

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO QUIMICO DE LAS PARTES AEREAS DE *Esenbeckia xochipala* Y DE LAS SEMILLAS DE *Esenbeckia huertana*

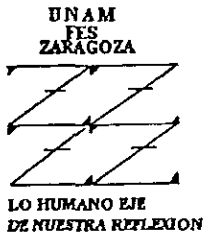
T E S I S
D E L I C E N C I A T U R A

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JOSE LUIS BUCIO GONZALEZ

DIRECTOR: Q. ARTURO E. CANO FLORES



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259385



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio de Química de Productos Naturales L-314 de la FES-ZARAGOZA C-II, bajo la asesoría del Q. Arturo E. Cano Flores.

El presente trabajo fue presentado en el X Simposio de Estudiantes de Posgrado "Fernando Romo", México D F Diciembre de 1996.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Guillemos Delgado Lamas y al personal técnico académico del Instituto de Química de la UNAM por las facilidades brindadas en la realización de este trabajo.

Se agradece a la M. en C. Martha Ramos del Instituto de Biología de la UNAM por su colaboración en el presente trabajo

DEDICATORIAS

A mi mamá **Eustolia** quién a base de esfuerzo y trabajo ha podido darme una educación.

A mis hermanos: **Luz María, Efrain, Maribel, Armando y Mario**

Y muy en especial a mi amigo el M en .C **Alejandro Ruíz Cancino.**

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|--------|
| Notaciones Empleadas | |
| 1. Resumen |1 |
| 2. Introducción | .. 3 |
| 3. Fundamentación | ...6 |
| 3.1 Familia <i>Rutaceae</i> | ... 7 |
| 3.1.1 Alcaloides de la Familia <i>Rutaceae</i> |7 |
| 3.1.1.1 Alcaloides Derivados del Acido Antranílico | ...12 |
| 3.1.1.2 Alcaloides Derivados del Triptófano |18 |
| 3.1.1.3 Alcaloides Derivados de la Tirosina | ...20 |
| 3.1.2 Flavonoides de la Familia <i>Rutaceae</i> |21 |
| 3.1.2.1 Flavonoides (1,3-diarilpropanos) | ...22 |
| 3.1.2.2 Isoflavonoides (1,2-diarilpropanos) | .. 23 |
| 3.1.2.3 Neoflavonoides (1,1-diarilpropanos) |24 |
| 3.1.3 Cumarinas de la Familia <i>Rutaceae</i> |27 |
| 3.1.4 Limonoides de la Familia <i>Rutaceae</i> | .. 31 |
| 3.2 Género <i>Esenbeckia</i> |34 |
| 3.2.1 Compuestos Aislados del Género <i>Esenbeckia</i> |35 |
| 4. Planteamiento del Problema |51 |
| 5. Objetivos |53 |
| 5.1 Objetivo General | 54 |
| 5.2 Objetivos Específicos | ...54 |
| 6. Hipótesis | ...55 |
| 7. Metodología | ...57 |
| 7.1 Material | 58 |
| 7.2 Equipo e Instrumento | ...58 |
| 7.3 Sustancias | ...59 |

| | |
|---|--------|
| 7.4 Parte Experimental. | ...60 |
| 7.4.1 Análisis químico del Extracto acetónico de <i>Esenbeckia xochipala</i> . | ..60 |
| 7.4.2 Análisis químico del Extracto hexánico de <i>Esenbeckia xochipala</i> | ...65 |
| 7.4.3 Análisis químico del Extracto etanólico de <i>Esenbeckia huertana</i> . | ...66 |
| 8. Resultados y Análisis de Resultados. | ...68 |
| 8.1 Tabla VI. Rendimientos de los compuestos aislados. | ...69 |
| 8.2 fridelina. | ...70 |
| 8.3 β -D-glucósido - β -sitosterol. | ...78 |
| 8.4 tridecaprenol. | ...82 |
| 8.5 β -sitosterol | ...83 |
| 8.6 limonina. | ..84 |
| 9 Conclusiones. | ...90 |
| 10. Espectros. | ..92 |
| 10.1 Espectro 1. IR(CHCl ₃) de la fridelina | ..93 |
| 10.2 Espectro 2. RMN ¹ H(300MHz, CHCl ₃ , TMS) de la fridelina | ...94 |
| 10.3 Espectro 3. IR(KBr) del β -D-glucósido- β -sitosterol. | ...95 |
| 10.4 Espectro 4. IR(CHCl ₃) del acetilado del β -D-glucósido- β -sitosterol. | ..96 |
| 10.5 Espectro 5. RMN ¹ H(300MHz, CHCl ₃ , TMS) del acetilado del β -D-glucósido- β -sitosterol. | ...97 |
| 10.6 Espectro 6. IR(CHCl ₃) del tridecaprenol. . | ...98 |
| 10.7 Espectro 7. RMN ¹ H(200MHz, CHCl ₃ , TMS) del tridecaprenol. | ...99 |
| 10.8 Espectro 8. IR(CHCl ₃) del acetilado del tridecaprenol . | ...100 |
| 10.9 Espectro 9. RMN ¹ H(200MHz, CHCl ₃ , TMS) del acetilado del tridecaprenol. | .. 101 |
| 10.10 Espectro 10. IR(CHCl ₃) del β -sitosterol | .. 102 |
| 10.11 Espectro 11. RMN ¹ H(300MHz, CHCl ₃ , TMS) del β -sitosterol. | ..103 |

| | |
|--|--------|
| 10.12 Espectro 12 IR(CHCl ₃) de la limonina | ...104 |
| 10.13 Espectro 13. RMN ¹ H(300MHz, CHCl ₃ , TMS) de la limonina. | ...105 |
| 10.14 Espectro 14 RMN ¹³ C(75MHz, CHCl ₃ , TMS) de la limonina. | ...106 |
| 11. Bibliografía. | ..107 |

NOTACIONES EMPLEADAS

| | |
|--------------------|--|
| Ac ₂ O | Anhídrido acético. |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado. |
| Py | Piridina. |
| RMN ¹ H | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno. |
| TMS | Tetrametilsilano. |
| IR | Infrarrojo. |
| EM | Espectrometría de masas. |
| Hz | Hertz o ciclos por segundo. |
| {M ⁺ } | Ión molecular. |
| <i>m</i> | Multiplete. |
| <i>s</i> | Singulete. |
| <i>d</i> | Doblete. |
| <i>t</i> | Triplete. |
| <i>c</i> | Cuarteto. |
| <i>ν</i> | Número de onda (cm ⁻¹). |
| δ | Desplazamiento químico (ppm). |
| J | Constante de acoplamiento (Hz). |
| <i>m/z</i> | Relación carga-masa. |
| I.E. | Impacto electrónico. |
| KBr | Bromuro de potasio. |
| ppm | Partes por millón. |
| () | Número de estructura. |
| Pf | Punto de fusión. |
| ccf | Cromatografía en capa fina. |
| A ⁽¹⁾ | Nota al pie de página. |
| Ω | Grados de insaturación. |
| A ¹¹ | Referencia bibliográfica. |

RESUMEN

El estudio químico en nuestro país se ha enmarcado en un contexto amplio, cuyos resultados pueden coadyuvar al diseño de investigaciones multidisciplinarias. Precisamente el conocimiento de la estructura molecular de los metabolitos secundarios constituye un apoyo para el establecimiento de la clasificación botánica de las especies de un grupo determinado de plantas. Siguiendo esta línea de investigación se inició el estudio químico de plantas del género *Esenbeckia*; con la finalidad de generar los conocimientos, que permitan delinear el perfil químico de este grupo de plantas y ayudar al establecimiento de sus relaciones quimiotaxonómicas. Por lo anterior, en el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos del análisis químico de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y de las semillas de *Esenbeckia huertana*, de las cuales se aislaron e identificaron cinco compuestos: fridelina, β -D-glucósido- β -sitosterol, tridecaprenol, β -sitosterol, el derivado peracetilado del β -D-glucósido- β -sitosterol y el acetato de tridecaprenilo como productos de reacción; mientras que de las semillas de *Esenbeckia huertana* se aisló y caracterizó a la limonina como producto único. Todas las sustancias aisladas fueron caracterizadas e identificadas con base en sus propiedades físicas — pf, Rf, solubilidad— y propiedades espectroscópicas — IR, RMN¹H , RMN¹³C y EM—.

INTRODUCCION

México ocupa un lugar privilegiado en el panorama mundial de la diversidad biológica. Con una superficie de apenas 1.5% del área total de la masa continental, en su territorio se encuentran casi todos los biomas que existen en el planeta, y en él viven cerca del 10% de las especies de plantas y animales terrestres que se conocen actualmente.

La gran biodiversidad que posee México se debe a su ubicación geográfica en una área de intersección de la región boreal y la región tropical, sus extensos litorales y su accidentada topografía han dado lugar a una gran diversidad de climas, suelos y comunidades vegetales, que conforman un mosaico de bosques de coníferas, bosques de encino, bosques de niebla, selvas altas siempre verdes, selvas que pierden sus hojas parte del año, matorrales, manglares, dunas costeras y una gran cantidad de asociaciones vegetativas de gran interés biológico.

Se tiene que resaltar, que el programa de áreas Naturales protegidas en México informa que " nuestro país destaca por sus endemismos, es decir por la presencia de organismos que no existen en otro país. Considerando tan sólo la flora, el porcentaje de endemismos oscilan entre 44 y el 63%."

Dentro de las especies endémicas de México, se encuentran algunas pertenecientes al género *Esenbeckia* (*Rutaceae*), la cual se caracteriza por biosintetizar una gran variedad de aceites esenciales, entre los que se han identificado a una serie de compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos.

Sin embargo, las características más distintivas de la familia han sido el aislamiento de alcaloides (derivados del ácido antranílico, de la fenilalanina, del carbazol, imidazol y los derivados del indol), de la mayoría de los géneros hasta ahora estructurados. Una recopilación importante de la información sobre los constituyentes químicos de la misma, es la presentada por Waterman y Grundon en 1983⁽¹¹⁾; quienes indican que los metabolitos secundarios más frecuentemente caracterizados pueden ser divididos en los siguientes grupos: a) alcaloides, b) flavonoides libres y en forma de glucósido, c) cumarinas, d) cromonas, e) acetofenonas y f) triterpenos tetracíclicos altamente oxidados (limonoides y quasinoídes).

En el presente trabajo, se dan a conocer los resultados del estudio químico de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y de las semillas de *Esenbeckia huertana*, los cuales aunados con los informados en la literatura, pueden coadyuvar al conocimiento químico de este género y así contribuir a su preservación y a la búsqueda de una aplicación racional que le permita ser considerada como un recurso de gran valía.

FUNDAMENTACION

La importancia que encierra el análisis químico de la flora mexicana, reside en que nuestro país posee una gran variedad de recursos vegetales, ya que prácticamente todos los grandes tipos de vegetación existentes en el mundo se encuentran en México.

Rutaceae es una gran familia de árboles, arbustos y en algunos casos hierbas de gran importancia económica por su producción de cítricos comerciales -limones, naranjas, limas, entre otros-. Su nombre proviene de la ruda, pequeña planta perenne y aromática, que durante siglos se ha venido cultivando en jardines como planta medicinal ^[2,3].

Asimismo, la familia *Rutaceae* es una de las más interesantes y complejas con respecto a la química de los alcaloides, cumarinas, flavonoides, cromonas y limonoides.

ALCALOIDES

Dentro de la familia *Rutaceae* se han identificado una gran variedad de alcaloides. En la tabla I, se presenta una clasificación que abarca los siguientes grupos: a) derivados del ácido antranílico, b) derivados de la tirosina, c) derivados del triptófano y d) de tipo quinolínicos.

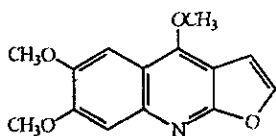
Tabla I. Algunos alcaloides aislados de la familia Rutaceae

| QUINOLINICOS | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------|
| COMPUESTO | FUENTE NATURAL | BIBLIOGRAFIA |
| Kokusaginina(1) | <i>Glycosmis cyanocarpa</i> | [4] |
| 3-hidroxiquinolina(2) | <i>Ruta montana</i> | [5] |
| 2-heptil-4-metoxiquinolona(3) | <i>Zanthoxylum avicennae</i> | [5] |
| Haplopina(4) | <i>Zanthoxylum rhaiifolium</i> | [6] |
| Eschinifolina(5) | <i>Zanthoxylum schinifolium</i> | [5] |
| O-etilnordictamnina(6) | <i>Dictamnus dasycarpus</i> | [7] |
| Nobilina(7) | <i>Teclea nobilis</i> | [8] |
| DERIVADOS DE LA ACRIDONA | | |
| Gravacridondiolacetato(8) | <i>Ruta graveolans</i> | [9] |
| Acrimarina F(9) | <i>Citrus funadoko</i> | [10] |
| Chaloridona(10) | <i>Ruta chalepensis</i> | [11] |
| Hallacridona(11) | <i>Ruta graveolans</i> | [9] |
| Citprissina(12) | <i>Citrus sulcata</i> | [5] |
| Arborinina(13) | <i>Zanthoxylum leprieurii</i> | [12] |
| DERIVADOS DE LA TIROSINA | | |
| Dihidroqueleritrina(14) | <i>Fagara semiarticulata</i> | [13] |
| 9-etoxiqueleritrina(15) | <i>Fagara xanthoxiloides</i> | [14] |
| Cloruro de nitidina(16) | <i>Fagara macrophylla</i> | [15] |

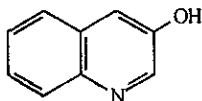
CONTINUACION DE LA TABLA I.

| COMPUESTO | FUENTE NATURAL | BIBLIOGRAFIA |
|---------------------------------|------------------------------|--------------|
| Norqueleritrina(17) | <i>Zanthoxylum spinosum</i> | [16] |
| Oxiqueleritrina(18) | <i>Zanthoxylum coriaceum</i> | [16] |
| DERIVADOS DEL TRIPTOFANO | | |
| Mukonal(19) | <i>Murraya koenigii</i> | [17] |
| Glicozolinol(20) | <i>Glicosmis pentaphylla</i> | [18] |
| Heptazolicina(21) | <i>Clausena heptaphylla</i> | [19] |
| Clausenatina(22) | <i>Clausena anisata</i> | [20] |

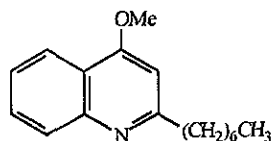
Continuación de la tabla I. Alcaloides aislados de la familia Rutaceae.



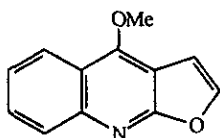
(1)



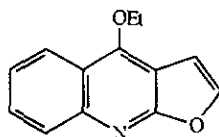
(2)



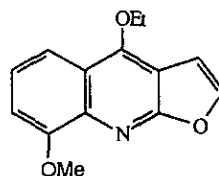
(3)



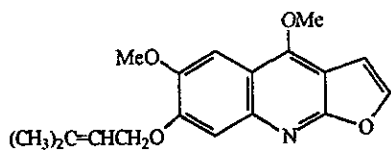
(4)



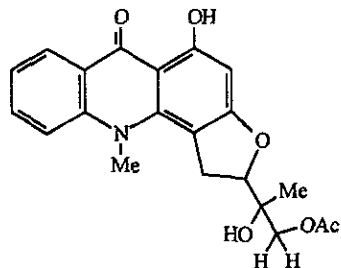
(5)



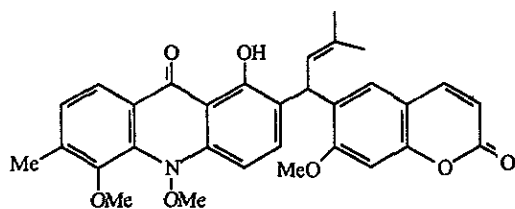
(6)



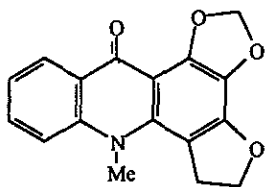
(7)



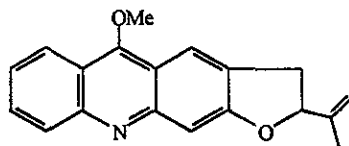
(8)



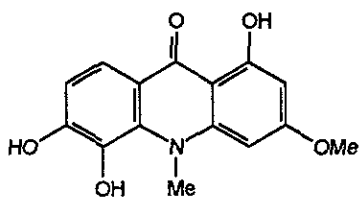
(9)



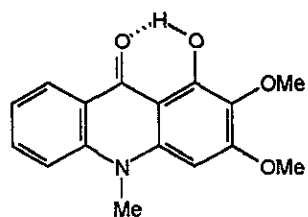
(10)



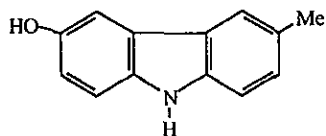
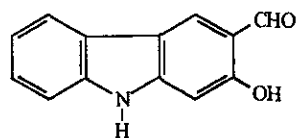
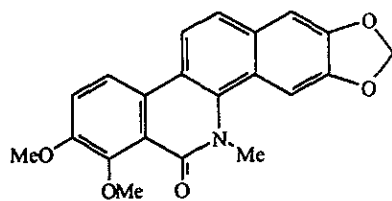
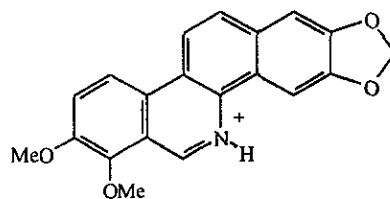
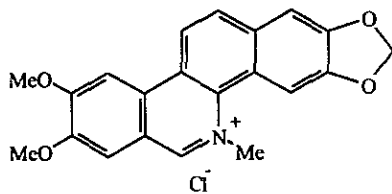
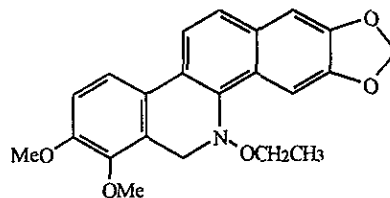
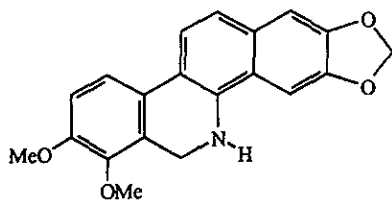
(11)

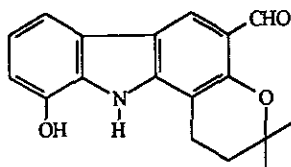


(12)

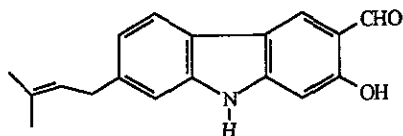


(13)





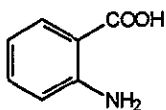
(21)



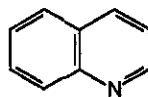
(22)

DERIVADOS DEL ACIDO ANTRANILICO

Las plantas de la familia Rutaceae son particularmente fuentes de alcaloides derivados del ácido antranílico (23), compuestos cuya estructura se basa en el núcleo de la quinolina (24).

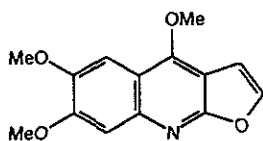


(23)

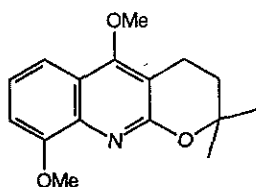


(24)

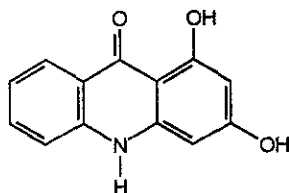
Algunos de estos metabolitos son completamente simples (quinolínicos), otros tienen un anillo de furano (25), pirano (26), piridina o bien pueden presentar un anillo bencénico unido a la estructura de la quinolina, tal es el caso de los derivados de la acridona (27). Estos compuestos se pueden encontrar comúnmente oxigenados en las posiciones C-2, C-4 y sustituidos en el anillo aromático por grupos metoxilo o más raramente por grupos hidroxilo, C-prenilo u O-prenilo (28, 29) ⁽²¹⁻²²⁾.



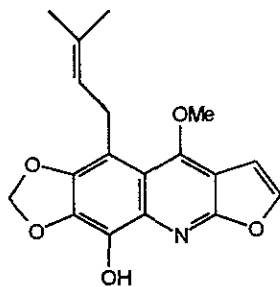
(25)



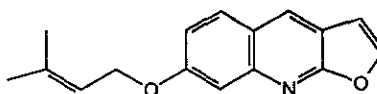
(26)



(27)



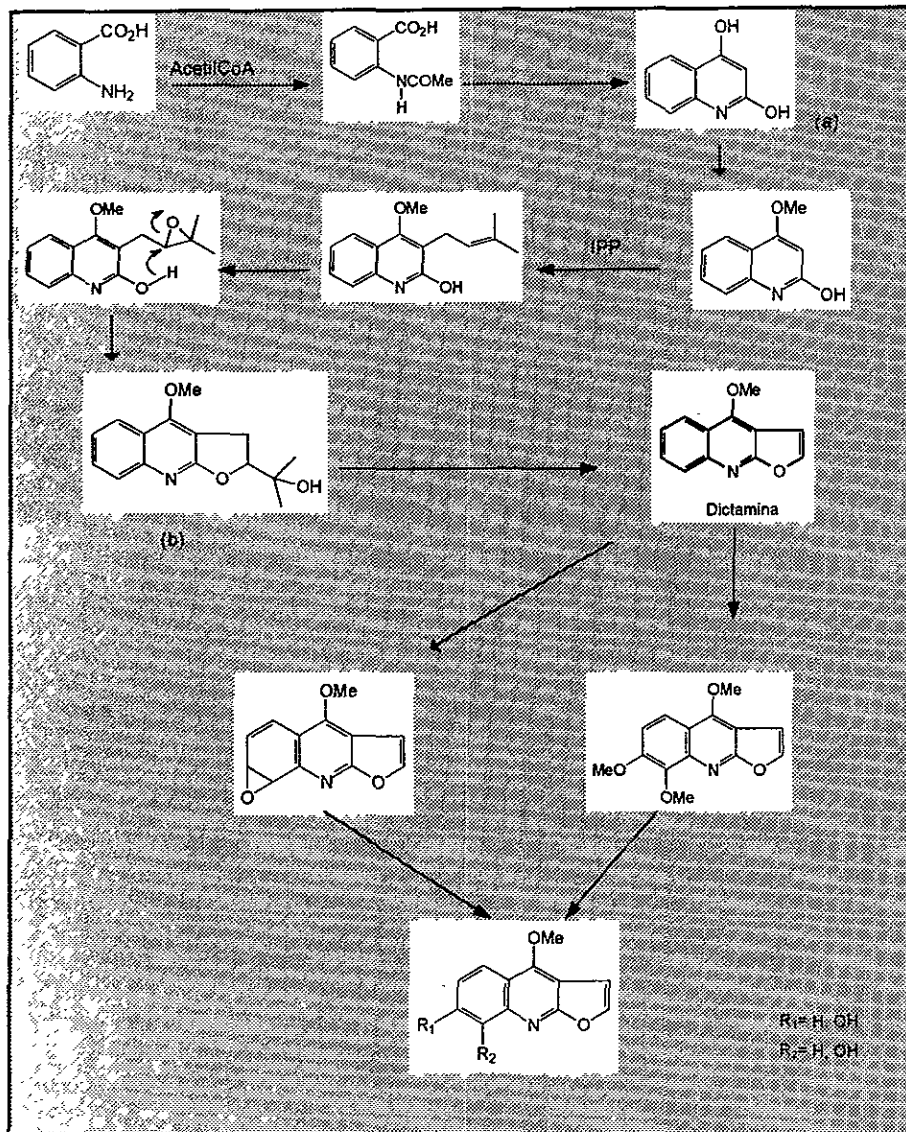
(28)



(29)

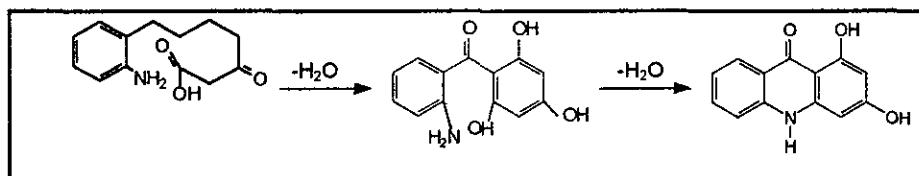
Dentro de los derivados del ácido antranílico, se encuentra el grupo de alcaloides furanoquinolinicos, los cuales presentan gran importancia estructural y biológica en la familia *Rutaceae*. La distribución de estos metabolitos en esta familia es esencialmente limitado; sin embargo, se han identificado derivados del sistema furo[2.3-b]quinolina, tal es el caso de la dictamina, la cual tiene su origen a partir del 2-4.dihidroxiquinolina (a), este compuesto sufre una serie de transformaciones hasta llegar a la platidesmina (b), tal como se ilustra en el esquema 1 ⁽²¹⁾.

Esquema 1. Biosíntesis de furanoquinolinas ^[21].

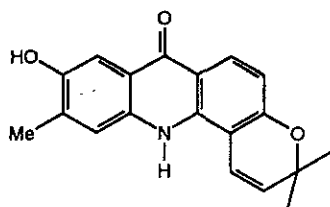


Además de los alcaloides furanoquinolínicos, se encuentran los alcaloides que poseen el esqueleto de la acridona, que se forma por la combinación del ácido antranílico con un policétido para producir un núcleo tricíclico frecuentemente oxigenado en los C-1 y C-2, tal como se muestra en el esquema 2.

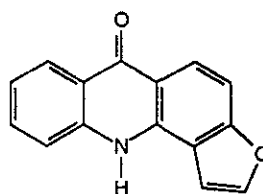
Esquema 2. Formación del núcleo de la acridona ^(1,12).



Los primeros alcaloides derivados de la acridona fueron aislados de especies pertenecientes a la familia *Rutaceae*, las cuales muestran como sustituyentes en el anillo C a un grupo hidroxilo, metoxilo y metilendioxi. Otros derivados de la acridona son hemiterpenos que contienen grupos C-prenilos y anillos derivados del pirano (dimetilpirano 30) y furano (isopropilfuran 31).



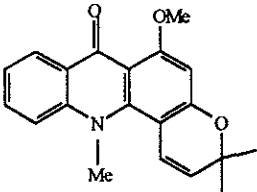
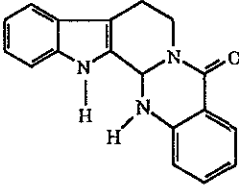
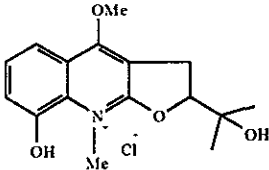
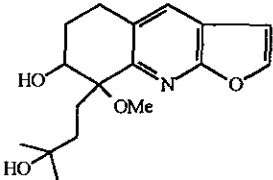
(30)



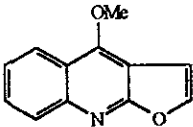
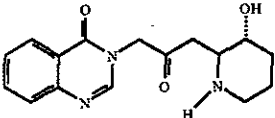
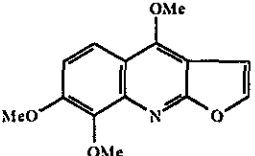
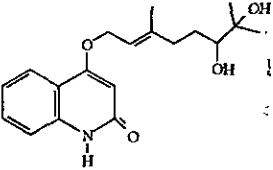
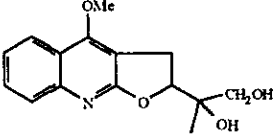
(31)

Se ha informado que algunos de estos metabolitos pueden mostrar importante actividad biológica, tal es el caso de los alcaloides furanoquinolínicos, así como derivados de la acridona, algunos de los cuales se muestran en la tabla II.

TABLA II. Actividad biológica de algunos alcaloides derivados del ácido antranílico ^[1,21,23].

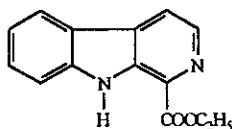
| COMPUESTO | ESTRUCTURA | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|-------------------------|---|---------------------|
| Acronicina |  | Antibiótico |
| Rutacarpina |  | Uterotónico |
| Cloruro de Pteleatinium |  | Antimicrobiana |
| Perforina |  | Sedante |

CONTINUACION TABLA II.

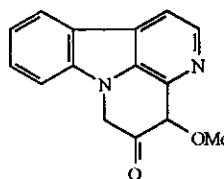
| COMPUESTO | ESTRUCTURA | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|-------------|---|--|
| Dictamina |  | Incrementa el tono muscular del corazón y contracción de uretra. |
| Febrifugina |  | Antipirético, Antimalárico |
| Skimmianina |  | Hipotérmico, Sedante |
| Bucharaina |  | Sedante |
| Dubinidina |  | Antimicrobiano, Sedante e Hipotérmico |

DERIVADOS DEL TRIPTOFANO

En los derivados del triptófano es posible localizar compuestos indolquinazolínicos, tipo carbolina, cantonina, tal es el caso de la kumijianina A (34) y nigakinona (35) respectivamente. Dentro de la familia *Rutaceae* se han encontrado una gran cantidad de cantinonas que parecen ser mayor a las sustancias aisladas en *Simaroubaceae*, aunque existe mayor diversidad de estos compuestos en la familia *Simaroubaceae*. Las cantinonas han mostrado tener actividad citotóxica y antibiótica, al igual que los derivados del ácido antranílico [22].



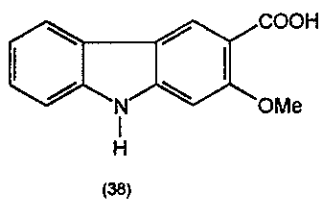
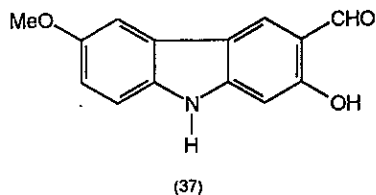
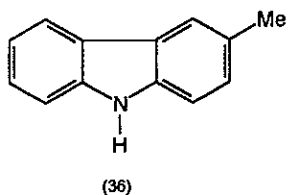
(34)



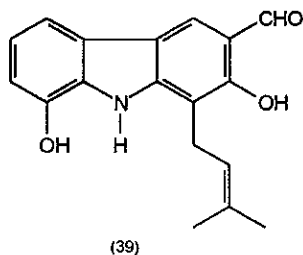
(35)

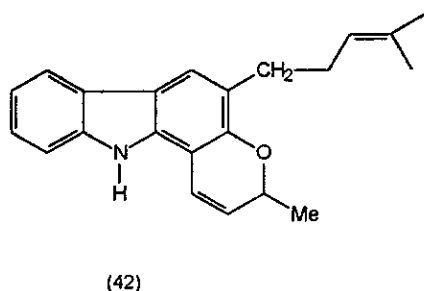
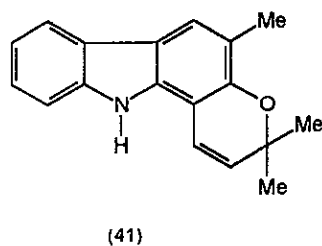
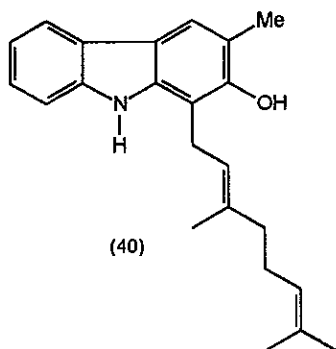
Otros metabolitos derivados del triptófano son los carbazoles, los cuales se encuentran comúnmente en la familia *Rutaceae*, *Clausena*, *Glycomis*, *Micromelum* y *Murraya*.

Todos los alcaloides de tipo carbazol obtenidos a partir de especies de rutáceas poseen un carbono unido en la posición tres, el cual puede ser un metilo, formilo o grupo carboxilo, ejemplos de este tipo de compuestos son: 3-metilcarbazol (36), lansina (37) y ácido mukoeico (38).



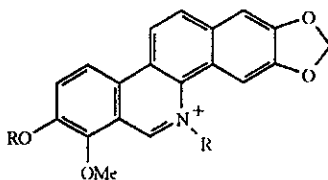
La sustitución del grupo hidroxilo, metoxilo ocurre en todas las posiciones, excepto en cuatro y cinco, y naturalmente en la posición tres. Algunos carbazoles pueden contener un C-prenilo o C-geranilo como sustituyente, tal como heptafillinas (39) y mahanimbinol (40). La ciclización del 1-prenilo-2-hidroxicarbazol, conduce a la formación de piranocarbazoles (girinimbina, 41) y (mahanina, 42) ^[1 25-26].





DERIVADOS DE LA TIROSINA

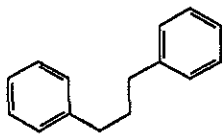
Los alcaloides derivados de la tirosina no son muy comunes en los Rutales, pero se han podido identificar en cinco géneros de la familia *Rutaceae*: *Zanthoxylum*, *Toddalia*, *Phellodendron*, *Tetradidium* y *Fagaropsis*, encontrándose más comúnmente las benzo[c]fenantridinas, las cuales en su mayoría poseen una pronunciada actividad antibiótica. ejemplo de este tipo de metabolitos son: la decarina (43) y queleritrina (44) ^[1-16].



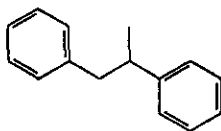
| | R | R' |
|----|----|----|
| 43 | H | H |
| 44 | Me | Me |

FLAVONOIDES

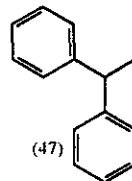
El término flavonoide se aplica a compuestos que poseen 15 átomos de carbono, en los cuales dos núcleos bencénicos están unidos por un eslabón de tres átomos de carbono ($Ar-C_3-Ar$). Se pueden distinguir 1,3-diarilpropanos (flavonoides, 45), 1,2-diarilpropanos (isoflavonoides, 46) y 1,1-diarilpropanos (neoflavonoides, 47) ^[23].



(45)



(46)

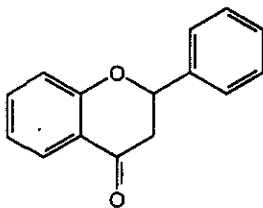
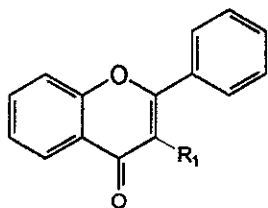


(47)

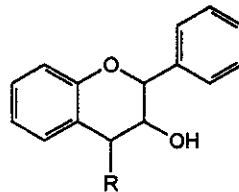
1,3-diarilpropanos

Los flavonoides, compuestos fenólicos, son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y algunos frutos. El elemento común de estos compuestos está relacionado con un núcleo básico, el 2-fenilcromano. El término 1,3-diarilpropanos se asocia a una gran diversidad de estructuras.

- a) 2-fenil cromonas: flavonas (48), flavonoles (49), flavanonas (50)
- b) 2-fenil cromanos (flavanos): 3-flavanol (catecoles, 51) y 3,4, flavandioles (52).
- c) flavilios: antocianos (53)
- d) chalconas : formas abiertas de las flavanonas (54).
- e) auronas (55).

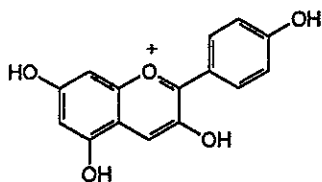


(50)

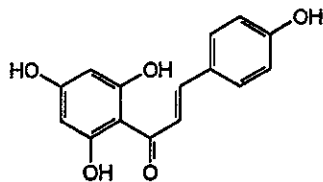


| | R ₁ |
|----|----------------|
| 48 | H |
| 49 | OH |

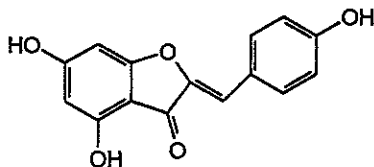
| | R |
|----|----|
| 51 | H |
| 52 | OH |



(53)



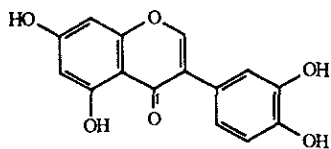
(54)



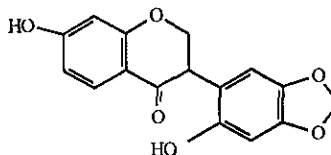
(55)

1,2-diarilpropanos

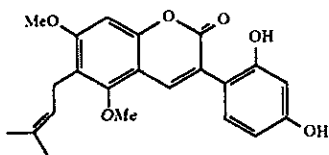
Los isoflavonoides se caracterizan, al igual que los flavonoides por poseer un esqueleto $Ar-C_3-Ar$, pero estos corresponden al tipo 1,2-diarilpropano. La diversidad estructural de este conjunto de compuestos es importante, junto a las isoflavonas (56), isoflavanonas (57), y 3-arilcumarinas (58); además de los rutenoïdes (59) los cuales se caracterizan por poseer un carbono adicional. En los vegetales gran parte de los isoflavonoides esta constituido por fitoaleinas, es decir las sustancias producidas por una planta en respuesta a una infección por un agente patógeno.



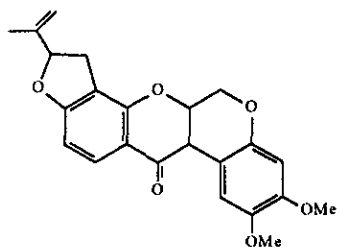
(56)



(57)



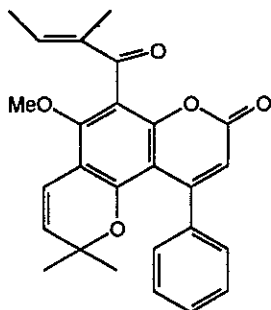
(58)



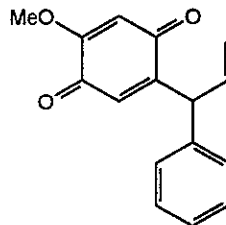
(59)

1,1-diarilpropanos

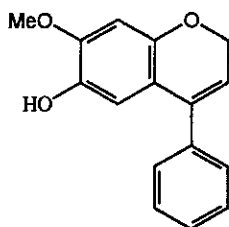
El término neoflavonoide se reserva a los compuestos de C_{15} , de tipo $Ar-C_3-Ar$, cuyo esqueleto base es el 1.1-difenilpropano. La diversidad estructural de estos compuestos es limitado, donde las 4-aryl-cumarinas (60), dalbergionas (61), neoflavenos (62) y 4-arylcrmanos (63), son ejemplos característicos de estos metabolitos .



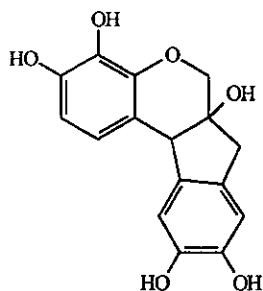
(60)



(61)

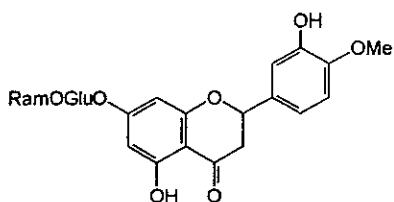


(62)

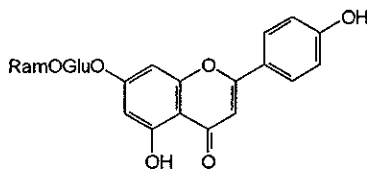


(63)

A pesar de la gran diversidad de los flavonoides, su presencia en los Rutales no es muy conocida, encontrándose hasta este momento únicamente dentro de algunos géneros de la rutáceas -*Citrus*, *Murraya*, *Micromelum* y *Melicope*-, las cuales producen flavanonas poli-oxigenadas, flavonas y flavanoles. En lo que respecta al género *Citrus*, se han aislado principalmente flavanonas tales como: hesperidina (64), diosmina (65), acompañadas de algunas flavonas como el diosmósido ^[22].



(64)



(65)

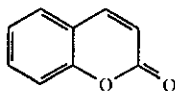
El papel fisiológico de los flavonoides no se conoce bien, sin embargo algunos son: antioxidantes, inhibidores enzimáticos, entre otras, como se indica en la tabla III.

TABLA III. Actividades biológicas de los flavonoides [17,22].

| TIPO | COMPUESTOS | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|----------------|---|--|
| Flavonoides | Polifenoles, Flavonoides, Antocianósidos, Oligómeros flavónicos | Antioxidantes, Inhibidores enzimáticos y propiedad vitamínica. |
| Isoflavonoides | Rutenoides. Rutenona, Isoflavonas | Insecticida y actividad estrogénica. |
| Neoflavonoides | Hematoxilina, Neoflavina | No presentan actividad biológica marcada |

CUMARINAS

El término cumarina se aplica a un gran número de compuestos que presentan como esqueleto base al 2-H-1-benzopirán-2-ona (66).



(66)

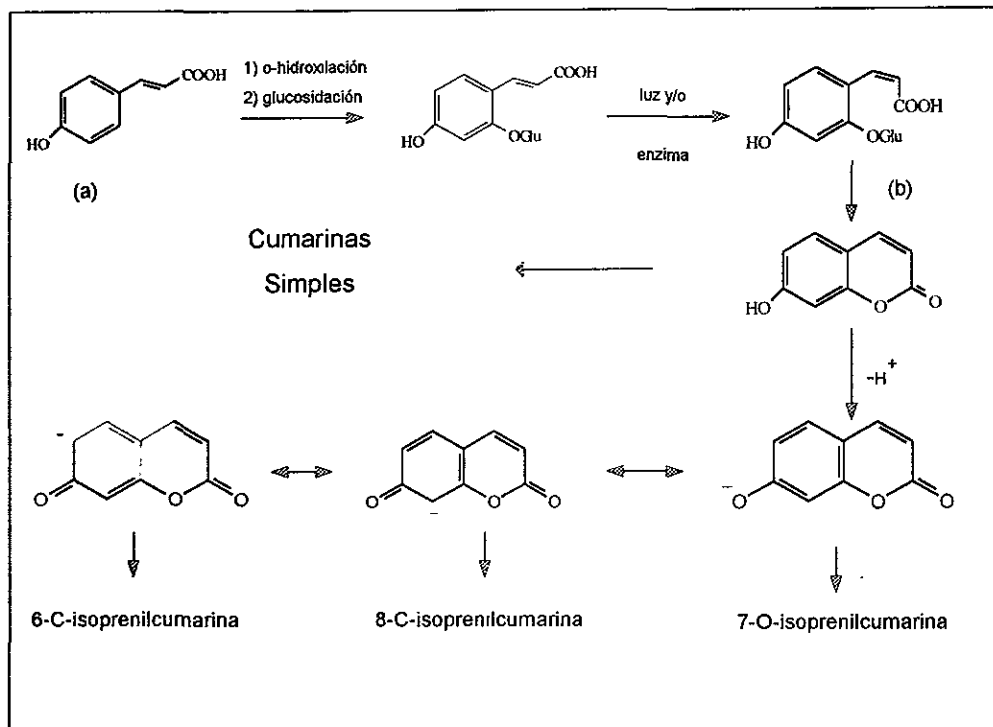
Sus estructuras son variadas; se conocen más de 800 cumarinas en los vegetales superiores. La mayoría de las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en las familias de las Leguminosas, Umbelífera y rutáceas, en esta última se han aislado estructuras más complejas.

La mayoría de las cumarinas aisladas en el orden de las Rutales se encuentran oxigenadas en la posición siete, lo que sugiere que los ácidos *trans* y *cis* *p*-cinámicos son los precursores de las cumarinas aisladas de la familia *Rutaceae*.

El ácido cinámico (a), formado de la deaminación de la fenilalanina sufre una oxidación en la posición *orto*, seguido de una glucosidación e isomerización al correspondiente ácido *cis* cinámico (b), tal como se indica en el esquema 3 ^[27].

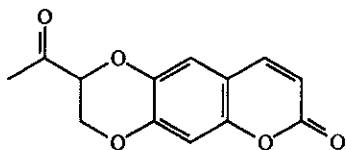
¹¹La mayoría de las cumarinas presentan fluorescencia azul cuando se les expone a la luz ultravioleta

Esquema 3. Origen de las cumarinas ⁽²⁷⁾.

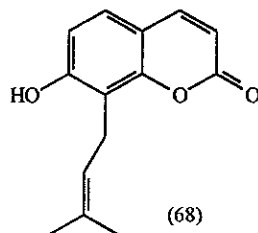


Un elemento estructural característico en las cumarinas de las rutáceas es la prenilación en C-6 o C-8 (67, 68). La cadena isoprenílica al ser muy reactiva, podrá estar epoxidada, monohidroxilada, dihidroxilada. El elemento isoprenílico también se encuentra en las cumarinas con estructuras más complejas, policíclicas, dihidrofurano, furanocumarinas⁽²⁾ (69,70), dihidropirano y piranocumarinas^(1 22 27).

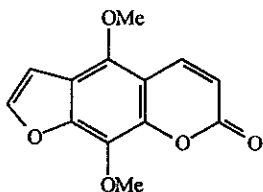
⁽²⁾ Las furanocumarinas presentan fluorescencia verde cuando se exponen a la luz ultravioleta



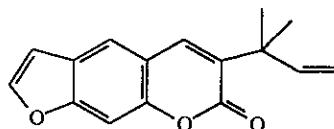
(67)



(68)



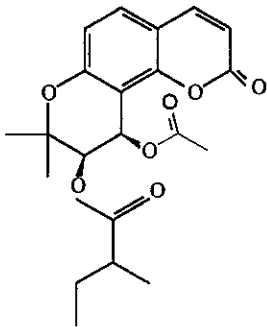
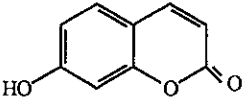
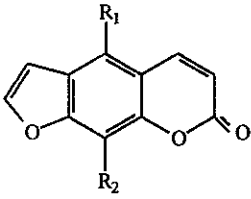
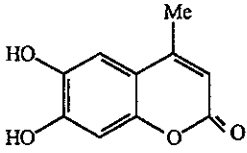
(69)



(70)

Sus propiedades farmacológicas se conocen parcialmente pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, pero se han encontrado que pueden exhibir efectos tóxicos en animales -efectos diuréticos, vasodilatadores y propiedades anticoagulantes- algunas otras pueden estimular el desarrollo de plantas o bien inhibir la germinación de las semillas como es el caso de las furanocumarinas. Algunos ejemplos de la actividad biológica de las cumarinas se indica en la tabla IV.

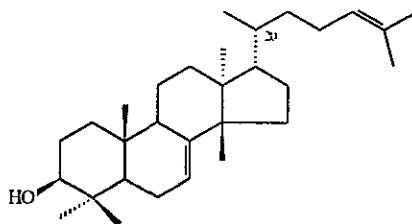
TABLA IV. Actividad biológica de cumarinas^[1,22,27].

| COMPUESTO | ESTRUCTURA | ACTIVIDAD BIOLÓGICA |
|---|---|--|
| Visnadina |  | Vasodilatador coronario |
| Umbeliferona |  | Efecto fototóxico y propiedad antibiótica. |
| Psoraleno (R ₁ =R ₂ =H) Bergapteno (R ₁ =OMe y R ₂ =H) Xantotoxina (R ₁ =H, R ₂ =OMe) |  | Efecto fototóxico |
| 4-metilesculetol |  | Venótico y protector vascular |

LIMONOIDES Y QUASINOIDES

Los limonoides son junto con los alcaloides derivados del ácido antranílico, los metabolitos más característicos de los Rutales; además de ser sustancias de gran interés, debido a su fascinante diversidad estructural y a su amplio espectro de actividad biológica.

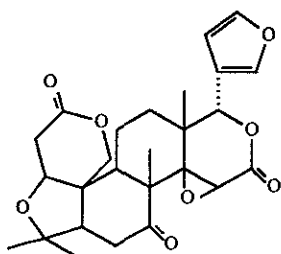
Los limonoides y quasinoideos se originan a partir de los triterpenos tetracíclicos tirucallol (71, 20S) y eufol (72, 20R), la amplia variedad estructural encontrada entre los limonoides es generalmente el producto de oxidaciones sucesivas que involucran la apertura de los anillos del triterpeno original.



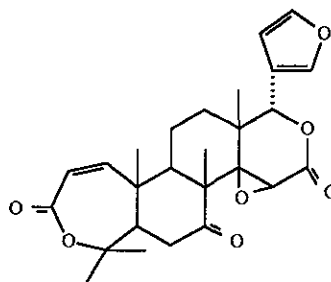
| |
|-----------|
| 71) 20(S) |
| 72) 20(R) |

Los limonoides se han aislado y caracterizado principalmente de las familias *Rutaceae*, *Meliceae* y *Simoroubaceae*, las cuales se encuentran relacionadas botánicamente.

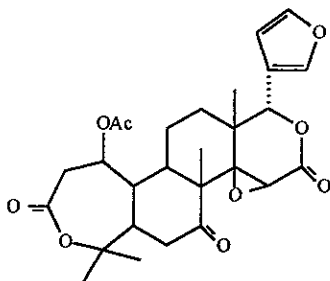
Las rutáceas son un grupo de plantas que tienen la capacidad de producir sustancias altamente oxidadas, y que estructuralmente presentan gran diversidad. En el caso de los limonoides, se ha encontrado una variación estructural más amplia y compleja en la familia *Meliceae* que en la familia *Rutaceae*, dentro de esta última se han aislado, limonina (73), obacunona (74) y nomilina (75) ^(22,28,29).



(73)



(74)

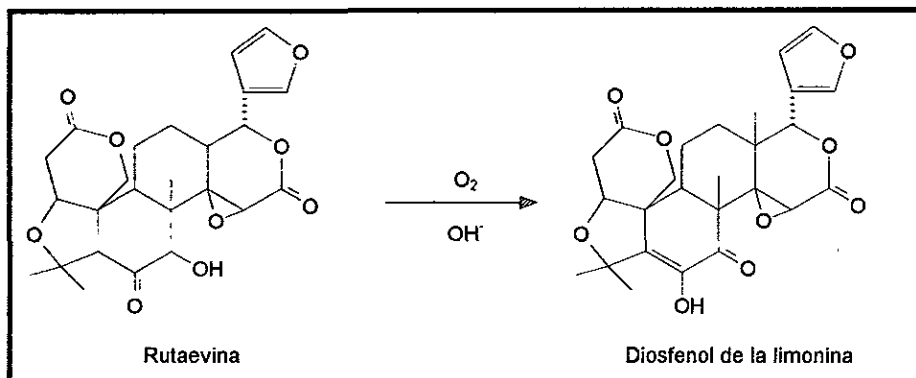


(75)

Por otro lado, se ha aislado el diosfenol de la limonina (76) y rutaevina (77) como metabolitos característicos de la subfamilia *Rutaceae*; las cuales representan un esqueleto base altamente oxidado.

La rutaevina contiene un grupo α -cetol, el cual puede fácilmente sufrir una oxidación (O_2 atmosférico) en medio básico, para generar el diosfenol de la limonina ^[30], ver figura 1.

Figura 1. Reacción de oxidación de la rutaevina en medio básico ^[30].

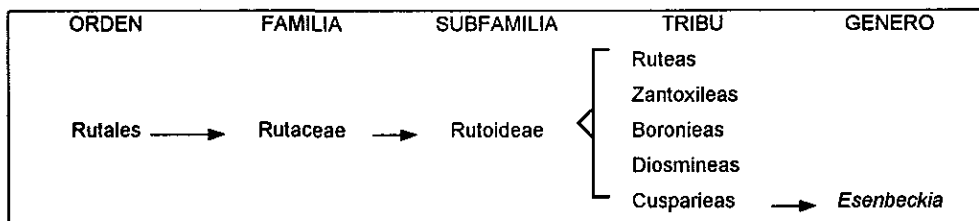


Generalidades sobre el género *Esenbeckia*

El conocimiento que se tiene sobre nuestra riqueza florística es aún muy deficiente y unilateral desde el punto de vista -químico, farmacológico, toxicológico, clínico, agronómico, entre otros-. Por lo anterior, ha resurgido el interés por el estudio de especies mexicanas, tal es el caso de las plantas pertenecientes al género *Esenbeckia*, el cual se haya ampliamente distribuido en todo el mundo; aproximadamente se han identificado 30 especies vegetativas, 17 de las cuales se localizan en México principalmente en la zonas selváticas y tropicales de los Estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas y Veracruz ^[31].

De acuerdo con Engler el género *Esenbeckia* se encuentra dentro de la tribu Cusparicas, un de las cinco tribus pertenecientes de la subfamilia Rutoideae, ver esquema 4 ^[2].

Esquema 4. Distribución del género *Esenbeckia* ^[2]



Las *Esenbeckias* son árboles o arbustos de 1 a 15 m de altura, con tronco de 5 a 50 cm de diámetro, hojas alternadas u opuestas, inflorescencia en forma de panícula, las flores presentan un diámetro de 5 a 7 mm con fruto capsulado ^[3].

Dentro del género *Esenbeckia*, se han aislado e identificado flavonoides, cumarinas, alcaloides, limonoides, entre otros constituyentes químicos. La distribución de los diferentes metabolitos secundarios encontrados en las Especies de *Esenbeckia* se enumeran en la tabla V.

TABLA V. Compuestos aislados del género *Esenbeckia*.

| ESPECIE | CONSTITUYENTE | REFERENCIA |
|--|---|------------|
| <i>E. febrifuga</i> (corteza) | Diosfenol de la limonina Flindersiamina Maculina Rutaevina Skimmianina | [32-33] |
| <i>E. hartmanii</i> (tallos) | Diosfenol de la limonina Limonina Maculosidina Rutaevina Skimmianina | [28] |
| <i>E. litoralis</i> (semillas) (cápsulas de semillas) | Bergapteno Isopimpinolina Kokusagina Limonina Rutaevina | [34] |
| <i>E. litoralis</i> (corteza) (hojas y tallo) | Alloimperatorina Felopterina 8-hidroxi bergapteno 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona Imperatorina Isopimpinolina Kokusagina | [34] |
| <i>E. litoralis</i> (raiz) | Bergapteno Dictamina Evolitrina Felopterina Imperatorina Kokusaginina Maculina Skimmianina | [34] |

CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | | |
|---|--|------|
| <i>E. berlandieri</i> (semillas) (cáscara de fruto) | Bergapteno Rutaevina | [34] |
| <i>E. flava</i> (partes aéreas) | Dictamina 3,3-diisopentenil-N-metil-2,4-quinoldiona Evolitrina Flindersiamina Maculosidina Rutaevina Skimmianina | [34] |
| <i>E. pilocarpoides</i> (raiz) | Flindersiamina 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona Isomaculina Kokusagina Kokusaginina Maculina | [35] |
| <i>E. nesiotica</i> (hojas y tallos) | (Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)- decaprenol β - epóxido del cariofileno Ester del β- sitosterol Fridelina Lupeol β- sitosterol (Z,Z,Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E,E)- tridecaprenol Clovandiol 1-(3-metil-butanoil)-3-geranil-floroglucinol 1-(2-metil-propanoil)-3-geranil-floroglucinol | [36] |
| <i>E. belizensis</i> (hojas y tallos) | (Z,Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E)- decaprenol β - epóxido del cariofileno Espatuleno Ester del β- sitosterol Flindersiamina Fridelina Kokusaginina Lupenona β- sitosterol | [37] |

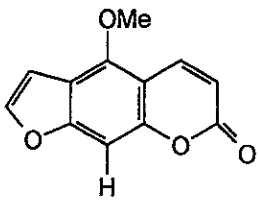
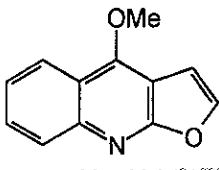
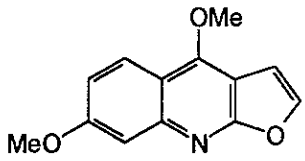
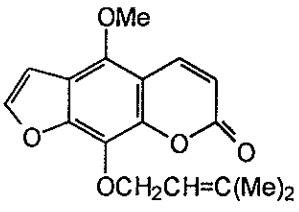
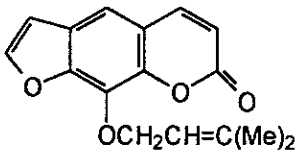
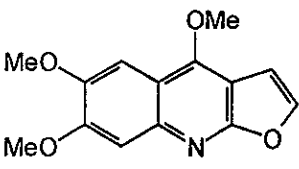
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| ESPECIE | CONSTITUYENTES | REFERENCIA |
|--|---|------------|
| <i>E. huertana</i> (hojas y tallos) | Bergapteno Criptomeridol β - epóxido del cariofleno Felopterina Fridelina Isopimpinelinea Lupeol Xantatoxina | [37] |
| <i>E. leiocarpa</i> (raiz) | Annonidina A Annonidina C Dictamina 1,4-dihidro-5-metoxi-1-metil-2-trideclquinolin-4-ona. 1,4-dihidro-1-metil- (3' pentil)- quinolin-4-ona. Flindersiamina 7-indolcarbaldehido 7-indolmetanol 5-isopentenilindol 6-isopentenilindol 7-isopentenilindol 4-isopreniloxi- <i>trans</i> -cinamato de metilo. Kokusaginina Leiocarpol Leiocarpatol A Leiocarpatol B Leiocarpona Maculina Marmesina 4-metoxi-2- (3' pentil)quinolina Sesamina | [38,39] |
| <i>E. pumilla</i> | Rutina | [40] |
| <i>E. berlandieri</i> ssp. <i>acapulcensis</i> (partes aéreas) | 5-hidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavonona. 5,7-dihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavonona. 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2",3"-dihidroxi-3"- metilpropil)-flavonona. | [41] |

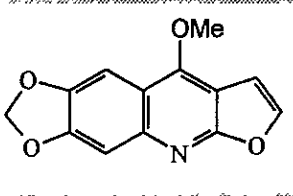
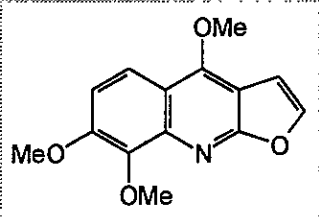
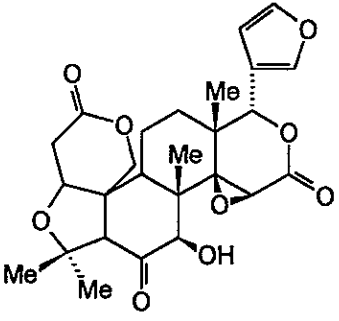
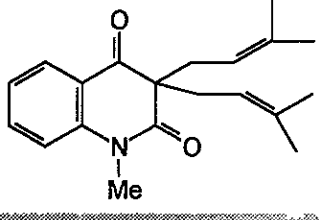
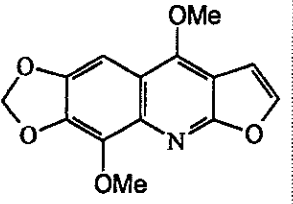
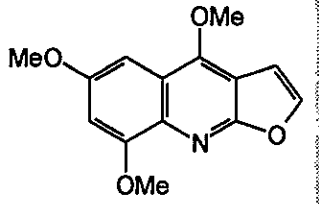
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| ESPECIE | CONSTITUYENTES | REFERENCIA |
|---|--|------------|
| | 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)- flavonona. Fridelina | |
| <i>E.berlandieri</i> ssp. <i>berlandieri</i> Baillon ex Hemsley | Fridelina β- sitosterol | [42] |
| <i>E. almawillia</i> | Isopimpinlina. 3-metoxi-4,5-Metilendioxicinamaldehido. 3-metoxi-4,5-metilendioxicinamato de metilo. 8-metoxi-1-metil-2-pentil-4-quinolona. 8-metoxi-1-metil-2-hexil-4-quinolona. 8-metoxi-1-metil-2-heptil-4-quinolona. | [43] |
| <i>E.berlandieri</i> ssp <i>acapulcensis</i> (Rose). | 7-metilglabranina. Glabranina. 5,7-dihidroxi-8-(3"-metil-2",3"-epoxibutano)-flavanona. 5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona. 5,7,4'-trihidroxi-8-(3",3"-dimetilalil)-flavanona. 5,7,4'-trihidroxi-8-(2",3",dihidroxi-3"-metilbutil)- flavanona. | [44] |
| <i>E.almawillia</i> (partes aéreas) | Flindersiamina. Maculosidina. 2(3'-metoxi-4,5-metilendioxfenil)-1-metilquinolin-4-ona. 8-metoxi-2(3'-metoxi-4,5-metilendioxfenil)-1- metilquinolin-4-ona. | [45] |
| <i>E.grandiflora</i> (raiz) | Pimpinlina. Xantatoxina. Kokusaginina. Maculina. Flindersiamina. 4-metoxi-1-metilquinolin-2-ona. Chalepina 3-(1',1'-dimetilalil)columbianitina | [45] |

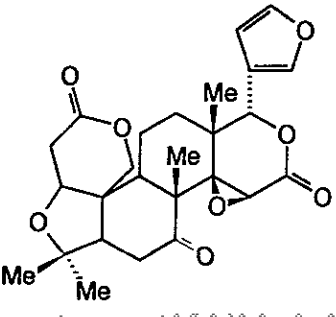
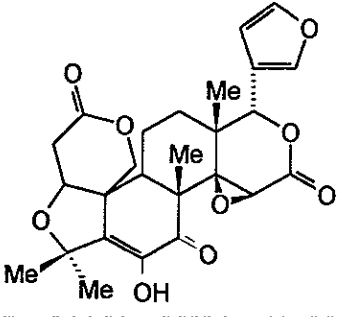
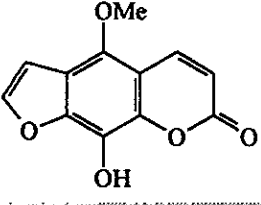
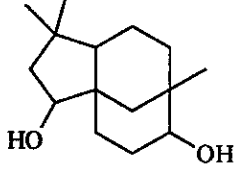
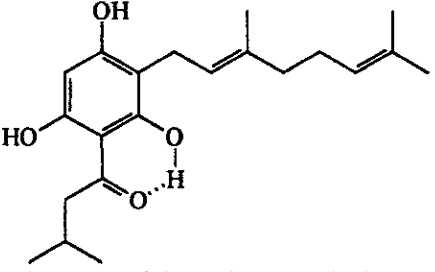
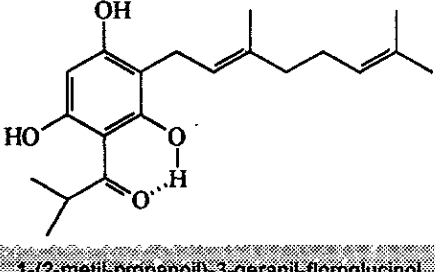
CONTINUACION DE LA TABLA V. Compuestos aislados del género *Esenbeckia*.

| | |
|---|---|
|  <p>Bergapteno</p> |  <p>Dictamina</p> |
|  <p>Evolitrina</p> |  <p>Felopterina</p> |
|  <p>Imperatorina</p> |  <p>Kokusaginata</p> |

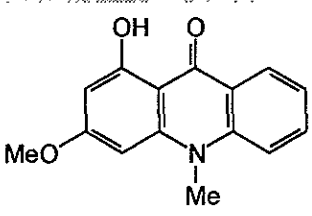
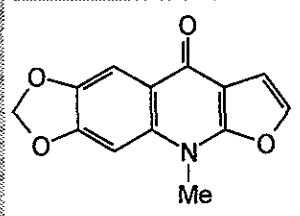
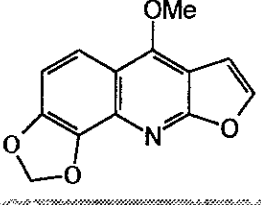
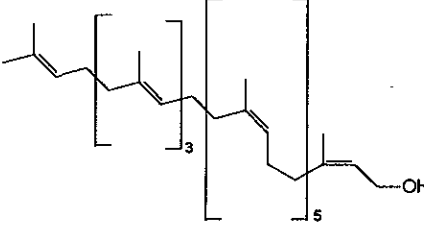
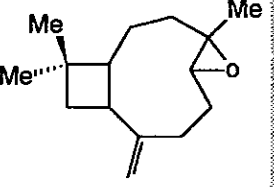
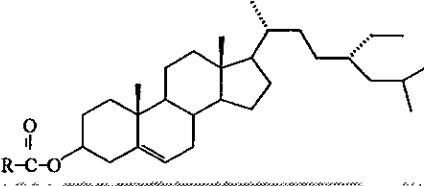
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|---|
|  <p>Maculina</p> |  <p>Skimmianina</p> |
|  <p>Rutaevina</p> |  <p>3,3-disopentenil-N-metil-2,4-quinoldiona</p> |
|  <p>Flinderstamina</p> |  <p>Maculosidina</p> |

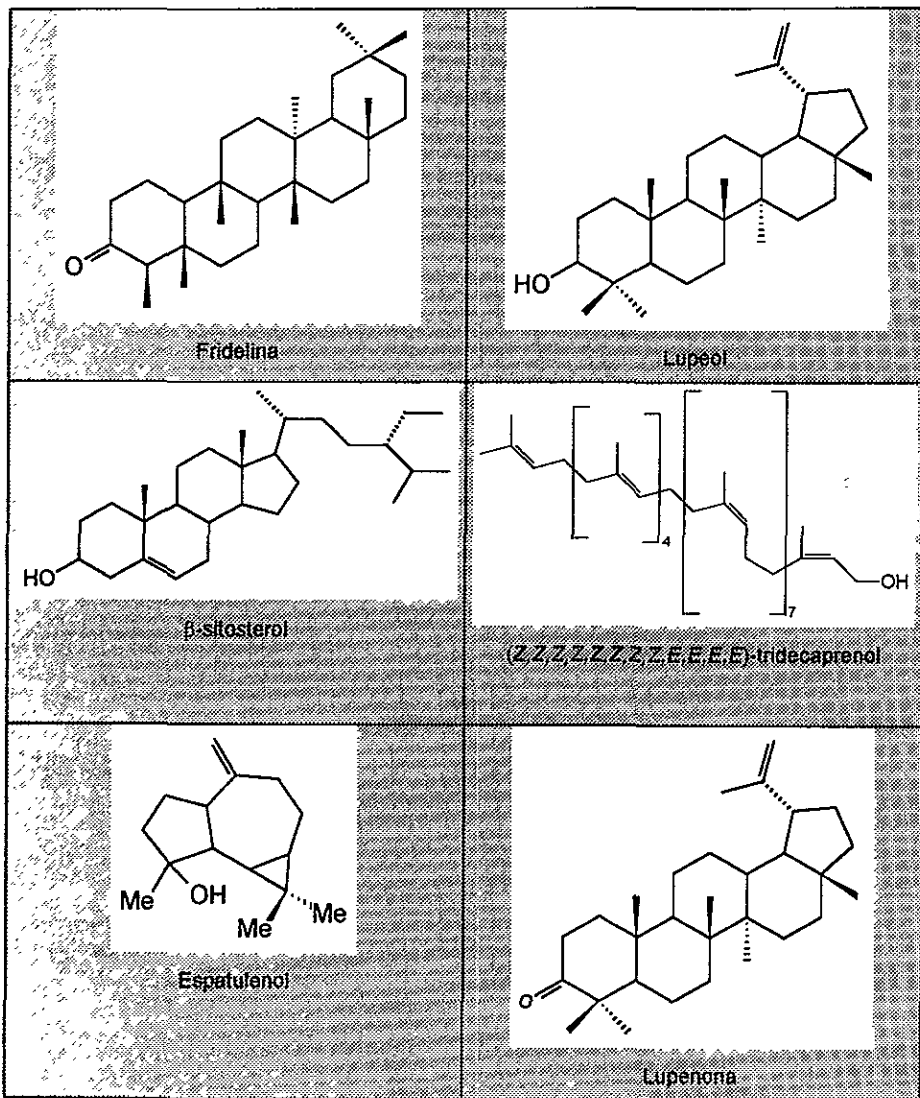
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|---|
|  <p>Limonina</p> |  <p>Diasterol de la limonina</p> |
|  <p>8-hidroxi bergapteno</p> |  <p>Clavandiol</p> |
|  <p>1-(3-metil-butanoil)-3-geranil-floroglucinol</p> |  <p>1-(2-metil-propanoil)-3-geranil-floroglucinol</p> |

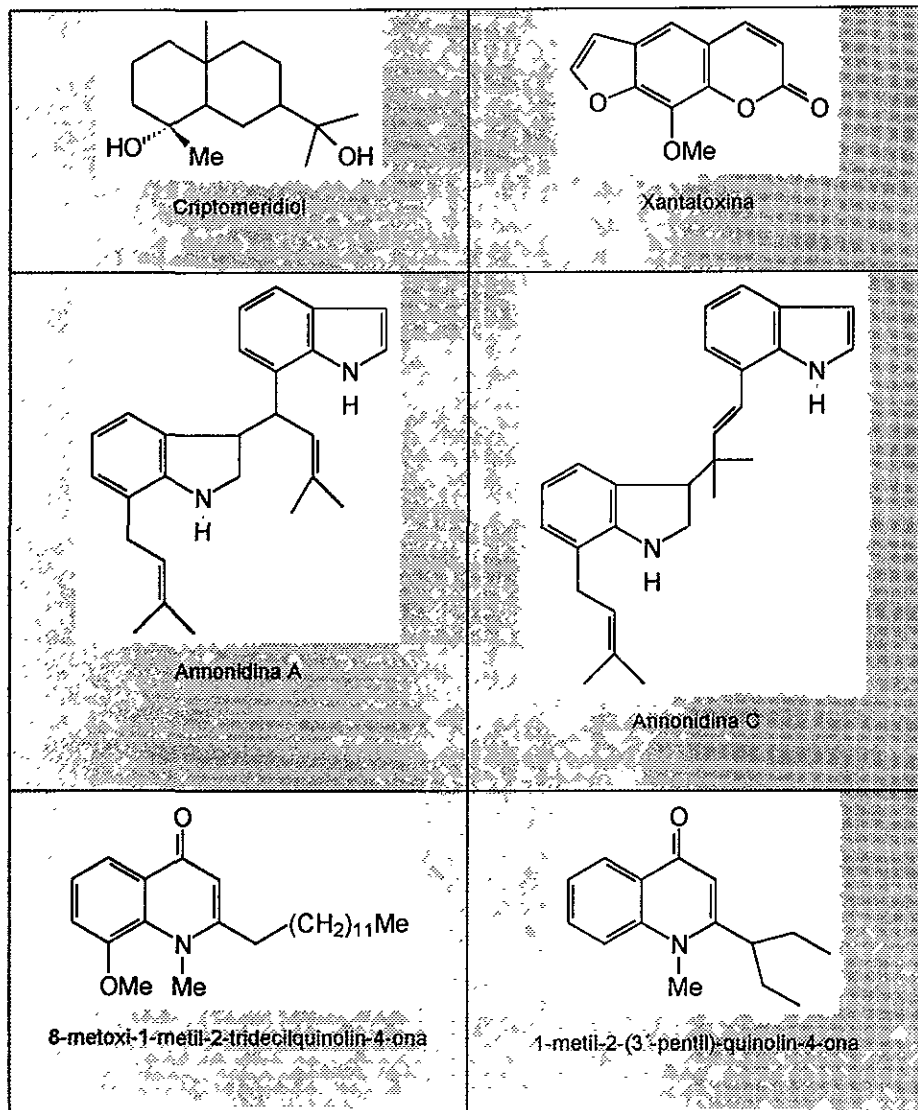
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|---|
|  <p>1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona</p> |  <p>isomaculina</p> |
|  <p>Kokusagina</p> |  <p>(Z,Z,Z,Z,Z,E,E,E) decaprenol</p> |
|  <p>β-epóxido del canfileno</p> |  <p>Ester del β-sitosterol</p> |

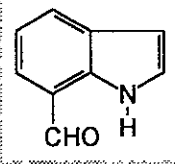
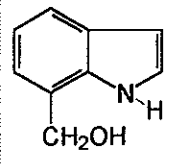
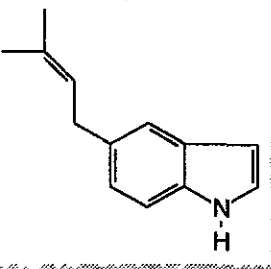
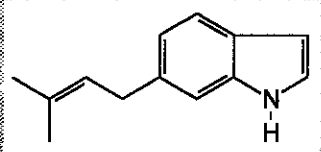
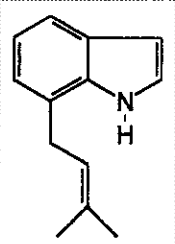
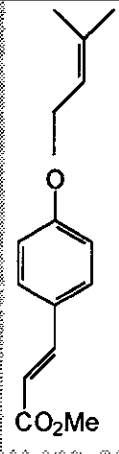
CONTINUACION DE LA TABLA V.



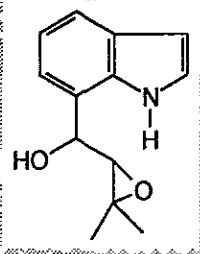
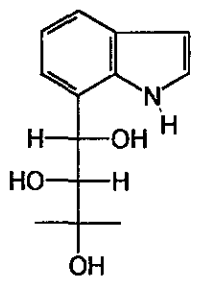
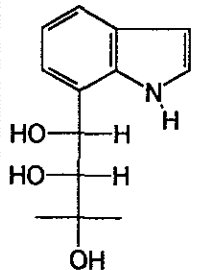
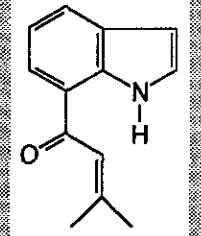
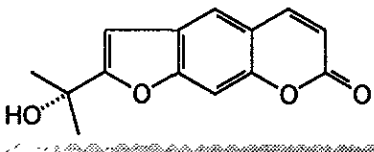
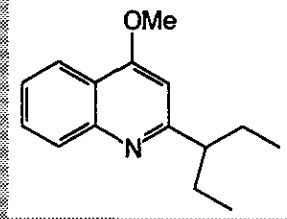
CONTINUACION DE LA TABLA V.



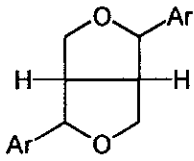
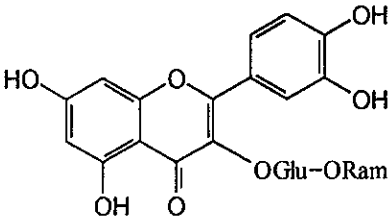
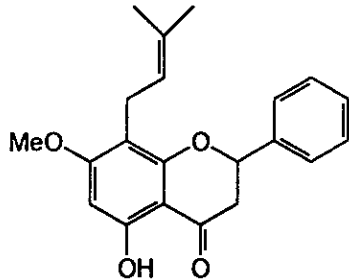
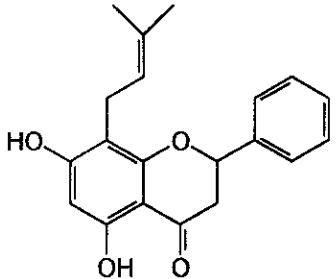
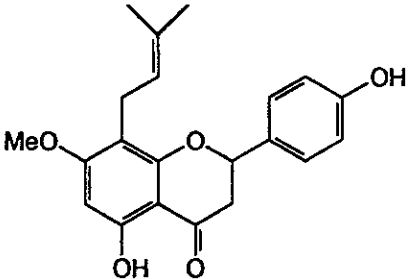
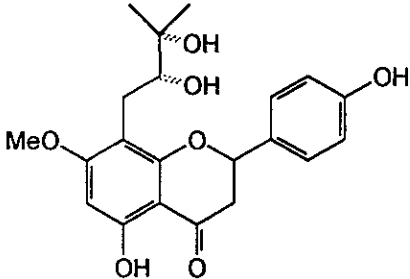
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|--|--|
|  <p>7-indolcarbaldehído</p> |  <p>7-indolmetanol</p> |
|  <p>5-isopentenilindol</p> |  <p>6-isopentenilindol</p> |
|  <p>7-isopentenilindol</p> |  <p>4-isopreniloxi-<i>trans</i>-cinamato de metilo</p> |

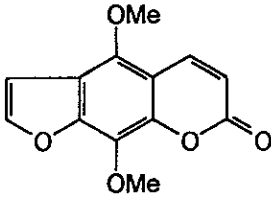
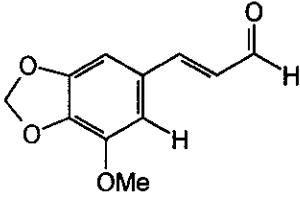
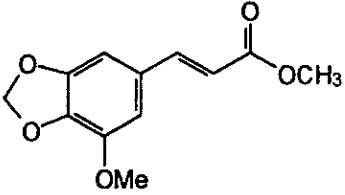
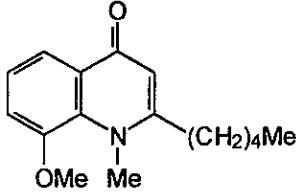
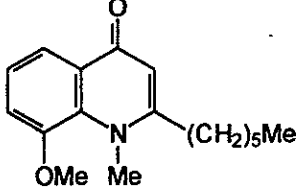
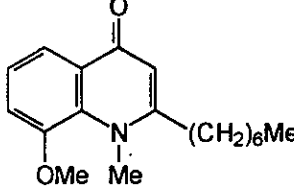
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|--|
|  <p>Leiocarpol</p> |  <p>Leiocarpatriol A</p> |
|  <p>Leiocarpatriol B</p> |  <p>Leiocarpona</p> |
|  <p>Marmesina</p> |  <p>4-metoxi-2-(3-pentil)-quinolina</p> |

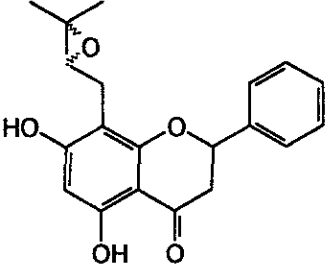
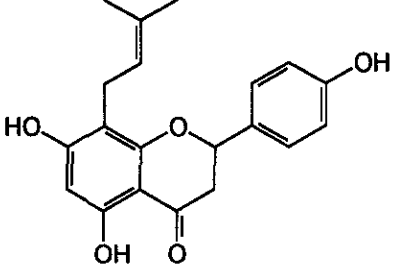
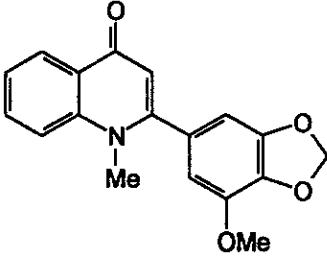
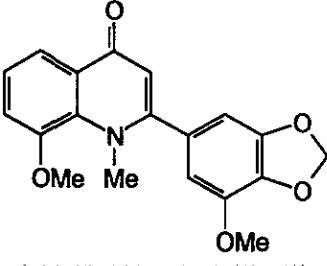
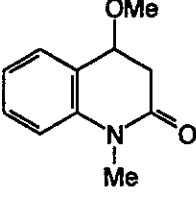
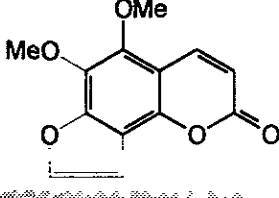
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|---|
|  <p>Sesamina</p> |  <p>Rutina</p> |
|  <p>5-hidroxi-7-metoxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona</p> |  <p>5,7-dihidroxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona</p> |
|  <p>5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(3',3'-dimetilalil)-flavanona</p> |  <p>5,4'-dihidroxi-7-metoxi-8-(2',3'-dihidroxi-3-metilbutil)-flavanona</p> |

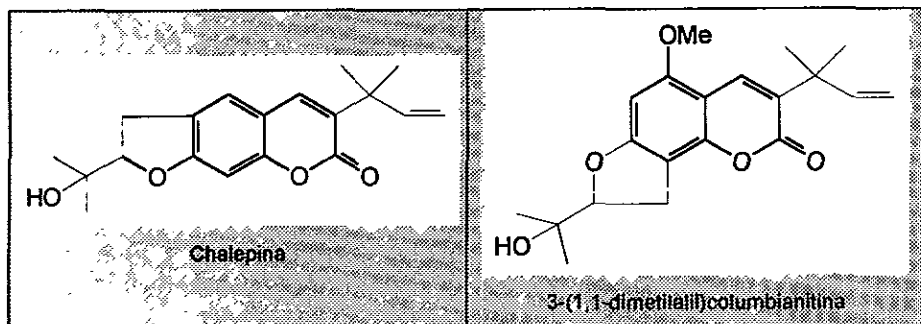
CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|--|--|
|  <p>Isopimpinina</p> |  <p>3-metoxi-4,5-metilendioxicinamaldehido</p> |
|  <p>3-metoxi-4,5-metilendioxicinamato de metilo</p> |  <p>8-metoxi-1-metil-2-pentil-4-quinolona</p> |
|  <p>8-metoxi-1-metil-2-hexil-4-quinolona</p> |  <p>8-metoxi-1-metil-2-heptil-4-quinolona</p> |

CONTINUACION DE LA TABLA V.

| | |
|---|--|
|  <p>5,7-dihidroxi-8-(3'-metil-2'',3'-epoxibutil)-flavanona</p> |  <p>5,7,4'-trihidroxi-8-(3'',3''-dimetilalil)-flavanona</p> |
|  <p>2-(3'-metoxi-4,5-metilendioxfenil)-1-metilquinolin-4-ona.</p> |  <p>6-metoxi-2-(3'-metoxi-4,5-metilendioxfenil)-1-metilquinolin-4-ona.</p> |
|  <p>4-metoxi-1-metilquinolin-2-ona</p> |  <p>Pimpinellina</p> |

CONTINUACION DE LA TABLA V.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al hablar sobre la vegetación en nuestro país, es importante mencionar que se considera una de las más diversificadas y abundantes del mundo. Sin embargo, el conocimiento sobre este recurso es muy deficiente todavía en sus aspectos básicos, donde cabe mencionar que la descripción botánica de algunas especies vegetales mexicanas se encuentran aún en proceso.

El conocimiento sobre la estructura molecular de los metabolitos secundarios, formación, reactividad química, y el papel que juegan en la naturaleza. Además, si consideramos la importancia que presenta con fines industriales (farmacéutico, alimenticio, agroquímico, cosmético, entre otros.), se puede llegar a visualizar la importancia que reviste el estudio químico de las plantas originarias de México.

Con base en lo anterior, se realizó el estudio químico de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y de las semillas de *Esenbeckia huertana*; con la finalidad de aislar y determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en dichos vegetales. Los resultados que se deriven del presente proyecto podrán integrarse a los ya informados en la literatura, para así poder diseñar un perfil químico para dicho género, del cual se conoce muy poco sobre su composición química, evaluación farmacológica y toxicológica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar y caracterizar a los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto hexánico y extracto acetónico de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y del extracto etanólico de las semillas de *Esenbeckia huertana*, con la finalidad de diseñar un perfil químico para el género *Esenbeckia*, y así contribuir al conocimiento sobre la constitución química de la flora mexicana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Recolección, clasificación e identificación de *Esenbeckia xochipala* y *Esenbeckia huertana*, con la ayuda y orientación de un botánico.
- 2.- Preparar los extractos crudos a partir de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y de las semillas de *Esenbeckia huertana*.
- 3.- Aislar y purificar los metabolitos mayoritarios presentes en los diferentes extractos crudos, por medio de la aplicación de técnicas convencionales de laboratorio.
- 4.- Identificar las sustancias aisladas de *Esenbeckia xochipala* y *Esenbeckia huertana* por técnicas espectroscópicas (UV, IR, RMN ^1H y ^{13}C), espectrométricas (EM), así como por propiedades físicas (pf. R_f, solubilidad, entre otras).
- 5.- Analizar los resultados obtenidos del estudio químico de *Esenbeckia xochipala* y *Esenbeckia huertana*, para incorporarlos a los ya existentes, y poder delinear el perfil químico de dicho género.

HIPOTESIS

La familia Rutaceae se caracteriza por biosintetizar metabolitos secundarios que pueden ser divididos en los siguientes grupos: a) alcaloides (derivados del ácido antranílico, de la fenilalanina, del carbazol, del imidazol y los indolalcaloides), b) cumarinas (furanocumarinas y cumarinas preniladas), c) flavonoides libres y en forma de glucósido, d) cromonas y acetofenonas y e) triterpenos tetracíclicos altamente oxidados (limonoides y quasinooides). Entonces por medio de la aplicación de técnicas convencionales de extracción y purificación; así como de las técnicas que ayuden a su identificación y caracterización, se podrá determinar la composición química de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala* y de las semillas de *Esenbeckia huertana*, con la finalidad de generar los conocimientos que integrados a los informados en la literatura química, permitan delinear el perfil químico de este grupo de plantas.

METODOLOGIA

MATERIAL

- Columnas para cromatografía de diferentes tamaños y diámetros.
- Equipo de destilación (simple y fraccionada).
- Cámaras de elución de 100 y 500ml.
- Matraz Erlenmeyer diferentes capacidades.
- Vasos de precipitado diferentes capacidades.
- Pipetas graduadas, volumétricas y Pasteur
- Embudos Büchner.
- Matraz balón.
- Probetas de diferentes capacidades.
- Soporte universal.
- Baño de vapor .
- Equipo básico de laboratorio de química orgánica.

EQUIPO E INSTRUMENTO

- Balanza analítica Ainsworth modelo 100A.
- Rotavapor Büchi R-124.
- Lámpara de luz UV (listed INSA & MEAS 399-J)
- Aparato Fisher -Johns.
- Espectrofotómetro de masas Hewlett Packard 5985 GC/MS system 70eV.
- Espectrofotómetro de IR Perkin-Elmer mod. 283 y 681.
- Espectrómetro de RMN Varian VXR-300S.

- Balanza granataria OHAUS serie 700-800.
- Balanza semianalítica OHAUS MOD. E-400.

SUSTANCIAS

DISOLVENTES

Acetato de etilo (grado técnico)
Hexano (grado técnico)
Eter etílico (grado técnico)
Cloroformo (grado analítico)
Diclorometano (grado analítico)
Acetona (grado técnico)
Metanol (grado analítico)
Etanol (grado analítico)
Acetonitrilo (grado analítico)
n-propanol (grado analítico)

REACTIVOS

Acido clorhídrico
Piridina
Bicarbonato de sodio (solución saturada)
Cloruro de tosilo
Diazald
Hidróxido de potasio (KOH)
Sulfato cérico amoniacal
Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
Silica gel 60F254
Celita
Carbón activado.

PARTE EXPERIMENTAL

A. Extracto acetónico de *Esenbeckia xochipala*

A partir de las partes aéreas de *Esenbeckia xochipala*, se realizaron extracciones sólido -líquido con acetona, dicho extracto se concentró en un rotavapor para así obtener el extracto acetónico. Para la separación de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Esenbeckia xochipala* se procedió de la siguiente manera: 71.15 g del extracto acetónico se adsorbieron en 125.84 g de celita, y se aplicaron en una columna de vidrio de 47 cm de largo y 8.8 cm de diámetro, empacada con 495 g de Sílica Gel 60GF₂₅₄ (Merck), por vía seca con ayuda del vacío [46]. La elución de la columna se llevó a cabo con n-hexano, mezclas de n-hexano-acetato de etilo y acetato de etilo- acetona de polaridad creciente, obteniéndose un total de 453 fracciones de 500 ml cada una

De los eluatos 42-49 (aguas madres) y 50-59 obtenidos al eluir la columna con n-hexano, cristalizó espontáneamente un sólido blanco, soluble en acetato de etilo y cloroformo e insoluble en n-hexano, el cual después de haber sido recristalizado por par de disolventes, se obtuvieron 10mg (0.014%) de un sólido cristalino de pf. 249-251C°. Su identificación y caracterización se realizó mediante sus datos espectroscópicos y espectrométricos; así como, por cromatografía en capa fina, empleando como referencia una muestra auténtica de fridelina.

Fórmula Molecular C₃₀H₅₀O

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 1) cm⁻¹: 2926, 2854, 1724, 1457, 1377, 1123, 1074 y 1022.

RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 2), δ0.72 (s, 3H, CH₃-27), δ0.85 (d, 3H, CH₃-23), δ0.87 (s, 3H, CH₃-30), δ0.90 (s, 3H, CH₃-29), δ0.95 (s, 3H, CH₃-24), δ1.0, 1.8 y 1.25 (s, 9H, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-28), δ2.25 (c, J=7 Hz, 1H, H-4), δ2.42 (dd, J=5 Hz y 2 Hz, 1H, H-2), δ2.38 (dd, J=5 Hz y 2 Hz, 1H, H-2).

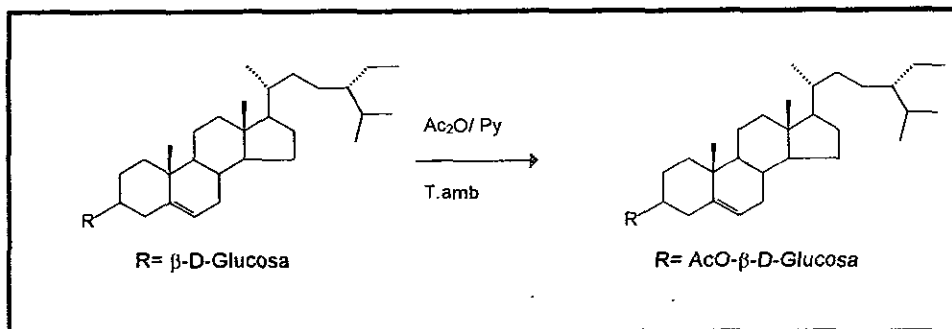
RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ213.19 (s, C-3), δ59.47 (d, C-10), δ58.22 (d, C-4), δ53.10 (d, C-8), δ42.79 (d, C-18), δ41.54 (t, C-2), δ38.31 (s, C-13), δ37.45 (s, C-9), δ36 (t, C-16), δ35.63 (t, C-11), δ35.35 (t, C-19), δ35 (q, C-30), δ32.78 (t, C-21), δ32.43 (t, C-12), δ32.10 (q, C-28), δ31.79 (q, C-29), δ30.52 (t, C-15), δ30.01 (s, C-17), δ28.19 (s, C-20), δ22.31 (t, C-1), δ20.29 (q, C-27), δ18.7 (q, C-26), δ18.26 (t, C-7), δ17.97 (q, C-25), δ14.68 (q, C-24), δ6.86 (q, C-25).

EM (I.E, 70 eV) m/z: 426 (M⁺, 29%), 411 (M⁺-CH₃, 7.4%), 302 (16%), 274 (22%), 273 (37%), 246 (25%), 231 (25%), 218 (29%), 205 (24%), 191 (30%), 179 (32%), 164 (36%), 125 (59%), 123 (60%), 121 (40%), 109 (77%), 107 (49%), 96 (52%), 95 (100%), 81 (60%), 79 (36%), 69 (96%), 67 (62%), 55 (93%), 43 (33%), 41 (53%).

De las fracciones (324-333), obtenidas al eluir la columna con una mezcla de hexano-acetato de etilo de (2:8) y acetato de etilo (100%) respectivamente, se separaron por filtración a gravedad 150 mg (0.21%) de un sólido blanco recristalizado en una mezcla metanol-etanol (1:1); el sólido fue insoluble en metanol, etanol, hexano, acetato de etilo y cloroformo, con punto de fusión de 239-245°C. Su identificación se logró por medio de cromatografía en capa fina (n-hexano-acetato de etilo 8:2) empleando como referencia una muestra del β-D-glucósido-β-sitosterol.

IR ν_{\max} (KBr, espectro 3) cm⁻¹: 3404, 2959, 2906, 1632, 1464, 1379 y 1075.

Basándose en el análisis de su espectro infrarrojo, que muestra la ν (OH) en 3404 cm^{-1} y la dificultad de manipulación de dicho sólido se procedió a la obtención de su derivado acetilado, para lo cual se hicieron reaccionar 100 mg del sólido en 2 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina, a temperatura ambiente y con agitación constante durante 90 minutos.



El curso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina, una vez concluida la reacción se adicionaron 5ml de agua fría, para proceder a la recuperación del producto de reacción. A la mezcla de reacción obtenida se le hicieron tres extracciones con acetato de etilo (cada una de 5 ml); la fase orgánica resultante fue tratada con una solución de ácido clorhídrico al 10% (3x3ml), para eliminar la piridina en forma de clorhidrato de piridinio, cualquier traza de ácido en la fase orgánica fue suprimida al agregar una solución saturada de bicarbonato de sodio (3x3 ml), para finalmente la fase orgánica lavarla con 3ml de agua, procediendo a continuación al secado y concentración de la misma sobre sulfato de sodio anhidro y a baja presión. obteniéndose 92mg (71.3%) de un sólido cristalino amarillo, de punto de fusión $165\text{-}167^{\circ}\text{C}$, soluble en cloroformo, acetato de etilo e insoluble en hexano. Sus datos espectroscópicos y espectrométricos se indican a continuación.

Fórmula Molecular $C_{43}H_{67}O_{10}$

IR ν_{max} ($CHCl_3$, espectro 4) cm^{-1} : 2971, 2957, 2909, 1755, 1466, 1377 y 1038.

Datos de RMN¹H (300 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 5): δ 0.67 (s, 3H), δ 0.85 (d, J=7 Hz, 6H), δ 0.93 (dd, J=7 Hz, 3H), δ 0.98 (s, 3H), δ 3.50 (m, 1H), δ 5.36 (d, J=8 Hz, 1H), δ 4.96 (d, J=8 Hz, 1H), δ 4.98 (dd, J=10 Hz y 8 Hz, 1H), δ 5.21 (t, J=10 Hz, 1H), δ 5.08 (t, J=10 Hz, 1H), δ 3.68 (ddd, J=10.5 Hz y 2 Hz, 1H), δ 4.22 (dd, J=10 Hz y 5 Hz, 1H), δ 4.11 (dd, J=10 Hz y 2 Hz, 1H), y δ 2.00 - 2.07 (4s, 12H)

Además de los compuestos ya mencionados, se aislaron tres sólidos adicionales del extracto acetónico, de los cuales se tienen los siguientes datos:

De las fracciones 66-70, obtenidas al eluir la columna con n-hexano (100%), se obtuvo un sólido blanco por decantación 49mg (0.069%), el sólido es insoluble en hexano y soluble en cloroformo, de punto de fusión 78-79°C, los datos de su análisis espectroscópico se enuncian a continuación:

Fórmula Molecular $C_{30}H_{52}O$.

IR ν_{max} ($CHCl_3$, espectro 6) cm^{-1} : 3599, 2928, 2855, 1728, 1515, 1466, 1387, 1171, y 1022.

RMN¹H (200 MHz, $CDCl_3$, TMS, espectro 7): δ 0.80 (t, J=4.6 Hz, 3H, CH_3), δ 1.17 (s, $-CH_2$), δ 1.55 (q, J=5 Hz, 2H, $-CH_2$) y δ 2.26 (t, J=5 Hz, 2H, CH_2OH).

Del análisis de su espectro de IR, se observó la presencia de un grupo hidroxilo ν (OH) en 3599 cm^{-1} , por lo que se procedió a obtener su derivado acetilado, para lo cual se hicieron reaccionar 24.5 mg de materia prima en 2 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina a temperatura ambiente durante dos horas y media. El producto acetilado 17 mg (58.38%), resultó ser soluble en cloroformo, acetato de etilo e insoluble en acetona. con pf. 70-71°C.

IR ν_{\max} (CHCl₃, espectro 8) cm⁻¹: 2955, 2917, 2849, 1742, 1473, 1241, 1041, 729 y 719.

RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS, espectro 9): δ 0.85 (t, 3H, CH₃), δ 1.25(s, -CH₂), δ 1.61 (m), δ 2.04 (s, 3H), δ 4.02 (t, 2H).

EM (I.E, 70eV) m/z: 480 (12.1%), 420 (17%), 392 (10.2%), 153 (10.2%), 125 (25.2%), 111 (44.2%), 97 (71.6%), 69 (67.5%), 57 (100%) y 43 (93.6%).

De los eluatos 88-103 decolorados⁽³⁾, se obtuvieron 25mg (0.035%) de un sólido amarillo por filtración a vacío, al sólido se le hicieron tres lavados con acetona para eliminar las impurezas; ésta sustancia es soluble en acetato de etilo, cloroformo, hexano e insoluble en acetona y metanol, con pf. 75-77°C.

Su espectro de IR en disolución muestra las bandas en 3691, y 3606 cm⁻¹, lo que permite suponer que la molécula presenta varios grupos hidroxilos, tomando cuenta esto, se realizó una reacción de acetilación para obtener el producto acetilado de dicho compuesto, para este fin se hicieron reaccionar 25 mg del sólido con 2 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina a temperatura ambiente durante 4 horas, el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina. El producto acetilado 17 mg (57%), fue soluble en cloroformo, acetato de etilo e insoluble en acetona y presenta un punto de fusión de 70-71°C.

⁽³⁾Decoloración Se montó una columna de vidrio previamente empacada con algodón desengrasado, celita y carbón activado en relación 3 y 1 respectivamente por gramo de extracto. Una vez empacada la columna se le hizo pasar varias veces volúmenes pequeños de etanol caliente (generalmente tres veces) y finalmente el residuo previamente disuelto en acetato de etilo, el curso de la decoloración fue seguido por ccf

B. Extracto hexánico de *Esenbeckia xochipala*

A partir de las fracciones 121-140, obtenidas del extracto hexánico de *Esenbeckia xochipala*, se aisló un sólido blanco cristalino soluble en acetato de etilo y cloroformo e insoluble en n-hexano con punto de fusión 245-247°C, fue identificado como la fridelina, triterpeno pentacíclico que ha sido aislado previamente de *Esenbeckia nesiotica*; *Esenbeckia beliszencis* y *Esenbeckia berlandieri ssp berlandieri*, sus datos espectroscópicos y espectrométricos ya fueron descritos anteriormente, en pagina 60.

De los eluatos 33-41 y 141-153 se obtuvo un sólido cristalino el cual fue recrystalizado mediante par de disolventes (acetato de etilo-etanol), esta sustancia es soluble en hexano, cloroformo y acetato de etilo y presentó pf. 135°C.

Fórmula Molecular $C_{29}H_{49}O$

IR ν_{max} (CHCl₃, espectro 10) cm^{-1} : 3609, 3955, 2869, 1464, 1380, 1044, 957 y 840.

RMN¹H (300MHz, CDCl₃, TMS, espectro 11), δ 0.68 (s, 3H, 18-CH₃), δ 1.01 (s, 3H, 19-CH₃), δ 0.85 (t, J=7 Hz, 3H, 29-CH₃), δ 0.92 (d, J=7 Hz, 3H, 21-CH₃), δ 0.85 (d, =7 Hz, 6H, 26 y 27-CH₃), δ 5.4 (dd, J=6.6 Hz, 1H, 6-H), δ 3.5 (dddd, J=11 Hz y 6 Hz, 1H, 3-H).

EM (I.E.) m/z: 414(M⁺), 339 (27.16%), 303 (22.22%), 73 (29.98%), 255 (23.4%), 213 (32.10%), 163 (22.22%), 161 (24.69%), 159 (27.16%), 145 (37.04%), 107 (50.62%), 97 (34.57%), 91 (51.85%), 64 (49.38%), 43 (100%), 40 (32.10%).

C. Extracto etanólico de *Esenbeckia huertana*

De las semillas de *Esenbeckia huertana*, se realizaron extracciones sólido-líquido con etanol, dicho extracto se concentró en un rotavapor para así obtener el extracto etanólico. La separación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo en una columna de vidrio con diámetro interno de 6 cm empacada con una altura de 12 cm de silica gel para cromatografía en capa fina, en la columna se aplicaron 63.4g de extracto etanólico adsorbidos con 68.4g de celita. La elución de la columna se inició con cloroformo aumentando la polaridad con mezclas cloroformo-acetato de etilo hasta finalizar con acetato de etilo puro, del fraccionamiento se obtuvieron 474 eluatos de 200 ml cada uno, el monitoreo de la cromatografía en columna se siguió por cromatografía en capa fina.

De las fracciones 209-216 se aislaron 214.6 mg de un sólido blanco soluble en etanol e insoluble en éter isopropílico y hexano, con pf. 232-233°C, al sólido se le realizó una cromatografía en capa fina empleando como revelador el reactivo de Ehrlich⁽⁴⁾, reactivo con el que revela color naranja. Sus datos espectroscópicos se indican a continuación.

Fórmula Molecular $C_{26}H_{30}O_8$

IR ν_{max} (CHCl₃, espectro 12) cm⁻¹: 3064, 2958, 1753, 1284 y 1028.

⁽⁴⁾ Preparación del reactivo de Ehrlich Se pesaron 5g de *p*-dimetilaminobenzaldehído y se disolvieron en etanol al 5%.

RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, TMS, espectro 14): δ1.30, 1.18, 1.78 y 1.08 (s, 12H), δ2.23 (dd, J=15.9 y 3 Hz, H-5), δ2.47 (dd, J=14.7 y 3.5 Hz, H_{ec}-6), δ2.58 (dd, J=12.2 y 3 Hz, H-9), δ2.68 (dd, J=16.7 y 2.1 Hz, H_{ec}-2), δ2.86 (t, J=15.5 Hz, H_{ax}-6), δ2.98 (dd, J=16.8 y 3.9 Hz, H_{ax}-2), δ4.04 (s, H-1 y H-15), δ4.47 (d, J=13.2 Hz, H_{ec}-19), δ4.77 (d, J=13.2 Hz, H_{ax}-19), δ5.47 (s, H-17), δ6.34 (dd, J=1.35 y 0.9 Hz, H-22) y δ7.41 (s, H-21 y H-23).

RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, TMS espectro 15): δ77.8 (d, C-1), δ36.4 (t, C-2), δ166.6 (s, C-3), δ80.3 (s, C-4), δ53.9 (d, C-5), δ35.7 (t, C-6), δ206.1 (s, C-7), δ45.9 (s, C-8), δ48.1 (d, C-9), δ51.3 (s, C-10), δ18.9 (t, C-11), δ30.8 (t, C-12), δ37.9 (s, C-13), δ65.7 (s, C-14), δ60.6 (s, 15), δ169.1 (s, C-16), δ79.2 (d, C-17), δ21.4 (c, C-18), δ65.3 (t, C-19), δ119.9 (s, C-20), δ141.1 (d, C-21), δ109.6 (d, C-22), δ143.2 (d, C-23), δ17.6 (c, C-24), δ20.7 (c, C-25) y δ30.2 (c, C-26).

**RESULTADOS Y ANALISIS DE
RESULTADOS**

TABLA VI. Rendimientos, Solubilidad y Punto de Fusión de los Compuestos Aislados.

| EXTRACTO ACETONICO DE <i>Esenbeckia xochipala</i> | | | | |
|--|--|---------------------|------------|---|
| ELUATOS | COMPUESTO | RENDIMIENTO | Pf. | SOLUBILIDAD |
| 42-49 y 50-59 | Fridelina | 0.014% (10mg) | 249-251°C | Soluble en cloroformo e insoluble en acetona |
| 324-329 y 330-333 | β -D-glucósido - β -sitosterol | 0.21% (150mg) | 239-245°C | Soluble en metanol e insoluble en hexano. |
| | Per acetilado del β -D- glucósido- β - sitosterol | 71.3% (92mg) | 165-167°C | Soluble en cloroformo e insoluble en hexano. |
| 66-70 | Tridecaprenol | 0.069% (49mg) | 78-79°C | Soluble en cloroformo e insoluble en hexano. |
| | Acetato de tridecaprenilo | 58.38% (17mg) | 70-71°C | Soluble en cloroformo e insoluble en acetona. |
| EXTRACTO HEXANICO DE <i>Esenbeckia xochipala</i> | | | | |
| 121-140 | Fridelina | ----- | 248-250°C | Soluble en cloroformo e insoluble en acetona |
| 31-41 y 141-153 | β -sitosterol | ----- | 135°C | Soluble en acetato de étilo y cloroformo. |
| EXTRACTO ETÁNOLICO DE <i>Esenbeckia huertana</i> | | | | |
| 209-216 | Limonina | 0.338% (214.6mg) | 232-233°C | Soluble en etanol e insoluble en hexano y cloroformo. |

Con base en los resultados de sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas, así como la comparación con muestras auténticas, se identificaron y caracterizaron cuatro metabolitos secundarios de *Esenbeckia xochipala*, y dos como producto de reacción -derivados acetilados-, mientras que de *Esenbeckia huertana* se aisló a la limonina como único metabolito secundario.

Fridelina.

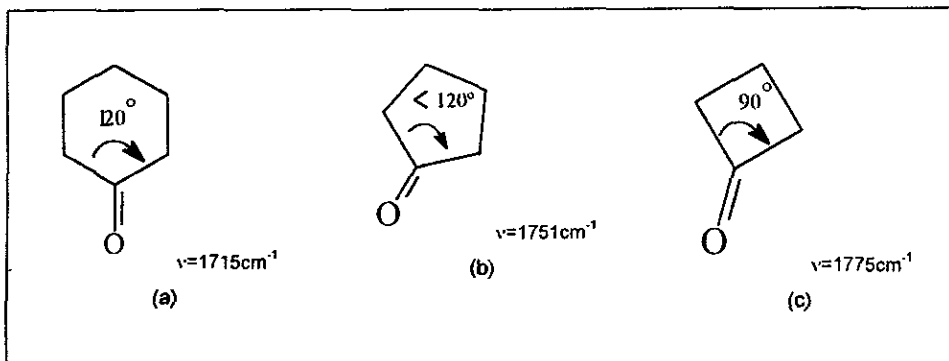
De las fracciones 42-49 (aguas madres) y 50-59 se obtuvo un sólido blanco cristalino de punto de fusión 249-251°C, el cual presenta un ión molecular de m/z 429, al que le corresponde una fórmula $C_{30}H_{50}O$ con cinco grados de insaturación.

En su espectro de IR (espectro 1), se observa una banda intensa en 1703 cm^{-1} que puede atribuirse a la vibración de un grupo carbonilo de cetona en un anillo de seis miembros. En la literatura química se encuentra informado que el ángulo de enlace de cetonas cíclicas⁽⁵⁾, influye en la frecuencia de absorción del grupo carbonilo, debido a los enlaces C-C adyacentes. Tal es el caso de la ciclohexanona (a), ciclopentanona (b) y ciclobutanona (c), en las cuales el grupo carbonilo absorbe en 1715 , 1751 y 1775 cm^{-1} respectivamente. De los datos anteriores se observa que al aumentar la tensión angular (tensión de Bayer), disminuye el valor en el número de onda¹⁴⁷, tal como se indica en la figura 2.

Además se observan las bandas correspondientes a ν (C-H) de hibridación sp^3 en 2926 y 1457 cm^{-1} .

⁽⁵⁾Factores que determinan el alargamiento de la banda del grupo carbonilo: a) estado físico, b) efecto electrónico y masa de los constituyentes, c) conjugación d) enlaces de hidrógeno (intra e intermolecular) y e) tamaño del anillo.

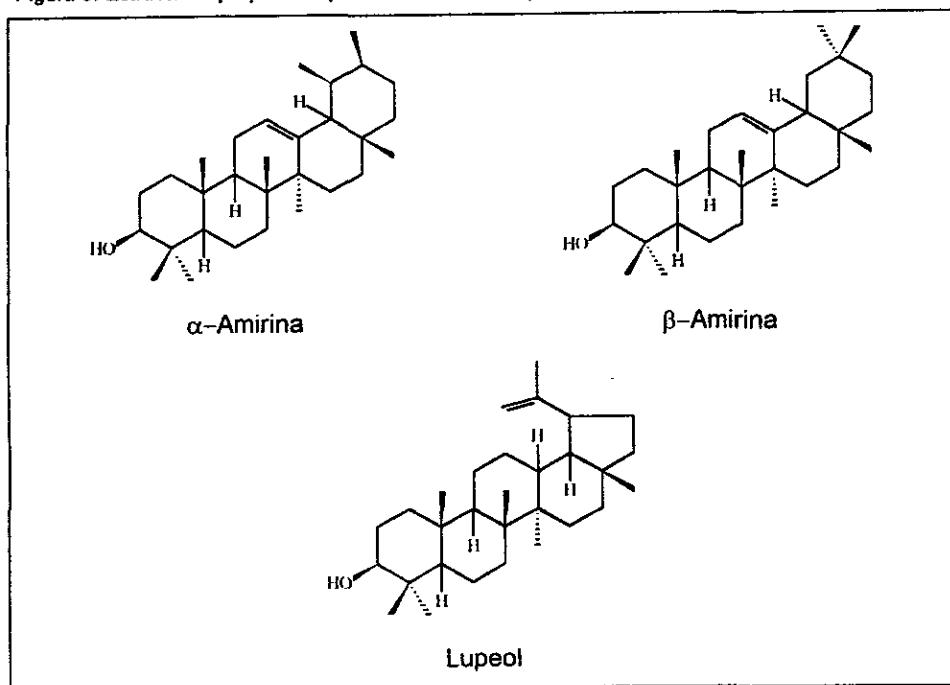
Figura 2. Influencia del ángulo de enlace de cetonas cíclicas en la frecuencia absorción del grupo carbonilo.



Por otro lado, su espectro de RMN¹H (espectro 2) presenta a campo alto ocho señales simples que integran para tres hidrógenos cada una, y que por su desplazamiento químico puede asignarse a grupos metilos unidos a carbonos cuaternarios, lo que permitió proponer como hipótesis estructural a un triterpeno pentacíclico.

Partiendo de lo anterior, y de acuerdo con los diferentes tipos estructurales informados en la literatura química, las posibles estructuras para la sustancia en discusión, se ilustran en la figura 3.

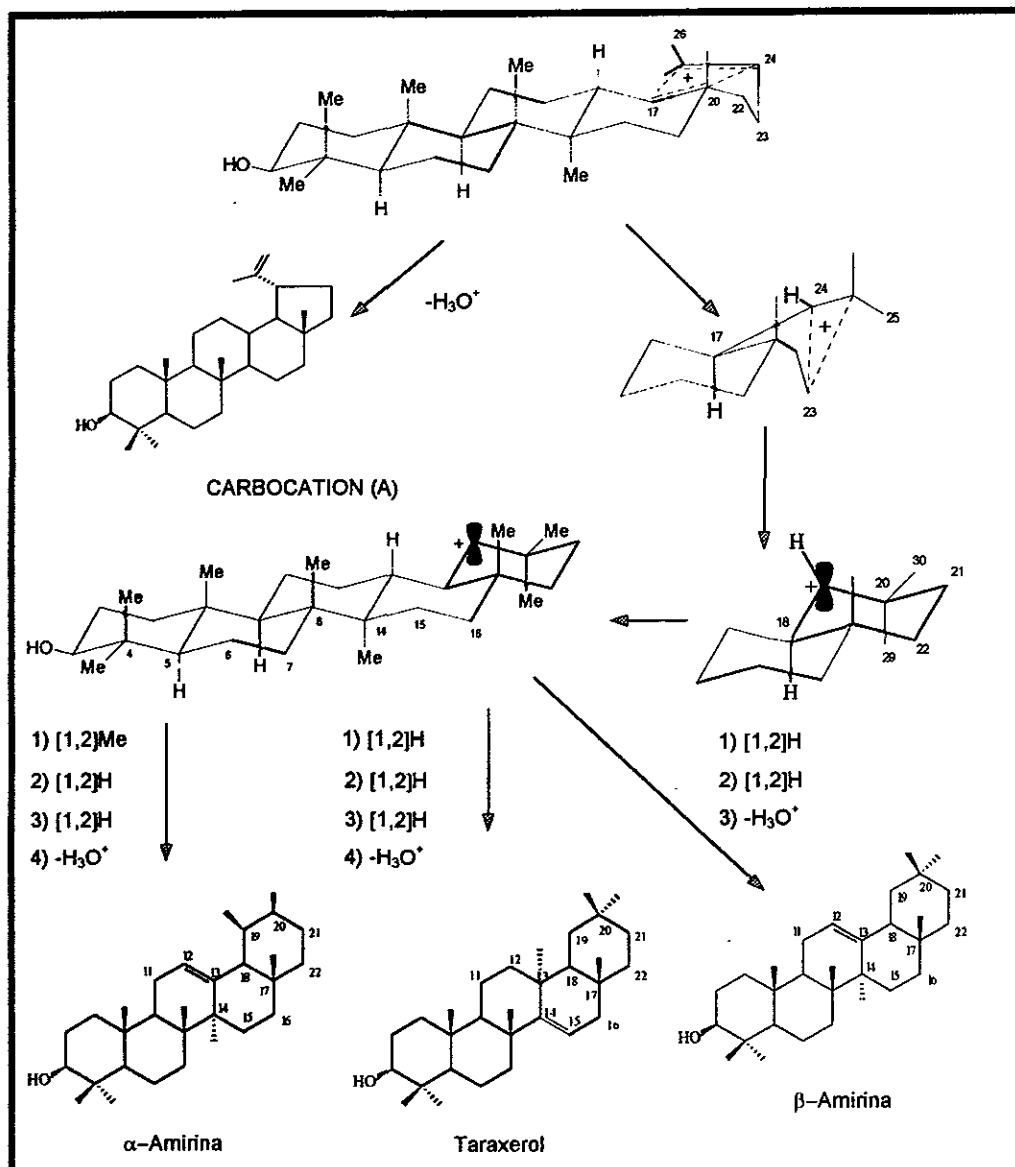
Figura 3. Estructuras propuestas para la discusión del producto natural aislado.



La α y β amirina son triterpenos pentacíclicos -cada anillo es de seis miembros-, mientras que el lupeol se caracteriza por poseer cuatro anillos de seis miembros y un anillo E de cinco átomos de carbono.

Los triterpenos pentacíclicos se forman al igual que los tetracíclicos a partir del óxido de escualeno por medio del carbocatión (A), tal como se muestra en el esquema 5, el cual a través de dos transposiciones [1,2] de hidruro del C-18 al C-19 y C-13 al C-18 respectivamente, seguido de la pérdida de un protón del C-12, lleva a la formación de la β -amirina; mientras que la α -amirina se forma a través del mismo intermediario, excepto que uno de los metilos geminales se transpone del C-20 al C-19 ^[48, 49].

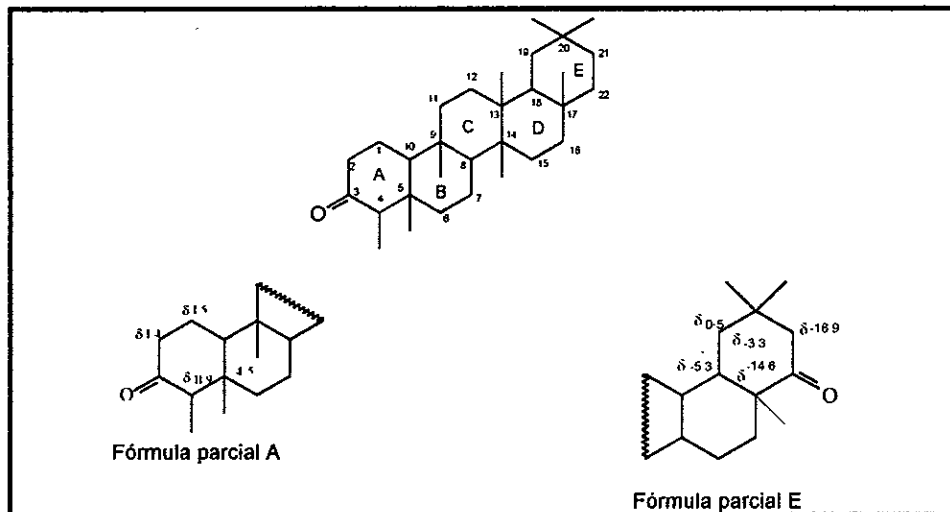
Esquema 5. Biosíntesis de triterpenos pentacíclicos [48-49].



La hipótesis estructural fue confirmada con sus datos de ^{13}C , que sugieren la presencia de ocho metilos, 11 metilenos, cuatro metinos, seis carbonos cuaternarios y un grupo carbonilo de cetona, asimismo los desplazamientos químicos mostrados por cada uno de los carbonos están de acuerdo con los informados por Gunatilaka y colaboradores 150 , tal como se ilustra en la tabla VII.

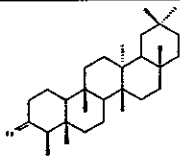
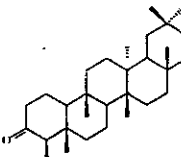
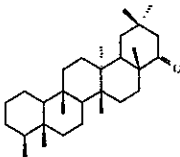
De manera que al comparar los desplazamientos químicos para ambas sustancias se puede corroborar que el grupo carbonilo de la cetona ejerce un efecto de desprotección sobre los carbonos adyacentes, debido a su capacidad electroattractora, la cual se muestra en la figura 4; donde se indica la fórmula parcial A, en la cual el grupo carbonilo se encuentra situado en el C-3, y la fórmula parcial E, donde esta situado en el C-22.

Figura 4. Efecto de desprotección del grupo carbonilo.



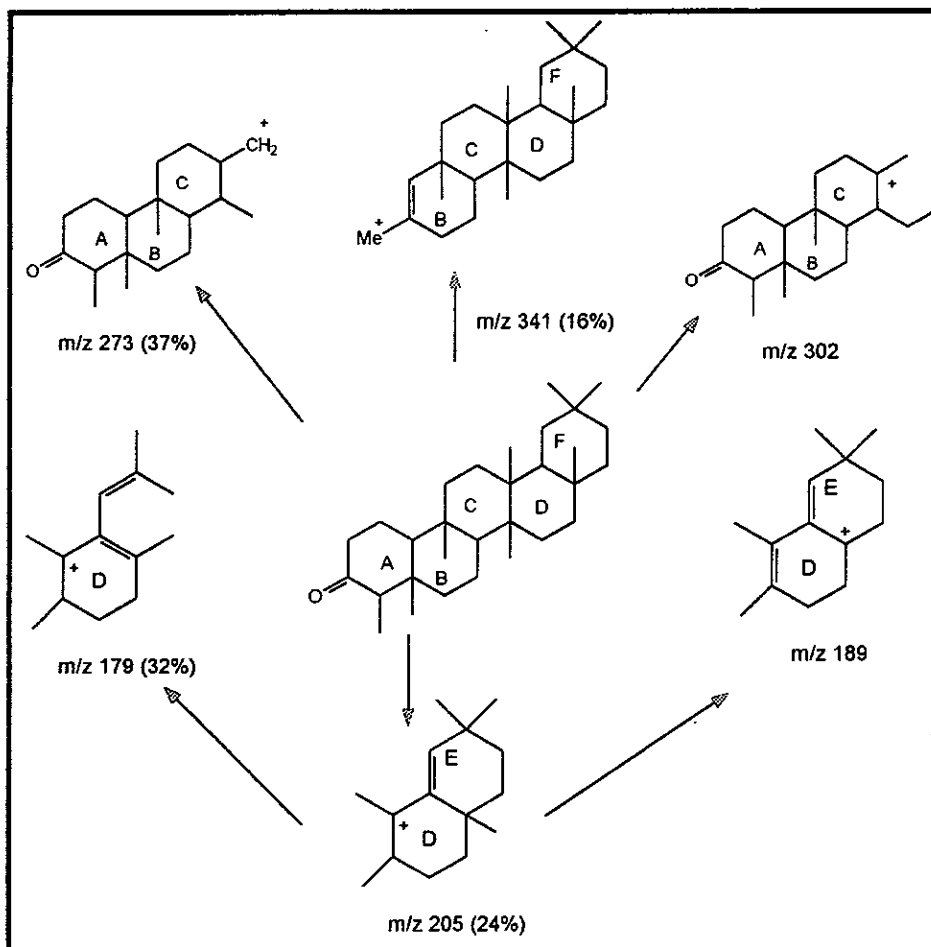
La posición del grupo carbonilo en el anillo A. queda corroborada basándose en la diferencia en el desplazamiento químico de los C-2, C-4 y del C-26.

TABLA VII. Desplazamientos químicos de RMN¹³C para la fridelina y D:A-friedo-olean-22-ona ^[50].

| |  |  <i>E. xochipala</i> |  D:A-friedo-olean-22-ona |
|------|---|--|---|
| C-1 | 22.3t | 22.31t | 20.8t |
| C-2 | 41.5t | 41.54t | 27.5t |
| C-3 | 213.0s | 213.19s | 31.1t |
| C-4 | 58.2d | 58.22d | 46.3d |
| C-5 | 42.1s | 42.09s | 37.6s |
| C-6 | 41.3t | 41.25t | 41.5t |
| C-7 | 18.2t | 18.26t | 18.2t |
| C-8 | 53.1d | 53.10d | 51.9d |
| C-9 | 37.4s | 37.45s | 37.2s |
| C-10 | 59.5d | 59.47d | 61.0d |
| C-11 | 35.6t | 35.63t | 35.6t |
| C-12 | 32.4t | 32.43t | 30.2t |
| C-13 | 38.3s | 38.31s | 38.7s |
| C-14 | 39.7s | 39.70s | 39.6s |
| C-15 | 30.5t | 30.52t | 30.4t |
| C-16 | 36.0t | 36.01t | 27.2t |
| C-17 | 30.0s | 30.01s | 45.1s |
| C-18 | 42.8d | 42.79d | 48.1d |
| C-19 | 35.3t | 35.35t | 43.8t |
| C-20 | 28.1s | 28.19s | 31.4s |
| C-21 | 32.8t | 32.78t | 49.7t |
| C-22 | 39.2t | 39.19t | 217.3s |
| C-23 | 6.8c | 6.86c | 13.6c |
| C-24 | 14.6c | 14.68c | 15.1c |
| C-25 | 17.9c | 17.97c | 18c |
| C-26 | 18.6c | 18.90c | 18.4c |
| C-27 | 20.3c | 20.29c | 18.5c |
| C-28 | 32.8c | 32.10c | 34.0c |
| C-29 | 31.8c | 31.79c | 31.1c |
| C-30 | 35.0c | 35.04c | 35.1c |

Aunado a lo anterior en su espectro de masas se observan los siguientes fragmentos de m/z 341(16%), 273 (37%), 205 (24%), 179 (32%), 125 (59%), 95 (100%), 41(53%), los cuales se encuentran determinados y fueron propuestos por Courtney y colaboradores ^[51-54], dichos fragmentos se ilustran en el esquema 6.

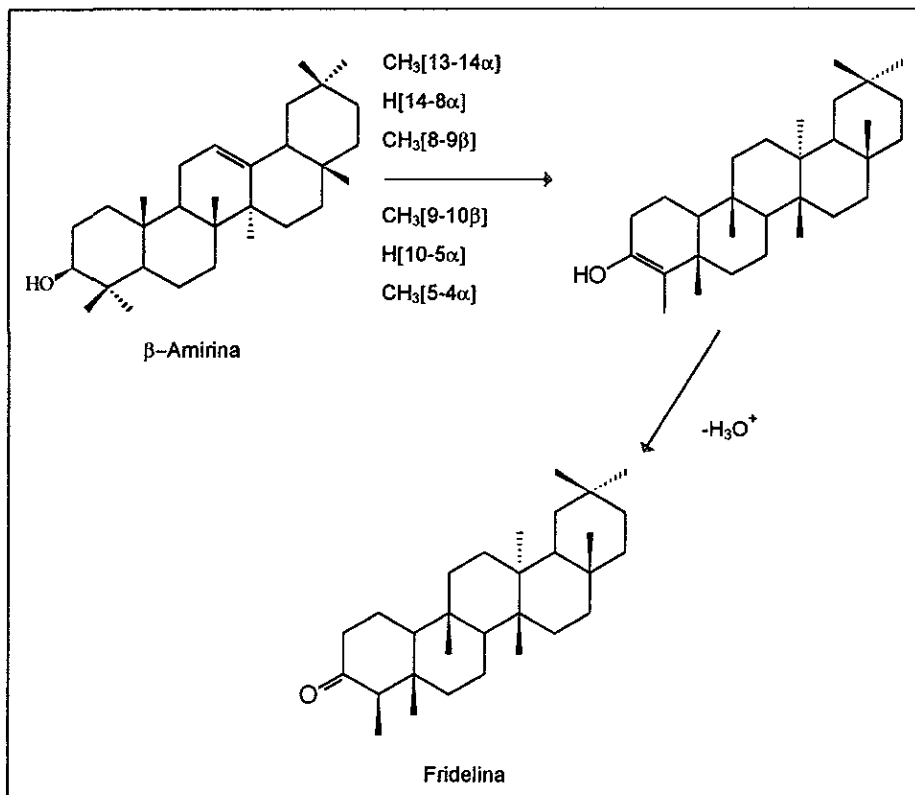
Esquema 6 . Patrón de fragmentación de la fridelina ^[51-54].



Corey y Ursprung^[55] proponen que la β -amirina es el precursor biológico de la fridelina, tal como se ilustra en el esquema 7, mediante una serie de transposiciones [1,2] de grupos metilos e hidrógenos.

Dicha hipótesis fue comprobada por el hecho de haberse logrado la reacción inversa, la cual puede ser catalizada por una gran diversidad de ácidos.

Esquema 7 . Transformación química en medio ácido de la β -amirina a fridelina.^[55]



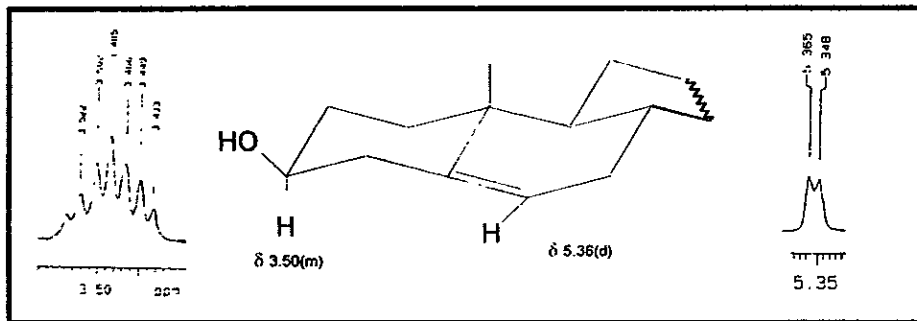
β -D-glucósido- β -sitosterol

A partir de los eluatos 324-329 y 330-333, obtenidos al eluir la columna con acetato de etilo, se aisló un sólido blanco de punto de fusión 240-245°C. El producto de acetilación de dicho sólido presentó un punto de fusión de 165-167°C, al cual le corresponde una fórmula $C_{43}H_{67}O_{10}$. Su espectro de IR (espectro 4), muestra una banda intensa en 1752 cm^{-1} que corresponde a la vibración del grupo carbonilo $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo acetato.^[47]

Por otro lado, en el espectro de RMN¹H (espectro 5) se observan dos señales simples que por su desplazamiento químico en $\delta 1.0$ y 0.67 , se asignaron a los hidrógenos de los CH_3 -19 y CH_3 -18 respectivamente, la señal doble (d , $J=7\text{Hz}$) que aparece en $\delta 0.91$ corresponde al grupo metilo de la posición 21, además de la señal presente en $\delta 0.81$ ($J=7\text{Hz}$) designada para seis hidrógenos equivalentes de los CH_3 -26 y CH_3 -27^[56].

Asimismo se observa una señal múltiple (m) en $\delta 3.50$, que por su desplazamiento químico corresponde al hidrógeno α -axial ubicado en el C-3, además de la señal doble (d , $J=8\text{Hz}$) en $\delta 5.36$, la cual se asignó al hidrógeno vinílico de la posición seis, ver figura 5.

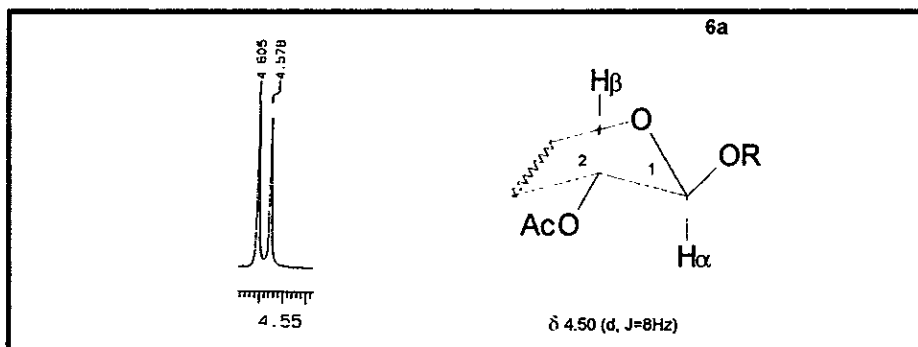
Figura 5. Estructura parcial de acuerdo a los desplazamientos químicos de los H-3 y H-6.



La asignación de las señales a la parte glucosídica de la molécula se realizó de la siguiente manera forma:

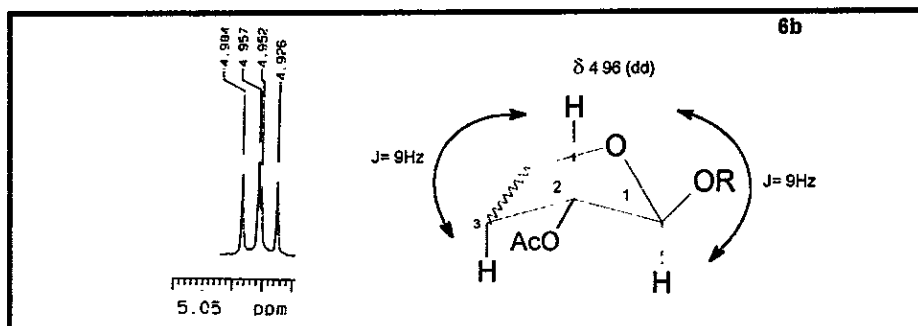
a) En $\delta 4.57$ (*d*, $J=8\text{Hz}$, 1H) se observa una señal doble que por su desplazamiento químico puede asignarse al protón ubicado en la posición α -axial del C-1, el valor de la constante de acoplamiento sugiere que dicho hidrógeno muestra un acoplamiento *trans* con un hidrógeno con orientación β -axial, ver figura 6a.

Figura 6a. Desplazamiento químico del H-1



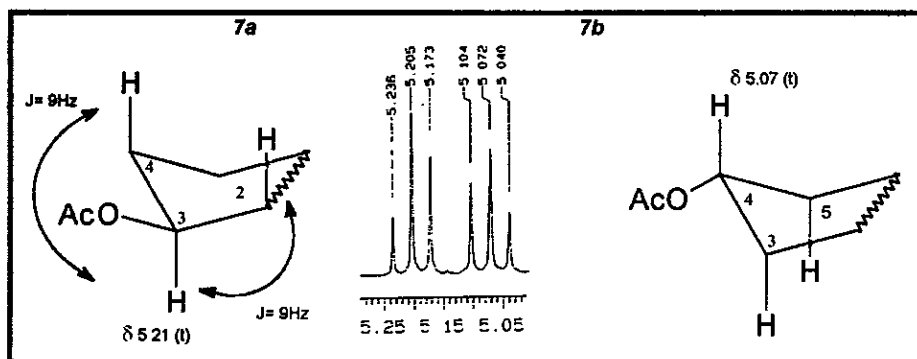
b) La señal registrada en $\delta 4.95$ (*dd*, $J=9\text{Hz}$, 1H), fue asignada para el hidrógeno del C-2, el cual tiene un acoplamiento *trans-diaxial* con los hidrógenos ubicados en los C-1 y 3, por lo que la señal se presenta como un doble de doble (*dd*), tal como se ilustra en la figura 6b.

Figura 6b. Interacción del hidrógeno del C-2



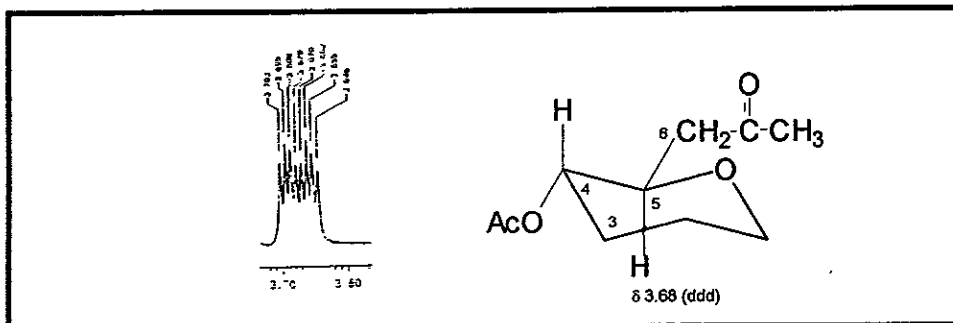
c) La señal correspondiente al hidrógeno C-3 se localiza en $\delta 5.21$ (*t*, $J = 9\text{Hz}$, 1H), este hidrógeno presenta una disposición *trans-diaxial* con hidrógenos del C-2 y 4, por lo que el desdoblamiento de la señal se ve como un triplete; así mismo, la señal presente en $\delta 5.07$ (*t*, $J = 9\text{Hz}$) corresponde al hidrógeno del C-4, el cual se encuentra en disposición *trans-diaxial* con respecto a los protones del C-3 y 5, lo anterior se muestra en las figura 7a y 7b.

Figura 7a y 7b. Desplazamientos químicos para los hidrógenos del C-3 y 4.



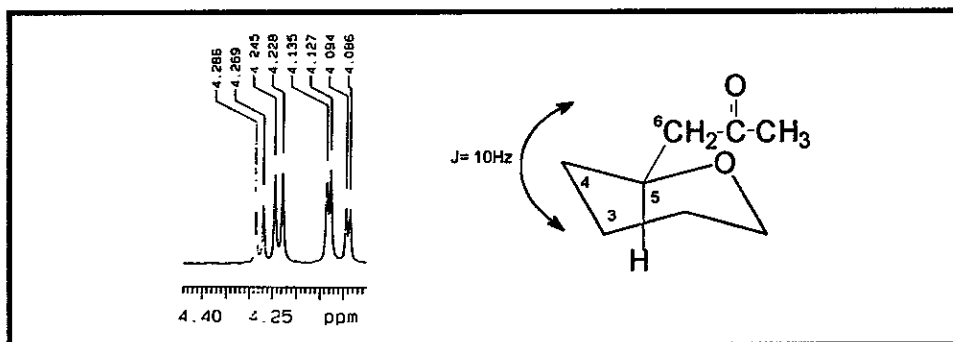
Para el hidrógeno en la posición C-5, se asignó la señal en $\delta 3.68$ (*ddd*, $J = 10\text{Hz}$, 1H), la cual resulta del acoplamiento con el hidrógeno ubicado en el C-3 y los dos protones diastereotópicos del C-6, registrándose ocho señales, tal como se muestra en la figura 8.

Figura 8. Estructura parcial para el hidrógeno ubicado en el C-5.



Por último las señales en $\delta 4.22$ (*dd*, $J = 10\text{Hz}$, 1H) y $\delta 4.11$ (*dd*, $J = 10\text{Hz}$, 1H) fueron asignadas a los hidrógenos diastereotópicos del C-6, los cuales se encuentran acoplados con el hidrógeno del C-5, mostrando un patrón de desdoblamiento doble de doble (*dd*) para cada hidrógeno, ver figura 9.

Figura 9. Estructura parcial para los hidrógenos diastereotópicos de la molécula.



Además de las cuatro señales entre $\delta 2.0-2.07$ ($4s, 12\text{H}$) correspondientes a los hidrógenos de los cuatro grupos metilos del acetato ^[57].

Con base en los datos anteriores y por comparación en cromatografía en capa fina se puede concluir que la sustancia aislada como producto natural es el β -D-glucósido- β -sitosterol.

Tridecaprenol

De las fracciones 60-70 de la columna original se obtuvo un sólido blanco que funde a 78-79°C. En su espectro de IR (espectro 6) muestra una banda intensa en 3599 cm^{-1} , lo que permite suponer que la molécula presenta un grupo hidroxilo.

En su espectro de RMN¹H (espectro 7) se observa una señal triple en δ 2.268 (*t*, J=5 Hz), la cual fue asignada a los dos hidrógenos geminales al grupo hidroxilo de la molécula, la señal en δ 1.55 (*q*, J=5 Hz) corresponden a los hidrógenos adyacentes al carbono del grupo hidroxilo; un singulete en δ 1.17 se asignó a los hidrógenos tipo (-CH₂-); finalmente se tiene una señal triple en δ 0.80 (*t*, J=4.6 Hz) que por su ubicación a campo alto pueden asignarse para los hidrógenos de un metilo. Lo anterior permitió proponer una fórmula parcial del producto natural [CH₃-(CH₂)_n-CH₂-CH₂OH].

Para la identificación total del producto natural se procedió a la obtención del producto acetilado, el cual presentó pf. 70-71°C. En el espectro de IR (espectro 8) se observa la banda característica del grupo acetato en 1742 cm^{-1} , lo que confirma la presencia del grupo hidroxilo en la molécula.

Por otro lado, en el espectro de masas por impacto electrónico de dicha sustancia, se observa un ión molecular de *m/z* 480, y los fragmentos *m/z*43(93.5%) y 57(100%), que resultan del rompimiento característico de los ésteres^[58].

Del análisis espectroscópico de RMN¹H (espectro 10) se puede observar una señal triple en δ 4.05, la cual se asignó a los dos hidrógenos geminales del grupo acetato, mientras que la señal simple en δ 2.04 corresponde a los hidrógenos del metilo del grupo acetato.

Con base en los datos anteriores se concluye que el producto acetilado presenta una fórmula molecular C₃₂H₆₄O₂, lo que indica que el producto natural es el tridecaprenol de fórmula C₃₀H₆₂O y de peso molecular 438.

β -sitosterol

A partir de los eluatos 33-41 y 141-153 se aisló un sólido blanco cristalino de punto de fusión 135°C, en su espectro de IR (espectro 10) se observa la presencia de un grupo hidroxilo debido a las bandas de absorción en 3609 cm⁻¹. En cuanto a su espectro de masas por impacto electrónico de esta sustancia mostró un ión molecular en m/z 414, además de las señales m/z 339 y 303 características de los esteroides^[56,59] que presentan una insaturación entre los carbonos 5 y 6.

En su espectro de RMN¹H (espectro 11) se observa una señal centrada en δ 5.4 (*dd*, $J=6.6\text{Hz}$, 1H), la cual corresponde al hidrógeno vinílico de la posición seis. La señal en δ 3.56 (*m*, 1H) se asignó al hidrógeno geminal al grupo hidroxilo que se encuentra en la posición tres, el resto de las señales corresponden a los seis metilos localizados entre δ 1.00 y 0.70^[56].

Los datos anteriores se propuso una fórmula molecular C₂₉H₅₀O, que al comparar sus constantes espectroscópicas y propiedades físicas con las informadas en la literatura para los fitosteroides^[59,60] se concluyó que la sustancia aislada era el β -sitosterol, sustancia ampliamente distribuida en la naturaleza.

Limonina

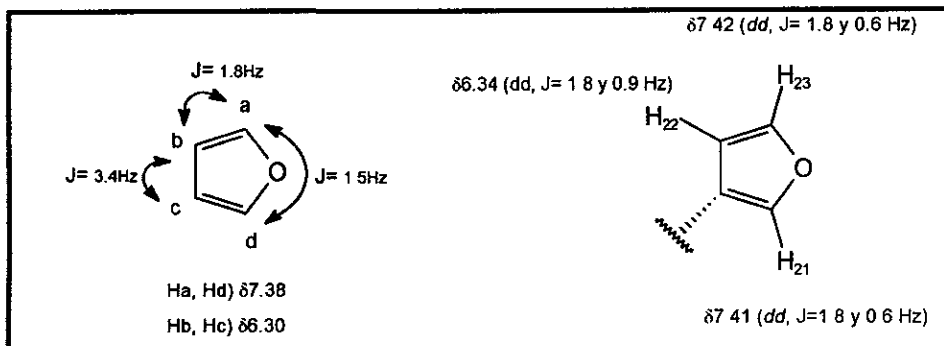
Del extracto etanólico de las semillas de *Esenbeckia huertana*, se aisló un sólido blanco cristalino de pf. 282-283°C. el cual presentó un Rf 0.48 [hexano-acetato de etilo (6:4)].

Por otro lado en su espectro de masas por impacto electrónico se observa un ión molecular de m/z 470, al cual se le puede asociar una fórmula molecular $C_{26}H_{30}O_8$ (Ω 12).

El espectro de $RMN^{13}C$ (espectro 15) de dicha sustancia, muestra en desacoplamiento total la presencia de 26 átomos de carbono. La naturaleza de un grupo funcional, así como el grado de hidrogenación de estos átomos, se dedujo con base a su espectro de $RMN^{13}C$ aplicando la técnica del ATP. Basándose en lo anterior, se pudo establecer la presencia de 4 metilos, 5 metilenos, 8 metinos y 9 carbonos cuaternarios, corroborando que esta sustancia posee 26 átomos de carbono y 30 átomos de hidrógeno, lo que sugiere que se trata de un triterpeno, ya que muestra en RMN^1H cuatro señales simples que corresponden a grupos metilos unidos a carbono cuaternario.

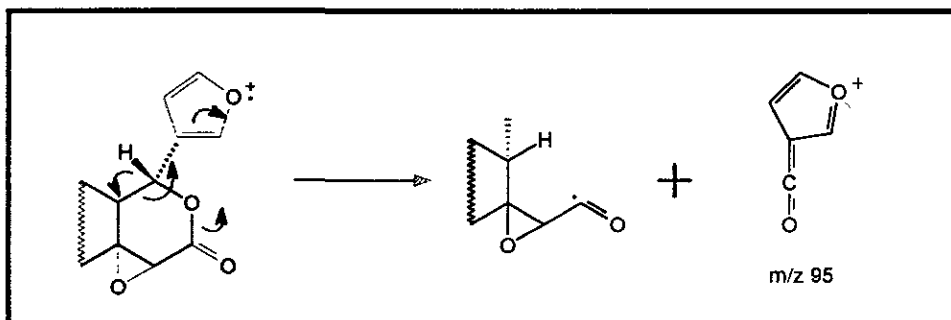
Asimismo se observa en la región de los hidrógenos aromáticos una señal compleja que integra para 2 hidrógenos [H-21 y H-23]; además, la señal doble de doble (dd) asignada al hidrógeno unido al C-22, los cuales forman parte del anillo del furano, tal como se ilustra en la figura 10.

Figura 10. desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento para el anillo del furano.



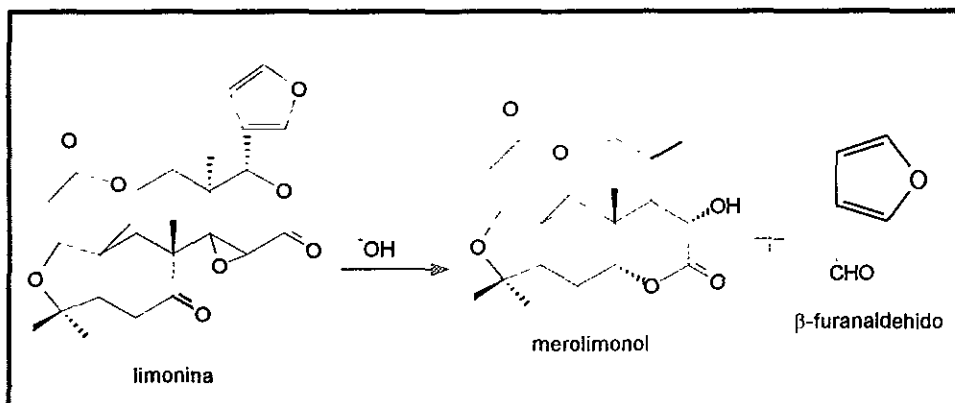
Con base en lo descrito anteriormente, se propuso como hipótesis estructural el esqueleto de un limonoide —triterpeno policíclico altamente oxidado— los cuales se caracterizan por incorporar al anillo del furano en su estructura base; esto permitió el empleo del reactivo de Ehrlich³⁰¹ como revelador específico de dichas sustancias, y se explica por el fragmento de m/z 95 —que corresponde al pico base de su espectro de masas— de acuerdo con lo propuesto por Dreyer⁶¹¹ y Baarschers⁶²¹, este último autor sugiere la fragmentación que se ilustra en la figura 11, donde se propone que el anillo del furano se encuentra unido a una γ -lactona.

Figura 11. Pérdida del fragmento en m/z 95⁶²¹.



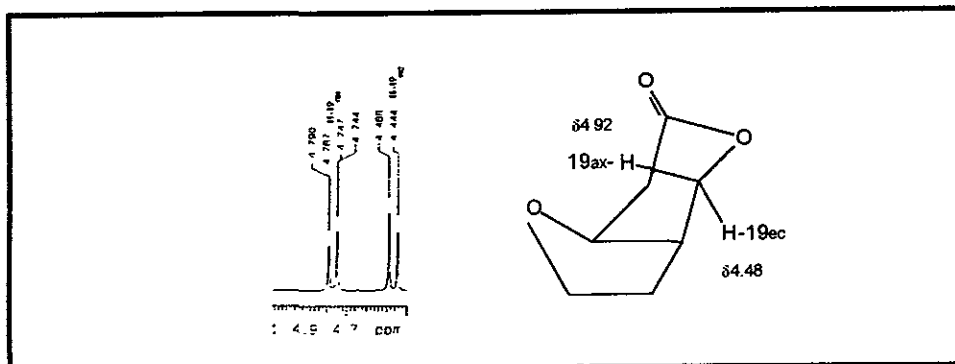
Lo anterior se complementa con la transformación química de la limonina en medio básico a merolimanol, formando el β -furanaldehido. Esta transformación se ha usado para determinar la naturaleza de un limonoide, como se ilustra en la figura 12⁽⁶³⁾.

Figura 12. transformación química de limonina a merolimanol en medio básico⁽⁶³⁾.



Por otro lado, dentro de género *Esenbeckia* se han aislado hasta ahora la limonina (73), el diosfenol de la limonina (76) y la rutaevina (77), mientras que en algunas especies del género *Citrus* se han aislado limonina, junto con la obacunona (74) y nomilina (75); éstas dos últimas sustancias contienen cinco grupos metilos unidos a carbonos cuaternarios, lo cual indica que el C-19 no se encuentra oxigenado; esto sugiere que la sustancia esta en discusión esta relacionada con la limonina, ya que además en su espectro de RMN^1H se observa un sistema AB que corresponde a los H-19_{ax} en $\delta 4.92$ ($J = 13\text{Hz}$) y H-19_{ec} en $\delta 4.48$ ($J = 13\text{Hz}$), ver figura 13.

Figura 13. Desplazamientos químicos para los hidrógenos del C-19^[64,65].



Por otra parte, los desplazamientos químicos de los H-17 ($\delta 5.47$, s, 1H) y H-15 ($\delta 4.04$, s, 1H) indican la presencia de un éster α,β -insaturado y un grupo epóxido característico del anillo "D" de los limonoides^[66,67]. Asimismo, la señal del H-15 se encuentra traslapada con los hidrógenos del C-1, de acuerdo con su espectro COSY.

El desplazamiento químico del H-15 se ve modificado con respecto a los epóxidos normales, esto debido a la ubicación del hidrógeno en el área negativa del efecto de anisotropía generado por el grupo carbonilo; sin embargo en este grupo de compuestos la posición del H-15 depende de la naturaleza del grupo funcional presente en el C-7^[64], como se puede observar al comparar los desplazamientos químicos en listados en la tabla VIII.

Esquema 8. Espectro COSY.

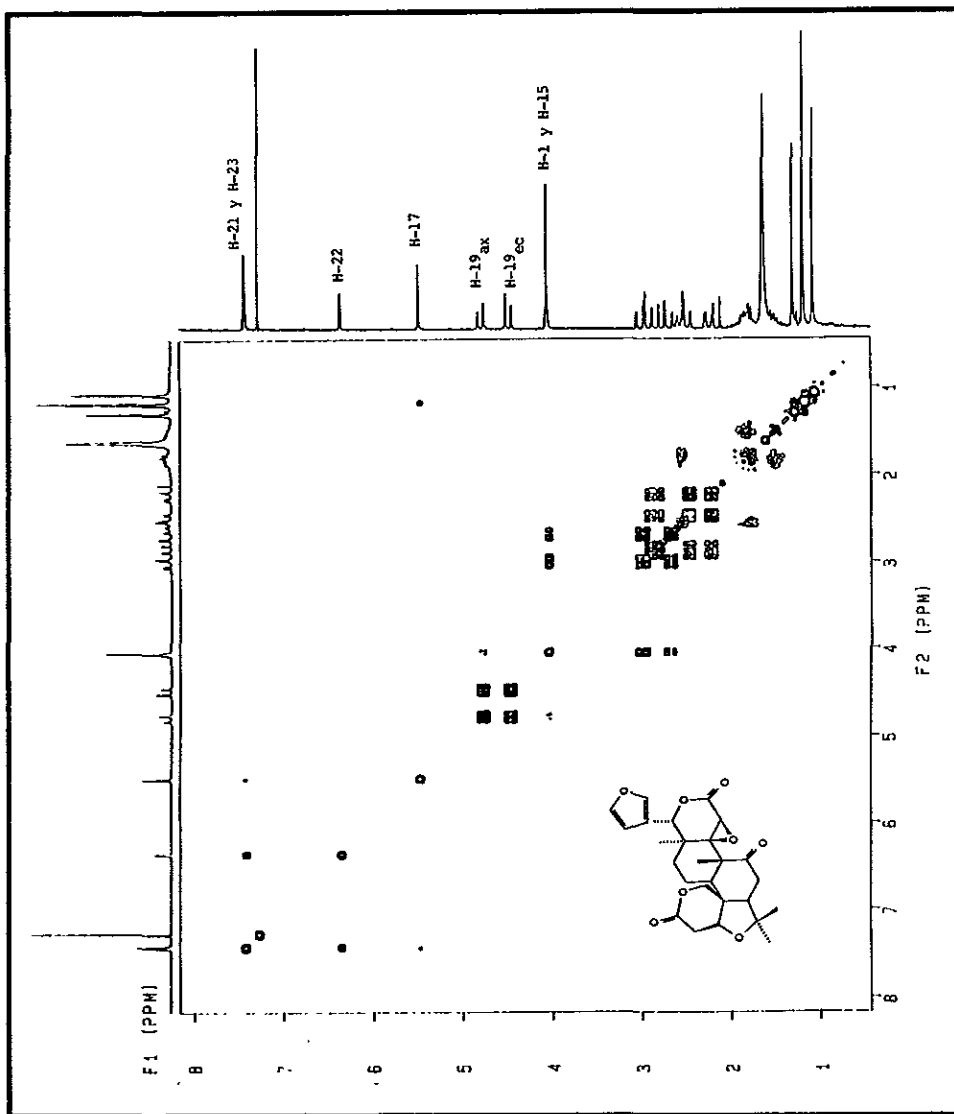
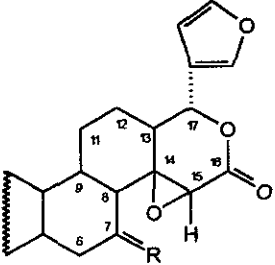


Tabla VIII. Desplazamientos químicos para H-15 por la presencia de grupos funcionales en C-7⁽⁶⁴⁾.

| | | |
|---|------------|-------|
|  | R | H-15 |
| | O | δ4.04 |
| | H-β, OH-α | δ4.42 |
| | H-α, OAc-β | δ3.72 |

A los hidrógenos de los C-2 y C-6 corresponden las señales en δ 3.33, las cuales integran para cuatro protones α a un grupo carbonilo, estos hidrógenos se encuentran formando un sistema AB característico de la limonina — cabe señalar que los derivados de la limonina, dichas señales se encuentran traslapadas, razón por la cual no se interpretan — Por último a campo alto aparecen 4 señales simples que corresponden a 12 hidrógenos, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera:

La señal en δ 1.3 corresponde a los 3H del grupo metilo en la posición C-13, estos hidrógenos son desplazados a campo bajo por la presencia del anillo del furano (efecto de anisotropía). Los desplazamientos químicos en δ 1.18 y 1.175 se asignaron a los 6H de los metilos geminales del C-4, el cual se encuentra unido a un átomo de oxígeno, justificándose así su aparición a campo bajo con respecto a los 3H del grupo metilo del C-8, el cual se ubica en δ 1.08⁽⁶⁴⁾.

Con base en lo anterior, se concluye que la sustancia aislada de las semillas de *Esenbeckia huertana* es la limonina.

CONCLUSIONES

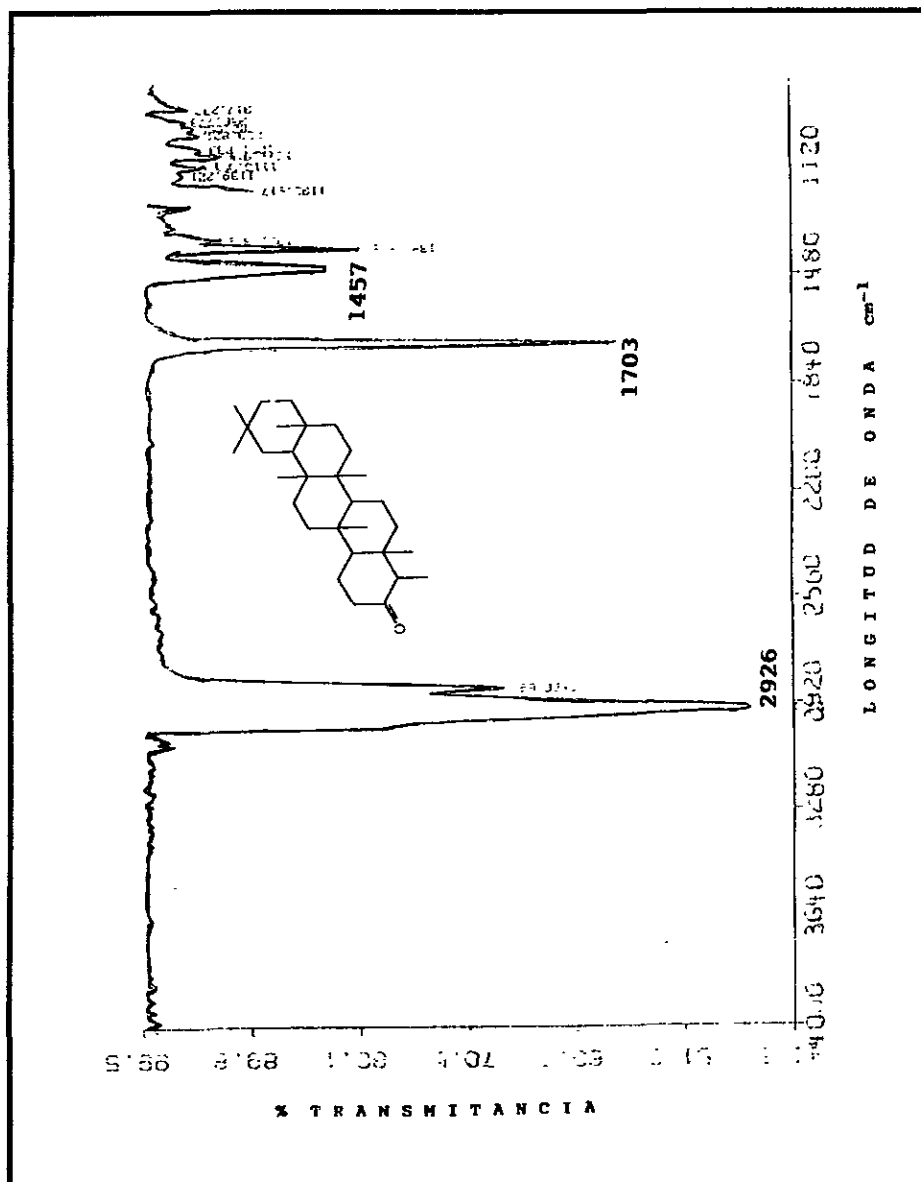
Del estudio químico de las partes aéreas del extracto acetónico y extracto hexánico de *Esenbeckia xochipala* se aislaron y caracterizaron cuatro metabolitos secundarios mayoritarios: **fridelina, β -D-glucósido- β -sitosterol, el tridecaprenol, β -sitosterol**, además de los productos de acetilación **del β -D-glucósido- β -sitosterol y tridecaprenol**.

Por otro lado de las semillas del extracto etanólico de *Esenbeckia huertana* se aisló como producto mayoritario a la **limonina**, cuyo hayazgo reviste interés taxonómico.

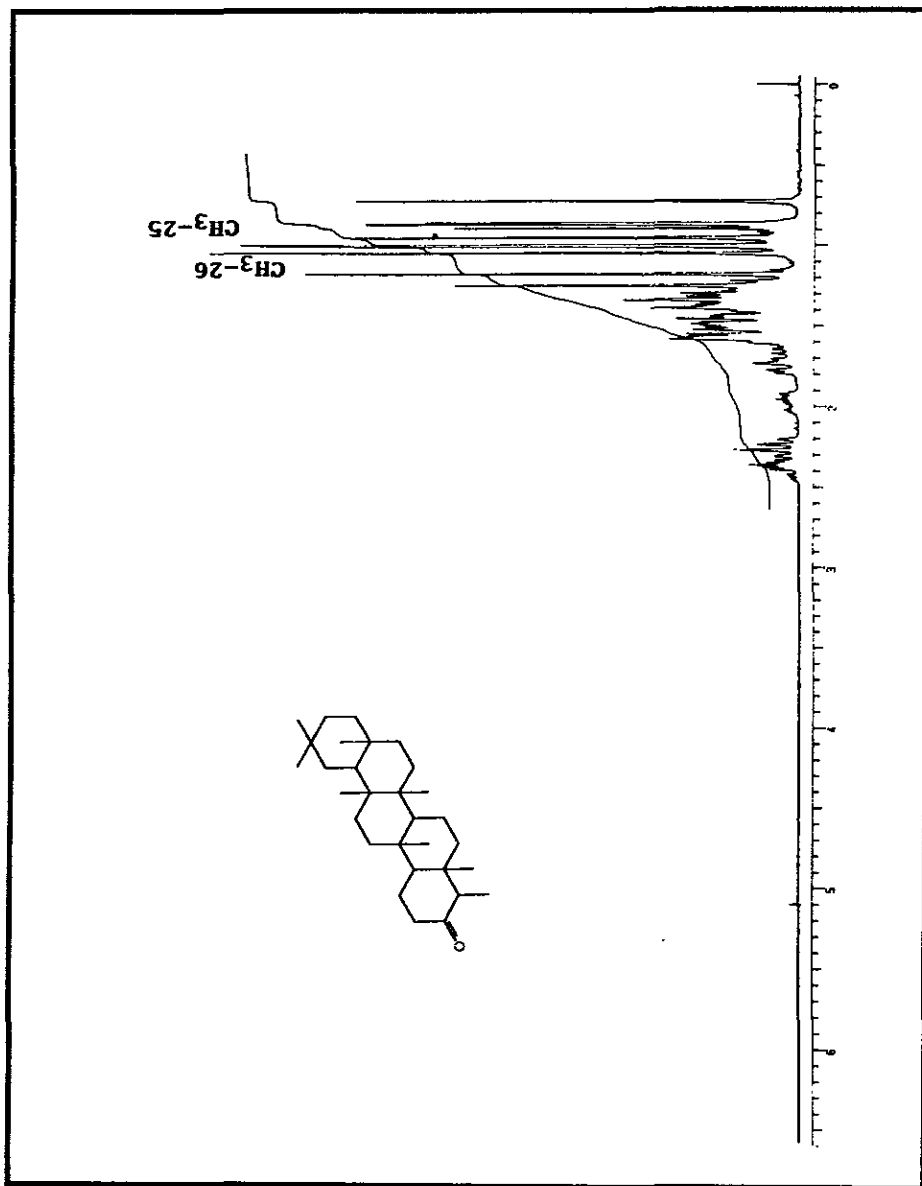
De esta manera los resultados del presente estudio químico se pueden incorporar a los ya informados en la literatura química, y así contribuir al conocimiento de los constituyentes químicos de dicho género, el cual se encuentra distribuido en nuestro país.

ESPECTROS

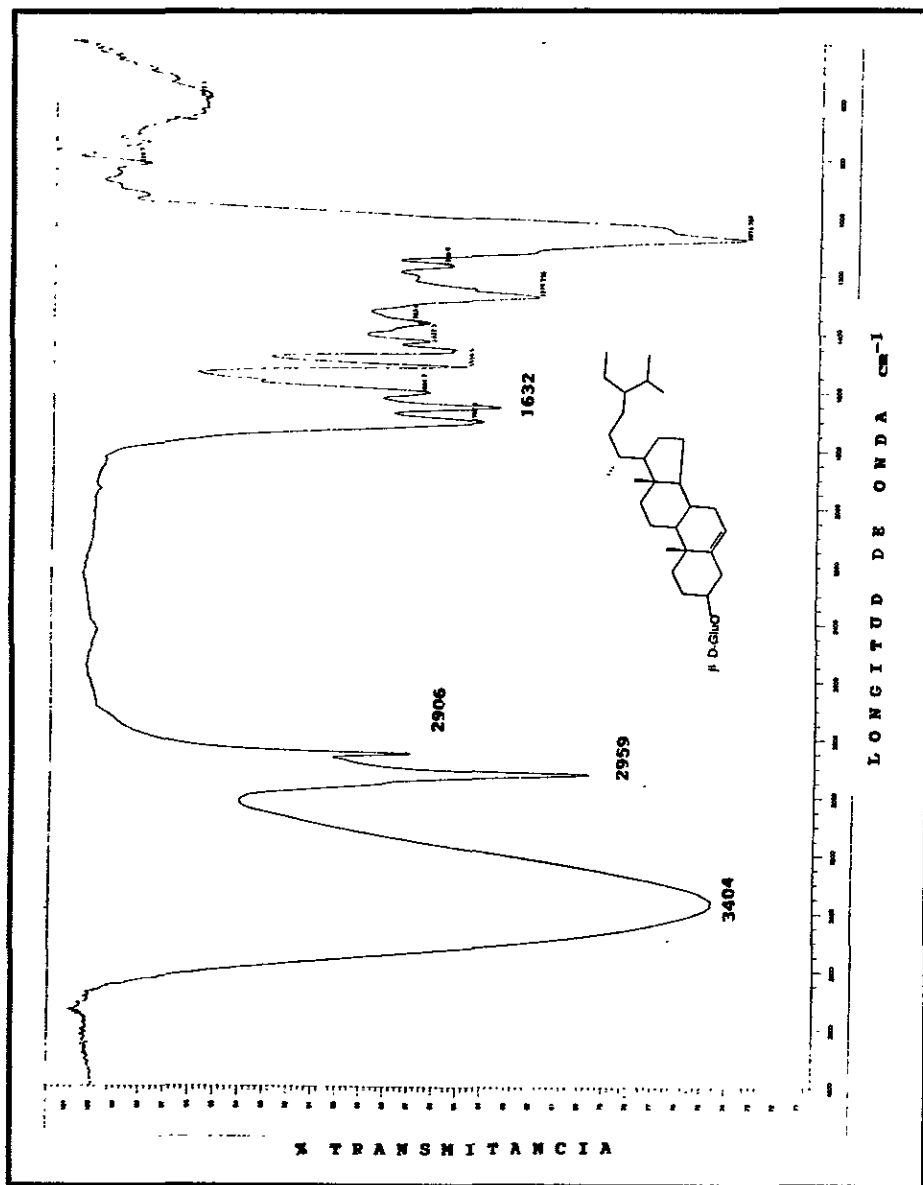
Espectro 1. IR (CHCl₃) de la fridelina



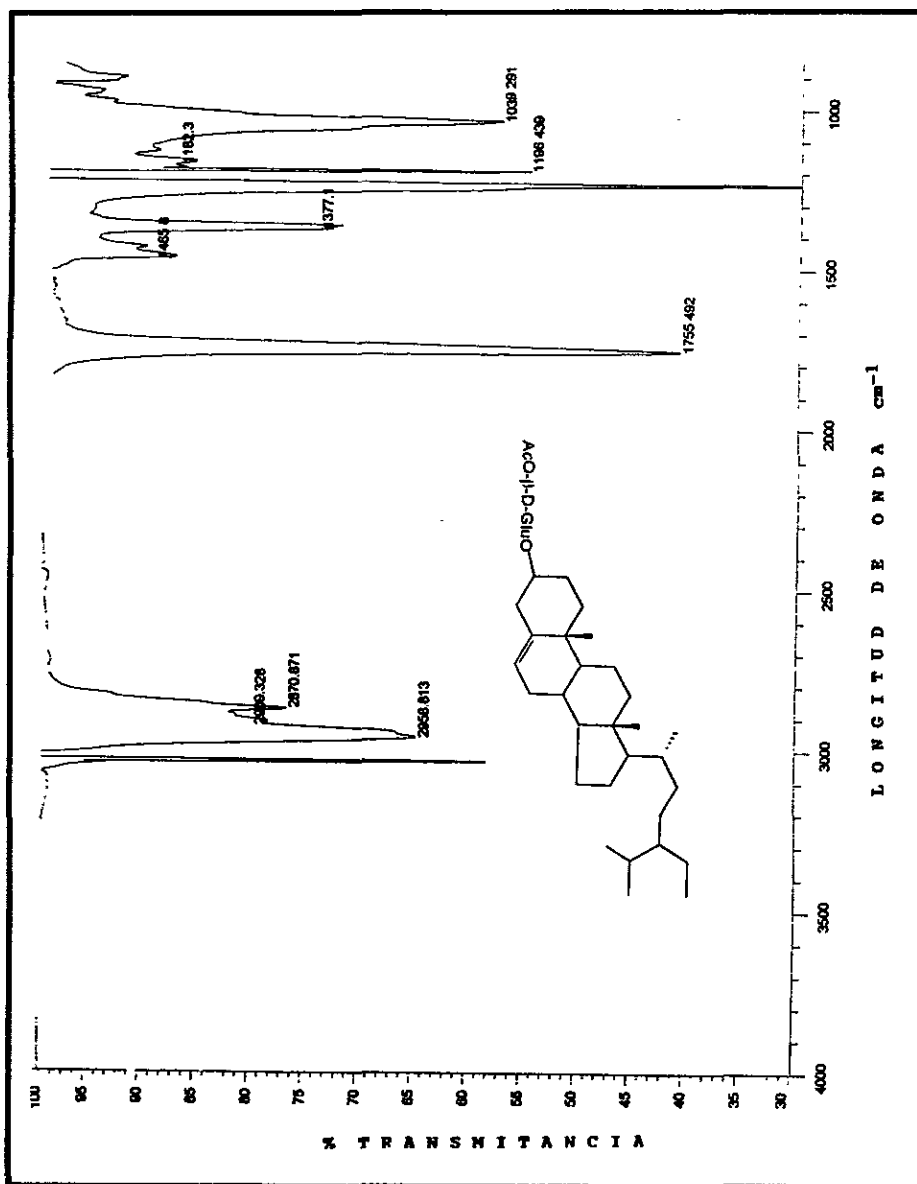
Espectro 2. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la fridelina.



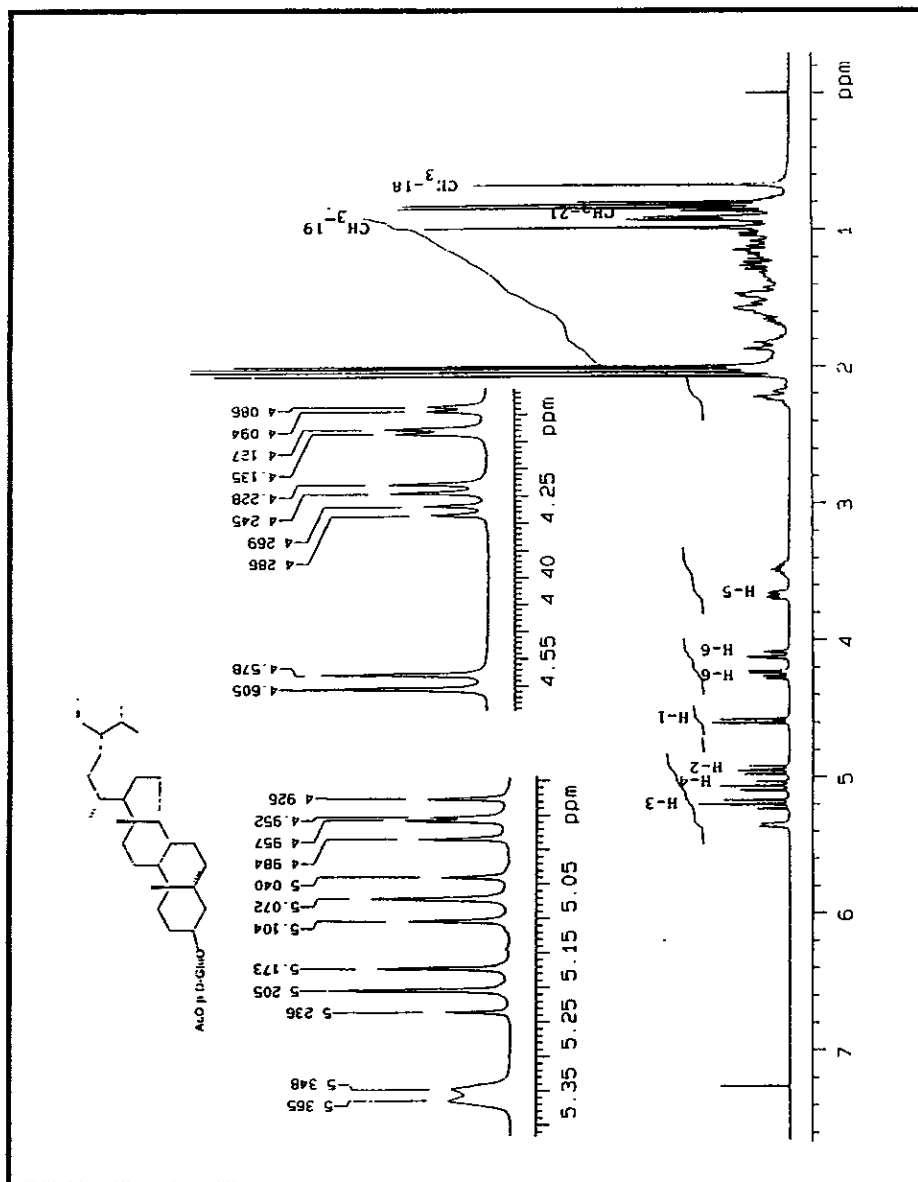
Espectro 3. IR (KBr) del β -D-glucósido- β -sitosterol.



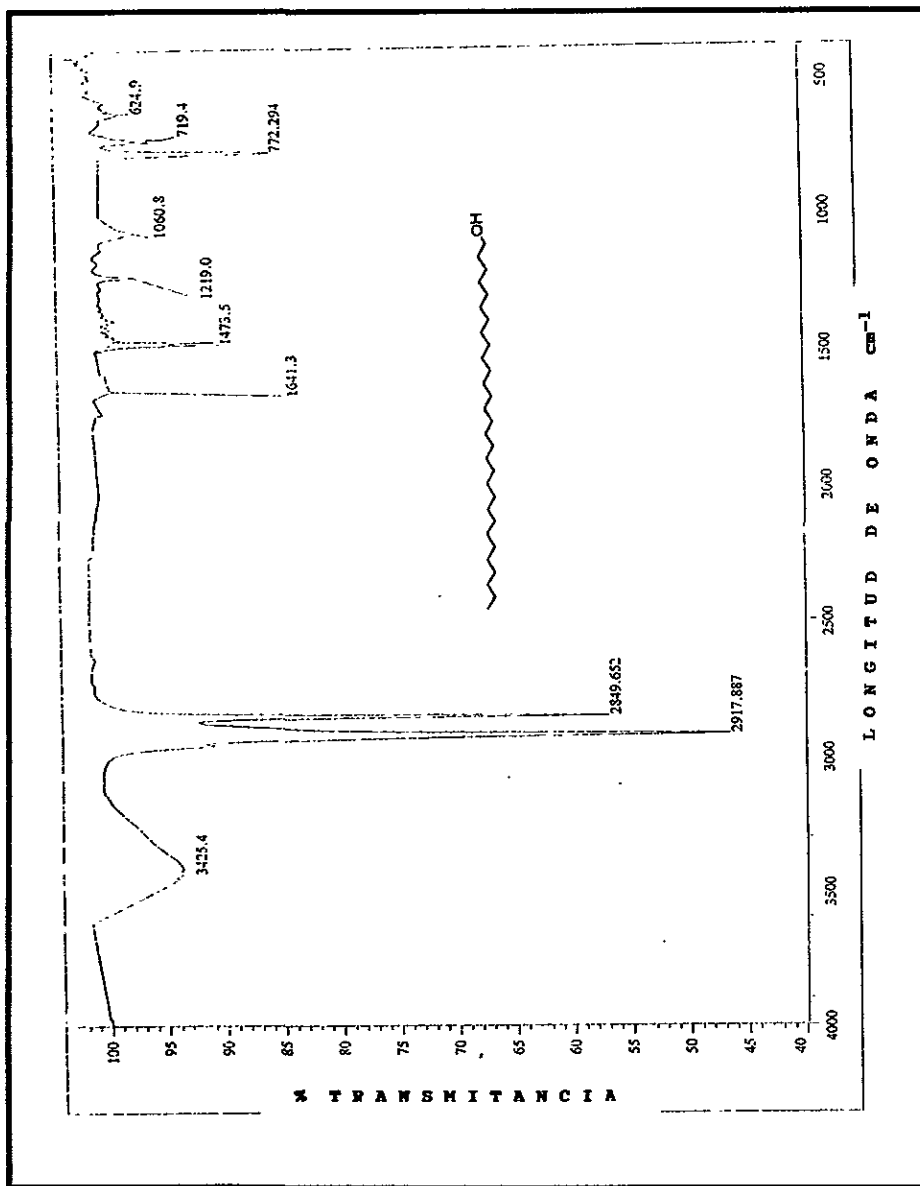
Espectro 4. IR (CHCl₃) del acetilado del β-D-glucósido-β-sitosterol.



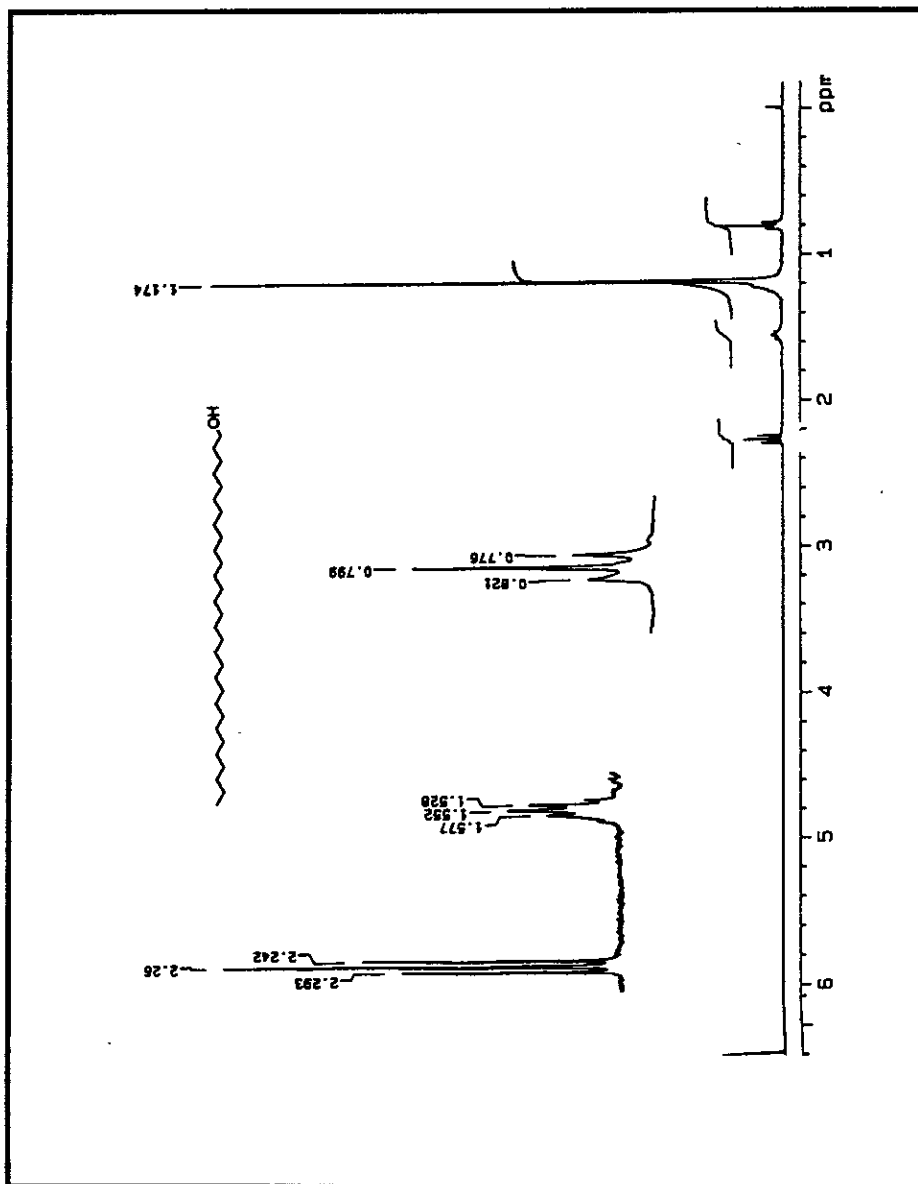
Espectro 5. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del acetilado del β-D-glucósido-β-sitosterol.



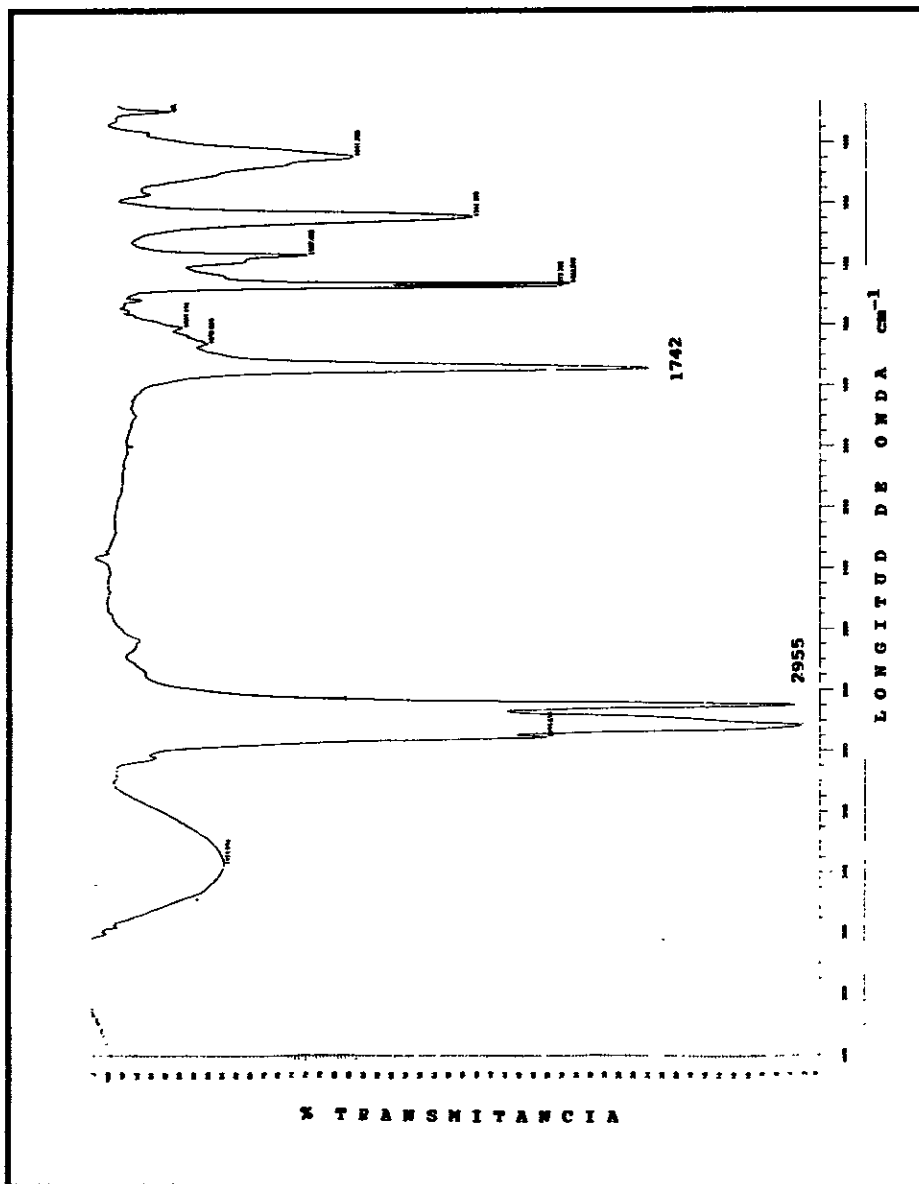
Espectro 6. IR (CHCl_3) del tridecapreno.



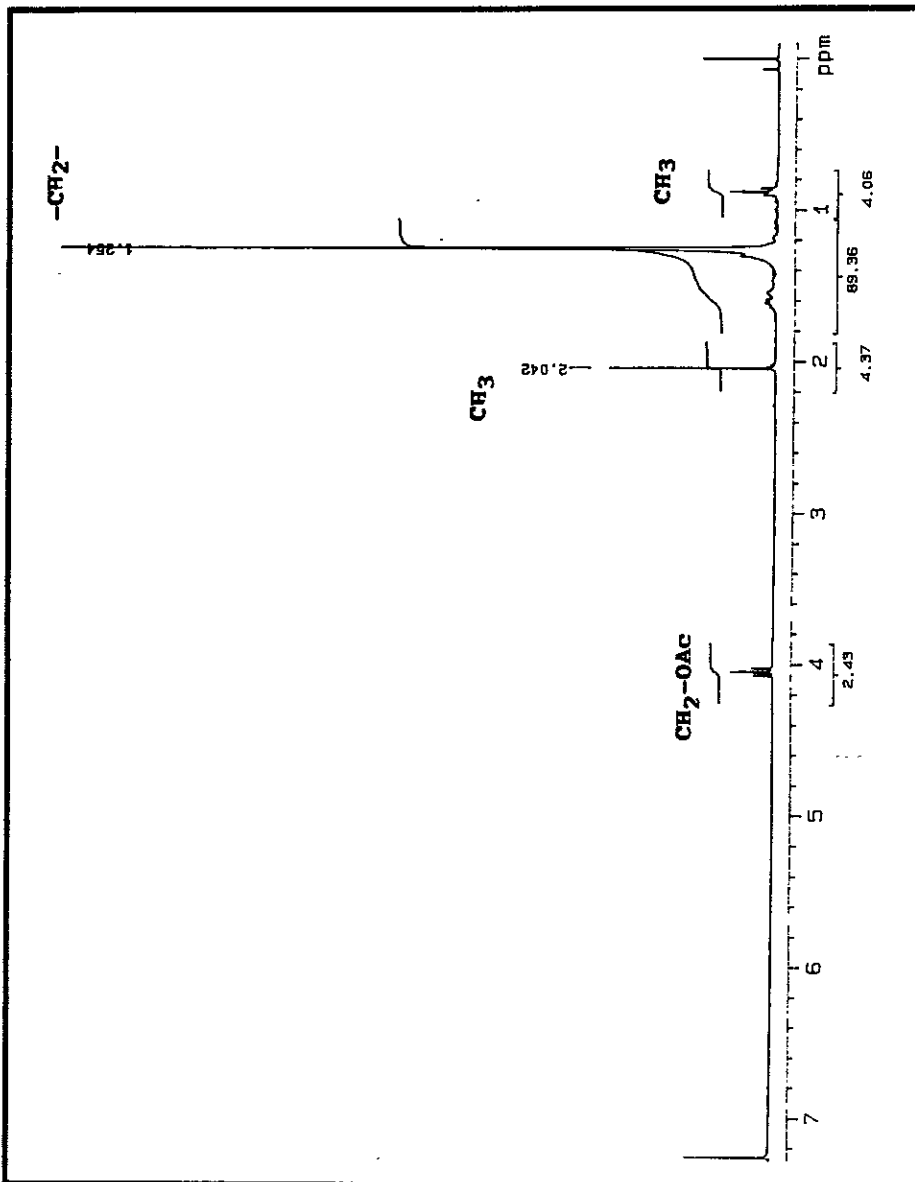
Espectro 7. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) del tridecaprenol.



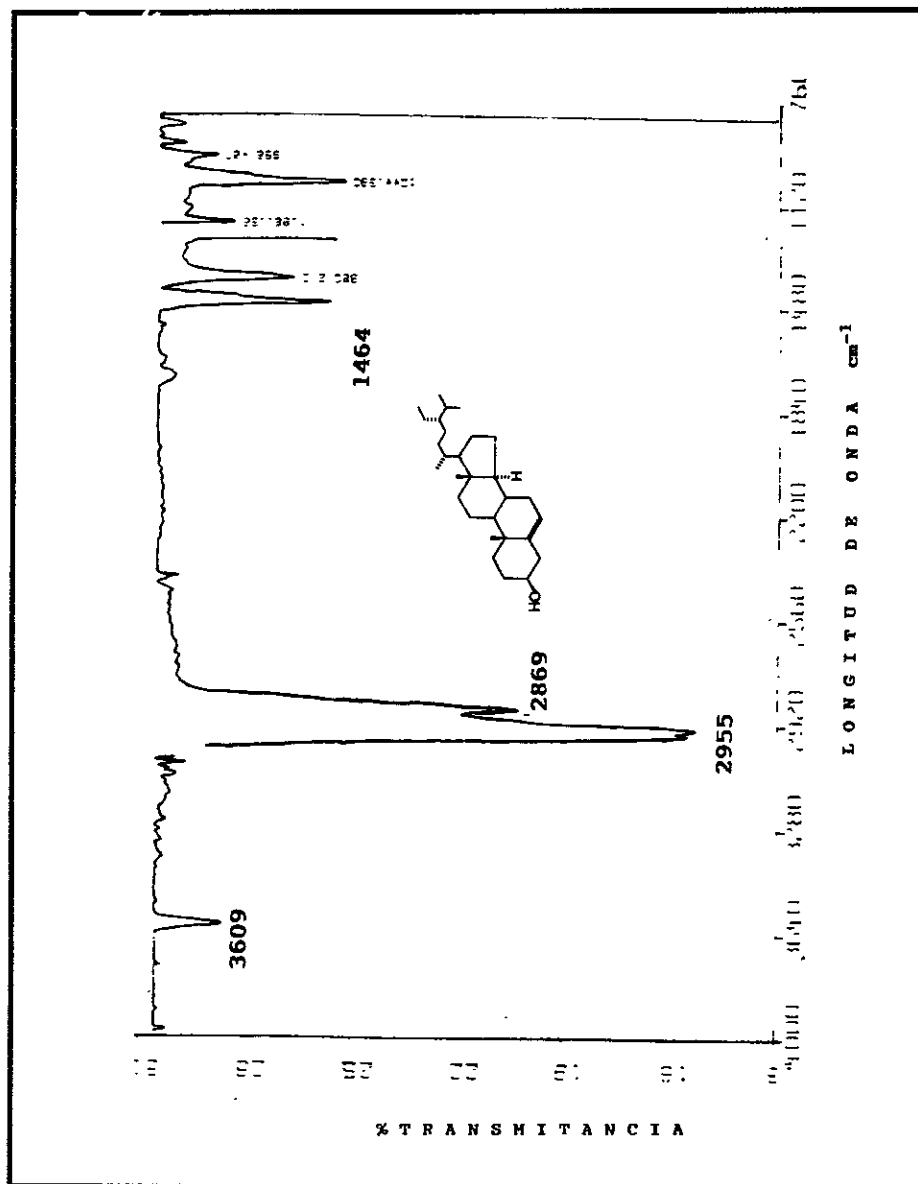
Espectro 8. IR (CHCl_3) del acetilado del tridecaprenol.



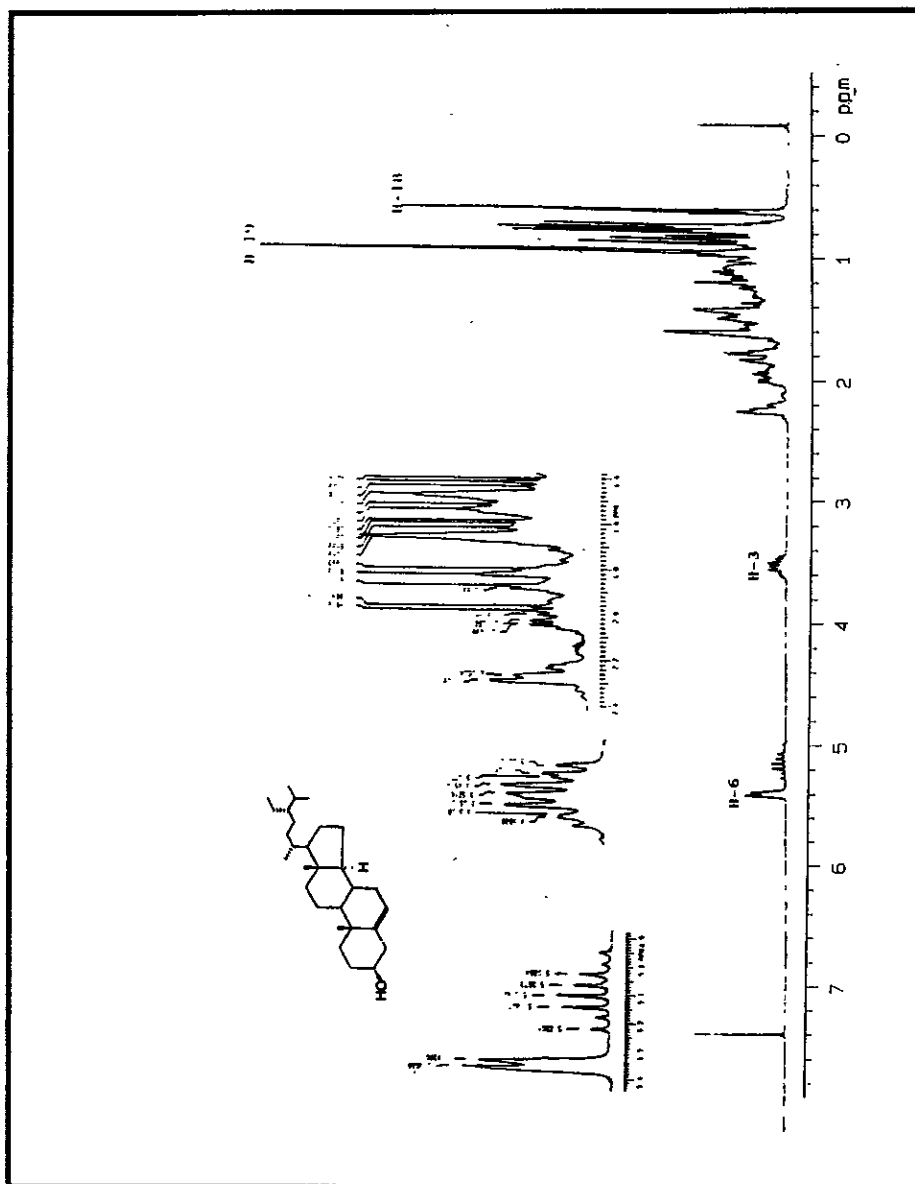
Espectro 9. RMN¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) del acetilado del tridecaprenol.



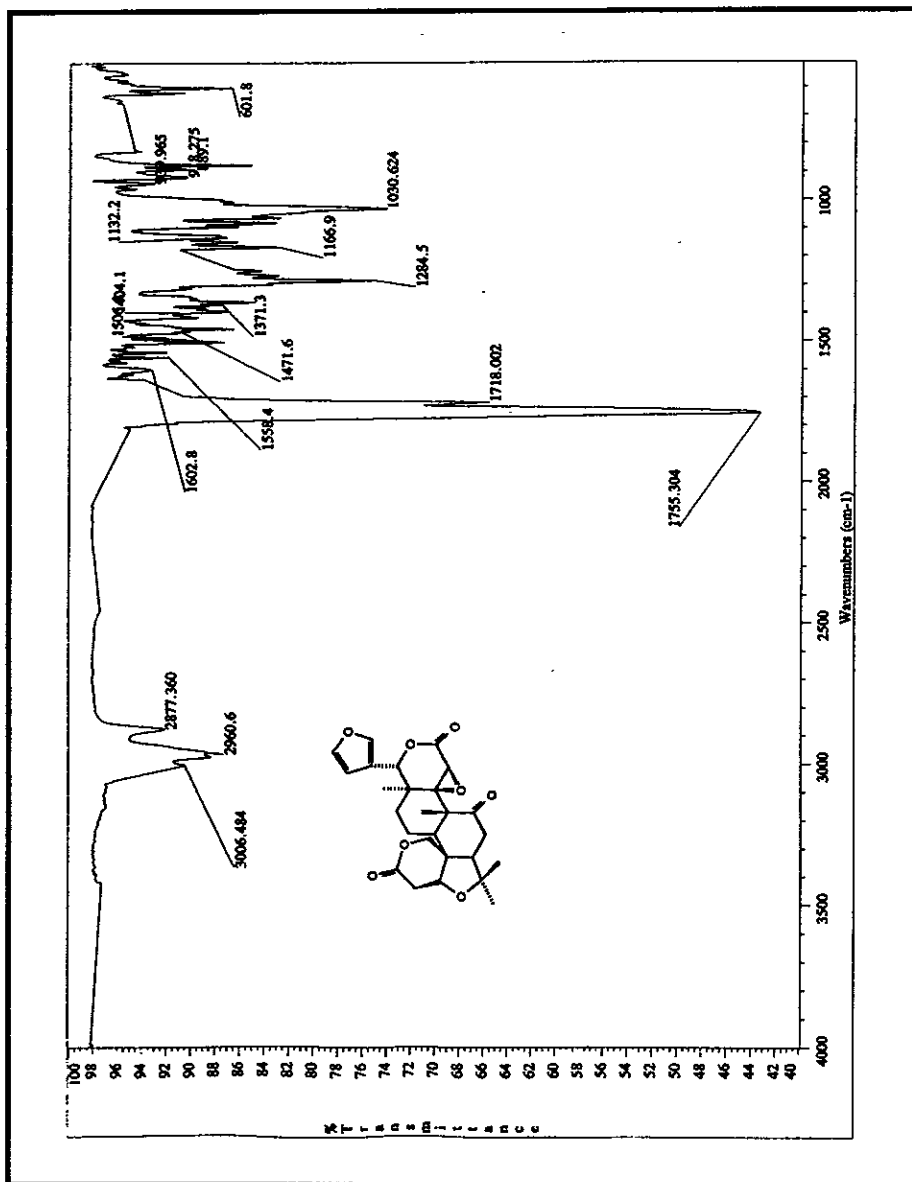
Espectro 10. IR (CHCl₃) del β-sitosterol.



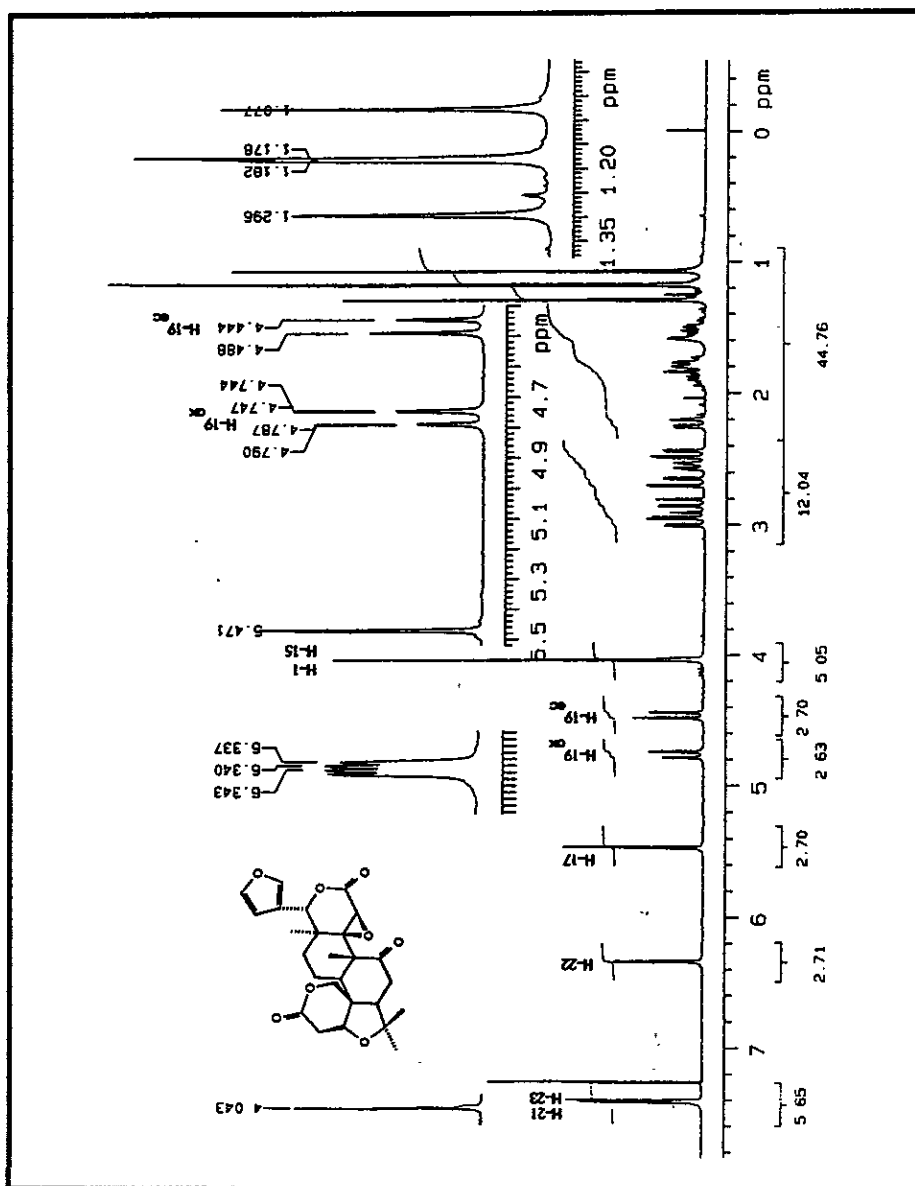
Espectro 13. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del β-sitosterol.



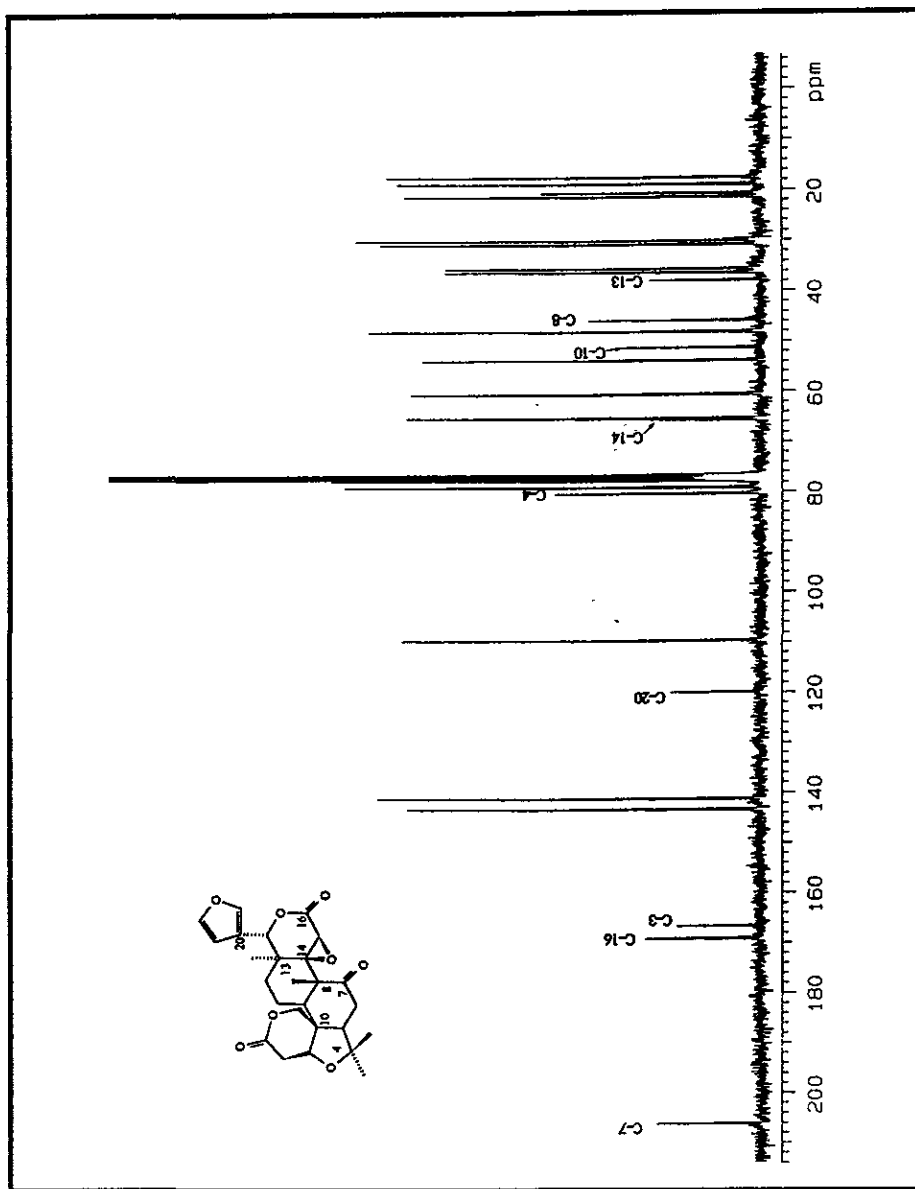
Espectro 14. IR (CHCl₃) de la limonina.



Espectro 13. RMN¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de la limonina.



Espectro 14. RMN¹³H (75 MHz, CDCl₃, TMS) de la limonina.



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Waterman, P. G. and Grundon, M. F. ; Chemistry and chemical Taxonomy of the Rutales. Academic Press Inc. London (1983).
- 2.- Rendle, A. D.; The classification of flowering plants. Vol.II. Cambridge. Great Britain (1956) 285-289 y 815-817.
- 3.- Kaastra, R. C.; New taxa and combinations in Rutaceae. *Acta Biot. Neerl* 26[6], 271 (1977).
- 4.- Greger, H. Hofer, O. Kähling, H. and Wurz, G.; Sulfur containing cinnamides with antifungal activity from *Glycosmis cyanocarpa*. *Tetrahedron* 48, 1209 (1992).
- 5.- Michael, J. P.; Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Products Reports*. 10, 163 (1994).
- 6.- Arruda, M. S. Fernandes, J. B. Vieira, P. C. and Pirani, J. R.; Chemistry of *Zanthoxylum rhoifolium*: An new secofuroquinoline alkaloid. *Biochemical Systematics. Ecology* 20, 173 (1992).
- 7.- Gray, A. Y. Hartley, T. J. Kong, Y. and Waterman, P. G.; The biochemical systematics of *Tetradium*, *Evodia* and *Melicope* and their significance in the Rutaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. 15, 587 (1987).
- 8.- Yenesew, A. and Dodne, E.; Alkaloids of *Teclea nobilis*. *Phytochemistry*. 27, 651 (1988).

- 9.- Paulini, H. Waibel, R. Keifer, J. and Shimmer, O.; Gravacridondiolacetato a new dihidrofuroacridone alkaloids from *Ruta graveolans*. *Planta Médica* 57, 82 (1990).
- 10.- Furukawa, H. Ito, C. Mizuno, T. Ju-ichi, M. Inove, M. Majiura, Y. and Omura, M.; Spectrometric elucidation of acrimarinas the first naturally occurring acridone-coumarin dimers. *Journal. Chemical. Society. Perkin Trans I*. 1593 (1990).
- 11.- Ulubelen, M. and Terem, B.; Alkaloids and coumarins from roots of *Ruta chapalensis*. *Phytochemistry* 27, 650 (1988).
- 12.- Grundon, M. F.; Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids. *Natural Products Reports* 5, 293 (1988).
- 13.- Schever, P. J. Chang, M. Y. and Swanhoum, C.; Hawaiian plant studies VIII, isolation of chelerytrine and dihydrochelerytrine from *Fagara semiarticulata* *Journal of. American. Chemical. Society* 27, 1427 (1962).
- 14.- Torto, F. G. Sefcovic, P. and Dadson, B. A.; Medicinal plants of Ghana identity of alkaloid from *Fagara xanthoxiloideae*. *Tetrahedron Letters*. 181 (1966).
- 15.- Wall, M. D. Wani, M. C. and Taylos, H.; Plant antitumor agents isolation, estructure and structure activity relationships of alkaloids fron *Fagara macrophylla*. *Journal Natural Products* 50, 1095 (1987).

- 16.- Mink, K. Gray, Y. A. and Waterman, G. P.; Benzophenanthridine alkaloids from the stem part of a *Zanthoxylum* species. *Phytochemistry* 26, 3251 (1987).
- 17.- Bhattacharyya, P. and Chakraborty, A.; Mukonal, a probable biogenic intermediate of pyranocarbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *Phytochemistry*. 23, 471 (1984).
- 18.- Bhattacharyya, P. Sarkar, T. Chakraborty, A. and Chowdhury, B.; Structure and synthesis of Glycozolinol, a new carbazole alkaloid from *Glycosmis pentaphylla*. *Indian Journal. Chemical* 23B, 49 (1984).
- 19.- Bhattacharyya, P.; Heptazolicine, a carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla*. *Phytochemistry* 23, 2409 (1984).
- 20.- Okarie, D. A.; A new carbazole alkaloid and coumarins from roots *Clausena anisata*. *Phytochemistry* 14, 2720 (1975).
- 21.- Cordell, G. M.; Alkaloids derived from anthranilic acid. Springer Verlag. New York. (1988) 237-253.
- 22.- Waterman, P. G.; Phytochemical diversity in the order Rutales, In: Phytochemical potential of tropical plants. (K. R. Downum, et. al.). Plenum Press. New York (1993) 203-233.
- 23.- Bruneton, J.; Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Acribia. Zaragoza (1991)

- 24.- Campbell, E. W. Finch, P. K. and Beant, P. A.; Isolation and identification of tree new phenolic furoquinoline alkaloids from *Teclea verdoorniana exell mendonca* (Rutaceae); *Journal Chemical Society Perkin I* (1982) 909-915.
- 25.- Ohmoto, T. and Koike, K.; Canthin-6-one-alkaloids (A, Brossi. de.), Vol.36. Academic Press. New York. (1989).
- 26.- Bhattacharyya, P. and Charkraborty, D. P.; Carbazole alkaloids in: *Forstschr, Chem. Organ. Naturstoffe* (W. Herz. Grisebach, H. and Kirby, G. W., eds). Vol. 52. Springer Verlag. New York. (1987). 159-209.
- 27.- Gray, Y. A. and Waterman, G. P.; Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry* 17, 845 (1978).
- 28.- Dreyer, D. L. and Pinchering, U. M.: Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry* 11, 705 (1972).
- 29.- Dreyer, D. L.; Botanical distribution and Chemotaxonomy in the Rutaceae. *Phytochemistry* 5, 367 (1966).
- 30.- Dreyer, D. L.; Rutaevin. *Journal of Organic Chemical* 32, 3442 (1967).
- 31.- Ramos, H. C.: Revisión Taxonómica de *Esenbeckia* (Rutaceae) de México. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM (1991).

- 32.-Vitagliano, J. C. and Comin, J.; Studies on Argentine plants XXVIII, alcaloids from *Esenbeckia febrifuga*. *Anales Asociación. Química. Argentina*. 58, 59 (1970).
- 33.-Vitagliano, J. C. and Comin, J.; Studies on Argentine plants XXIX, limonoids from *Esenbeckia febrifuga*, *Jus* and *Helieta longifoliata*. *Anales. Asociación. Química. Argentina*. 58, 273 (1970).
- 34.- Dreyer, D. L.; Alcaloids, limonoids and furanocoumarins from three mexican *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* 14,941(1980).
- 35.- Bevalot, F. Foumet, A. Moretti, C. *et. al.* Alcaloids from *Esenbeckia pilocarpoides*. *Planta Médica* 50, 522 (1984).
- 36.- Ríos, M. Y. and Delgado, G.; Poliprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. *Phytochemistry* 31. 349 (1992).
- 37.- Ríos, M. Y. and Delgado, G.; Terpenoids and alkaloids from *Esenbeckia belizcensis* spontaneous oxidation of furoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products* 55, 1307 (1992)
- 38.- Monache, F. D. Monache, G. D.; Moraes e Souza, M. A., *et. al.* Isopentenylinole derivates and components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazzetta Chimical Italiana*. 435 (1989).
- 39.- Monache, F. D. and Benadetto, R.: *Esenbeckia leiocarpa* 11a further components. *Gazzetta Chimical Italiana* 387 (1990).

- 40.- Kubo, Y.; Recent applications of counter current chromatography to the isolation of bioactive natural products. *Journal of Chromatography* 187 (1991).
- 41.- Rodríguez, C. S.; Aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. (1995).
- 42.- Méndez, S. M.; Estudio químico de *Esenbeckia berlandieri* ssp *berlandieri* Baillon ex Hemsley. Como una contribución al conocimiento químico del género *Esenbeckia*. Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. (1995).
- 43.- Guithan, G. M. Baetas, A. C. Maia, J. G., and Conserva, L. M.; 2-alkil-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*. *Phytochemistry* 37, 1193(1994).
- 44.- Espinoza, C. M.; Caracterización, identificación y determinación de la actividad biológica de flavanonas preniladas aisladas de *Esenbeckia berlandieri* ssp *acapulcensis* (Rose). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM (1996).
- 45.- Olvera, F. M., Santana, A., Conserva, L., Maia, J., and Guithan, G. M., Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* 41,647(1996).
- 46.- Coll, J. C. and Bromdu, B. F.: The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal. Natatural. Products.* 49, 934 (1980).

- 47.- Silverstein, R. M. Bassler, G. C. and Morrill, T. C.; *Spectrometric identification of organic compounds* 4a. ed. John Wiley & Sons. New York (1981) 115-121.
- 48.- Nes, W. R. and Mckean, M. L.; *Biochemistry of steroids and other isopentenoids*. Park Press. U.S.A. (1977) 231-253
- 49.- Corey, J. E. and Ursprung, J. J.; Enzymic synthesis of β .amyrin from 2,3-oxidosqualene, *Journal of American Chemical Society* 87, 3302 (1967).
- 50.-Gunatilaka, A. I. Dhammika, R. Nanayallara, N. P. and Wazeer, M. I.; ^{13}C NMR spectra of some D: A friedo-oleananes. *Phytochemistry* 22, 991 (1983).
- 51.- Budzikiewicz, H. Wilson, J. M. and Djerassi, C.; Mass spectrometry in structural and stereochemical problems XXXII. pentacyclic triterpenos. *Journal of American Chemical Society* 85, 3688 (1963).
- 52.- Karliner, J. and Djerassi, C.; Mass spectral and nuclear magnetic resonance studies of pentacyclic triterpene hydrocarbons. *Journal of American Chemical Society* 11, 1945 (1966).
- 53.- Courtney, J. L. and Shannon, J. S.. Studies in mass spectrometry triterpenoids: structure assignnet to some friedelane derivatives. *Tetrahedron Letters* 13, (1963).

- 54.- Shannon, J. S., and Courtney, J. L.; Studies in mass spectrometry triterpenoids: Structure assignment to Friedelan-Y-one (Y-al) and derivatives. *Tetrahedron Letters* 173 (1967).
- 55.- Corey, E. J., and Ursprung, J. J.; The structures of the triterpenes fridelin and cerin. *Journal of American Chemical Society* 78, 5041 (1956).
- 56.- Rubistein, I. L. Goad, J. A. Clague, D. G. and Lawrence, J.; The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15, 195 (1976).
- 57.- Agrawal, P. K.; NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 10 (1992).
- 58.- Seibl, J. Calderón, J. and Stud, M.; *Espectrometría de masas*. Ed. Alhambra, Barcelona (1973). 50-78.
- 59.- Thompson, M. J. Dutky, S. R. Patterson. G. W. and Gooden E. L.; NMR spectra of C-24 isomeric sterols. *Phytochemistry* 11, 1781 (1972).
- 60.- Leitao, S. G. Kaplan, M. A. Monache, F. D. Akihisa, T. and Tamura, T.; Sterols and sterol glucosides from two *Aegiphila* species. *Phytochemistry* 31, 2813 (1992).
- 61.- Dreyer, D. L.; Citrus Bitter Principles VI. *Journal of Organic Chemistry* 31, 2279 (1966).

- 62.- Baarschers, W. H.; The mass spectra of 3-substituted furans. *Organic Mass Spectrometry* 6, 367 (1972).
- 63.- Dominguez, A. X.; Métodos de investigación Fitoquímica: Ed Limusa, México (1973) 81-87, 111-115.
- 64.-Dreyer, D. L.; Citrus Bitter Principles II · Application of NMR to structural and stereochemical problems. *Tetrahedron* 21, 75 (1965).
- 65.- Dreyer, D. L. Bennett, R. D and Basa, S. C.: Limonoids from *Atalantia monophylla*, *Tetrahedron* 32, 2367 (1976).
- 66.-Bennett, R. D. and Hasegawa, H.; 7- α -oxygenated limonoids from the *Rutaceae*. *Phytochemistry* 21, 2349 (1982).
- 67.- Burke, B. H. Chan, W. R. and Taylor D. R.; The structure and stereochemistry of *Spathelin*, a new seco-ring A tetranortriterpene from *Spathelia sorbifolia*. *Tetrahedron* 28, 425 (1972).