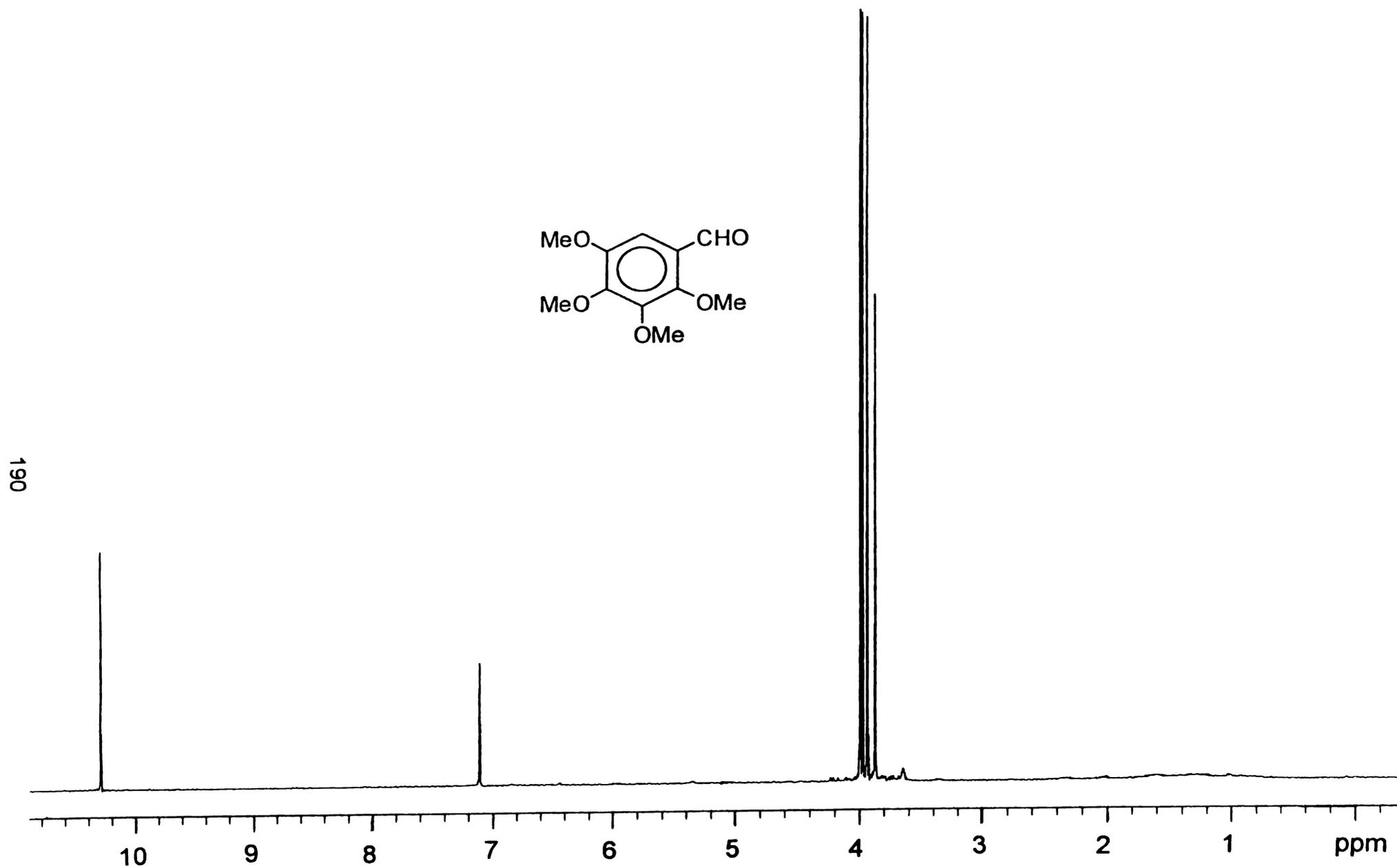
Espectro 1. Espectro de RMN-¹H del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57)



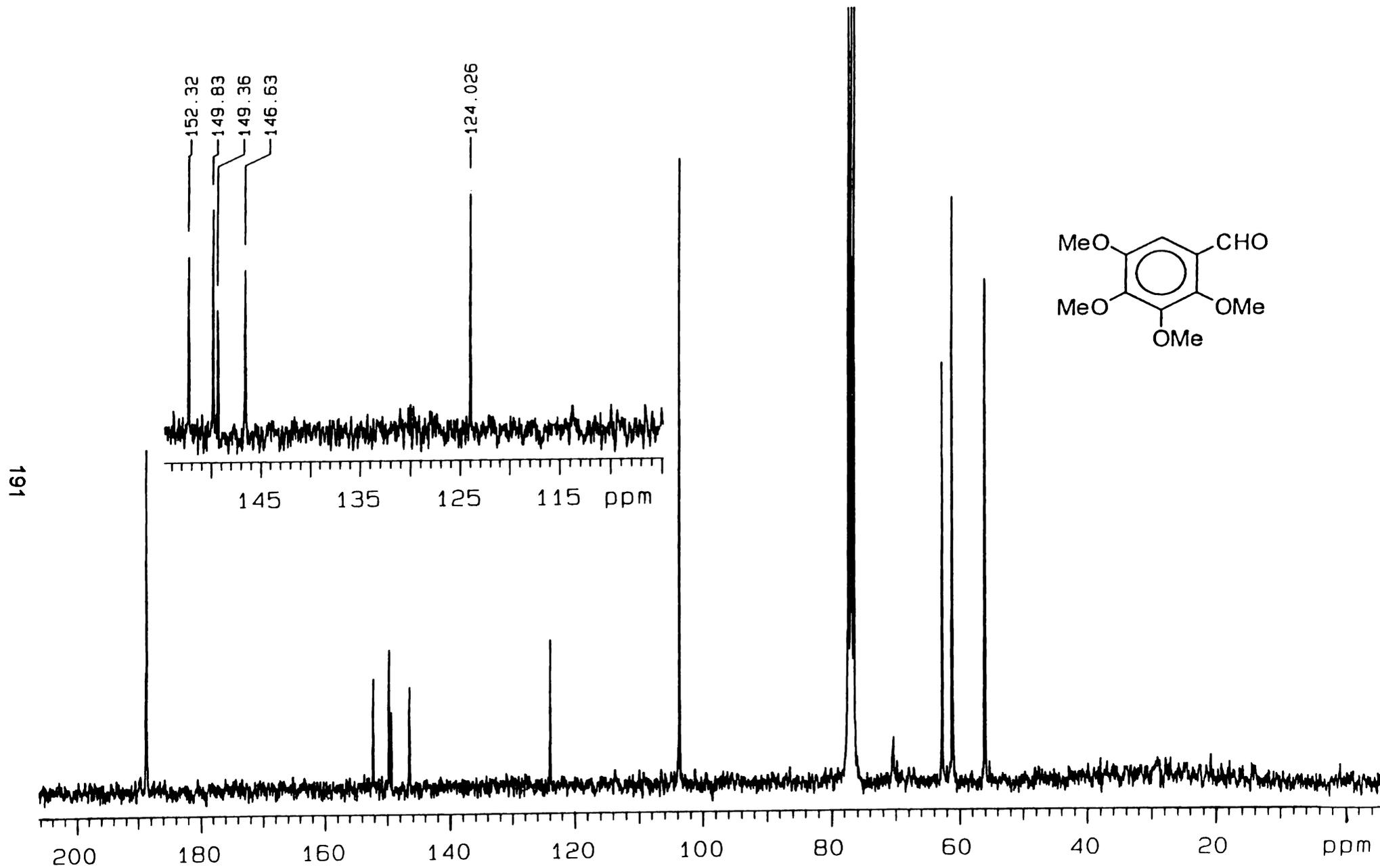
Espectro 2. Espectro de RMN-¹³C del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57)



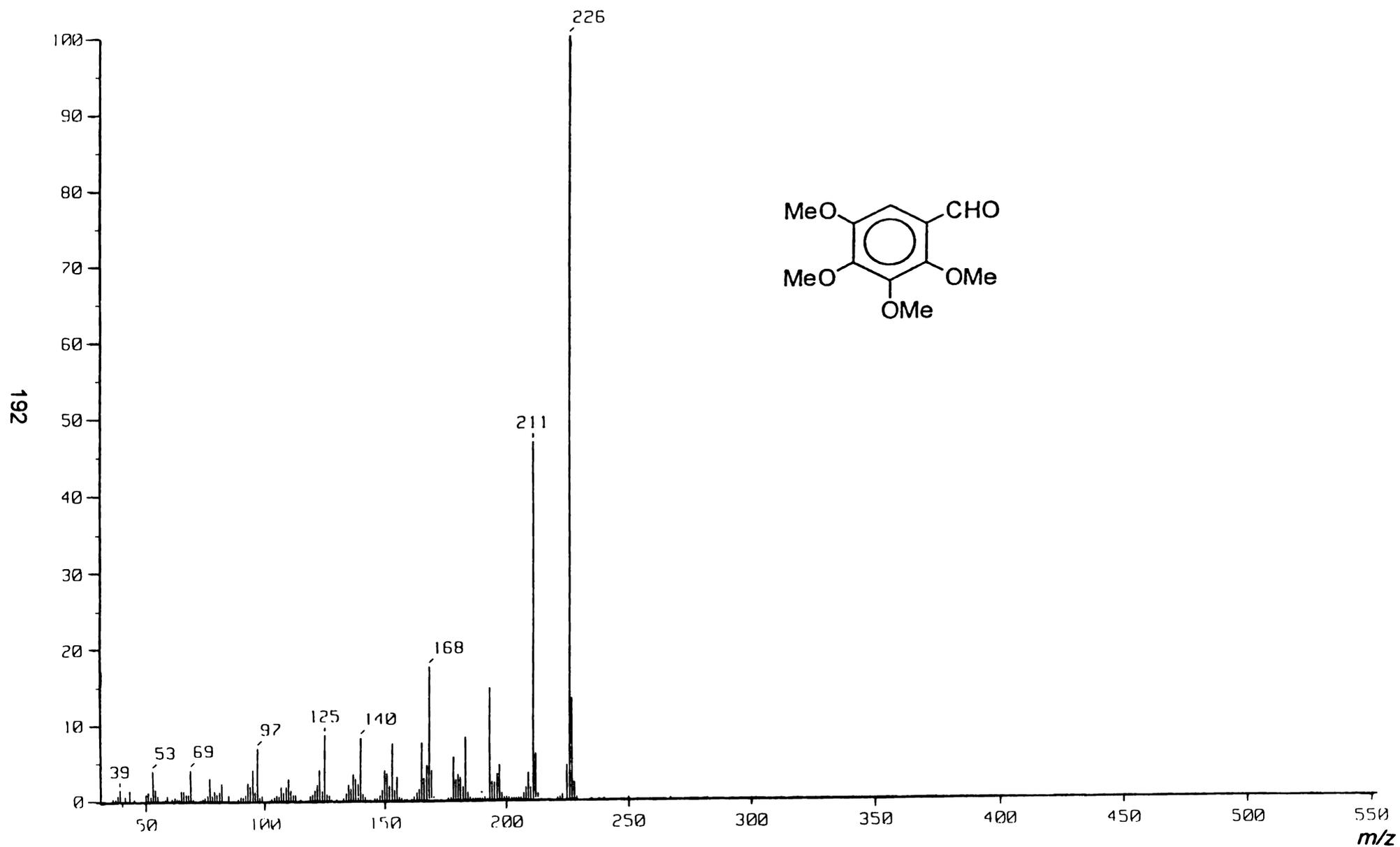
Espectro 3. Espectro de Masas del 1,2,3,4-tetrametoxi-5-(2-propenil)benceno (57)



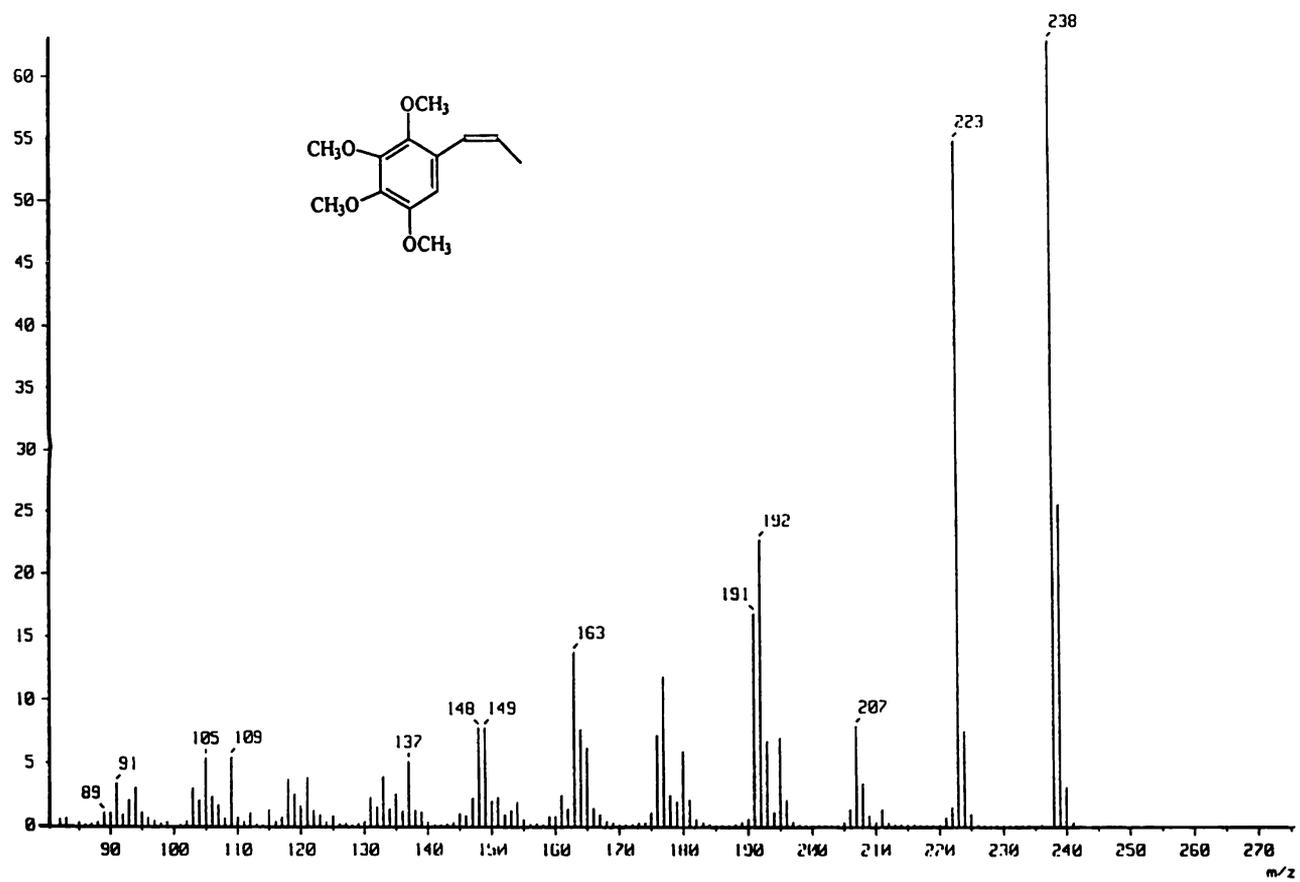
Espectro 4. Espectro de RMN-¹H del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido (58)



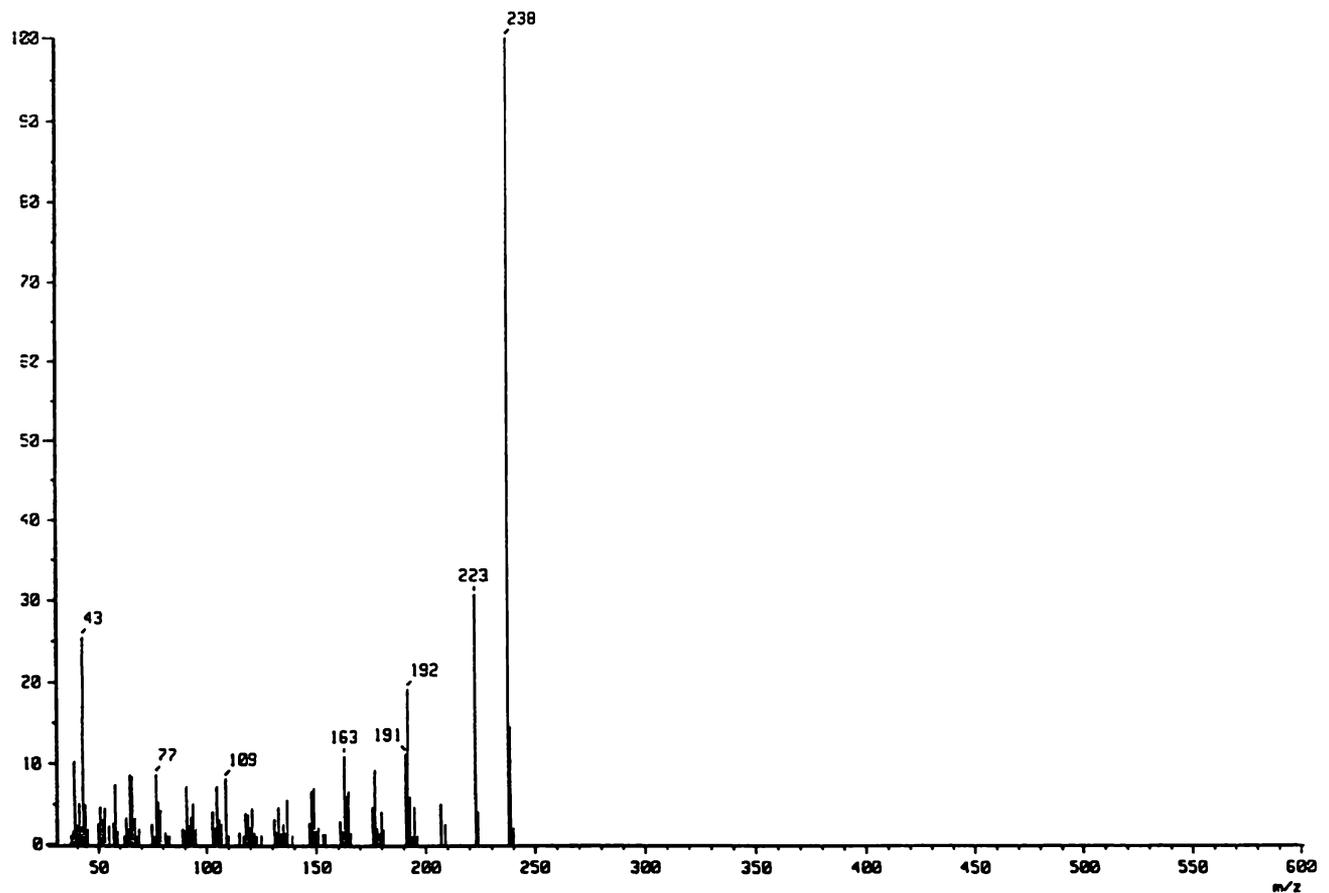
Espectro 5. Espectro de RMN- ^{13}C del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehido (58)



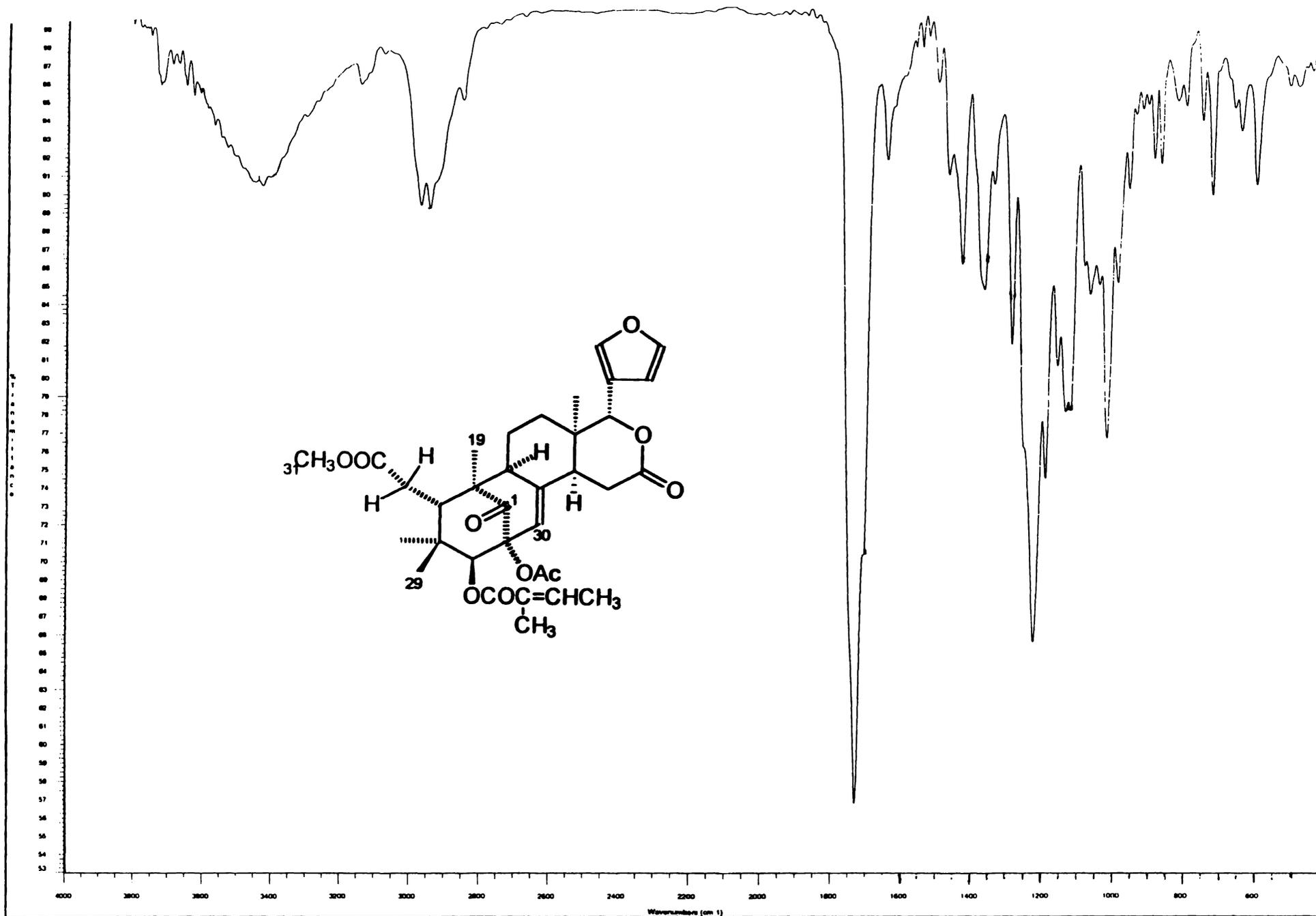
Espectro 6. Espectro de Masas del 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehio (58)



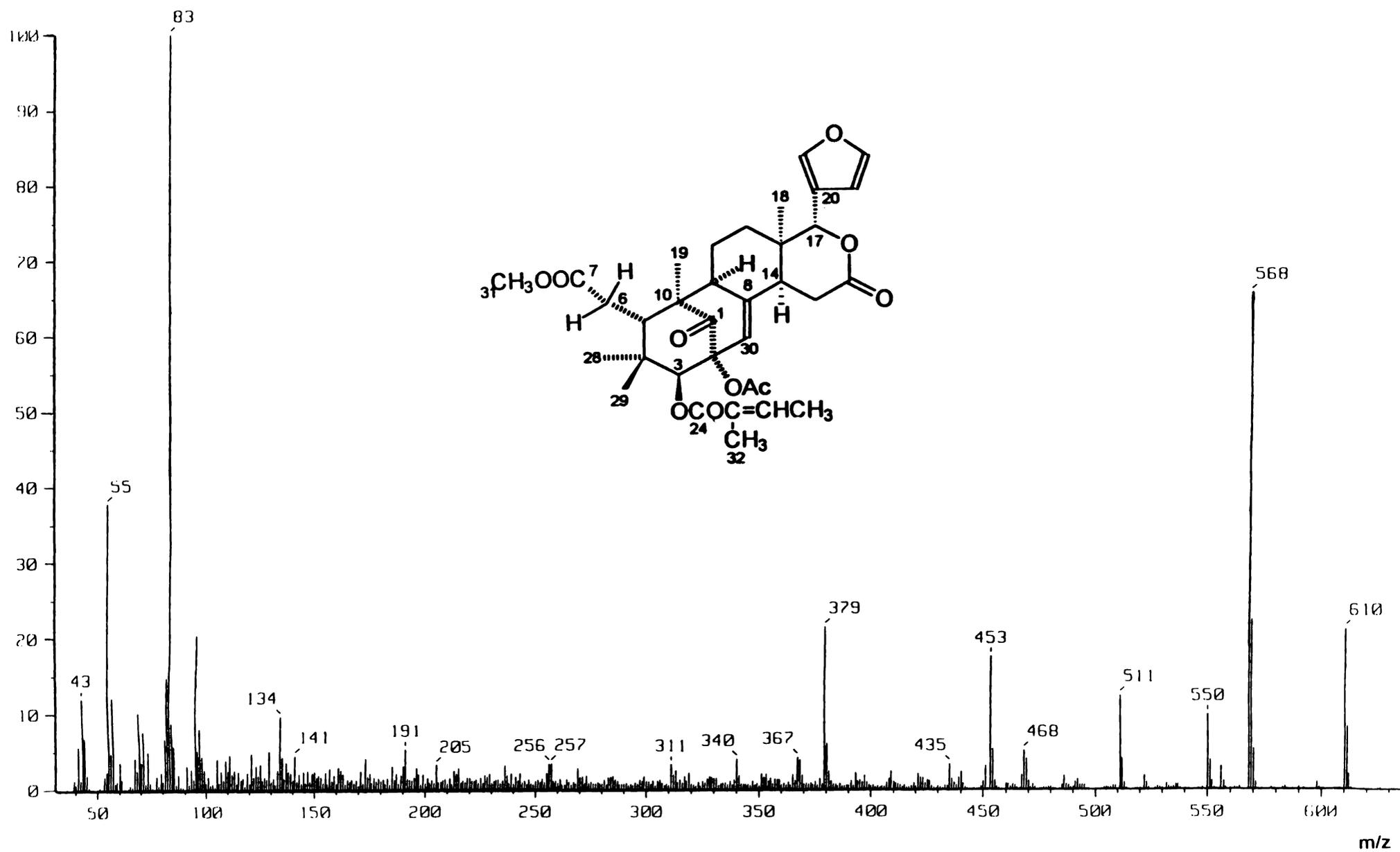
Espectro 7a. Espectro de Masas de la *cis*-isomirisatcina (63)



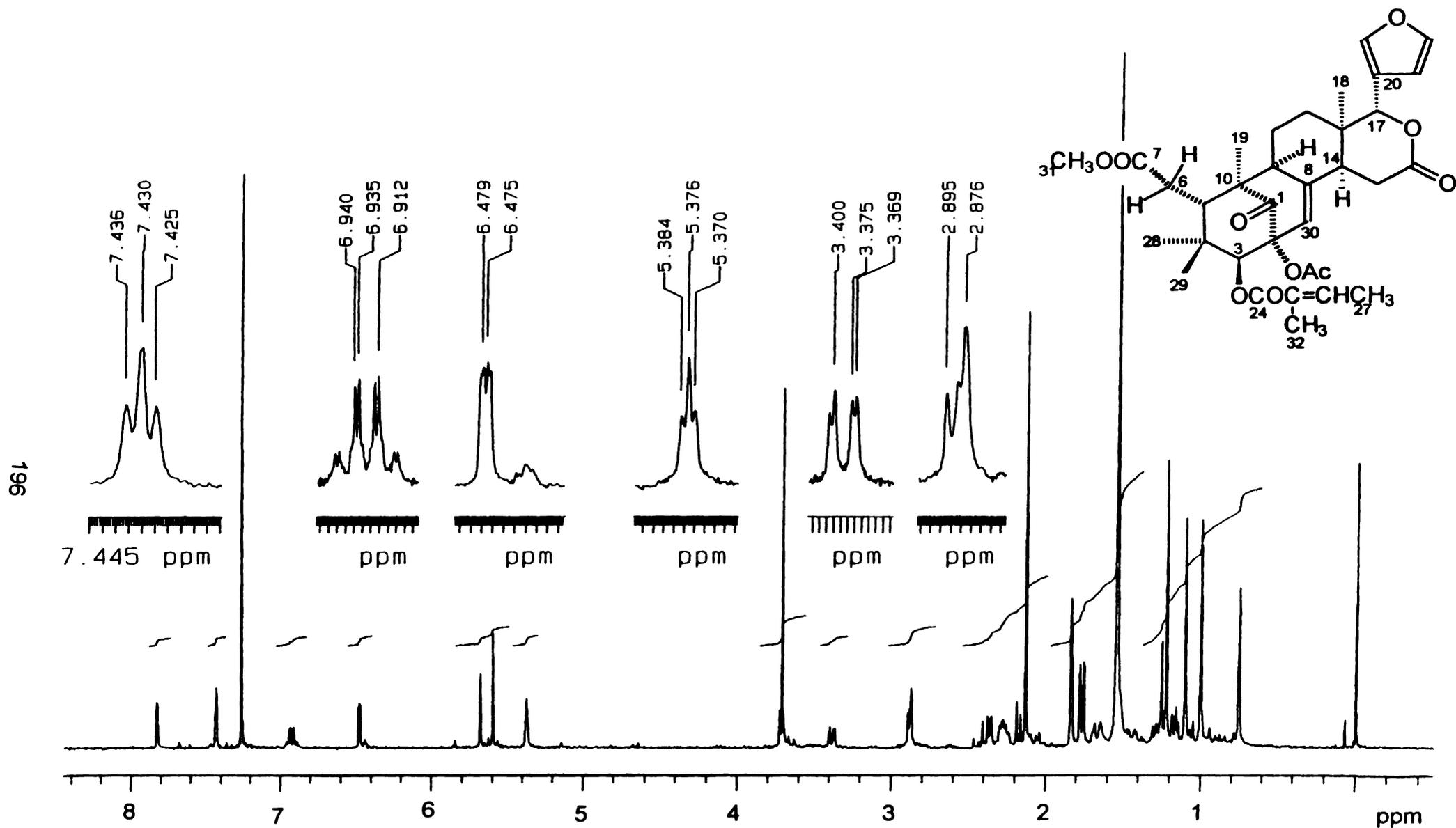
Espectro 7b. Espectro de masas comparativo de la *cis*-iso-mirisatcina (63) generado en el banco de datos PubChem/NIST.



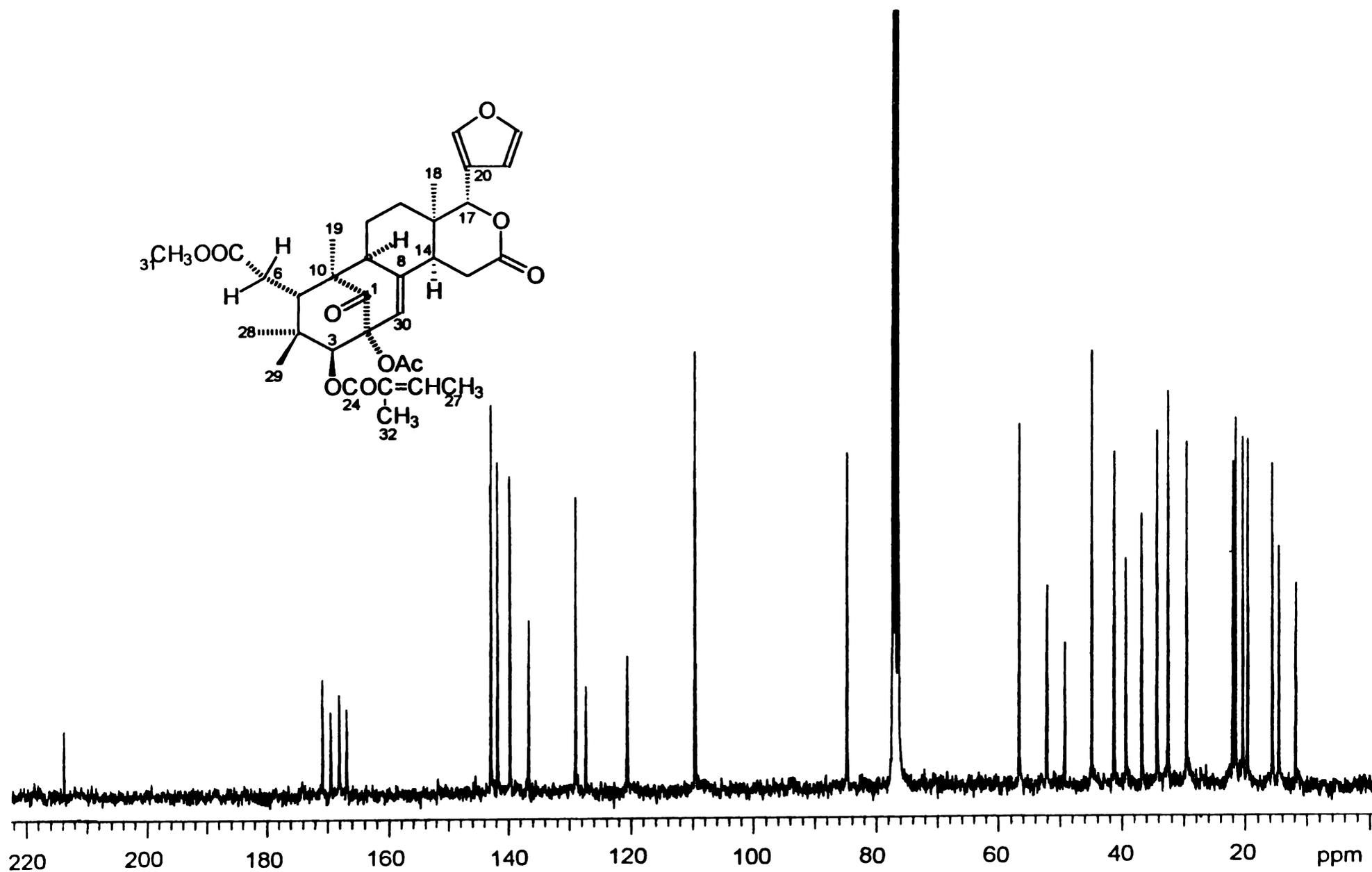
Espectro 8. Espectro de IR de la humilinólida C (28).

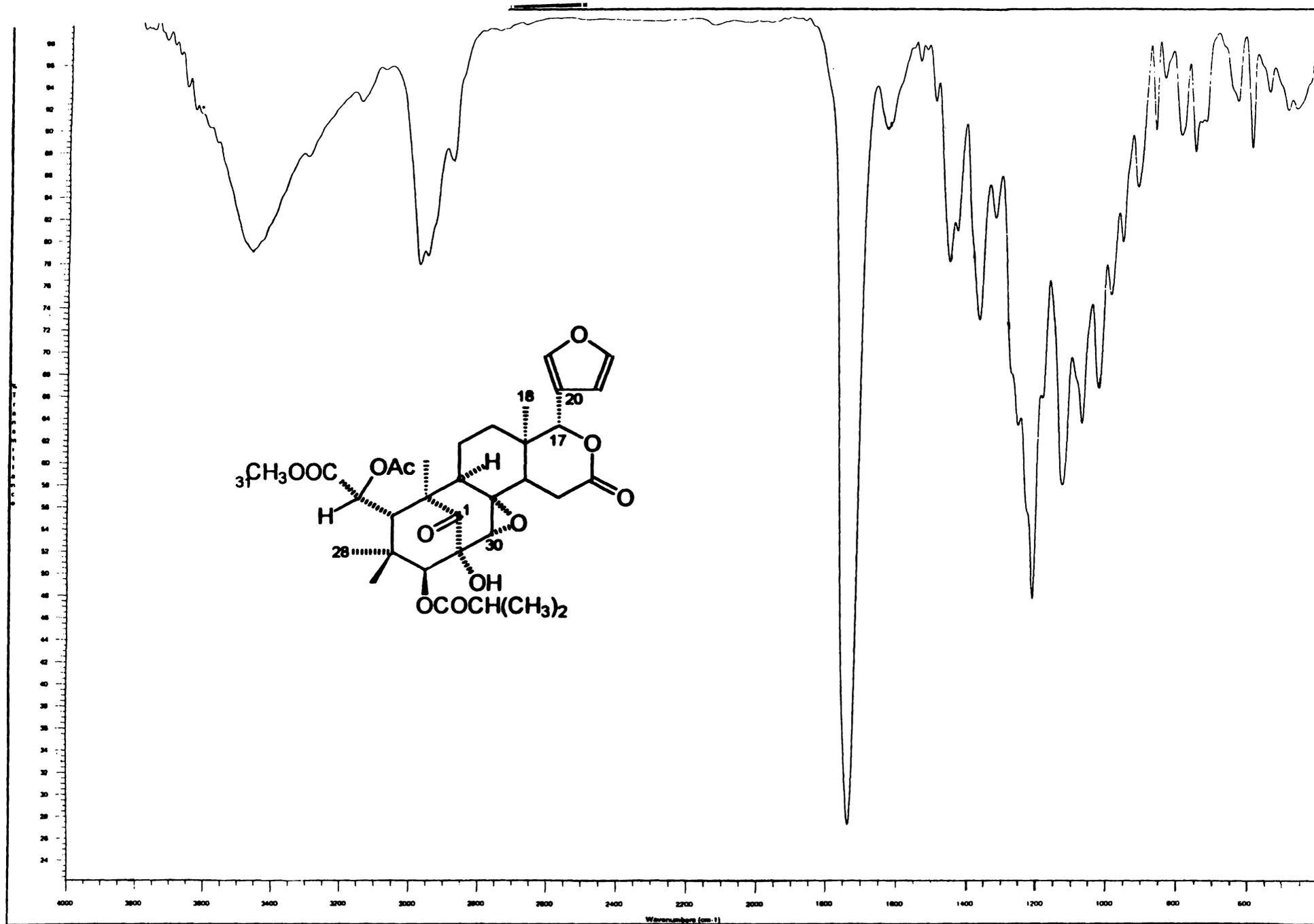


Espectro 9. Espectro de masas de la humilinólida C (28).

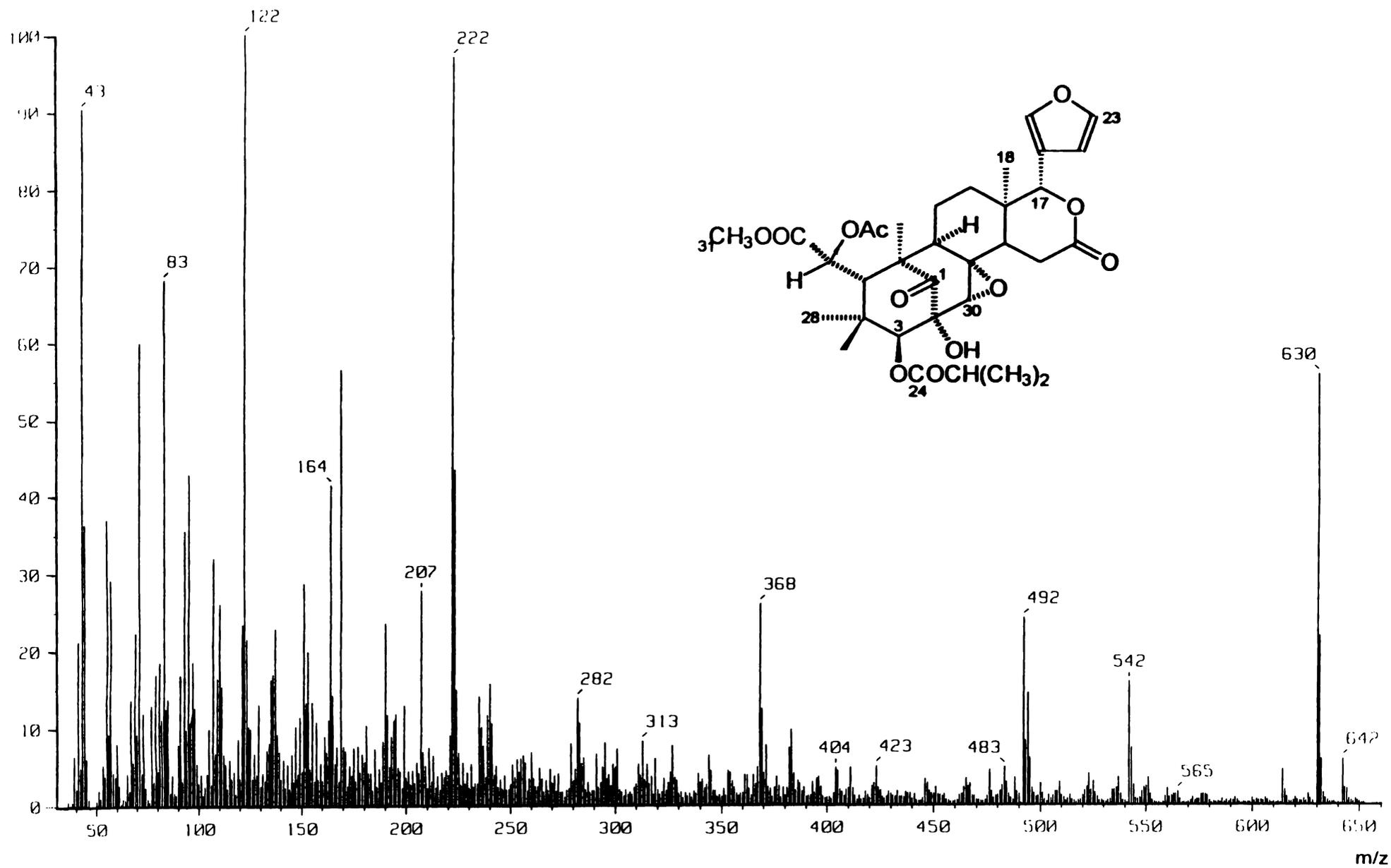


Espectro 10. Espectro de RMN-¹H de la humilinólida C (28).

Espectro 11. Espectro de RMN- ^{13}C de la humilinólida C (28).

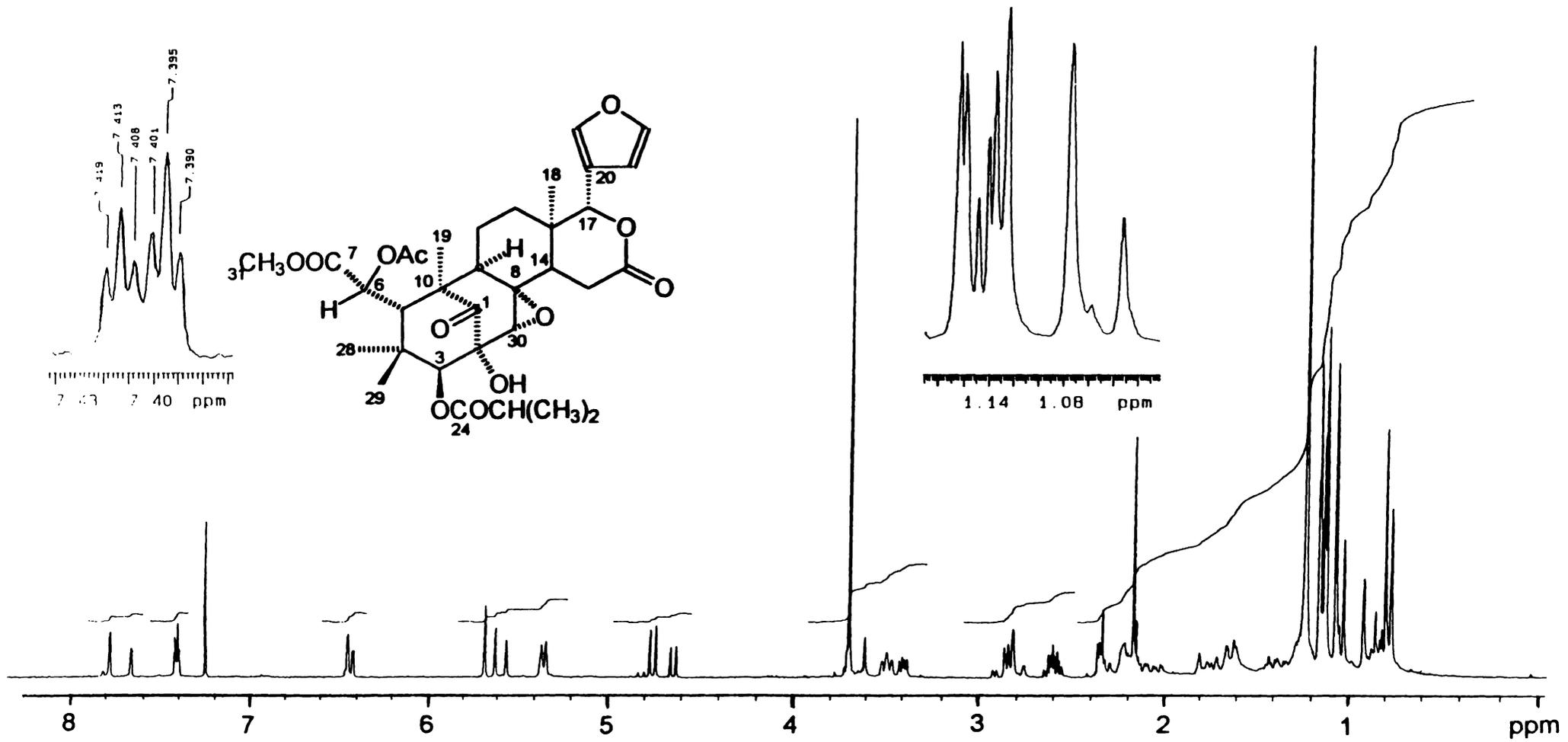


Espectro 12. Espectro de IR de la humilinólida B (27).

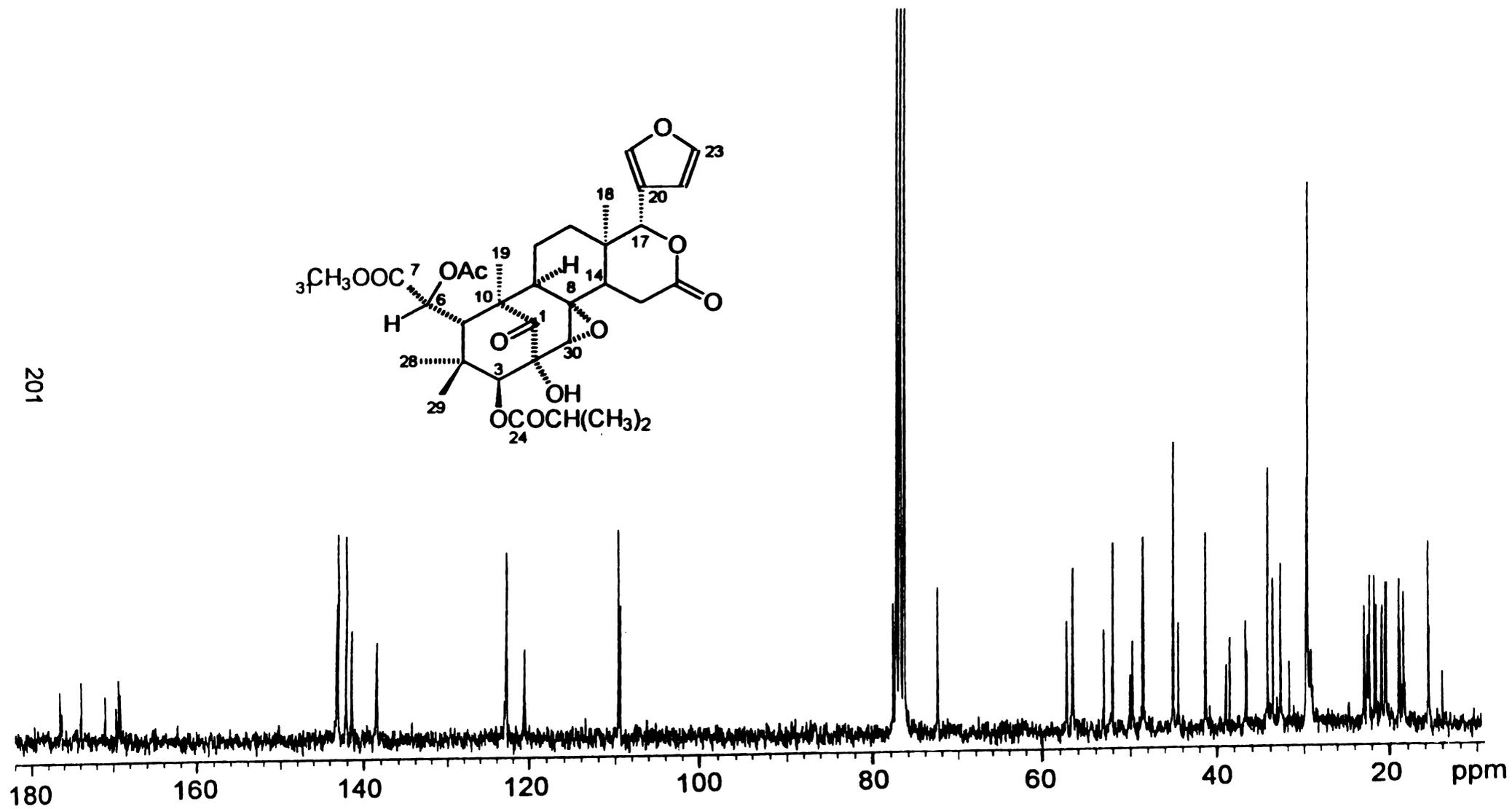


Espectro 13. Espectro de masas de la humilinólida B (27).

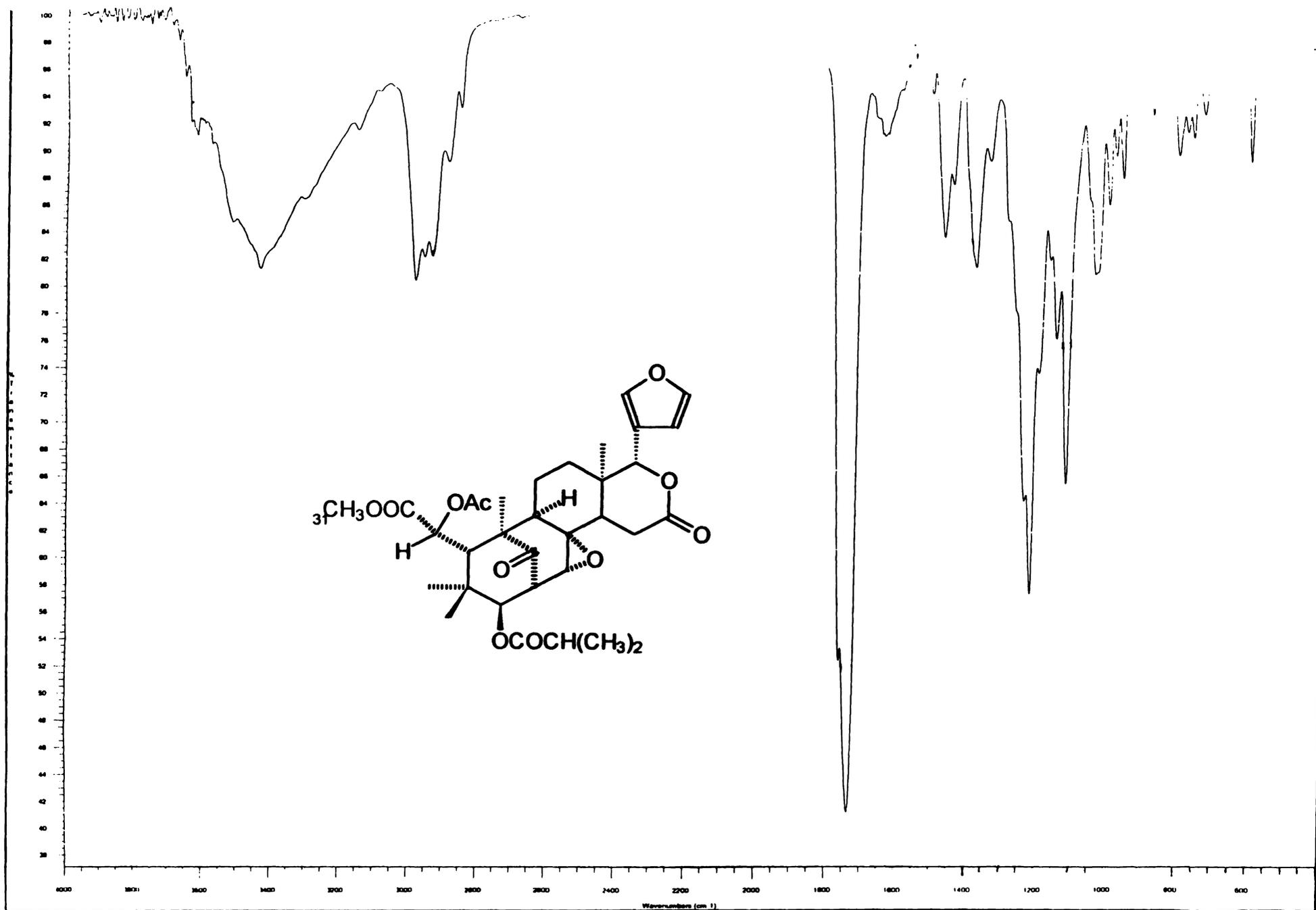
200



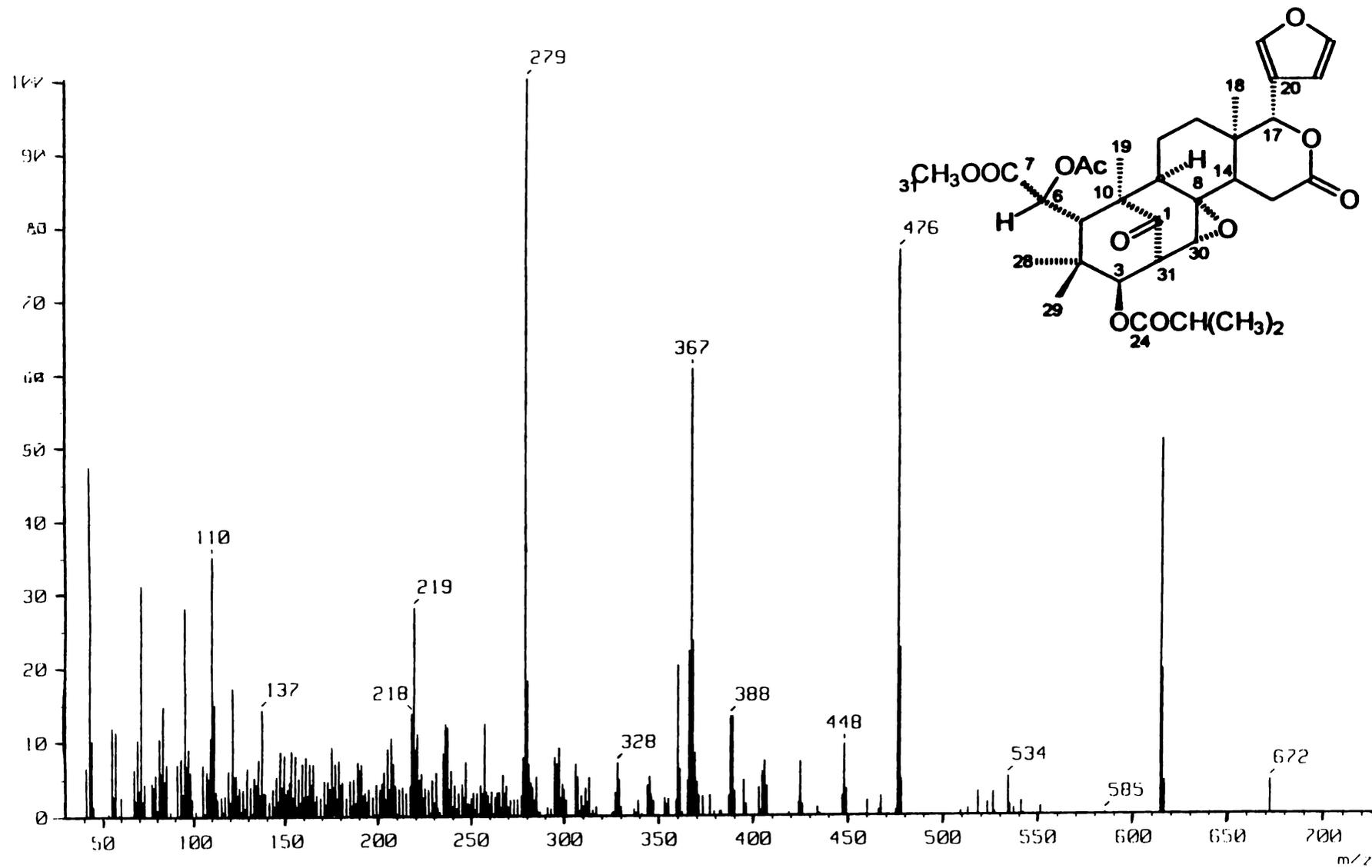
Espectro 14. Espectro de RMN-¹H de la humilinólida B (27).



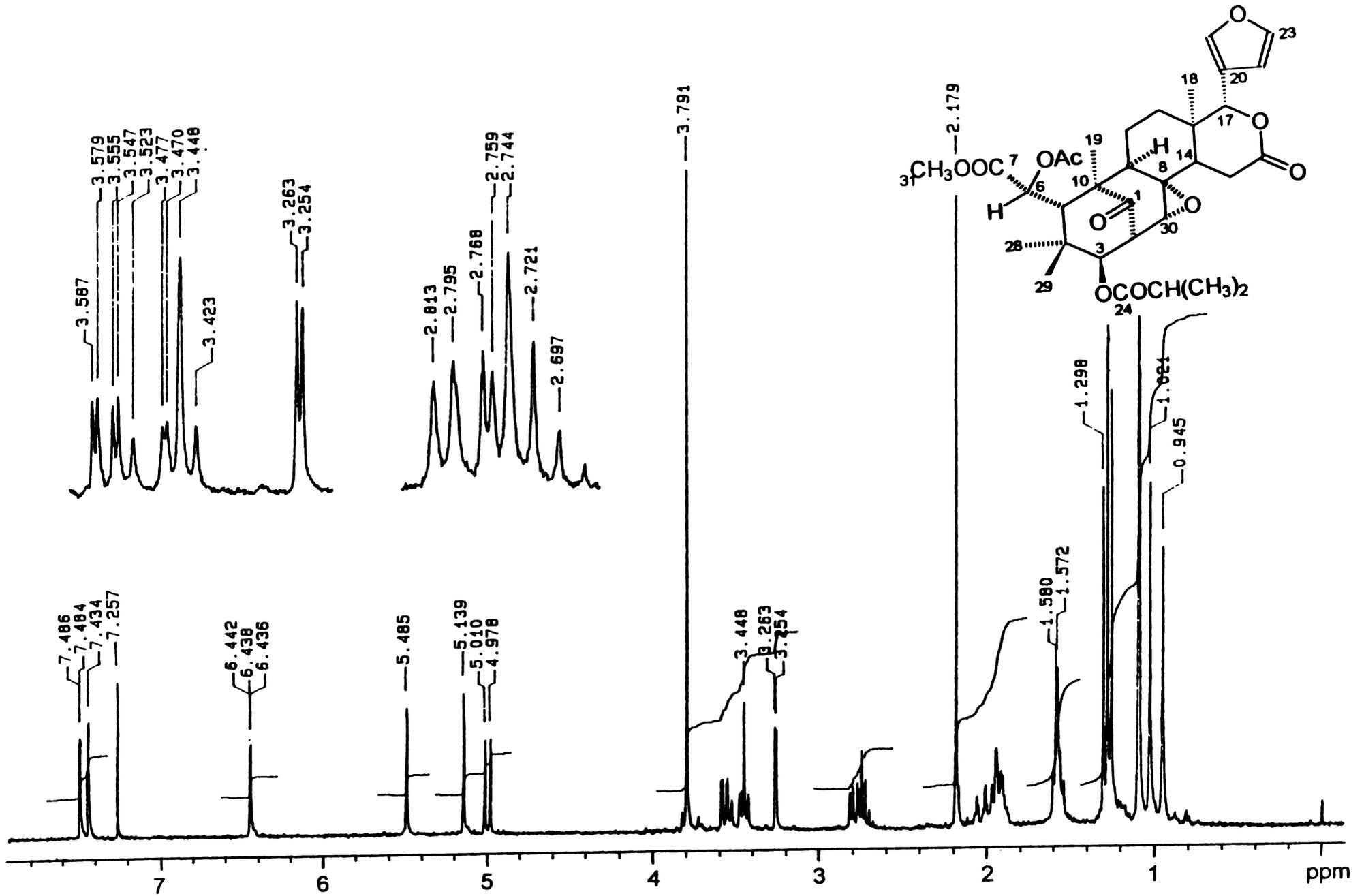
Espectro 15. Espectro de RMN- ^{13}C de la humilinólida B (27).

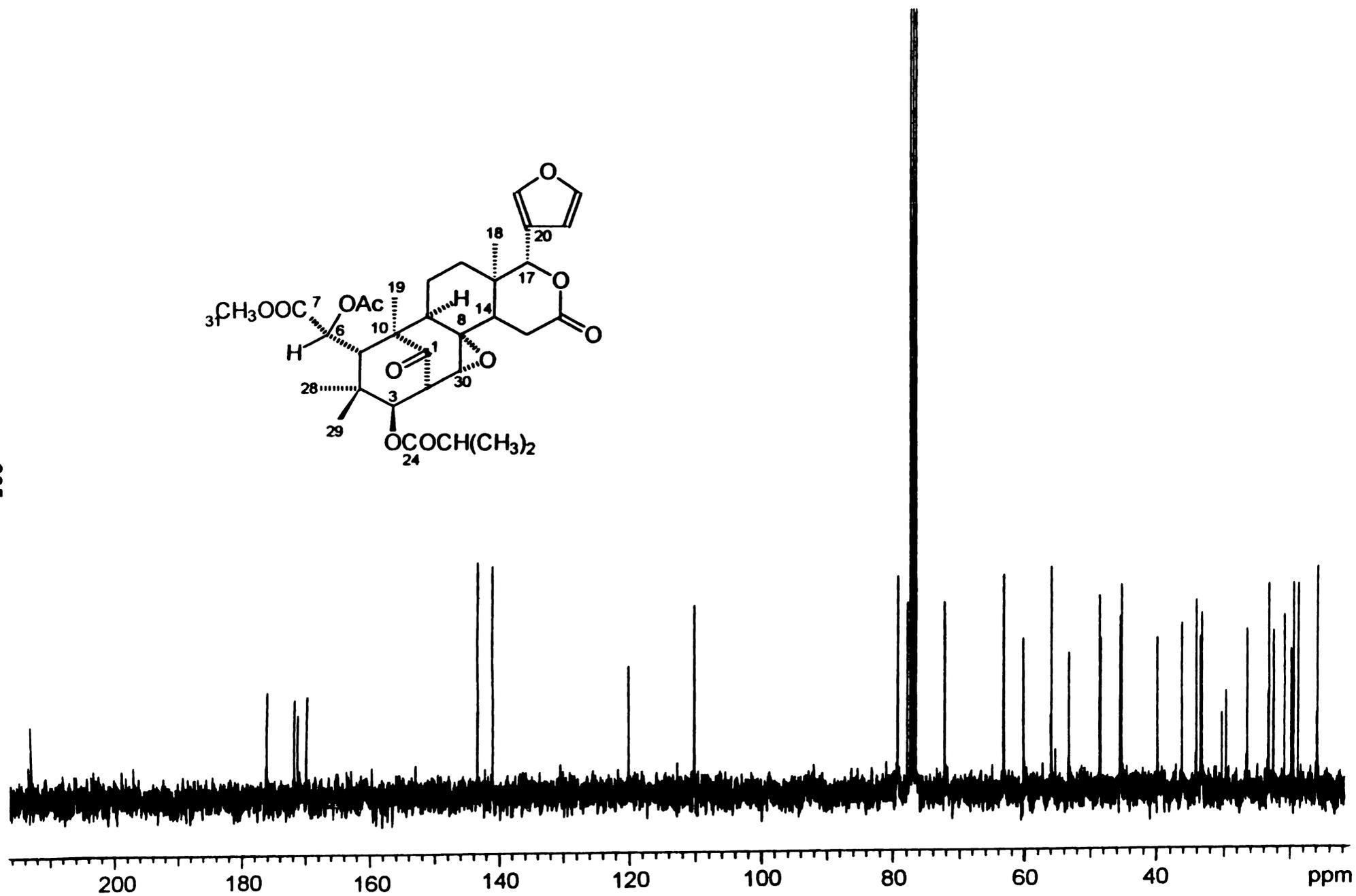
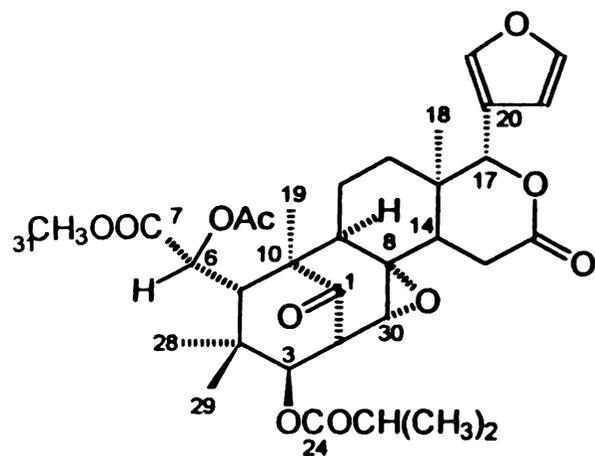


Espectro 16 Espectro de IR de la swietemahonina C (36).

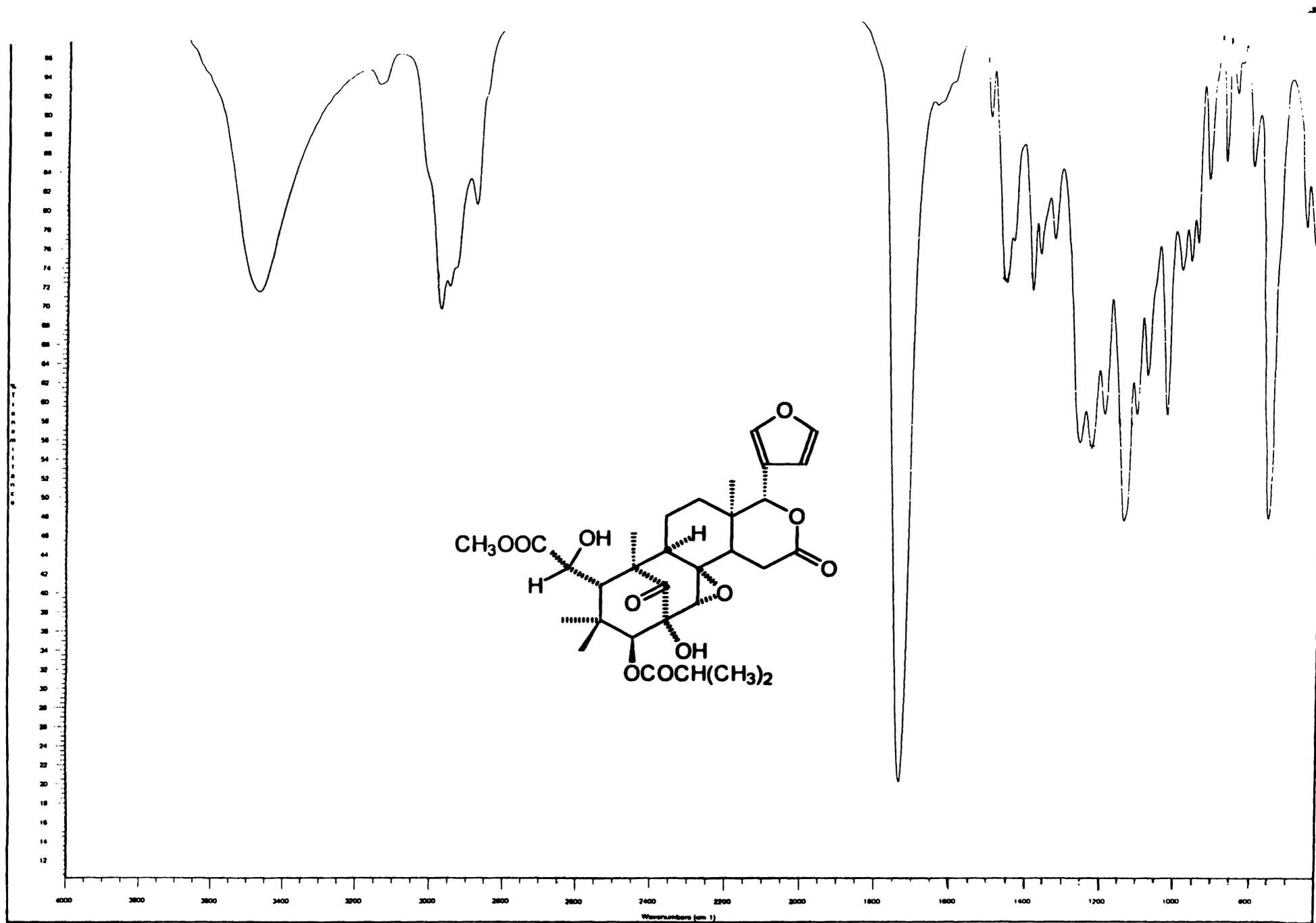


Espectro 17. Espectro de masas de la swietemahonina C (36).

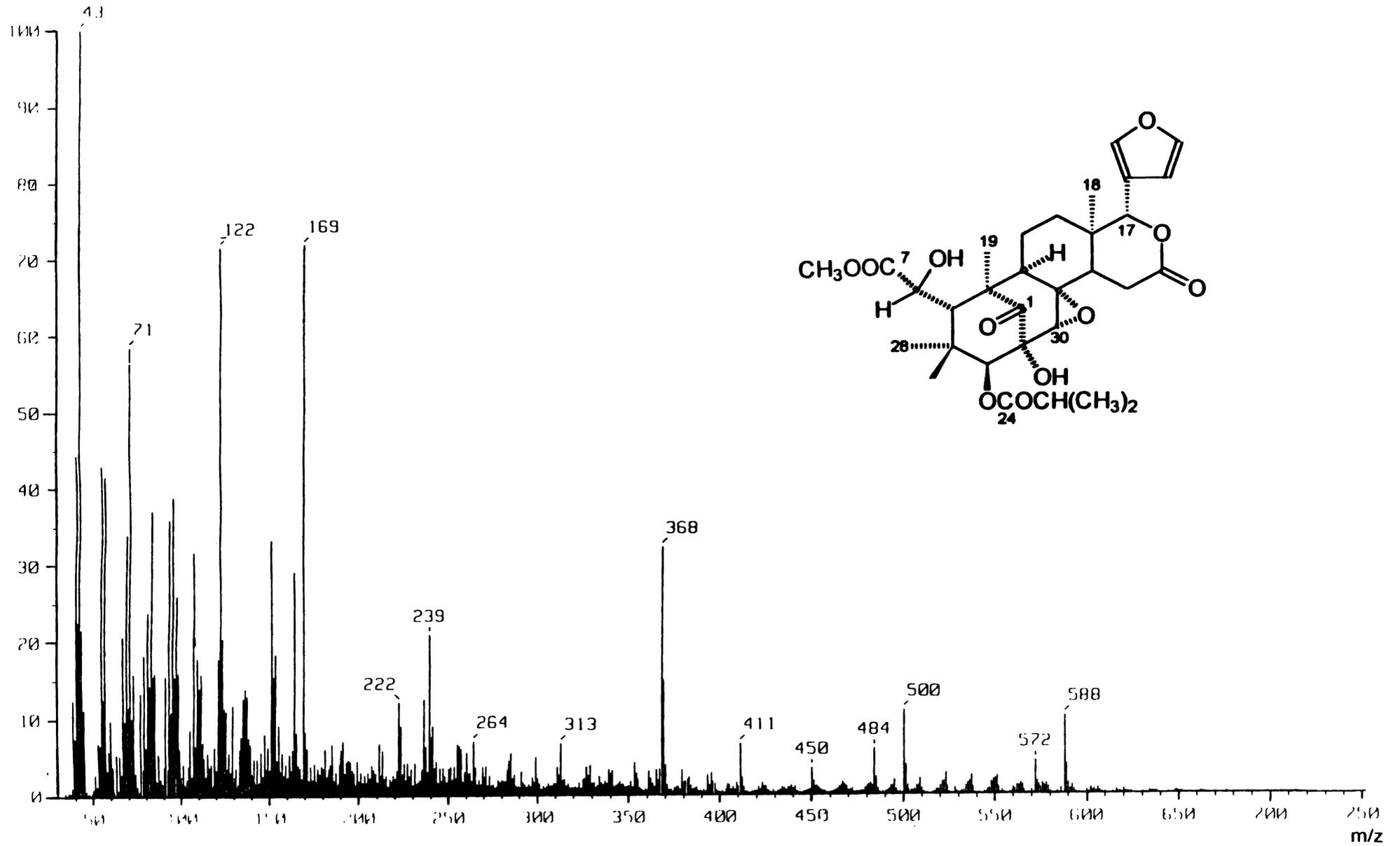
Espectro 18. Espectro de RMN-¹H de la swietemahonina C (36)



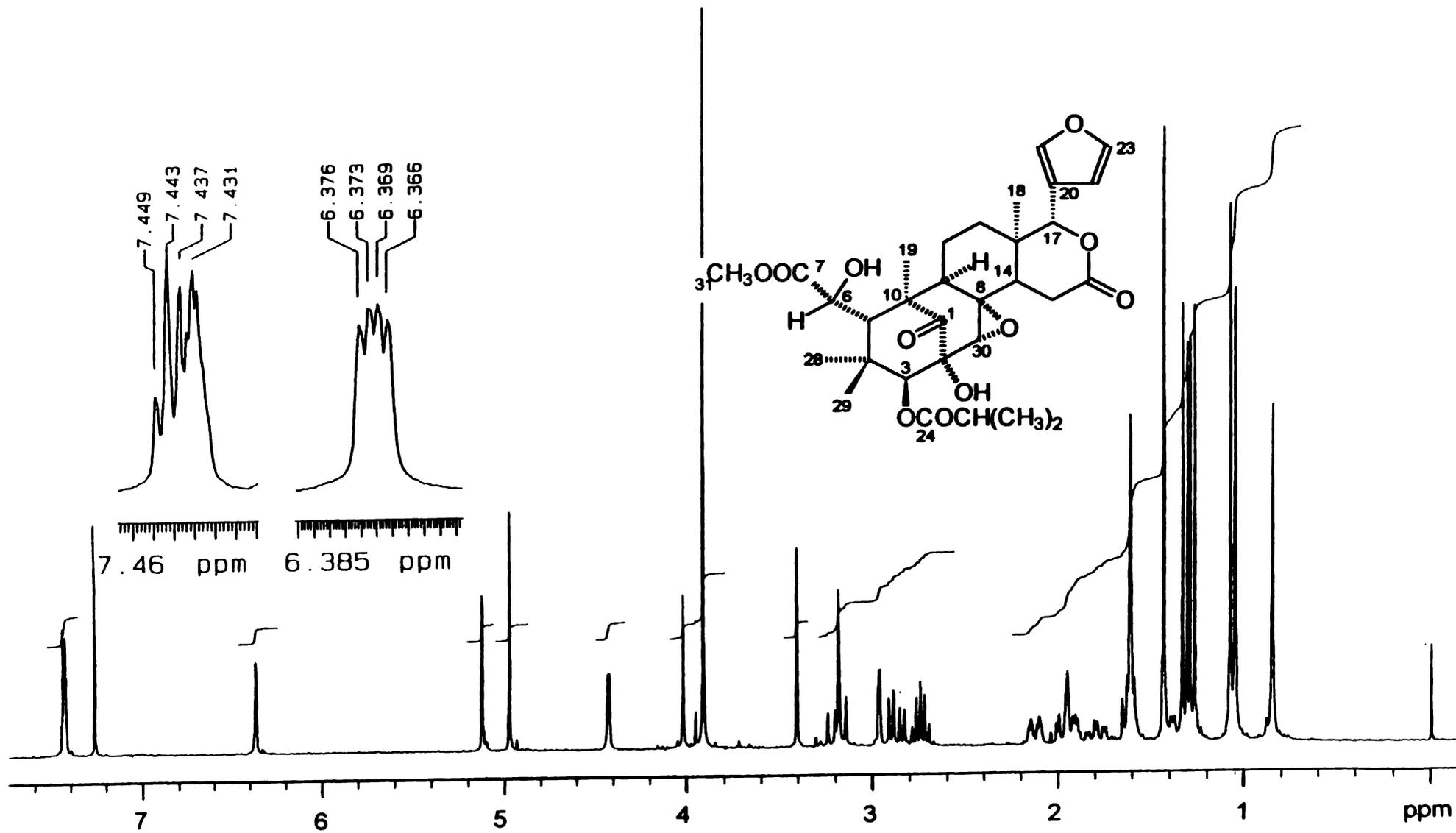
Espectro 19. Espectro de RMN-¹³C de la swietemahonina C (36).

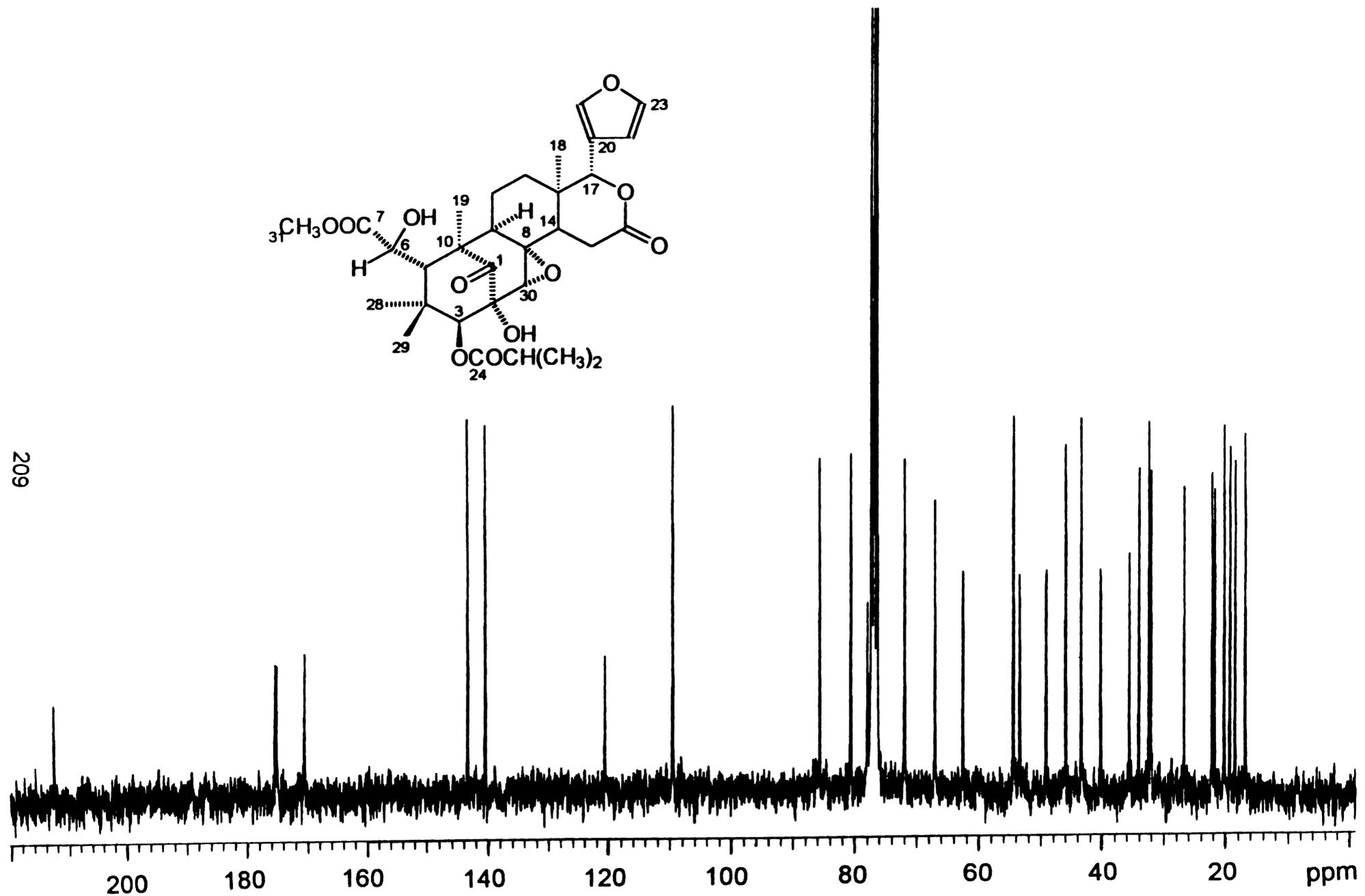
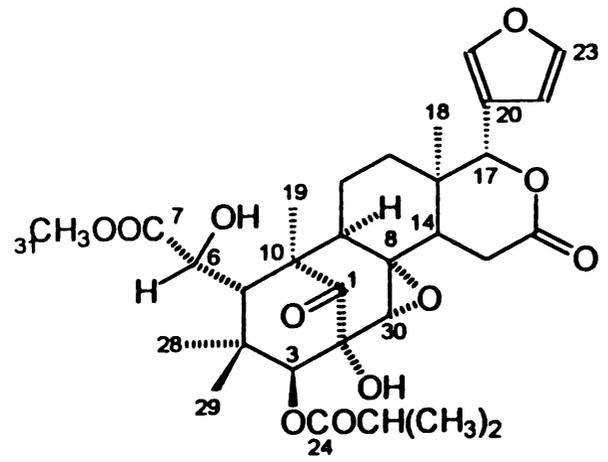


Espectro 20. Espectro de IR de la humilinólida A (26).



Espectro 21. Espectro de masas de la humilinólida A (26).

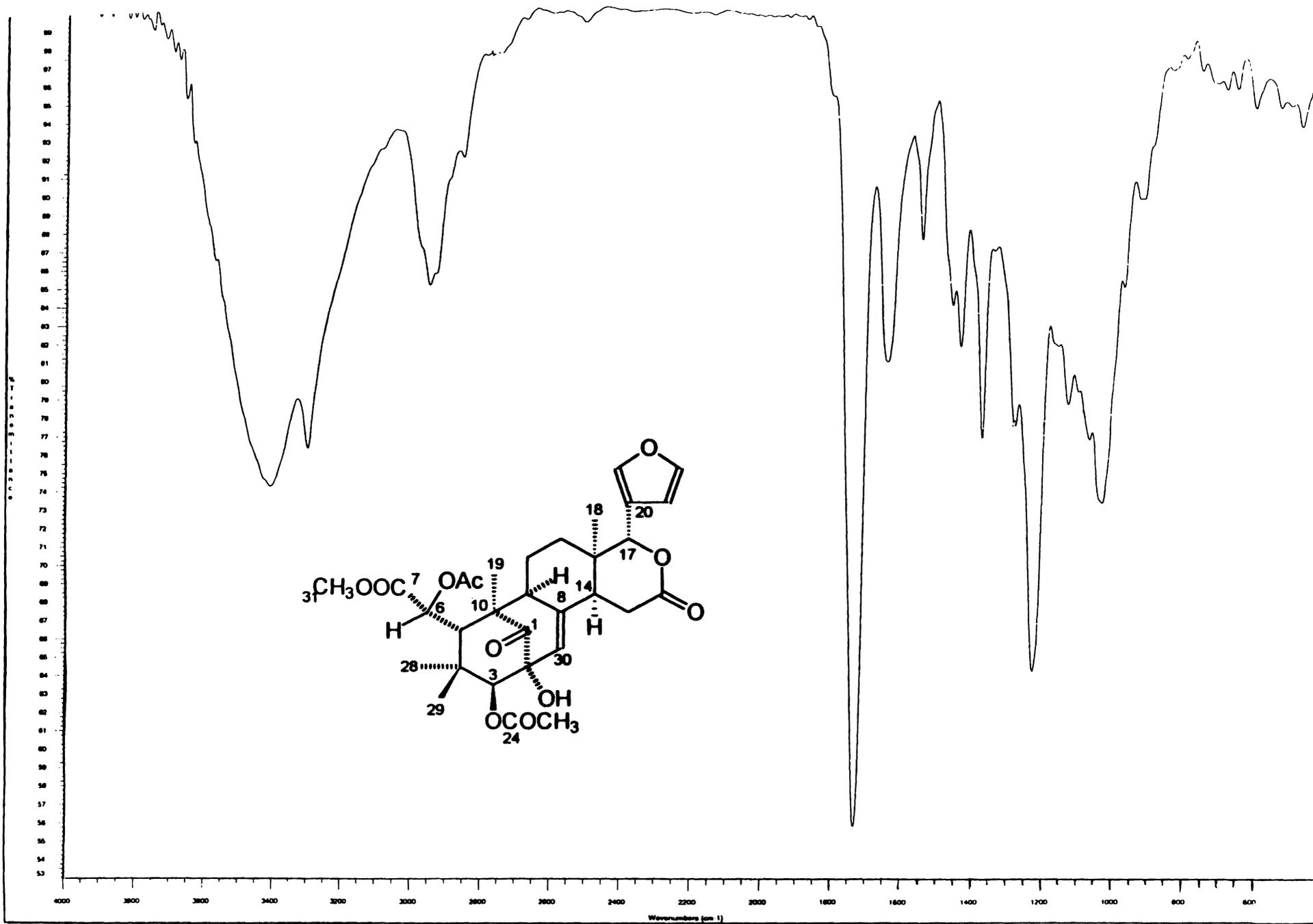
Espectro 22. Espectro de RMN- ^1H de la humilinólida A (26).



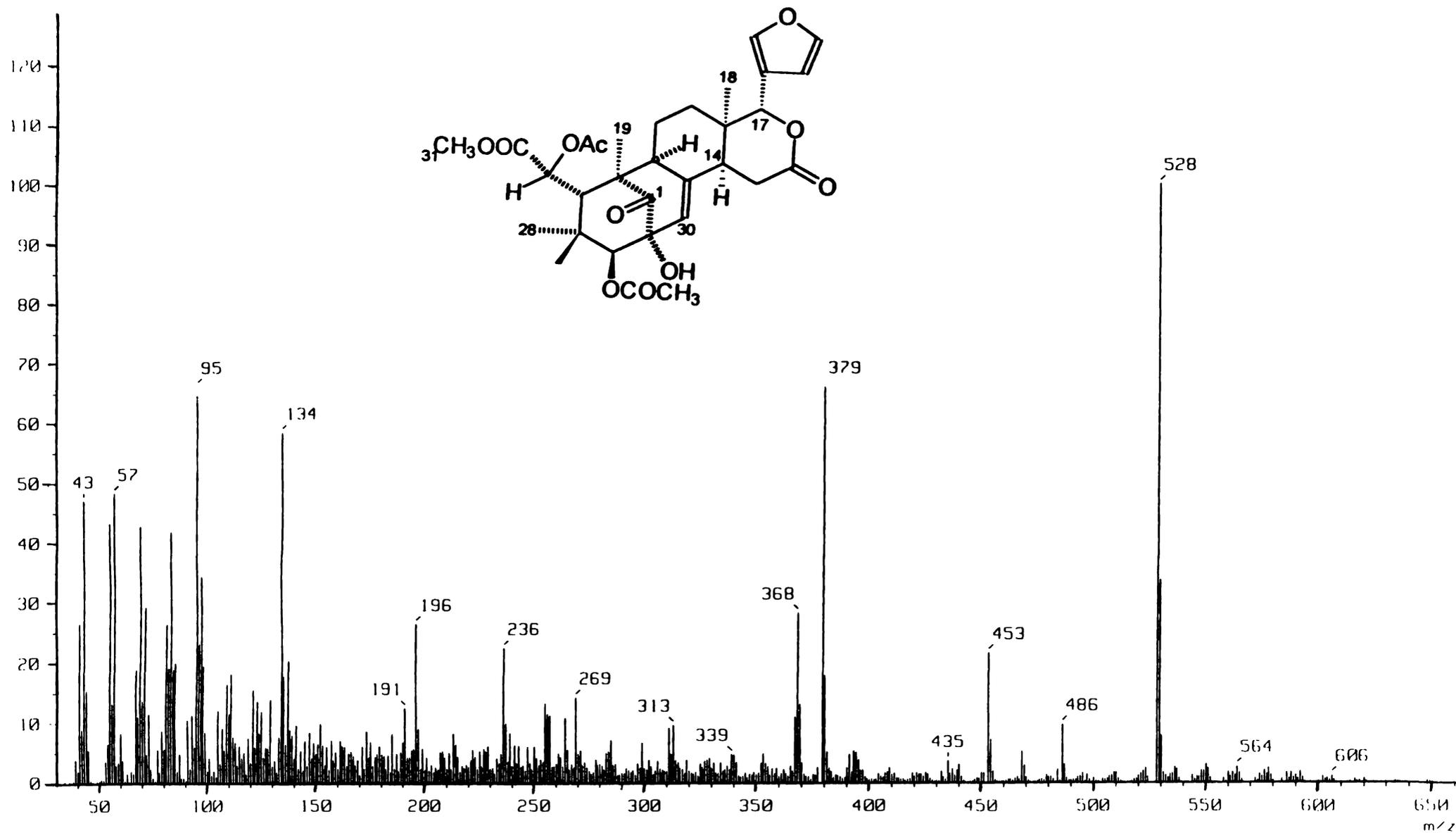
209

Espectro 23 Espectro de RMN-¹³C de la humilinólida A (26).

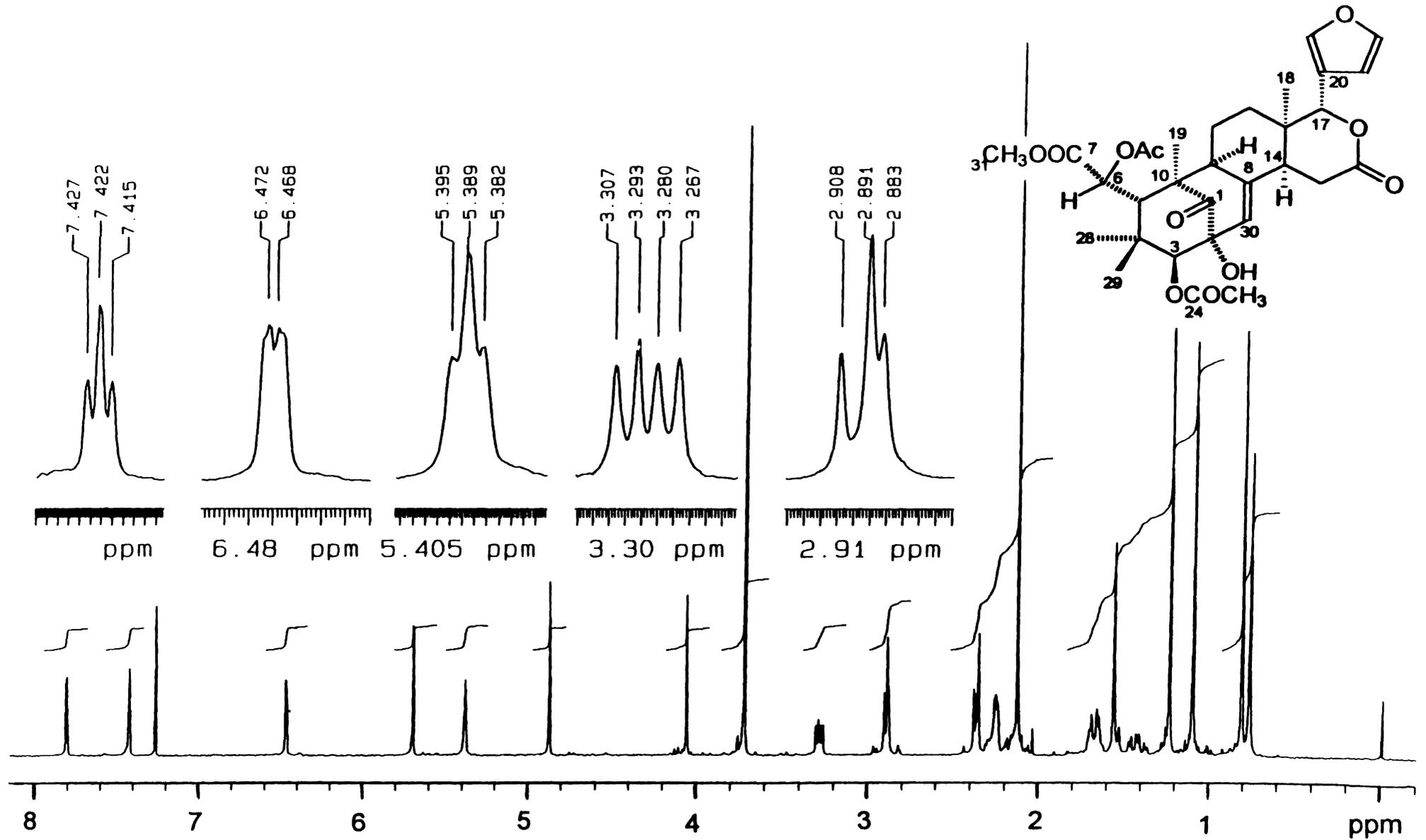
210

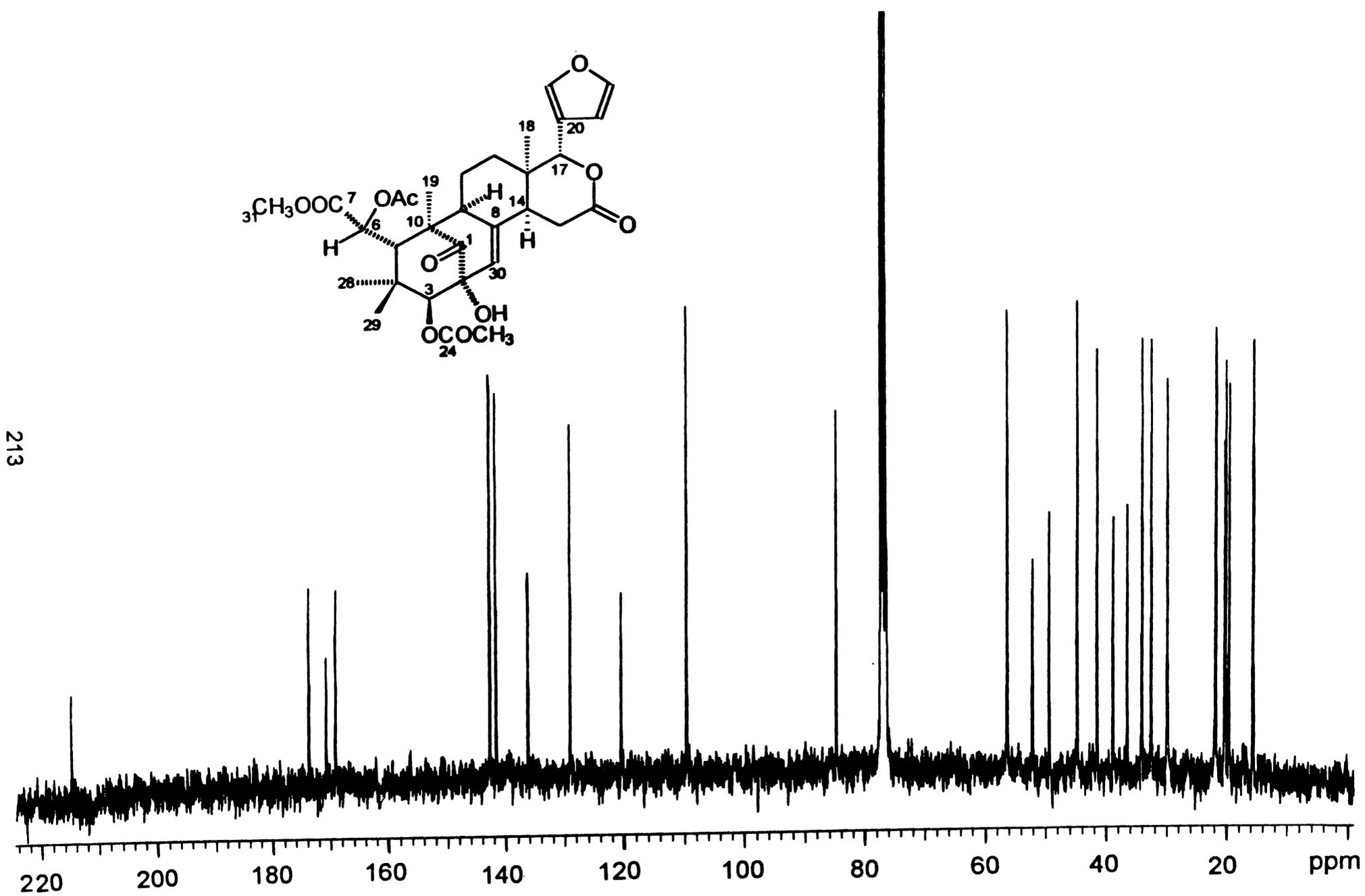
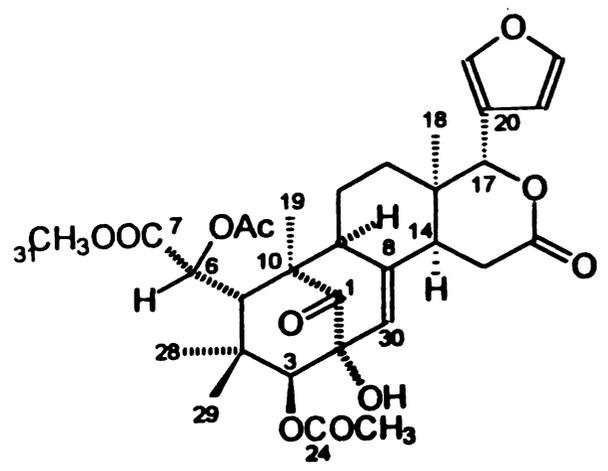


Espectro 24. Espectro de IR de la humilinólida D (29).

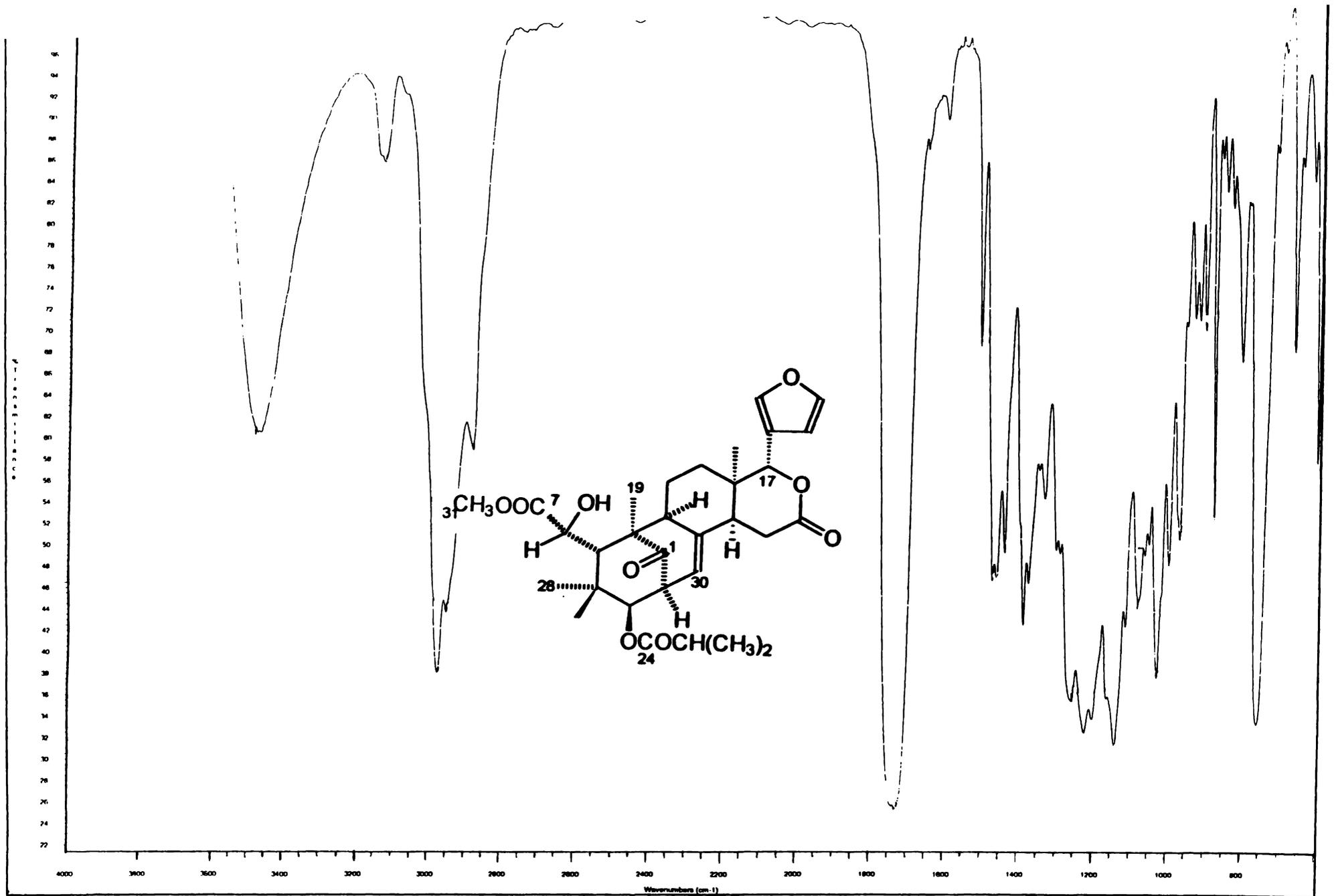


Espectro 25. Espectro de masas de la humilinólida D (29).

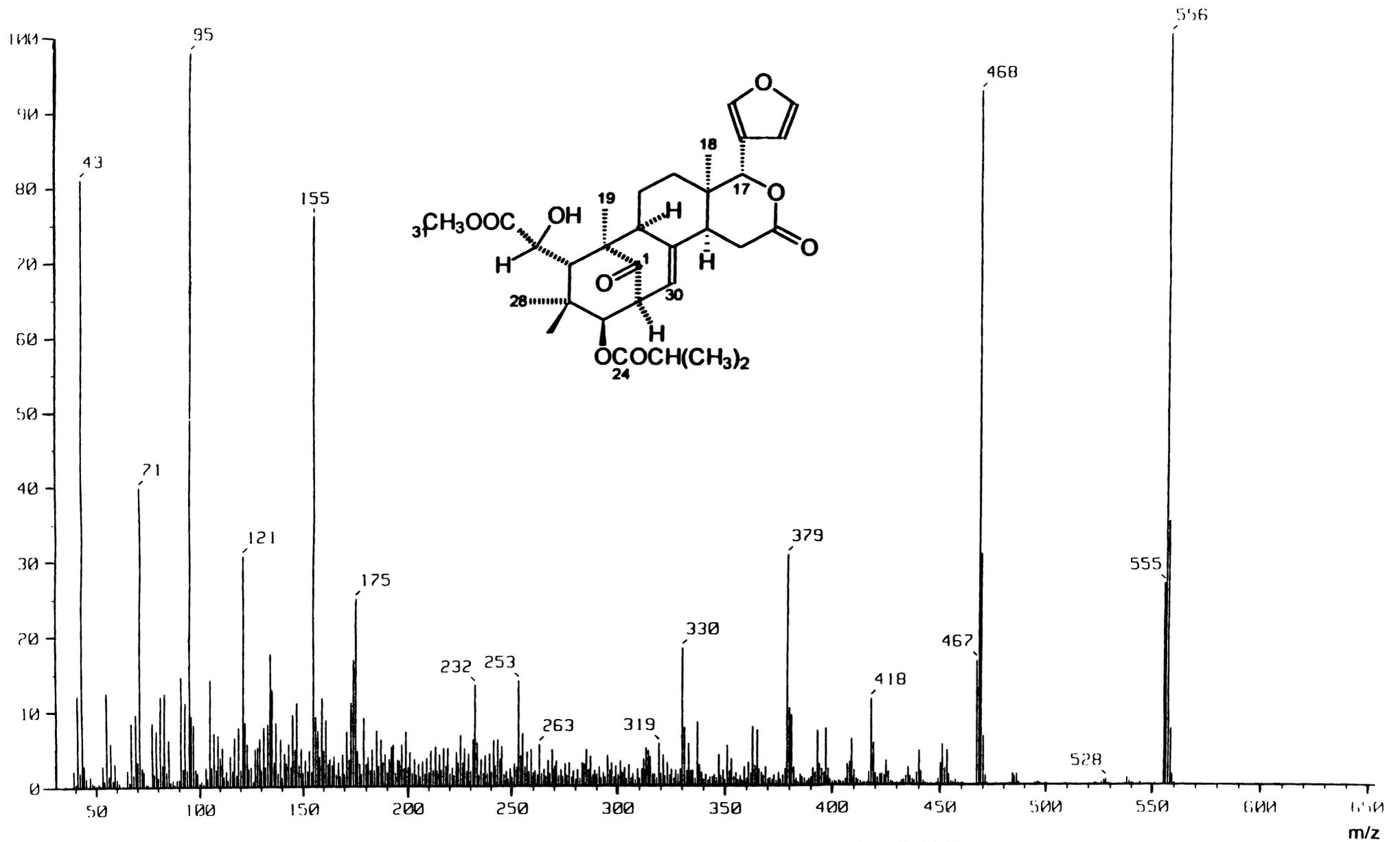
Espectro 26. Espectro de RMN- ^1H de la humilinólida D (29).



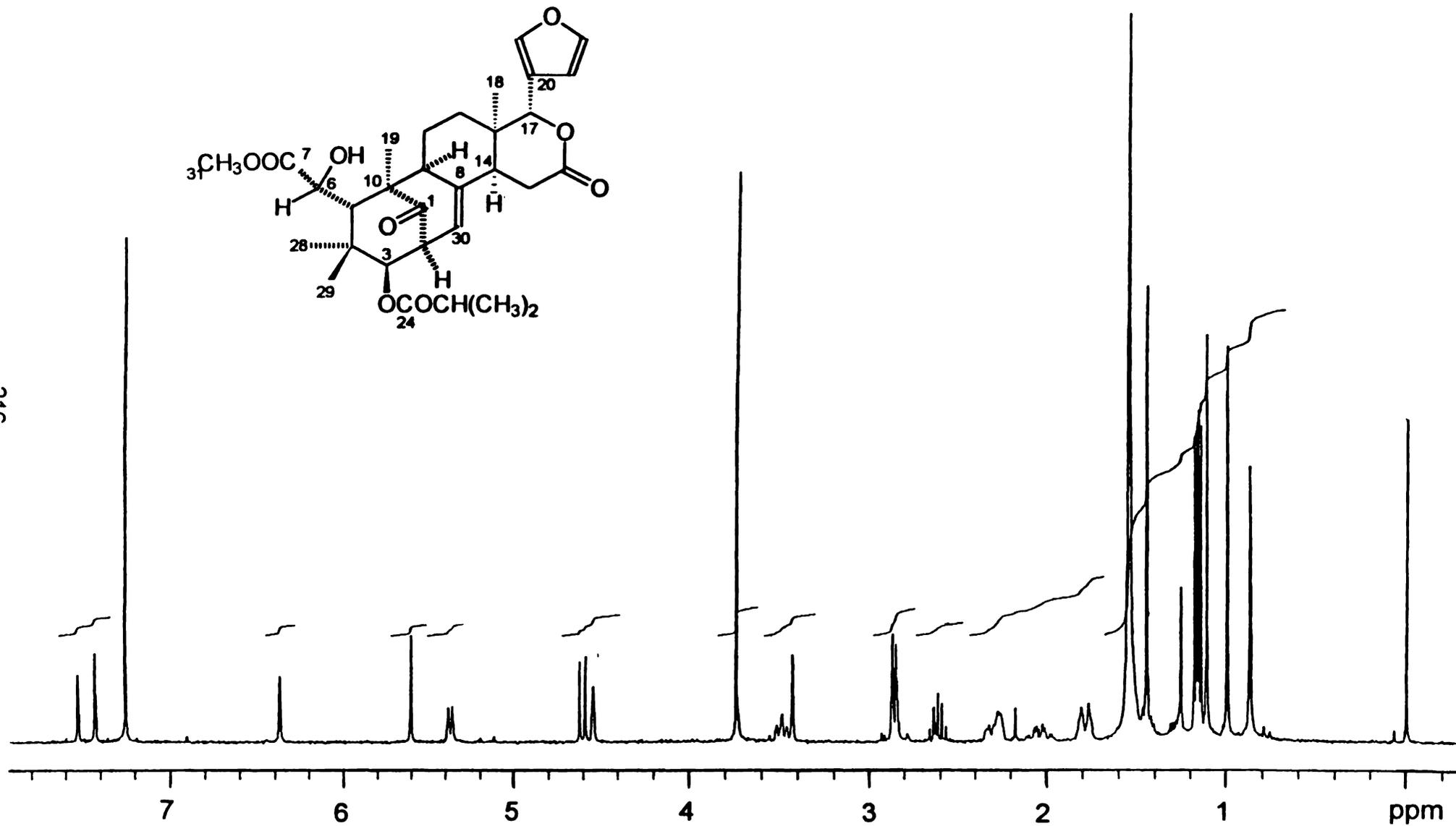
Espectro 27. Espectro de RMN-¹³C de la humilinólida D (29).



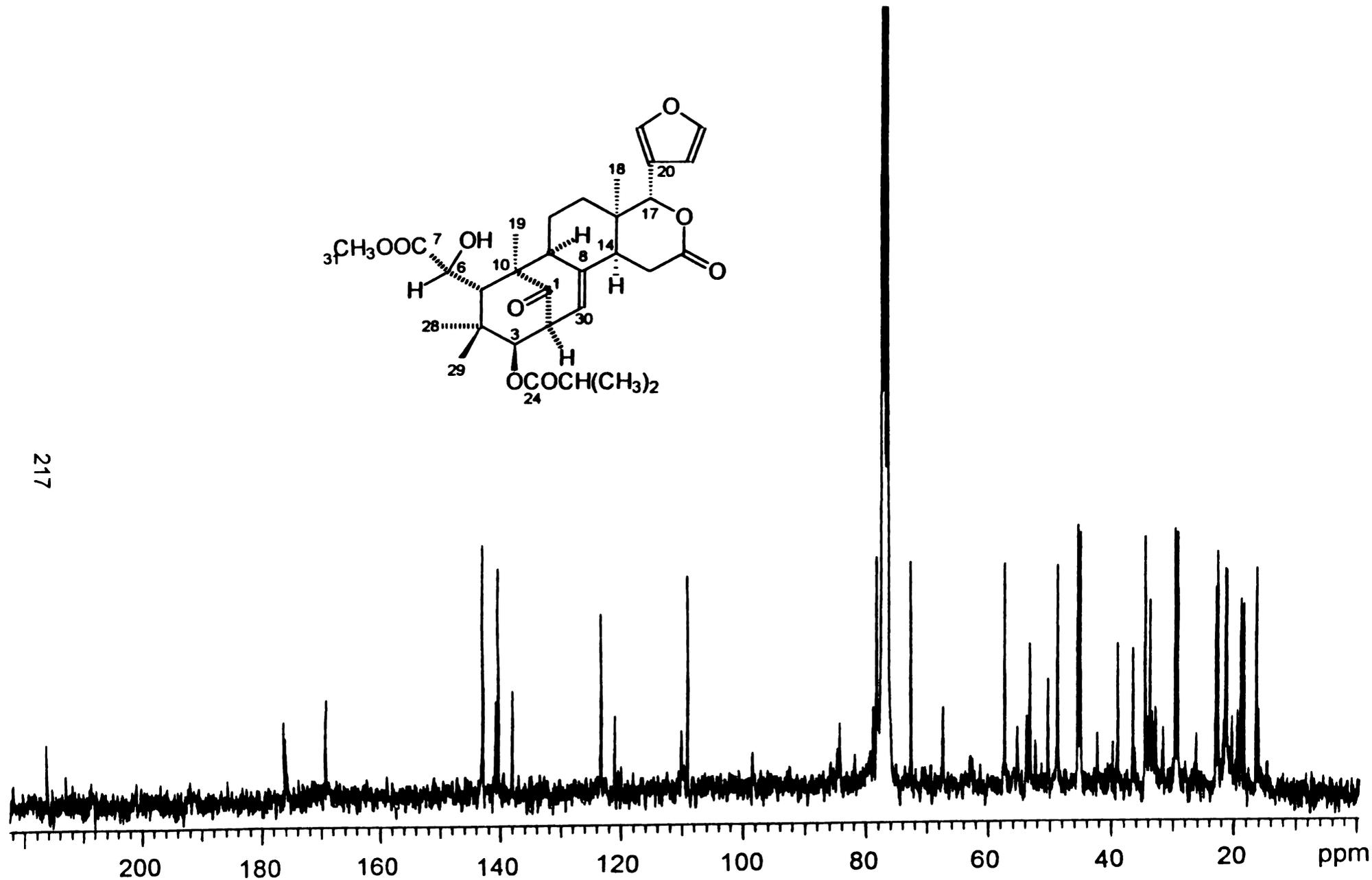
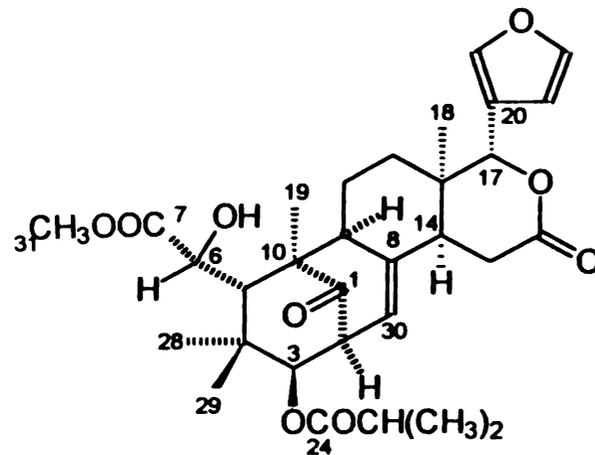
Espectro 28. Espectro de IR de la swietenina C (44).



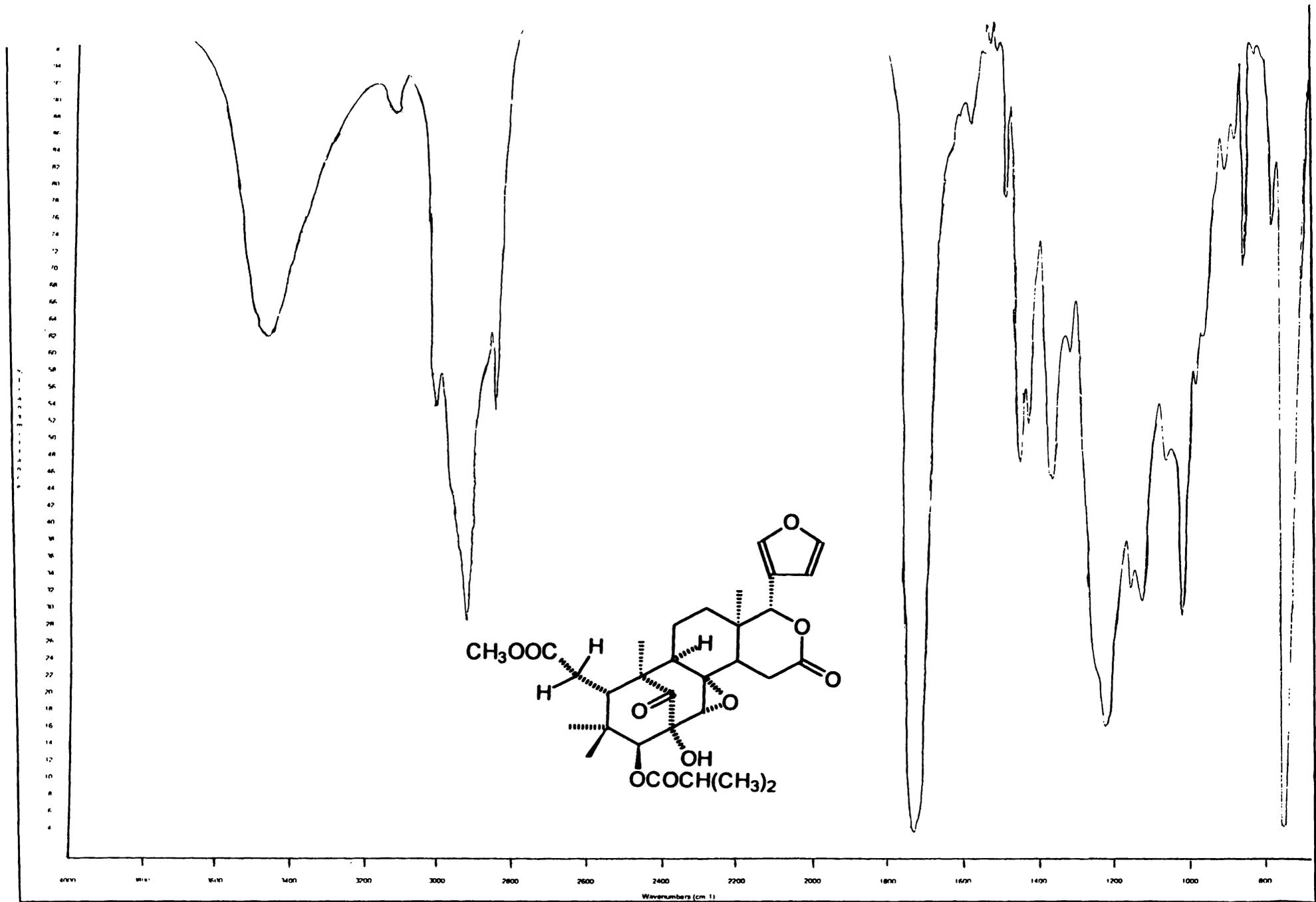
Espectro 29. Espectro de masas de la swietenina C (44).

Espectro 30. Espectro de RMN-¹H de la swietenina C (44).

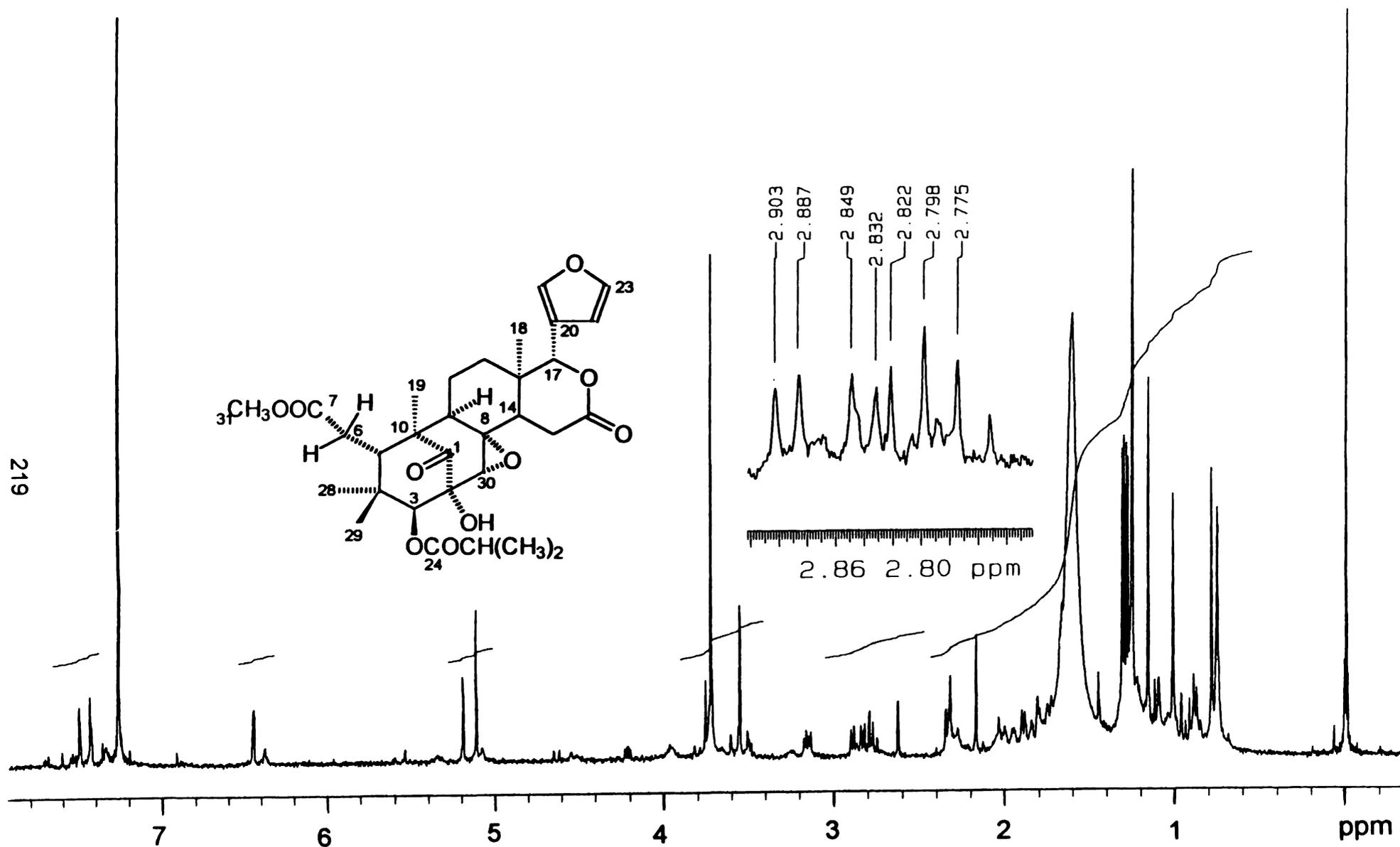
217



Espectro 31 Espectro de RMN-¹³C de la swietenina C (44).

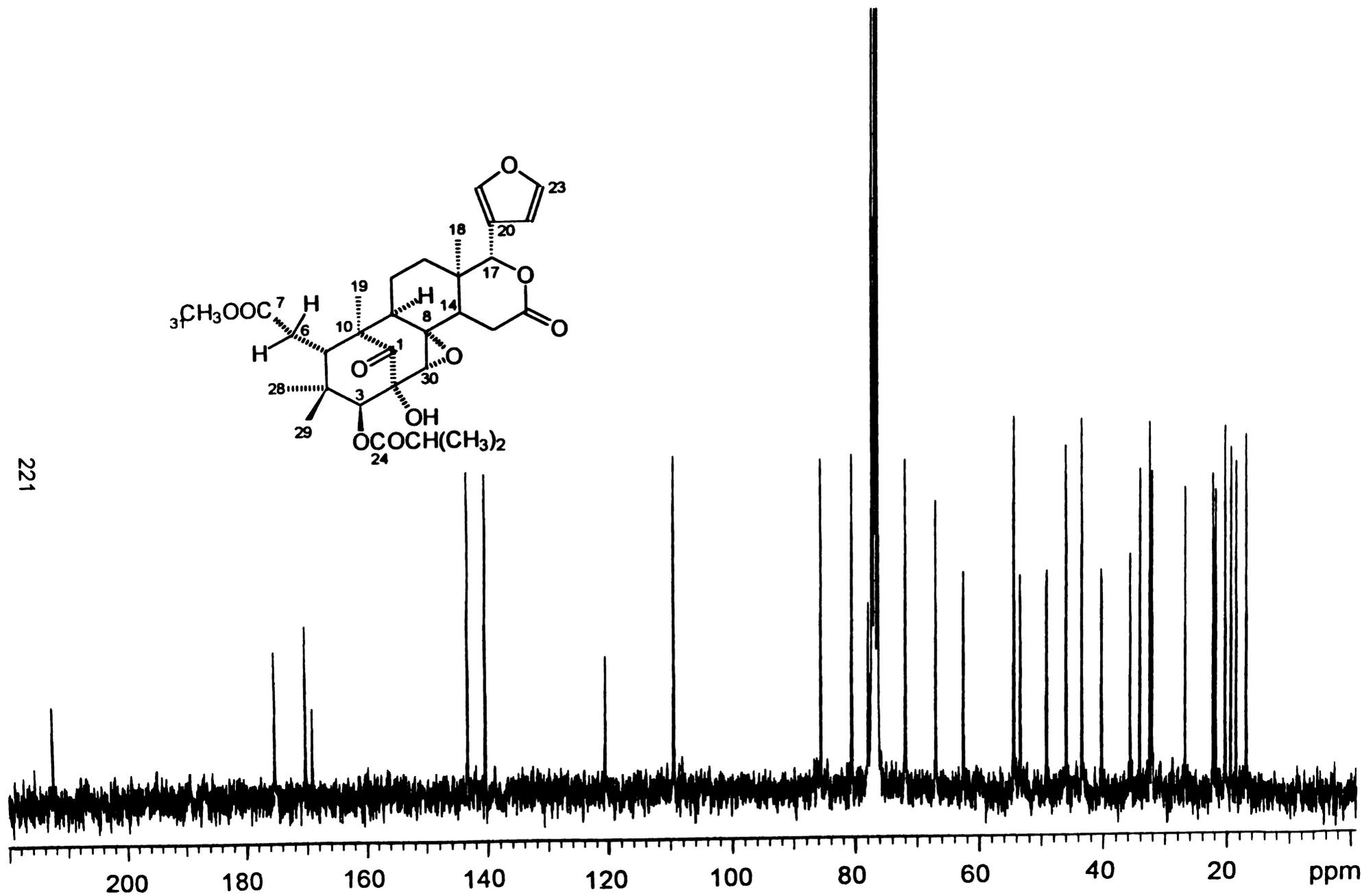


Espectro 32. Espectro de IR de la humilina B (30).

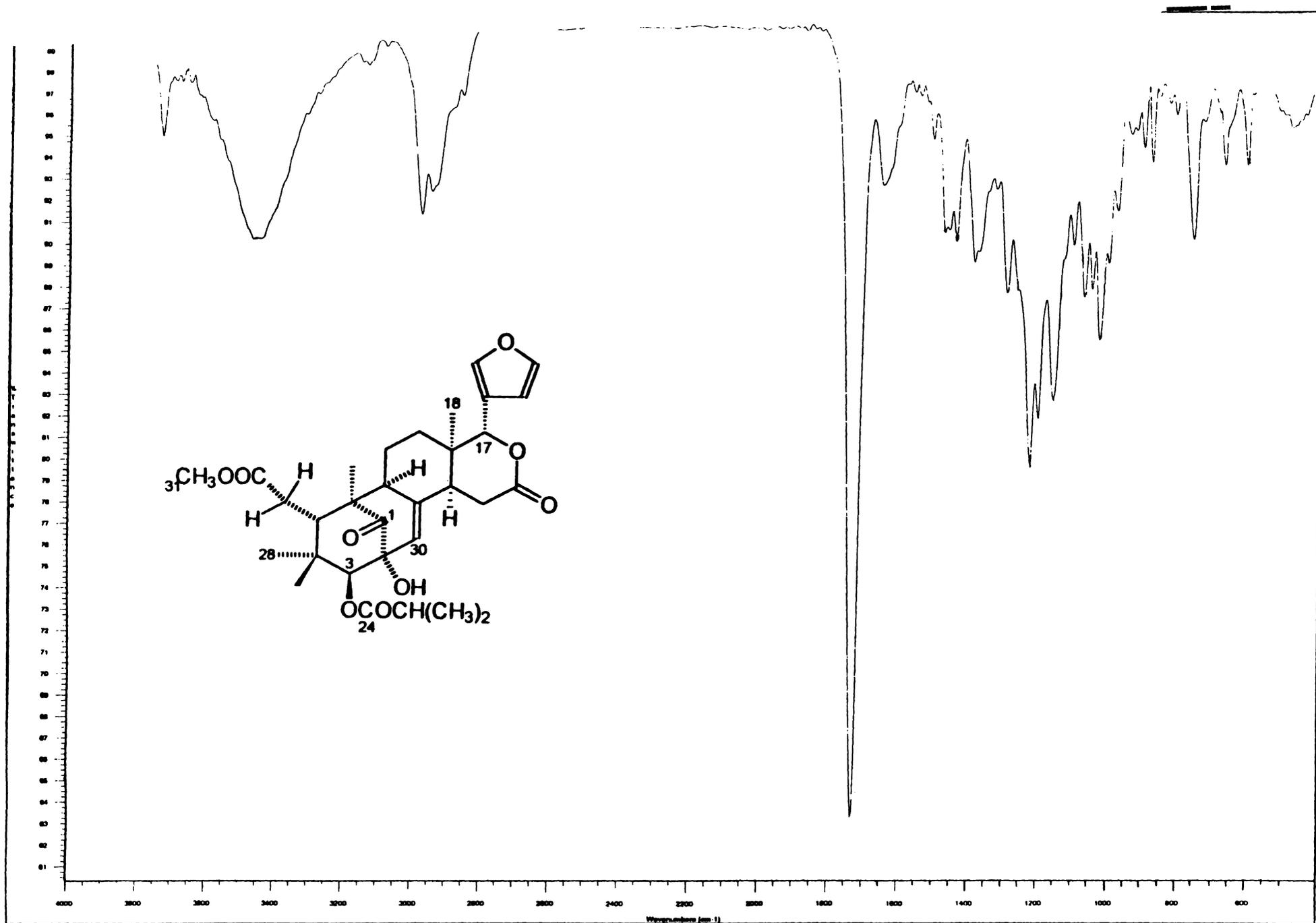


Espectro 34. Espectro de RMN-¹H de la humilina B (30).

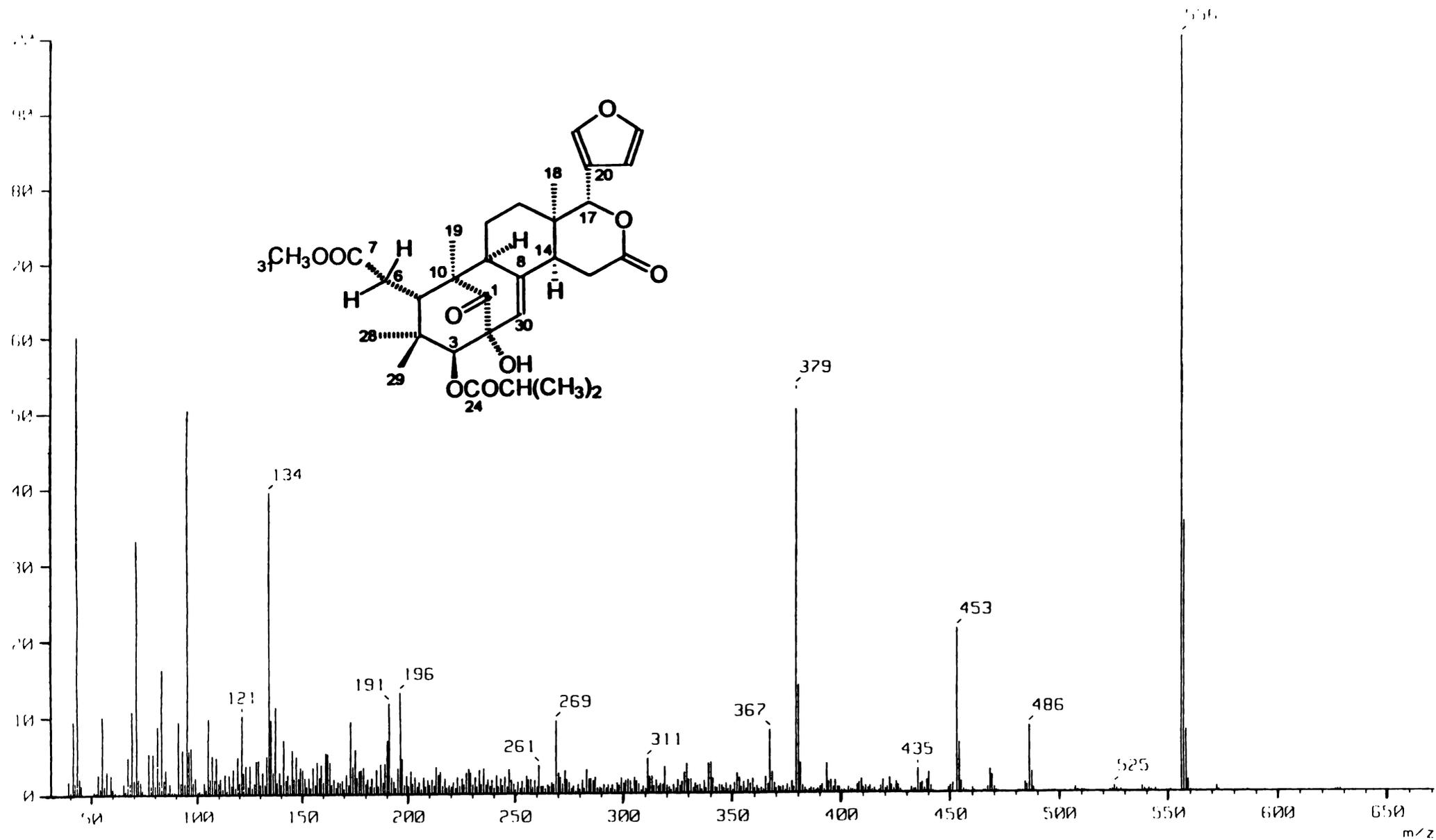
221



Espectro 35. Espectro de RMN-¹³C de la humilina B (30).

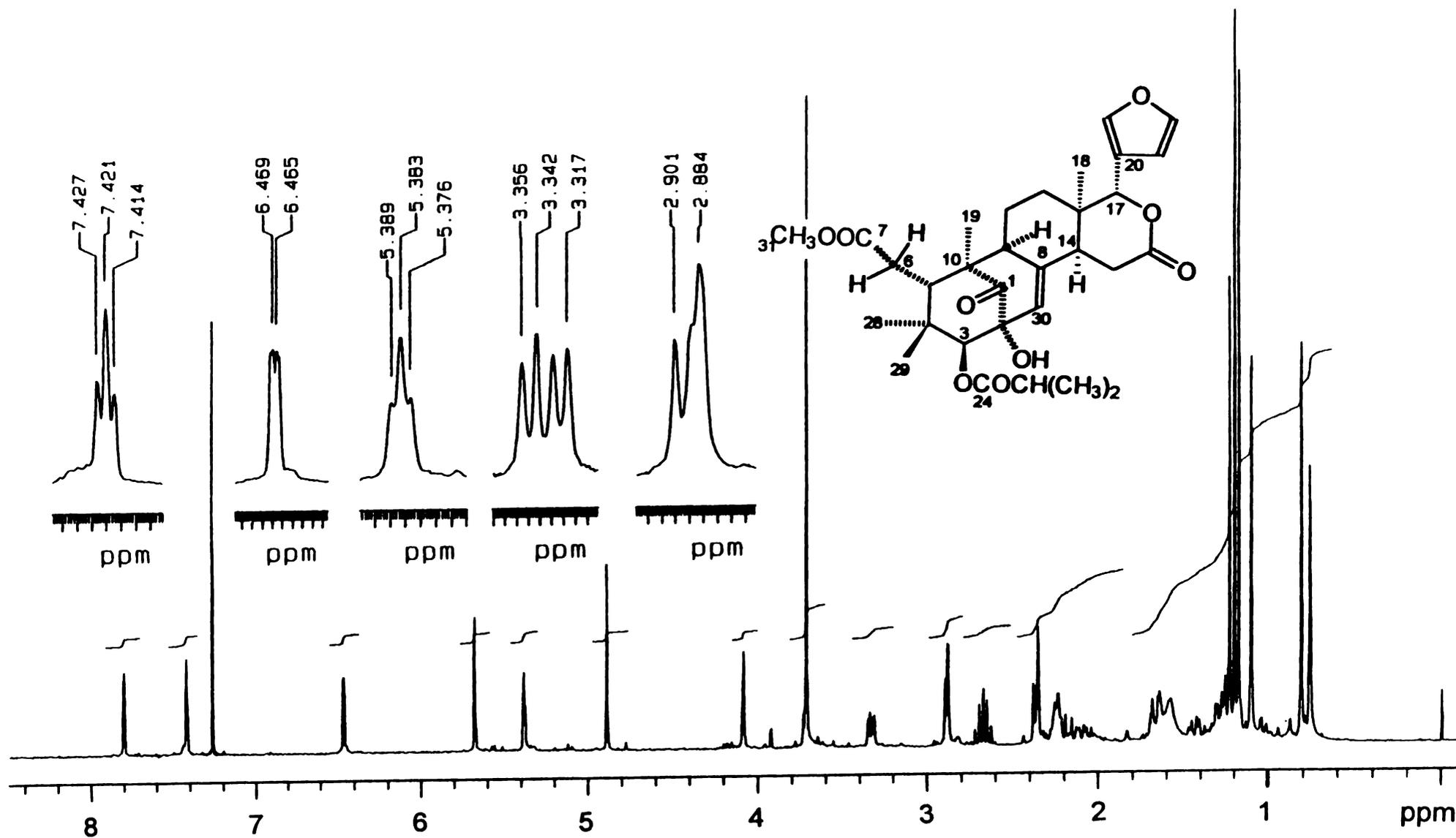


Espectro 36. Espectro de IR del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).

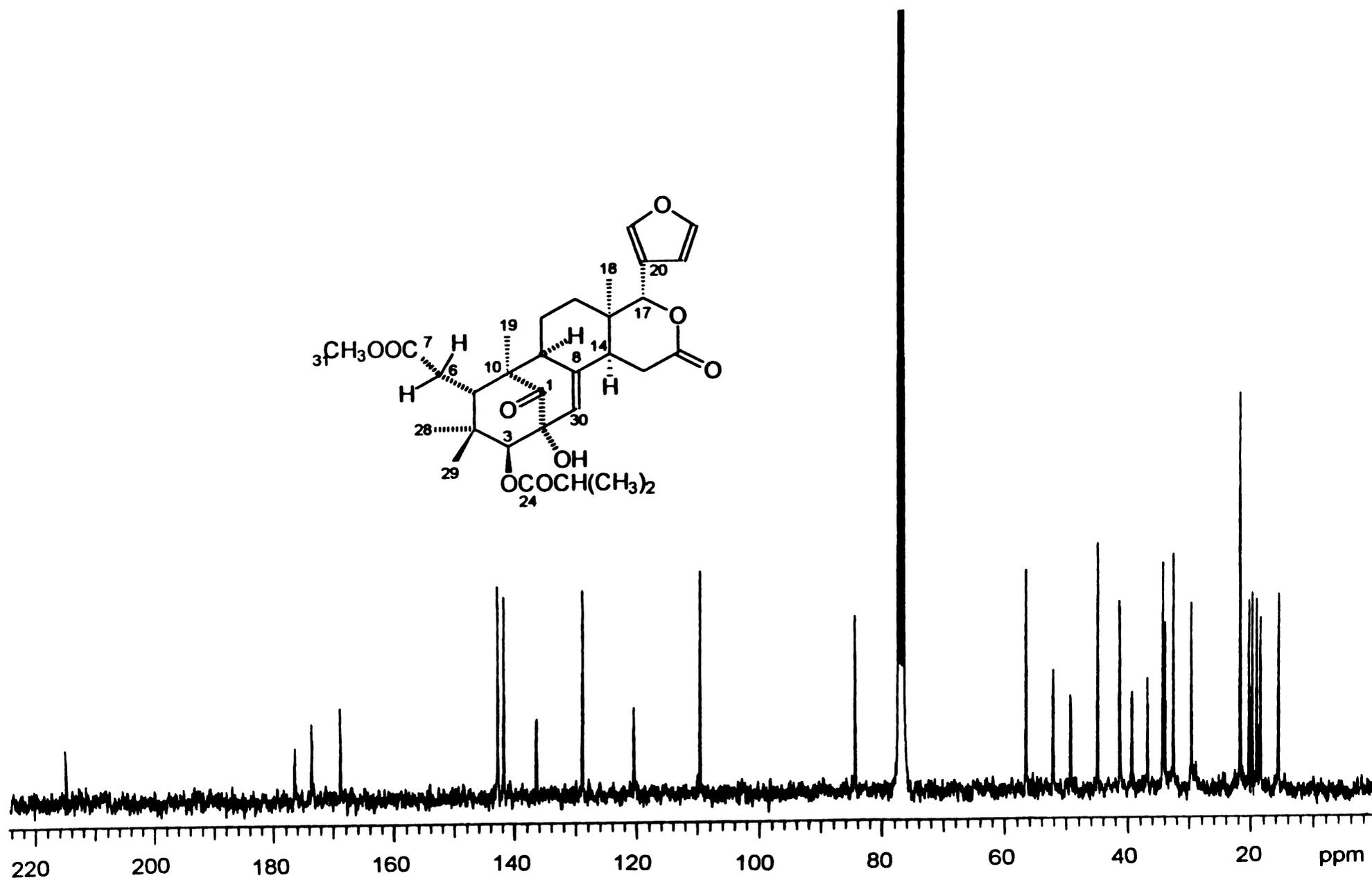
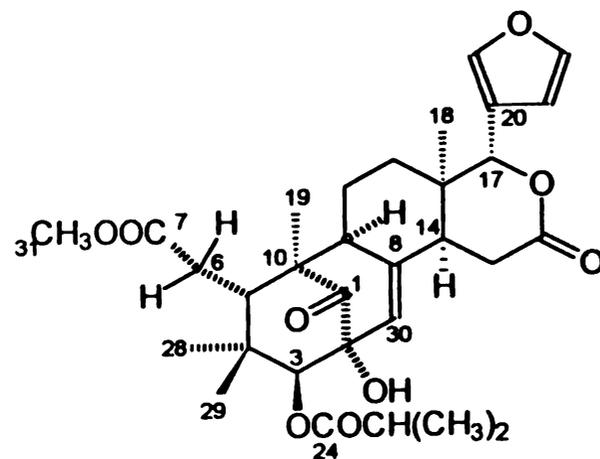


Espectro 37 Espectro de masas del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**).

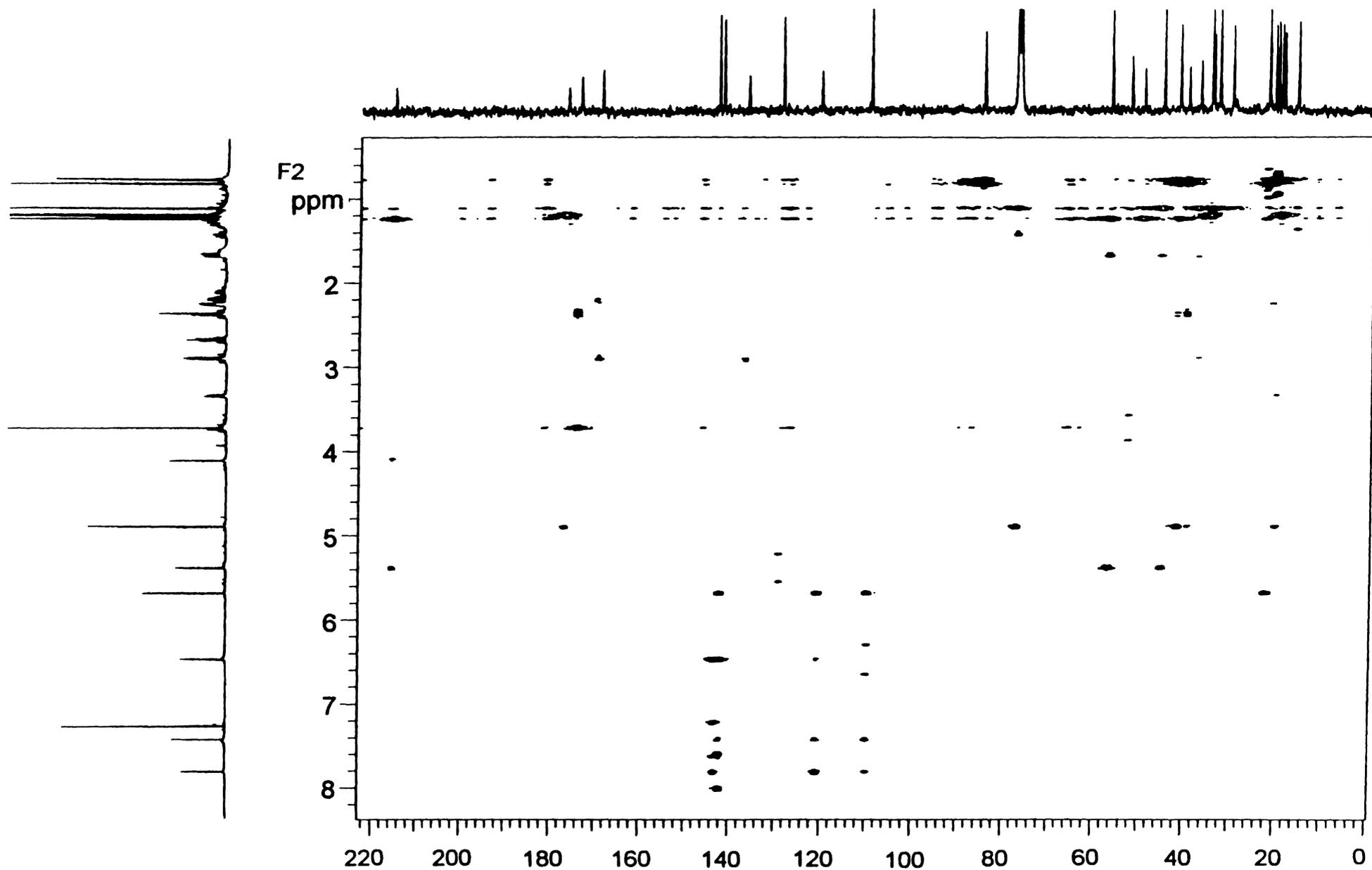
224



Espectro 38. Espectro de RMN- ^1H del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).

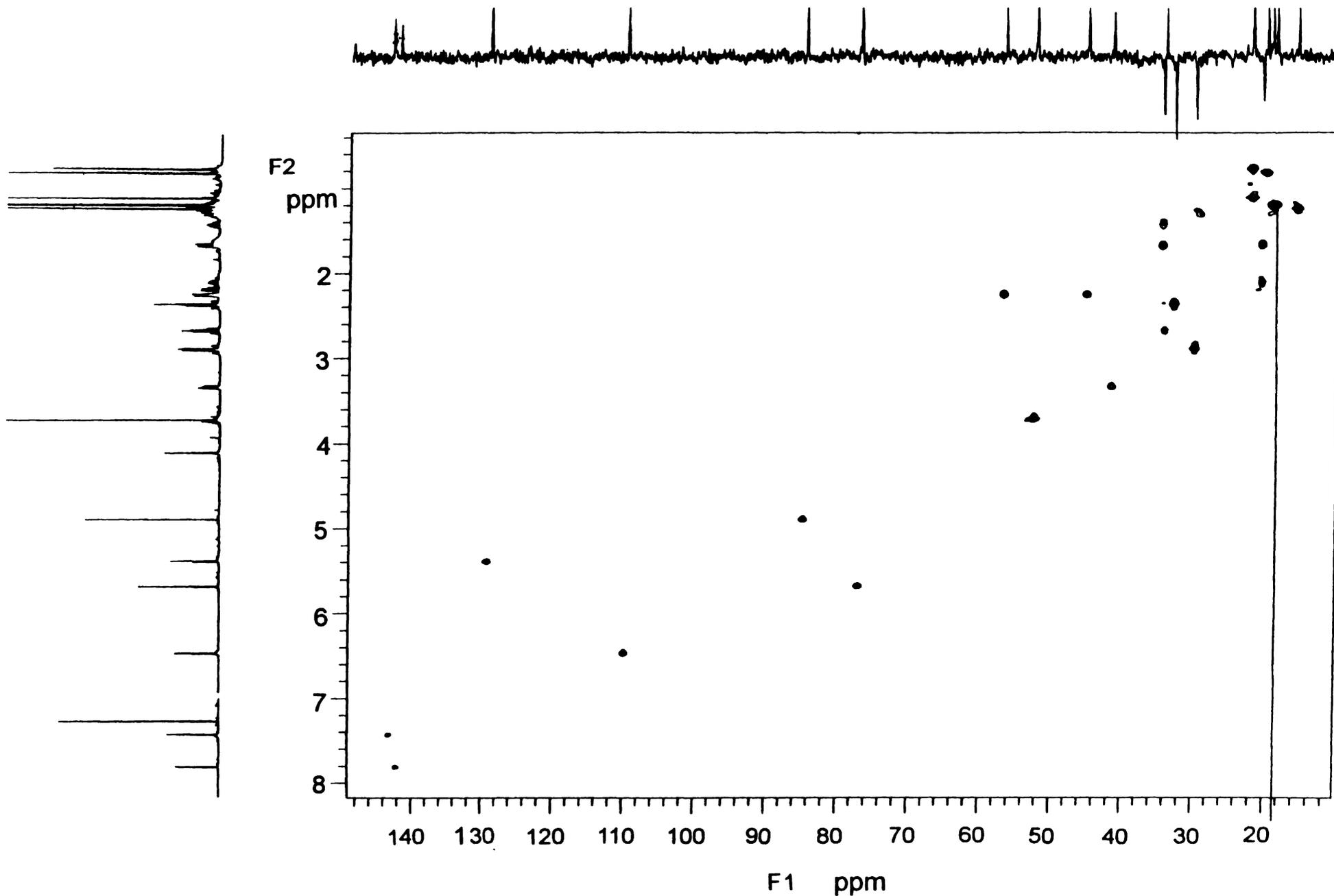


Espectro 39. Espectro de RMN- ^{13}C del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobiturato (25a).

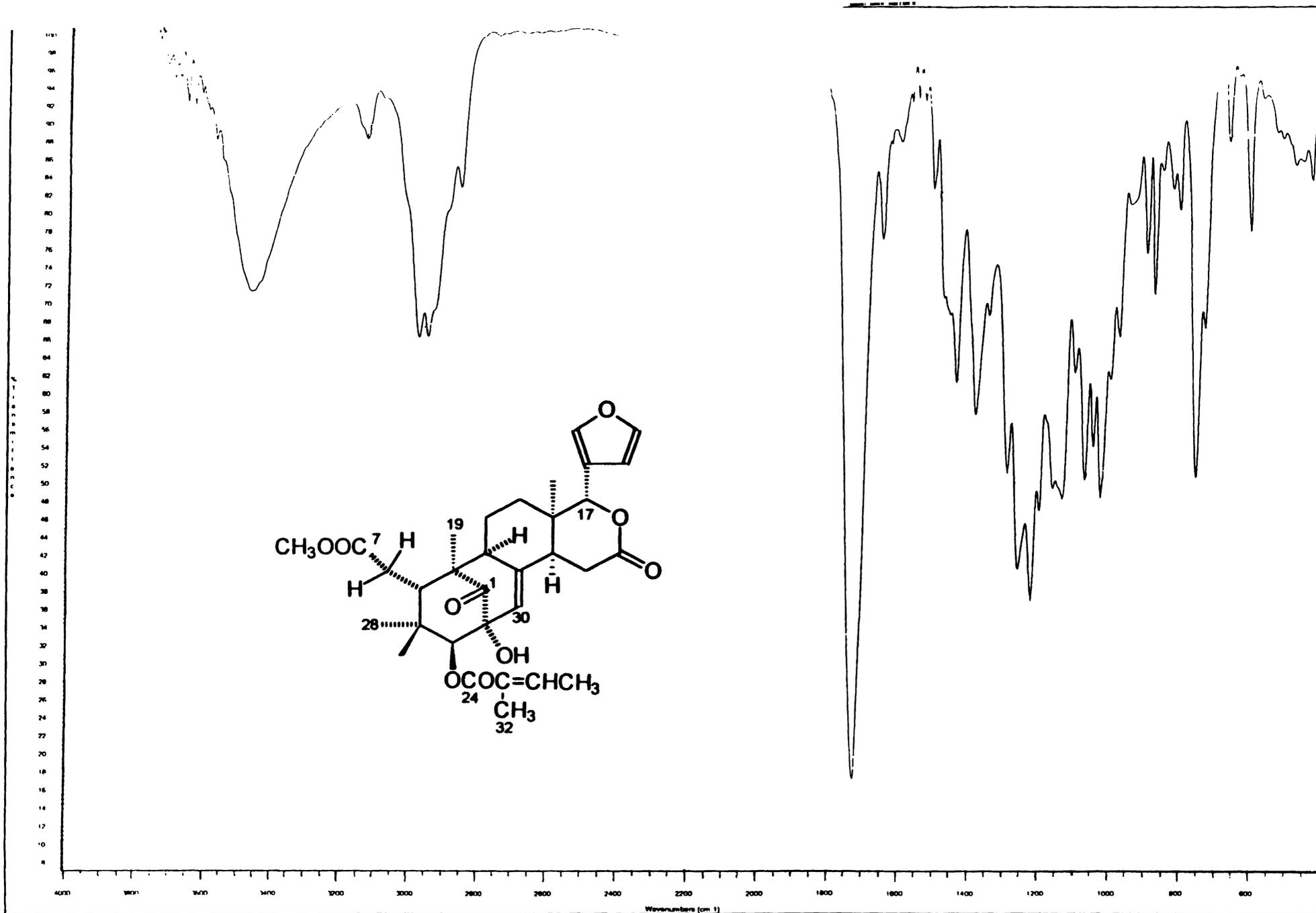


Espectro 40. Espectro de RMN-¹H HMBC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).

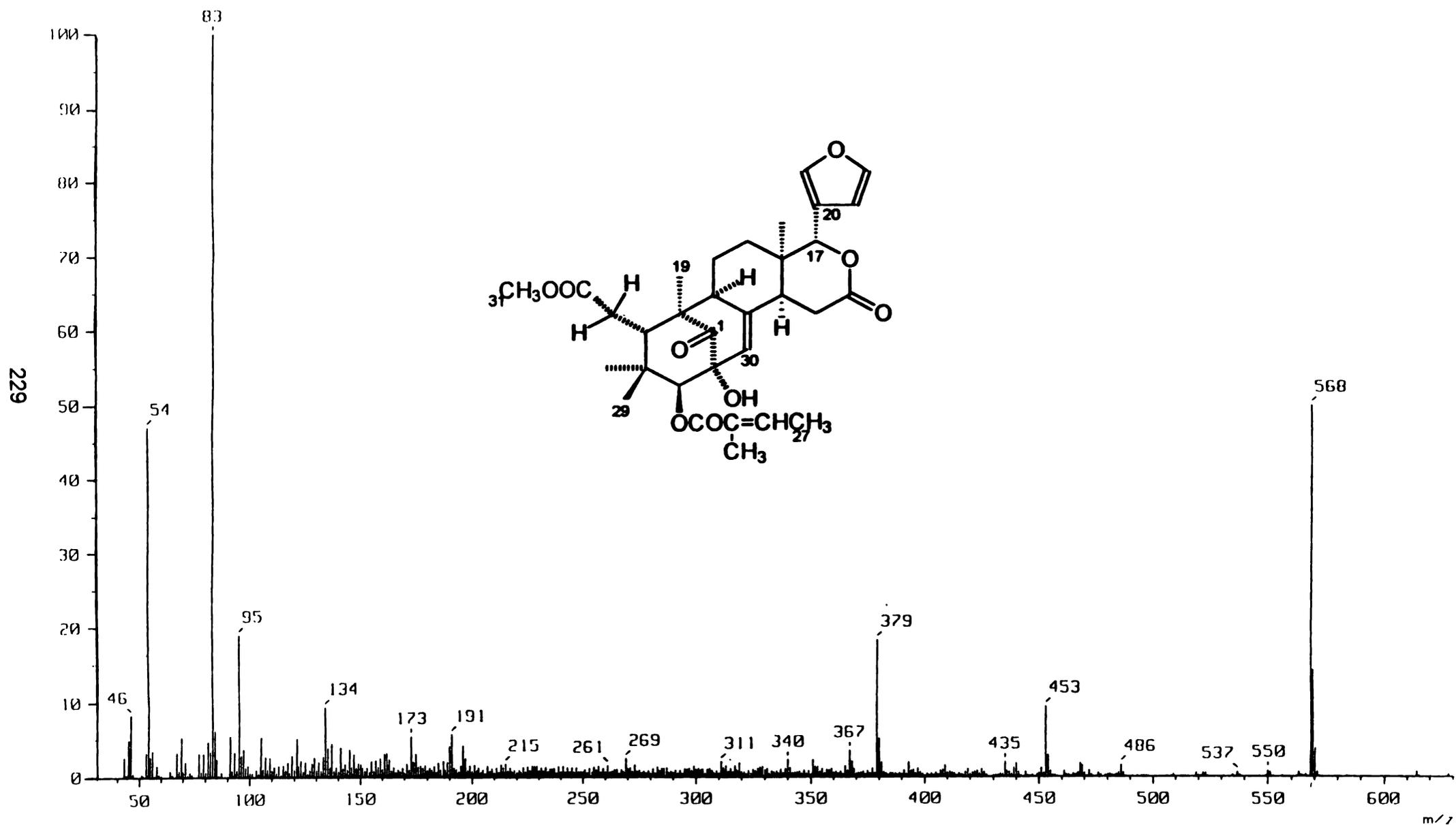
227



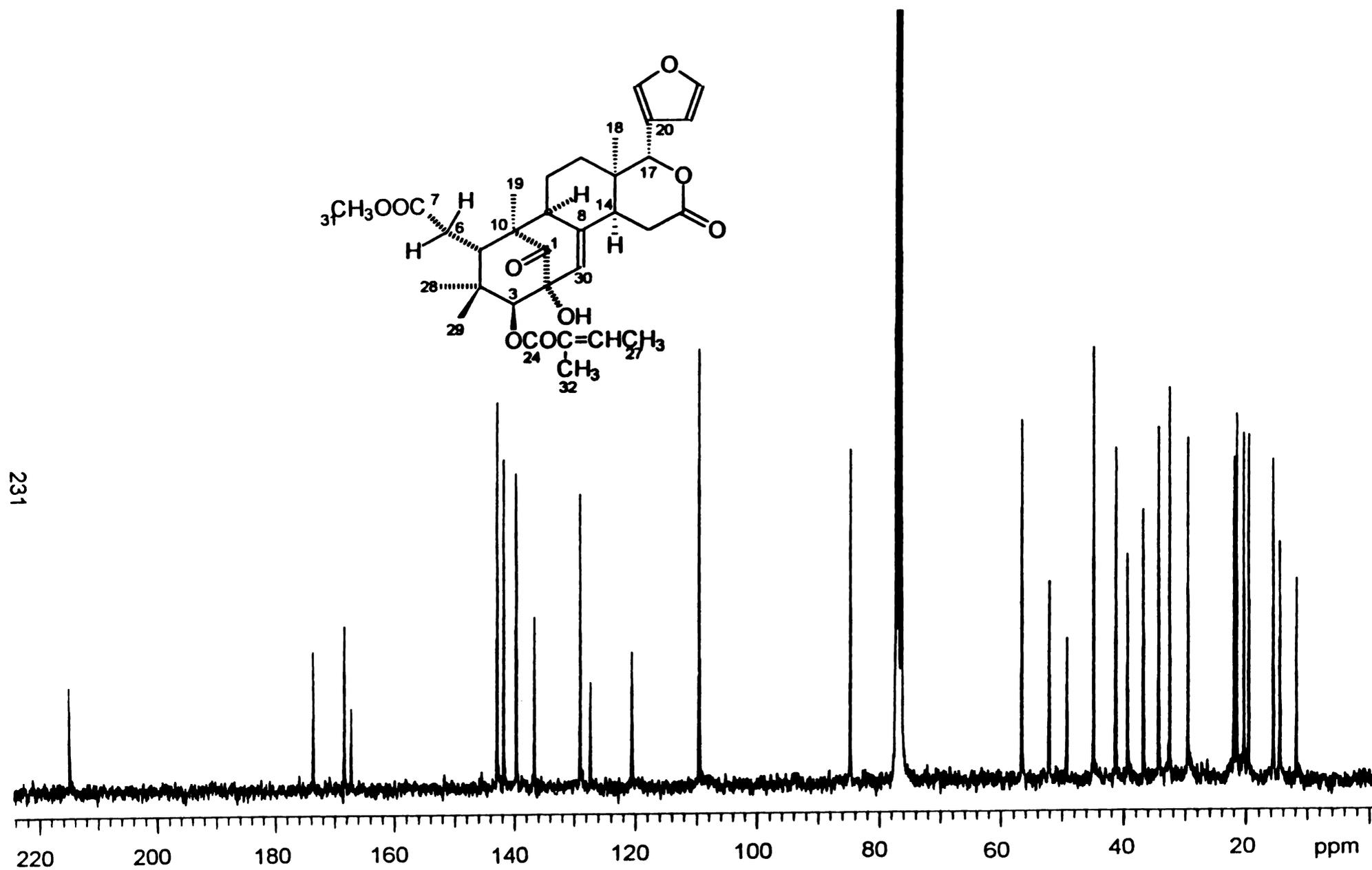
Espectro 41. Espectro de RMN-¹H HMQC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a).



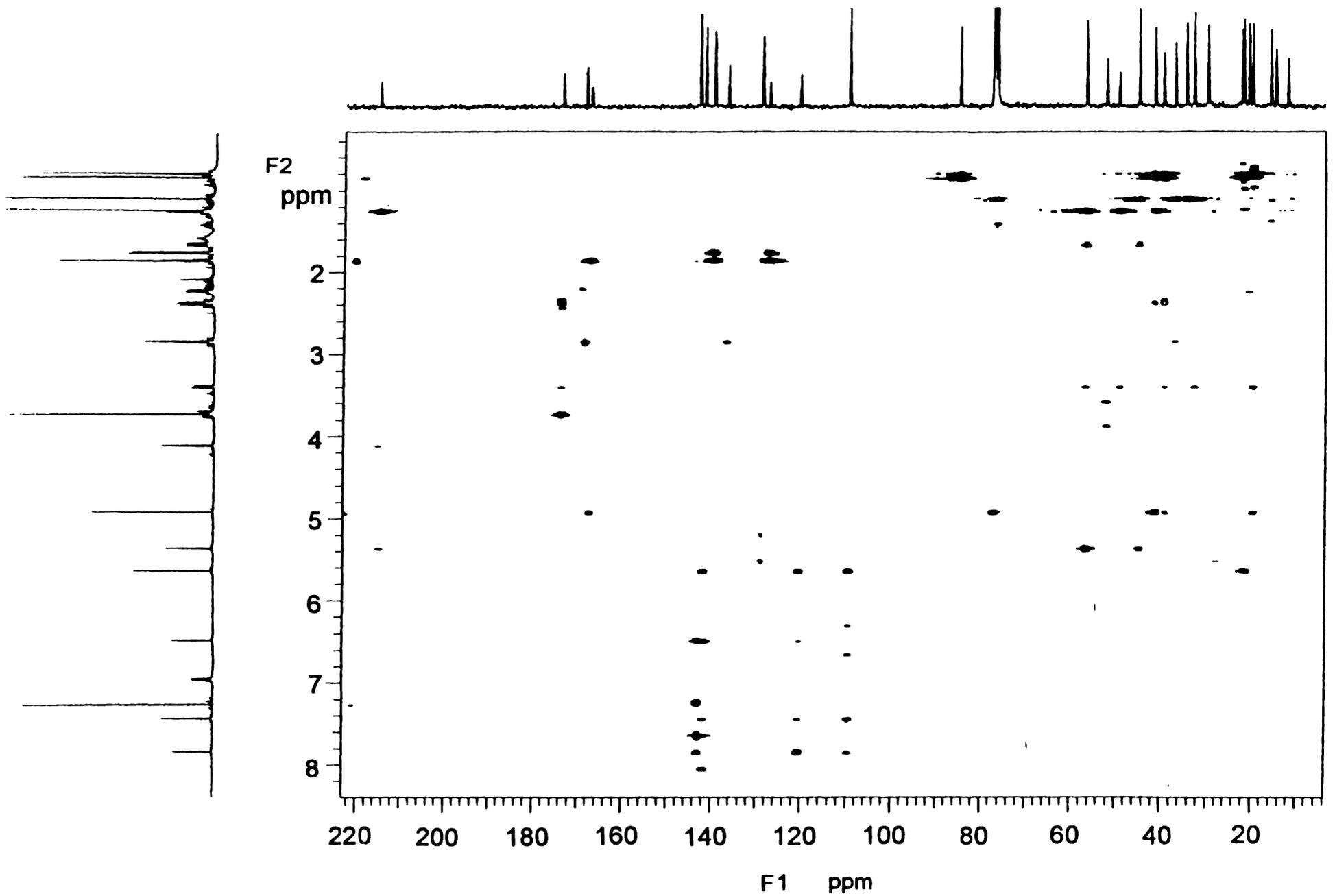
Espectro 42 Espectro de IR del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglate (25b).



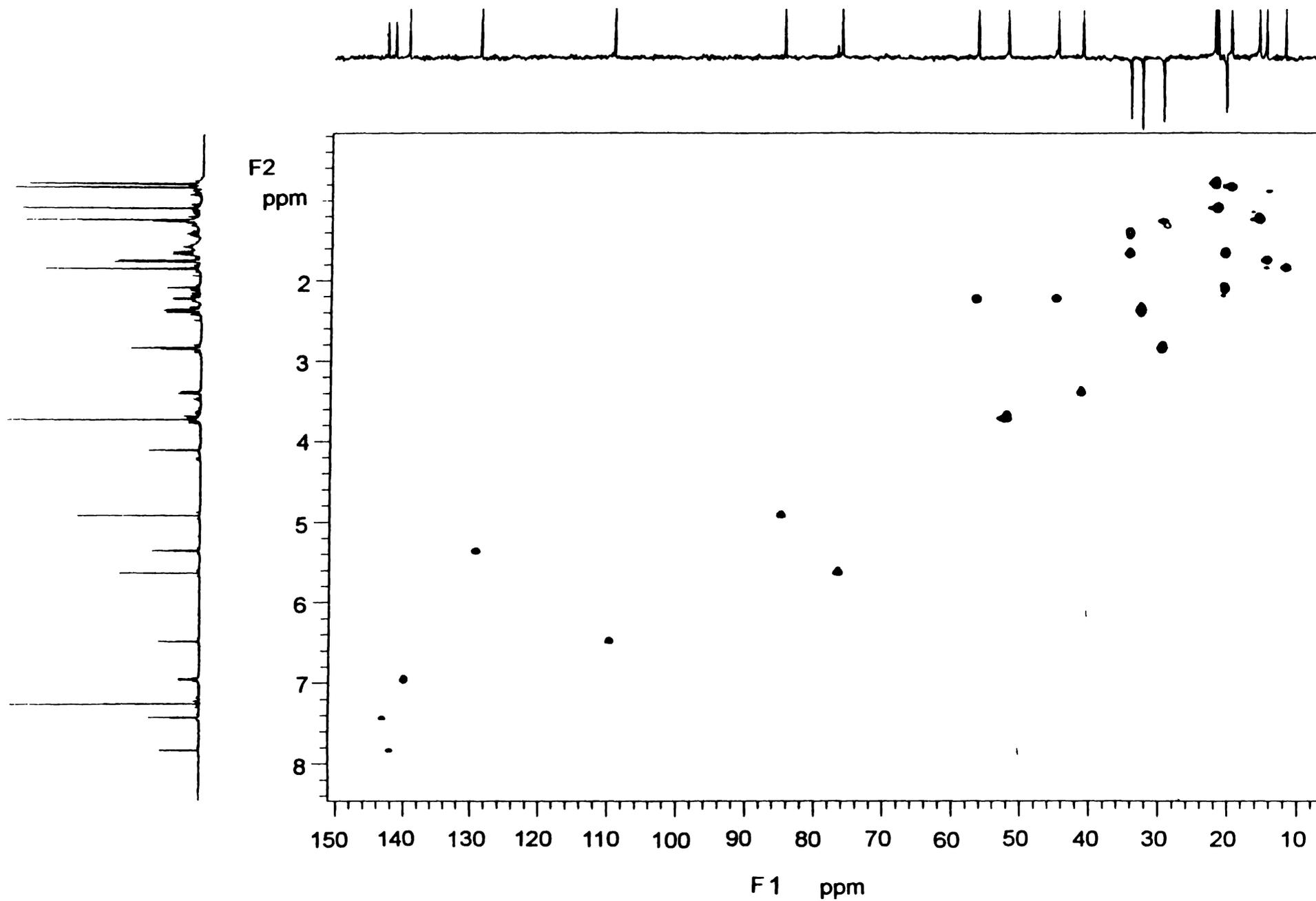
Espectro 43. Espectro de masas del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).



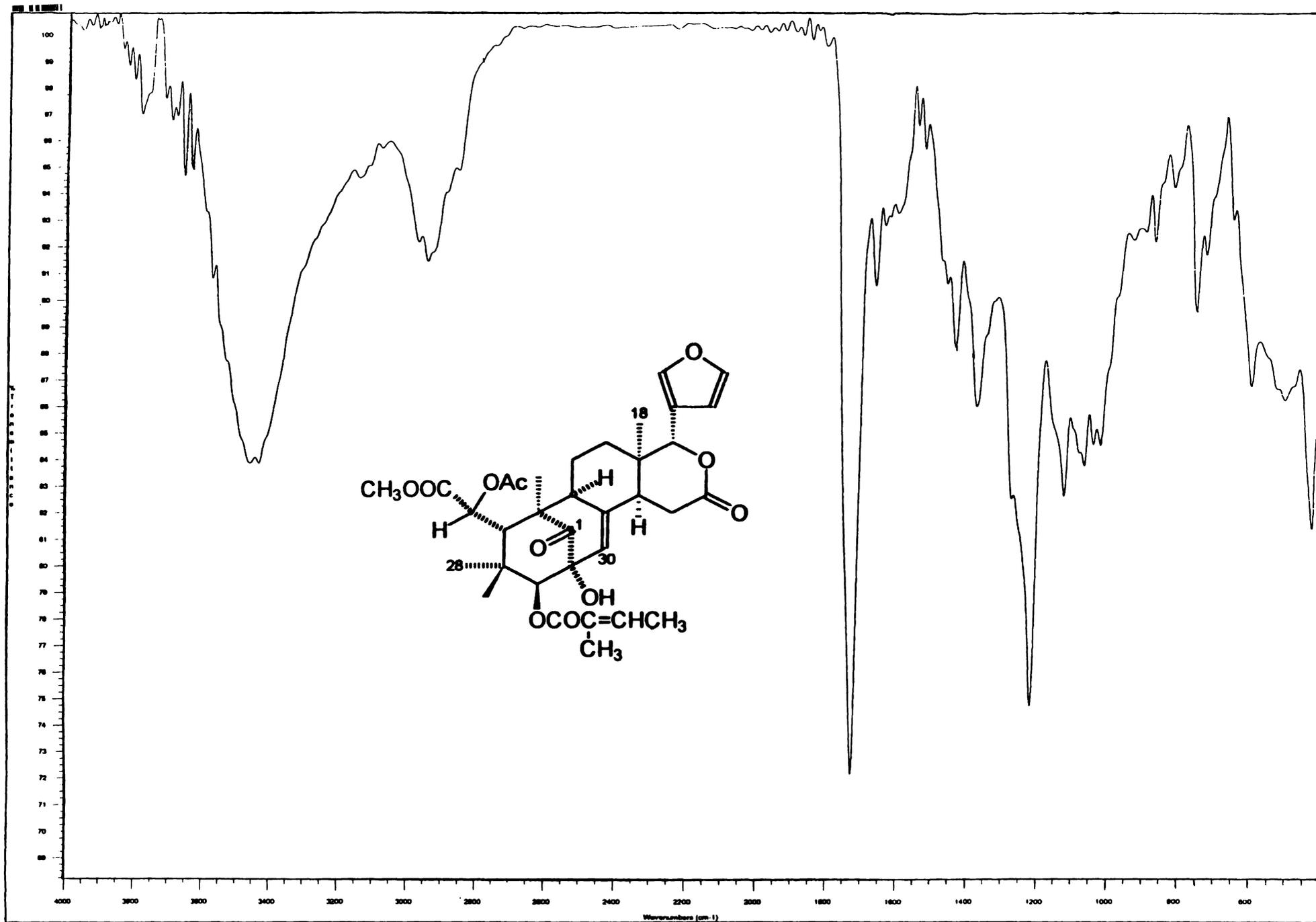
Espectro 45. Espectro de RMN- ^{13}C del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b).



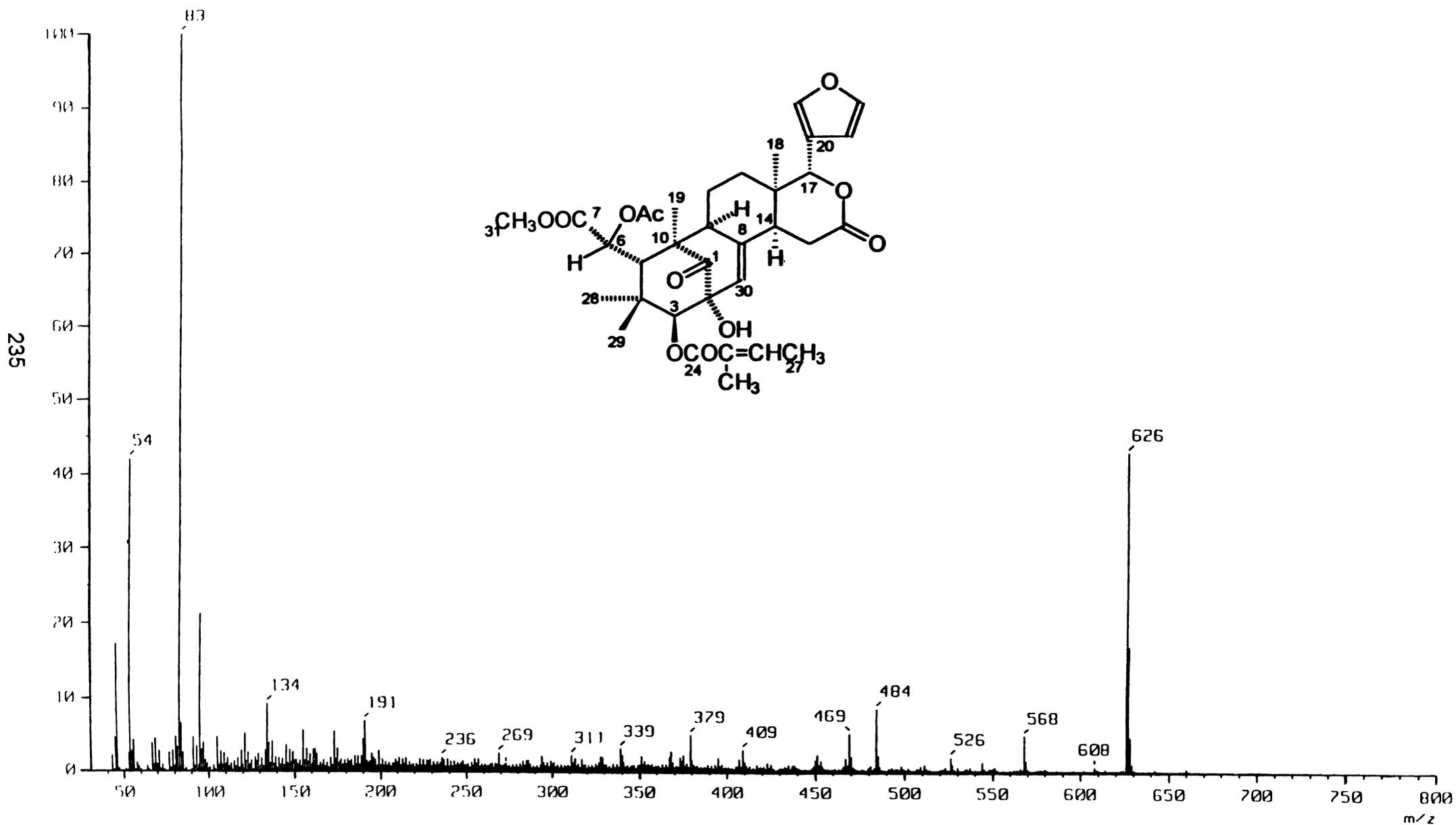
Espectro 46. Espectro de RMN- ^1H HMBC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglate (25b).



Espectro 47. Espectro de RMN- ^1H HMQC del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglate (25b).

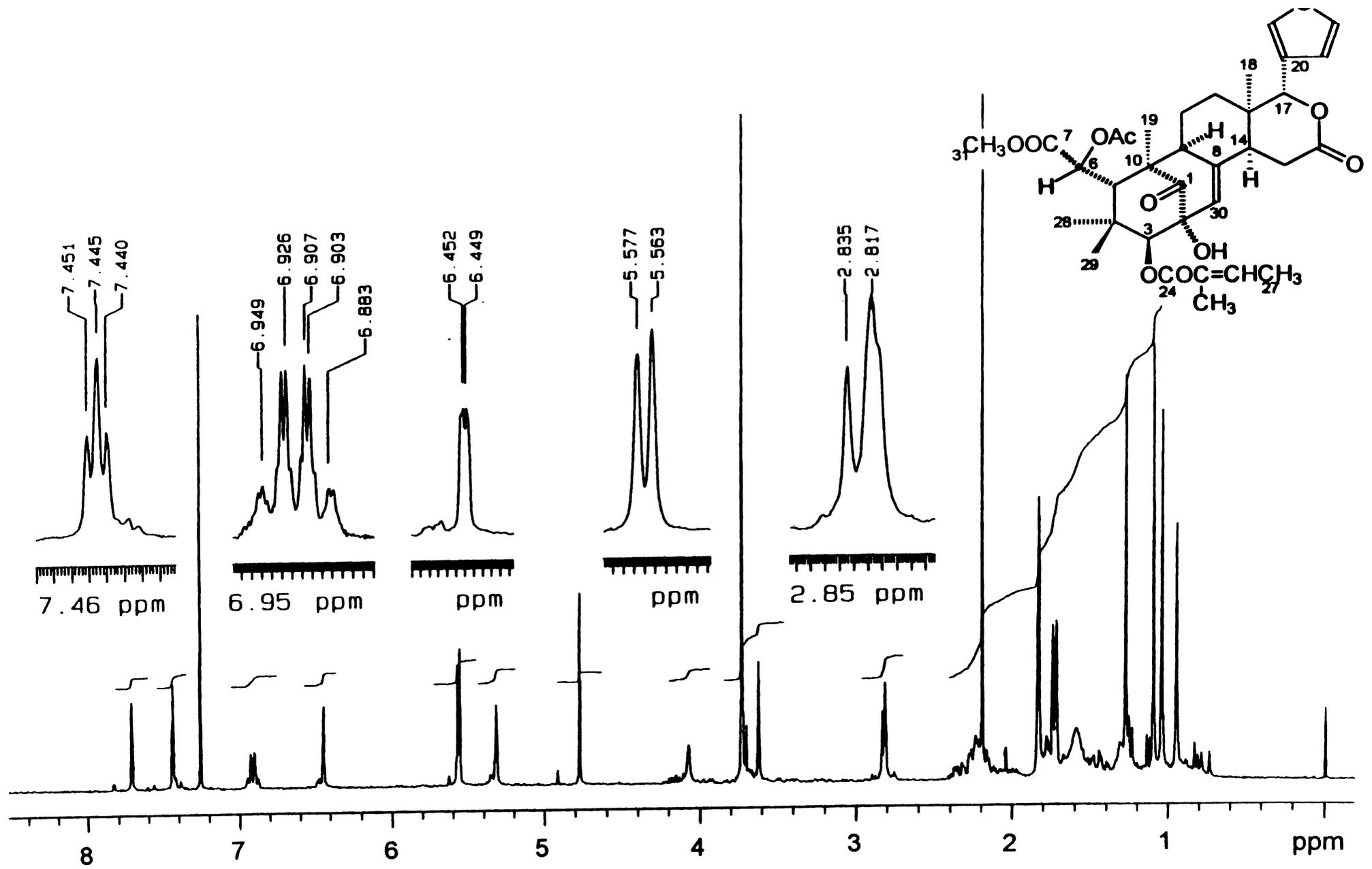


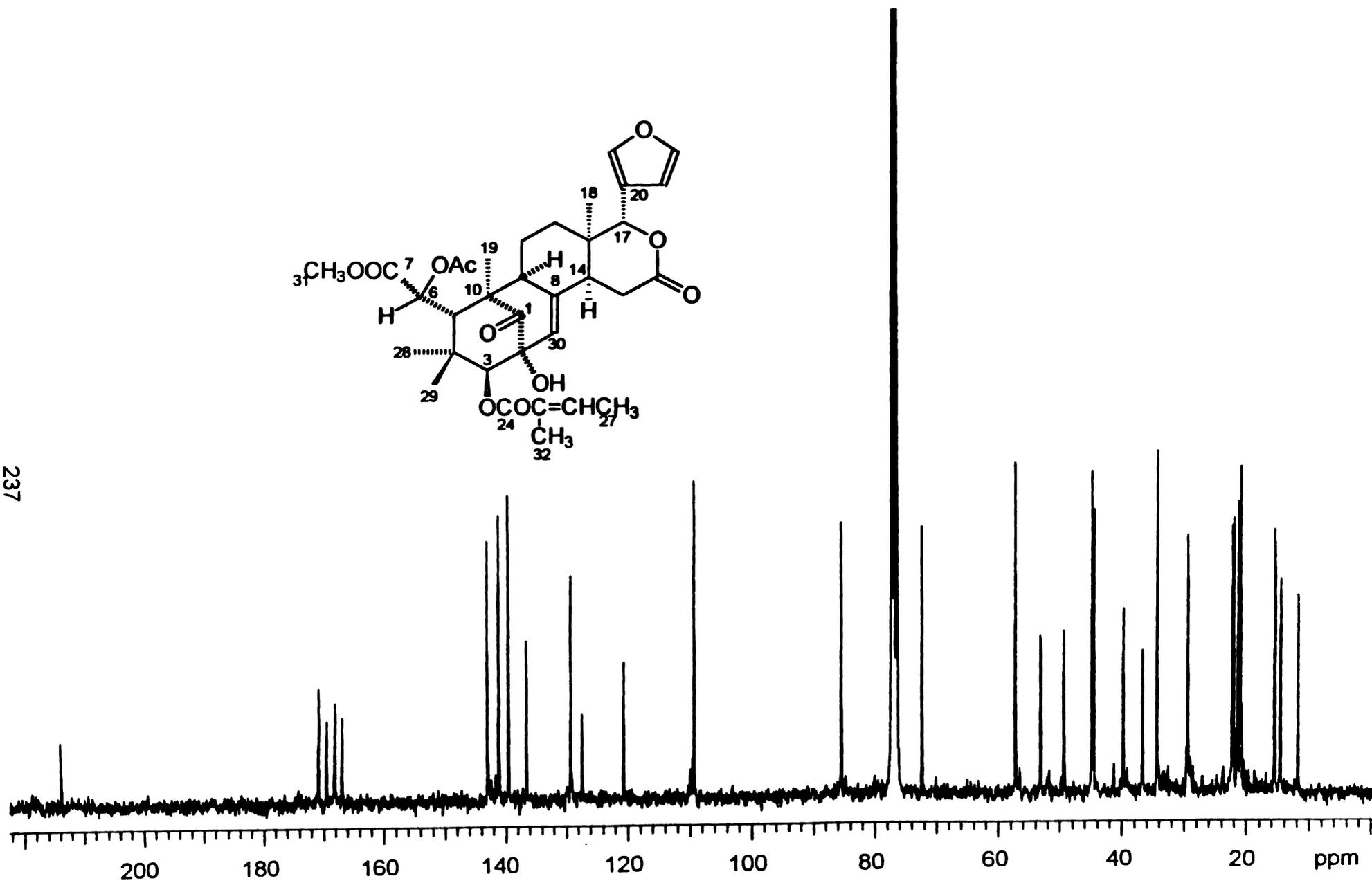
Espectro 48. Espectro de IR de la humilinólida E (55).



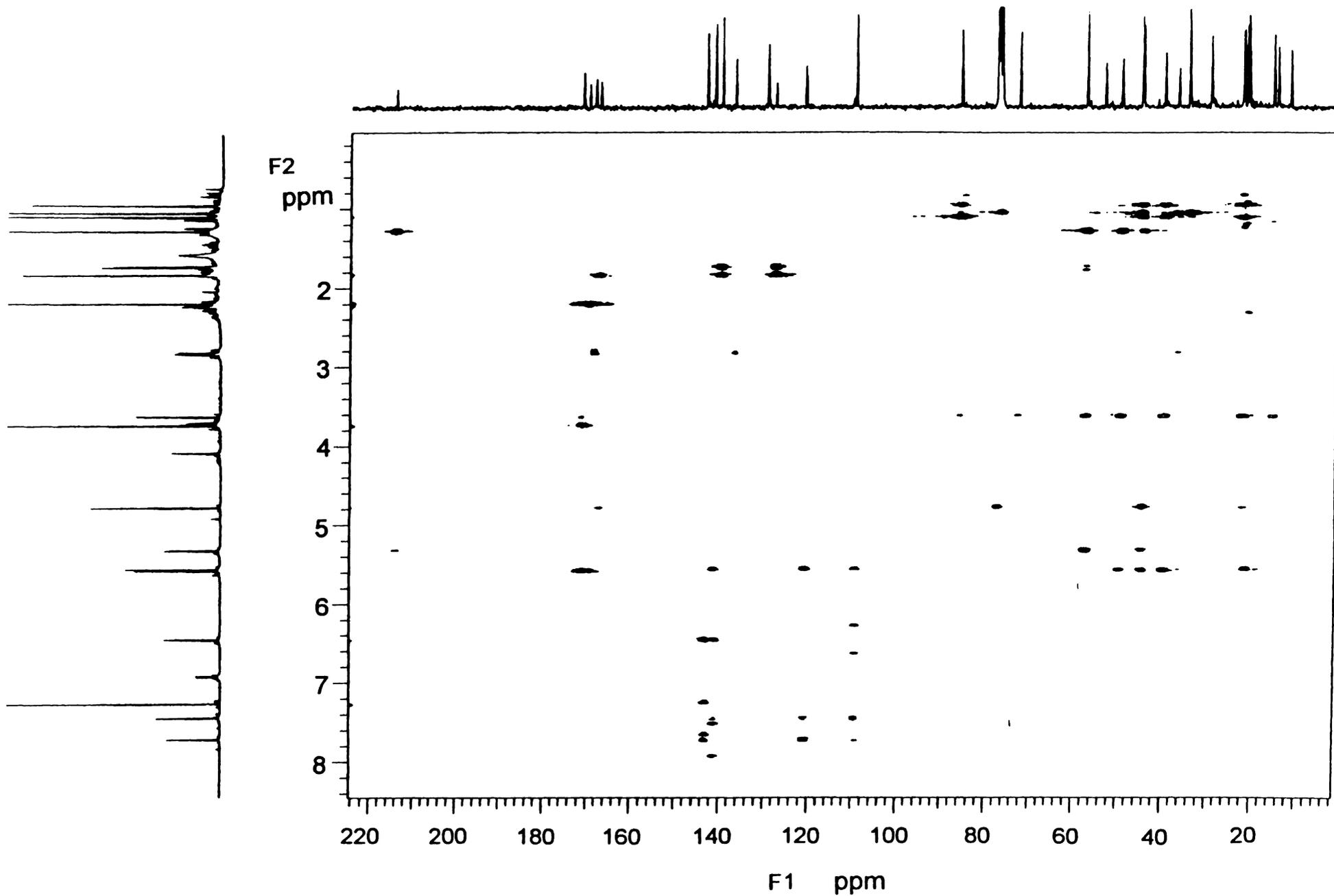
Espectro 49 Espectro de masas de la humilinólida E (55).

236

Espectro 50. Espectro de RMN- ^1H de la humilinólida E (55).

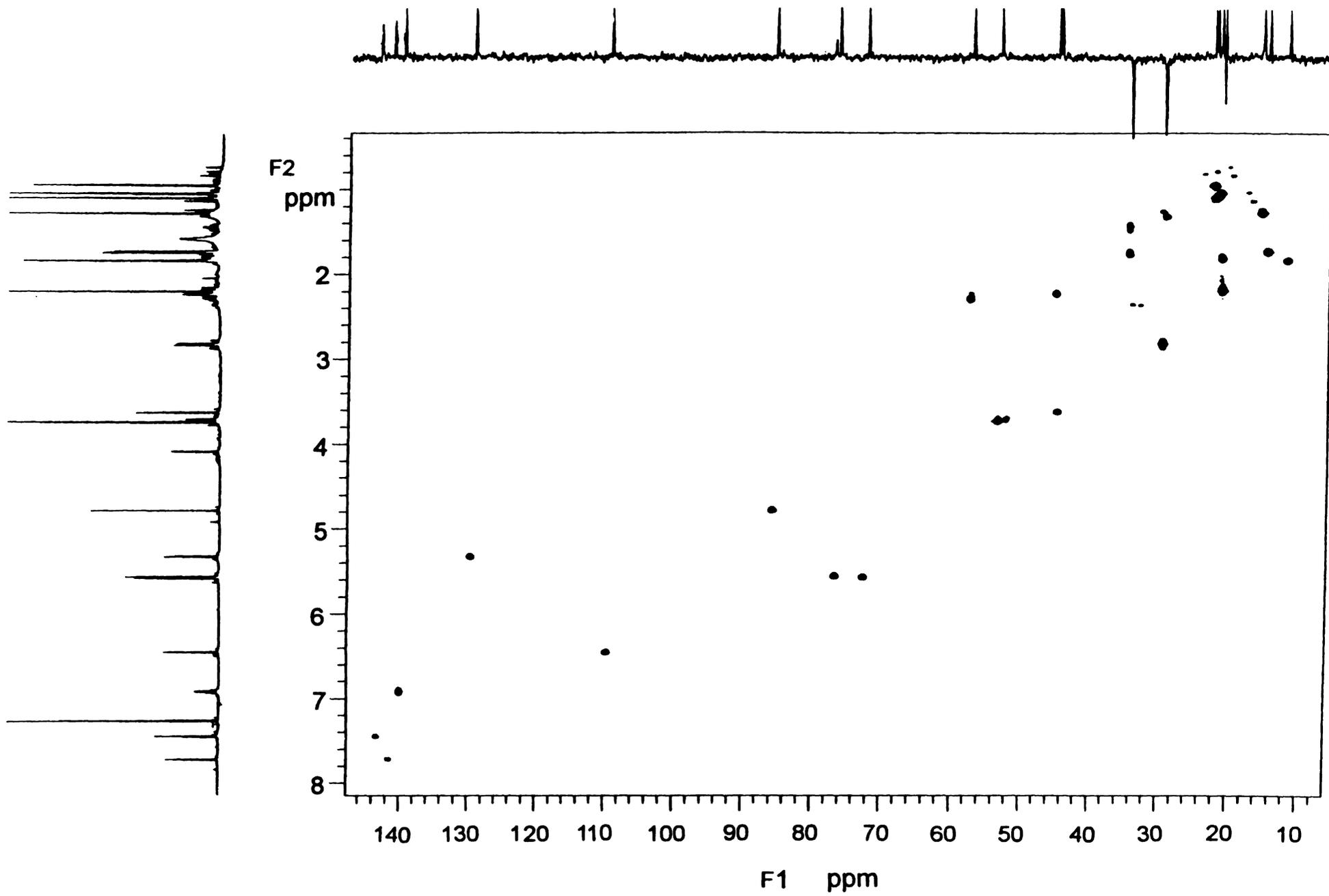
Espectro 51. Espectro de RMN- ^{13}C de la humilinólida E (55).

238



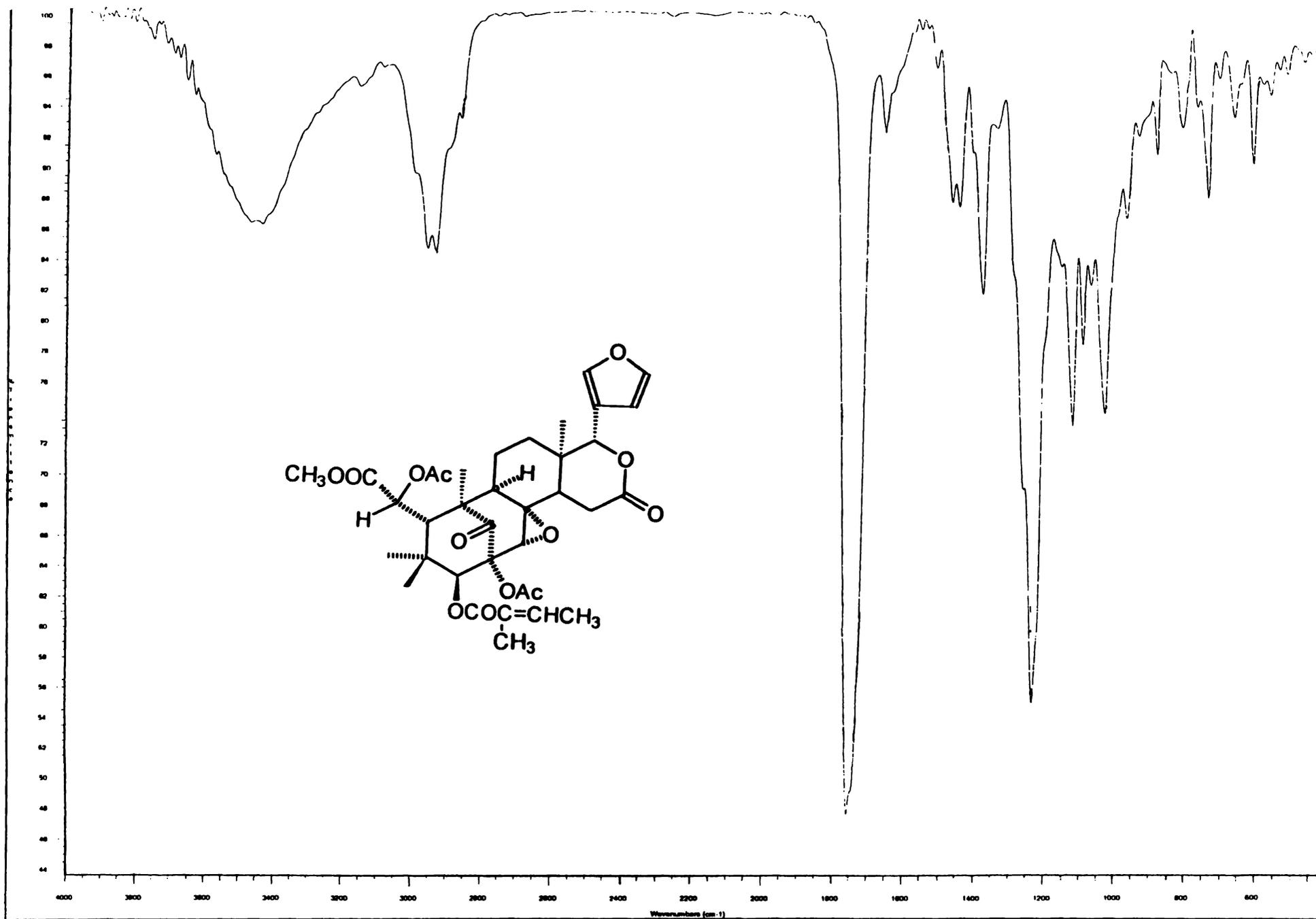
Espectro 52. Espectro de RMN- ^1H HMBC de la humilinólida E (55).

239

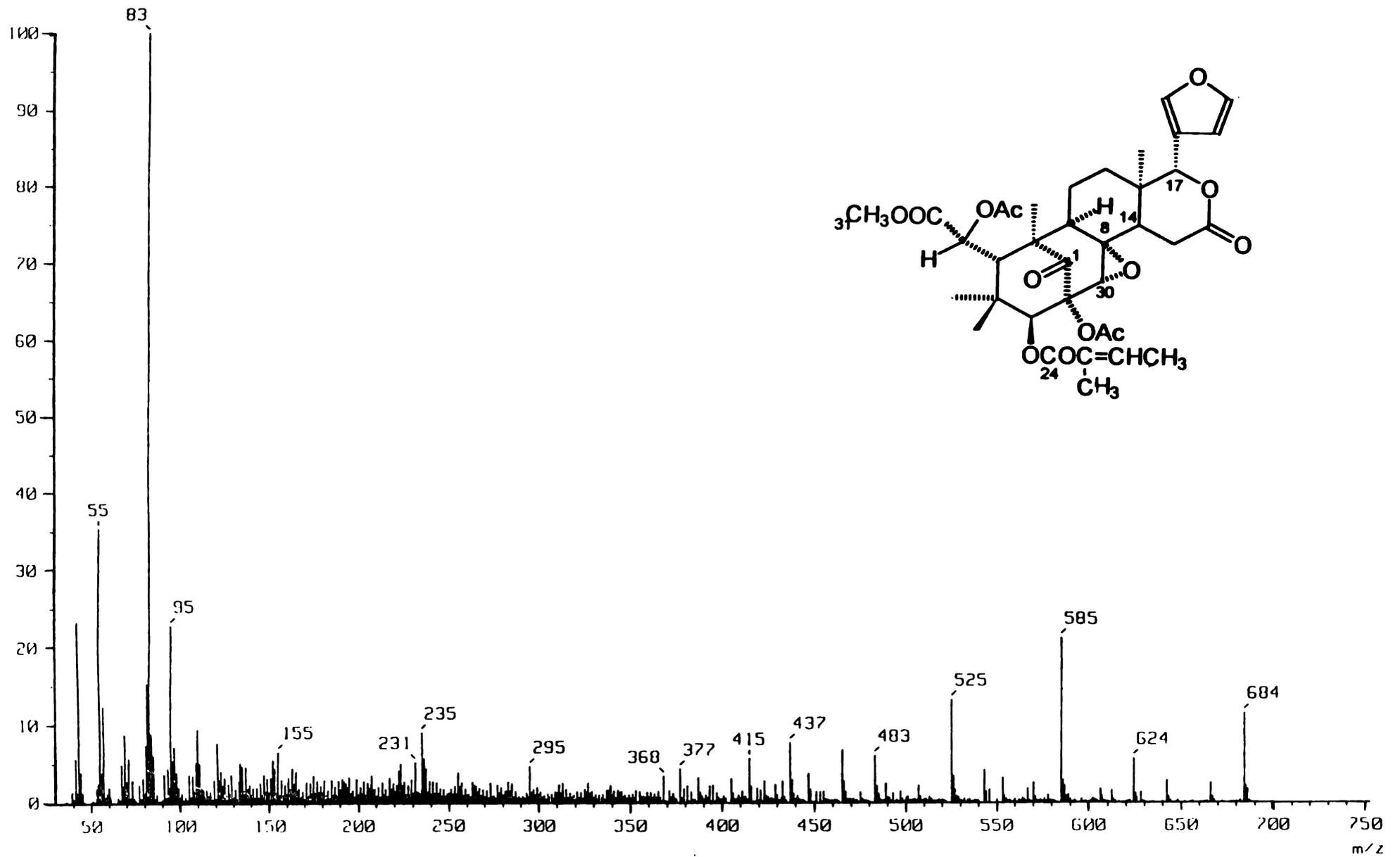


Espectro 53. Espectro de RMN- ^1H HMQC de la humilinólida E (55).

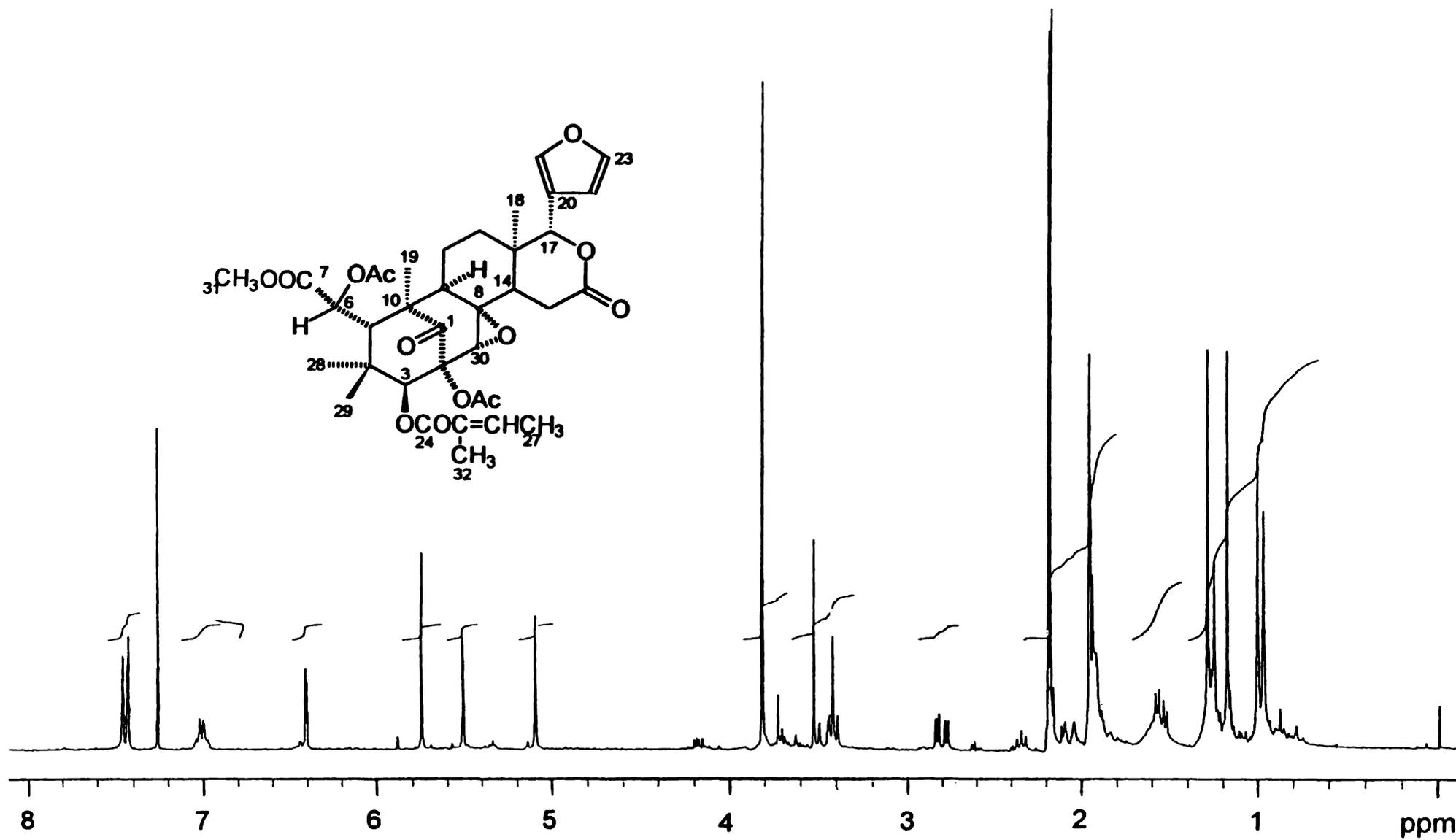
240



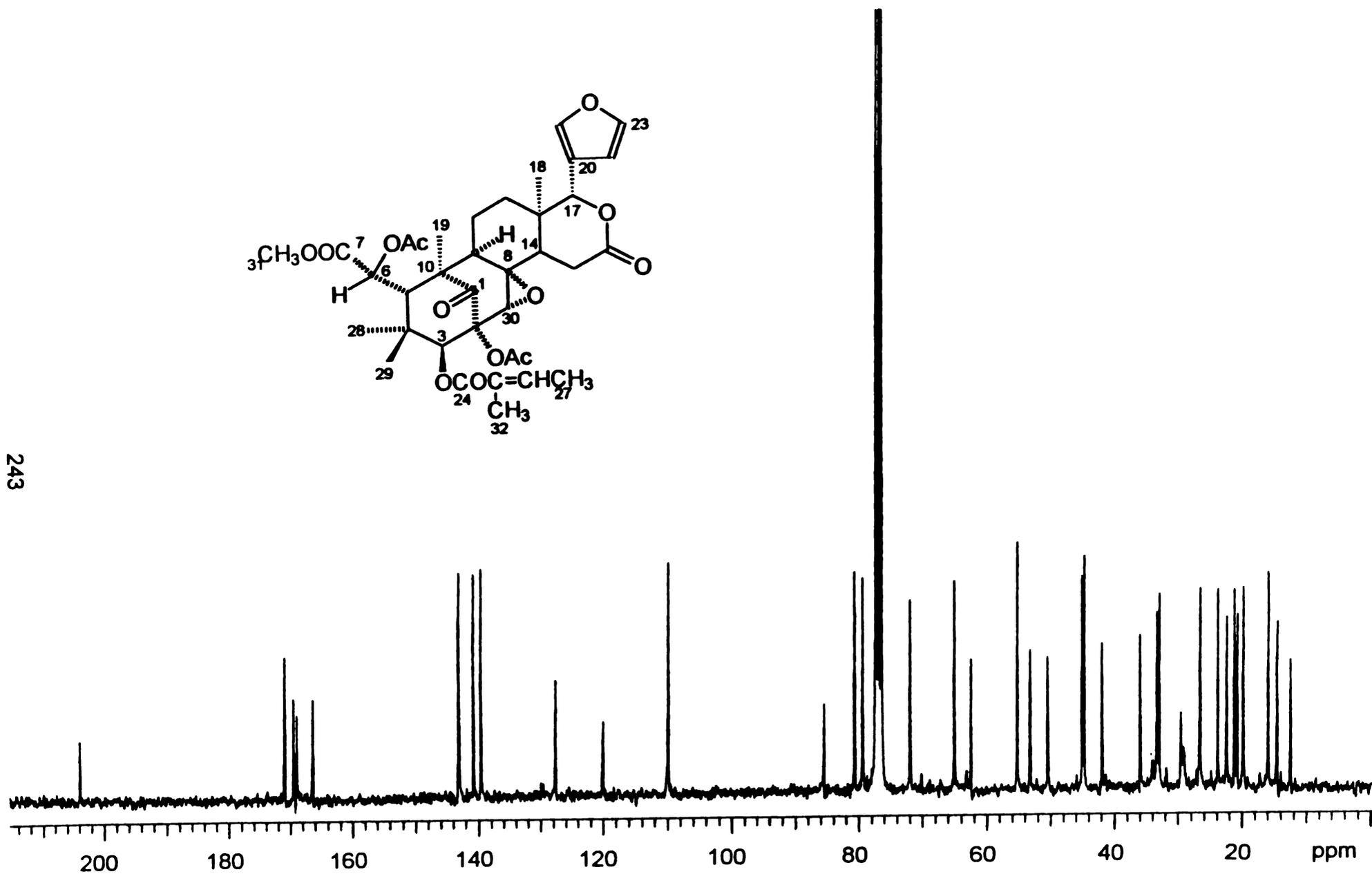
Espectro 54. Espectro de IR de la humilinólida F (56).



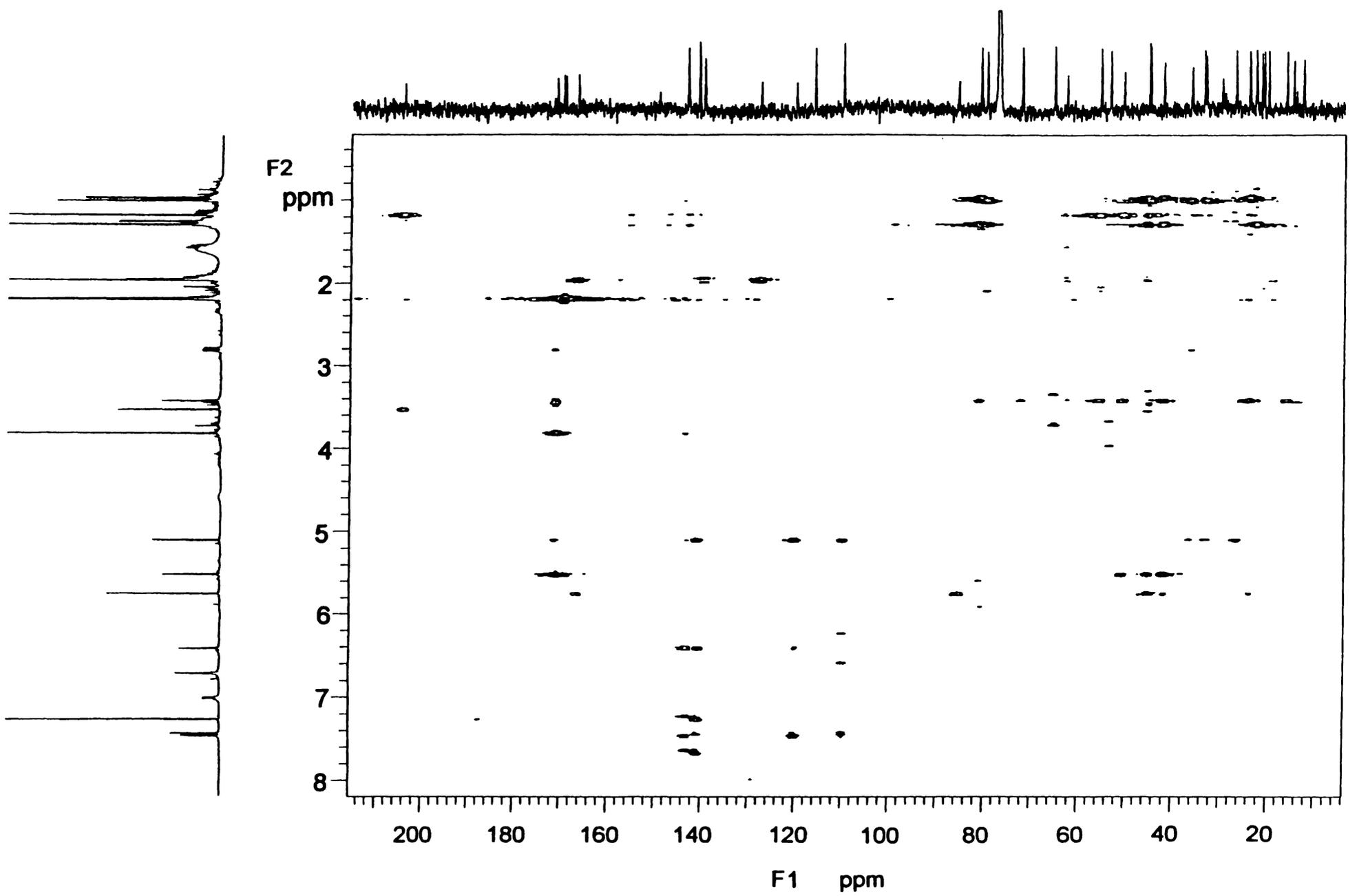
Espectro 55. Espectro de masas de la humilinólida F (56).

Espectro 56. Espectro de RMN- ^1H de la humilinólida F (56).

243



Espectro 57 Espectro de RMN-¹³C de la humilinólida F (56).



Espectro 58. Espectro de RMN- ^1H HMBC de la humilinólida F (56).

ANEXO II.

**RESULTADOS ADICIONALES DE LA EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
INSECTICIDA DE LOS LIMONOIDES DE *S. humilis*.**

Tabla 23. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso máximo alcanzado y porcentaje de mortalidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso máximo alcanzado (mg)	Mortalidad de larvas (%)
Control		94 ± 5.64	3
Humilinólida E			
(55)	50	94.07 ± 55.64	23
Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato 25a	50	90.60 ± 5.53	16
Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato 25b	50	96.63 ± 5.24	0
Toosendanina	50	41.81 ± 5.64	23

Los valores representan los promedios de 30 insectos de prueba ($P < 0.05$). ± error estándar.

Tabla 24. Efecto de la humilina B (30) y swietenina C (44) sobre el peso máximo alcanzado y porcentaje de mortalidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

Tratamiento	Concentración (ppm)	Peso máximo alcanzado (mg)	Mortalidad de larvas (%)
Control		100 ± 4.57	10
Humilina B (30)	50	96.96 ± 4.49	10
Swietenina C			
(44)	50	86.98 ± 4.57	16
Toosendanina	50	22.92 ± 4.41	33

Los valores representan los promedios de 30 insectos de prueba ($P < 0.05$). ± error estándar.

Tabla 25. Efecto de las Humilínólicas A-D (26-29) sobre otros parámetros de desarrollo de *Ostrinia nubilalis* (Continuación).

Humilínólida										
C										
5 ppm	26.0 ±0.0	-----	57.3 ±0.0	-----	16.6	33.0 ±0.0	-----	29.1 ±0.0	-----	3.3
50 ppm	-----	37.0 ±0.0	-----	87.9 ±0.0	13.3	-----	44.0* ±0.0	-----	40.2 ±0.0	3.3
Humilínólida										
D										
5 ppm	23.7 ±0.6	27.0 ±0.5	69.3 ±1.0	89.1 ±2.2	53.3	32.6 ±0.5	34.0 ±0.6	29.1 ±1.3	48.0 ±2.2	50.0
50 ppm	27.0 ±0.0	31.5 ±2.5	76.9 ±0.0	87.9 ±7.5	10.0	37.0 ±0.0	37.0 ±0.0	33.3 ±0.0	51.5 ±4.9	10.0
Toosendanina										
5 ppm	29.8 ±0.9	31.1* ±1.0	63.5 ±2.1	81.2 ±1.0	63.3	39.0* ±0.9	41.0 ±1.6	23.0 ±1.4	43.0 ±1.9	63.3
50 ppm	33.4* ±1.3	35.9* ±1.2	48.9 ±3.9	65.7 ±4.1	50.0	42.4* ±1.8	45.8* ±0.7	17.6 ±0.8	34.4 ±2.2	50.0

* Las medias son significativamente diferentes del control en Xi cuadrada Kruskal-Wallis (P <0.05).

Tabla 26. Efecto de la humilinólida E (55), del metil -2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil -2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre otros parámetros de desarrollo de *Ostrinia nubilalis*.

Compuesto y concentración (ppm)	Tiempo promedio de pupación (días)		Peso máximo de las pupas (mg)		% de pupación	Tiempo promedio de emergencia del adulto (días)		Peso promedio del adulto (mg)		% de emergencia del adulto
	M	H	M	H		M	H	M	H	
Control	28.66 ±1.06	27.87 ±1.12	80.77 ±4.94	119.4 ±5.24	84	35.5 ±4.2		94.69 ±5.54	94.59 ±5.54	73
Humilinólida E (55)										
50 ppm	28.00 ±1.82	26.60 ±1.42	79.33 ±8.57	87.29 ±6.63	26	34.5 ±2.9		94.07 ±5.54	94.07 ±5.54	23
Metil -2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a)										
50 ppm	28.00 ±1.42	27.00 ±1.59	78.21 ±6.63	102.1 ±7.42	33	36.5 ±3.5		90.60 ±5.53	90.60 ±5.53	30
Metil -2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b)										
50 ppm	24.50 ±0.91	27.00 ±1.12	76.39 ±4.2	100.6 ±5.2	70	33.0 ±4.7		96.63 ±5.64	96.63 ±5.64	63
Toosendanina										
50 ppm	33.00 ±1.42	33.00 ±1.59	61.91 ±6.63	71.15 ±7.42	26	> 41		41.80 ±5.64	41.80 ±5.64	20

* Las medias son significativamente diferentes del control en Xi cuadrada Kruskal-Wallis (P <0.05).

Tabla 27. Efecto de los compuestos humilina B y swietenina C (30 y 44) sobre otros parámetros de desarrollo de *Ostrinia nubilalis*.

Compuesto y concentración (ppm)	Tiempo promedio de pupación (días)		Peso máximo de las pupas (mg)		% de pupación	Tiempo promedio de emergencia del adulto (días)		Peso promedio del adulto (mg)		% de emergencia del adulto
	M	H	M	H		M	H	M	H	
Control	24.06 ±0.79	24.06 ±0.79	85.34 ±5.59	95.48 ±3.37	87	32.5 ±3.5		38.66 ±4.0	52.59 ±2.4	82
Humilina B (30)										
50 ppm	25.60 ±0.68	25.60 ±0.68	86.02 ±3.54	93.20 ±4.5	63	34.5 ±4.5		37.53 ±2.5	50.35 ±3.2	55
Swietenina C (44)										
50 ppm	23.83 ±0.88	23.83 ±0.88	75.12 ±5.00	93.18 ±4.23	44	34.0 ±3.0		32.79 ±4.0	51.52 ±3.02	49
Toosendanina										
50 ppm	36.56 ±0.76	36.56 ±0.76	57.16 ±7.91	65.43 ±3.54	55	> 44		23.34 ±5.6	33.14 ±2.5	24

* Las medias son significativamente diferentes del control en Xi cuadrada Kruskal-Wallis (P < 0.05).

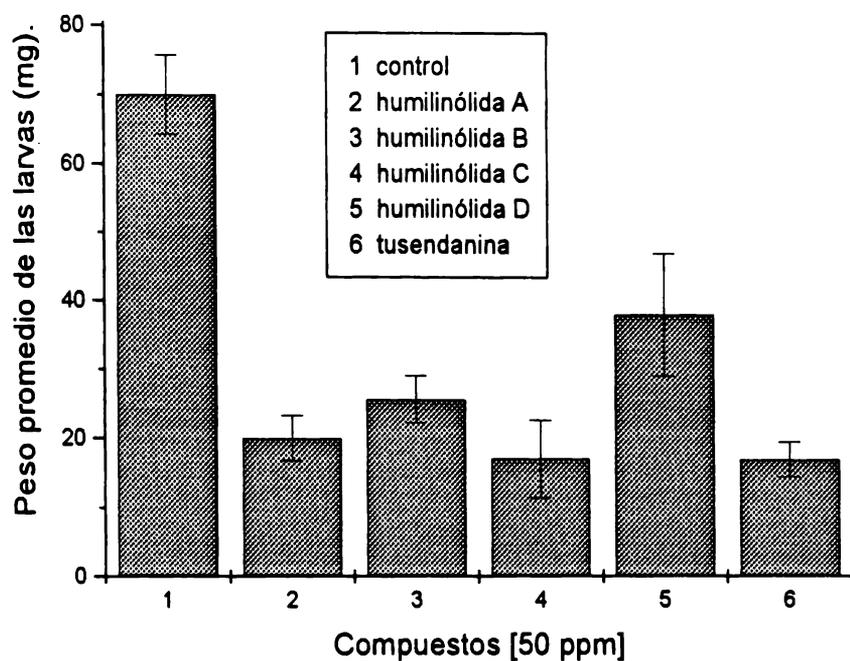


Figura 45. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) sobre el peso promedio máximo alcanzado por las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

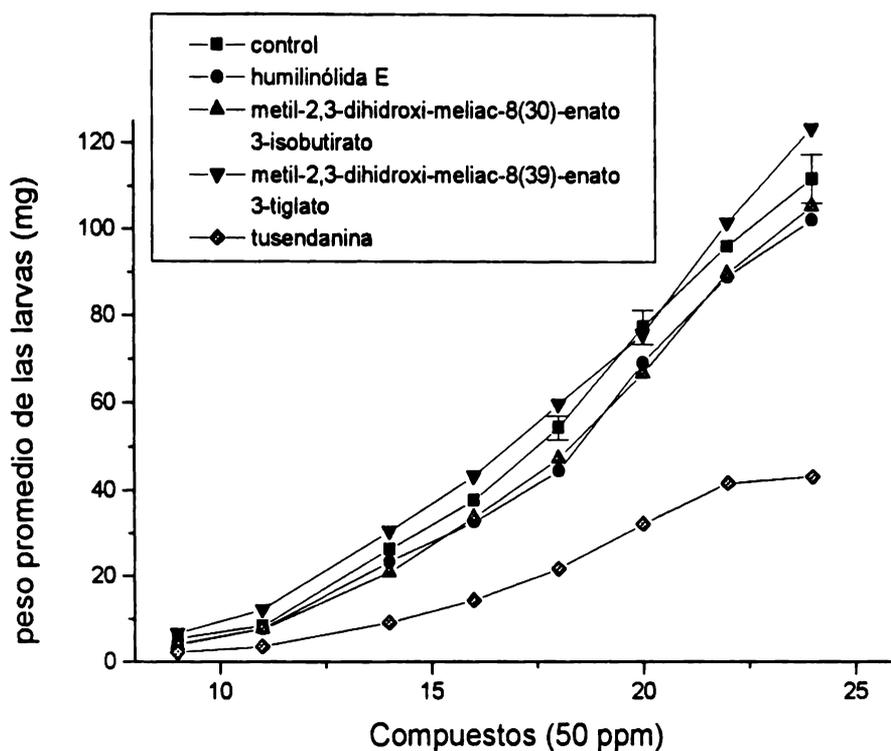


Figura 46. Efecto de la humilinólida E (55), el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso promedio de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

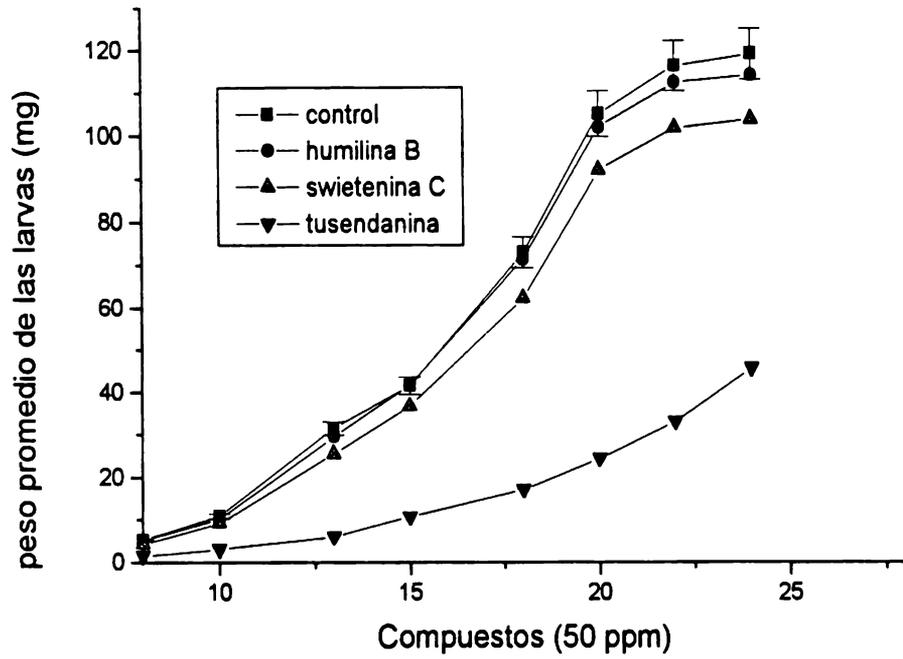


Figura 47. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el peso promedio de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

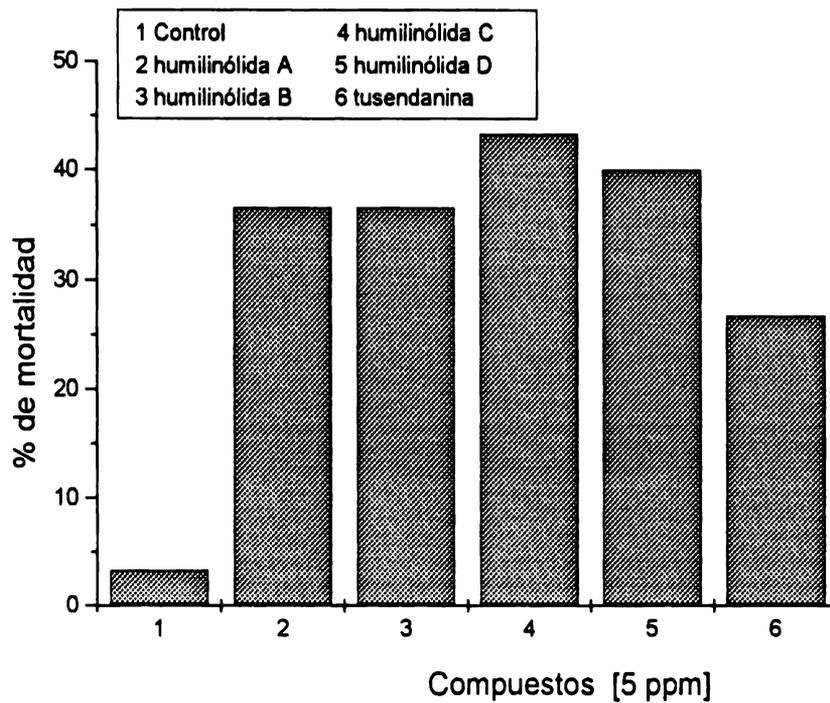


Figura 49. Efecto de las humilinólidas A-D (26-29) a la concentración de 5 ppm sobre el porcentaje de mortalidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

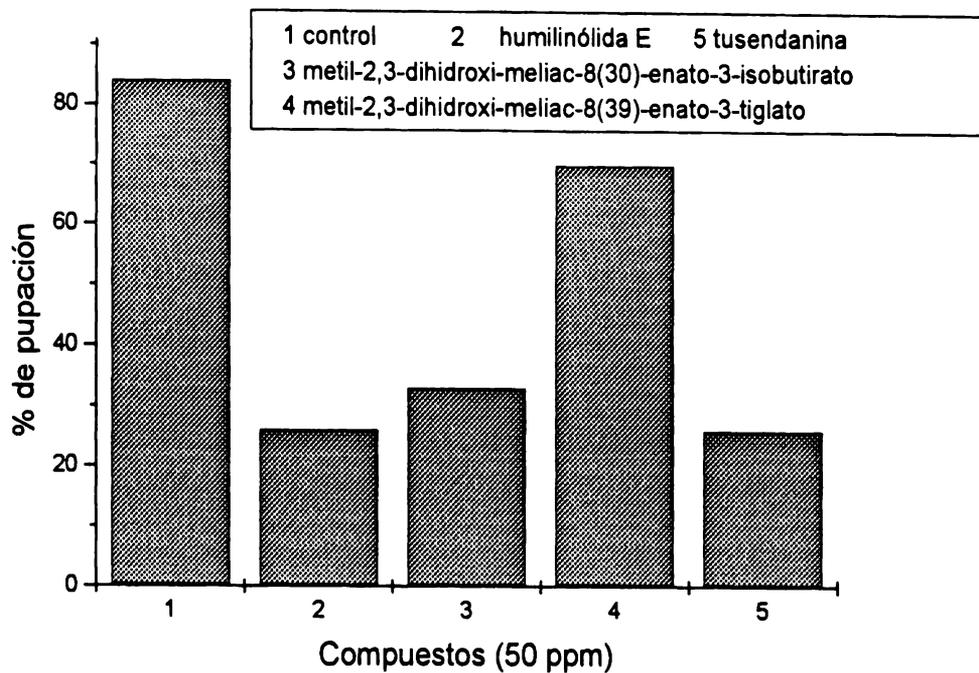


Figura 51. Efecto de la humilinólida E (**55**), el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3- isobutirato (**25a**) y del el metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3- tiglato (**25b**) sobre el porcentaje de pupación.

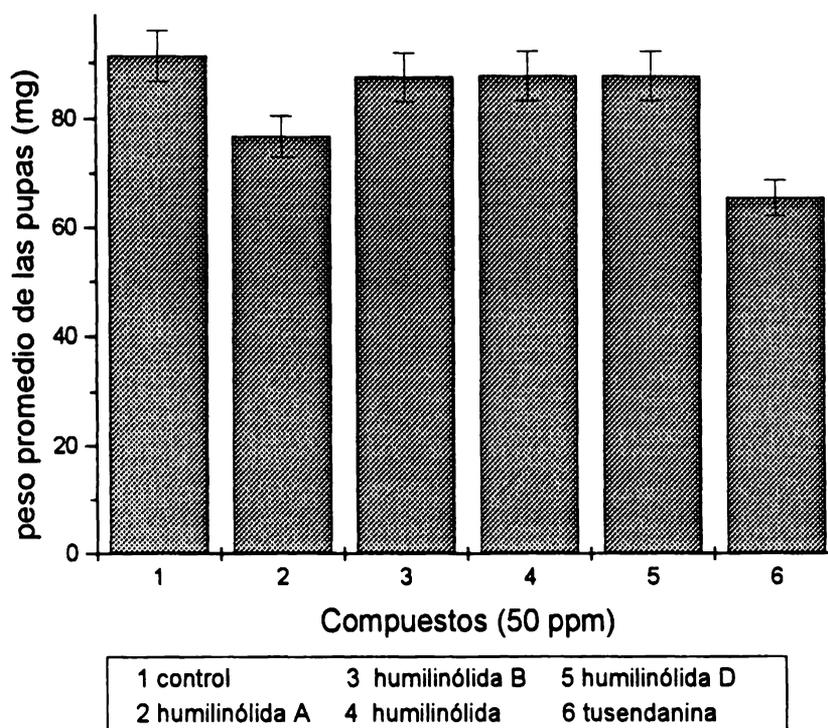


Figura 52. Efecto de las humilinólidas A-D (**26-29**) sobre el peso promedio de las pupas de *O. nubilalis*.

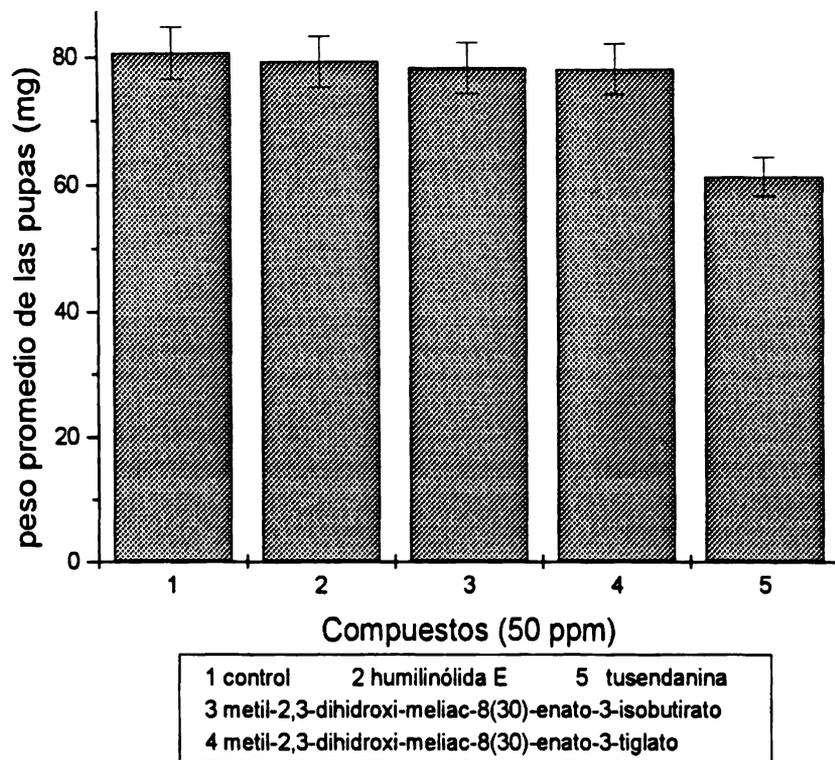


Figura 53. Efecto de la humilinólida E (**55**) del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (**25b**) sobre el peso promedio de las pupas de *O. nubilalis*.

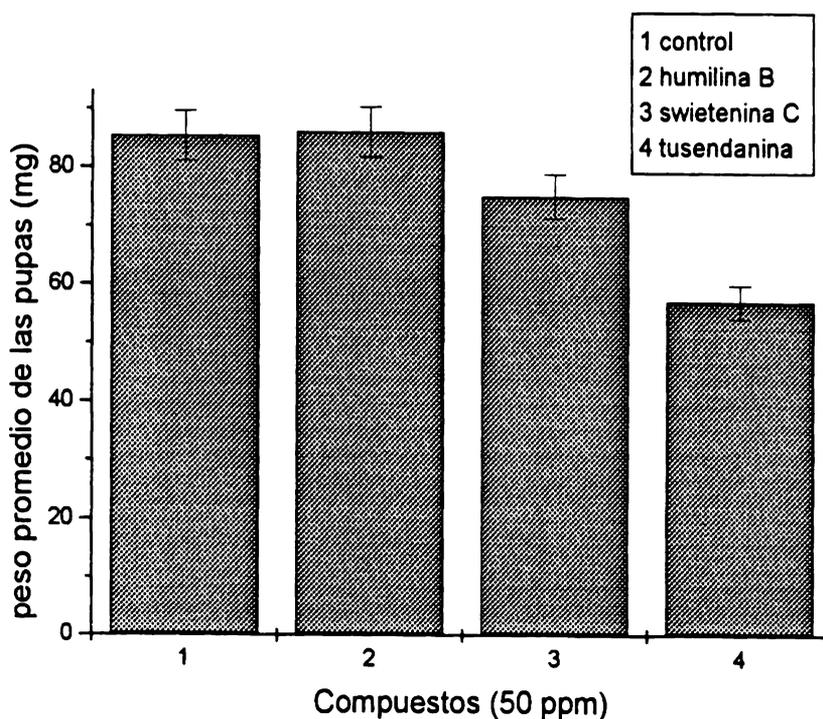


Figura 54. Efecto de la humilina B (**30**) y de la swietenina C (**44**) sobre el peso promedio de las pupas de *O. nubilalis*.

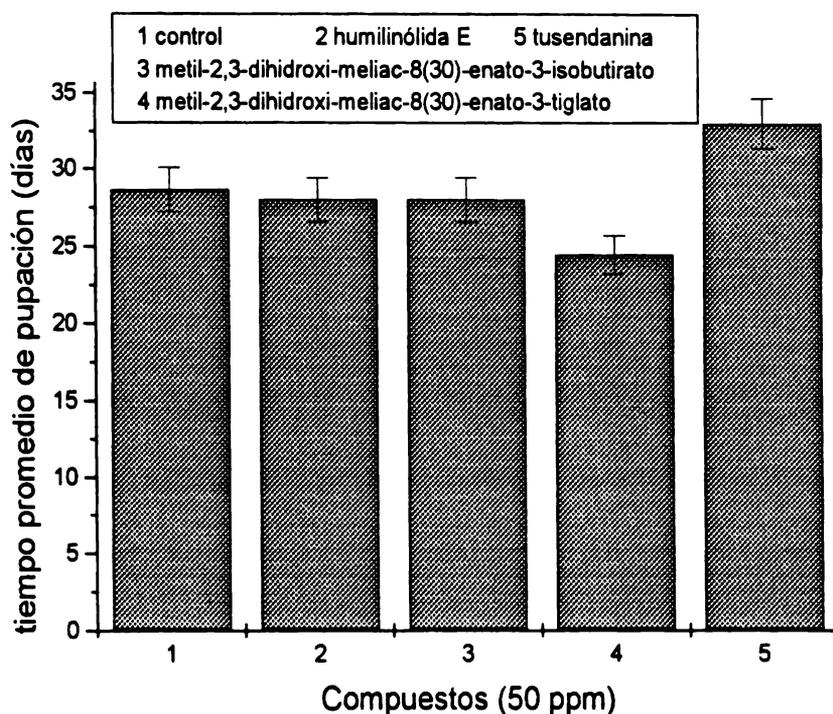


Figura 56. Efecto de la humilinólida E (**55**) del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (**25a**) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (**25b**) sobre el tiempo promedio de pupación.

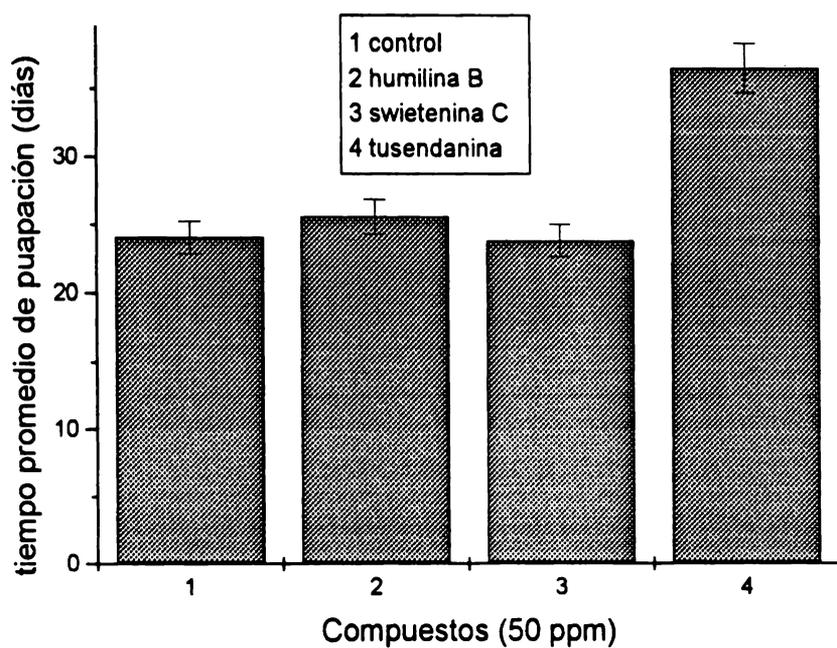


Figura 57. Efecto de la humilina B (**30**) y de la swietenina C (**44**) sobre el tiempo promedio de pupación.

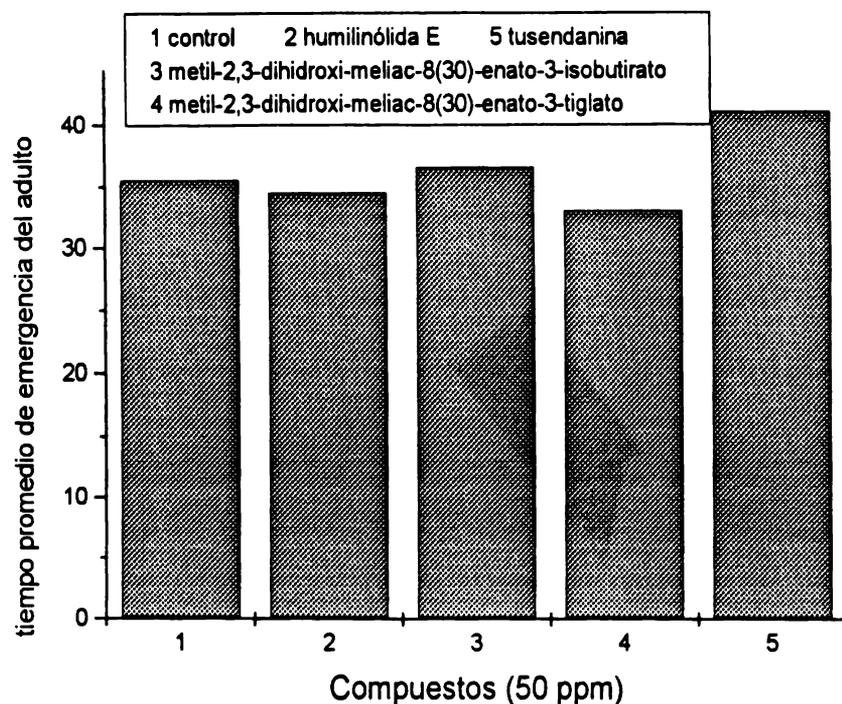


Figura 59. Efecto de la humilínolida E (55) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.

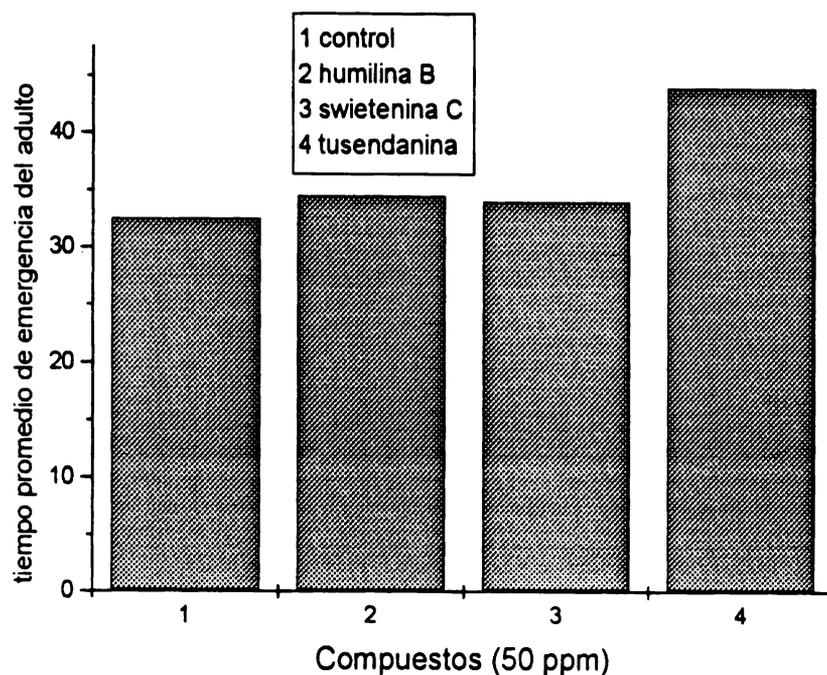


Figura 60. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el tiempo promedio de emergencia del adulto.

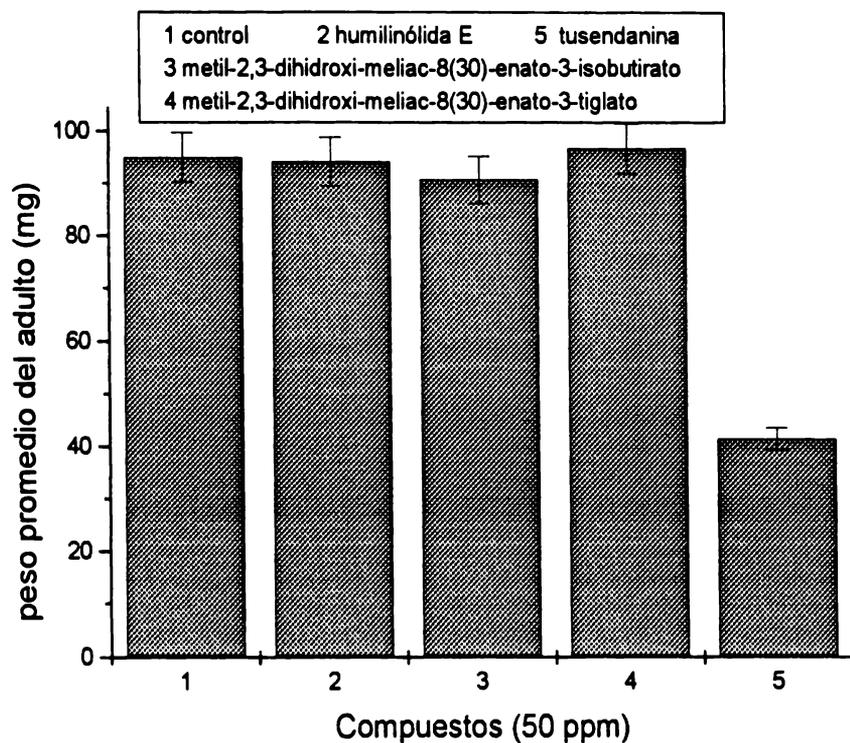


Figura 62. Efecto de la humilinólida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el peso promedio del adulto.

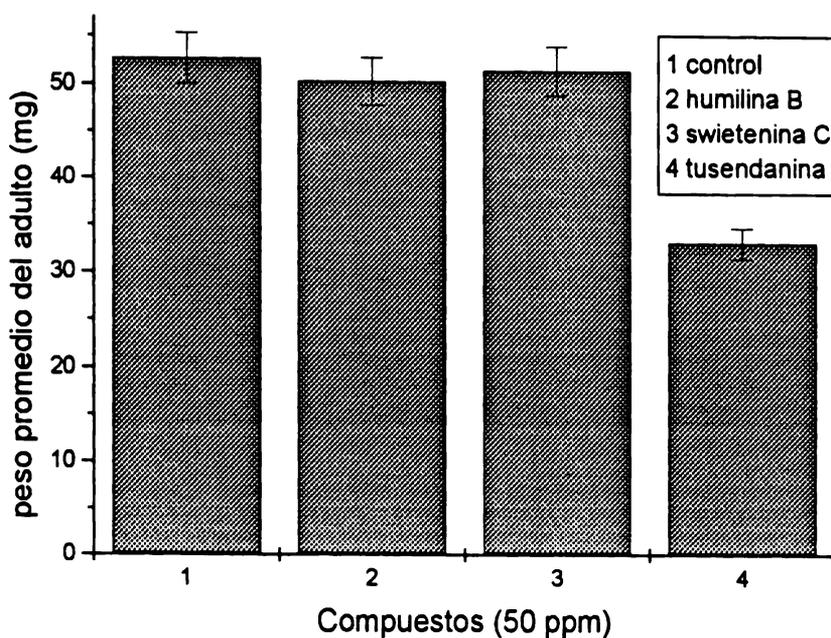


Figura 63. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el peso promedio del adulto.

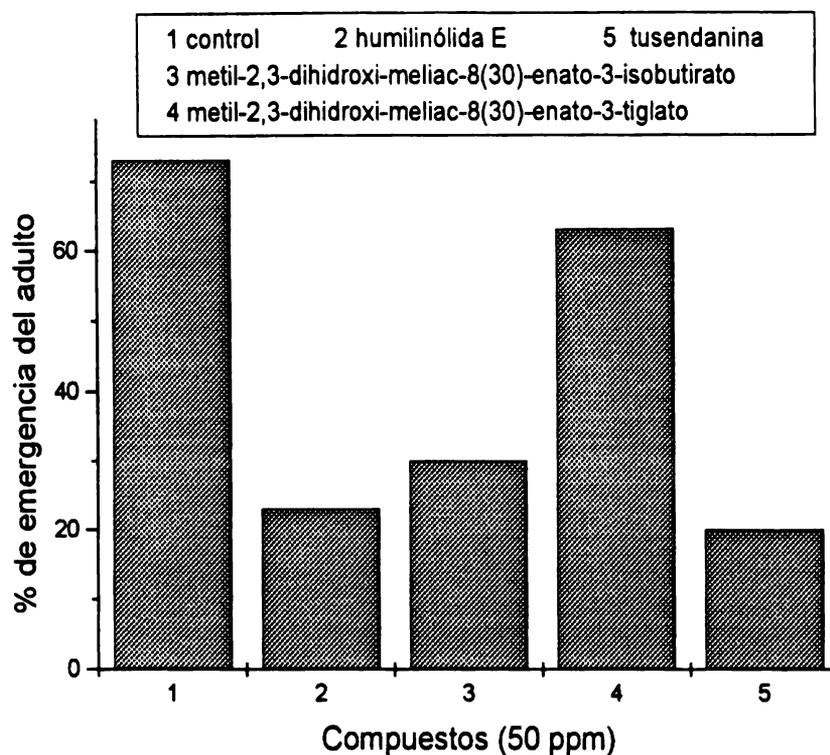


Figura 65. Efecto de la humilínolida E (55), del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-isobutirato (25a) y del metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-3-tiglato (25b) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.

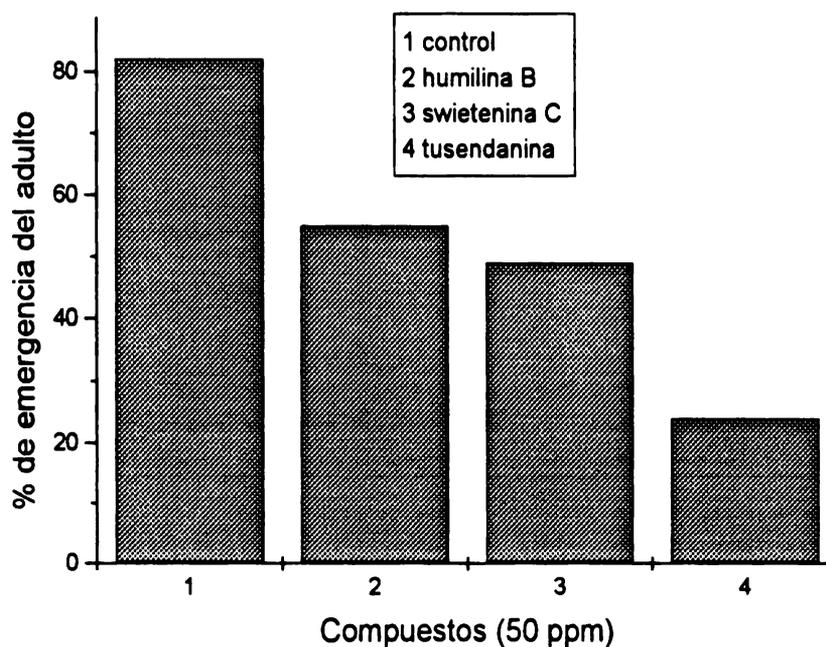


Figura 66. Efecto de la humilina B (30) y de la swietenina C (44) sobre el porcentaje de emergencia del adulto.

ANEXO III.

ARTICULOS GENERADOS DE LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.

1. Adelina Jiménez Arellanes, Rachel Mata, Blas Lotina-Hennsen, Ana Luisa Anaya Lang and Luis Velasco Ibarra. (1996). Phytogrowth-Inhibitory Compounds from *Malmea depressa*. *J. Natural Products*, **59**, 202-204.
2. A. Jiménez a., R. Mata, R. Pereda-Miranda, J. Calderon, m. B. Isman, R. Nicol and J. T. Arnason. (1997). Insecticidal Limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *Journal of Chemical Ecology*, **23**, 1225-1234.
3. Manuel Soriano-García, M. Adelina Jiménez, Rachel Mata and Rosabel Segura de Correa. (1996). Humilinolide D. *Acta Crystallographica Section C*, 1527-1529.
4. Mercedes perusquía, Ricardo hernández, M. Adelina Jiménez, Rogelio Pereda-Miranda and Rachel Mata. (1997). Contractile Response Induced by a limonoid (Humilinode A) on Spontaneous Activity of Isolated Smooth Muscle. *Phytoterapy Research*, **11**, 354-357.
5. Jiménez A., Mata, R., Lorina-Hennsen B. and Anaya A. L. (1997). Interference of 1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with Photosynthetic Electron Transport. *Z. Naturforsch* (in press).
6. A. Jiménez a., R. Mata and J. T. Arnason. (1997). Additional Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry*. Manuscrito en preparación.

Phytogrowth-Inhibitory Compounds from *Malmea depressa*¹

Adelina Jimenez Arellanes and Rachel Mata*

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, and Unidad Conjunta de Plantas Medicinales del Instituto de Química y Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

Blas Lotina-Henssen

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

Ana Luisa Anaya Lang

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-265, México D.F., 04511, Mexico

Luis Velasco Ibarra

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., Mexico

Received June 8, 1995*

Fractionation of the CHCl₃ extract of the stem bark of *Malmea depressa*, guided by phytogrowth-inhibitory bioassays, led to the isolation of four known phenylpropanoids: 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene (1), 2,3,4,5-tetramethoxycinnamaldehyde (3), *trans*-isomyristicin (4), and 2,3,4,5-tetramethoxycinnamyl alcohol (5), and a new C₆-C₁ derivative that was characterized by spectral means as 2,3,4,5-tetramethoxybenzaldehyde (2). Compound 1 exhibited significant phytogrowth-inhibitory activity on seedlings of *Amaranthus hypochondriacus* (IC₅₀ = 43 μg/mL) and *Echinochloa crusgalli* (IC₅₀ = 810 μg/mL) and moderate antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes* (MIC 500 μg/mL) and *Fusarium oxysporum* (MIC = 250 μg/mL).

Malmea depressa (Baill.) R. E. Fries (Annonaceae) [syn. *Guatteria leiophylla* (Donn. Sm.) Saff. ex. Standl.], commonly known by the Maya people as "elemuy", "sufricaya", "elemuy-box", and "nazareno prieto", is a tree (up to 10 m high) found in Central America and Mexico, from Veracruz to the Peninsula of Yucatan. In the tropical forest it is a dominant species. The tree is used by local people as an analgesic agent and for the treatment of diseases such as pellagra and liver and kidney stones.² No previous studies on the phytochemistry and biological properties of this species have been reported. In a general screening of several plant extracts for antifungal, cytotoxic, and plant-growth-inhibiting agents, the CHCl₃ extract and the essential oil of the stem bark of *M. depressa* demonstrated a significant inhibition of the radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*. In this investigation we describe the isolation and identification of the major phytotoxic constituents of *M. depressa*.

The initial phytogrowth-inhibitory activity of the CHCl₃ extract of the stem bark of *M. depressa* on seedlings of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli*³⁻⁵ gave IC₅₀ values of 134 and 457 μg/mL, respectively (Table 1). The essential oil of the stem bark also significantly inhibited the radicle growth of both species (Table 1). In addition, the CHCl₃ extract displayed moderate antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Trichophyton mentagrophytes*, with MIC values of 400 and 300 μg/mL, respectively, brine shrimp lethality [(BST), LC₅₀ = 62 μg/mL with a 95% confidence interval of 66-57 μg/mL] and equivocal cytotoxic activity against

Table 1. Phytogrowth Inhibitory Activity of the CHCl₃ Extract, the Essential Oil, and Isolates

sample	seedling growth IC ₅₀ , μg/mL (95% confidence intervals)	
	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. hypochondriacus</i>
CHCl ₃ extract	457 (500-414)	134 (164-114)
essential oil	475.2 (593-385)	116 (152-85)
1	810 (857-765)	43 (51-35)
2	> 1000	822 (864-777)
3 + 4 + 5	> 1000	345 (425-269)
tricolorin A ^a	12 (17-7)	37 (46-29)

^a Tricolorin A served as the positive control.

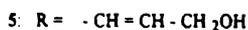
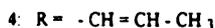
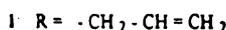
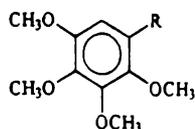
three human solid-tumor cell lines (lung carcinoma, A-549; breast carcinoma, MCF-7; and colon adenocarcinoma, HT-29; the ED₅₀ values being 30, 21, and 21 μg/mL, respectively).^{6,7}

The CHCl₃ extract was fractionated by column chromatography over Si gel to yield seven primary fractions (F-1 to F-7) with a direct bioautographic bioassay being used for activity-directed fractionation. Successive preparative TLC of the active fraction F-1 allowed the isolation of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene (1) as the major active compound.

Preparative TLC of active fraction F-2 led to the isolation of the novel compound 2 and the known compounds 2,3,4,5-tetramethoxycinnamaldehyde (3), *trans*-isomyristicin (4), and 2,3,4,5-tetramethoxycinnamyl alcohol (5). Compounds 1 and 3-5 were identi-

* Abstract published in *Advance ACS Abstracts*, February 1, 1996.

fied from their IR, NMR, and MS data, which were identical to those previously described.^{8,9}

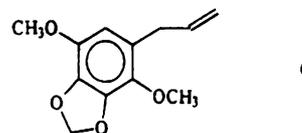


Compound 2 was obtained as a yellow oil. Its molecular formula, C₁₁H₁₄O₅, was deduced from elemental analysis and EIMS measurements. The IR spectrum showed absorption bands attributable to an aromatic aldehyde (2825, 1724 cm⁻¹) and an aromatic ether (1265 cm⁻¹). The NMR spectra supported the presence of the aldehyde functionality (δ_H 10.36; δ_C 188.80) and clearly indicated that the natural product contained a tetramethoxyphenyl moiety. The signals attributable to the aromatic methoxyl groups appeared at δ_H 3.95 (OMe-2), 3.87 (OMe-5), 3.99 (OMe-3), and 3.97 (OMe-4) in the ¹H-NMR spectrum and δ_C 61.25 (OMe-2), 56.10 (OMe-3 and 5), and 62.85 (OMe-4) in the ¹³C-NMR spectrum. The only aromatic proton resonance was observed at δ_H 7.10, which showed a cross peak with the methine signal at δ_C 103.80 in the HETCOR spectrum. The other aromatic carbons observed in the ¹³C NMR were quaternary and appeared at δ_C 124.00 (C-1), 149.37 (C-2), 149.83 (C-3), 146.63 (C-4), and 152.30 (C-5). The analysis of the ¹H-¹H NOESY correlations confirmed the substitution pattern of the aromatic ring. In fact, the NOESY spectrum of 2 showed that the aromatic proton (δ_H 7.10) had cross peaks both with the aldehyde hydrogen (δ_H 10.36) and with the methoxyl protons at δ_H 3.87. In addition, the aldehyde proton (δ_H 10.36) correlated not only with H-6 but also with the signal at δ 3.95; thus, it was assigned to the methoxyl group at C-2. These observations were in agreement with the disposition of the methoxyl groups at C-2, C-3, C-4, and C-5 of the aromatic ring.

The essential oil obtained by H₂O and steam distillation of the stem bark was also investigated by GC-MS analysis, which showed the presence of 1-4 and an unidentified compound. Identification was made by comparison of the GC mobilities, by study of mass fragmentation, and by coinjection with compounds 1-4 isolated during the course of this study from the CHCl₃ extract. It should be noted that tetraoxygenation of simple aromatic compounds is rare in nature,⁸ and their presence in *M. depressa* could be of chemotaxonomic relevance.

Compound 1 produced significant inhibition of radicle growth in *A. hypochondriacus* (IC₅₀ = 43 μ g/mL) but was less sensitive against *E. crusgalli* (IC₅₀ = 810 μ g/mL). These results were in agreement with those of Horada and Nakayama,¹⁰ who demonstrated that this compound reduced radicle growth of rice seedlings by 55% at a concentration of 100 μ g/mL. Also, the growth-regulatory activity of 1 was comparable to that previously demonstrated for several phenylpropanoids, including apiol (6), which also possess a tetraoxygenated aromatic ring.¹⁰⁻¹⁴ The new natural product 2,3,4,5-tetramethoxybenzaldehyde (2) and the mixture of phenylpropanoids 3 + 4 + 5 were markedly less active in the phyto-growth-inhibitory bioassays than 1. The

level of activity against *A. hypochondriacus* is significant, inasmuch as the concentration threshold required for most of the natural phyto-growth-inhibitors tested in similar experiments has often been in the 100-1000 μ g/mL range.^{15,16} Thus, 1 may be considered for development into an environmentally safe herbicide. Its mode of action is under investigation and will be communicated in due course.



The cytotoxic, brine-shrimp-lethality, and antifungal properties of the major phenylpropanoid 1 were also evaluated. It was inactive in the BST (LC₅₀ 144 μ g/mL) and did not exhibit cytotoxic activity against the A-549 (ED₅₀ = 29 μ g/mL), MCF-7 (ED₅₀ = 46 μ g/mL), and HT-29 (ED₅₀ = 71 μ g/mL) cell lines but showed moderate antifungal activity against *T. metagrophytes* and *F. oxysporum* with MIC values of 500 and 250 μ g/mL, respectively.

Experimental Section

General Experimental Procedures. IR spectra were obtained on a Perkin-Elmer 599 B spectrophotometer. ¹H-NMR (300 MHz) and ¹³C-NMR (75 MHz) spectra were registered on a Varian VXR-300S spectrometer in CDCl₃ with TMS as internal standard. GC-MS analyses were accomplished on a Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph interfaced with a JEOL JMS AX50HA mass spectrometer.

The GC column was a PAS-1701-tested 1701 silicone column (25 m \times 0.32 mm i.d.) programmed from 1-150 $^{\circ}$ C at the rate of 7 $^{\circ}$ C \times min; the carrier gas was He (7 psi, 1 mL/min). Analytical and preparative TLC were performed on Si gel 60 F₂₅₄ E. Merck plates, and the spots were visualized by spraying with a 10% solution of H₂SO₄, followed by heating at 110 $^{\circ}$ C. Column chromatography was carried out on Si gel 60 (70-230 mesh, E. Merck).

Plant Material. The plant material (stem bark) of *M. depressa* was collected in Municipio de Carrillo Puerto, Quintana Roo, Mexico, in March 1994. A voucher specimen (*Anaya 93-4*) has been deposited in the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Extraction and Bioassay-Directed Fractionation. The air-dried stem bark (200 g) was extracted with CHCl₃ at room temperature. After filtration, the solution was evaporated under reduced pressure to yield 5 g of residue, which was subjected to column chromatography over Si gel (100 g). Elution was accomplished with a mixture of solvents of increasing polarity (C₆H₆ gradually enriched with EtOAc); fractions of 100 mL each were collected and pooled based on TLC profiles to yield seven major fractions (F-1 to F-7). Bioautographic bioassay of the primary fractions showed that F-1 (*R_f* 0.75) and F-2 (*R_f* 0.45) were phytotoxic. Successive preparative TLC of the active fraction (F-1) (2.0 g) allowed the isolation of compound 1 (1.42 g) as a yellow oil. Preparative TLC of F-2 (380 mg), using the same solvent system, led to the isolation of compounds 2-5: 2 (23 mg), 3 (19 mg), 4 (20 mg), and 5 (17 mg).

Compounds 1 and 3–5 were identified by comparison of their IR, NMR, and MS data with those previously described.^{8,9}

2,3,4,5-Tetramethoxybenzaldehyde (2): pale yellow oil; IR ν_{\max} (CHCl₃) 2825, 2720, 1724, 1265 cm⁻¹; EIMS m/z (rel int) M⁺ 226 (100), 211 (54.4), 196 (6.4), 195 (5.3), 193 (14.4), 183 (12); ¹H-NMR δ 10.36 (s, CHO), 7.10 (s, H-6), 3.95 (OMe-2), 3.87 (OMe-5), 3.99 (OMe-3), 3.97 (OMe-4); ¹³C-NMR δ 188.80 (CHO), 61.25 (OMe-2), 56.10 (OMe-3 and 5), 62.85 (OMe-4), 124 (C-1), 149.37 (C-2), 149.83 (C-3), 146.63 (C-4), 152.30 (C-5), 103.80 (C-6).

Essential Oil. The essential oil was prepared by H₂O and steam distillation from 200 g of plant material, yielding 1.45 g.

Phytogrowth-Inhibitory Activity. The phytogrowth-inhibitory activity of the CHCl₃ extract, fractions, and pure compounds was evaluated on seedlings of *A. hypochondriacus* and *E. crusgalli* by using a Petri dish bioassay (PDPIB) according to the procedure previously described.^{3–5,15} The seeds of *E. crusgalli* and *A. hypochondriacus* were purchased from Valley Seed Service, Fresno, CA, and Mercado de Tulyehualco, D.F., México, respectively. The data were analyzed by ANOVA ($p < 0.05$), and IC₅₀ values were calculated by Probit analysis on the basis of the percentage of inhibition obtained. The organic extract and isolates were evaluated at 50, 100, 250, and 500 $\mu\text{g/mL}$. Tricolorin A was used as a positive control.¹⁵ In addition, a direct bioautographic phytogrowth-inhibitory bioassay (BPIB),^{17,18} in which the seeds of the target species grow directly on the TLC plates (Si gel G60 F254 plates 5 \times 20 cm, E. Merck) was employed for activity-guided fractionation. Samples (ca. 10 mg each) were applied as a band, and then the developed plates (benzene-EtOAc 9:1) were dried, coated with agar (20 mL), and left to solidify. The seeds (ca. 150/plate) of the target species were distributed over the coated TLC plates and incubated at 27 °C in the dark for 24 h for *A. hypochondriacus* and for 48 h for *E. crusgalli*. In each experiment, a plate with the agar served as the control.

Bioassays with Phytopathogen Fungi. Bioassay was carried out using a previously described procedure³ employing *Pythium* sp., *Helminthosporium* sp., and *F. oxysporum*. Test samples were evaluated at 50, 100, 200, 300, 400, and 500 $\mu\text{g/mL}$. Activity criteria: MIC values <500 $\mu\text{g/mL}$.³

Bioassays with Human Fungal Pathogens. *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus niger* (ATCC 16888), and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9129) were obtained from ATCC. Positive controls: amphotericin B (Sigma, 15 $\mu\text{g/mL}$) for *C. albicans* and *A. niger* and griseofulvin (Sigma, 8 $\mu\text{g/mL}$) for *T. mentagrophytes*. The test material was dissolved in MeOH and evaluated by the agar-dilution method as described.¹⁹ MIC values represent the lowest concentration of test sample at which complete inhibition of growth occurs. The MIC value for griseofulvin was 2.60 $\mu\text{g/mL}$ and for amphotericin B was 3 $\mu\text{g/mL}$.

Brine Shrimp Lethality and Cytotoxic Activity. The extracts, fractions, and isolates were evaluated for lethality to brine shrimp larvae, and *in vitro* cytotoxic activity was determined according to previously described protocols.^{6,7} The cell lines used were lung carcinoma (A-549), breast carcinoma (MCF-7), and colon adenocarcinoma (HT-29), with Adryamicin as the positive control (DE₅₀ = 3 \times 10⁻², 3 \times 10⁻¹, and 7 \times 10⁻³ $\mu\text{g/mL}$, respectively). Activity criteria: ED₅₀ values of <20 $\mu\text{g/mL}$ for extracts and <4 $\mu\text{g/mL}$ for pure compounds.

Acknowledgment. We thank M. en C. Isabel Chávez, Instituto de Química, UNAM, for recording the NMR spectra and Q.F.B. Graciela Chávez and Q. Marisela Gutiérrez, Facultad de Química, UNAM, for the registration of IR and UV spectra. This study was financed by the following projects: DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM) IN 202493 and IN 203394; PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) No. 005328, No. 005361, and FQ-5006, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Convenio PFPN/112/92). A Jiménez acknowledges fellowship support from CONACyT. We also thank Dr. Jerry McLaughlin, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, Indiana, who kindly arranged for the cytotoxicity assays.

References and Notes

- (1) Taken in part from the Ph.D. Dissertation of A. Jiménez.
- (2) Cabrera, C. E.; Sousa, S. M.; Téllez, V. O. *Imágenes de la Flora Quintanarroense*; Centro de Investigaciones de Quintana Roo, A. C., Quintana Roo, 1982; pp 127.
- (3) Castañeda, P.; García, M. R.; Hernández, B. E.; Torres, B. A.; Anaya, A. L.; Mata, R. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1025.
- (4) Anaya, A. L.; Calera, M. R.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16*, 2145.
- (5) Segura-Correa, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Hernández, B.; Villena, R.; Soriano, M.; Bye, R. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1567.
- (6) Anderson, J. E.; Goetza, C. M.; McLaughlin, J. L.; Suffnes, M. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 107.
- (7) Geran, R. I.; Greenberg, N. H.; McDonald, M. M.; Schumacher, A. M.; Abbot, B. *Cancer Chemother. Rep.* **1972**, *3*, 1.
- (8) Lopes, M. N.; Da Silva, M. S.; Barbosa, J. M.; Ferreira, Z. S.; Yoshida, M.; Gottlieb, O. R. *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 2609.
- (9) Enríquez, R. G.; Chávez, M. A.; Jauregui, F. *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 2024.
- (10) Horada, J.; Nakayama, M. *Weed Res., Jpn* **1989**, *34*, 65.
- (11) Greca, M. D.; Monaco, P.; Previtara, L.; Aliotta, G.; Pinto, G.; Polio, A. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2319.
- (12) Greca, M. D.; Monaco, P.; Polio, A.; Previtara, L. *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 4119.
- (13) Greca, M. D.; Monaco, P.; Pinto, G.; Polio, A.; Previtara, L. *Allelopathy J.* **1995**, *2*, 37.
- (14) Reynolds, T. *Ann. Bot.* **1978**, *42*, 419.
- (15) Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Wickramaratne, D. B. M.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 571.
- (16) Eihling, F. A.; Souza, Y. F. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1.
- (17) Inove, M.; Nishimura, H.; Li, H. H.; Mizutani, J. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1833.
- (18) Hai-Hang, L.; Nishimura, H.; Hasegawa, K.; Mizutani, J. *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1785.
- (19) Hufford, C. D.; Funderburk, M. J.; Morgan, J. M.; Robertson, L. W. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 789.

NP960058K

INSECTICIDAL LIMONOIDS FROM *Swietenia humilis*
AND *Cedrela salvadorensis*

A. JIMENEZ,¹ R. MATA,¹ R. PEREDA-MIRANDA,¹ J. CALDERON,¹
M. B. ISMAN,² R. NICOL,³ and J. T. ARNASON^{3,*}

¹*Departamento de Farmacia and Instituto de Quimica, Facultad de Quimica
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Coyoacan, 04510 D.F., Mexico*

²*Department of Plant Science, University of British Columbia
Vancouver, British Columbia V6T 1Z4, Canada*

³*Department of Biology University of Ottawa
Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada*

(Received June 25, 1996; accepted December 9, 1996)

Abstract—Four limonoids, humilinolides A–D from *Swietenia humilis* and cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*, were evaluated for their effect on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* in comparison with toosendanin, a commercial insecticide derived from *Melia azedarach*. When incorporated into artificial diets of neonates at 50 ppm, all compounds caused larval mortality as well as growth reduction and increased the development time of survivors in a concentration-dependent manner. Humilinolide C also reduced growth and survivorship at 5 ppm. Additional effects observed in many of the limonoid-treated groups included a significant delay in time to pupation and adult emergence. The compounds showed comparable activity to toosendanin, a commercial insecticide. Furthermore, the cytotoxicity of the humilinolides to three human cell lines was low.

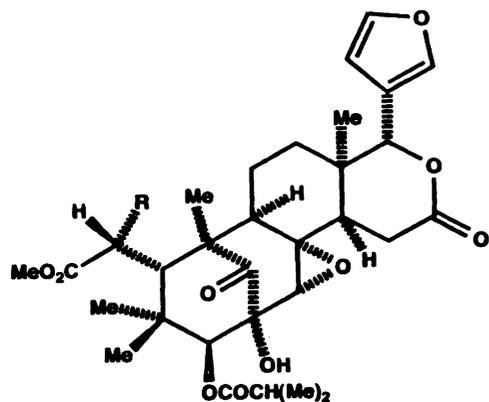
Key Words—Humilinolides, cedrelanolide, limonoids, insecticides, European corn borer, cytotoxicity.

INTRODUCTION

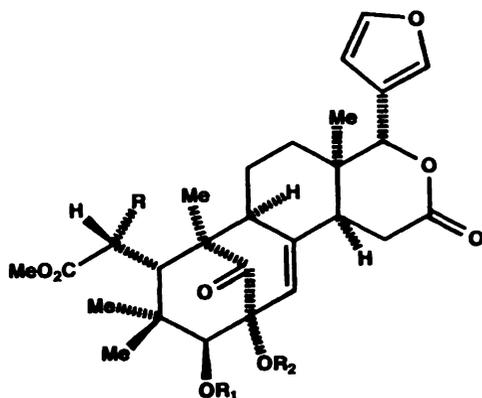
Many limonoids of the Meliaceae and Rutaceae families possess antifeedant, toxic, or growth-reducing properties to different species of insects (Arnason et al., 1993; Champagne et al., 1989, 1992; Isman et al., 1995; Mikolajczak and Reed, 1987). Two of these compounds, azadirachtin from seeds of the neem

*To whom correspondence should be addressed.

tree of India, *Azadirachta indica*, and toosendanin from the bark of *Melia toosendan* and *Melia azedarach* of China have been commercialized for use as practical pest control agents (Chiu, 1995). In both cases the parent natural product has generally better efficacy than derivatives. Limonoids are valued as well for their low mammalian toxicity, nonneurotoxic mode of action, and low persistence, which enhance their value as botanical pesticides.



humilinolide A: R=OH
humilinolide B: R=OAc

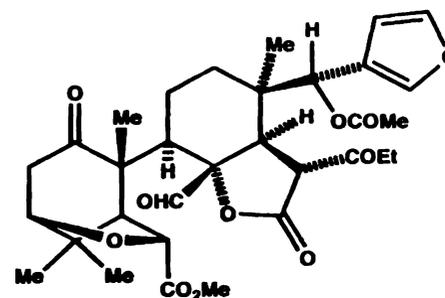


humilinolide C: R=H; R₁=COC(Me)=CHMe; R₂=Ac
humilinolide D: R=OAc; R₁=Ac; R₂=H

FIG. 1. Humilinolides A-D.

Although the Meliaceae are well represented in the neotropics and are known as natural sources of insecticides (Pennington, 1981), no insecticide has been commercialized from the neotropical Meliaceae. In an effort to find practical insecticides from the Americas, several groups have screened extracts of Meliaceae for effects against lepidopteran larvae. The significantly active extracts included species of the common American genera, *Swietenia* and *Cedrela*. For example, it was found that leaf extracts of *Swietenia humilis* Zucc. inhibited growth (50% effective concentration, EC₅₀ = 100 ppm) and deterred feeding (EC₅₀ = 23 ppm) by the variegated cutworm *Peridroma saucia*. Phytochemical investigation led to the isolation of seven limonoids, including humilinolides A-D (Figure 1) from seeds (Okorie and Taylor, 1970; Segura-Correa et al., 1993). *S. humilis* is commonly known in Mexico as "zopilote" and "cobano." It grows in the low to mid-elevation of subtropical regions of Mexico including the states of Guerrero, Michoacan, Colima, Sinaloa, and Chiapas and extends along the Pacific slope into Central America as far south as Guanacaste province, Costa Rica (Standley, 1920-1926). *Cedrela salvadorensis* is a tree growing at mid-elevation (500-1500 m) in the same geographical range. Recently the new limonoid cedrelanolide (Figure 2) was isolated and identified from the bark of this species (Segura-Correa et al., 1994).

In the present paper, humilinolides A-D and cedrelanolide were examined for their effects on the European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis* Hübner. *O. nubilalis* is a polyphagous pest of corn, and the economic losses due to this insect on sweet corn in Minnesota alone were estimated to exceed \$5,000,000 annually (Noetzel et al., 1985). It also causes damage to potatoes (Stewart, 1994), winter wheat (Buntin 1992), and bell peppers (Fran et al., 1992). Toosendanin was included both as a reference standard and because its effects on ECB had not been examined. Toosendanin at 20 ppm is known to deter feeding by the asiatic corn borer, *Ostrinia furnicalis* (Chiu, 1995). In order to assess



Cedrelanolide

FIG. 2. Cedrelanolide.

the potential for nontarget effects, the cytotoxicity of several of the limonoids to human cell lines was determined.

METHODS AND MATERIALS

Plant Extractions. *Swietenia humilis* was collected in the state of Guerrero, Mexico, and was identified by Dr. Robert Bye, Jardin Botanico, Instituto de Biologia, UNAM. The air-dried seeds (1 kg) were ground into powder, defatted with hexane, and then exhaustively extracted by maceration with CHCl_3 at room temperature. The resulting CHCl_3 extract was concentrated under reduced pressure to give a residue (125 g). The concentrated residue was chromatographed on silica gel, eluting with benzene-EtOAc-MeOH using a step gradient of increased polarity to yield three major fractions (FI-FIII). Fraction II, eluting with EtOAc was rechromatographed on silica gel using hexane-EtOAc (mixtures of increasing polarity) as eluents to yield humilinolides B (14.28 mg) and C (29.0 mg). Further column chromatography over silica gel of FIII (eluted with EtOAc-MeOH 7:3) using hexane-EtOAc (6:4) allowed the isolation of humilinolides A (171.4 mg) and D (21.4 mg). In all cases, final purification was achieved by preparative TLC on silica gel using benzene-EtOAc (1:1) as the eluent. IR, MP, and NMR data of the isolated humilinolides A-D (1-4) were identical to those of authentic samples (Segura-Correa et al., 1993). Toosendanin was a gift from Professor Chiu, and cedrelanolide was isolated from *Cedrela salvadorensis* as described previously (Segura-Correa et al., 1994).

Bioassays with ECB. Larvae used for the experiments were obtained from the culture at the University of Ottawa, which was maintained under previously described conditions (Arason et al., 1987). All test materials were dissolved in 95% ethanol and added to the artificial diet at one of two concentrations (5 or 50 ppm) or control (1 ml 95% ethanol). Neonate larvae were placed collectively for nine days in glass vials containing a cube of the appropriately treated diet. Thirty larvae were then transferred to separate vials with corresponding diet cubes. Larvae were weighed approximately every four days, at which time the old diet was replaced with fresh stock. Larval weight gains and mortality were recorded the last day before the first larva pupated (approximately after 20 days). Other life-cycle measurements were recorded, such as time to pupation and adulthood, weight of pupae and adults, mortality of larvae, and adult deformities. All treatments were effected in a controlled environment chamber with an 18L:6D photoperiod, a 25°C day and 19°C night temperature regime, and a relative humidity of approximately 80%.

Cytotoxicity Assays. Cytotoxicity against human solid tumor cells was measured at the Purdue Cell Culture Laboratory, Purdue Cancer Center, in a seven-day NTT assay for MCF-7 breast carcinoma, HT-29 colon adenocarci-

noma, and A-549 lung carcinoma with adryamicin as the positive control (Anderson et al., 1991).

Data Analysis. Data analyses for all the live insect bioassays were statistically analyzed using SAS ANOVA and GLM procedures. (SAS Institute, 1982).

RESULTS AND DISCUSSION

At the larval stage, all the compounds tested inhibited growth compared to controls when incorporated into diets at 50 ppm (Figures 3 and 4). At 20 days this growth reduction is clearly significant in the 50 ppm group (Table 1), but only humilinolide C, cedrelanolide, and toosendanin showed significant inhibition at 5 ppm (Table 1). When expressed as the percentage of respective controls, toosendanin was the best larval growth inhibitor with humilinolide C producing comparable inhibition (Figure 5). Toosendanin and cedrelanolide at both 5 and 50 ppm induced only moderate larval mortalities (<37%), but the humilinolides generally produced higher mortalities (>36% at both concentrations).

The percentage of larvae that reached pupation decreased in all tested compound groups in comparison to the control groups (Table 2). The most important

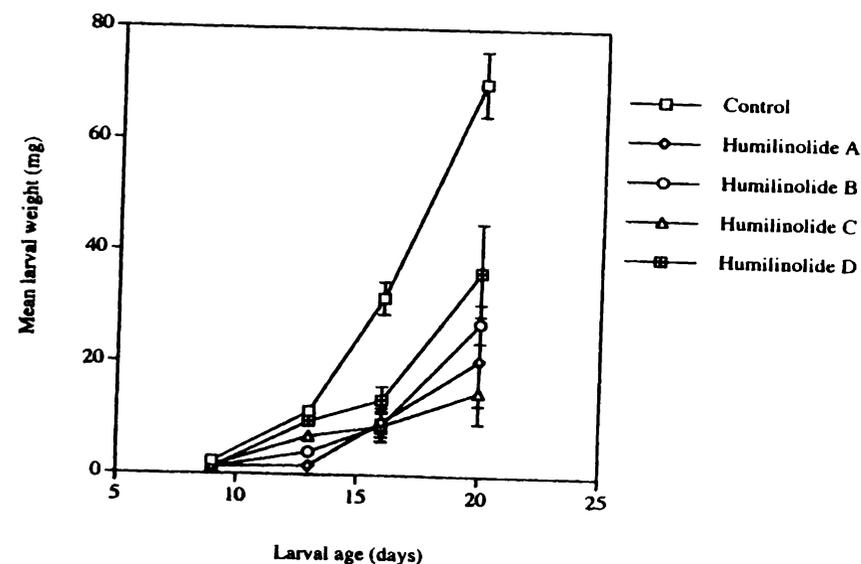


FIG. 3. Growth of ECB larvae fed control diets or diets treated with 50 ppm humilinolides A-D.

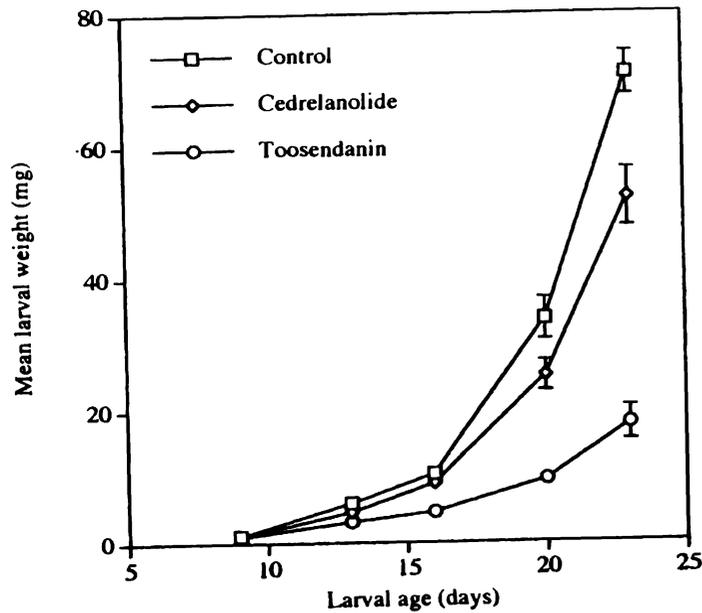


FIG. 4. Growth of ECB larvae fed control diets or diets treated with 50 ppm cedreanolide or toosendanin.

TABLE 1. ACTIVITY OF LIMONIDS ON LARVAL GROWTH PARAMETERS OF *O. nubilalis*

Treatment	Concentration (ppm)	Mean weight gained (mg)	Larval mortality (%)
Control	—	69.7 ± 3.2 a ^e	13.3
Cedreanolide	5	55.7 ± 4.9 b	23.3
	50	41.6 ± 5.9 b	13.3
Toosendanin	5	51.1 ± 4.1 b	26.7
	50	17.0 ± 2.5 c	36.7
Control	—	68.0 ± 5.7 a	3.3
Humilinolide A	5	55.5 ± 8.0 a, b	36.6
	50	19.6 ± 3.3 b	43.3
Humilinolide B	5	80.1 ± 7.9 a	36.6
	50	25.8 ± 3.4 b	50.0
Humilinolide C	5	36.1 ± 6.4 b	43.3
	50	17.1 ± 5.6 b	50.0
Humilinolide D	5	80.3 ± 6.1 a	40.0
	50	38.8 ± 8.9 b	63.3

^eMeans followed by the same letter within a column, are not significantly different in a Student-Newman-Keuls (SNK) test at $P < 0.05$ (treatments are compared to their respective controls only, e.g., toosendanin is not compared to humilinolide A). Means are ± standard error.

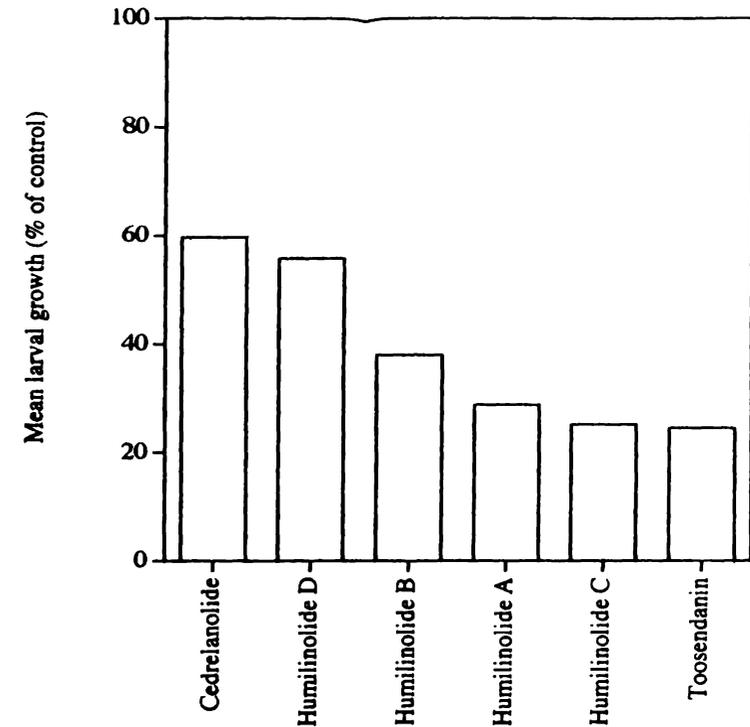


FIG. 5. Growth of ECB larvae reared on treated diets at 20 days, as a percent of respective control.

effect was observed with humilinolides D and C, which at 50 ppm resulted in only 10% and 13% pupation, respectively. Significant delays in time to pupation were observed in 5 ppm cedreanolide-treated males, 50 ppm treated females, 5 ppm toosendanin-treated males, and both males and females at 50 ppm. Development of males was delayed in 50 ppm treatments with humilinolide B. Of all the limonoids tested, only toosendanin significantly reduced pupal weights of males and females at 50 ppm. In several of the humilinolide C groups there were too few survivors for statistical analysis.

Survival to adult stage, as compared to the pupal stage, showed no further reductions with toosendanin or cedreanolide (Table 2). However, the humilinolides produced additional mortality and lower survivorship to the adult stage for most compounds and concentrations. Mean adult weights were significantly reduced (male and female) with 50 ppm toosendanin treatments. Significant delays in mean time to the adult stage were seen in many of the treatments.

The cytotoxic activity of humilinolides A–D was determined against three

TABLE 2. EFFECTS OF TWO CONCENTRATIONS OF LIMONIDS ON DEVELOPMENT OF EUROPEAN CORN BORER LARVAE TO PUPAL AND ADULT STAGES^a

Compound and concentration (ppm)	Mean time to pupation (days)		Mean pupal weight (mg)		Survival to pupation (%)		Mean time to adult stage (days)		Mean adult weight (mg)		Survival adult (%)
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	
Control	28.6 ± 0.2	28.7 ± 0.8	65.5 a ± 2.1	85.9 a ± 3.5	80.0	80.0	36.1 ± 0.3	36.7 ± 0.9	24.9 a ± 1.5	45.4 a ± 2.2	80.0
5 ppm C	29.8 ± 0.5 ^b	30.5 ± 0.9	62.2 a ± 2.6	83.0 a ± 1.7	63.3	63.3	38.4 ± 0.8 ^b	39.1 ± 1.4	21.9 a ± 0.5	42.1 a ± 2.4	63.3
50 ppm C	29.2 ± 0.4	33.4 ± 1.2 ^b	61.4 a ± 2.4	77.5 a ± 4.8	60.0	60.0	38.7 ± 0.8 ^b	41.5 ± 1.2 ^b	24.6 a ± 2.4	44.2 a ± 3.0	60.0
5 ppm T	29.8 ± 0.9	31.1 ± 1.0 ^b	63.5 a ± 2.1	81.2 a ± 1.0	63.3	63.3	39.0 ± 0.9 ^b	41.0 ± 1.6	23.0 a ± 1.4	43.0 a ± 1.9	63.3
50 ppm T	33.4 ± 1.3 ^b	35.9 ± 1.2 ^b	48.9 b ± 3.9	65.7 b ± 4.1	50.0	50.0	42.4 ± 1.8 ^b	45.8 ± 0.7 ^b	17.6 b ± 0.8	34.4 b ± 2.2	50.0
Control	26.6 ± 1.4	28.5 ± 1.6	67.0 a ± 1.4	91.3 b ± 2.1	80.0	80.0	34.9 ± 1.1	34.3 ± 1.4	32.9 a ± 1.4	57.0 a ± 2.2	80.0
5 ppm H-A	27.9 ± 1.0	29.0 ± 2.4	64.8 a ± 2.9	86.7 b ± 5.2	56.6	56.6	36.1 ± 1.0	38.0 ± 2.7	29.2 a ± 1.3	44.8 b ± 3.1	46.7
50 ppm H-A	31.0 ± 0.0	34.0 ± 1.0	60.1 a ± 0.0	76.8 b ± 5.6	40.0	40.0	35.0 ± 0.0	42.0 ± 1.0 ^b	28.4 a ± 0.0	36.1 b ± 1.7	13.3
5 ppm H-B	25.4 ± 0.5	25.5 ± 1.6	67.9 a ± 1.0	108.0 a ± 4.0	56.6	56.6	33.3 ± 0.6	35.3 ± 1.6	32.4 a ± 0.9	61.5 a ± 0.6	50.0
50 ppm H-B	32.4* ± 1.4	31.5 ± 1.2	74.9 a ± 4.6	87.6 b ± 6.4	46.6	46.6	40.8* ± 0.8	38.8 ± 1.3 ^b	36.7 a ± 1.9	55.1 a ± 4.6	36.7
5 ppm H-C	26.0 ± 0.0		57.3 a ± 0.0		16.6	16.6	33.0 ± 0.0		29.1 a ± 0.0		3.3
50 ppm H-C		37.0 ± 0.0		87.9 b ± 0.0	13.3	13.3		44.0 ± 0.0 ^b		40.2 a ± 0.0	3.3
5 ppm H-D	23.7 ± 0.6	27.0 ± 0.5	69.3 a ± 1.0	89.1 b ± 2.2	53.3	53.3	32.6 ± 0.5	34.0 ± 0.6	29.1 a ± 1.3	48.0 a ± 2.2	50.0
50 ppm H-D	27.0 ± 0.0	31.5 ± 2.5	76.9 a ± 0.0	87.9 b ± 7.5	10.0	10.0	37.0 ± 0.0	37.0 ± 0.0	33.3 a ± 0.0	51.5 a ± 4.9	10.0

*C = cedrelanolide, T = toosendanin, H-A = Humilinolide A, H-B = Humilinolide B, H-C = Humilinolide C, H-D = Humilinolide D. Means followed by same letter within a column are not significantly different in a Student-Newman-Keuls (SNK) test at $P < 0.05$ (treatments are compared by concentration, to respective controls only, e.g., toosendanin is not compared to humilinolide A). Means are ± standard error.

^aMeans within a column are significantly different from control in a Kruskal-Wallis chi-squared approximation test at $P < 0.005$.

TABLE 3. CYTOTOXIC ACTIVITY OF HUMILINOLIDES A-D TO THREE HUMAN CARCINOMA CELL LINES^a

	ED ₅₀ (μg/ml)		
	A-549	MCF-7	HT-29
Humilinolide A	64.4	79.5	59.6
Humilinolide B	> 100	> 100	81.1
Humilinolide C	37.7	94.1	> 100
Humilinolide D	60.6	65.0	53.6
Adriamycin	7.9×10^{-3}	3.2×10^{-3}	3.5×10^{-2}

^aA-549, lung carcinoma; MCF-7, breast carcinoma; and HT-20, colon adenocarcinoma.

human solid tumor cell lines, lung carcinoma (A-549), breast carcinoma (MCF-7), and colon adenocarcinoma (HT-29). The tested limonoids showed low but measurable cytotoxic effects at concentrations several orders of magnitude higher than adriamycin (Table 3). While more formal in vivo toxicological assessments are required, these in vitro results are promising in light of the need for a selective insecticide with low mammalian toxicity if further development were to be considered.

The effect of the humilinolides and cedrelanolide on reducing insect growth, increasing development time and mortality of ECB is similar to that of other limonoids (Armason et al., 1987; Champagne et al., 1992). The mode of action of these compounds is being investigated and may be due to a combination of antifeedant action and postdigestive toxicity, as found for other limonoids (Isman et al., 1995). The activity of these neotropical limonoids is comparable to the commercial insecticide toosendanin, which suggests potential for further development of these materials. However, no neotropical limonoid has been found with the outstanding activity of azadirachtin.

Acknowledgments—This work was partially supported by the following grants to R. Mata: Proyecto DGAPA IN206795 (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) and Proyecto PADEP No. 005361 (Coordinación General de Estudios Postgrado, UNAM). A Jiménez also acknowledges a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Support to J. Armason was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. We are grateful to Dr. J. L. McLaughlin, Purdue University, Lafayette, Indiana, who kindly arranged for the cytotoxicity assays and to N. Donskov, University of Ottawa, for technical work during the insect bioassays. R. Pereda-Miranda was the recipient of a Visiting Researcher Award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and a sabbatical fellowship awarded by DGAPA, UNAM (1994-1995).

REFERENCES

- ANDERSON, J. E., GOETZ, C. M., McLAUGHLIN, J. L., and SUFFNESS, M. 1991. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreen. *Phytochem. Anal.* 2:107-111.
- ARNASON, J. T., PHILOGÈNE, B. J. R., DONSKOV, N., and KUBO, I. 1987. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 43:221-226.
- ARNASON, J. T., MACKINNON, S., DURST, A., PHILOGÈNE, B. J. R., HASBUN, C., SÁNCHEZ, P., POVEDA, I., SAN ROMAN, L., ISMAN, M. B., SATASOOK, C., TOWERS, G. H. N., WIRIYACHITRA, P., and McLAUGHLIN, J. L. 1993. Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. *Recent Adv. Phytochem.* 27:107-131.
- BUNTIN, G. D. 1992. Damage by the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) to winter wheat. *J. Entomol. Sci.* 27:361-365.
- CHAMPAGNE, D. E., ISMAN, M. B., and TOWERS, G. H. N. 1989. Insecticidal activity of phytochemicals and extracts of the Meliaceae, pp. 95-109, in Arnason, J. T., B. J. R. Philogène, and P. Morand (eds.). Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium 387, American Chemical Society, Washington, D.C.
- CHAMPAGNE, D. E., KOUL, O., ISMAN, M. B., SCUDDER, G. G. E., and TOWERS, G. H. N. 1992. Biological activity of limonoids from the *Rutales*. *Phytochemistry* 31:377-394.
- CHIU, S.-F. 1995. Experiments on the practical application of chinaberry, *Melia azedarach*, and other naturally occurring insecticides in China, pp. 661-668, in H. Schmutterer and K. R. S. Ascher (eds.). Natural Pesticides from the Neem Tree and Other Tropical Plants: Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine and Other Purposes. GTZ, Eschborn, Germany.
- FRAN, J. R., SCHWARTZ, P. H., JR., and W. E. POTTS. 1992. Modeling the effects of weed interference periods and insects on bell peppers (*Capsicum annuum*). *Weed Sci.* 40:308-312.
- ISMAN, M. B., ARNASON, J. T., and TOWERS, G. H. N. 1995. Chemistry and biological activity of ingredients of other species of Meliaceae, pp. 652-666, in H. Schmutterer, K. R. S. Ascher, M. B. Isman, M. Jacobson, C. M. Ketkar, M. Kraus, H. Rembold, and R. C. Saxena (eds.). The Neem Tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other Meliaceae Plants: Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine and Other Purposes. GTZ, Eschborn, Germany.
- MIKOLICZAK, K. L., and REED, D. K. 1987. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda*, *Acalymma vittatum*, and *Artemia salina*. *J. Chem. Ecol.* 13:99-111.
- NOETZEL, D. M., CUTKOMP, L. K., and HAREIN, P. K. 1985. Estimated annual losses due to insects in Minnesota, 1981-1983. University of Minnesota Extension Service Publ. AG-B4-2541.
- OKORIE, D. A., and TAYLOR, D. H. A. 1970. Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 10:469.
- PENNINGTON, T. D. 1981. Meliaceae. Flora Neotropica. Monograph No. 28. New York Botanical Garden, Brooklyn pp. 389-395.
- SAS Institute. 1982. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- SEGURA-CORREA, R., MATA, R., ANAYA, A. L., HERNÁNDEZ, B., VILLENA, R., SORIANO-GARCÍA, R. J., BYE, R., and LINARES, E. 1993. New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J. Nat. Prod.* 56:1567-1575.
- SEGURA-CORREA, R., CALDERON, J., TOSCANA, R., GUTIERREZ, A., and MATA, R. 1994. Cedrelanolide, a new limonoid from *Cedrela salvadorensis*. *Tetrahedron Lett.* 35:3427-3440.
- STANDLEY, P. C. 1920-1926. Trees and Shrubs of México, United States National Herbarium, pp. 560.
- STEWART, J. G. 1994. Monitoring adult European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in potatoes on Prince Edward Island. *Environ. Entomol.* 23:1124-1128.

SCENT MARKING, SCENT ORIGIN, AND SPECIES SPECIFICITY IN MALE PREMATING BEHAVIOR OF TWO SCANDINAVIAN BUMBLEBEES

PETER BERGMAN* and GUNNAR BERGSTRÖM

Department of Chemical Ecology
Botanical Institute, Göteborg University
Carl Skottsbergs Gata 22, S-413 19
Göteborg, Sweden

(Received May 21, 1996; accepted December 16, 1996)

Abstract—The marking behavior and the scent-marking compounds in males of two Scandinavian bumblebee species *Bombus pratorum* and *Bombus lapidarius* were studied. There are characteristic differences in the behavior and in the chemistry of the two species. Males of *B. pratorum* scent marked small areas of the edges of birch leaves in a quick and unpredictable manner, depositing farnesol, geranylgeranyl acetate, farnesyl acetate, (Z)-11-octadecanol, hexadecanol, and a pentacosadiene. In *B. lapidarius*, scent marking on birch leaves was much slower and the entire edge of the leaf was marked with (Z)-9-hexadecenol and hexadecanol. These compounds were also detected in the cephalic portion of the labial gland in males. Thus, males of *B. lapidarius* produce a blend of fatty acid derivatives while *B. pratorum* males, in addition to fatty acid derivatives, also produce sesqui- and diterpenes. The total amount of scent compounds per milligram of labial glands was 0.2 µg in *B. pratorum* and 40 µg in *B. lapidarius*. Farnesol and farnesyl acetate were detected via headspace collection in the air around leaves marked by *B. pratorum* and (Z)-9-hexadecenol was detected around leaves marked by *B. lapidarius*.

Key Words—Labial gland, male mating behavior, marking pheromone, *Bombus pratorum*, *Bombus lapidarius*, Hymenoptera, Apidae, GC-MS, isoprenoids, fatty acid derivatives.

INTRODUCTION

The majority of bumblebee species worldwide (about 300) have annual colonies that originate from a single mated and hibernated queen (Prýs-Jones and Corbet,

*To whom correspondence should be addressed.

C(25)	0.7202 (3)	0.3752 (1)	0.4327 (5)	0.065 (1)
C(26)	0.6164 (4)	0.3587 (1)	0.3629 (6)	0.091 (2)
C(27)	0.7772 (4)	0.4109 (1)	0.3530 (7)	0.081 (2)
C(28)	0.7314 (4)	0.3321 (1)	0.8404 (6)	0.087 (2)
C(29)	0.6898 (5)	0.2943 (2)	0.9352 (6)	0.132 (2)
C(30)	0.6637 (5)	0.3716 (2)	0.8754 (6)	0.125 (2)
C(31)	0.7805 (5)	0.4570 (2)	0.1330 (8)	0.154 (3)

† Partial occupancy (see below).

Table 2. Geometry of hydrogen bonds and C—H...O interactions (Å, °)

D—H...A	D—H	H...A	D...A	D—H...A
C(6)—H(4)...O(3 [†])	0.98	2.46	3.25 (3)	138
C(11)—H(11)...O(1)	0.98	2.51	3.722 (5)	120
N(3)—H(20)...N(2)	0.76 (4)	2.28 (4)	2.644 (5)	110 (4)
C(16)—H(21)...O(1)	0.98	2.48	2.805 (5)	99
C(20)—H(26)...O(2)	0.98	2.42	3.025 (5)	120
C(23)—H(34)...O(2)	0.98	2.22	2.706 (4)	109
C(24)—H(35)...O(3)	0.98	2.45	2.82 (1)	102
C(24)—H(35)...O(3 [*])	0.98	2.45	2.77 (3)	98
C(26)—H(37)...O(4)	0.98	2.22	2.713 (5)	109
C(30)—H(43)...O(4 [†])	0.98	2.52	3.427 (6)	154

Symmetry codes: (i) $x - \frac{1}{2}, \frac{1}{2} - y, 2 - z$; (ii) $x, y, 1 + z$.

Table 3. Summary of bond lengths (Å)

Bond type	Range	Mean
C—C _{aromatic}	1.364 (6)–1.405 (5)	1.383 (7)
C—C	1.318 (5)–1.355 (5)	1.337 (7)
C—C _{aliphatic}	1.516(7)–1.568 (5)	1.534 (6)
C _{sp²} —C _{sp²}	1.450 (6)–1.481 (6)	1.466 (8)
C _{sp³} —C _{sp²}	1.489 (5)–1.532 (5)	1.513 (6)
N—C _{sp²}	1.367 (5)–1.369 (5)	1.368 (7)
N—C _{sp³}	1.449 (5)–1.474 (4)	1.461 (5)
O—C	1.22 (1)–1.232 (5)	1.23 (1)
O—C _{carbonyl}	1.307 (5)	
O—C _{car}	1.452 (6)	

The structure was solved by direct methods using *SIR92* (Altomare *et al.*, 1994) and expanded using Fourier techniques (Beurskens *et al.*, 1994). All calculations were performed using *TEXSAN* (Molecular Structure Corporation, 1992) and *MSC/AFC Diffractometer Control Software* (Molecular Structure Corporation, 1988) was used for data collection and cell refinement. The amine H atoms were refined with isotropic displacement parameters. The remaining H atoms were fixed in calculated positions (methyl groups staggered, with C—H 0.98 Å and displacement parameters 20% larger than those of the parent atoms). The partial disorder of the crystal structure involves the carbonyl O(3) atom of the ester fragment. The occupancies of the two positions were adjusted as the refinement progressed to yield approximately equal displacement parameters, the final values being 0.71 and 0.29 for O(3) and O(3^{*}), respectively. The absolute configuration was based on the known chiralities of two centers. A parallel refinement of the opposite enantiomer gave slightly higher residuals ($R = 0.0392$ and $wR = 0.0376$).

Financial support was provided by a grant to RJA from the National Cancer Institute of Canada.

Lists of structure factors, anisotropic displacement parameters, H-atom coordinates and complete geometry, including torsion angles and contact distances, have been deposited with the IUCr (Reference: FG1120). Copies may be obtained through The Managing Editor, International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, England.

References

- Altomare, A., Cascarano, G., Giacovazzo, C., Guagliardi, A., Burla, M. C., Polidori, G. & Camalli, M. (1994). *J. Appl. Cryst.* **27**, 435.
- Beurskens, P. T., Admiraal, G., Beurskens, G., Bosman, W. P., de Gelder, R., Israël, R. & Smits, J. M. M. (1994). *The DIRDIF Program System*. Technical Report. Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands.
- Coleman, J. E., de Silva, E. D., Kong, F., Andersen, R. J. & Allen, T. M. (1995). *Tetrahedron*, **39**, 10653–10662.
- Crews, P., Farias, J. J., Emrich, R. & Keifer, P. A. (1994). *J. Org. Chem.* **59**, 2932–2934.
- Fusetani, N. & Matsunaga, S. (1993). *Chem. Rev.* **93**, 1793–1806.
- Molecular Structure Corporation (1988). *MSC/AFC Diffractometer Control Software*. MSC, 3200 Research Forest Drive, The Woodlands, TX 77381, USA.
- Molecular Structure Corporation (1992). *TEXSAN. Single Crystal Structure Analysis Software*. MSC, 3200 Research Forest Drive, The Woodlands, TX 77381, USA.
- North, A. C. T., Phillips, D. C. & Mathews, F. S. (1968). *Acta Cryst.* **A24**, 351–359.
- Roberge, M., Anderson, H., Coleman, J. E. & Andersen, R. J. (1995). Unpublished results.
- Talpir, R., Benayahu, Y., Kashman, Y., Pannell, L. & Schleyer, M. (1994). *Tetrahedron Lett.* **35**, 4453–4456.
- Zachariassen, W. H. (1967). *Acta Cryst.* **23**, 558–564.

Acta Cryst. (1996). **C52**, 1527–1529

Humilinolide D

MANUEL SORIANO-GARCIA,^a MARIA ADELINA JIMENEZ,^b RACHEL MATA^b AND ROSABEL SEGURA DE CORREA^c

^aInstituto de Química, † Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, ^bLaboratorio de Fitoquímica, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, † Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-265, México DF 04511, México, and ^cDepartamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, Colombia

(Received 13 September 1994; accepted 24 July 1995)

Abstract

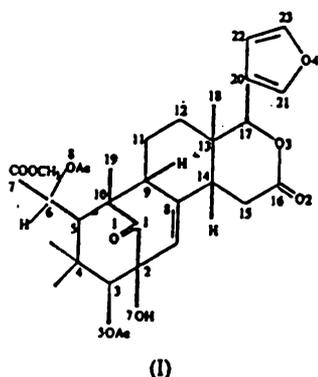
The title molecule, methyl $\alpha,10$ -bis(acetoxy)-4-(3-furanyl)-1,4,4a,5,6,6a,7,8,9,10,11,12b-dodecahydro-11-hydroxy-4a,7,9,9-tetramethyl-2,13-dioxo-7,11-methano-2*H*-cyclo-octa[*f*][2]benzopyran-8-acetate, C₃₁H₃₈O₁₁, consists of four six-membered rings (A, B, C and D) and a five-membered furan ring (E). The A ring is fused at C(2)—C(1)—C(10) to the B ring. The B/C and C/D rings are *trans*- and *cis*-fused, respectively. Rings A, B, C and D adopt conformations intermediate between twist ²T₄ and boat B_{4,1}, intermediate between half-chair ¹H₆ and envelope ¹E, distorted chair ¹C₄ and half-chair

† Contribution No. 1421 of the Instituto de Química and Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

⁶H₁, respectively. The crystal structure is stabilized by an intermolecular O—H...O hydrogen bond, three C—H...O intermolecular hydrogen bonds and van der Waals interactions.

Comment

Humilinolide D, (I), is a tetranortriterpenoid which was isolated from the seeds of *Swietenia humilis* (Meliaceae). Details of the source and chemical background of humilinolide D are given by Segura-Correa, Mata, Anaya, Hernández-Bautista, Villena, Soriano-García, Bye & Linares (1993).



The absolute configuration of the title compound is inferred from the known stereochemistry of humilinolide A (Segura-Correa *et al.*, 1993) deduced from chemical and X-ray studies. The Cremer & Pople (1975) ring-puckering parameters for the A, B, C and D rings are, respectively, $q_2 = 0.792(7)$, $q_3 = 0.015(6)$, $Q = 0.792(7) \text{ \AA}$, $\theta = 88.9(5)$, $\varphi = -162.0(5)^\circ$; $q_2 = 0.474(7)$, $q_3 = 0.343(7)$, $Q = 0.585(7) \text{ \AA}$, $\theta = 54.1(7)$, $\varphi = -23.3(9)^\circ$; $q_2 =$

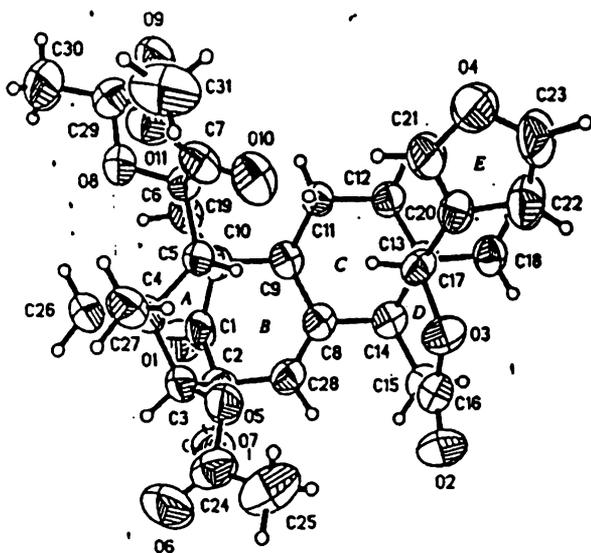


Fig. 1. The molecular structure of the title compound showing the atom labelling. Ellipsoids are plotted at the 50% probability level.

$0.030(7)$, $q_3 = 0.518(7)$, $Q = 0.518(7) \text{ \AA}$, $\theta = 3.3(8)$, $\varphi = -154.5(12)^\circ$; $q_2 = 0.283(7)$, $q_3 = -0.427(6)$, $Q = 0.512(7) \text{ \AA}$, $\theta = 146.4(8)$, $\varphi = 155.3(1)^\circ$. The crystal structure is stabilized by an intermolecular hydrogen bond between the O(7)—H hydroxy group and the O(9) carbonyl group [H(7A)...O(9ⁱ) 2.2(7), O(7)...O(9ⁱ) 2.815(7) \AA and O(7)—H...O(9ⁱ) 146(7)°; symmetry code: (i) $x - \frac{1}{2}, \frac{1}{2} - y, -z$]. There are three C—H...O interactions shorter than 3.5 \AA: C(23)...O(2ⁱⁱ) 3.292(11); C(25)...O(7ⁱⁱⁱ) 3.367(11) and C(31)...O(6ⁱⁱⁱ) 3.310(12) \AA [symmetry codes: (ii) $\frac{1}{2} + x, \frac{3}{2} - y, -z$; (iii) $-\frac{1}{2} - x, 1 - y, -\frac{1}{2} + z$].

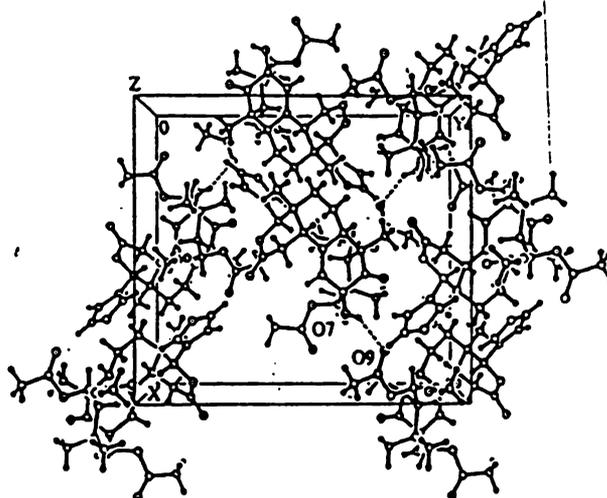


Fig. 2. A perspective drawing of the packing arrangement of the title compound. The dashed lines indicate the intermolecular hydrogen bonding.

Experimental

Crystal data

C₃₁H₃₈O₁₁
M_r = 586.63
 Orthorhombic
*P*2₁2₁2₁
a = 14.510(1) \AA
b = 17.248(1) \AA
c = 11.908(2) \AA
V = 2980(1) \AA³
Z = 4
D_x = 1.307 Mg m⁻³

Cu K α radiation
 $\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$
 Cell parameters from 25 reflections
 $\theta = 32.7\text{--}40.0^\circ$
 $\mu = 0.83 \text{ mm}^{-1}$
T = 296 K
 Prism
 0.40 × 0.33 × 0.22 mm
 Colourless

Data collection

Rigaku AFC-5R diffractometer
 ω scans
 Absorption correction:
 ψ scan (North, Phillips & Mathews, 1968)
 $T_{\text{min}} = 0.94$, $T_{\text{max}} = 1.00$
 2551 measured reflections
 2526 independent reflections

1854 observed reflections
 $[F > 4\sigma(F)]$
 $\theta_{\text{max}} = 60.25^\circ$
 $h = 0 \rightarrow 16$
 $k = 0 \rightarrow 19$
 $l = 0 \rightarrow 13$
 3 standard reflections monitored every 150 reflections
 intensity decay: 5%

Refinement

Refinement on F $R = 0.0562$ $wR = 0.0651$ $S = 1.32$

1854 reflections

382 parameters

H atoms refined isotropically

 $w = 1/\sigma^2(F)$ $(\Delta/\sigma)_{\max} = 0.032$ $\Delta\rho_{\max} = 0.15 \text{ e } \text{Å}^{-3}$ $\Delta\rho_{\min} = -0.21 \text{ e } \text{Å}^{-3}$

Extinction correction: none

Atomic scattering factors

from *SHELXTL-Plus*
(Sheldrick, 1991)Table 1. Fractional atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (Å^2)

	x	y	z	U_{eq}
O(1)	-0.1010 (4)	0.2521 (3)	0.1708 (5)	0.080 (2)
O(2)	-0.0912 (4)	0.6691 (3)	0.1978 (5)	0.081 (2)
O(3)	0.0317 (3)	0.6407 (3)	0.0996 (4)	0.061 (2)
O(4)	0.2552 (4)	0.6514 (3)	-0.1569 (5)	0.091 (2)
O(5)	-0.1966 (3)	0.4745 (3)	-0.0180 (5)	0.066 (2)
O(6)	-0.3502 (4)	0.4727 (4)	-0.0142 (8)	0.127 (4)
O(7)	-0.2200 (4)	0.3722 (3)	0.1980 (6)	0.084 (2)
O(8)	0.0067 (3)	0.2691 (3)	-0.2224 (4)	0.067 (2)
O(9)	0.1575 (3)	0.2486 (3)	-0.2525 (5)	0.081 (2)
O(10)	0.0473 (4)	0.4730 (3)	-0.2342 (5)	0.080 (2)
O(11)	0.0301 (4)	0.3792 (3)	-0.3649 (5)	0.079 (2)
C(1)	-0.0871 (5)	0.3082 (4)	0.1128 (7)	0.059 (3)
C(2)	-0.1488 (5)	0.3781 (4)	0.1158 (7)	0.061 (3)
C(3)	-0.1925 (5)	0.3919 (4)	-0.0003 (7)	0.062 (3)
C(4)	-0.1425 (5)	0.3509 (4)	-0.0981 (7)	0.058 (3)
C(5)	-0.0359 (5)	0.3605 (4)	-0.0735 (6)	0.051 (2)
C(6)	0.0285 (5)	0.3419 (4)	-0.1733 (5)	0.051 (2)
C(7)	0.0345 (5)	0.4064 (5)	-0.2618 (8)	0.063 (3)
C(8)	0.0021 (5)	0.4425 (3)	0.1603 (6)	0.047 (2)
C(9)	0.0578 (5)	0.3770 (4)	0.1086 (6)	0.052 (2)
C(10)	-0.0034 (5)	0.3201 (3)	0.0378 (6)	0.050 (2)
C(11)	0.1404 (4)	0.4083 (3)	0.0432 (6)	0.051 (2)
C(12)	0.1960 (4)	0.4667 (3)	0.1108 (6)	0.053 (2)
C(13)	0.1403 (5)	0.5340 (4)	0.1578 (6)	0.051 (2)
C(14)	0.0587 (5)	0.5020 (4)	0.2247 (6)	0.051 (2)
C(15)	0.0028 (5)	0.5682 (4)	0.2738 (6)	0.056 (2)
C(16)	-0.0252 (6)	0.6285 (4)	0.1894 (6)	0.059 (3)
C(17)	0.0980 (5)	0.5818 (4)	0.0617 (6)	0.052 (2)
C(18)	0.2025 (5)	0.5832 (4)	0.2328 (6)	0.061 (3)
C(19)	0.0459 (5)	0.2422 (4)	0.0221 (6)	0.062 (3)
C(20)	0.1660 (5)	0.6248 (4)	-0.0100 (6)	0.057 (3)
C(21)	0.1909 (6)	0.6032 (4)	-0.1138 (7)	0.070 (3)
C(22)	0.2166 (6)	0.6918 (4)	0.0127 (8)	0.084 (4)
C(23)	0.2699 (7)	0.7047 (5)	-0.0779 (8)	0.091 (4)
C(24)	-0.2803 (6)	0.5083 (5)	-0.0190 (8)	0.078 (4)
C(25)	-0.2720 (7)	0.5938 (5)	-0.0237 (7)	0.102 (4)
C(26)	-0.1747 (5)	0.2670 (4)	-0.1020 (8)	0.079 (3)
C(27)	-0.1692 (5)	0.3891 (5)	-0.2091 (7)	0.079 (3)
C(28)	-0.0892 (5)	0.4437 (4)	0.1578 (6)	0.056 (3)
C(29)	0.0808 (6)	0.2265 (5)	-0.2589 (7)	0.070 (3)
C(30)	0.0515 (7)	0.1520 (5)	-0.3074 (9)	0.127 (5)
C(31)	0.0441 (7)	0.4354 (6)	-0.4531 (7)	0.116 (5)

Table 2. Selected geometric parameters (Å , $^\circ$)

O(1)—C(1)	1.207 (9)	O(2)—C(16)	1.191 (10)
O(3)—C(16)	1.367 (9)	O(3)—C(17)	1.470 (8)
O(4)—C(21)	1.351 (10)	O(4)—C(23)	1.333 (11)
O(5)—C(3)	1.442 (8)	O(5)—C(24)	1.347 (10)
O(6)—C(24)	1.187 (11)	O(7)—C(2)	1.427 (10)
O(8)—C(16)	1.420 (8)	O(8)—C(29)	1.372 (10)
O(9)—C(29)	1.178 (10)	O(10)—C(7)	1.210 (10)
O(11)—C(7)	1.316 (11)	O(11)—C(31)	1.443 (11)
C(1)—C(2)	1.502 (10)	C(1)—C(10)	1.521 (10)
C(2)—C(3)	1.540 (12)	C(2)—C(28)	1.509 (10)
C(3)—C(4)	1.543 (11)	C(4)—C(5)	1.583 (9)
C(4)—C(26)	1.522 (10)	C(4)—C(27)	1.527 (11)
C(5)—C(6)	1.545 (9)	C(5)—C(10)	1.571 (9)
C(6)—C(7)	1.536 (11)	C(8)—C(9)	1.519 (9)

C(8)—C(14)	1.521 (9)	C(8)—C(28)	1.326 (10)
C(9)—C(10)	1.569 (9)	C(9)—C(11)	1.528 (9)
C(10)—C(19)	1.533 (9)	C(11)—C(12)	1.523 (9)
C(12)—C(13)	1.520 (9)	C(13)—C(14)	1.532 (9)
C(13)—C(17)	1.538 (9)	C(13)—C(18)	1.527 (10)
C(14)—C(15)	1.517 (9)	C(15)—C(16)	1.503 (10)
C(17)—C(20)	1.502 (10)	C(20)—C(21)	1.341 (11)
C(20)—C(22)	1.396 (11)	C(22)—C(23)	1.346 (13)
C(24)—C(25)	1.481 (12)	C(29)—C(30)	1.472 (12)
C(16)—O(3)—C(17)	122.0 (5)	C(14)—C(13)—C(17)	105.7 (5)
C(3)—O(5)—C(24)	117.7 (6)	C(14)—C(13)—C(18)	110.7 (6)
C(7)—O(11)—C(31)	115.6 (7)	C(8)—C(14)—C(13)	113.5 (5)
O(1)—C(1)—C(10)	125.2 (6)	C(13)—C(14)—C(15)	110.0 (5)
O(7)—C(2)—C(1)	113.0 (6)	O(2)—C(16)—O(3)	117.4 (7)
C(1)—C(2)—C(3)	110.3 (6)	O(3)—C(16)—C(15)	117.8 (6)
C(1)—C(2)—C(28)	105.5 (6)	O(3)—C(17)—C(20)	105.2 (5)
O(5)—C(3)—C(2)	107.5 (6)	C(17)—C(20)—C(21)	124.3 (6)
C(2)—C(3)—C(4)	114.4 (6)	C(21)—C(20)—C(22)	105.5 (7)
C(3)—C(4)—C(26)	108.3 (6)	C(20)—C(22)—C(23)	106.5 (8)
C(3)—C(4)—C(27)	109.6 (6)	O(5)—C(24)—O(6)	123.1 (8)
C(26)—C(4)—C(27)	107.8 (6)	O(6)—C(24)—C(25)	125.9 (9)
C(4)—C(5)—C(10)	113.8 (5)	O(8)—C(29)—O(9)	123.1 (7)
O(8)—C(6)—C(5)	111.5 (5)	O(9)—C(29)—C(30)	125.5 (8)
C(21)—O(4)—C(23)	105.5 (7)	O(10)—C(7)—O(11)	126.9 (8)
C(6)—O(8)—C(29)	115.5 (6)	O(11)—C(7)—C(6)	112.3 (7)
O(1)—C(1)—C(2)	122.1 (7)	C(9)—C(8)—C(28)	122.3 (6)
C(2)—C(1)—C(10)	112.5 (6)	C(8)—C(9)—C(10)	112.5 (5)
O(7)—C(2)—C(3)	109.2 (6)	C(10)—C(9)—C(11)	113.0 (6)
O(7)—C(2)—C(28)	104.0 (6)	C(1)—C(10)—C(9)	102.8 (5)
C(3)—C(2)—C(28)	114.7 (6)	C(1)—C(10)—C(19)	109.1 (5)
O(5)—C(3)—C(4)	111.2 (6)	C(9)—C(10)—C(19)	110.5 (5)
C(3)—C(4)—C(5)	105.8 (6)	C(11)—C(12)—C(13)	114.7 (5)
C(5)—C(4)—C(26)	113.9 (6)	C(12)—C(13)—C(17)	110.4 (5)
C(5)—C(4)—C(27)	111.3 (6)	C(12)—C(13)—C(18)	109.0 (5)
C(4)—C(5)—C(6)	115.3 (6)	C(17)—C(13)—C(18)	111.9 (5)
C(6)—C(5)—C(10)	112.0 (5)	C(8)—C(14)—C(15)	114.5 (6)
O(8)—C(6)—C(7)	111.8 (6)	C(14)—C(15)—C(16)	114.1 (6)
C(5)—C(6)—C(7)	114.3 (6)	O(2)—C(16)—C(15)	124.7 (7)
O(10)—C(7)—C(6)	120.7 (8)	O(3)—C(17)—C(13)	113.8 (5)
C(9)—C(8)—C(14)	114.8 (6)	C(13)—C(17)—C(20)	115.2 (6)
C(14)—C(8)—C(28)	122.7 (6)	C(17)—C(20)—C(22)	130.2 (7)
C(8)—C(9)—C(11)	111.2 (5)	O(4)—C(21)—C(20)	111.4 (7)
C(1)—C(10)—C(5)	108.3 (5)	O(4)—C(23)—C(22)	111.1 (8)
C(5)—C(10)—C(9)	110.2 (5)	O(5)—C(24)—C(25)	110.9 (7)
C(5)—C(10)—C(19)	115.2 (6)	C(2)—C(28)—C(8)	124.7 (6)
C(9)—C(11)—C(12)	112.3 (6)	O(8)—C(29)—C(30)	111.4 (7)
C(12)—C(13)—C(14)	109.1 (5)		

The H atoms of the CH and CH₂ groups were allowed to ride on their bonded C atoms and refined. The H atom bonded to atom O(7) was located on a difference Fourier map at an advanced stage of anisotropic refinement and its coordinates refined. The structure solution and refinement were carried out using *SHELXTL-Plus* (Sheldrick, 1991). *PARST* (Nardelli, 1983) was used for geometrical calculations.

Lists of structure factors, anisotropic displacement parameters, H-atom coordinates and complete geometry have been deposited with the IUCr (Reference: SZ1030). Copies may be obtained through The Managing Editor, International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, England.

References

- Cremer, D. & Pople, J. A. (1975). *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1354–1358.
 Nardelli, M. (1983). *Comput. Chem.* **7**, 95–98.
 North, A. C. T., Phillips, D. C. & Mathews, F. S. (1968). *Acta Cryst.* **A24**, 351–359.
 Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A. L., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M., Bye, R. & Linares, E. (1993). *J. Nat. Prod.* **56**, 1567–1574.
 Sheldrick, G. M. (1991). *SHELXTL-Plus*. Release 4.1. Siemens Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, Wisconsin, USA.

Contractile Response Induced by a Limonoid (Humilinolide A) on Spontaneous Activity of Isolated Smooth Muscle

Mercedes Perusquía,^{1*} Ricardo Hernández,¹ María Adelina Jiménez,² Rogelio Pereda-Miranda² and Rachel Mata²

Universidad Nacional Autónoma de México, ¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular, Apartado Postal 70-492, México D.F. 04511, and ² Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Coyoacán D.F. 04510, México.

The *in vitro* effect of the limonoid humilinolide A, isolated from *Swietenia humilis* (Meliaceae), on spontaneous contractions of guinea-pig ileum, and uterus from oestrus, dioestrus, ovariectomized and oestrogen-primed rats was studied. Humilinolide A caused a concentration dependent and non-reversible excitatory effect on intestinal and uterine smooth muscle, distinguished as spasmogenic and uterotonic action respectively. However, the potency of this compound to induce contraction was different in the distinct preparations assayed: in ileal musculature of male guinea-pigs, as well as in uterine muscle of dioestrus and ovariectomized rats, a slight excitatory effect was observed; in contrast to an intense excitatory effect displayed in rat uterus with high oestrogen levels (oestrus and oestrogenized). These data suggest that the contractile response induced by humilinolide A could be mediated by oestrogens, probably by occupancy of some receptors in myometrial plasma membranes to induce uterotonic response, which may be oestrogen-dependent. © 1997 by John Wiley & Sons, Ltd.

Phytother. Res. 11, 354-357 (1997)

No. of Figures: 4. No. of Tables: 1. No. of References: 13.

Keywords: limonoids; humilinolide A; *Swietenia humilis*; smooth muscle; guinea-pig ileum; rat uterus; spasmogenic activity.

INTRODUCTION

Swietenia humilis Zucc (Meliaceae) is a tree which commonly grows in the tropical areas of Mexico. The seeds of this species are highly valued for the treatment of gastrointestinal disorders, including worms and amebiasis (Díaz, 1976; Soto Nuñez and Sousa, 1995).

Previous phytochemical analysis conducted with the seeds led to the isolation and characterization of seven limonoids, including humilinolide A (Fig. 1) (Okorie and Taylor, 1971; Segura-Correa *et al.*, 1993). The limonoids produced by this species, possess insect and plant growth regulating properties (Segura-Correa *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1997). However, the pharmacological potential of these compounds has not been yet explored, particularly the effects related to the use of the plant for the treatment of gastrointestinal malaises.

Therefore, in an attempt to find a pharmacological basis for the reputed therapeutic properties of the seeds, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* effect of humilinolide A on the smooth muscle contractility determining its effect on the spontaneous contractile response of guinea-pig ileum. In addition, this compound was also tested in other types of smooth muscle with spontaneous contractility, as models of rat uterus in different endocrine situations, i.e. with high oestrogen levels (in oestrus and

oestrogenized) and with low oestrogen levels (in dioestrus and ovariectomized).

MATERIAL AND METHODS

The animals used in this study were obtained from Charles River Breeding Laboratories (Wilmington, MA), housed in our animal facility under controlled lighting (lights-on from 0700-1900 h) and temperature (21 °C) conditions, and given *ad libitum* water and food.

Humilinolide A was isolated from the seeds of *S. humilis* collected in the state of Guerrero, Mexico and was identified

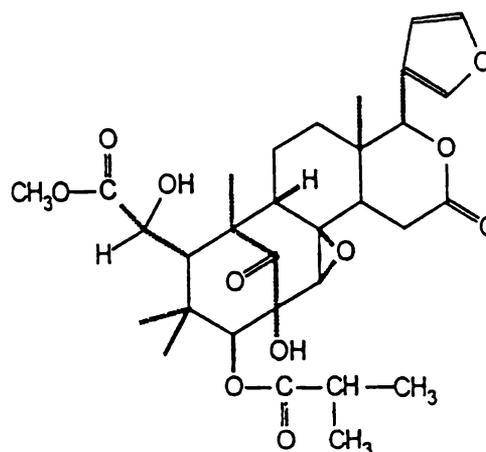


Figure 1. Molecular structure of humilinolide A.

This work forms part of the Ph.D thesis by María Adelina Jiménez.

* Correspondence to: M. Perusquía, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular, Apartado Postal 70-492, México D.F. 04511.

Contract grant sponsor: Dirección General de Asuntos del Personal Académico; Contract grant number: IN 203494.

by Dr Robert Bye, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM. The air dried seeds (1 kg) were ground into powder and defatted with hexane and then exhaustively extracted by maceration with CHCl_3 at room temperature. The resulting CHCl_3 extract was concentrated under reduced pressure to give a residue (125 g), which was chromatographed on Si gel, other elution was achieved with benzene/EtOAc/MeOH using a step gradient of increased polarity to yield three major fractions (FI–FIII). Fraction FIII, eluted with EtOAc:MeOH 7:3, was further rechromatographed on Si gel using hexane–EtOAc (mixtures of increasing polarity) and this process allowed the isolation of humilinolide A. Purification to homogeneity was achieved by preparative TLC on Si gel using benzene:EtOAc (1:1) as the eluent. IR, MP, and NMR data of the isolated humilinolide A were identical to those of an authentic sample (Segura-Correa *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1997).

Preparation of guinea-pig ileal smooth muscle. Male Hartley guinea-pigs weighing 450–600 g were killed by a blow on the head, and the distal ileum was removed. Lengths of approximately 4 cm of full thickness tissue, including muscle and serosal membrane were cut from the middle region of ileum and transferred to warmed (37 °C), oxygenated (O_2/CO_2 95:5) Krebs-bicarbonated solution of the following composition (mM): NaHCO_3 25, NaCl 120, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 2.5 and glucose 11 (pH adjusted to 7.4). The intestinal enclosure was evacuated by injection of Ringer's solution and then, the tissue was cut transversally into rings about 1 cm long.

Preparation of rat uterine smooth muscle. Female Wistar rats weighing 180–200 g were used, vaginal smears of these animals were inspected daily for 2 weeks, and animals showing regular 4-day oestrous cycle were selected on the day of oestrus (group I) or dioestrus (group II). Other animals were ovariectomized under ether anaesthesia and they were used 2 weeks after ovariectomy (group III), the last group were oestrogen-primed rats receiving a s.c. injection of oestradiol benzoate (purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) dissolved in corn oil (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 24 h before the start of the experiment (group IV).

The rats were killed by cervical dislocation and the uteri removed immediately and placed in Krebs-bicarbonated solution, which was identical to that described above except that the concentration of CaCl_2 was lower (1.5 mM). The uterine horns were isolated, cleaned of surrounding fat and loose connective tissue, and transversally bisected into two rings, approximately 1 cm long.

Protocol of the experiments. The rings from both tissues were placed vertically in a 10 mL tissue chamber and bathed in Krebs-bicarbonated solution, under optimum resting force of 10 mN (1 g tension), and allowed to rest for 30 min before starting the experiment. The contractile response of each tissue was recorded isometrically using transducers (Grass FTO3) connected to a polygraph (Grass 79).

After stabilizing (1 h) the tissues in Krebs-bicarbonated solution, the spontaneous ileal and uterine contraction of each different group described above was recorded for 10 min, and this was taken as the control value (100%). Immediately, humilinolide A, dissolved in ethanol to a final innocuous concentration of 0.1%, was added to the bath tissue, and tested by adding increasing concentrations (ranging from 3.1 to 200 μM) in a non-accumulative manner

(only one concentration was used for each ring). The effect of humilinolide A was also recorded for 10 min, and the response was compared with the control.

In order to evaluate the contractile response of humilinolide A, its potency was compared with that of acetylcholine (purchased by Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), which was used as a positive control, since it produces depolarization and tonic contractions of nonvascular smooth muscle (Bolton, 1979). The humilinolide A concentration, at which the E_{max} (100% of contraction) was obtained on uterine or ileal smooth muscle, was compared with the acetylcholine concentration, at which the E_{max} (100% of contraction) was achieved in each muscle.

Statistics and calculations. The total contractile activity (the area under the curve inscribed by the frequency and amplitude of contraction) was measured during each 10-min interval using the planimetric method. The data for compound action on the ileal or uterine contractility were calculated as mean value of more than six independent determinations, each from different experiments and expressed as percentage \pm SD. To study the effect of humilinolide A on intestinal and uterine contractility their concentration-response curves were plotted, and the EC_{50} (value for humilinolide A concentration at which 50% of the maximum response of spontaneous contraction was achieved) was obtained as described by Litchfield and Wilcoxon (1949). Student's *t*-test for paired samples was used to compare the difference between the means of the control and the treated tissues.

RESULTS

The vehicle for humilinolide A (ethanol 0.1%) did not significantly modify the spontaneous ileal or uterine contractility (compared with the control value $<8.8\% \pm 1.2\%$ of inhibition, $p < 0.0005$).

Effect of humilinolide A on ileal smooth muscle

Humilinolide A induced an increment of the tone and amplitude of the spontaneous contraction. Figure 2A shows the change in contractile activity at 50 μM . The change in

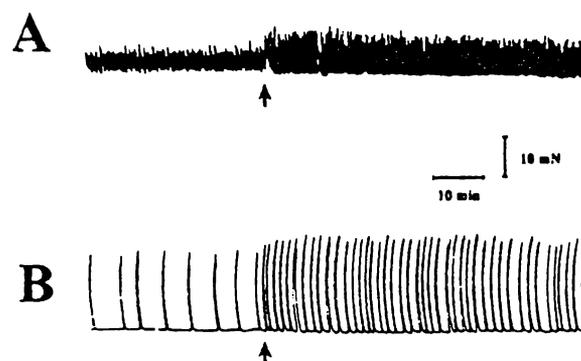


Figure 2. Representative tracings of spontaneous contractility time control and contractile augment induced by humilinolide A at equimolar concentration (50 μM) on isolated guinea-pig ileum (A) and rat uterus in oestrus (B). The compound addition indicated by arrow.

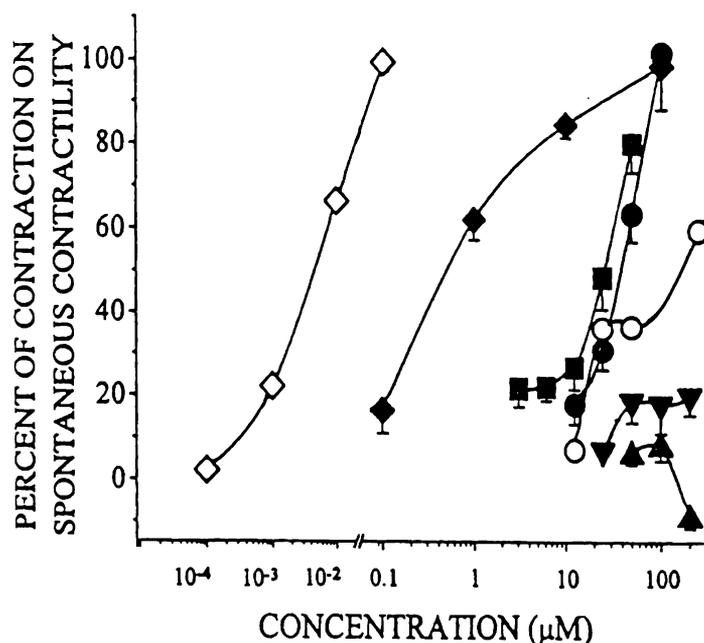


Figure 3. Concentration-response curves of the contraction induced by acetylcholine on the spontaneous contractility in isolated guinea-pig ileum (\diamond) and rat uterus (\blacklozenge), and humilinolide A in guinea-pig ileum (\circ) and rat uterus in different endocrine situations: oestrus (\blacksquare), oestrogenized (\bullet), dioestrus (\blacktriangle) and ovariectomized (\blacktriangledown). The vertical bars represent the SD for $n \geq 6$.

contractility was found to be concentration-dependent (Fig. 3), and the maximum effect ($59.7\% \pm 5.2\%$ of excitation) was observed at $250 \mu\text{M}$ (Table 1). The spasmogenic activity lasted more than 3 h and was not reversible after washout. Table 1 shows the EC_{50} calculated for humilinolide A. The contractile response of humilinolide A was 1000-fold less than that of acetylcholine, considering that 100 nM acetylcholine-induced full contraction (100%) see Fig. 3.

Effect of humilinolide A on uterine smooth muscle

In different endocrine situations humilinolide A contracted the uteri of rats, producing an increase in amplitude and frequency of the spontaneous contraction (Fig. 2B). A marked concentration-dependent excitatory effect was observed in oestrus and oestrogenized rats, the EC_{50} values are indicated in Table 1. However, in the case of dioestrus and ovariectomized animals only a slight excitatory effect was observed (Fig. 3). The potency of the compound to induce contraction was not different in ovariectomized animals at concentrations ranging from $25 \mu\text{M}$ to $200 \mu\text{M}$, with a maximum excitatory effect of $20.1 \pm 4.6\%$, while in dioestrus rats this compound was ineffective ($< 7.9 \pm 3.2\%$ of excitation) at all concentrations tested. The effect was

nonsignificant compared with the control ($p < 0.005$).

The uterotonic action induced by humilinolide A is quite evident in females with high oestrogen levels (oestrus and oestrogenized), showing a different potency to induce the uterotonic action in each endocrine situation (Fig. 4). Humilinolide A-induced excitation was observed approximately for 1.40 h, and it was not reversible even after washout. Acetylcholine induced the maximum contraction (100%) in rat uterus at $100 \mu\text{M}$. Thus, humilinolide A is as potent as acetylcholine in inducing uterotonic response in oestrogenized and oestrus rats (Fig. 3).

The excitatory effect of this compound was related to its potency to induce smooth muscle contraction, and the order was: oestrus uterus > oestrogenized uterus > ileum > ovariectomized uterus > dioestrus uterus. Therefore, the potency was higher in rat uterus with high oestrogen levels than in guinea-pig ileum.

DISCUSSION

The spasmogenic activity elicited by humilinolide A shows that it could be a pharmacological basis for the use of *S. humilis* in treating gastrointestinal disorders, probably associated with facilitating gastrointestinal motility. How-

Table 1. The maximum excitatory effects induced by humilinolide A and the EC_{50} values on isolated tissues

Tissue	EC_{50} (μM)	Confidence limits	Maximum excitation (%) means $n \pm \text{SD}$
Ileum	120	39.8–361	59.71 ± 5.27
Uterus			
Oestrus	25	16–39	80.15 ± 6.83
Oestrogenized	31.5	21.8–43.3	101.72 ± 13.43
Dioestrus	$1 \times 10^3^a$	3.4×10^4 – 2×10^{14}	7.91 ± 3.21
Ovariectomized	740 ^a	503.4–1087.8	20.16 ± 4.69

^a Theoretical values.

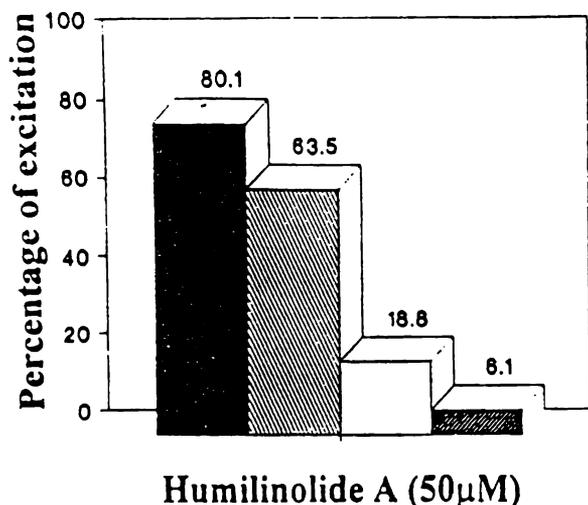


Figure 4. Comparative potency of the excitatory effect induced by humilinolide A at equimolar concentration (50 μM) on isolated rat uterine contractility in different enocrine situations. ■ oestrus; ▨, oestrogenized; ▩, ovariectomized; ▤, di-oestrus.

ever, its potency was substantially lower than that of acetylcholine in inducing contraction.

The present findings show that the uterus is also a target for the excitatory action induced by humilinolide A, indicating a uterotonic action. However, the potency of this compound markedly differs among the groups employed. The higher potency of humilinolide A in inducing excitation on uterine smooth muscle contractility of rats with high oestrogen levels (oestrus and oestrogenized) may be due to an increment of physiological level of oestrogens (oestradiol-17β). Consistent with this suggestion is the present

evidence that in the ileal smooth muscle of males, as well as in uterine smooth muscle of females with a low oestrogen level (dioestrus and ovariectomized), humilinolide A displayed a negligible effect. The fact that humilinolide A failed to excite the muscle with low estrogen levels supports our contention that this compound produces an oestrogen-dependent action on smooth muscle contractility. Therefore, the effect appeared to be mediated by oestrogen-dependent receptors as in the case of oxytocin (Alexandrova and Soloff, 1980; Fuchs *et al.*, 1983), serotonin (Ichida *et al.*, 1983; Ichida *et al.*, 1985) and acetylcholine (Purves, 1974).

The uterotonic response exhibited by this limonoid was equipotent to acetylcholine. Lastly, we would like to consider the possible therapeutic relevance of this compound. Indeed, humilinolide A represents a new lead for the development of abortive drugs, which might be useful for inducing labour.

The humilinolide A effect, in both ileal and uterine tissue, was not reversed after washout. This result could be a consequence of a toxic action, such as a calcium ionophore-like property and/or calcium release from bound sites in the cell, as proposed for some stimulant drugs that increase smooth muscle tension (Bolton and Kitamura, 1983). However, further pharmacological research is under way to elucidate the mechanism of action of this compound.

Acknowledgments

We thank Ms Irma Rodríguez for skilful technical assistance. This research was financially supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), project IN 203494.

REFERENCES

- Alexandrova, M., and Soloff, M. S. (1980). Oxytocin receptor and parturition II. Concentration of receptors for oxytocin and estrogen in the gravid and nongravid uterus at term. *Endocrinology* 106, 736-738.
- Bolton, T. B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718.
- Bolton, T. B., and Kitamura, K. (1983). Evidence that ionic channels associated with the muscarinic receptor of smooth muscle may admit calcium. *Br. J. Pharmacol.* 78, 405-416.
- Díaz, J. L. (1976). Uso de las Plantas Medicinales de México. In *Monografías Científicas II*, IMEPLAN, p. 116. México D.F.
- Fuchs, A.-R., Periyasamy, S., Alexandrova, M., and Soloff, M. S. (1983). Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium. Effect of ovarian steroids. *Endocrinology* 113, 742-749.
- Ichida, S., Hayashi, T., Kita, T., and Murakami, T. (1985). Estradiol-induced increase of specific (³H) ketaserin binding sites on rat uterine membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 108, 257-264.
- Ichida, S., Oda, Y., Tokunaga, H., Hayashi, T., Murakami, T., and Kita, T. (1983). Mechanisms of specific change by estradiol in sensitivity of rat uterus to serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229, 244-249.
- Jiménez, A., Mata, R., Pereda-Miranda, R. *et al.* (1997). Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *J. Chem. Ecol.* In press.
- Litchfield, J. T., and Wilcoxon, F. A. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113.
- Okoria, D. A., and Taylor, D. A. H. (1971). Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 10, 469-470.
- Purves, R. D. (1974). Muscarinic excitation: a microelectrophoretic study on cultured smooth muscle cell. *Br. J. Pharmacol.* 52, 77-86.
- Segura-Correa R., Mata, R., Anaya, A. L. *et al.* (1993). New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J. Nat. Prod.* 56, 1567-1575.
- Soto Nuñez, J. C., and Sousa, M. (1995). *Plantas Medicinales de la Cuenca del Río Balsas*. In Cuaderno 25, pp. 79-160. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Interference of 1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene with Photosynthetic Electron Transport*

Jimenez A.^a, Mata R.^a, Lotina-Hennsen B.^b and Anaya, A. L.^c

^a Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Investigación en Plantas Medicinales, Instituto de Química and Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Mexico D. F., Mexico

^b Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D. F., México

^c Departamento de Ecología Química, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Mexico D. F., Mexico

Z. Naturforsch. 52c, ▶▶▶▶-▶▶▶▶ (1997); received August 19/October 14, 1997

Malmea depressa, Hill Reaction Inhibitor, Photosystem II Inhibition, 1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene, Phenylpropanoids

The effect of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene, the major phytogrowth-inhibitory agent isolated from the leaves, stem bark and wood of *Malmea depressa* (Annonaceae), on several photosynthetic activities has been investigated using freshly lysed spinach chloroplasts. The results indicate that this compound inhibits proton-uptake, ATP synthesis and electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled) in a concentration dependent manner, therefore acting as a Hill reaction inhibitor. Uncoupled electron transport through photosystem I from reduced dichlorophenol-indophenol to methylviologen is unaffected by this compound. On the other hand, uncoupled electron transport through photosystem II from water to dichlorophenol-indophenol, from water to silicomolibdate and from diphenylcarbazide to dichlorophenol-indophenol is inhibited by this phenylpropanoid, suggesting that the site of inhibition is located in the span from P₆₈₀ to Q_A.

Introduction

As a part of our search for biologically active compounds of agrochemical interest it was previously demonstrated that the aqueous lixiviates, organic extracts and the essential oil, prepared from the stem bark of *Malmea depressa* (Baill.) R. E. Fries (Annonaceae), inhibited seedling growth of *Amaranthus hypochondriacus* (L.) and *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. Furthermore, bioactivity directed fractionation of the CHCl₃ extract and the essential oil led to the isolation of several phytotoxic principles. The most active compound was the phenylpropanoid 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene (Jiménez *et al.*, 1996).

Abbreviations: MV, methylviologen; DCMU, 3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea; DCPIP, dichlorophenol-indophenol; K₃[Fe(CN)₆], potassium ferricyanide; SiMo, silicomolybdate; DPC, diphenylcarbazide

* Taken in part from the Ph.D. Dissertation of Adelina Jiménez

Reprint requests to Dr. B. Lotina-Hennsen.
Fax: (5) 6-22-53-29.

The process of photosynthesis is a target of a wide range of compounds which destroy or inhibit plant growth (Einhelling, 1995). However, the effect of phenylpropanoids on energetic metabolism (i.e. respiration or photosynthesis) remains largely unexplored (Einhelling, 1995). Therefore, in this paper we describe the effect of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene (1), the major and most active phytogrowth-inhibitory principle of *M. depressa*, on several photosynthetic activities including proton uptake, ATP synthesis and electron flow (basal, phosphorylating and uncoupled).

Materials and Methods

General experimental procedures

GC was performed on a Hewlett-Packard Model 5890 gas chromatograph, equipped with PAS-1701-tested 1701 silicone column (25 m×0.32 mm i.d.) programmed from 1–150 °C at the rate of 7 °C×min; the carrier gas was He (7 psi, 1 ml/min). Analytical and preparative TLC were performed on Si gel 60 F₂₅₄ E. Merck plates, and the spots were visualized by spraying with a 10% solution of H₂SO₄, followed by heating at 110 °C.

0939-5075/97/1100-▶▶▶▶ \$ 06.00 © 1997 Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. All rights reserved. D

Plant material

The leaves of *M. depressa* were collected in Catemaco, Veracruz, Mexico in September 1995. The wood was collected in Carrillo Puerto Quintana Roo, Mexico in March 1993. Voucher specimens were deposited in the Instituto de Ecología Herbarium (XAL), Jalapa and National Herbarium (MEXU), México D. F.

Extraction and identification

The essential oils were prepared by distillation from 200 g of plant material to yield 4.8 g from leaves and 3.4 g from wood. Preparative TLC of the essential oils on silica gel plates, using benzene–EtOAc 9:1 as the eluent, allowed the isolation of compound 1 (4.3 g from the leaves and 2.9 g from the wood). The spectroscopic and spectrometric properties of 1 were identical to those of an authentic sample previously isolated from the stem bark of *M. depressa* (Jiménez *et al.*, 1996).

Chloroplasts, isolation and chlorophyll determination

Chloroplast thylakoids were isolated from market spinach (*Spinacea oleracea* L.) as described earlier (Saha *et al.*, 1971; Mills *et al.*, 1980; Calera *et al.*, 1996) and suspended, unless otherwise indicated, in three ml of a medium composed of 400 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, and 10 mM KCl and buffered with 0.030 M Na⁺-tricine at pH 8.0 (KOH, 1 M). KCN (0.1 mM) was added to inhibit any catalase activity. Chlorophyll concentration was measured according to Strain *et al.* (1971).

Measurement of proton uptake, ATP synthesis and electron transport

Proton uptake was measured as the pH value increase between 8.0 and 8.1 (Dilley, 1972), using a combination microelectrode connected to a Corning Potentiometer with expanded scale. The pH changes were registered using a Gilson recorder. The reaction medium was 100 mM sucrose, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM Na⁺-tricine, pH = 8.0 (KOH, 1 M). ATP-synthesis was determined titrimetrically by the procedure of Dilley (Dilley, 1972). Methylviologen (MV) (0.05 mM) was employed as electron acceptor for the Hill Reaction.

Light-induced noncyclic electron transport in the presence of MV was monitored with a YSI (Yellow Spring Instrument C) model 5300 oxygen monitor using a Clark electrode in a temperature regulated flask at 20 °C. The reaction medium was the same as in the proton uptake assay except for the tricine concentration (15 mM) and the presence or absence of 6 mM ammonium chloride (NH₄Cl) (Saha, *et al.*, 1971; Mills *et al.*, 1980; Calera *et al.*, 1996).

Photosystem I was determined in a similar way as noncyclic electron transport (Calera *et al.*, 1995; Calera *et al.*, 1996). The following reagents were added: 6 mM NH₄Cl, 10 μM 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU), 100 μM dichlorophenol-indophenol (DCPIP), 50 μM MV and 500 μM ascorbic acid. Photosystem II electron transport was measured in the presence of 100 μM DCPIP, 1 μM 2,5-dibromo-6-isopropyl-3-methyl-1,4-benzoquinone (DBMIB), 500 μM potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]), and 6 mM NH₄Cl (Calera *et al.*, 1995; Calera *et al.*, 1996).

Uncoupled electron transport from water to silicomolibdate (SiMo) was determined as in photosystem II except that 200 μM SiMo and 10 μM DCMU were added to the reaction medium (Giacquinta *et al.*, 1984). Uncoupled electron transport from diphenylcarbazide (DPC) to DCPIP was measured spectrophotometrically as reported (Vernon and Shaw, 1969) but in this medium MV was omitted, and 200 μM DPC were added. All reaction mixtures were illuminated with actinic light from a projector lamp (GAF 2660) and were passed through a 5 cm filter of a 1% CuSO₄ solution. The temperature was 20 °C. For each reaction a blank experiment was performed with the chloroplasts alone in the reaction medium. All the experiments were done in triplicate and the data analyzed by ANOVA. The I₅₀ value for each activity was extrapolated using the graph of percent activity vs concentration of phenylpropanoid. I₅₀ is the concentration producing 50% inhibition.

Results and Discussion

Isolation of 1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene

GC analysis of the essential oils revealed the presence of compound 1 in a proportion of 95% in the case of the leaves and 90% in the case of

the wood. Identification was made by comparison with an authentic sample via coinjection during GC analysis) (Jiménez *et al.*, 1996). These results indicated that this phenylpropanoid is the major component not only of the essential oil from the stem bark, but also from those of the leaves and wood of *M. depressa*.

Preparative TLC of the essential oils from the leaves and of wood of *M. depressa* allowed the isolation of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene (Fig. 1). The spectroscopic and spectrometric properties were identical to those of an authentic sample (Jiménez *et al.*, 1996).

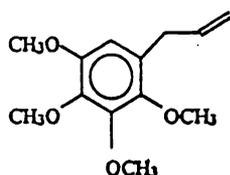


Fig. 1. Structure of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene.

Biological activity of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene

The effect of this phenylpropanoid on several photosynthetic processes, including ATP-synthesis, H^+ -uptake, electron transport rate (basal, phosphorylating and uncoupled) and partial reactions of the photosystems I and II, was investigated using freshly lysed spinach chloroplasts (Calera *et al.*, 1995; Calera *et al.*, 1996).

Effect of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene on basal, phosphorylating and uncoupled electron transport

1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene inhibited basal, phosphorylating and uncoupled electron transport from water (electron donor) to MV (electron acceptor) in a concentration-dependent manner (Fig. 2). The uncoupled electron flow was most drastically inhibited. The I_{50} values for each type of electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled) were 3.6, 5.0 and 2.7 μM , respectively. These data clearly indicate that this compound behaves as a Hill reaction inhibitor. These results also show that the target of 1 in the thylakoid membranes (are) is exposed in the non-energized state (uncoupled by 6 mM NH_4Cl), as indicated by the lowest I_{50} value being obtained at this state.

Localization of the site of inhibition of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene

In order to determine the site of inhibition, the effect of phenylpropanoid 1 on partial photosynthesis reactions (photosystems I and II) was measured using artificial electron donors and acceptors (Lotina-Hennsen *et al.*, 1991; Calera *et al.*, 1995). Compound 1 inhibited electron flow in photosystem II from water to DCPIP, from water to SiMo and from DPC to DCPIP (this last activity was explored in Tris-treated chloroplasts [Vernon and Shaw, 1969]). At the concentration of 6.05 μM this compound completely inhibited both electron transport from water to SiMo and from water to DCPIP by 96.1%. The I_{50} for both activities was

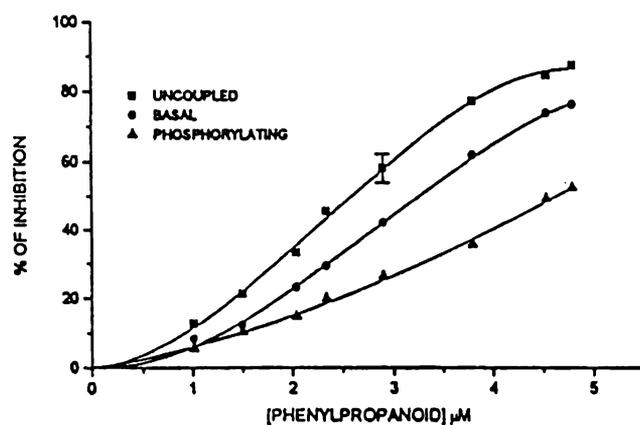


Fig. 2. Noncyclic electron transport (basal, phosphorylating and uncoupled) from water to methylviologen as a function of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene concentration. Photophosphorylating electron transport was measured in the presence of 1 mM ADP and 3 mM K_2HPO_4 . NH_4Cl (6 mM) was added for measuring uncoupled electron transport. Each cuvette contained 20 μg chlorophyll per ml in the reaction medium. Control value rates for basal, phosphorylating and uncoupled electron transport are 580, 488 and 1280, respectively, in $\mu e q e^{-1} \cdot h^{-1} \cdot \mu g Chl^{-1}$. Basal (■), phosphorylating (●) and uncoupled (Δ) electron transport.

2.86. Finally, electron transport from DPC to DCPIP was inhibited by 51% at the concentration of 9.08 μM . These results indicate that compound 1 primarily inhibited electron flow from P_{680} to Q_A and partially inhibited that from water to P_{680} . On the other hand, photosystem I electron transport from DCPIP to MV was inhibited 27% by this phenylpropanoid (data not shown). Photosystem II was more sensitive to 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene than photosystem I and is thus the target of compound 1.

Effect 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene on ATP synthesis and H^+ -uptake

ATP synthesis and H^+ -uptake (Fig. 3) were also inhibited by phenylpropanoid 1. The calculated I_{50} values were 1.40 and 2.30 μM , respectively. The concentration of 1 needed to inhibit these activities is lower than that needed to affect electron flow, suggesting that the proton gradient built up by electron transport is not available for ATP synthesis. This conclusion was supported by the fact that Mg^{2+} -ATPase activity was not inhibited by compound 1 (data not shown). It has been previously demonstrated that several cinnamic acid derivatives inhibited electron transport and phosphorylation in spinach thylakoids (Einhelling,

1986); the I_{50} displayed by these derivatives ranged between 1 and 10 mM. Therefore, phenylpropanoid 1 was 370 times more potent than these cinnamic acid derivatives.

Conclusion

The interference of compound 1 with energetic metabolism at the level of photosynthesis as a Hill reaction inhibitor might be partially responsible for its phyto-growth inhibitory properties and its possible role as an allelopathic agent. It is important to point out that the target for most commercial herbicides that affect photosynthesis is at the Q_B level; however, this natural phenylpropanoid acts on a different step of the electron transport chain (P_{680} to Q_A).

Acknowledgments

This study was financed by the following projects: DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM) IN 205197; PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) No. 005328, 005361, 005384 and FQ-5006, and CONACyT (Convenio PFPN/112/92, 400313-5-2358PN and 400313-5-2576PM). A. Jiménez acknowledges fellowship support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

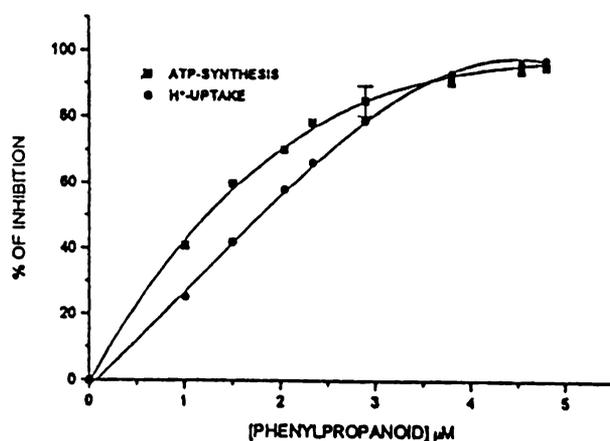


Fig. 3. Proton uptake (●) and ATP synthesis (■) as a function of 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)benzene concentration. In each case the cuvette contained 20 μg chlorophyll per ml in the reaction medium. Other conditions are described in the experimental section.

- Calera R., Soto F., Sánchez P., Bye R., Hernández B., Anaya A., Lotina-Hennsen B. and Mata R. (1995), Biochemical active sesquiterpene lactones from *Raiibida latipalearis*. *Phytochemistry* 40, 419–425.
- Calera R., Mata R., Lotina-Hennsen B. and Anaya, A. L. (1996), Uncoupling behavior of the 4-phenylcoumarins in spinach chloroplasts: structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* 14, 2966–2969.
- Dilley R. (1972), Ion transport (H^+ , K^+ , Mg^{2+} exchange phenomena). *Methods. Enzymol.* 24, 68–74.
- Einhellig F. (1986), Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: *The Science of Allelopathy* (Putnam A. L. and Tang C. S., eds.). John Wiley and Sons, N.Y., pp. 171–186.
- Einhellig F. A. (1995), Allelopathy: current status and future goals. In: *Allelopathy. Organisms, Processes and Applications* (K. Inderjit, M. Dakshini and F. A. Einhellig, eds.). ACS Symposium Series 582. American Chemical Society pp. 2–25.
- Giaquinta R., Dilley R., Selman B. and Anderson B. (1984), Chemical modification studies of chloroplast membranes. Water oxidation inhibition by diazoniumbenzenesulfonic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 200–209.
- Jiménez A., Mata R., Anaya A. L. and Lotina-Hennsen B. (1995), Phytogrowth-inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *J. Nat. Prod.* 59, 202–204.
- Lotina-Hennsen B., Roque-Resendiz J., Jiménez M. and Aguilar M. (1991), Inhibition of oxygen evolution by cacalol and derivatives. *Z. Naturforsch.* 46c, 1772–1780.
- Mills J. D., Mitchel P. and Schurman P. (1980), Modulation of coupling ATPase activity in intact chloroplasts. *FEBS Lett.* 112, 173–177.
- Saha S., Ouitrakul R., Izawa S. and Good N. (1971), Electron transport and phosphorylation in chloroplast as function of the electron acceptor. *J. Biol. Chem.* 246, 3204–3209.
- Strain H., Cope B. and Svec M. (1971). Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the chlorophylls. *Methods Enzymol.* 23, 452–466.
- Vernon L. and Shaw E. (1969), Photoreduction of 2,6-dichlorophenol-indophenol by diphenylcarbazide: a photosystem 2 reaction catalyzed by Tris-washed chloroplast and subchloroplast fragments. *Plant Physiol.* 44, 1645–1649.