



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS XANTONAS AISLADAS DEL DURAMEN DE *Calophyllum brasiliensis*"

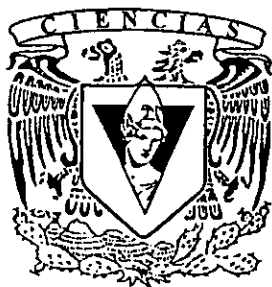
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

ELIZABETH ESTRADA MUÑOZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

263386



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

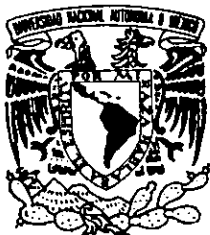


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"ESTUDIO QUIMICO Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LAS XANTONAS AISLADAS DEL DURAMEN DE  
Calophyllum brasiliensis."

realizado por ELIZABETH ESTRADA MUÑIZ

con número de cuenta 8708572-1 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. Ricardo Reyes Chilpa.  
Director de Tesis  
Propietario

Dr. Manuel Jimenez Estrada.  
Propietario

M. en C. Javier Antonio Taboada Ramirez.  
Propietario

Dr. Helia Reyna Osuna Fernández.  
Suplente

M. en B. Julia Cassani Hernández.  
Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suarez D.

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**Esta tesis se realizó en el Laboratorio 2-8 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de los doctores Ricardo Reyes Chilpa y Manuel Jiménez Estrada.**

Deseo dedicar este trabajo:

A mi Madre Sra. Rosa María Muñiz O. por que sin ella no hubiera sido posible llegar hasta aqui GRACIAS.

A mis hermanos Angelica  
y  
Mauricio

A Raymundo Cruz por su apoyo en todo momento, por su amistad, comprensión y amor GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer de manera muy especial a los doctores Ricardo Reyes Chilpa y Manuel Jiménez Estrada, por la confianza que han depositado en mí al permitirme ingresar a su laboratorio y dirigir este trabajo que hace que yo concluya una etapa de mi vida profesional. Por brindarme su amistad y compartir conmigo sus conocimientos.

Agradezco a la Dr. Ana Luisa Anaya Lang y la Biól. Blanca Hernández por la orientación y facilidades prestadas para la elaboración de las pruebas biológicas.

A el programa " Economic Botany in Latin America and the Caribbean -PREBELAC-" de THE NEW YORK BOTANICAL GARDEN por la beca otorgada.

A la DGAPA-UNAM (Proyecto IN21496) por el financiamiento otorgado para adquirir reactivos, equipo y material de laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio 2-8. En especial al Dr. Arturo Navarro Ocaña, Quím. Beatriz Gonzalez P. y M. en C. Dagoberto Alavez S. por sus acertados comentarios que me hicieron en todo momento así como su amistad desinteresada.

A mis compañeros y amigos de la generación 90-93. En especial a Fer, Amelia, al niño (Ale), al querubin, a Sara, a Elvis, Panchis, Salomón, por todos los momentos compartidos que hicieron de la carrera una gran aventura.

Finalmente a mis jefes que fueron muy buena onda y siempre en la medida de sus posibilidades me apoyaran y me brindaron su amistad (Franco Vazquez (DEPFI), Leticia Flores (CI). Así como al personal de la Biblioteca del Centro de Instrumentos (Rocio y Gloria) por su amistad y confianza.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página.
<b>Resumen</b>	
<b>1 Introducción</b>	1
<b>2 Antecedentes</b>	3
2.1 La madera	3
2.1.1. Anatomía de la madera	3
2.1.2. Composición química de la madera	5
2.1.3. Los hongos degradadores de la madera	6
2.1.4. Tipos de pudrición	7
2.1.5. Durabilidad	8
2.2. Antecedentes de <i>Calophyllum brasiliensis</i> .	9
2.2.1. Taxonomía	9
2.2.2. Morfología	10
2.2.3. Distribución y Ecología	10
2.2.4. Usos industriales	11
2.2.5. Etnobotánica	11
2.2.6. Fitoquímica	13
2.2.7. Resistencia natural de la madera	17
<b>3. Objetivos</b>	19
<b>4. Materiales y Metodos</b>	20
4.1. Material biológico	20
4.2. Aislamiento e identificación de los compuestos	20
4.2.1. Extracción de la madera	20
4.2.2. Instrumentación y Cromatografía	20
4.2.3. Extracto Hexánico	21
4.2.4. Extracto Acetónico	21
4.2.5. Extracto Metanólico	22
4.3. Transformaciones químicas	22
4.3.1. Acetilación del Compuesto V	22
4.3.2. Acetilación de la Mezcla III y IV	23
4.4. Actividad Antifúngica	23
<b>5. Resultados</b>	26
5.1. Rendimiento de los extractos	26
5.2. Composición química de la madera	26
5.3. Compuestos obtenidos del extracto hexánico	26
5.4. Compuestos obtenidos del extracto acetónico	27
5.4.1. 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V).	27
5.4.2. 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV)	30
5.4.3. 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (II)	31

## TABLA DE CONTENIDO

5.4.4. 6-desoxijacareubeina (I)	31
5.4.5. Jacareubeina (III)	32
5.5. Compuestos obtenidos del extracto metanólico	33
5.6. Rendimiento de los compuestos obtenidos	34
5.7. Actividad Biológica	39
5.7.1. Efecto de los extractos	39
5.7.2. Efecto de las xantonas	40
6. Discusión	44
7. Conclusiones	49
8. Bibliografía	50
Espectros	55



## RESUMEN

*Calophyllum brasiliensis* (Guttiferae) es un árbol que se distribuye en las selvas altas perennifolias y subperennifolias de México. La madera es de excelente calidad y es usada industrialmente. Se ha determinado que la madera de duramen es altamente resistente a organismos degradadores como hongos y termitas. Esta propiedad podría estar determinada por su contenido de metabolitos secundarios. Por tal motivo se realizó un estudio químico y biológico. Se prepararon 4 extractos (hexano, acetona, metanol y agua) del duramen y se aislaron e identificaron sus principales constituyentes químicos. Se evaluó la actividad de extractos y compuestos contra el hongo xilofago *Postia placenta*.

Los extractos se obtuvieron con rendimientos en un rango de 0.04% (hexano) a 4.81% (acetona). Los extractos de metanol, acetona y agua (5 mg/ml=5%) inhibieron el crecimiento micelial del hongo de pudrición morena *P. placenta* en un 83%, 59% y 21% respectivamente. El extracto de hexano no se probó debido a su bajo rendimiento.

Los extractos de acetona y metanol se sometieron a cromatografía en columna. Se aislaron 5 xantonas preniladas: 6-desoxijacareubeina (I), 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-methoxixantona (II), Jacareubeina (III), 1,3,5,-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V). Las xantonas III, IV y especialmente el compuesto V fueron los constituyentes mayoritarios de ambos extractos. Todos las xantonas inhibieron: a una concentración de 0.25 mg/ml el crecimiento micelial de *P. placenta*. Dicha inhibición se encontró en un rango de 55.5% (V) a 67.3% (mezcla de III y IV). Bajo las mismas condiciones los productos obtenidos por acetilación no mostraron una diferencia respecto al efecto inhibitorio de los productos naturales. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los metabolitos secundarios del duramen son los responsables de la resistencia natural de la madera al biodeterioro causado por factores bióticos.

## 1.INTRODUCCION

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo: primario y secundario. En el primero se sintetizan compuestos como aminoácidos, glucósidos, nucleótidos, lípidos, etc. En el segundo se sintetizan compuestos como: alcaloides, flavonoides, xantonas, terpenos, etc.

Los metabolitos primarios son esenciales para las células. A partir de estos compuestos se producen los llamados metabolitos secundarios. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en el reino vegetal, y son muy diversos. Se calcula que existen alrededor de 30,000 diferentes compuestos. En la actualidad no se ha podido esclarecer su función metabólica o fisiológica de estos, por lo cual en el pasado se les consideró meros productos de desecho (Dirzo, 1985; Estrada *et al.*, 1995). No obstante lo anterior, los metabolitos secundarios deben tener algún significado biológico ya que son biosintetizados y biodegradados activamente por las células (Gross *et al.*, 1985).

Muchos de los metabolitos secundarios se limitan a especies o subespecies únicas, variando en tipo y cantidad de estos, por consiguiente son una evidencia de la individualidad de los organismos que los contienen confiriéndole un valor taxonómico (Estrada *et al.*, 1995). Actualmente se ha determinado que los metabolitos secundarios tienen un propósito ecológico y un significado evolutivo, ya que están estrechamente involucrados en las complejas interacciones ecológicas entre plantas y otros organismos. Una de estas, es la defensa química contra patógenos y herbívoros. De esta forma se piensa que las plantas producen diversos metabolitos secundarios como medio para repeler a sus depredadores ya sea por su sabor, olor e incluso toxicidad, de tal forma que pueden causar muchos trastornos al depredador o inclusive la muerte del mismo (Estrada *et al.*, 1995).

Los metabolitos secundarios se pueden encontrar en todos los tejidos vegetales. En los tejidos leñosos son muy abundantes y presentan una gran diversidad estructural. Se ha demostrado que algunas de estas sustancias poseen propiedades tóxicas y/o repelentes a organismos degradadores de la madera como son hongos y termitas (Reyes-Chilpa, 1997; McDaniel 1992, Reyes Chilpa *et al.*, 1995; Deon 1983, Gomez *et al.*, 1990). Es por lo anterior que estos compuestos son considerados como los responsables principales de la resistencia natural de la madera al ataque de los organismos degradadores (Reyes-Chilpa, 1997).

En la presente tesis se estudió el papel de los metabolitos secundarios en la resistencia natural de la madera de *Calophyllum brasiliensis*, al ataque del hongo de pudrición morena *Postia placenta*. *Calophyllum brasiliensis* es un árbol tropical de México de importancia comercial, cuya madera es conocida por su alta durabilidad y resistencia a hongos y termitas. De esta madera se aislaron e identificaron 5 compuestos del tipo de las xantonas preniladas. Se evaluó la capacidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento micelial del hongo xilófago *Postia placenta*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 La madera.

#### 2.1.1 Anatomía de la madera.

La madera forma parte importante en los ecosistemas forestales, ya que constituye un enorme depósito de materiales orgánicos. Los tejidos de la madera equivalen al 90 % de la biomasa total (en peso seco). Los troncos y ramas contribuyen con el 70 % y las raíces con el 20 % restantes.

La madera es un material orgánico que es producida por muchas plantas, pero la madera que tiene un valor comercial se obtiene principalmente de troncos de árboles forestales. Al realizar un corte transversal de un árbol a la altura del tronco o fuste, se pueden observar a simple vista diferentes capas que forman circunferencias de grosor variable y que caracterizan a la madera. (Figura 1). En la parte más externa encontramos la corteza, tejido constituido por células muertas y que tiene como función proteger las capas interiores. Inmediatamente por debajo de esta encontramos una capa llamada floema por la cual circula la savia descendente, rica en nutrientes manufacturados por las hojas, que alimentan el proceso de crecimiento secundario que tiene su origen en el cambium vascular. A esta capa le continúa otra muy delgada visible únicamente por microscopio, denominada cambium vascular, esta capa es la que forma las nuevas células que dan origen al floema y al xilema.

El xilema es la zona más evidente que se observa al realizar un corte transversal del tronco. En esta zona se pueden observar dependiendo de la especie dos regiones las cuales se distinguen por el color. La región más externa y cercana a la corteza se llama albura. Esta es de color más claro, mientras que la región central es denominada duramen, la cual es de color más oscuro (Echenique-Manrique *et al.*, 1993).

La albura o madera blanda es la zona por donde circulan los minerales y nutrientes disueltos en la savia, que fueron absorbidos por las raíces. La albura esta constituida por células parenquimatosas, llamadas traqueidas, estas presentan numerosas puntuaciones areoladas. El agua y minerales ascienden más allá a través de estas puntuaciones presentes en las células que se conectan entre si y de esta forma hacen el transporte del agua y minerales más eficiente. Con el paso de los años dependiendo de la especie, las paredes inferiores de las células viejas que constituyen el xilema se van

engrosando gradualmente debido al depósito de "productos de desecho", (taninos, gomas, y resinas) Estos desechos que se acumulan en las células impiden el transporte eficiente del agua lo que ocasiona la muerte de esta parte del xilema la cual es llamada duramen, madera dura o corazón. El depósito de estas sustancias le confiere a esta zona el color oscuro que la diferencia de la albura, es por esto que cuando se realizan cortes de árboles jóvenes estos están constituidos principalmente por albura, mientras que en árboles maduros encontramos que presentan una zona amplia de duramen (Page, 1983).

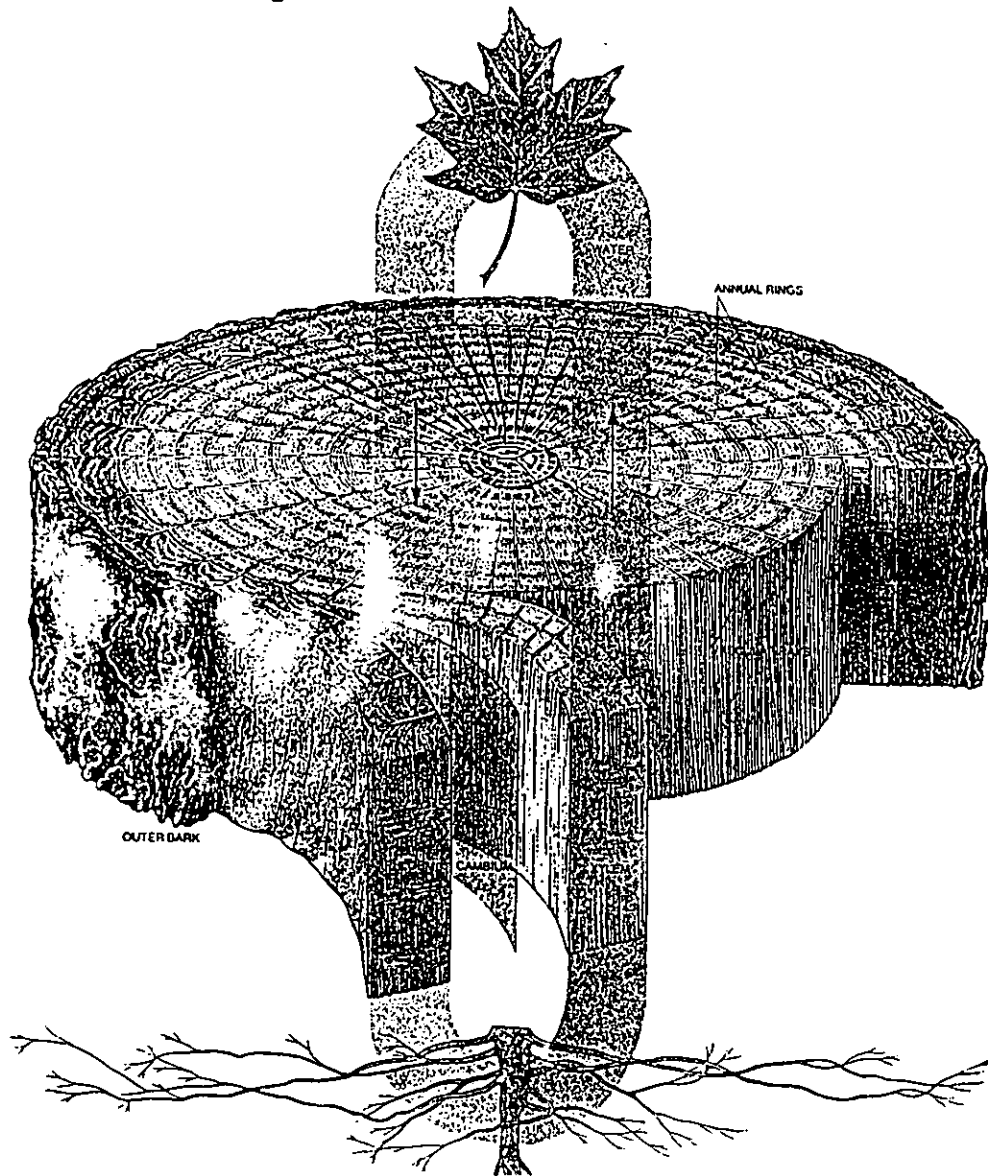


Figura 1. Corte transversal de un tronco (tomado de Page, 1983).

### 2.1.2. Composición química de la madera.

La madera esta constituida principalmente por tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales le confieren su estructura y propiedades. De estos, el más importante y abundante es la celulosa (35 al 45%), la cual es un polímero lineal de unidades de anhidro-D-glucopiranososa con enlaces  $\beta$ -1-4 glucosídicos. (Echenique-Manrique *et al.*, 1993). Estas cadenas de celulosa constituyen microfibrillas, que forman el esqueleto de la madera. La hemicelulosa es menos abundante (20 a 45 %) y es un polisacárido constituido por residuos de azúcares como xilosa, glucosa, manosa, galactosa y arabinosa. Estos polímeros son ramificados. La lignina esta presente en la madera de un 15 a un 35 % y es un polímero amorfo constituido por unidades fenólicas.

La celulosa forma las paredes secundarias, mientras que la hemicelulosa y lignina se localizan entre las capas de dichas paredes. La hemicelulosa forma una matriz de polímeros y actua como sosten de los filamentos celulósicos, mientras que la lignina actua como cementante entre las capas de celulosa (Page, 1983).

Además de estos polímeros estructurales se encuentran otros compuestos que no forman parte de la estructura de la madera, como son carbohidratos simples, almidón, elementos minerales y metabolitos secundarios o extractivos. El término extractivo incluye una gran variedad de compuesto químicos, tanto primarios como secundarios. Ente los primarios tenemos, lípidos, ácidos grasos, etc, entre los secundarios, los principales son : flavonoides isoflavonoides, lignanos, triterpenos, cumarinas, xantonas, compuestos aromáticos y aceites volátiles. Las especies de madera difieren mucho en cuanto al tipo y cantidad de extractivos que tienen. Tambien existe una considerable variación en la distribución de los extractivos en la madera de árboles individuales. Los extractivos no forman parte de la estructura de la pared celular y constituyen entre el 3 y 4 % de la masa seca de la madera y en algunas especies tropicales hasta un 25 %. Son los extractivos los principales responsables de impartir a la madera olores y sabores muy característicos. La madera de algunas especies a las que los extractivos imparten dichas características, son también muy resistentes al ataque de hongos e insectos, razón por la cual se considera que estos compuestos estan estrechamente relacionados con la resistencia natural a agentes degradadores. (Echanique-Manrique *et al.*, 1993).

### 2.1.3. Los hongos degradadores de la madera.

Bajo condiciones naturales, la degradación de la madera es un acontecimiento muy importante ya que de esta manera se restituyen al suelo los componentes químicos, que están parcialmente inmovilizados, y de esta forma son nuevamente accesibles para otros organismos. Bajo este punto de vista los hongos y otros organismos degradadores de la madera como los insectos y escarabajos juegan un rol decisivo en el reciclaje de materia.

Los hongos que degradan a la madera, también llamados xilófagos, desempeñan una función importante dentro de la naturaleza, pero no así cuando destruyen objetos de madera útiles para el hombre. Dentro del reino Fungi, diversas especies de Ascomicetes y Deuteromicetes son capaces de degradar la celulosa. Sin embargo son los Basidiomicetes, los principales destructores de la madera. Algunas especies degradan celulosa y hemicelulosa, otras más degradan incluso lignina. En lugares donde se almacena la madera por tiempos más o menos largos, si ésta no está bien seca o si existe humedad en el medio, prosperan los hongos. Para que estos se desarrollen deben existir por lo menos dos condiciones: a) El contenido de humedad de la madera debe ser superior al punto de saturación de la fibra (30%) e inferior al 90 %. Si la madera está saturada de agua, los hongos tampoco pueden prosperar por la falta de oxígeno; b) La temperatura del ambiente debe ser mayor a 24 °C e inferior a 32 °C (Pérez *et al.*, 1994). Bajo estas condiciones ambientales, los hongos se desarrollan, haciendo que la madera pierda peso, se degrade y manche, lo cual disminuye su valor y utilidad (Herrera *et al.*, 1990).

Los hongos xilófagos están constituidos de filamentos llamados hifas, estas estructuras se desarrollan en abundancia, se ramifican, entrelazan y anastomosan, formando una estructura filamentosa llamada micelio. Son las hifas las que le confieren a los hongos la capacidad de degradar los tejidos leñosos debido a la habilidad de penetrar dicho tejido. A partir del micelio se forman estructuras reproductivas llamadas cuerpos fructíferos. Dichas estructuras contienen en su interior miles de esporas las cuales son liberadas al medio después de madurar. Si las condiciones son las adecuadas, las esporas producen micelio sobre el nuevo sustrato, causando una nueva infección (Pérez *et al.*, 1994)

#### 2.1.4. Tipos de pudrición

Los hongos se pueden clasificar en dos categorías según el tipo de ataque sobre la madera:

- A) Los hongos manchadores y mohos (Ascomicetes y Deuteromicetes)
- B) Los hongos xilófagos (Basidiomicetes)

A) En la primera categoría tenemos a aquellos que presentan hifas de color pardo oscuro, las cuales penetran la albura dando la apariencia de vetas o manchas azul-gris o negras. Este tipo de hongos degrada principalmente almidones y azúcares, mientras que los mohos se desarrollan en la superficie de la madera, produciendo esporas de color verde o negro con apariencia algodonosa. Estos mohos consumen solo azúcares libres y almidones.

Este grupo altera la apariencia estética de la madera, pero tiene efectos casi nulos sobre su resistencia mecánica; sin embargo la resistencia al impacto (tenacidad) puede ser afectada negativamente cuando el manchado de la madera es severo y da la pauta para que colonicen aquellos hongos que si pudren la madera (Echenique-Manrique *et al.*, 1993).

B) En la segunda categoría se ubican los hongos que causan la pudrición de la madera atacando componentes estructurales como celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que ocasiona una pérdida de peso y resistencia mecánica de la madera. Esta categoría se subdivide a su vez en tres grupos y estos se distinguen principalmente por el tipo de pudrición que ocasionan:

- 1) Pudrición blanda
- 2) Pudrición blanca.
- 3) Pudrición morena

Los hongos de pudrición blanda degradan principalmente celulosa y hemicelulosa y en menor grado lignina. Estos hongos crecen en las paredes secundarias de las fibras de la madera, formando cavidades cilíndricas con fondos cónicos, por su tipo de ataque causan el ablandamiento de las capas superficiales de la madera (Eriksson, 1981; Highley *et al.*, 1979). Este tipo de pudrición es menos frecuente, ya que para que se desarrolle requiere de condiciones muy húmedas, como las que existen en las torres de enfriamiento (Perez *et al.*, 1994).



El patrón de ataque que presentan los hongos de pudrición morena y blanca es similar, no así el sistema que siguen para degradar los componentes estructurales. El ataque por ambos grupos de hongos inicia cuando las hifas penetran la pared celular moviéndose de una célula a otra a través de puntuaciones presentes en las células o mediante cavidades, desarrollando micelio en los lúmenes de las paredes celulares.

Los hongos de **pudrición blanca** degradan los tres componentes estructurales de la madera: celulosa, hemicelulosa y lignina. La degradación de la madera se inicia con la actividad de las endo  $\beta$ -1,4-glucanasas que hidrolizan al azar los enlaces  $\beta$ -1,4 a lo largo de la cadena de celulosa seguida por la actividad de una exo  $\beta$ -1,4 glucanasa que libera unidades de celobiosa o glucosa a partir del extremo no reductor de la celulosa. Finalmente la  $\beta$ -1,4 glucosidasa hidroliza celobiosa y celodextrinas solubles en agua liberando glucosa. Además hidrolizan el ácido celobiónico liberando glucosa y gluconolactosa (Eriksson, 1981; Highley *et al.* 1979).

Los hongos de **pudrición morena** degradan al igual que los hongos de pudrición blanda, la celulosa y hemicelulosa pero solo parcialmente la lignina. El proceso de degradación difiere del que presentan los hongos de pudrición blanca, ya que éste no es completamente enzimático. Solo cuentan con la actividad de la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y carecen de la exo- $\beta$ -1,4 glucanasa, razón por la cual aparentemente no podrían degradar la celulosa cristalina. No obstante estos hongos depolimerizan la celulosa rápidamente durante las primeras etapas de la pudrición de la madera. Koenigs (1974) propone que el ataque inicial hacia la celulosa cristalina es a través de un sistema  $H_2O_2/Fe^{++}$ . Esto es mediante un proceso de degradación oxidativo. Aunque los hongos que provocan pudrición blanca también producen  $H_2O_2$ , este es degradado rápidamente por enzimas como la catalasa, lo cual no ocurre en los hongos de pudrición morena (Eriksson, 1981; Highley *et al.*, 1979).

### 2.1.5. Durabilidad

La durabilidad de una madera se define como su capacidad intrínseca para resistir el ataque combinado de los factores bióticos (hongos, termitas, etc) y abióticos (agentes físicos: humedad, aire, fuego, etc), que la degradan en condiciones de servicio. Esta propiedad varía entre las diferentes especies, siendo algunas maderas poco, moderadamente o muy durables (Perez *et al.*, 1994).

El término "Resistencia natural" se emplea en relación a la capacidad de una madera para resistir a un agente degradador en particular (por ejemplo un hongo o termita). Dicha resistencia esta asociada principalmente a la presencia de metabolitos secundarios o extractivos, componentes químicos no estructurales de la madera. Esta propiedad de la madera varía en el tronco de un mismo árbol, existiendo diferencias entre la de madera de albura y de duramen. La madera de albura es considerada poco resistente debido a su baja o nula concentración de extractivos (Deón, 1983). Mientras que la madera de duramen es más resistente por su alto contenido de metabolitos secundarios. En el duramen existe un patrón de incremento radial en la concentración de extractivos desde el duramen interno hacia el externo, el cual está relacionado con un aumento en la resistencia a la pudrición en el mismo sentido (Clark y Scheffer, 1983; Deón, 1983). La extracción de los extractivos del duramen con disolventes orgánicos neutros, agua, soluciones diluidas alcalinas o ácidas puede provocar una disminución notable en su resistencia (Deón, 1983). También se ha demostrado que la adición de estos extractivos en un medio de crecimiento o la impregnación de estos en alguna madera con baja resistencia a la degradación, inhiben el crecimiento de hongos xilófagos o aumentan la resistencia del tejido leñoso (Bultman y Ritchie, 1976; Eslyn, Bultman y Jurd, 1981; Reyes-Chilpa *et al.*, 1997).

Existen diferentes metodos para evaluar la durabilidad, por ejemplo la "prueba de cementerio" la cual consiste en enterrar estacas de madera en una zona de alto riesgo ambiental al biodeterio. Para evaluar la resistencia natural existen pruebas como la de suelo-bloque la cual se lleva a cabo en el laboratorio o en el campo y permite evaluar la resistencia a agentes degradadores (hongos y termitas) de una madera (Perez *et al.*, 1994). La investigación sobre las bases químicas que estan estrechamente involucradas en la resistencia natural de árboles tropicales permitirá a futuro desarrollar nuevos preservadores de toxicidad selectiva y de menor riesgo ambiental y para la salud humana (Reyes-Chilpa 1987; Eslyn, Bultman y Jurd 1981).

## 2.2. Antecedentes de *Calophyllum brasiliensis*

### 2.2.1. Taxonomía

*Calophyllum brasiliensis* Camb. es un árbol caducifolio con una altura aproximada de 40 a 50 metros y con un diámetro a la altura del pecho (d.a.p.) de aproximadamente 1.80 metros. El tronco es derecho, con ramas

ascendentes, copa redondeada y densa. Pertenece a la familia Guttiferae la cual incluye alrededor de 1000 especies confinadas principalmente a los trópicos. Esta familia está constituida por seis subfamilias. Una de estas es Calophylloideae que contiene la tribu Calophylleae. A su vez está agrupada a tres géneros incluyendo a *Calophyllum*. El género está constituido por aproximadamente 130 especies (Bennet *et al.*, 1989).

### 2.2.2. Morfología

La corteza tiene un espesor aproximado de 10 a 20 mm, es de color café oscuro con fisuras que forman diamantes, presenta un exudado lechoso de color amarillo intenso. El duramen varía de color rosa claro a café rojizo, frecuentemente marcado por bandas finas más oscuras de pa enquima. La albura es de un espesor aproximado de 3.5 a 6.5 cm, es de color café claro. La zona de transición entre la albura y el duramen está bien definida. Su textura es media y uniforme. Es poco lustrosa, sin olor ni sabor, parecida a la caoba. Las hojas son coriáceas, simples decusadas, elípticas u oblongas, con el ápice agudo, de color verde oscuro y brillante en el haz y verde pálido en el envés con nervaduras numerosas y paralelas. Algunos árboles de esta especie tiran las hojas en abril o mayo en las zonas más secas de su área de distribución. Presenta flores blancas, dióicas en panículas axilares de 2 a 5 cm. de largo, glabras, con ovario súpero, presentan de 7 a 12 estambres, las flores masculinas despiden un ligero aroma. Este árbol florece de julio a diciembre. El fruto se presenta en drupas de 2.5 a 3 cm de largo, ovoides o esféricos, verde amarillentos, en la madurez de olor fragante, con el endocarpio duro, contienen semillas hasta de aproximadamente 1.5 x 1.3 cm, maduran de octubre a diciembre (Martínez, 1994; Pennington *et al.*, 1968; Echenique-Manrique, 1970).

### 2.2.3. Distribución y Ecología.

*Calophyllum brasiliensis* se distribuye en América Latina desde el sur de México, incluyendo Centroamérica, Las Antillas y hasta el noreste de Sudamérica; en esta última región se ha reportado en el Ecuador, Colombia, Venezuela, Guayana, oeste de Brasil, Bolivia y Perú.

En México se encuentra en las vertientes del Golfo y del Pacífico. En la primera se encuentra desde el sur de Veracruz, hasta la Península de Yucatán, abarcando Tabasco, norte de Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En la segunda se encuentra desde Nayarit hasta la zona costera y depresión central de Chiapas, pasando por Jalisco, Colima,

Michoacán, Guerrero y Oaxaca.

*Calophyllum brasiliensis* se encuentra principalmente como componente de selvas altas perennifolias o medianas, subperennifolias y subcaducifolias, en suelos con buen drenaje, derivados tanto de material calizo como ígneo y metamórfico así como abundante materia orgánica. En el sur de Veracruz, oeste de Tabasco y norte de Chiapas, es especie abundante y codominante de la selva alta perennifolia junto con *Terminalia amazonia*, *Dialium guianense* y *Guatteria anomala*. Su amplitud altitudinal va desde el nivel del mar hasta los 1170 msnm (Pennington *et al.*, 1968; Chudnoff, 1984; Ortega *et al.*, 1991, Campos *et al.*, 1992; Echenique -Manrique, 1979).

#### 2.2.4. Usos Industriales

La madera de esta especie es considerada de muy buena calidad y es empleada en la fabricación de durmientes, duela, vigas para puentes y quillas de embarcaciones, accesorios agrícolas, mangos para herramientas, chapa para vistas de madera terciada y tripay. También se utiliza en la construcción de muebles finos, tejamanil, armazones, paredes exteriores e interiores, puertas interiores y columnas. Se recomienda como sustituto de la caoba (Echenique-Manrique, 1970; Pennington *et al.*, 1968; Barcenás, *et al.*, 1980).

#### 2.2.5. Etnobotánica

En México *Calophyllum brasiliensis* recibe un sin número de nombres comunes según su área de distribución (Tabla 1). En Sudamérica también es llamado de diferente forma por ejemplo: ocuje (Cuba); krassa (Nicaragua); calaba (Panamá); aceite maría, chacualo (Colombia); edaballi, kurahara, wild calabash (Guayana); María (Venezuela); alfaró, lagarto, caspi (Perú); bella maría (Ecuador); balsa maría, palo maría, calaba (Bolivia); guanandi, jacareuba (Brasil y Perú); santa maría y leche maría (Belice); Mario y Santa María (Guatemala) (Chudnoff, 1984; Echenique-Manrique, 1970; Ortega, *et al.*, 1991).

**Tabla 1.** Nombres comunes de *Calophyllum brasiliensis* en México.

Nombre	Lugar
Barí	Pichucalco, Chiapas
	Sur de Tabasco y Veracruz
	Costa de Oaxaca
Barillo, Barilla	Oaxaca
Cedro Cimarrón	Oaxaca
Cimarrón	Oaxaca
Guaya ó Gluaya	Campamento San Joaquín, Chiapas Teapa, Tabasco
Leche Amarilla	Escuintla, Chiapas
	Sur de Veracruz y Tabasco
	Costa de Oaxaca
Leche María	Oaxaca, Chiapas, Tabasco
Mariquita	Sierra de Atoyac, Guerrero
Palo María	Nayarit, Sierra de Atoyac, Guerrero
Santa María	Chiapas
María	Chiapas
Marillo	Chiapas
Ocú	Tehuantepec Oaxaca
Sacbalamté ó Sakbalamte	Lengua Tzeltal, El Real, Chiapas.

En México, al látex que se obtiene de la corteza de esta especie, llamado "Bálsamo de María" se le atribuyen propiedades medicinales. También se emplea como aglutinante e impermeabilizante en la elaboración de papel de corteza. De sus semillas se obtiene un aceite que se utiliza en algunas comunidades rurales con fines de iluminación y para curar algunas enfermedades cutáneas (Ortega *et al.*, 1991).

En la sierra de Atoyac, Guerrero, el té elaborado con la corteza de este árbol se da de beber a las parturientas durante nueve días para que les limpie la matriz (Soto Nuñez, 1995).

En Colombia la gente del campo obtiene un aceite de tres especies: *C. brasiliensis* ("árbol de aceite") *C. lucidum* ("palo de aceite") y *C. mariae* ("aceite de maría"), el cual lo extraen realizando una incisión en la corteza. Dicho aceite es de color verdoso y de olor fuerte el cual dejan espesar al aire y es utilizado como vulnerario (García, 1992). Salvador Calderón y Paul

C. Standley (1941) al tratar del aceite de María dicen: "De las incisiones hechas en la corteza brota un látex amarillo empleado como tópico por la gente del campo para cicatrizar el ombligo de los recién nacidos, cuando éste tiene tendencia a no secar" (García, 1992).

### 2.2.6. Fitoquímica

Estudios fitoquímicos previos indican que el género *Calophyllum* es una fuente rica en metabolitos secundarios tales como xantonas, neoflavonoides, cumarinas, benzopiranos, triterpenos y esteroides (Ampofo *et al.*, 1987; Kashman *et al.*, 1992; Patil *et al.*, 1993). Los estudios químicos realizados sobre la madera de *C. brasiliensis* originaria del Brasil indica que contiene principalmente xantonas y triterpenos.

Las xantonas presentan un esqueleto básico derivado de la benzofenona. Tiene su origen en la fenilalanina merced a su producto de degradación; el ácido m-hidroxibenzoico (C6-C1) y su posterior condensación con tres unidades de malonato. Otra ruta prodría ser: la combinación de una unidad C6-C3, por ejemplo un ácido cinámico con dos unidades de malonato para obtener benzofenona. El acoplamiento oxidativo prodría conducir a la formación de la xantona (Figura 2). (Gros *et al.*, 1985). Las xantonas pueden ser simples o modificadas. En este ultimo caso por la presencia de un sustituyente glúcosídico o grupo prenilado (2,2 dimetilalil) (Figura 3). Además del grado de oxigenación que presenten pueden ser clasificadas como mono, di, tri, o tetraoxigenadas (Bennett *et al.*, 1989; Peres *et al.*, 1997).

Los triterpenos son compuesto de 30 átomos de carbono. Existe un sin número de esqueletos básicos, siendo el más común en la naturaleza el del  $\beta$ -sitosterol (Figura 4).

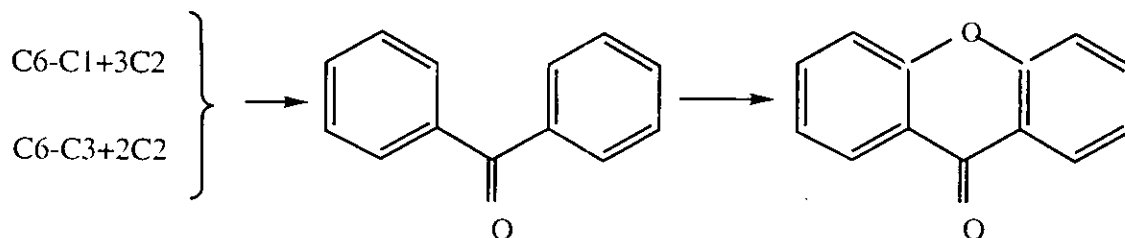
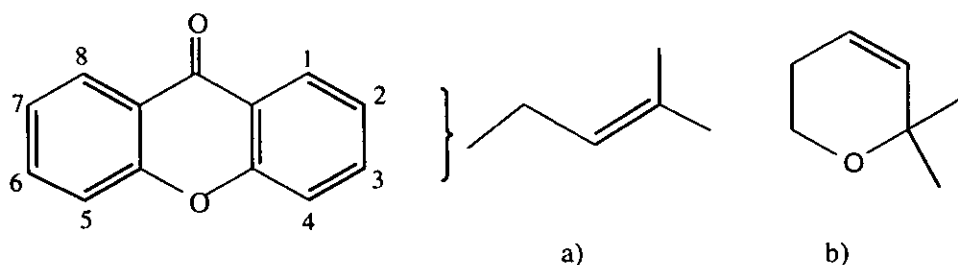
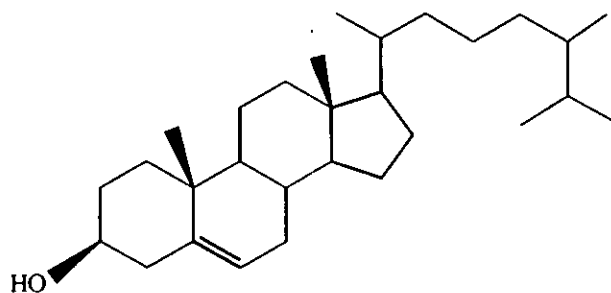


Figura 2. Origen biosintético de las xantonas.



**Figura 3.** Esqueleto de la xantona y sus substituyentes. a) substituyente isoprenilo (2,2-dimetilalil). b) substituyente cromeno producto de la ciclización del isoprenilo con un OH fénelico de la xantona.



**Figura 4.** Estructura de un triterpeno ( $\beta$ -sitosterol)

La madera de *C. brasiliensis* procedente de Brasil ha sido objeto de tres estudios previos: King, King *et al.* (1953) aislaron por primera vez del extracto de éter, un sólido cristalino de color amarillo el cual fué identificado como la xantona: Jacareubina (Figura 5.1).

Posteriormente en 1966 Ottoni Da Silva Pereira *et al.*, estudiaron los constituyentes del extracto bencénico. En este estudio aislaron seis xantonas y dos triterpenos: friedelina y  $\beta$ -sitosterol. Las primeras xantonas en ser aisladas fueron la Jacareubeina (Figura 5.1) y la 6-dehidroxijacareubina (Figura 5.2) (1,5-dihidroxi-2'-2'-dimetilpirano-xantona). Esta última previamente aislada de *Kielmeyera speciosa* St. Hil (Oliveira *et al.*, 1966).

Los siguientes compuestos que reportaron fueron dos isómeros de peso molecular 296, los cuales por estudios de espectroscopía demostraron que se trataba de la Guanandina (Figura 5.3) (1,5-dihidroxi-6-(2,2-dimetilalil)-xantona) y la Isoguanandina (Figura 5.4) (1,5-dihidroxi-8-(2,2-dimetilalil)-xantona). Con la finalidad de corroborar las estructuras de estos 2 compuestos, se realizaron reacciones de ciclización en medio ácido. Al tratar al compuesto 3 se obtuvo la Cicloguanandina (Figura 5.3a) 1-hidroxi-(2,2-

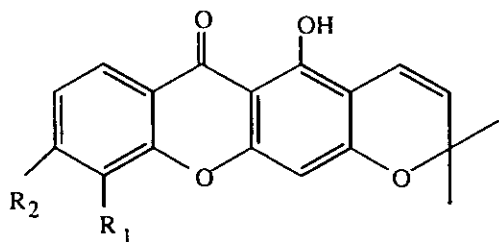
dimetildihidropirano)-xantona. En el caso de la Isoguanandina no hubo reacción.

El siguiente compuesto que este equipo aisló fue una sustancia monohidroxilada, la cual fue identificada como 4-hidroxixantona (Figura 5.5). Finalmente aislaron la Gentisina (Figura 5.6) (1,7-Dihidroxi-3-metoxixantona), previamente aislada de *Gentiana lutea* L (Perkin, 1898; Anand, *et al.*, 1974). Este compuesto fue metilado obteniendo de esta manera el derivado correspondiente: 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (Figura 5.6a).

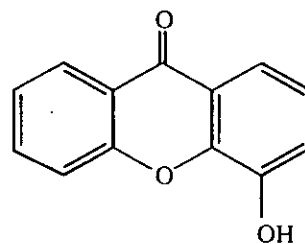
Más adelante Ottoni Da Silva Pereira *et al.*, (1967) reportaron dos compuestos más. Estos fueron obtenidos de la parte no cristalina del extracto bencénico de la madera y fueron: la Dehidrocicloguanandina (Figura 5.7) y el 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona (Figura 5.8). No se determinó si el compuesto 8 era un artefacto o un compuesto natural.

Adicionalmente Stout *et al.*, (1968) estudiaron la resina de *C. brasiliensis* var. *Rekoi*. Standl. de la cual se obtuvieron dos cumarinas ácido brasiliésico y el ácido isobrasiliésico. Plattner *et al.*, (1974) reportaron el aislamiento de diferentes derivados carboxílicos de cromanonas, a partir del aceite de las semillas de *C. brasiliensis*.

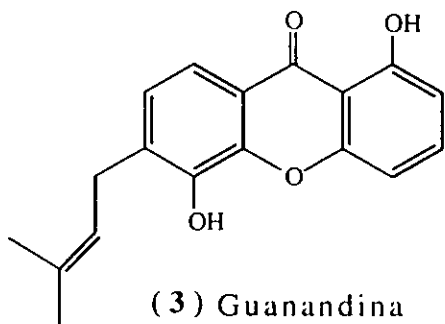




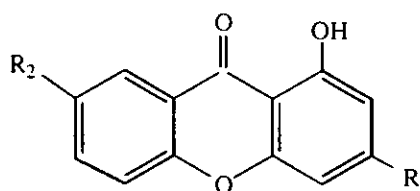
- (1)  $R_1=R_2=\text{OH}$  Jacareubeina  
 (2)  $R_1=\text{OH}$ ,  $R_2=\text{H}$  6-desoxijacareubeina



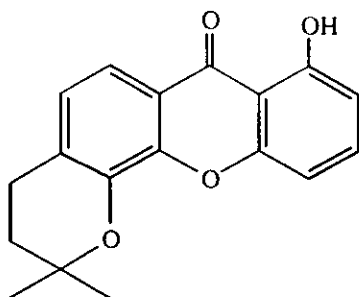
- (5) 4-hidroxi xantona



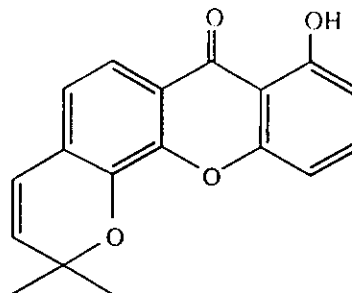
- (3) Guanandina



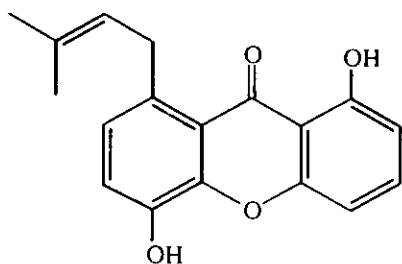
- (6)  $R_1=\text{Me}$ ,  $R_2=\text{H}$  Gentisina  
 (6a)  $R_1=R_2=\text{Me}$  1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona



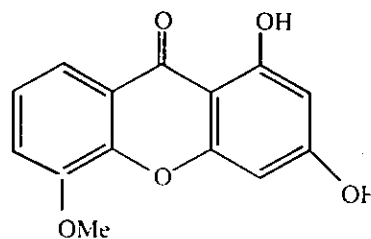
- (3a) Cicloguanandina



- (7) Dehidrocicloguanandina



- (4) Isoguanandina



- (8) 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona

**Figura 5.** Xantonas aisladas previamente de la madera de *Calophyllum brasiliensis* (Origen : Brasil).

### 2.2.7. Resistencia natural de la madera

La resistencia natural de *C. brasiliensis* al biodeterioro y al ataque de organismos degradadores ha sido objeto de tres estudios. En general dichos estudios señalan que está madera es resistente o altamente resistente a estos factores bióticos.

Bárcenas (1995) utilizó un método acelerado para evaluar la durabilidad de veinte maderas tropicales mexicanas incluyendo *C. brasiliensis*. Para ello semienterró estacas de madera sobre el suelo en una zona de alto riesgo al biodeterioro. (Selva baja caducifolia, en la Estación de la Mancha, Veracruz). El criterio para determinar su durabilidad se muestra en la tabla 2. Bajo este criterio, la madera del duramen de *C. brasiliensis* después de estar expuesta por más de 48 meses fué clasificada como durable.

**Tabla 2.** Categorías de Durabilidad de la Madera en Pruebas aceleradas de Cementerio (Bárcenas, 1995).

Meses de exposición	Clasificación
12-24 meses	no durables
24-48 meses	mod. durables
más de 48 meses	durables

En otro trabajo realizado por Torelli, N. (1982) se estudiaron 43 diferentes especies maderables mexicanas incluyendo a *C. brasiliensis*, con el fin de evaluar su resistencia a la pudrición, mediante pruebas aceleradas de laboratorio. Se utilizaron dos hongos: *Lenzites trabea* y *Polystictus versicolor* (L) (= *Coriolus versicolor*). El primero se ubica dentro de los que provocan pudrición blanca, mientras que el segundo produce pudrición morena. Bloques de madera se probaron durante 10 y 16 semanas respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que con el hongo de pudrición blanca la madera perdió menos del 5% de peso seco, con lo cual se clasificó como altamente resistente, mientras que con el hongo de pudrición morena perdió alrededor de un 20% de peso y se clasificó como resistente.

Carter y Camargo (1983) evaluaron la resistencia natural de diferentes maderas contra las termitas subterráneas *Reticulitermes flavipes* y *Coptotermes formosunus*. Las pruebas que realizaron fueron de alimentación forzada y de selección. En la prueba de alimentación forzada

se expusieron bloques de madera (1.2 x 1.2 x 2.5) en cajas petri que contenían 100 termitas durante ocho semanas. Mientras que en la prueba de selección se expusieron diferentes especies de madera en bloques al azar en una caja, la cual contenía 500 termitas durante el mismo tiempo (8 semanas). En una prueba similar a la de alimentación forzada, solo que en este caso se evaluó la sobrevivencia, se utilizaron los extractos obtenidos con hexano, acetona, acetona-hexano-agua y metanol. Los resultados obtenidos para la primera prueba mostraron que *C. brasiliensis* es altamente resistente al ataque de ambas especies de termitas (*R. flavipes* y *C. formosanus*) ya que al final de la prueba casi el 100% de estas habían muerto. Para la prueba de selección se observó que la madera de *C. brasiliensis* fue una de las menos atacadas. El consumo fue de 1.1 - 1.3% y 2.2 - 2.5% para *R. flavipes* y *C. formosanus* respectivamente. En las pruebas realizadas con los extractos se observó que el extracto de acetona fue más activo con un 0 % de sobrevivencia para ambas especies de termitas. El extracto de acetona-hexano-agua, causó un 80 % y 100% de mortalidad para *R. flavipes* y *C. formosanus* respectivamente. Los extractos de hexano y metanol fueron los menos activos.

Hasta el presente se desconocen los factores químicos responsables de la alta durabilidad y resistencia del duramen de *C. brasiliensis* a hongos y termitas. Por este motivo se decidió realizar el estudio fitoquímico del duramen y examinar las posibles propiedades antifúngicas de los compuestos aislados.

### 3. OBJETIVOS

- \*Aislar e identificar los principales metabolitos secundarios del duramen de *Calophyllum brasiliensis*.
- \*Preparar los derivados correspondientes de los metabolitos secundarios.
- \*Evaluar la actividad biológica de los extractos obtenidos del duramen de *C. brasiliensis*.
- \*Evaluar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios aislados, así como de sus derivados.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Material Biológico.

La madera de duramen de *Calophyllum brasiliensis* fué proporcionada por el Departamento de Productos Forestales y Conservación de Bosques del Instituto de Ecología A.C. en Xalapa, México. La madera se obtuvo de un árbol colectado en la Selva Lacandona, localizada en el estado de Chiapas, México (Bárceñas, 1995). Ejemplares de herbario y muestras de madera están depositadas en el Herbario del Instituto de Ecología A.C (XAL). La cepa 698 del hongo *Postia placenta* fué proporcionada por el Forest Products Laboratory, Madison. U.S.A.

### 4.2. Aislamiento e identificación de los compuestos.

#### 4.2.1. Extracción de la Madera

Se colocaron 711.5 gramos de madera de duramen cortada en pequeñas fracciones para aumentar la superficie de contacto con el disolvente y así mejorar la extracción. Se realizaron extracciones a temperatura ambiente durante una semana con cada disolvente (hexano, acetona, metanol y agua). Posteriormente los extractos fueron concentrados al vacío en un rotavapor (Figura 7).

#### 4.2.2. Instrumentación y Cromatografía.

Los extractos se separaron en sus diferentes componentes utilizando cromatografía en columna (c.c.), cromatografía en capa fina (c.c.f.) y preparativa (ccp). En la separación cromatográfica se utilizó como adsorbente Gel de Sílice 60 (Merck) y como eluyentes se emplearon diferentes disolventes orgánicos. Para realizar ccf se emplearon cromatofolios de Sílica Gel de 0.25 mm de espesor (Merck), mientras que para realizar ccp se emplearon cromatoplasmas de Sílica Gel de 2 mm de espesor (Merck). La pureza de los compuestos así como el curso de las reacciones fué observada por c.c.f. Como reveladores se utilizaron luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N. Se determinó el R<sub>f</sub> (frente de referencia) de los compuestos aislados en c.c.f. (Sílica Gel, 0.25 mm de espesor). El R<sub>f</sub> se calculó mediante la formula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

Las constantes físicas y los datos espectroscópicos que sirvieron para la identificación de los compuestos aislados, fueron obtenidos como se indica a continuación. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns. Los espectros de infrarojo (IR) fueron realizados en los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX. En el caso de los espectros de ultravioleta (UV) estos se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer 552; los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RNMP) se realizaron en los espectrómetros Varian Gemini 2000 (200 MHz), y Varian XL 300 (300 MHz). En el caso de los espectros de Carbono (RMN<sup>13</sup>C) estos se determinaron en un espectrómetro Varian Gemini 2000 (200 MHz). Para obtener los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE) se utilizó un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B. Finalmente los estudios de difracción de rayos X se obtuvieron con un difractómetro Nicolet P-3F.

#### 4.2.3. Extracto Hexánico.

Al extracto de hexano (360 mg) se le agregó diclorometano y luego metanol helado. Posteriormente se filtró sobre papel filtro para retirar las ceras. La solución se concentró a presión reducida en un rotavapor obteniéndose 260 mg. Este extracto se aplicó en una placa preparativa usando como eluyente una mezcla de acetato de etilo-hexano 9:1. Se obtuvieron 7 fracciones, en la fracción 6 precipitaron espontáneamente unos cristales incoloros, los cuales fueron identificados como  $\beta$ -sitosterol (Figura 7).

#### 4.2.4. Extracto Acetónico.

De la extracción con acetona se obtuvieron 29.65 gramos de extracto. Parte del extracto (28 gramos) se preabsorbió en celita y se dejó secar. La celita se colocó en una columna empacada con gel de sílice para capa fina. La columna se eluyó con hexano y acetona, así como mezclas de estos disolventes.

En las fracciones 6-8 eluidas con hexano se obtuvo nuevamente  $\beta$ -sitosterol. De las fracciones 9-16 eluidas con hexano-acetona (9:1) precipitó un polvo amarillo, el cual por c.c.f. se observó como una sola mancha. Su punto de fusión fue de 280-283 °C y fue identificado por sus datos espectroscópicos como 6-desoxijacareubeina (I) (Figura 7).

De las fracciones 17-20 eluidas con hexano-acetona (9:1) precipitó un polvo amarillo (12 mg), identificado como la 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-

metoxixantona (II) (Figura 7).

De las fracciones 21-24 eluidas con hexano-acetona (8:2) precipitó un polvo amarillo, el cual por cromatografía en capa fina se observó como una sola mancha. Estas fracciones se reunieron (790 mg) y se sometieron a ccfp, eluyendo con un sistema hexano-acetato de etilo (5:5) 3 veces sucesivamente. La cromatoplaça se dividió en cuatro zonas desde la base a la parte superior. Se raspó la sílica de cada zona y se extrajo con acetato de etilo. Se obtuvieron cuatro fracciones, las cuales analizadas por c.c.f. no mostraron diferencias de color ni de Rf, sin embargo el análisis espectroscópico indicó que la fracción cuatro (parte superior de la cromatoplaça) contenía únicamente 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5-trihidroxi-xantona (IV), mientras que las fracciones restantes contenían una mezcla del compuesto IV y Jacareubeina (III) (Figura 7).

De las fracciones 25-43 eluidas con hexano-acetona (7.5:2.5) se obtuvo un polvo fino de color amarillo (3.3 g.) con punto de fusión 260-262 °C, el cual por RMNP fue identificado como el 2-(3,3-dimetilalil)-1,3,5,6-tetrahidroxi-xantona (V) (Figura 7).

#### 4.2.5. Extracto Metanólico.

Parte del extracto de metanol (2.5 g) fué sometido a cromatografía en columna (Sílica gel) eluyendo con hexano, acetato de etilo y mezclas de estos disolventes. El extracto previamente se preabsorbió en celita, como se describió anteriormente.

Las fracciones 12-18 eluidas con una mezcla de hexano-acetato de etilo (9:1) y analizadas por ccf mostraron que era una mezcla de los compuestos III y IV (86 mg).

En las fracciones 26-39 las cuales se eluyeron con hexano-acetato de etilo (8:2) se obtuvo el compuesto V (516 mg) previamente aislado en el extracto de acetona (Figura 7).

#### 4.3. Transformaciones químicas.

##### 4.3.1. Acetilación del Compuesto V

400 mg del compuesto V se acetilaron con anhídrido acético y piridina manteniendo la reacción en agitación constante y temperatura ambiente

durante 24 horas. La reacción se detuvo agregando agua, obteniéndose un sólido el cual fué filtrado y lavado con HCL 10% y agua. El sólido (391 mg, con un rendimiento de la reacción del 56%) se recrystalizó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH formandose de esta manera unos cristales de color amarillo de forma rectangular los cuales se identificaron como el 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5,6-triacetilxantona (Va). Estos cristales fueron sometidos a análisis de difracción de rayos X .

#### 4.3.2. Acetilación de la Mezcla III y IV

Parte de la mezcla de los compuestos III y IV (150 mg) fué acetilada de la forma previamente descrita. El producto de la reacción se sometió a c.c.f.p. Se obtuvieron cuatro fracciones, de las cuales la primera fracción fué preabsorbida en celita y sometida c.c. (gel de sílice), eluyendo con mezclas de hexano-acetona. Las fracciones observadas en c.c.f. no mostraron diferencia alguna según su Rf. Sin embargo las primeras fracciones, de acuerdo a sus datos espectroscópicos mostró la presencia del 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa) (8 mg), mientras que las ultimas fracciones (5 mg) resultaron ser una mezcla de dos compuestos: el 5,6-diacetil-jacareubeina (IIIa) y el dihidro-jacareubeina (IIIb).

#### 4.4. Actividad Antifúngica.

El efecto de los extractos (acetónico, metanólico y acuoso) y compuestos aislados se evaluo *in vitro* contra el crecimiento micelial del hongo de pudrición morena *Postia placenta*. Los extractos orgánicos y los compuestos fueron disueltos en 1 ml de acetona. En el caso del extracto acuoso se empleo 1 ml de agua. La solución se vació en un tubo de ensaye que contenia 16 ml. de medio de cultivo (malta-agar 1.5 %) previamente esterilizado (15 atmosferas durante 15 minutos). La mezcla se homogenizó completamente con un vortex. Se tomaron 3 alícuotas de 5 ml las cuales se vertieron en 3 cajas Petri (60 x 15 mm).

La cantidad necesaria de los extractos o compuestos se calculó para obtener concentraciones finales definidas. En el caso de los extractos esta fué de 0.5 mg/ml, mientras que en los compuestos de 0.25 mg/ml. En razón a la abundancia del compuesto V también se probó a las concentraciones de: 1.0 mg/ml y 0.5 mg/ml.

Las cajas Petri con el medio se dejaron dentro de la campana durante 24 horas para eliminar completamente el disolvente, al término de este periodo en cada placa de agar se colocó un inculó (6mm) con una muestra



de micelio, la cual se tomó con un sacabocados de un cultivo de dos semanas de crecimiento. Cada experimento consistió de tres replicas, las cuales se incubaron en un estufa de cultivo a 25 °C durante una semana. Los controles fueron tratados unicamente con disolvente (acetona). Para tener una referencia de comparación se utilizó fenol (Sigma).

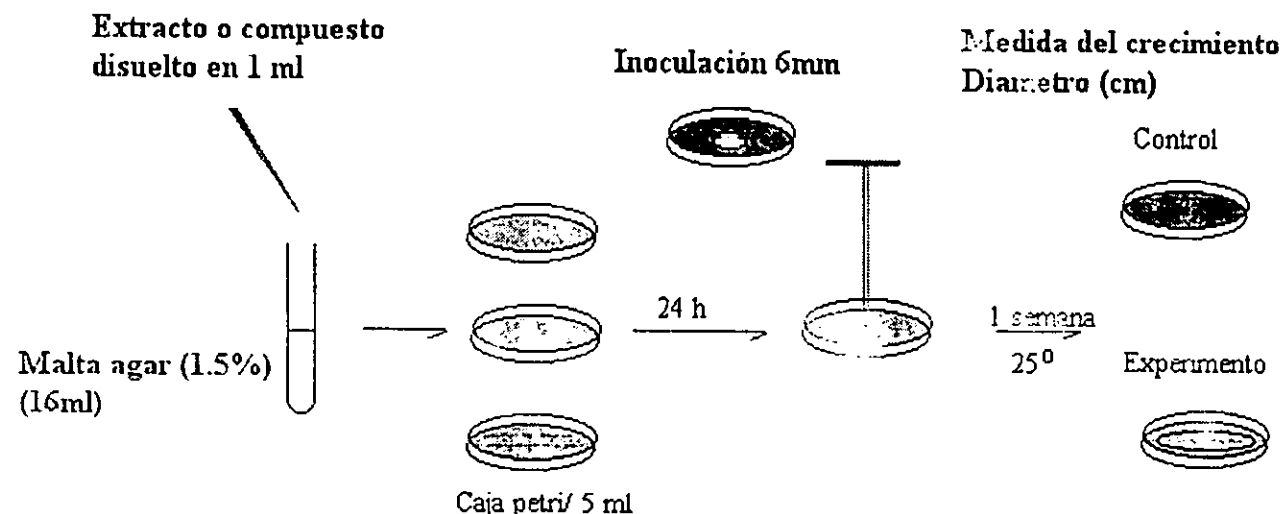
El crecimiento micelial (diámetro de la colonia) de las placas se midió diariamente. La prueba se dió por concluida cuando el micelio de las placas control alcanzó los bordes de la caja Petri (Figura 6). La inhibición del crecimiento causado por los extractos y compuestos sobre el crecimiento micelial fué calculado utilizando la expresión matematica:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Crecimiento del control} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} * 100$$

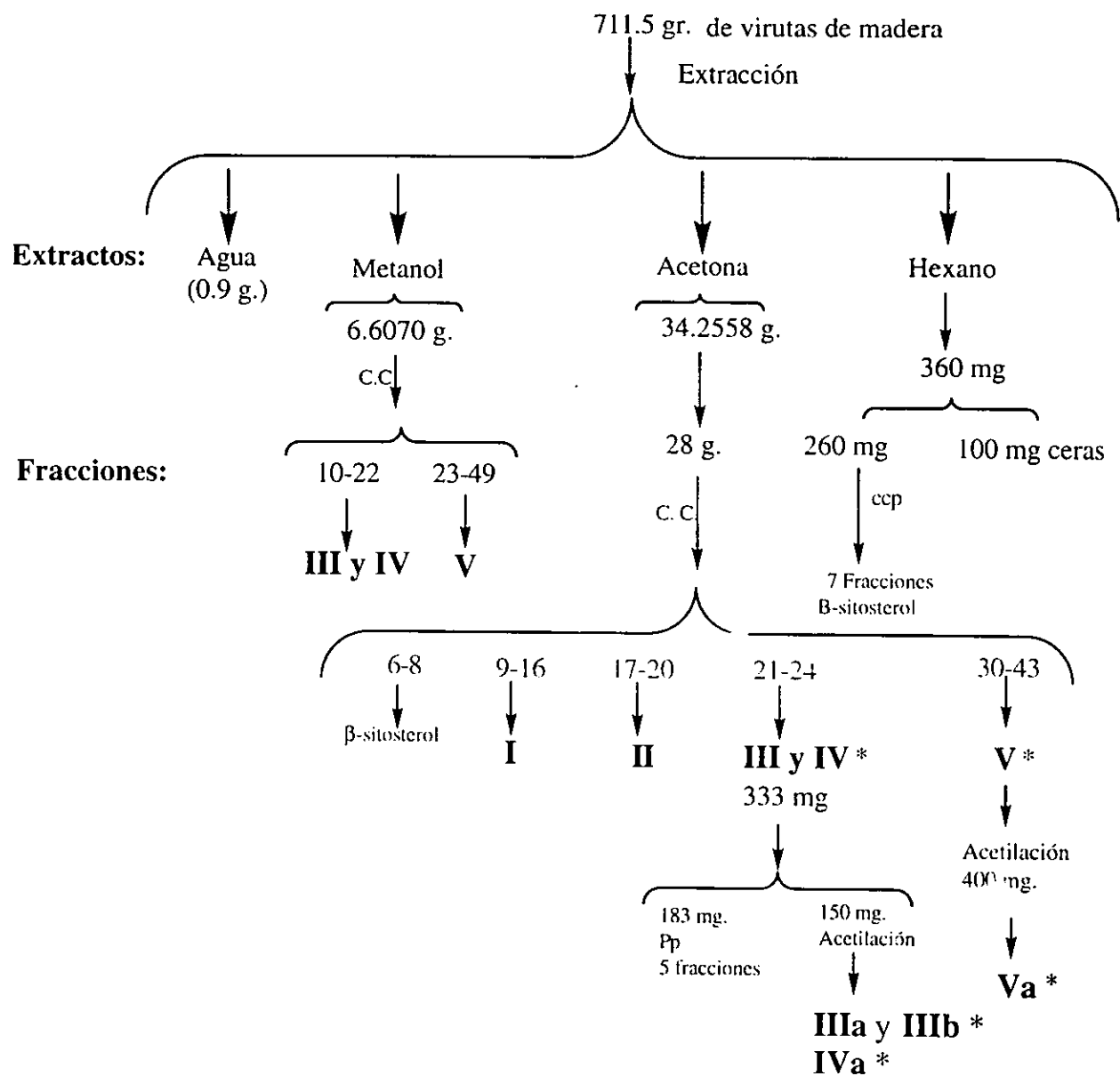
Las diferencias entre los tratamientos, compuestos y control fueron examinados por ANOVA y la prueba de rango multiple de Tukey.

Con el fin de conocer si el metabolismo del hongo podía transformar la estructura química de las xantonas, las placas de agar que contenian el compuesto V, fueron reunidas al final de la prueba redisolviendo el agar con agua caliente, y extrayendo varias veces con acetato de etilo. La fase orgánica se purificó por cromatografía en capa fina y finalmente se analizó por RMNP.

**Figura 6.** Prueba de Actividad Biológica



**Figura.7** Obtención de los compuestos del duramen de *C. brasiliensis* .



Los numeros indican las fracciones de C.C.

C. C. = Cromatografía en Columna.

ccfp= Cromatografía en capa fina preparativa.

\*= Compuestos que se sometieron a pruebas de actividad antifúngica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Rendimiento de los extractos.

El rendimiento de los extractos (en peso seco de la madera) obtenidos con hexano, acetona, metanol y agua se muestran en la Tabla 3. El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de acetona (4.81 %). A éste le siguió el de metanol con un rendimiento del 0.92 % y finalmente los extractos de hexano y agua.

**Tabla 3.** Rendimiento (% del peso seco) de los extractos obtenidos del duramen de *C. brasiliensis*.

Extracto	Gramos	Rendimiento %
Hexano	0.3600	0.04 %
Acetona	34.2558	4.81 %
Metanol	6.6970	0.92 %
Agua	0.9243	0.13 %
<b>TOTAL</b>	<b>42.2371</b>	<b>5.90%</b>

### 5.2. Composición química de la madera

De los extractos de hexano, acetona y metanol se lograron aislar seis compuestos, cinco de los cuales son del tipo de las xantonas, así como un triterpeno. Las xantonas se obtuvieron tanto del extracto de acetona como del metanólico (Tabla 4).

**Tabla 4** Compuestos aislados de los extractos del duramen de *C. brasiliensis*

Compuesto	Hexano	Acetona	Metanol
$\beta$ -sitosterol	+	-	-
6-desoxijacareubeina(I)	-	+	-
1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona(II)	-	+	-
Mezcla Jacareubeina (III) y IV	-	+	+
1.3.5.-trihidroxi-2-(3.3-dimetilalil)-xantona (IV)	-	+	+
1.3.5.6-tetrahidroxi-2-(3.3-dimetilalil)-xantona (V)	-	+	+

### 5.3 Compuestos obtenidos del extracto hexánico.

El extracto de hexano, después de separar las ceras se sometió a cromatografía en capa fina preparativa, obteniéndose 7 fracciones. De la

fracción 6 cristalizó de forma espontánea unos cristales ( p. f). Los cuales también fueron comparados con una muestra auténtica de  $\beta$ -sitosterol por cromatografía en capa fina presentando idéntico Rf. Sus datos espectroscópicos así como sus constantes físicas permitieron identificar a este compuesto como:  $\beta$ -sitosterol.

#### 5.4. Compuestos obtenidos del extracto acetónico.

El análisis cromatográfico del extracto de acetona proporcionó 5 compuestos los cuales por sus datos espectroscópicos mostraron ser 5 xantonas preniladas: 6-desoxijacareubeina (I), 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (II), Jacareubeina (III), 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V) (Figura 9). Este extracto fué el más abundante y rico en compuestos. El compuesto más abundante fué el V. En la tabla 5 se muestra el índice de referencia (Rf) así como el color observado a dos diferentes longitudes de luz ultravioleta.

**Tabla. 5.** Comportamiento de los compuestos aislados (I-V) y sus derivados por cromatografía en capa fina.\*

Compuesto	Rf*	UV <sub>(254 nm)</sub>	UV <sub>(350 nm)</sub>
I	0.85	oscura	no visible
II	0.66	clara (barrido)	no visible
III y IV	0.43	oscura(barrido)	no visible
IV	0.40	oscura(barrido)	no visible
V	0.32	oscura(barrido)	no visible
IIIa	0.82	oscura	no visible
IVa	0.82	oscura	no visible
Va	0.67	clara (barrido)	no visible

\*Eluyente Hexano-Acetato de etilo (6:4). Cromatofolios de Sílica Gel 60 Merk (0.25 mm).

##### 5.4.1. 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V)

La estructura del compuesto V se dedujo principalmente de sus espectros de RMNP, EM y IR: de acuerdo a los siguientes datos. En la región de los protones aromáticos mostró señales para 3 protones. Dos de estas señales fueron dobles con desplazamientos químicos de 6.95 y 7.62 ppm ambas con  $J=8.7$  Hz, las cuales indicaron la presencia de dos hidrógenos orto en un anillo aromático, dichas señales fueron asignadas a los H7 y H8

respectivamente (Tabla 6). La tercera señal fué simple y se observó en 6.50 ppm (Tabla 6) indicando la presencia del H4 típico de las xantonas substituidas en las posiciones 1, 2 y 3. La presencia del carbonilo del núcleo de la xantona fué evidenciado en el espectro de IR por una banda de absorción intensa en  $1647\text{ cm}^{-1}$ . En el espectro de IR también se observaron bandas para grupos hidroxilo en 3489, 3427 y  $3380\text{ cm}^{-1}$ . Lo anterior se corroboró por el espectro de RMNP, puesto que aparecen señales simples anchas intercambiables con  $\text{D}_2\text{O}$  en 13.41 (1H) y 9.0 ppm (3H). Por su desplazamiento a campo bajo, la primera señal, además indicó que un hidroxilo debe formar un puente de hidrógeno con el carbonilo de la xantona.

La presencia de un substituyente isoprenilo (2,2-dimetilalil) se dedujo con base en un sistema  $\text{AX}_2$ . Dicho sistema consta de una señal sobre en 3.34 ppm ( $J=7.2\text{ Hz}$ ) y que integra para 2H la cual fué asignada a los hidrógenos del metileno en 1', también se apreció una señal triple en 5.27 ppm ( $J=7.2$  y  $1.5\text{ Hz}$ ) y que integra para 1H, la cual se asignó al H2'. Los metilos del isoprenilo se observaron como dobles en 1.63 y 1.76 ppm (ambos con  $J=0.9\text{ Hz}$ ).

Los anteriores datos sugirieron la estructura V, la cual corresponde a un compuesto con fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$  y de un peso molecular de 328. El espectro de masas corroboró la estructura propuesta puesto que el ión molecular se observó en  $m/z=328$  (54 %). El pico base de  $m/z=273$  correspondió a la pérdida de un fragmento  $\text{C}_4\text{H}_7$  derivado del grupo isoprenilo. La estructura del compuesto también se corroboró mediante la preparación del derivado triacetilado (Va). De la acetilación de este producto se obtuvo el derivado acetilado, 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5,6-triacetilxantona (Va).

El espectro de RMNP del derivado (Va) fué similar al del compuesto original (V), con excepción de las señales correspondientes a los hidroxilos en las posiciones 3, 5 y 6 las cuales desaparecieron siendo reemplazadas por tres señales simples en 2.43, 2.34 y 2.36 (3H cada una) que corresponden a los protones de los metilos de tres grupos acetato. La señal para el OH quelatado sobre el C-1 (12.92 ppm) se conservó, indicando que este no reaccionó (Tabla 6). El espectro de masas del derivado (Va) confirmó la presencia de tres acetatos pues mostró el ión molecular en  $m/z=454$  superior en 126 unidades de masa al compuesto V. Finalmente la estructura del compuesto V quedó confirmada mediante estudios de difracción de Rayos X (Figura 8).

El compuesto **V** ha sido previamente aislado de las siguientes especies de *Calophyllum*: *C. sclerophyllum*. Vesq (Jackson *et al.*, 1966), *C. inophyllum* (Jackson *et al.*, 1969), *C. scriblitifolium* (Jackson *et al.*, 1967), *C. fragrans* Ridley (Locksley *et al.*, 1969), *C. canum* Hook f. (Carpenter *et al.*, 1969).

**Datos espectroscópicos:**

**1,3,5,6-tetrahidroxi- 2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V)**

Polvo amarillo, p.f. 260-262° (reportado 255-257° Jackson *et al.*, 1966).

UV  $\lambda_{\max}$  [MeOH], nm ( $\epsilon$ ): 326(23698), 282(14678), 252(50758).

IR  $\nu_{\max}$  (KBr): 3489 (OH), 3427(OH), 3380(OH), 2964(CH-alif), 1647 (C=O, conj.), 1613(C=C), 1455(CH<sub>3</sub>).

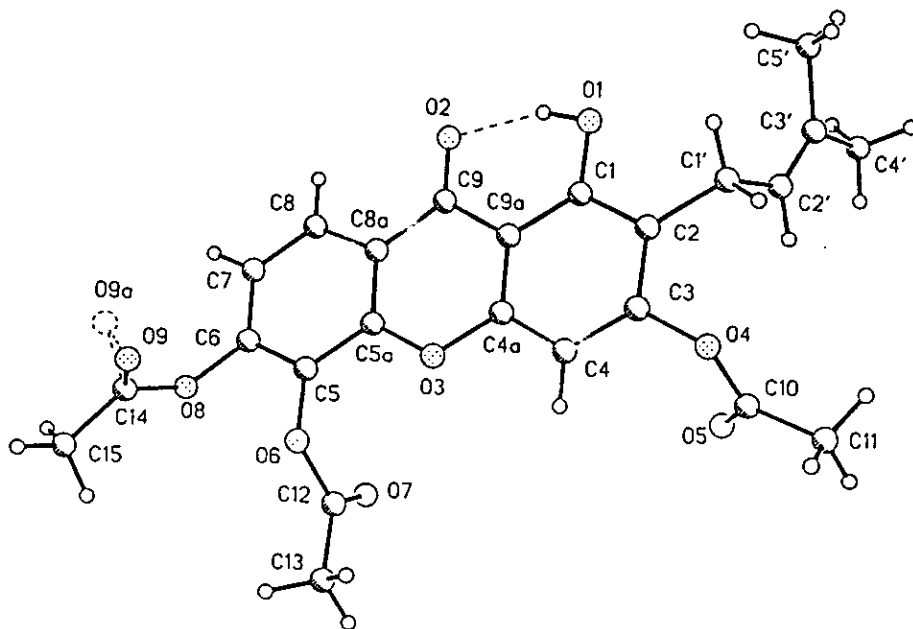
EM: 70 ev (m/z): 328 M<sup>+</sup> (54%) [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>]<sup>+</sup>, 313 (30.3%) [M<sup>+</sup>- CH<sub>3</sub>], 285 (66.6 %) [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>], 273 (100%) [M<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>], 260(13.5%).

**1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5,6-triacetilxantona (Va)**

Prismas amarillos de forma rectangular, p.f. 193-196°.

IR  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>): 2917, 1785, 1649, 1611, 1452, 1373, 1260, 1161, 116, 1087.

EM: 70 ev (m/z): 454 M<sup>+</sup> (100%) [C<sub>24</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 411 (32.2%) [M<sup>+</sup> - C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O] = A, 399 (44%) [M<sup>+</sup> - C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup> = B, 368 (60%) [A - C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 357 (68.6%) [B - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 355 (10.1%), 327 (62.7%), 315 (61.8%), 273 (50%), 272 (32.2%), 69 (15.2%), 43 (33%).



**Figura 8.** Esterodiagrama por difracción de Rayos X del Va

#### 5.4.2. 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV).

El espectro de RMNP del compuesto IV fué similar al anteriormente descrito para el compuesto V, pero a diferencia de este, se observó una señal doble de doble adicional en 7.33 (J=2 y 7.9 Hz) indicando un protón aromático con acoplamiento orto y meta. La presencia de esta señal, así como el cambio en la multiplicidad de las señales correspondiente a los hidrógenos H7 y H8, sugirieron que el compuesto IV no está hidroxilado en el C-6. Lo anterior se corroboró por el espectro de masas del compuesto IV, el cual mostró el ión molecular en  $m/z=312$  (55 %), esta masa molecular es inferior en 16 unidades a la que presenta el compuesto V. De la acetilación del compuesto IV se obtuvo el derivado: 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa). El compuesto IV ha sido aislado previamente de: *Calophyllum cuneifolium*, *C. inophyllum*, *C. scriblitifolium*, *C. soulattri*, *C. thwaitesii*, *C. tomentosum*, *C. walkeri* (Peres *et al.*, 1997).

#### 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa).

El espectro de RMNP de IVa fué similar al del compuesto original IV, con excepción de las señales correspondientes a los hidroxilos en las posiciones 3 y 5 las cuales desaparecieron siendo reemplazadas por dos señales simples en 2.34 y 2.43 (3H cada una) que corresponden a los protones de los metilos de 2 grupos acetato. La señal para OH quelatado sobre el C-1 (12.97 ppm) se conservó, indicando que este no reaccionó (Tabla 6). El espectro de masas del derivado (IVa) fué también congruente con la estructura propuesta.

#### Datos espectroscópicos:

##### 1,3,5,-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV)

Polvo amarillo, p.f. 288-290° (reportado 280-281° Gunasekera *et al.*, 1977).

IR  $\nu$  max (CHCl<sub>3</sub>): 3517,(OH) 3411 (OH),3004 (CH-ar.), 2926 (CH-alif.), 1715 (C=O), 1427 (CH<sub>3</sub>), 1362 (CH<sub>2</sub>), 1223(C=O).

EM: 70 ev ( $m/z$ ): 312 M<sup>+</sup> (55%) [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>], 297 (35%) [M<sup>+</sup>- CH<sub>3</sub>], 269 (60.8%) [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>], 257 (100 %) [M<sup>+</sup>- C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>], 244 (10.8%).

##### 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa)

Polvo amarillo. p.f. 121-123°.

UV  $\lambda$  max [MeOH]. nm ( $\epsilon$ ): 360 (6879), 304(17894), 239(60534).

IR  $\nu$  max (KBr): 2925(CH-alifatico), 1774 (C=O, Ac), 1641 (C=O, conj.), 1614

(C=C), 1436 (CH<sub>3</sub>).

EM: 70 eV (m/z): 396 M<sup>+</sup> (80.3%) [C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 353 (51.7%) [M<sup>+</sup>-C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O] = A, 341 (34.8%) [M<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>] = B, 311 (69.6%) [A - C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 299 (100%) [B - C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 269 (37.5%) [C<sub>15</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 257 (66%) [C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 55 (20%) [C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>]<sup>+</sup>, 43 (25%) [C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>.

#### 5.4.3. 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-methoxixantona (II).

El espectro de RMNP del compuesto II fué similar al del compuesto IV, pero mostró una señal simple adicional en 4.0 ppm que integra para 3H, la cual se asignó a un metoxilo sobre el C-3. La presencia de un metoxilo adicional en la estructura del compuesto II se corroboró también por EM, mostrando en este caso el ión molecular en m/z=326 (53.3%). Dicha masa molecular es superior en 14 unidades (-1H+1CH<sub>3</sub>) respecto a la del compuesto IV.

El compuesto (II) únicamente a sido aislado de la especie *Garcinia mangostana* (Peres *et al.*, 1997).

#### Datos espectroscópicos:

##### 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-methoxixantona (II).

Polvo amarillo, p.f. 254-255° (reportado 242-244° Sen *et al.*, 1981).

EM:70 eV (m/z): 326 M<sup>+</sup> (53.3%) [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>], 311 (41.6%) [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>], 283 (73.3%) [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>], 271 (100%) [M<sup>+</sup>-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>], 258 (10%), 241 (11.6%).

#### 5.4.4. 6-desoxijacareubeina (I).

El espectro de RMNP del compuesto I fué similar al del compuesto IV, pero a diferencia de este, mostró dos señales dobles en 6.69 (J=10.2 Hz) y 5.76 (J=9.9 Hz) las cuales fueron asignadas a dos protones vinílicos que forman un anillo de cromeno. La presencia del anillo de cromeno se confirmó también por EM, mostrando en este caso el ión molecular m/z=310 (21.3%) que nos indica la pérdida de 2H respecto al compuesto IV.

Este compuesto (IV) ha sido previamente aislado de: *C. bracteatum*, *C. brasiliensis*, *C. calaba*, *C. cuneifolium*, *C. fragrans*, *C. inophyllum*, *C. neoebudicum*, *C. scriblitifolium*, *C. soulattri*, *C. tomentosum*, *C. trapezifolium*, *C. zeylanicum*, *Hypericum brasiliense*, *Kielmeyera ferruginea*, *K. speciosa*, *Meclura aurantica*, *M. pomifera*, *Mourera fluciatilis*. (Peres *et al.*, 1997).



## Datos espectroscópicos:

### 6-desoxijacareubeina (I).

Polvo color amarillo p.f. 214-215° (reportado 212-214° Jackson *et al.*, 1967).

UV  $\lambda_{\max}$  [MeOH], nm ( $\epsilon$ ): 287 (1863)

IR  $\nu_{\max}$  (CHCl<sub>3</sub>): 3570, 2981, 1651, 1616, 1591, 1496, 1296, 1141, 1093.

RMNP (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): 13.13 (s, 1H D<sub>2</sub>O int.) OH-1, 6.35 (s, 1H) H-4, 7.29 dd (1H, J= 2 and 7.4 Hz) H-6, 7.6 (t, 1H, J= 7.6 Hz) H-7, 7.74 (dd, 1H, J=2 y 7.4 Hz) H-8, 6.71 (d, 1H, J=10.0 Hz) H-1', 5.59 (d, 1H, J=10.1 Hz) H-2', 1.46 (s, 6H) 2 CH<sub>3</sub>, 5.9 (s, 1H D<sub>2</sub>O int.) Ar-OH.

EM:70 eV (m/z): 310 M<sup>+</sup> (21.3%) [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>], 295 (100%) [M<sup>+</sup>- CH<sub>3</sub>], 257 (4.1 %) [M<sup>+</sup>- C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>], 147 (11.5%)

### 5.4.5. Jacareubeina (III).

La jacareubeina no fué aislada de manera pura, se obtuvo como mezcla con el compuesto IV. Parte de la mezcla III y IV se sometió a acetilación. El producto de acetilación fué un polvo blanco el cual fué una mezcla de IIIa y IVa. Dicha mezcla apareció como una sola mancha en CCF (ver materiales y metodos) la cual fué separada por CC obteniendose la 5,6-diacetiljacareubeina (IIIa).

El compuesto III ha sido previamente aislado de: *Calophyllum brasiliensis* (King *et al.*, 1953), *C. zeylanicum* Kosterm (Bennett *et al.*, 1989), *C. soulattri* (Gunasekera *et al.*, 1977), *C. neo-ebudicum* (Scheinmann *et al.*, 1971), *C. inophyllum* (Jackson *et al.*, 1969; Al-Jeboury *et al.*, 1971), *C. sclerophyllum* Vesq. (Jackson *et al.*, 1966), *C. scriblitifolium* (Jackson *et al.*, 1967), *C. fragrans* Ridley (Locksley *et al.*, 1969) y *C. canum* Hook (Carpenter *et al.*, 1969).

### 5,6-diacetiljacareubeina (IIIa).

En el espectro de RMNP del compuesto IIIa se observan dos señales, una de ellas es un doble de dobles en 6.72 (J=0.6 y 10.0 Hz) y otra un doblete en 5.61 (J=10.1 Hz) dichas señales son similares a las observadas en el compuesto I por lo que fueron asignadas a dos protones vinílicos que forman un anillo de cromeno. Adicionalmente se observan dos señales simples en 2.42 y 2.36 las cuales corresponden a los protones metilo de dos grupos acetato lo cual indica que la molécula original (III) presenta dos hidroxilos orto en un anillo aromático.

Por otra parte se pudo observar que el compuesto **IIIa** presentaba trazas del compuesto 1',2'-dihidro-5,6-diacetil-jacareubeina (**IIIb**). La presencia de dicho compuesto (**IIIb**) se confirmó en EM por los picos adicionales en 412m/z (19%), 370 (15%), 328(31%), los cuales corresponden al ión molecular  $(C_{22}H_{20}O_8)^+$  y a la pérdida de dos fragmentos  $C_2H_2O$  respectivamente; adicionalmente en el espectro de RMNP del **IIIa** se observan dos pequeñas señales triples en 2.7 y 1.85 ppm asignadas a dos protones metileno en posición 1' y 2' del **IIIb**. El origen del **IIIb**, en cuanto a si es un artefacto o un producto natural no fué determinado.

#### **Datos espectroscópicos:**

##### **5,6-diacetiljacaraubeina (IIIa)**

Polvo amarillo, p.f. 169-170°

UV  $\lambda_{max}$  [MeOH], nm ( $\epsilon$ ): 239 (3496), 292 (3584), 327 (1493).

EM: 70 ev (m/z): 410  $M^+$  (50%) [ $C_{22}H_{18}O_8$ ], 395 (93%) [ $M^+ - CH_3$ ] = A, 353 (97%) [ $A - C_2H_2O$ ] $^+$ , 311 (100%) [ $A - 2 C_2H_2O$ ] $^+$ , 43 (42%) [ $C_2H_3O$ ] $^+$ .

#### **5.5. Compuestos obtenidos del extracto metanólico.**

La separación cromatográfica del extracto de metanol proporcionó 3 compuestos, los cuales de acuerdo a sus características físicas y datos espectroscópicos fueron identificados como: Jacareubeina (**III**), 1,3,5,-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (**IV**) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (**V**) (Figura 9).

Las características físicas así como los análisis espectroscópicos de IR, UV y RMNP son similares a los previamente indicados en el punto anterior. El extracto acuoso no se analizó químicamente.

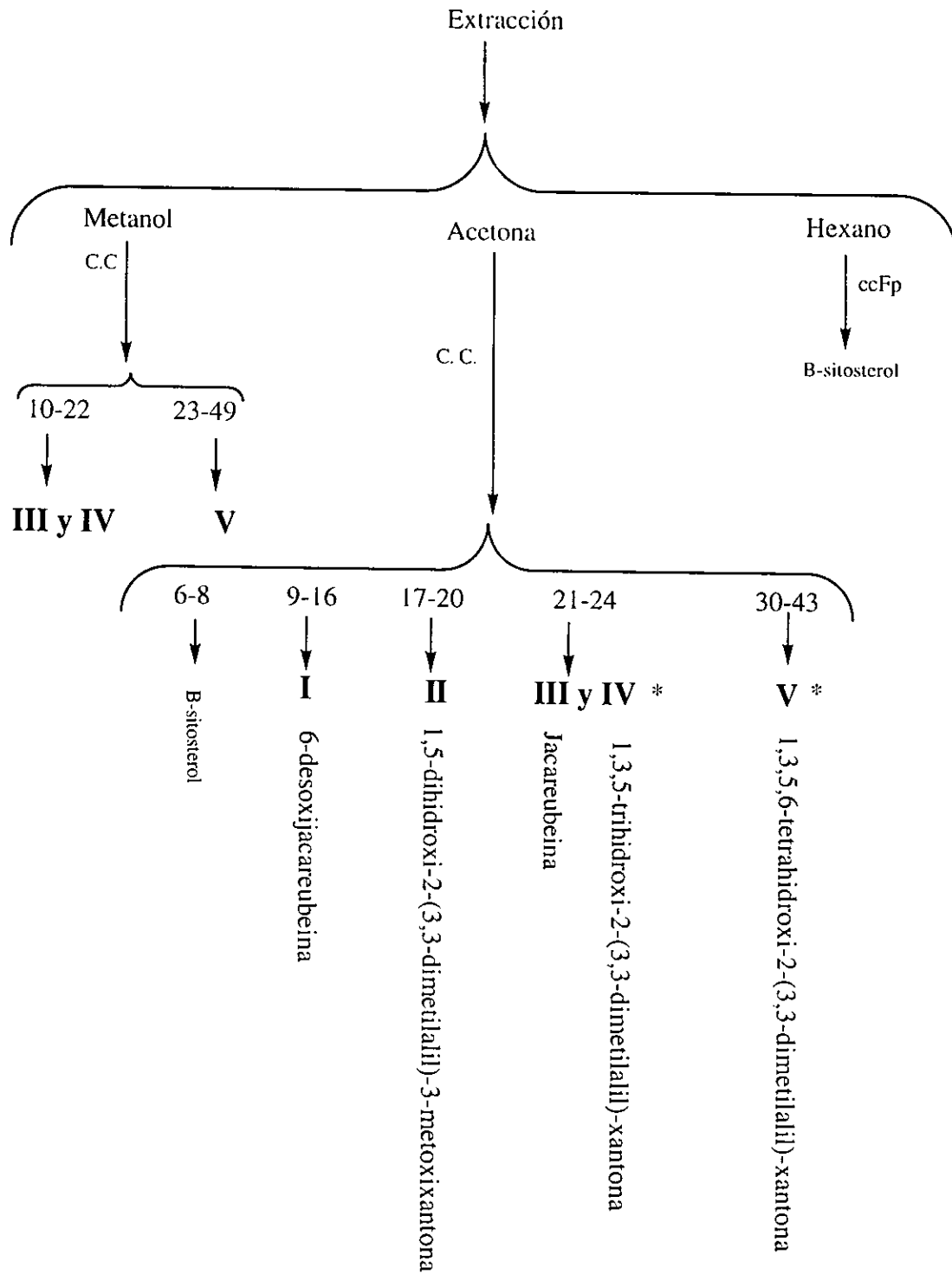
## 5.6. Rendimiento de los compuestos obtenidos.

En la tabla 7 se muestran los rendimientos de los compuestos aislados de los extractos de acetona y metanol. En está se observa que la mezcla **III** y **IV** así como el compuesto **V** estuvieron presentes en ambos extractos (acetona y metanol). La mezcla **III** y **IV** está representada con un rendimiento del 2.821 y 3.44 % respectivamente. En el caso del compuesto **V** esté fué particularmente abundante en ambos extractos con un 11.78 y 20.64 % respectivamente. Los compuestos **I** y **II** unicamente estuvieron presentes en el extracto de acetona con rendimientos bajos (0.017 y 0.041% ).

**Tabla 7.** Rendimiento de los compuestos aislados del duramen de *C. brasiliensis*.

<b>Compuesto</b>	<b>Gramos</b>	<b>Rendimiento %</b>
<b>I</b> (Ex. acetona)	0.0050	0.017 %
<b>II</b> (Ex. acetona)	0.0120	0.042 %
<b>III</b> y <b>IV</b> (Ex.acetona)	0.7900	2.821 %
<b>III</b> y <b>IV</b> (Ex. metanol)	0.0860	3.44 %
<b>V</b> (Ex. acetona)	3.3000	11.78 %
<b>V</b> (Ex. metanol)	0.5160	20.64 %
<b>TOTAL</b>	4.709	38.74 %

**Figura.9** Obtención de los compuestos del duramen de *C. brasiliensis* .



\* Compuestos que se acetilaron

Tabla 6. RMNP ( $\delta$ , ppm) de las Xantonas aisladas de *C. brasiliensis*.

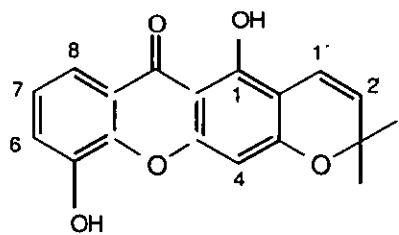
	I	II	IIIa
OH-1	13.32 s (D <sub>2</sub> O int.)	13.08 s (D <sub>2</sub> O int)	12.99 s (D <sub>2</sub> O int)
H-4	6.38 s	6.63 s	6.33 s
H-5			
H-6	7.35 dd (J=1.8 y 7.8 Hz)	7.34 m	
H-7	7.28 t (J=7.8Hz)	7.27 t (J= 8.1 Hz)	7.20 d (J=8.8 Hz)
H-8	7.67 dd (J=1.8 y 7.8 Hz)	7.67 d (J= 7.8 Hz)	8.13 d (J=8.8 Hz)
H-1'	6.69 d (J=10.2 Hz)	3.33 d (J=7.2 Hz) [2H]	6.72 dd (J= 0.6 y10.0 Hz)
H-2'	5.76 d (J=9.9 Hz)	5.20 tt (J= 1.5 y 7.2 Hz)	5.61 d (J= 10.1 Hz)
CH <sub>3</sub>	1.47 s	1.77 s	1.55 s
CH <sub>3</sub>	1.47 s	1.63 s	1.47 s
Ar-OH	9.15 s (D <sub>2</sub> O int.)	9.4 s (D <sub>2</sub> O int)	
Ar-OH			
Ar-OH			
OCH <sub>3</sub>		4.0 s	
OAc			2.42 s
OAc			2.36 s
OAc			
	300 MHz/Acetona-D6	300 MHz/Acetona-D6	200 MHz/CDCI <sub>3</sub>

s = singulete, d = doblete, t = triplete, m= multiplete, a = ancho.

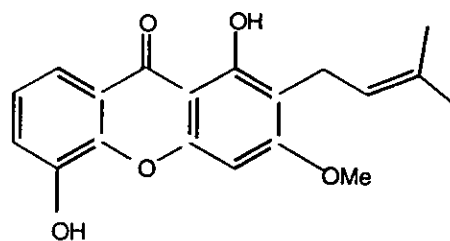
Tabla 6. RMNP ( $\delta$ , ppm) de las Xantonas aisladas de *C. brasiliensis*.  
(*continuación*)

	IV	IVa	V	Va
O11-1	13.25 s (D <sub>2</sub> O int.)	12.97 s (D <sub>2</sub> O int.)	13.41 s (D <sub>2</sub> O int.)	12.92 s (D <sub>2</sub> O int.)
H4	6.56 s	6.74 s	6.50 s	6.75 s
H5				
H6	7.33 dd (J= 2 y 7.9 Hz)	8.14 dd (J=1.8 y 8 Hz)		
H7	7.25 t (J= 7.5 Hz)	7.36 t (J= 8 Hz)	6.95 d (J=8.7 Hz)	7.24 d (J=8.96 Hz)
H8	7.67 dd (J= 2 y 7.5 Hz)	7.49 dd (J=1.5 y 7.8 Hz)	7.62 d (J=8.7 Hz)	8.17 d (J=8.92 Hz)
H1'	3.36 d (J= 7.2 Hz) [2H]	3.33 d (J= 7.2 Hz)[2H]	3.34 d (J=7.2 Hz)[2H]	3.33 d (J=6.96 Hz)[2H]
H2'	5.28 tq (J= 7.4 Hz)	5.15 tt (J=1.5 y 7.2 Hz)	5.27 tm (J=7.2 y 1.5 Hz)	5.15 tt (J=7 y 1.3 Hz)
CH3	1.63 s	1.68 s	1.76 d (J= 0.9 Hz)	1.78 s
CH3	1.78 s	1.77 s	1.63 d (J=0.9 Hz)	1.69 s
Ar-OH	9.80 s a (D <sub>2</sub> O int.)		9.0 s a (D <sub>2</sub> O int.)	
Ar-OH	9.80 s a (D <sub>2</sub> O int.)		9.0 s a (D <sub>2</sub> O int.)	
Ar-OH			9.0 s a (D <sub>2</sub> O int.)	
OCH3				
OAc		2.43 s		2.43 s
OAc		2.34 s		2.36 s
OAc				2.34 s
	200 MHz/Acetona-D6	300 MHz/CDCI3	300 MHz/Acetona-D6	200 MHz/CDCI3

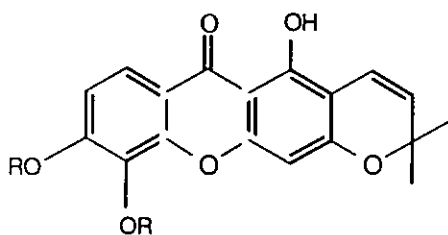
s = singulete, d = doblete, t = triplete, m= multiplete, a = ancho.



**I**

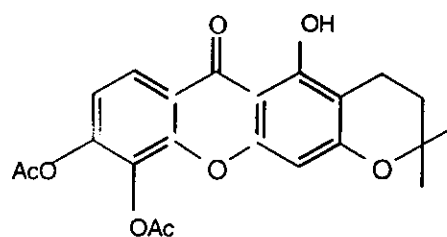


**II**

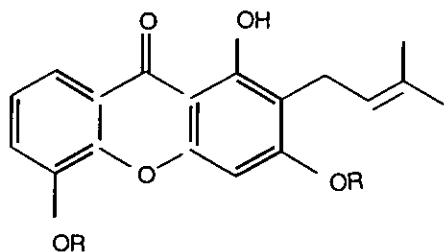


**III** R = H

**IIIa** R = Ac

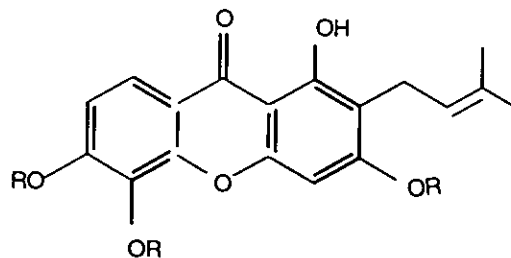


**IIIb**



**IV** R = H

**IVa** R = Ac



**V** R = H

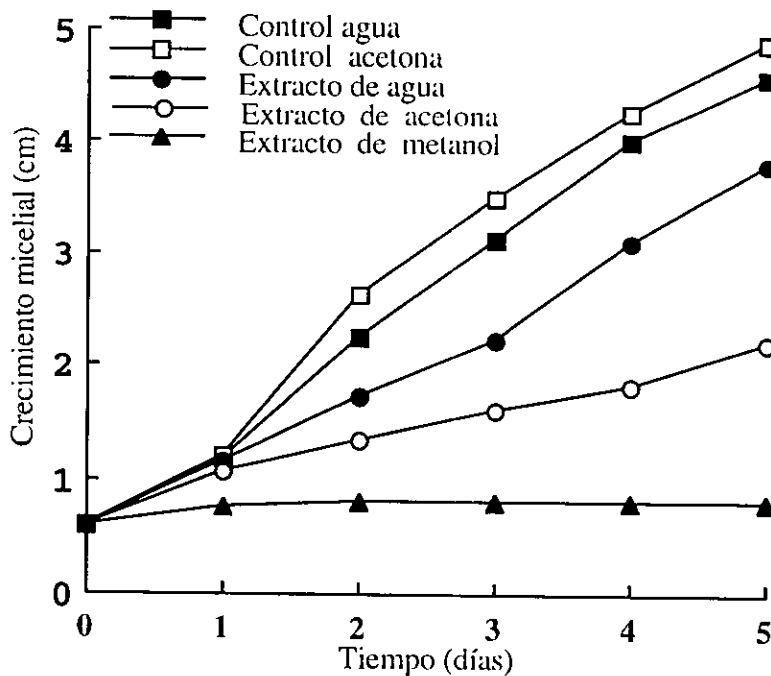
**Va** R = Ac

**Figura 10.** Xantonas naturales (I-V) y transformadas (IIIa-Va) del duramen *Calophyllum brasiliensis*.

## 5.7. Actividad Biológica.

### 5.7.1 Efecto de los extractos.

A la concentración empleada (5 mg/ml) los tres extractos (acetónico, metanólico y acuoso) inhibieron el crecimiento micelial del hongo de pudrición morena *Postia placenta*. (Gráfica No.1). Este efecto se observó a partir del segundo día. Al final de la prueba (5° día), el extracto de metanol fué el más activo inhibiendo el crecimiento micelial en un 83.6 %, siguiéndole el extracto de acetona con 59.0% de inhibición, y finalmente el extracto acuoso, el cual fué el que menor actividad biológica presentó (21.9 %) (Tabla 8). La prueba de Tukey mostró una diferencia altamente significativa entre el tratamiento del extracto metanólico con respecto al control. Los demás tratamientos mostraron diferencias significativas entre sí y con respecto al control con una probabilidad de  $\alpha= 0.05$ .



Gráfica 1. Efecto de los extractos (5 mg/ml) de *C. brasiliensis* sobre el crecimiento micelial del hongo *Postia placenta* (media de 3 réplicas).



**Tabla 8.** Actividad fungistática de los extractos (5 mg/ml) del duramen de *C. brasiliensis* sobre el crecimiento micelial de *P. placenta*.

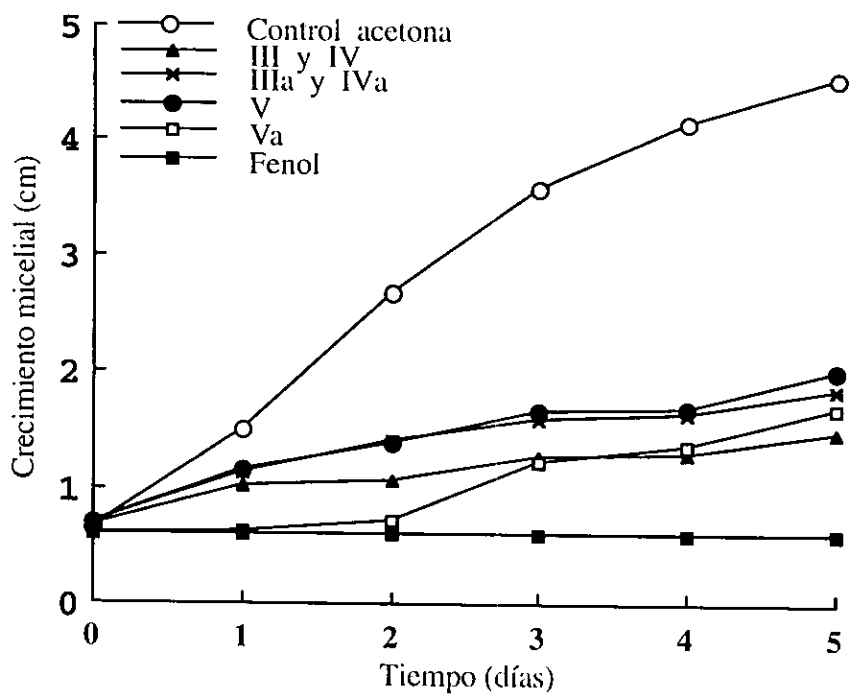
Extracto	Crecimiento (cm)*	% Inhibición
Control	4.88 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.0 ± 3.2
Hexano	n.p.	n.p.
Acetona	2.00 ± 0.00 <sup>b</sup>	59.0 ± 0.0
Metanol	0.80 ± 0.14 <sup>c</sup>	83.6 ± 2.8
Agua	3.81 ± 0.06 <sup>d</sup>	21.9 ± 1.2

Medias ± desviación estándar de tres réplicas cinco días después de la inoculación. La menor diferencia significativa > 0.59; las letras indican que las medias son significativamente diferentes entre sí con una probabilidad de  $\alpha=0.05$  (Prueba de Tukey), n.p. no probado.

### 5.7.2. Efecto de las xantonas aisladas.

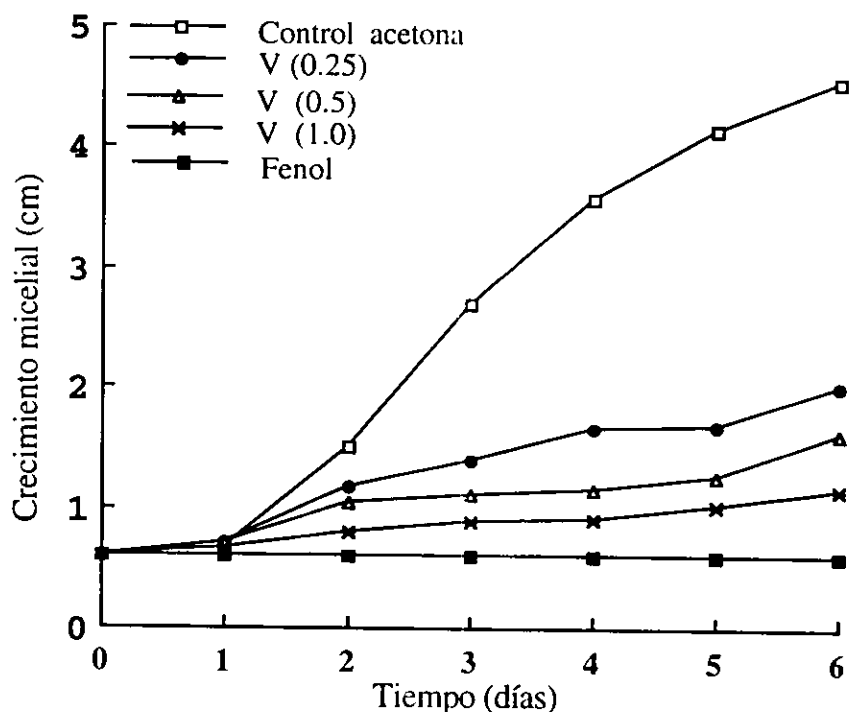
A la concentración usada (0.25 mg/ml), todos los compuestos aislados presentaron actividad antifúngica contra *Postia placenta*. El fenol bajo las mismas condiciones inhibió en crecimiento micelial en un 100 %. En la gráfica No. 2 se puede observar que el efecto fungistático sobre el crecimiento del hongo *P. placenta* se manifiesta a partir del segundo día. No obstante es al final de la prueba (6° día), donde se observa que todas las xantonas inhibieron el crecimiento micelial, en un rango de 55.8 %(V) a un 67.3% (III y IV) (Tabla 9). Bajo las mismas condiciones los productos obtenidos por acetilación (IIIa, IVa y Va) no mostraron una diferencia estadísticamente significativa respecto al efecto inhibitorio de los productos naturales.

En el caso del acetato Va, se observa un leve incremento en su actividad (8%) y en el caso de la mezcla acetilada IIIa y IVa está actividad disminuye (tabla 9). De acuerdo a la prueba de Tukey, se demostrará que existen diferencias estadísticamente significativas entre los compuestos naturales y con respecto al control. No obstante las diferencias entre los compuestos naturales y sus acetatos no son estadísticamente significativas y podrían no ser detectadas.



**Gráfica 2.** Efecto de las xantonas y sus derivados (0.25 mg/ml) sobre el crecimiento micelial de *Postia placenta*.

En la gráfica 3 se observa que al incrementar la concentración del compuesto V a 0.5 y 1.0 mg/ml, la actividad se incrementa en un 64.6 y 74.6 % respectivamente. Este último dato resulta interesante ya que es estadísticamente diferente del que se obtiene a la concentración de 0.25 mg/ml (tabla 9). Pero resulta aún más importante observar que cuando se incrementa la concentración de la xantona V a 1.0 mg/ml, la inhibición observada no es estadísticamente diferente de aquella que se obtiene con el fenol a 0.25 mg/ml. Esto sugiere que la xantona V es cuatro veces menos efectiva que el fenol.



**Gráfica 3.** Efecto de la xantona V a tres concentraciones (0.25, 0.5 y 1.0 mg/ml) sobre el crecimiento micelial de *Postia placenta*.

**Tabla 9.** Actividad biológica de las xantonas aisladas del duramen de *C. brasiliensis*. \*

<b>Compuesto</b> (mg/ml)	<b>Crecimiento</b> (cm)*	<b>%</b> <b>Inhibición</b>
<b>Control</b>	4.53 ± 0.33a	00.0 ± 7.2
<b>V</b> (1.00)	1.15 ± 0.41bd	74.6 ± 9.0
<b>V</b> (0.50)	1.60 ± 0.14b	64.6 ± 3.0
<b>V</b> (0.25)	2.00 ± 0.42be	55.8 ± 9.2
<b>IV</b> (0.25)	1.95 ± 0.40be	56.9 ± 8.8
<b>IIIa &amp; IVa</b> (0.25)	1.85 ± 0.07be	59.1 ± 1.5
<b>Va</b> (0.25)	1.68 ± 0.16b	62.9 ± 3.5
<b>III &amp; IV</b> (0.25)	1.48 ± 0.28b	67.3 ± 6.1
<b>Fenol</b> (0.25)	0.60 ± 0.00cd	100.0 ± 0.0

Medias ± desviación estandar de tres réplicas seis días después de la inoculación. La menor diferencia significativa >0.59; Las letras indican que la medias son estadísticamente diferentes entre sí con una probabilidad de  $\alpha = 0.05$  (Prueba de Tukey).

Con el fin de conocer sí el compuesto V sufría alguna transformación química causada por el metabolismo del hongo, las cajas de petri fueron reunidas y el agar fue tratado con disolvente. Al examinar el recuperado por cromatografía en placa fina se observó únicamente un compuesto con un rendimiento del 71%, el cual por sus datos de espectroscopia de RMNP fué identificado como el compuesto original (V).

## 6. DISCUSION.

En el presente trabajo se aislaron del duramen de *Calophyllum brasiliensis* cinco compuestos (I-V) del tipo de las xantonas, que fueron los constituyentes mayoritarios en los extractos de acetona y metanol. Dichas xantonas poseen un sustituyente isoprenilo 3,3-dimetilalil en el carbono 2. Adicionalmente las xantonas I, II, IV presentan un sustituyente oxigenado en los carbonos 1, 3, 5; los compuestos III y V presentan un hidroxilo adicional (tetraoxigenadas) en el carbono 6.

Todas las xantonas antes mencionadas se han aislado previamente de otras especies de *Calophyllum* (Bennet *et al.*, 1989; Peres *et al.*, 1997) a excepción del compuesto II. Este unicamente se ha obtenido de los frutos de *Garcinia mangosta* (Sen *et al.*, 1981). Las xantonas I-V representan aproximadamente el 0.78% (w/w) del peso seco de la madera. El compuesto V contribuye con el 0.63%, siguiendole la mezcla de los compuestos III y IV con un 0.14%. Los compuestos I y II son minoritarios.

Las xantonas aisladas mostraron una buena actividad antifúngica contra el hongo de pudrición morena *Postia placenta* (55.8-67.3%), esto sugiere que estos compuestos y en especial el compuesto V son los responsables de la resistencia natural del duramen de *C. brasiliensis*. En una investigación realizada por Schultz *et al.*, (1995) obtuvieron la 1,3,5,6-tetrahidroxixantona del duramen de *Maclura pomifera*. Este compuesto a una concentración de 200 ppm (0.2 mg/ml) inhibió el crecimiento micelial de los hongos xilófagos *Gleophyllum trabeum* y *Trametes versicolor* en más de un 50% (IC<sub>50</sub>). En el caso de las xantonas aisladas en la presente tesis estas también mostraron una actividad biológica superior al 50%, bajo concentraciones similares (0.25 mg/ml=250 ppm). Cabe destacar que la 1,3,5,6-tetrahidroxixantona aislada por Schultz es el precursor biogenético del compuesto V (Figura 11).

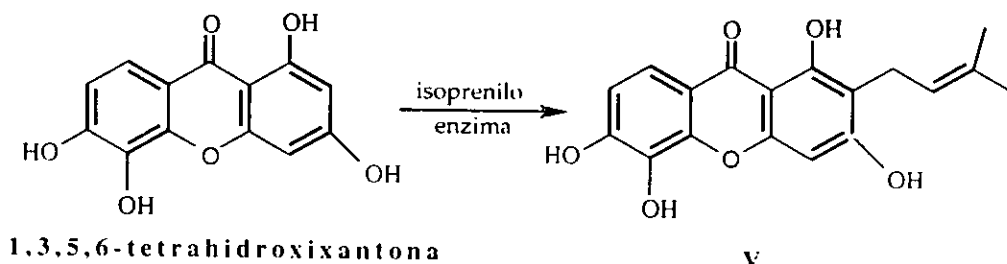


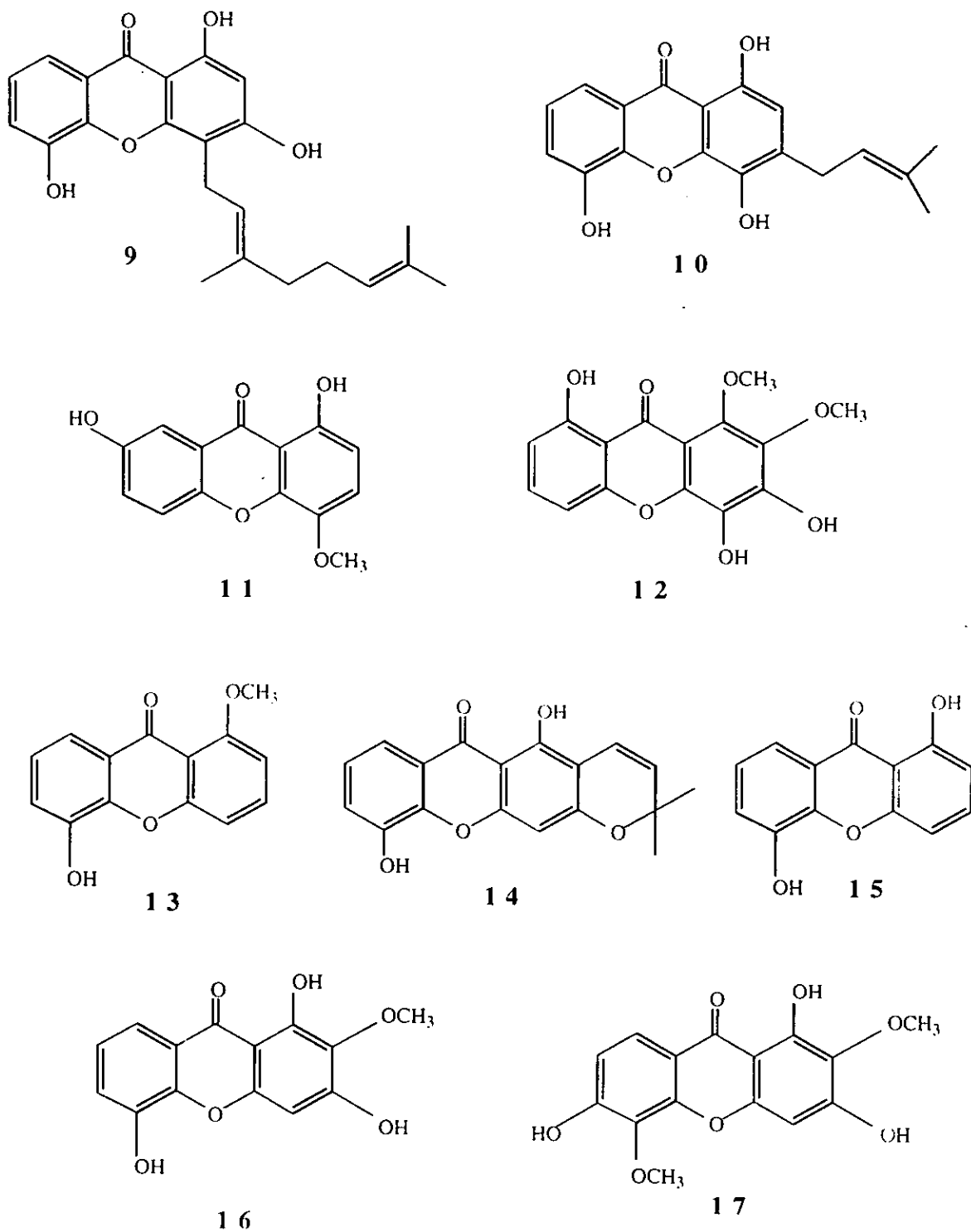
Figura 11. Precursor biogenético del compuesto V

No obstante las xantonas aisladas de *C. brasiliensis* fueron menos efectivas que el fenol a la misma concentración. Schultz *et al.*, (1995) también reporta que los compuestos aislados de *Maclura pomifera* son menos efectivos cuando fueron evaluados contra los fungicidas comerciales como el 3-iodo-2-propinilbutil carbamato (IPBC).

En los últimos años las xantonas han despertado un gran interés debido a sus propiedades biológicas principalmente farmacológicas como son : inhibición de las enzimas monoamino oxidasas tipo A y B, citotoxicidad *in vitro*, antitumoral *in vivo*, antibacteriana, tuberculostática, anti-inflamatoria, mutagénica, antidepresiva, diurética, antiviral, cardiotónica y antifúngica (Sordat-Diserens *et al.*, 1992, Rath *et al.*, 1996, Peres y Nagem, 1997).

En relación al último rubro existe en la actualidad un gran interés por obtener nuevos fungicidas de origen natural que no contaminen el medio ambiente, que sean fácilmente degradados y que no provoquen efectos nocivos o secundarios a los seres vivos en especial al ser humano. En este contexto se ha reportado que varias xantonas, muchas de ellas con sustituyente isoprenilo tienen una buena actividad contra hongos fitopatógenos. Entre estas se encuentran la 4-(3',7'-dimetilocta-2',6'-dienil)-1,3,5-trihidroxi-9H-xanten-9-ona (Sordat-Diserens *et al.*, 1992); 1,7-dihidroxi-4-metoxixantona, 1,6-dihidroxi-7,8-dimetoxixantona (Marston *et al.*, 1993); 5-hidroxi-1-metoxixantona, 6-deoxijacareubeina, 1,5-dihidroxi-1-metoxixantona (Rocha *et al.*, 1994); 1,3,5-trihidroxi-2-metoxixantona (Pinto *et al.*, 1994). Todas ellas inhibieron al hongo *Cladosporium curcumerinum*. La última xantona mencionada y la 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona además inhibieron a *Trichophyton mentagrophytes* (Pinto *et al.*, 1994.) (Figura 12).

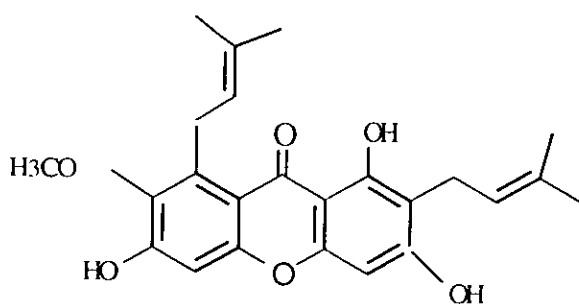
Otras xantonas aisladas de *Garcinia mangostana* como la  $\gamma$ -mangostina, el gartanin y la gartinona D mostraron actividad contra tres tipos de hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis* y *Dreschlera oryzae*. La  $\gamma$ -mangostina fue la más efectiva (Gopalakrishna *et al.*, 1997). Adicionalmente Rath *et al.*, (1996); reportaron que algunas de las xantonas aisladas de *Hypericum roeperanun* mostraron actividad antifúngica contra el hongo patógeno del humano *Candida albicans*. Todas las xantonas antes mencionadas, comparten al menos una característica en común, presentan un hidroxilo o una función oxigenada unida al carbono 3. Esto hace suponer que el OH en esta posición es importante para dicha actividad.



**Figura 12.** Xantonas con actividad antifúngica ( con base en Sordat *et al.*, 1992, Marston *et al.*, 1993, Pinto *et al.*, 1994).

Es interesante señalar que aquellas xantonas con un grupo funcional metoxilo unido al carbono tres que se encuentra ya sea de manera natural o por reacciones de metilación en el laboratorio, no muestran actividad contra hongos, o pierden toda actividad. Dentro de estas podemos mencionar la 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona así como el derivado metilado de la xantona 1,3,5-trihidroxi-2-metoxixantona (Pinto *et al.*, 1994), 1-hidroxi-3,7,8-trimetoxixantona, 1,7,8-trihidroxi-3-metoxixantona, 1-hidroxi-3,5-dimetoxixantona (Rodríguez *et al.*, 1995), y la 1,7-dihidroxy-3,5,6-trimetoxixantona (Marston *et al.*, 1993). Todas ellas fueron completamente inactivas contra *C. curcumerinum* y *C. albicas*.

Gopalakrishnam *et al.*, (1997), sugieren que la alquilación de los hidroxilos unidos a los carbonos 3 y 6 en la mangostina reduce considerablemente su actividad antifúngica, posiblemente por impedimento estérico. Estos autores mencionan que en el caso del hongo fitopatógeno *D. oryzae*, la alquilación de la mangostina (Figura 13), con grupos etil, propil y butil, estimula el crecimiento micelial, mientras que la acetilación o alquilación con grupos como isoprenil, alil, y metilalil provoca una disminución de la actividad fungistática.



**Figura 13.** Mangostina

No obstante existen en este trabajo ciertos detalles que provocan confusión por ejemplo: a) Se observa una variación considerable entre los controles b) La acetilación de la mangostina no reduce significativamente el crecimiento cuando se prueba *in vitro* con *A. tenuis* y *F. oxysporium* y c) En el caso del hongo *D. oryzae* la acetilación inhibe moderadamente. Debido a esto, hay que tomar con reserva el estudio de estos autores.

En el presente estudio la acetilación de los compuestos **V** y la mezcla **III** y **IV** no redujo significativamente la actividad fungistática. Sin embargo en estudios preliminares realizando la misma prueba antifúngica pero con el hongo *Gleophyllum trabea* (= *Lenzites trabeum*) (datos no mostrados), se ha



observado una marcada disminución de la actividad fungistática por parte del derivado acetilado. Esto sugiere que el efecto antifúngico de la xantona V podría tener más de un sitio o mecanismo de acción (el cual se desconoce), y que depende de los distintos hongos xilófagos, los cuales difieren en su metabolismo. Por lo tanto es necesario a futuro conocer los mecanismos bioquímicos y/o celulares que intervienen en la regulación del crecimiento micelial de diferentes especies de hongos.

Adicionalmente a las propiedades previamente mencionadas, se ha reportado que las xantonas presentan propiedades antioxidantes y funcionan como atrapadores de radicales libres (Minami *et al.*, 1994, 1995). Estas propiedades son importantes considerando que la degradación de la madera por parte de los hongos de pudrición morena (como *Postia placenta* en este estudio) involucra la secreción de  $H_2O_2$  por parte de las hifas, el cual interacciona con los iones libres  $Fe^{2+}$  u otros metales de transición presentes en la madera (Kirk, 1983; Highley, 1982).

Bajo esta perspectiva se puede hipotetizar que durante el ataque de estos hongos, las xantonas estarían actuando como barrera en los primeros estados de la infección atrapando los radicales libres que se generan en el sistema  $H_2O_2/Fe^{2+}$ , siendo estas las primeras en ser oxidadas retrasando la degradación de los polímeros estructurales. Para probar esta hipótesis se recuperó el compuesto V del medio tratado. Los resultados indicaron que el compuesto (V) no fue oxidado *in vitro* por *P. placenta*, Esto muy probablemente no ocurrió debido a que no se aseguró la presencia de iones metálicos en el medio ( $Fe^{++}$ ), por lo que a futuro es necesario profundizar en este aspecto asegurando que existan las condiciones adecuadas como la presencia de iones metálicos, para que dicho fenómeno bioquímico se manifieste.

## 7. CONCLUSIONES

A partir del estudio químico y biológico del duramen de *Calophyllum brasiliensis* se puede concluir que:

- 1) El duramen de *Calophyllum brasiliensis* es rico en metabolitos secundarios del tipo de las xantonas como son: 6-desoxijacareubeina (I), 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (II), Jacareubeina (III), 1,3,5,-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV) y 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V). De los compuestos aislados únicamente dos habían sido reportados de la madera de *C. brasiliensis* colectada en Brasil. Esto sugiere que podrían existir diferentes quimiotipos o variedades dentro de la especie, cuyo rango de distribución es muy amplio (México-Brasil).
- 2) Los compuestos probados (III, IV, V) presentaron actividad antifúngica, lo cual apoya la hipótesis de que los metabolitos secundarios del duramen son los responsables de la resistencia natural de la madera al biodeterioro causado por factores bióticos.
- 3) El compuesto V fué el más abundante siguiéndole la mezcla III y IV. El compuesto V mostró una actividad inhibitoria similar al fenol. Con lo cual se puede concluir que estos compuestos y en particular el compuesto V, son los principales responsables de la durabilidad y alta resistencia natural al biodeterioro causado por hongos y termitas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Al-Jeboury F. S. y Locksley H. D. 1971. Xanthonas in the heartwood of *Calophyllum inophyllum*: a geographical survey. *Phytochemistry* 10:603-606.
- Ampofo S. A. and Waterman R. G. 1986. Xanthonas and neofla-flavonoids from two Asian species of *Calophyllum*. *Phytochemistry* 25(11): 2611-2620.
- Anand N. and Venkataraman K. 1947. *Proc, Indian Acad. Sci.*, 25 A, 438
- Bárcenas-Pazos M.G. 1995. Características tecnológicas de veinte especies maderables de la selva Lacandona. *Madera y Bosques* (México) 1(1): 9-38.
- Bárcenas-Pazos G., Rejón R. R., Echenique-Manrique R. 1980. *La Madera y su uso en la construcción*. Xalapa Veracruz. Inst. Nac. de Invest. sobre Recurs. Bioticos p. 20.
- Bennett G. y Lee H. H. 1989. Xanthonas from Guttiferae. *Phytochemistry* 28(4):967-998.
- Campos V. A., Cortes A. L., Davila A. P., Garcia M., A. ; Reyes S. J., Toriz A. G., Torres C. L. y Torres C. R. *Plantas y Flores de Oaxaca*. México. UNAM. 1992.pag.15.
- Carter F. L. y Camargo C. R. R. 1983. Testing antitermitic properties of brazilian woods and their extracts. *Wood Fiber Sc.* 15:350-357.
- Carpenter I., Locksley H. D. y Scheinmann F. 1969. Extractives from Guttiferae. Part X. The isolation and structure of for xanthonas from *Calophyllum canum* Hook f. *J. Chem. Soc. (C)* 486-488.
- Clark, J.W. y Scheffer, T.C. 1983. Natural decay resistance of heartwood of coast redwood *Sequoia sempervirens* (D.Don) Endl. *Forest Products Journal.* 33:15-20.
- Chudnoff M. 1984. *Tropical timbers of the world*. Agric. Handbook. Washington, D.C. :U.S. Department of Agriculture, Forest Service p 466 p.
- Déon G. 1983. Les composés flavoniques du dabema et leur role dans la résistance de ce bois a la pourriture. *Cahiers Scientifiques du Centre Technique Forestier Tropical*. Supplément au 6. Nogent su Mer, France. 16 pp.
- Dirzo Rodolfo. 1985. Metabolitos secundarios en plantas ¿Atributos panglossianos o de valor adaptativo?. *Ciencia* 36:137-145.
- Echenique-Manrique R. 1970. *Descripción, características y usos de 25 maderas tropicales mexicanas*. México. Camara Nacional de la Industria de la Construcción.
- Echenique-Manrique R., Francisco Robles F. 1993. *Ciencia y Tecnologia de*

- la Madera I.* México Veracruz. Universidad Veracruzana.
- Esllyn, W.E., Bultman J.D., y Jurd, L. 1981. Wood decay inhibition by tropical hardwood extractives and related compounds. *Phytopathology* 71:521-524.
- Eriksson K. E. 1981. Cellulases of Fungi In: Trends in the biology of fermentations for fuels and chemical. Editado por Hollaender A., Rabson R., Rogers, Pietro, Valentine and Wolfe. New York pag.19-32.
- Estrada A., Coates-Estrada R. 1995. *Las selvas tropicales húmedas de México: recurso poderoso, pero vulnerable.* México, Fondo de Cultura Económica,
- García B. H. 1992. *Flora Medicinal de Colombia.* Botánica Médica. Tomo II. Bogota, Colombia. Tercer Mundo Editores.
- Gómez-Garibay F., Reyes-Chilpa R., Quijano L., Calderon-Pardo J.S., and Rios-Castillo, T. 1990. Methoxy furan auronols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry* 29(2):459-463.
- Gopalakrishnan G., Band B. and Suresh G. 1997. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthenes from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. *Journal of Natural Products.* 60(5):519-524.
- Gros E. G., Pomilio, A. B., Seldes A. M. y Burton, G. 1985 *Introducción al estudio de los productos naturales.* Washington, D. C., OEA.
- Gunasekera S. P., Jayatilake G. S., Selliah S. S. and Sultanbawa M.U.S. 1977. Chemical investigation of ceylanose plants. Part 27. Extractives of *Calophyllum cuneifolium* Thw. and *Calophyllum soulattri* Burm. F. (Guttiferae). *Journal of the Chemical Society. Perkin I* 1505-1511.
- Herrera T. y Ulloa M. 1990. *El reino de los hongos: Micología básica y aplicada.* México D. F. Fondo de Cultura Económica p.552.
- Highley T.L. and Kirk K. 1979. Mechanisms of wood decay and the unique features of heartrots. *Phytopathology* 69(10):1151-1157.
- Highley T.L. 1982. Is extracellular hydrogen peroxide involved in cellulose degradation by brown-rot fungi?. *Mater. Org.* 17(3):205-214.
- Jackson B., Locksley H.D. and Scheinmann F. 1966. Extractives from Guttiferae. Part I. Extractives of *Calophyllum sclerophyllum* Vesq. *Journal of the Chemical Society (C)* 178-181.
- Jackson B., Locksley H.D. and Scheinmann F. 1967. Extractives from Guttiferae. Part. VII. The Isolation and structure of seven xanthenes from *Calophyllum scriblitifolium* Henderson and Wyatt-Smith. *Journal of the Chemical Society (C)* :2500-2507.
- Jackson B., Locksley H.D. and Scheinmann F. 1969. The isolation of 6-deoxyjacareubin, 2-(3,3-dimethylalil)-1,3,5,6-tetrahydroxanthones and Jacareubin from *Calophyllum inophyllum*.

- Phytochemistry*. 8:927-929.
- Kashman Y., Gustafson K. R., Fuller R. W., Cardellina J. H., McMahon J. B., Currens M. J., Buckheit R. W., Hughes S. H., Cragg G. M., Boyd M. R. 1992 The Calanolides, a novel HIV-Inhibitory class of Coumarin derivatives from the tropical Rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of the Medical Chemistry* 35:2735-2743.
- King F. E., King T. J. and Manning L.C. 1953 The Chemistry of Extractives from Hardwoods. Part XIV. The Constitution of Jacareubin a Pyranoxanthone from *Calophyllum brasiliense*. *The Chemistry of Organic*:3932-1937.
- Kirk T.K., 1983. Degradation and conversion of lignocelluloses. In: *Filamentous Fungi*. Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. (eds.). *Fungal Technology*. Edward Arnold Pub. London, Vol. 4:122 p.
- Koenigs J.W. 1974. Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot Basidiomycetes. *Wood Fiber* 6(1):66-79.
- Locksley H. D. y Murray I. G. 1969. Extractives from Guttiferae. Part XII. The isolation and structure of seven xanthenes from *Calophyllum fragrans* Ridley. *J. Chem. Soc. (C)* 1567-1571.
- Marston A., Hamburger M., Sordat-Diserens M., Jerome D. and Hostettmann, K. 1993. Xanthenes from *Polygala nykensis*. *Phytochemistry*. 33(4):809-812.
- Martínez, M. 1994. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas*. México D. F. Fondo de Cultura Económica.
- McDaniel, C.A. 1992. Major antitermitic components of the heartwood of southern catalpa. *Journal of Chemical Ecology* 18(3):359-369.
- McLaren, J.S. 1986. Biologically active substances from higher plants ? status and future potential. *Pesticide Science* 17:559-578.
- Minami, H., Kinoshita, M., Fukuyama, Y., Kodama, M., Yoshizawa, T., Sigiura, M., Nakagawa, K. and Tago, H. 1994. Antioxidant Xanthenes from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry* 36(2):501-506.
- Minami, H., Takahashi, E., Fukuyama, Y., Kodama, M., Yoshizawa T. and Nakagawa, K. 1995. Novel xanthenes with superoxide scavenging activity from *Garcinia subelliptica*. *Chemical Pharmacology Bulletin* 43(2):347-349.
- Oliveira , G. G. De Lins Mesquita, A. A., Gottlieb, O.R. e Taveira Magalhaes, M., 1966. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 38:421.
- Ortega-Escalona. F., Castillo-Morales. I., and Carmona-Valdovinos, T. 1991. *Anatomía de la Madera de Veintiseis Especies de la Selva Lacandona, Chiapas*. Angiospermas Arboreas de México No. 3. La Madera y su uso 26. Instituto de Ecología A.C. & Universidad Autónoma

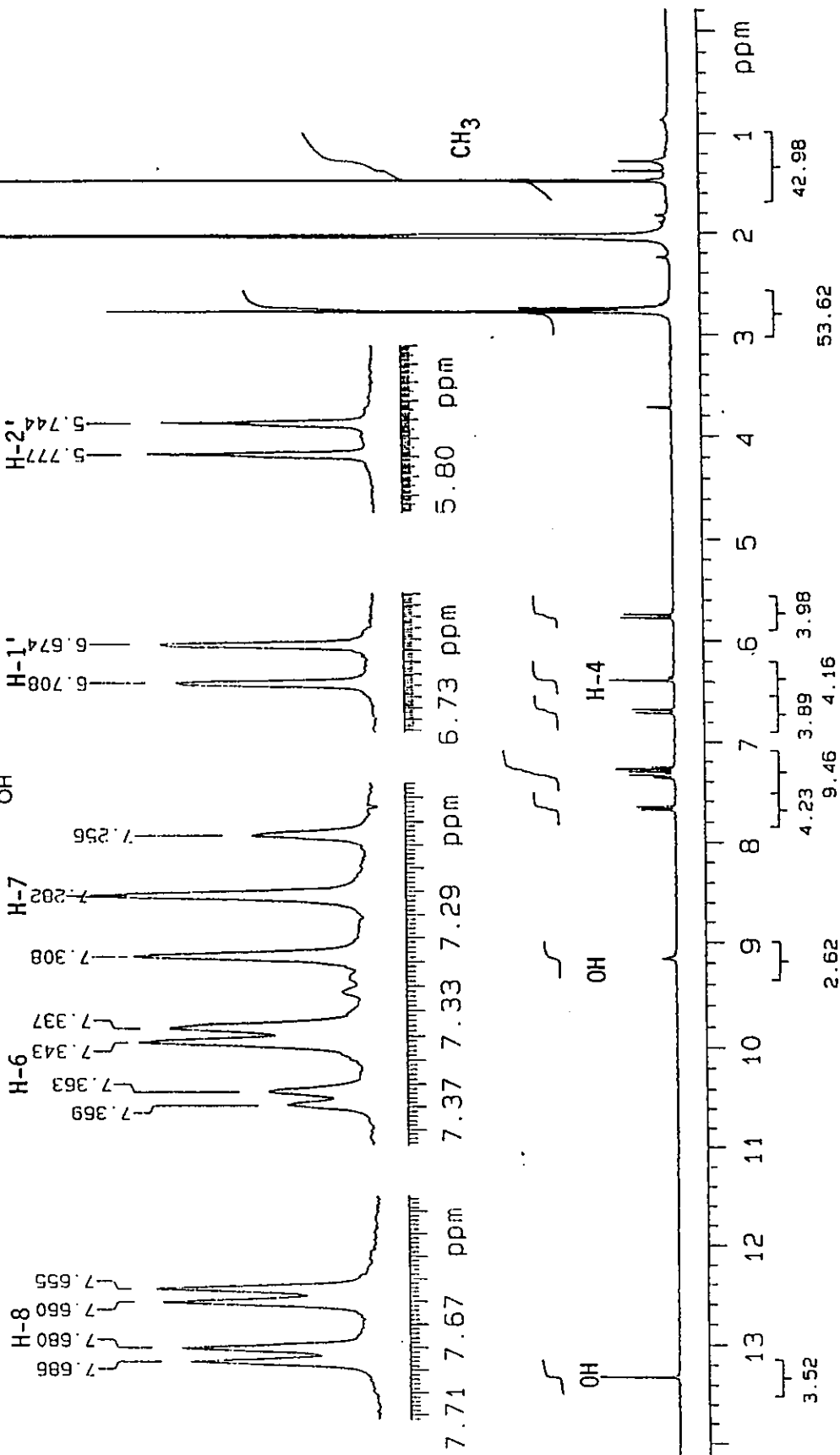
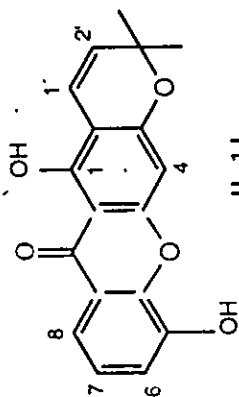
- Metropolitana. México. 200 pp.
- Otoni da Silva Pereira, M., Gottlieb, O. R., Taveira Magalhaes, M. 1966. A química de Gutíferas Brasileiras. IX Constituints xantónicos do *Calophyllum brasiliense*. *An. da Acad. Brasileira de. Ciencias.* 1966 38(3/4):425-427.
- Otoni da Silva Pereira, M., Gottlieb, O. R., Taveira Magalhaes, M. 1967. A química de Gutíferas Brasileiras. XIII Novas Xantonas do *Calophyllum brasiliense*. *An. da Acad. Brasileira de. Ciencias.* 1967 39(2):255-256.
- PAGE, Jake. 1983. *Forest*. Alejandria, Virginia : Time-life.
- Patil, Freyer, A.J., Eggleston, Drake S., Haltiwanger Curtis R., Bean, Mark F., Taylor, Caranfa, Breen, Ann L., Bartus, Henry R., Johnson, Randall K., Hertzberg, Robert P. and Westley, John. 1993. Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase isolated from Malaysian tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. *Medicinal Chemistry* 36(26):4131-4138
- Pennington, T. D., Sarukhan, José. 1968. *Manual para la identificación de campo de los principales árboles tropicales de México*. México. Instituto Nacional de Investigadores Forestales . pag.413
- Peres, V. y Nagem, T. J. 1997. Trioxxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry.* 44(2):191-214.
- Perkin, A. G., 1898 *J. Chem. Soc.*, 73:666
- Pérez Morales V., Castillo Morales I. Reyes Chilpa R. 1994. Capítulo 4. Secado y protección de la madera, en: *Manual de construcción de estructuras ligeras de la madera* Quintana Roo México Consejo Nacional de la Madera en la construcción, A. C. (COMACO), :66-86
- Pinto, D. G., Fuzzati, N. ; Pazmino, X. C. and Hostettmann, K. 1994. Xanthone and Antifungal Constituents from *Monnina obtusifolia*. *Phytochemistry* . 37(3):875-878.
- Plattner, R.D.; Spencer, G.F.; Weisleder D. and Kleiman, R. 1974. Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. *Phytochemistry* 13:2597-2602.
- Rath, G. ; Potferat O. ; Mavi, S. and Hosteffmann, K. 1996. Xanthones from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry* 42(2):513-520.
- Reyes Chilpa, R., Perez-Morales, V. and Del Angel-Blanco., S. 1987. Influencia de los extractivos en la resistencia natural de seis maderas tropicales al hongo de pudrición morena *Lenzites trabea*. *Biótica* (México) 12(1):7-13.
- Reyes Chilpa, R. 1994. Apuntes del Curso: Biodegradación de la madera (BPM-94) Veracruz, México. Instituto de Ecología . (Manuscrito sin publicar).

- Reyes-Chilpa, R., Viveros-Rodriguez, N., Gomez-Garibay, F. and Alavez-Solano, D. 1995. Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *Journal of Chemical Ecology* 21(4):155-463.
- Reyes-Chilpa, R., Quiroz-Vásquez, R.I., Jiménez-Estrada, M., Navarro-Ocaña, A., and Cassani-Hernández, J. 1997. Antifungal activity of selected plant secondary metabolites against *Coriolus versicolor*. *Journal of Tropical Forest Products* 3(1):110-113.
- Rocha, L., Marston, A., Kaplan, M.A.C., Stoekli-Evans, H., Thull, U., Testa, B., and Hostettmann, K. 1994. An antifungal g-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 36(6):1381-1385
- Rodriguez, Sylvain; Wolfender, Jean-Luc; Hakizamungu, Etienne y Hostettmann, Kurt. 1995. An antifungal naphthoquinone, xanthenes and Secoiridoids from *Swertia calycina*. *Planta Medica* 61:362-364.
- Scheinmann F. y Sripong Nuan-Anong. 1971. Xanthenes from the heartwood of *Calophyllum neo-ebudicum*: comments on the taxonomic value of Jacareubin in *Calophyllum* species. *Phytochemistry* 10:1331-1333.
- Schultz, T.P., Harms, W.B., Fisher, T. H., McMurtrey, K.D., Minn, J. y Nicholas, D.D. 1995. Durability of Angiosperm heartwood: the importance of extractives. *Holzforschung*. 49: 29-34.
- Sen, A. K., Sarkar, K. k., Majumder, P. C., Baseerji, N. 1981. Minor xanthenes of *Garcinia mangosta*. *Phytochemistry*. 20:183-185.
- Sordat-Diserens, Isabelle, Rogers, Colin, Sordat, Bernard and Hostettmann, Kurt. 1992. Prenylated Xanthenes from *Garcinia livingstonei*. *Phytochemistry* 31(1):313-316.
- Soto Nuñez, J. C. y M. Sousa S. 1995. *Plantas medicinales de la cuenca del Rio Balsas*. México D. F. UNAM.
- Stout, George H., Krahn, M. M. and G D. Breck 1968. *Calophyllum* Products. II. Brasiliensic and Inophyllodic acids. *Tetrahedron Letters* 29:3285-3290.
- Torelli, N. 1982. Estudio promocional de 43 especies forestales tropicales mexicanas. Reporte técnico . Programa de cooperación Científica y técnico México-Yugoslavia. SARH México.

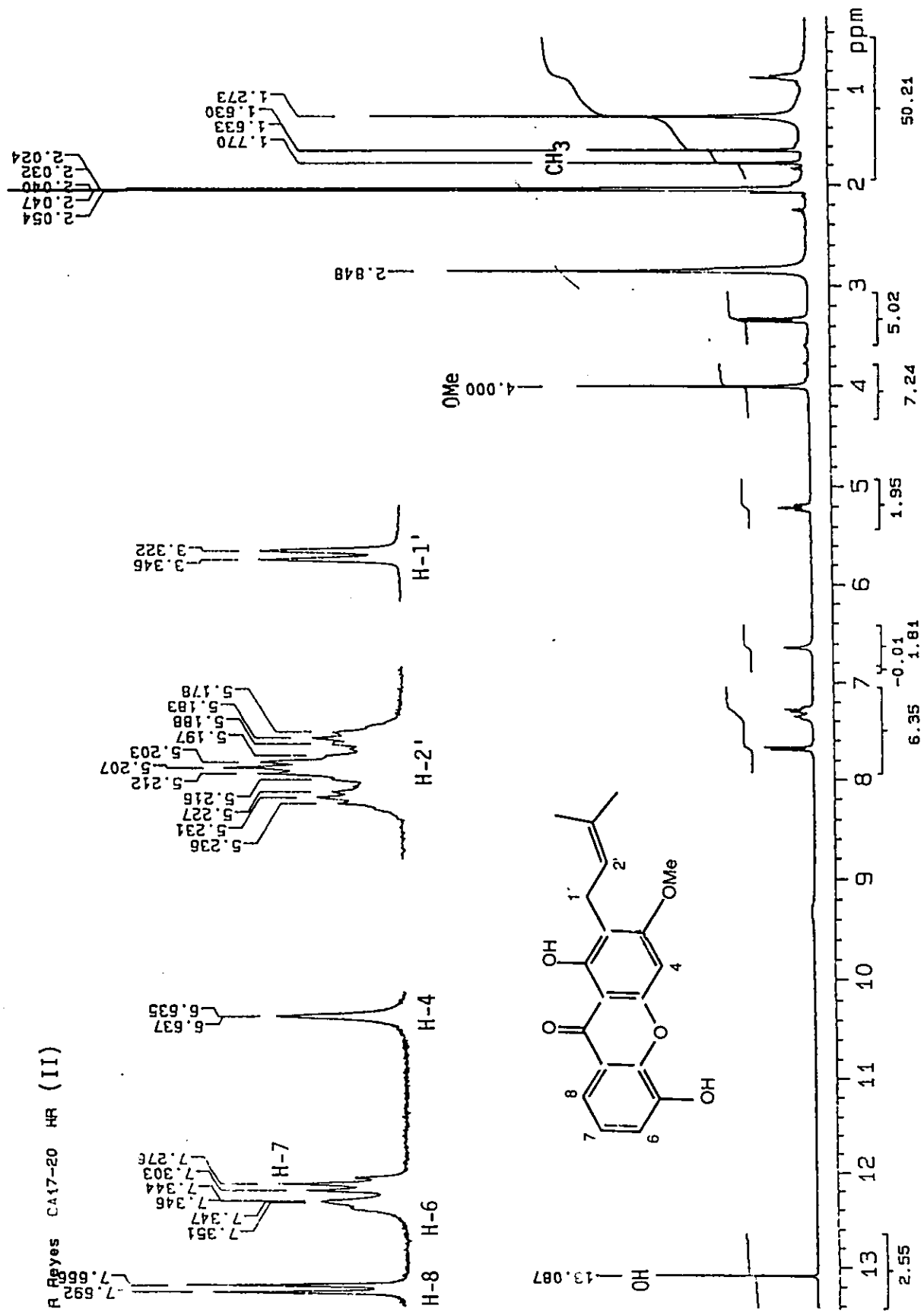
## ESPECTROS



U.N.A.M. Instituto de Química  
 Dr. R. Reyes CA-9 (I)  
 BGG  
 300 MHz

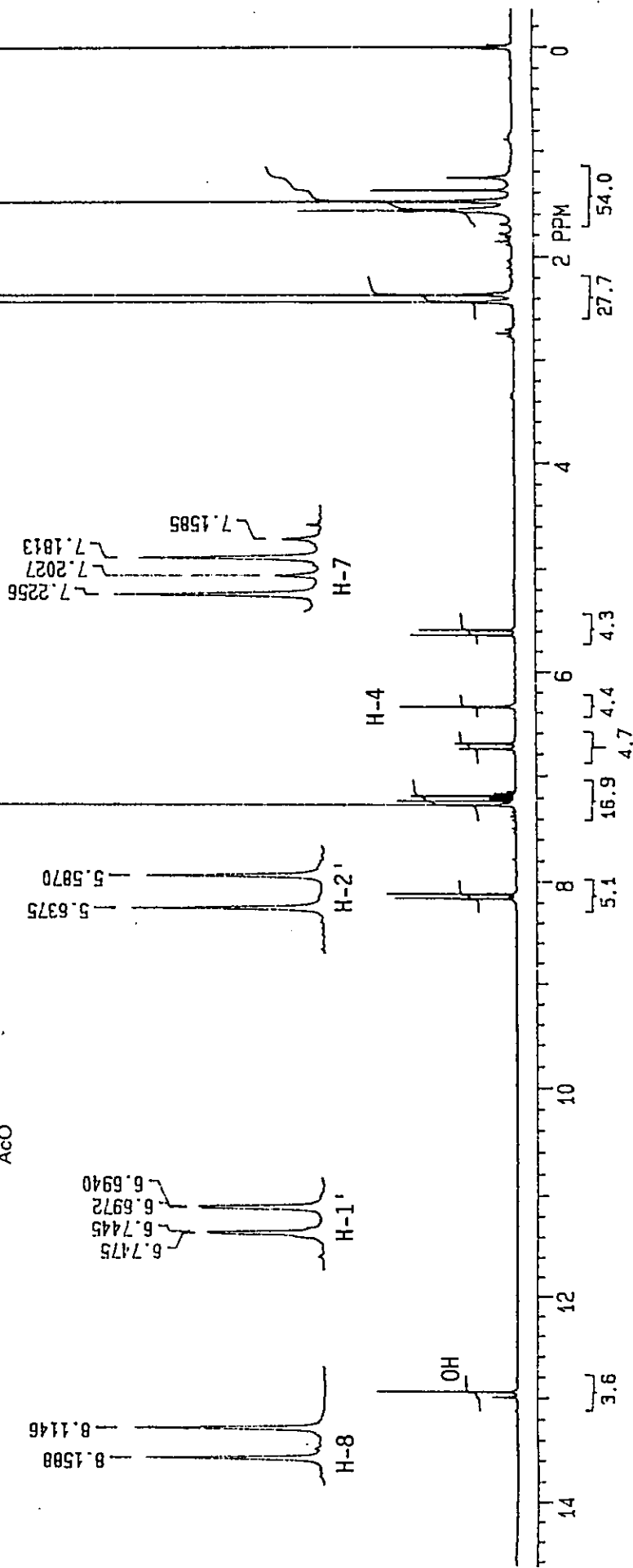
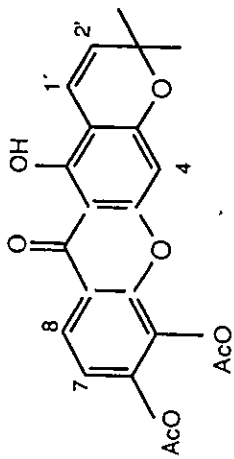


Espectro No. 1. Espectro de RMNP (300 MHz, Acetona Duterada): 6-desoxijacareubina (I)

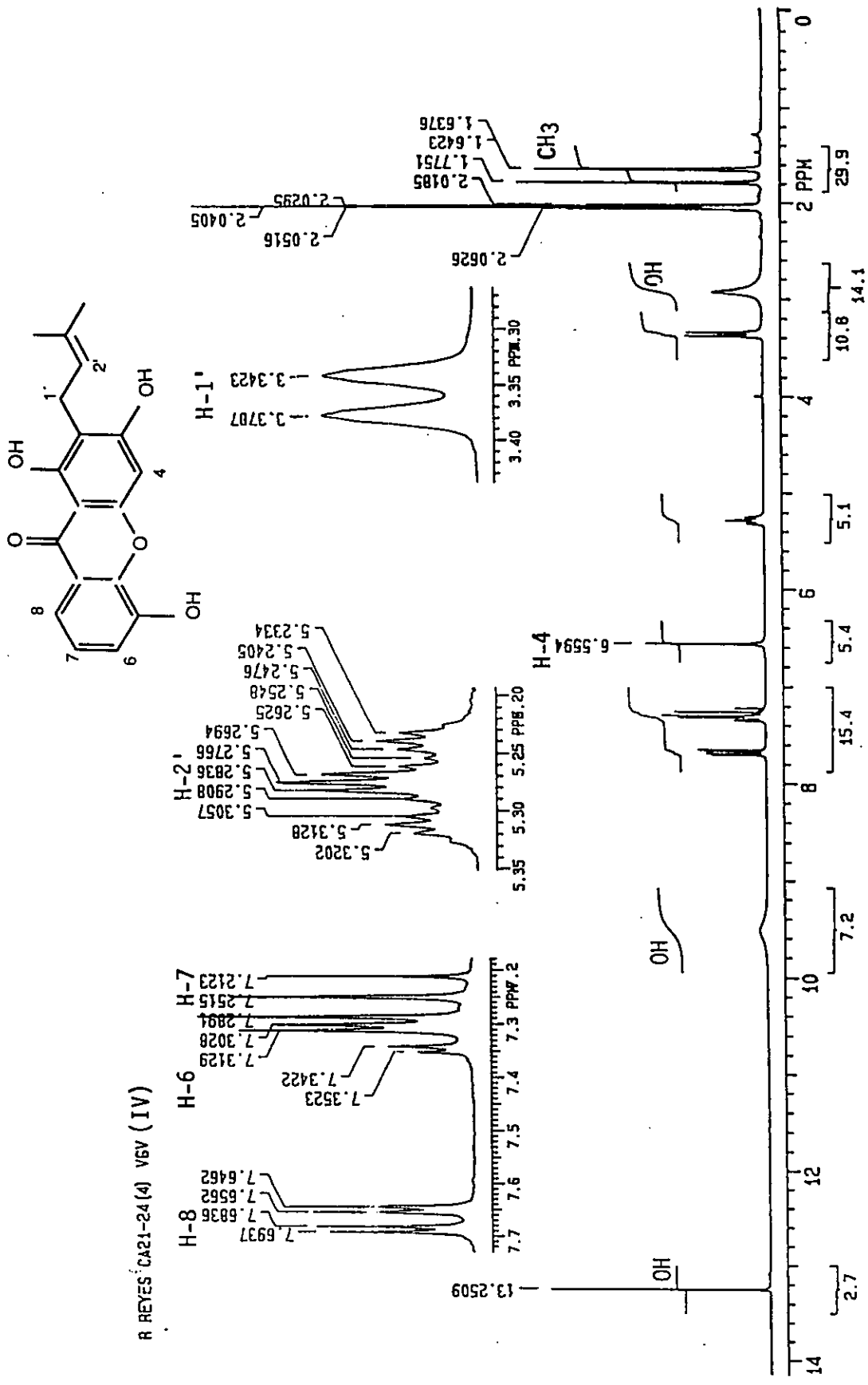


Espectro No. 2 Espectro de RMNP (300 MHz Acetona deuterada) : 1,5-dihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3-metoxixantona (II).

DR. R. REYES CA21-24AC(18) (IIIa)  
 806-EB  
 INST. DE QUIMICA U.N.A.M.

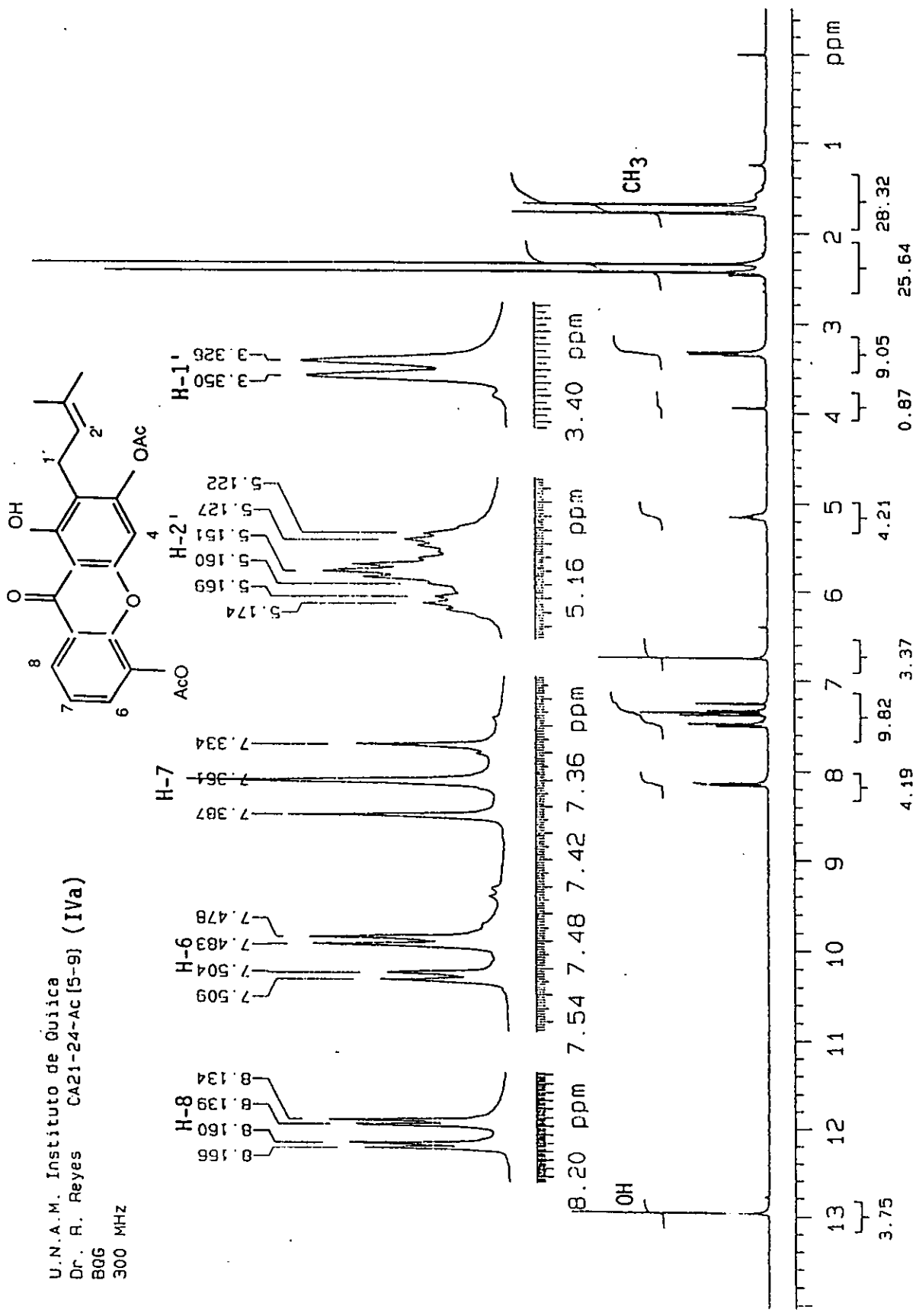


Espectro No.3. Espectro de RMNP (200 MHz, CDCL3) : 5,6-diacetiljacareubina (IIIa)



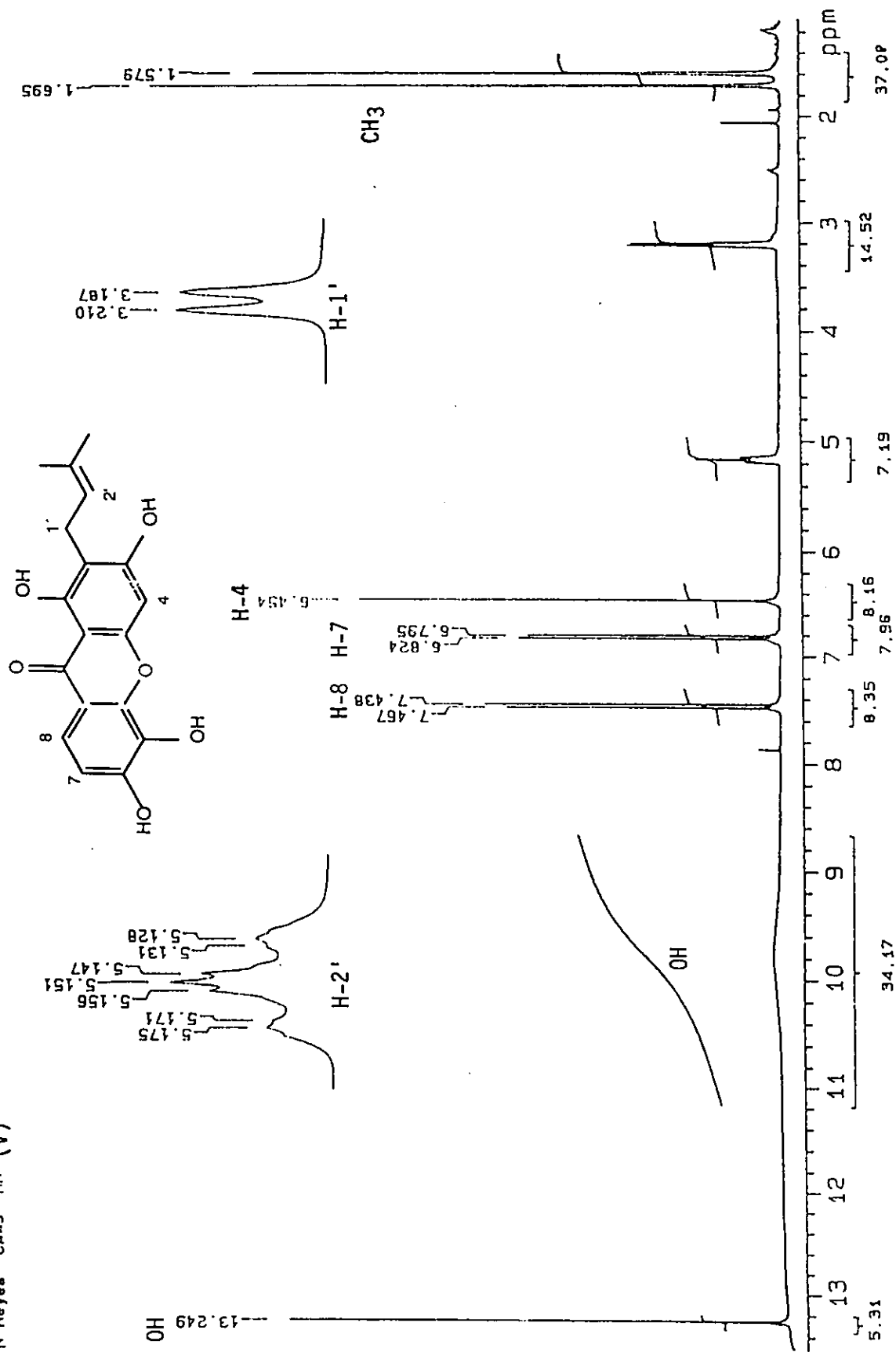
Espectro No.4. Espectro de RMNP (200 MHz, Acetona deuterada) : 1,3,5-trihidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (IV).

U.N.A.M. Instituto de Quimica  
 Dr. R. Reyes CA21-24-Ac [5-9] (IVa)  
 B06  
 300 MHz



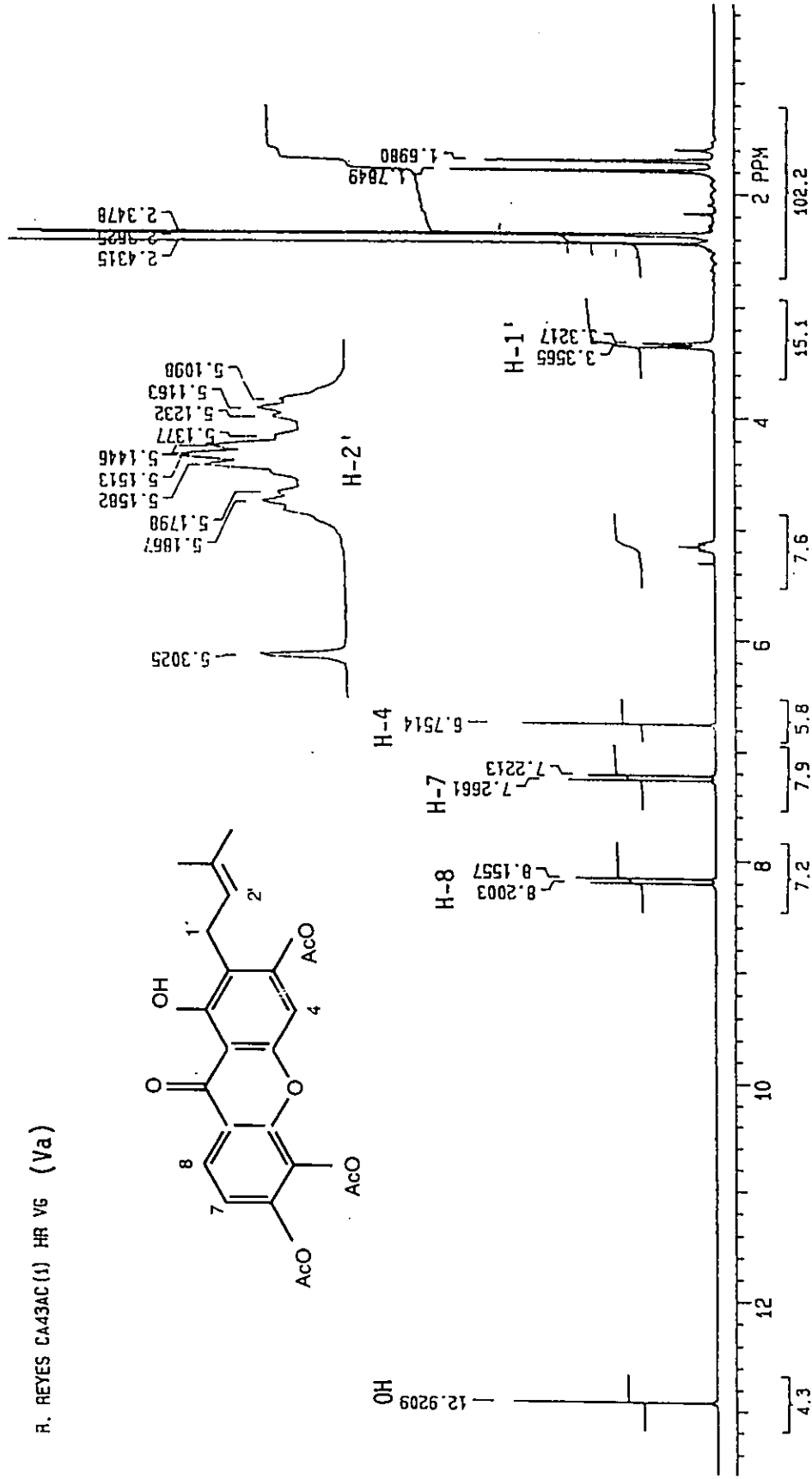
Espectro No.5. Espectro de RMNP (300 MHz, CDCL<sub>3</sub>) : 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5-diacetilxantona (IVa)

R Reyes CA43 HR (V)



Espectro No.6. Espectro de RMNP (300 MHz, Acetona deuterada) : 1,3,5,6-tetrahydroxi-2-(3,3-dimetilalil)-xantona (V)

R. REYES CA43AC (1) HR V6 (Va)



Espectro No.7. Espectro de RMNP (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1-hidroxi-2-(3,3-dimetilalil)-3,5,6-triacetilxantona (Va).