

72  
2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"ESTUDIO QUIMICO DE  
*Buddleja cordata* H. B. K. (Loganiaceae)."

## T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A:  
EMMA MARTINEZ LUNA

MEXICO D.F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

275012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Dra. Yolanda Caballero Arroyo.
<b>Primer Vocal</b>	Dra. Rachel Mata Essayag.
<b>Secretario</b>	Dra. Perla Carolina Castañeda López.
<b>Primer suplente</b>	M. en C. Irma Susana Rojas Tomé.
<b>Segundo suplente</b>	M. en C. José Fausto Rivero Cruz.

### **Sitio de realización de la tesis:**

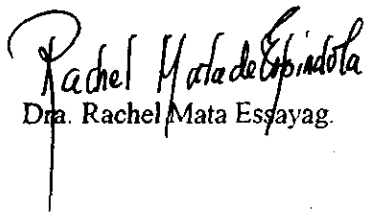
Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de  
la U. N. A. M.

### **Sustentante:**



Emma Martínez Luna.

### **Asesor:**



Dra. Rachel Mata Essayag.

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: "Bioactive Agentes from Dryland Plants of Latin American" a través del programa "International Cooperative Biodiversity Group" (NIH GRANT 5U01TW/\*\*00316-03) y DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN205197.

A las M. En C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN de los compuestos obtenidos de la especie *Buddleja cordata*.

A las Q. F. B. Graciela Chávez y Marisela Gutierrez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

A la Q. Georgina Duarte Lisci y el M. en C. José Luis Gallegos Pérez de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas de todos los compuestos presentados en este trabajo.

A la Q. F. B. Rosa Isela Del Villar Morales y al Q. F. B. Oscar S. Yañez Muñoz de la USAI, Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A Mónica Espindola Mata por su valiosa colaboración en la revisión y corrección del estilo del presente trabajo de tesis.

Al Dr. Daniel Chávez por su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. José Fausto Rivero Cruz por su valiosa ayuda otorgada durante la realización de este trabajo.

A la Q. F. B. Leda C. Gómez León y a la M. en C. Laura A. Acevedo Arteaga por su valiosa asistencia técnica.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

De manera especial agradezco la beca que se me otorgó a través del Proyecto "Bioactive Agentes from Dryland Plants of Latin American" a través del programa "International Cooperative Biodiversity Group" para la realización de mi tesis de Licenciatura.

Por último, deseo agradecer a la Dra. Rachel Mata por sus enseñanzas y la dirección de la presente investigación.

## DEDICATORIAS

A mis hijos Eduardo y Osvaldo,  
Con todo mi amor.

A mi esposo Alfredo Carreón.  
Por todo el cariño y el apoyo hasta ahora brindado.

A mi madre:  
Candelaria Luna.  
Por darme la vida, por su apoyo y cariño  
incondicional. Gracias "mami".

A mi padre:  
Rubén Martínez  
Por ser mi Papá, brindándome su amor y  
apoyo incondicional.  
Por que sin él no estaría donde estoy.

A mis hermanos:  
Carmen  
Juan Rubén  
Eusebio  
José Guadalupe

A mis suegros;  
Concepción Bárcenas  
Daniel Carreón  
Por todo el apoyo brindado a lo largo de mis  
estudios universitarios.

A mis cuñados:  
Lucina, Daniel, Ricardo.  
Emilia y Abraham.  
A mis sobrinos:  
Ricardo, Brenda, Berenice, Andrea y  
Alejandro

A la Dra. Rachel Mata con admiración y respeto.

A mis amigas:  
Lilia, Verónica y Cecilia.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio 124, en especial a:  
Leda , Blanca, Isabel, Mirza, Mitzi, Lupita, Fausto, Laura, Daniel y a la Dra. Perla  
Castañeda.

A las familias que han estado conmigo por muchos años:

Luna Argueta.

Morales Luna.

Torres Aramín.

Núñez Bárcenas.

Medina Bárcenas.

Bárcenas Piña.

Este trabajo lo dedico a las personas que tuve la desdicha de perder:

Eusebio Martínez Olvera.

Ramón Martínez.

Lucía Macías.

Santos Luna.

Ramón García.

Refugio Maldonado.

## CONTENIDO

Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Cuadros.....	v
Lista de Esquemas.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	viii
Lista de espectros.....	ix
<b>I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCION.....</b>	<b>4</b>
2.1 ANTECEDENTES DEL GENERO <i>Buddleja</i> Y DE LA ESPECIE <i>Buddleja cordata</i> .....	4
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	24
3.2 PROCEDIMIENTOS GENERALES.....	24
3.2.1 Análisis cromatográficos.....	24
3.2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	26
3.2.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.....	26
3.3 ESTUDIO QUIMICO DE <i>Buddleja cordata</i> H.B.K.....	27
3.3.1 Preparación del extracto orgánico.....	27
3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de <i>Buddleja cordata</i> .....	29
3.3.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias activas derivadas del extracto íntegro de <i>Buddleja</i> <i>cordata</i> .....	30
3.3.3.1 Aislamiento $\beta$ -sitosterol (26) y del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67) de la fracción F009.....	30

## CONTENIDO

3.3.3.2 Aislamiento de la mezcla constituida por palmitato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (68), heptadecanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (69), estearato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (70), nonadecanoato de 2[4-hidroxi-fenil etilo (71), eicosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (72), docosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (73), tricosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (74), tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (75), pentacosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (76) y hexacosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (77) de la fracción F010	31
3.3.3.3 Separación del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil etilo (75) a partir de la mezcla F017.....	32
3.3.3.4 Metilación de la mezcla F017.....	33
3.3.3.5 Saponificación de las mezclas F017, F019 y del producto puro 75.....	33
3.3.3.6 Metilación de las mezclas de ácidos grasos. F018-A, F018-B y del ácido lignocérico.....	34
3.4 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS MUESTRAS DE <i>Líquén sp.</i> .....	35
3.4.1 Preparación de los extractos orgánicos.....	35
3.4.1a <i>Líquén sp I.</i> .....	35
3.4.1b <i>Líquén sp II.</i> .....	35
3.4.1c <i>Líquén sp III.</i> .....	35
3.4.2 Aislamiento del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67) a partir del extracto íntegro del <i>Líquén sp. III.</i> .....	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
4.1 Estudio fitoquímico de <i>Buddleja cordata</i> .....	40
4.1.1 Caracterización del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).....	44



## CONTENIDO

4.1.2 Caracterizació del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).....	51
4.1.3 Elucidación estructural de los compuestos presentes en la mezcla de fenil etanoides (mezcla F017).....	60
4.2 Estudio fitoquímico del <i>Liquen sp III</i> .....	66
<b>V. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>VI. PERSPECTIVAS</b> .....	68
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	69
<b>ANEXO (Espectros)</b> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados.
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
cm	Centímetro.
COSY	Correlated spectroscopy.
$\delta$	Desplazamiento químico.
<i>d</i>	Doblete.
DEPT	Distortionless enhancement polarization transfer.
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico.

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación).

eV	Electron volts.
g	Gramos.
h	Hora.
HETCOR	Heteronuclear Correlation.
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond connectivity.
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
Hz	Hertz.
Int. rel.	Intensidad Relativa,
IR	Infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
Kg	Kilogramo
l	Litros.
$\lambda$	Longitud de onda.
$M^+$	Ión molecular.
<i>m</i>	Multiplete.
<i>m/z</i>	Relación masa carga.
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{l}$	Microlitro.
mg	Miligramo
MHz	Megahertz.
ml	Mililitro.
mm	Milímetro.
nm	Nanómetro.
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy.
p. f.	Punto de fusión.
ppm	Partes por millón.

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación).

RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear protónica.
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.
s	Singulete.
TMS	Tetrametilsilano.
uma	Unidades de Masa Atómica.
UV	Ultravioleta.

## LISTA DE CUADROS.

Cuadro.	Contenido.	Página.
1	Propiedades medicinales atribuidas a <i>Buddleja cordata</i> .	7
2	Ejemplos de algunas especies del género <i>Buddleja</i> utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo	8
3	Metabolitos secundarios aislados de <i>Buddleja cordata</i> y otras especies del género <i>Buddleja</i> .	10
4	Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	25
5	Agentes cromógenos para los análisis cromatográficos en capa fina.	25
6	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la corteza de <i>Buddleja cordata</i> .	29
7	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F009 de <i>Buddleja cordata</i> .	30
8	Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F010 de <i>Buddleja cordata</i> .	32

**LISTA DE CUADROS (continuación).**

<b>Cuadro</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
9	Resumen del fraccionamiento preliminar via cromatografia en columna abierta del <i>Líquén sp III</i> (Bye 22555).	39
10	Metabolitos aislados de la especie <i>Buddleja cordata</i> .	41
11	Fenil etanoides detectados en el espectro de masas modalidad FAB de la mezcla de fenil etanoides (F017).	63
12	Acidos grasos de la hidrólisis de la mezcla de fenil etanoides (F017) indicados como sus ésteres metílicos en CG-EM.	64

**LISTA DE ESQUEMAS.**

<b>Esquema</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Proceso de extracción de la corteza de <i>Buddleja cordata</i> .	28
2	Proceso de extracción del <i>Líquén sp I</i>	36
3	Proceso de extracción del <i>Líquén sp II</i>	37
4	Proceso de extracción del <i>Líquén sp III</i> .	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página.
1	Distribución del género <i>Buddleja</i> en el mundo.	5
2	Distribución del género <i>Buddleja</i> en la República Mexicana	5
3	<i>Buddleja cordata</i> H. B. K.	6
4	Espectro de RMN-HMQC del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	47
5	Correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY del compuesto éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	49
6	Espectro NOESY del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	50
7	Cromatograma de líquidos de alta Resolución de donde se obtiene el tetracosanoato de 2' [4-hidroxi-fenil] etilo (75).	51
8	Cromatograma de Líquidos de Alta Resolución del compuesto puro 75 tetracosanoato de 2' [4-hidroxi-fenil] etilo .	52
9	Espectro de masas del tetracosanoato de 2' [4-hidroxi-fenil] etilo (75).	55
10	Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas por impacto electrónico del tetracosanoato de 2' [4-hidroxi-fenil] etilo (75).	56

**LISTA DE FIGURAS (continuación).**

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
11	Espectro de RMN modalidad COSY del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75)	58
12	Cromatograma de gases de la mezcla F017	60
13	Cromatograma de gases de la mezcla de éteres metílicos (F019) derivados de la mezcla de fenil etanoides (F017).	61
14	Fragmento característico de los éteres metílicos de los ácidos grasos.	62
15	Espectros de masas (CG-EM IE) generados por los picos de t.r. 16.99 min (78a) y 20.02 min (79a) presentes en la mezcla de fenil etanoides	62

**LISTA DE TABLAS.**

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	44
2	Datos de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	44
3	Datos de RMN- <sup>13</sup> C del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	45

## LISTA DE TABLAS (continuación).

Tabla	Contenido	Página.
4	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	53
5	Datos de RMN- <sup>1</sup> H del del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75)..	54
6	Datos de RMN- <sup>13</sup> C del del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	54

## LISTA DE ESPECTROS.

Espectro	Contenido	Página
1	Espectro en el IR del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	75
2	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	76
3	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	77
4	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H con intercambio de agua deuterada del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	78
5	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	79
6	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-DEPT del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	80

## LISTA DE ESPECTROS (continuación).

Espectro	Contenido	Página
7	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C-HETCOR del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).	81
8	Espectro en el IR del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	82
9	Espectro de masas modalidad IE del del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	83
10	Espectro de masas modalidad FAB <sup>+</sup> del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	84
11	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	85
12	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75) en presencia de agua deuterada.	86
13	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	87
14	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C modalidad HETCOR del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	88
15	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la mezcla F017 metilada (mezcla F019) del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75). del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75). del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).	89
16	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la mezcla F019	90



## LISTA DE ESPECTROS (continuación).

Espectro	Contenido	Página
17	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la mezcla F019 (continuación).	91
18	Cromatograma de gases de la mezcla F020-A	92
19	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido palmítico (68 a)	93
20	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido heptadecanoico (69 a)	93
21	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido esteárico (70 a)	94
22	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido nonadecanoico (71 a)	94
23	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido araquidónico (72 a).	95
24	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido behénico (73 a).	95
25	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido tricosanoico (74 a).	96
26	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido lignocérico (75 a).	96
27	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido hiénico (76 a).	97
28	Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido cerótico (77 a).	97

## ESTUDIO QUIMICO DE *BUDDLEJA CORDATA* H.B.K. (LOGANIACEAE).

### I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

El presente trabajo de tesis se generó del proyecto de investigación "Bioactive Agentes from Dryland Plants of Latin American", el cual forma parte de un programa de carácter internacional denominado "International Cooperative Biodiversity Group Program" (ICBG). Este programa está patrocinado por las siguientes instituciones gubernamentales de los Estados Unidos de América del Norte: National Science Foundation (NSF), U.S. Agency for International Development (USAID) y National Institute of Health (NIH).

Los objetivos generales del programa ICBG (Suffnes, *et al.*, 1995) son los siguientes:

- 1.- Identificar los recursos naturales renovables en países en vías de desarrollo y proponer estrategias para la conservación de los mismos.
- 2.- Desarrollar, a largo plazo, las estrategias ecológicas y económicas para el establecimiento de cultivos de recursos naturales en países en vías de desarrollo.
- 3.- Implementar investigaciones de bajo costo para la investigación de los recursos naturales regionales.
- 4.- Establecer nuevas industrias.
- 5.- Buscar nuevos fármacos de origen natural para tratar enfermedades que ocasionan problemas en vastos sectores de la población.
- 6.- Contribuir al mejoramiento de la infraestructura de investigación de los países en vías de desarrollo que participan en el programa.
- 7.- Contribuir a la formación de recursos humanos capacitados para realizar investigación sobre los recursos naturales renovables de los países participantes.

Los países que hacen una labor conjunta con los Estados Unidos de América del Norte en el proyecto "Bioactive Agentes from Dryland Plants of Latin American" son: Chile, Argentina

y México. Las instituciones norteamericanas a las que compete el desarrollo de la empresa científica antes señalada son: la Universidad de Arizona, donde reside el investigador principal del proyecto, American Cyanamid Company, Wyeth-Ayerst Laboratories y GWL Hansen's Disease Center. En México, la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Biología, es la responsable de colaborar con el proyecto. En Chile, la institución participante es la Universidad Católica de Chile; en tanto que en la Argentina participan la Universidad Nacional de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA.

La Facultad de Química, a través de un convenio con la Universidad de Arizona realiza las siguientes actividades:

- a.- Preparar extractos vegetales a partir de especies seleccionadas, principalmente mediante un criterio etnomédico.
- b.- Enviar los extractos para determinar su potencialidad terapéutica. Las evaluaciones biológicas se realizan en los laboratorios de las compañías American Cyanamid Company, Wyeth-Ayerst Laboratories, así como en los laboratorios de investigación de GWL Hansen's Disease Center.
- c.- Fraccionar de manera biondirigida los extractos que demuestren una actividad biológica significativa.
- d.- Separar y purificar los compuestos activos responsables de las actividades biológicas.
- e.- Elucidar las estructuras moleculares de los componentes aislados de las fracciones activas.

El convenio establecido con la Universidad de Arizona contiene una cláusula de confidencialidad en relación a los resultados de las evaluaciones biológicas. Estos resultados por lo tanto, no pueden ser difundidos sin el establecimiento de patentes que justifiquen los descubrimientos derivados de las investigaciones. En consecuencia, en el presente trabajo, no se describirá ningún resultado de tipo biológico.

Como se desprende de la información antes mencionada, las actividades que se desarrollan en la Facultad de Química se encuentran enmarcadas en el objetivo número cinco del programa ICBG, cuya meta es el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales a partir de algunas especies medicinales de las zonas áridas de la República Mexicana.

En el contexto del proyecto "Bioactive Agentes from Dryland Plants of Latin American" del programa ICBG, la planta medicinal *Buddleja cordata* H.B.K. (Loganiaceae) fue seleccionada como una fuente de principios activos de interés terapéutico. En consecuencia el objetivo primordial del presente trabajo es el aislamiento y la caracterización de los principios activos responsables de la actividad biológica demostrada en las evaluaciones preliminares, a partir del extracto íntegro de *Buddleja cordata*.

Para el cumplimiento de éste objetivo se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- (i) Preparar a gran escala el extracto íntegro de la corteza del árbol mediante un proceso de maceración.
- (ii) Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total mediante un proceso de cromatografía en columna abierta.
- (iii) Separar los principios activos a partir de las fracciones activas, empleando para ello, métodos cromatográficos.
- (iv) Identificar los compuestos activos mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos.

## II. INTRODUCCION.

### 2.1 Antecedentes del género *Buddleja* y de la especie *Buddleja cordata*.

El género *Buddleja* (Loganiaceae) a menudo escrito *Buddleia*, incluye aproximadamente 100 especies. Estos vegetales se distribuyen principalmente en el Continente Americano, desde Chihuahua, México, hasta el sur de Argentina (Norman, 1973). Cabe mencionar que algunas especies se han descrito en Asia (China y Japón) y Africa (Madagascar) Figura 1 y 2.

*Buddleja cordata* H.B.K. (Figura 3), conocida popularmente en el centro de México como "tepozán" y "tepozán blanco", es un árbol de 4 a 6 m de alto, sus hojas son pecioladas de forma lanceolada u ovada y miden de 8 a 30 cm. La base es generalmente subcordada y los bordes enteros o serrulados. Las flores se encuentran en panículas terminales.

El "tepozán" se emplea ampliamente en la medicina tradicional mexicana. Por ejemplo, en el centro del país la infusión de las hojas es utilizada para aliviar algunos desórdenes hepáticos; en tanto que el cataplasma de las hojas frescas se aplica localmente para el tratamiento de heridas, quemaduras y toda clase de afecciones de la piel (Aguilar *et al.*, 1994). Las hojas de la planta son también altamente valoradas para la cura del reumatismo, la diarrea, dolores de cabeza, así como para el alivio de las contracciones uterinas y la fiebre después del parto (Argueta *et al.*, 1994). En el último caso las hojas suelen combinarse con otras especies medicinales. La decocción de la raíz y la corteza se emplea como diurético para el tratamiento de problemas renales (Argueta *et al.*, 1994).

Los indios Tarahumaras conocen esta planta con los nombres de "matowi" o "wasala" y emplean las hojas y la corteza para curar las heridas e inflamación de la piel. De manera adicional, este grupo étnico utiliza las diferentes partes vegetales de la especie para la cura del "susto" y "alma perdida" (Bye, 1983; Cárdenas, 1993).

En Durango la infusión de la corteza se utiliza para el tratamiento de infecciones uterinas y dolores reumáticos, así como diurético (Standley, 1924). Otros usos que se le atribuyen a la especie se resumen en el Cuadro 1 (Bye, 1983; Houghton, 1984).

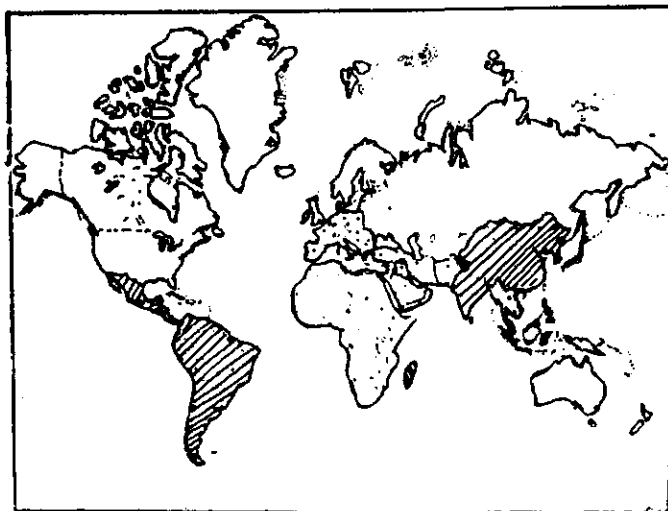


Figura 1. Distribución del género *Buddleja* en el mundo.



Figura 2. Distribución del género *Buddleja* en la República Mexicana.

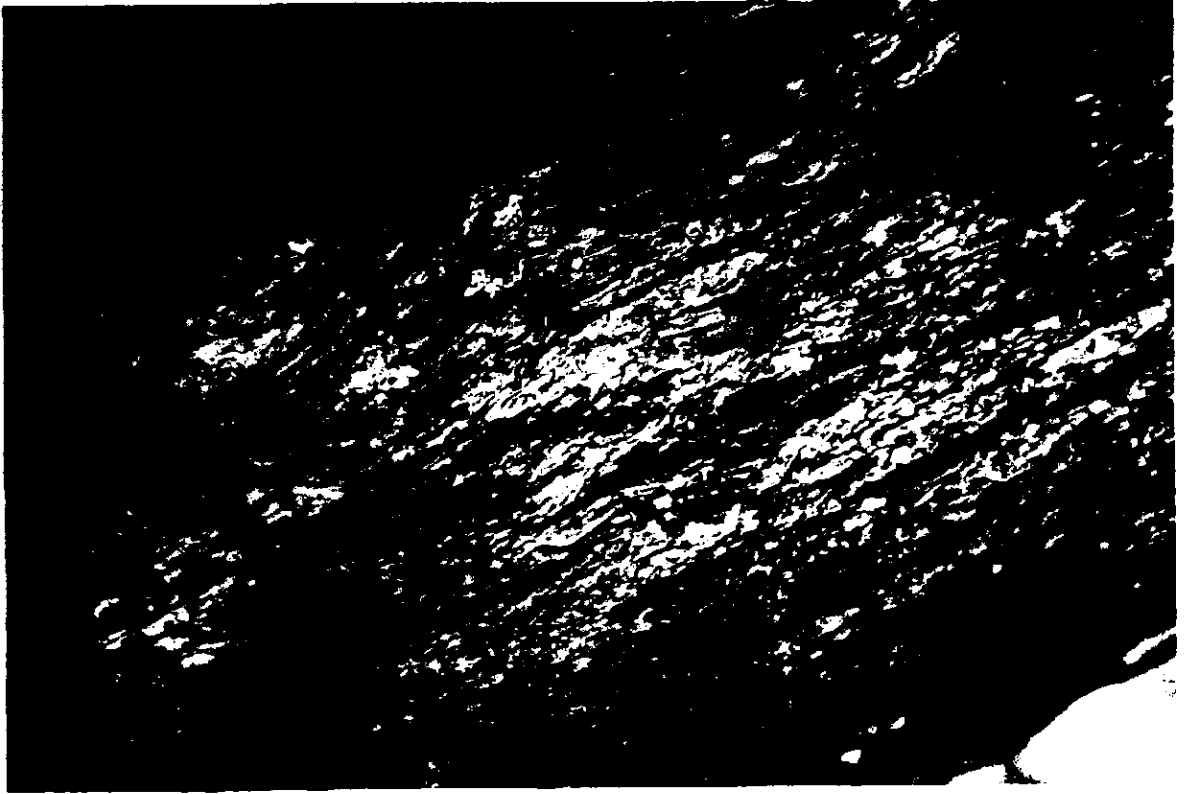


Figura 3. *Buddleja cordata* H.B.K.

Cuadro 1. Propiedades medicinales atribuidas a *Buddleja cordata* H.B.K.

USO POPULAR	PARTE DE LA PLANTA	VIA DE ADMINISTRACION
Enfermedades hepáticas	Hojas	Oral
Afecciones cutáneas	Hojas	Tópica
Dolores de cabeza	Hojas	Oral
Antileproso	Hojas	Tópica
Antiasmático	Hojas	Oral
Antitusivo	Hojas	Oral
Tratamiento de la bronquitis	Hojas	Oral
Eupéptico	Hojas	Oral
Antiséptico	Hojas	Oral
Analgésico	Hojas	Oral
Anti-inflamatorio	Hojas	Oral
Antidiarreico	Hojas, corteza y raíz	Oral
Antipirético	Hojas, corteza y raíz	Oral
Antitumoral	Hojas, corteza y raíz	Oral
Antipalúdico	Raíz	Oral
Hipnótico	Raíz	Oral
Contracciones uterinas	Toda la planta	Oral
Diurético	Toda la planta	Oral
Antiespasmódico	Toda la planta	Oral
Tratamiento de la cirrosis	Toda la planta	Oral
Tratamiento de disfunciones biliares	Toda la planta	Oral

Otras especies del género *Buddleja* se utilizan como agentes curativos en la medicina tradicional de México y otras regiones del mundo (Houghton, 1984). En el Cuadro 2 se indican algunos ejemplos de especies de este género que gozan de reputación folclórica como agentes medicinales. También se indica el lugar de origen de las especies.



**Cuadro 2.** Ejemplos de algunas especies del género *Buddleja* utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo.

ESPECIE	LUGAR DE ORIGEN	USO POPULAR
<i>B. asiatica</i> Lour.	Norte de la india. Sur de China. Sur de Malasia. Indonesia. Nueva Guinea.	Abortivo. Tratamiento de afecciones de la piel. Dolor de cabeza. Tratamiento de tumores. Tratamiento de la malaria.
<i>B. officinalis</i> Maxim.	China  Malasia	Tratamiento de la hipertensión. Diabetes. Nefritis. Cáncer. Afecciones cutáneas. Enfermedades del hígado. Tratamiento de la córnea, cataratas y fotofobia.
<i>B. curviflora</i> Hook. Et Arn.	China Japón	Tratamiento del catarro. Tratamiento de la malaria. Piscicida.
<i>B. davidii</i> Franchet. <i>B. variabilis</i> Hemsl.	China Japón	Tratamiento de úlceras de la piel. Tratamiento de la lepra.
<i>B. madagascarensis</i> Lam.	Madagascar Uruguay	Tratamiento de la disentería. Remedio para el asma, la tos y la bronquitis.
<i>B. americana</i> L.	México Sur de Colombia.  Guatemala.	Antiespasmódico Eupéptico Tratamiento de quemaduras Antiséptico. Tratamiento de la cirrosis. Diurético. Tratamiento del asma. Dolor de cabeza. Antirreumático. Enfermedades hepáticas. Anti-inflamatorio. Antiséptico.

**Cuadro 2.** Ejemplos de algunas especies del género *Buddleja* utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo (*continuación*).

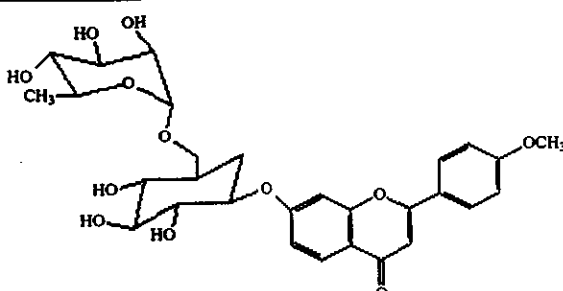
ESPECIE	LUGAR DE ORIGEN	USO POPULAR
<i>B. saligna</i> Wild.	Perú. Bolivia.	Remedio para la tos. Purgante.
<i>B. globosa</i> Lam.	Sur de Chile. Perú. Bolivia.	Tratamiento de quemaduras. Tratamiento de disenteria crónica. Tratamiento de hemorroides, hepatitis y catarro. Antiséptico urogenital.
<i>B. humboldtiana</i> .	Chile. Perú.	Tratamiento de: infecciones uterinas y reumatismo.
<i>B. quinquenaria</i> Cham. et Schltr.	Ecuador.	Sedante.
<i>B. brasiliensis</i> Jacqu.	Brasil	Analgésico. Antiarrítmico. Anticatarral.
<i>B. perfoliata</i> Kunth.	México. Guatemala.	Antisudorífico. Diurético.
<i>B. marrubifolia</i> Benth.	Bolivia. Chile. Perú.	Tratamiento del reumatismo. Diurético.
<i>B. incana</i> . Ruiz et Pavón.	Ecuador. Perú. Bolivia. Chile.	Tratamiento de quemaduras infectadas. Antirreumático. Tratamiento de: neuralgia, catarro, gonorrea e infecciones genitales.

En una investigación previa de las hojas de *Buddleja cordata* recolectada en Cuantichan, Puebla, México, se demostró las propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas del extracto acuoso. Los estudios químicos permitieron el aislamiento de la flavona glicosídica, linarina (1) (Martínez *et al.*, 1996; Arciniegas *et al.*, 1997).

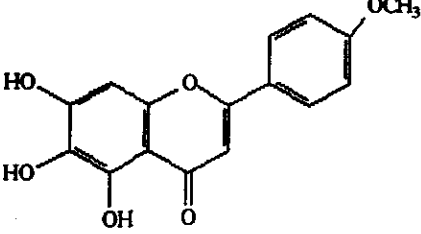
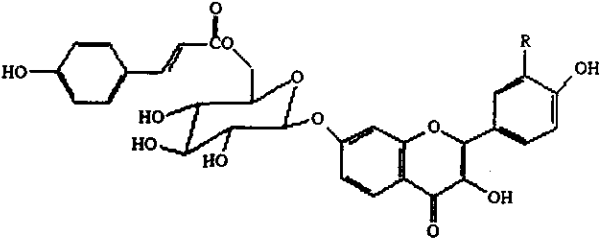
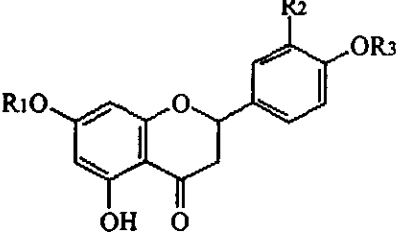
Por otra parte, los estudios químicos realizados a la fecha sobre especies relacionadas han permitido el aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios que se presentan en el Cuadro 3. Estos metabolitos incluyen:

- a) Flavonoides (Houghton, 1984 y 1985; Kubo *et al.*, 1992, Martínez *et al.*, 1996 y 1998, Arciniegas *et al.*, 1997, Sighal *et al.*, 1980).
- b) Sesquiterpenoides (Houghton, 1984; Romo de Vivar *et al.*, 1995, Yoshida *et al.*, 1976 y 1978).
- c) Diterpenoides (Houghton, 1996).
- d) Triterpenoides (Houghton, 1984 ; Ding *et al.*, 1992, Emam *et al.*, 1996, Yamamoto *et al.*, 1991)).
- e) Compuestos aromáticos simples (Houghton, 1984.).
- f) Iridoides (Houghton, 1984 ; Arciniegas *et al.*, 1997).
- g) Lignanos y Neolignanos.(Houghton,1985)).
- h) Esteroles (Emam *et al.*, 1996; Houghton, 1984; Romo de Vivar *et al.*, 1995).
- i) Feniletanoides y Fenilpropanoides (Houghton, 1985; Arciniegas *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1993)

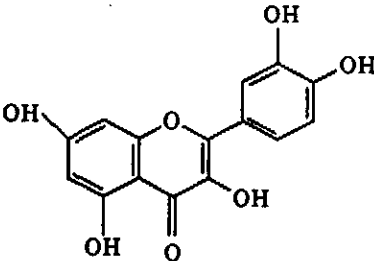
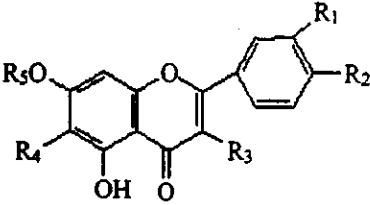
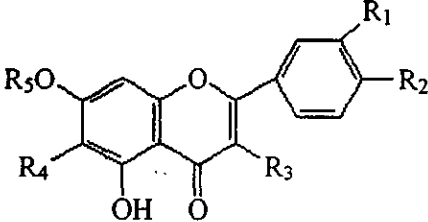
**Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja*.**

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FLAVONOIDES</b>		
<i>B. cordata</i> <i>B. officinalis.</i> <i>B. asiatica</i> <i>B. curviflora</i> <i>B. davidii</i> <i>B. americana</i> <i>B. perfoliata</i> <i>B. verticillata</i> <i>B. globosa</i>	 <p style="text-align: center;">linarina (1)</p>	Houghton, 1984. Martínez <i>et al.</i> , 1996 y 1998

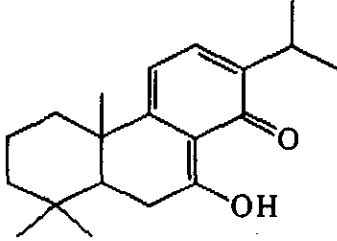
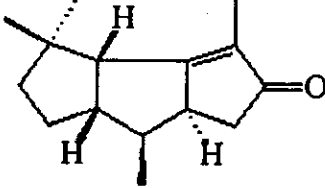
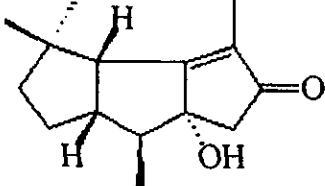
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA																
<i>B. davidii</i>	 <p style="text-align: center;">acetina (2)</p>	Houghton, 1984																
<i>B. coriacea</i>	 <p style="text-align: center;">budlenoide A (3) R=H budlenoide B (4) R=OMe</p>	Kubo <i>et al.</i> , 1992.																
<i>B. parviflora</i> <i>B. cordata</i>	 <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td>R<sub>1</sub></td> <td>R<sub>2</sub></td> <td>R<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>eriodictiol (5)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>glucohesperetina (6)</td> <td>gluc</td> <td>OH</td> <td>Me</td> </tr> <tr> <td>piracontosido (7)</td> <td>gluc</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </table>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	eriodictiol (5)	H	OH	H	glucohesperetina (6)	gluc	OH	Me	piracontosido (7)	gluc	OH	H	Arciniegas <i>et al.</i> , 1997.
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>															
eriodictiol (5)	H	OH	H															
glucohesperetina (6)	gluc	OH	Me															
piracontosido (7)	gluc	OH	H															

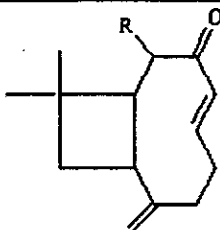
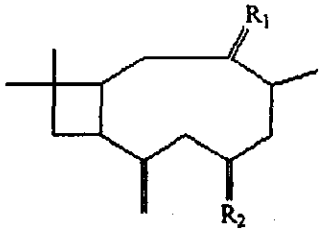
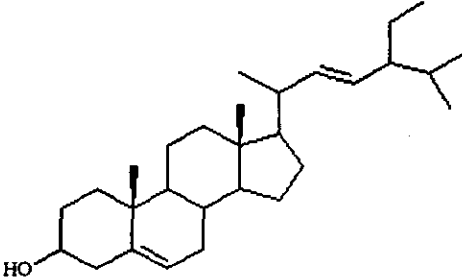
**Cuadro 3.** Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA																																				
<p><i>B. globosa</i> <i>B. asiatica</i></p>	 <p>quercetina (9)</p>	<p>Houghton, 1984</p>																																				
<p><i>B. globosa</i></p>	 <table border="0" data-bbox="333 1004 900 1231"> <thead> <tr> <th></th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> <th>R<sub>4</sub></th> <th>R<sub>5</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>luteolina (10)</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>6-hidroxiluteolina (11)</td> <td>OH</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>7-O-glucósido de la apigenina (12)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>gluc.</td> </tr> <tr> <td>7-O-rutinósido de la quercetina (13)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>O-rut.</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>escutelearina (14)</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>gluc.</td> </tr> </tbody> </table>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	luteolina (10)	OH	OH	H	H	H	6-hidroxiluteolina (11)	OH	OH	H	OH	H	7-O-glucósido de la apigenina (12)	H	OH	H	H	gluc.	7-O-rutinósido de la quercetina (13)	H	OH	O-rut.	H	H	escutelearina (14)	H	OH	H	OH	gluc.	<p>Houghton, 1984</p>
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>																																	
luteolina (10)	OH	OH	H	H	H																																	
6-hidroxiluteolina (11)	OH	OH	H	OH	H																																	
7-O-glucósido de la apigenina (12)	H	OH	H	H	gluc.																																	
7-O-rutinósido de la quercetina (13)	H	OH	O-rut.	H	H																																	
escutelearina (14)	H	OH	H	OH	gluc.																																	
<p><i>B. macrostachya</i></p>	 <table border="0" data-bbox="333 1487 900 1567"> <thead> <tr> <th></th> <th>R<sub>1</sub></th> <th>R<sub>2</sub></th> <th>R<sub>3</sub></th> <th>R<sub>4</sub></th> <th>R<sub>5</sub></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>pectolarigenina (15)</td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>salvigenina (16)</td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>H</td> <td>OCH<sub>3</sub></td> <td>CH<sub>3</sub></td> </tr> </tbody> </table>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	pectolarigenina (15)	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H	salvigenina (16)	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	<p>Houghton, 1984. Sighal <i>et al.</i>, 1980</p>																		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>																																	
pectolarigenina (15)	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H																																	
salvigenina (16)	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>																																	

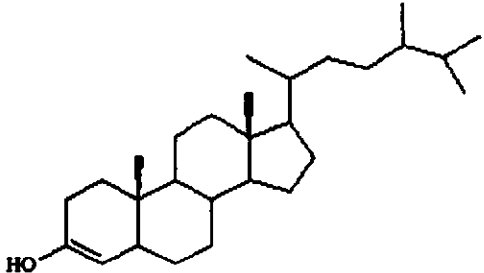
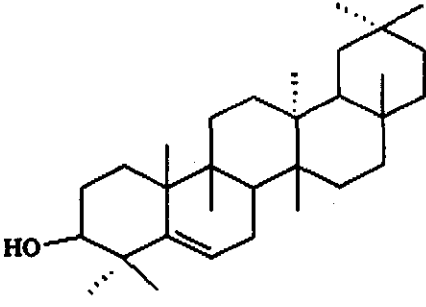
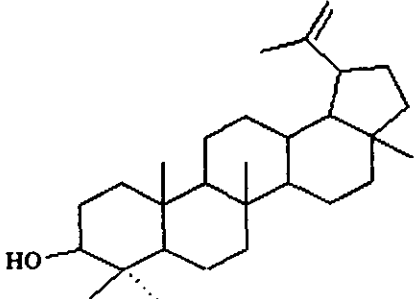
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>DITERPENOIDES</b>		
<p><i>B. albiflora</i> <i>B. globosa</i></p>	 <p style="text-align: center;">budlejona (17)</p>	<p>Houghton <i>et al.</i>, 1996</p>
<b>SESQUITERPENOIDES</b>		
<p><i>B. albiflora</i> <i>B. globosa</i></p>	 <p style="text-align: center;">isocapnel-9-en-8-ona (18)</p>	<p>Romo de Vivar <i>et al.</i>, 1995</p>
<p><i>B. cordata</i> <i>B. sessiliflora</i></p>	 <p style="text-align: center;">6-<math>\alpha</math>-hidroxi-isocapnel-9-en-8-ona (19)</p>	<p>Romo de Vivar <i>et al.</i>, 1995</p>

**Cuadro 3.** Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

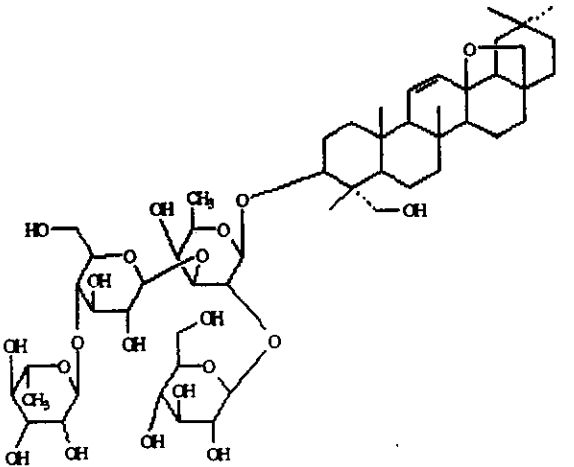
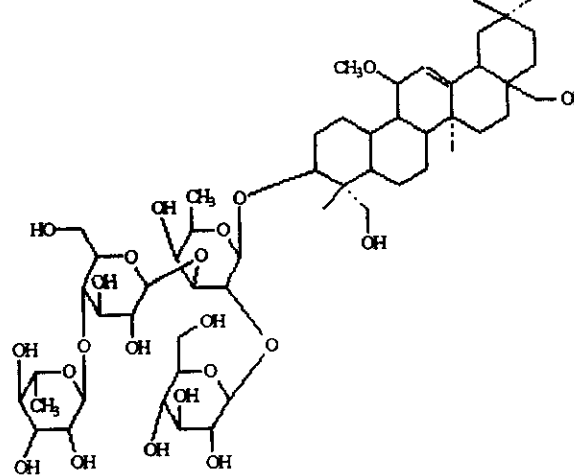
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>SESQUITERPENOIDES</b>		
<i>B. davidii</i> <i>B. curviflora</i>	 <p>           budledina A (20)      R            budledina B (21)      OH            budledina C (22)      OCH<sub>3</sub>               H         </p>	Yoshida <i>et al.</i> , 1976 y 1978.  Houghton, 1984
<i>B. davidii</i>	 <p>           budledina D (23)      R<sub>1</sub>      R<sub>2</sub>               O      H<sub>2</sub>            budledina E (24)      H<sub>2</sub>      O         </p>	Yoshida <i>et al.</i> , 1976 y 1978.  Houghton, 1984.
<b>ESTEROLES</b>		
<i>B. cordata</i> <i>B. asiatica</i> <i>B. madagascarensis</i>	 <p style="text-align: center;">estigmasterol (25)</p>	Houghton, 1984 Romo de Vivar <i>et al.</i> , 1995 Emam <i>et al.</i> , 1996

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

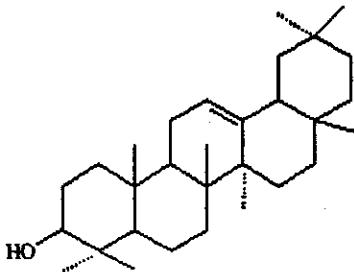
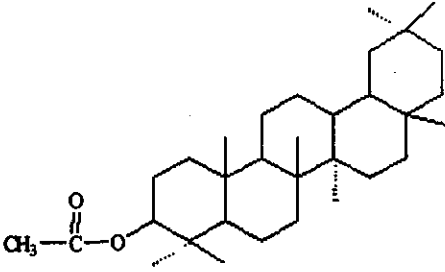
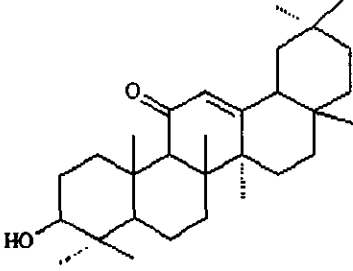
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>ESTEROLES</b>		
<i>B. cordata</i> <i>B. asiatica</i> <i>B. madagascarensis</i>	 <p style="text-align: center;">β-sitosterol (26)</p>	Houghton, 1984 Romo de Vivar <i>et al.</i> , 1995 Emam <i>et al.</i> , 1996
<b>TRITERPENOIDES</b>		
<i>B. globosa</i>	 <p style="text-align: center;">glutinol (27)</p>	Houghton, 1984
<i>B. globosa</i>	 <p style="text-align: center;">lupeol (28)</p>	Houghton, 1984



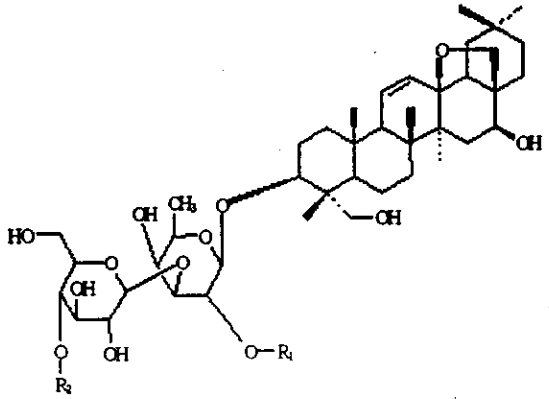
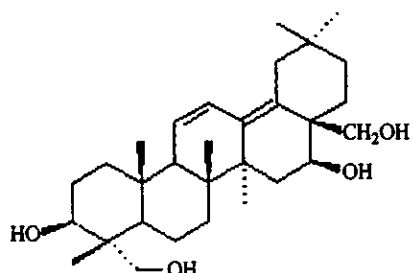
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>TRITERPENOIDES</b>		
<p><i>B. officinalis</i> <i>B. madagascarensis</i></p>	 <p style="text-align: center;">mimengosido A (29)</p>	<p>Ding <i>et al.</i>, 1992. Emam <i>et al.</i>, 1996</p>
<p><i>B. officinalis</i> <i>B. madagascarensis</i></p>	 <p style="text-align: center;">mimengosido B (30)</p>	<p>Ding <i>et al.</i>, 1992.</p>

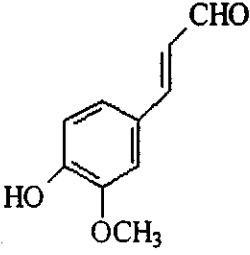
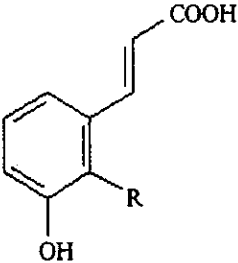
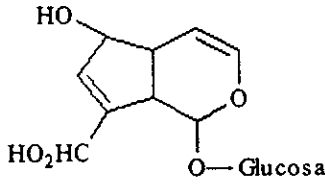
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>B. madagascarensis</i>	 <p style="text-align: center;">β-amirina (31)</p>	Houghton, 1984
<i>B. globosa</i> <i>B. madagascarensis</i> .	 <p style="text-align: center;">acetato de la β-amirina (32)</p>	Houghton, 1984
<i>B. madagascarensis</i>	 <p style="text-align: center;">11-ceto-β- amirina (33)</p>	Houghton, 1984

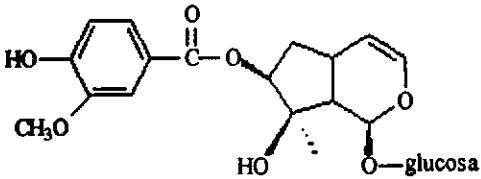
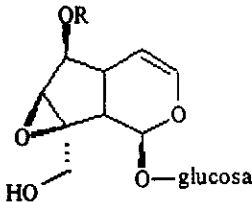
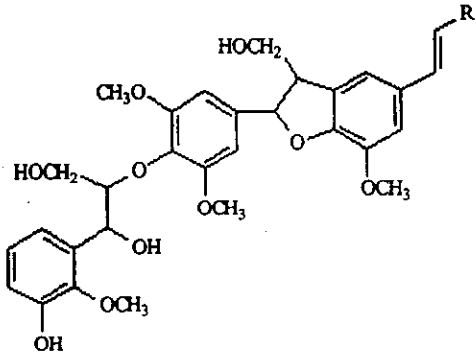
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>B. japonica</i> .	 <p style="text-align: center;"> <math>R_1</math>      <math>R_2</math>            budlejasaponina 1 (34)    Glc    Ram            budlejasaponina 2 (35)    Glc    Xil            budlejasaponina 3 (36)    H      Xil            budlejasaponina 4 (37)    Glc    H            saicosaponina a (38)      H      H         </p>	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991.
<i>B. japonica</i> .	 <p style="text-align: center;">saicogenina A (39)</p>	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991.

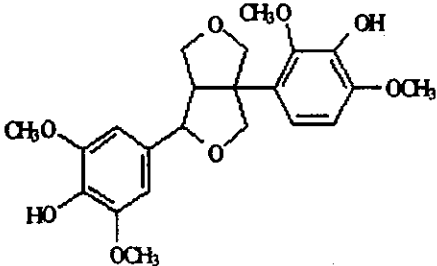
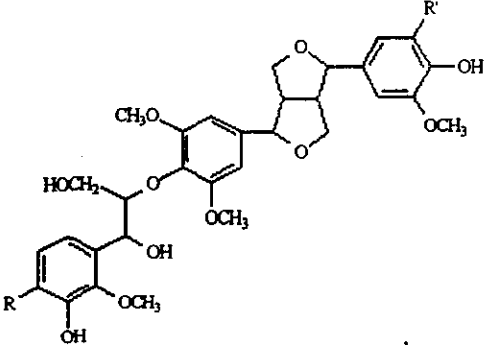
Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<b>FENILPROPANOIDES</b>		
<i>B. davidii</i>	 <p>aldehído coniferílico (40)</p>	Houghton, 1985
<i>B. davidii</i>	 <p>ácido cafeico R= OH (41) ácido ferúlico R=OCH<sub>3</sub> (42)</p>	Houghton, 1985.
<b>IRIDOIDES</b>		
<i>B. cordata</i> <i>B. sessiliflora</i> <i>B. asiatica</i> <i>B. parviflora</i> <i>B. davidii</i> <i>B. globosa</i> <i>B. alternifolia</i> <i>B. auriculata</i> <i>B. brasiliensis</i> <i>B. curviflora</i>	 <p>aucubina (43)</p>	Houghton, 1984

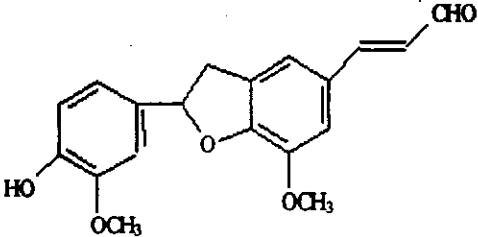
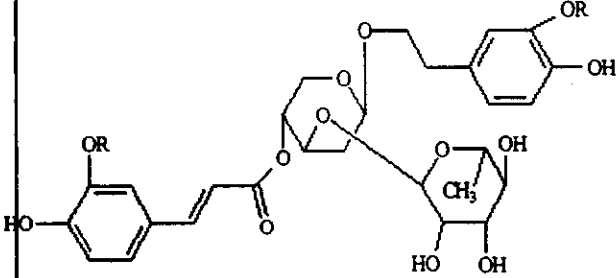
**Cuadro 3.** Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<p><i>B. parviflora</i> <i>B. cordata</i></p>	 <p>vanilil ajugol (44)</p>	<p>Arciniegas., <i>et al.</i>, 1997.</p>
<p><i>B. cordata</i> <i>B. davidii</i> <i>B. globosa</i></p>	 <p>catalpol (45)      R = H metil catalpol (46)      R = CH<sub>3</sub></p>	<p>Arciniegas <i>et al.</i>, 1997.</p>
<b>NEOLIGNANOS Y LIGNANOS</b>		
<p><i>B. davidii</i></p>	 <p>budlenol A (47)      R = CHO budlenol B (48)      R = CH<sub>2</sub>OH</p>	<p>Houghton, 1985</p>

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA															
<i>B. davidii</i>	 <p style="text-align: center;">siringarresinol (49)</p>	Houghton, 1985															
<i>B. davidii</i>	 <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;">R<sup>1</sup></td> </tr> <tr> <td>budlenol C (50)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>budlenol D (51)</td> <td style="text-align: center;">OCH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">OCH<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>budlenol E (52)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>budlenol F (53)</td> <td style="text-align: center;">OCH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> </table>		R	R <sup>1</sup>	budlenol C (50)	H	OCH <sub>3</sub>	budlenol D (51)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	budlenol E (52)	H	H	budlenol F (53)	OCH <sub>3</sub>	H	Houghton, 1985
	R	R <sup>1</sup>															
budlenol C (50)	H	OCH <sub>3</sub>															
budlenol D (51)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>															
budlenol E (52)	H	H															
budlenol F (53)	OCH <sub>3</sub>	H															

**Cuadro 3.** Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>B. davidii.</i>	 <p style="text-align: center;">balanofonina (54)</p>	Houghton, 1985
<b>FENILETANOIDES</b>		
<i>B. davidii.</i> <i>B. parviflora</i>	 <p style="text-align: center;">verbascósido (55)    R = H cistanósido (56)    R = CH<sub>3</sub></p>	Houghton, 1985 Arciniegas, <i>et al.</i> , 1995.

Cuadro 3. Metabolitos secundarios aislados de *Buddleja cordata* y otras especies del género *Buddleja* (continuación).

ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA																																												
<b>FENILETENÓIDES</b>																																														
<i>B. davidii</i>		Yamamoto, <i>et al.</i> , 1993.																																												
	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 40%;"></td> <td style="text-align: center;">R<sub>1</sub></td> <td style="text-align: center;">R<sub>2</sub></td> <td style="text-align: center;">R<sub>3</sub></td> </tr> <tr> <td>plantainósido A (57)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">A</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>plantainósido B (58)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">C</td> </tr> <tr> <td>acteósido (59)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">B</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>epiacteósido (60)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">B</td> </tr> <tr> <td>leucosceptósido A (61)</td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">C</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>martinósido (62)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">C</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>isomartinósido (63)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">H</td> <td style="text-align: center;">C</td> </tr> <tr> <td>jionósido D (64)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">B</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>angorósido C (65)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">C</td> <td style="text-align: center;">arabinosa</td> </tr> <tr> <td>leucosceptósido B (66)</td> <td style="text-align: center;">CH<sub>3</sub></td> <td style="text-align: center;">C</td> <td style="text-align: center;">opiosa</td> </tr> </table>			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	plantainósido A (57)	CH <sub>3</sub>	A	H	plantainósido B (58)	H	H	C	acteósido (59)	H	B	H	epiacteósido (60)	H	H	B	leucosceptósido A (61)	H	C	H	martinósido (62)	CH <sub>3</sub>	C	H	isomartinósido (63)	CH <sub>3</sub>	H	C	jionósido D (64)	CH <sub>3</sub>	B	H	angorósido C (65)	CH <sub>3</sub>	C	arabinosa	leucosceptósido B (66)	CH <sub>3</sub>	C	opiosa
			R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>																																									
	plantainósido A (57)		CH <sub>3</sub>	A	H																																									
	plantainósido B (58)		H	H	C																																									
	acteósido (59)		H	B	H																																									
	epiacteósido (60)		H	H	B																																									
	leucosceptósido A (61)		H	C	H																																									
	martinósido (62)		CH <sub>3</sub>	C	H																																									
	isomartinósido (63)		CH <sub>3</sub>	H	C																																									
jionósido D (64)	CH <sub>3</sub>	B	H																																											
angorósido C (65)	CH <sub>3</sub>	C	arabinosa																																											
leucosceptósido B (66)	CH <sub>3</sub>	C	opiosa																																											



### III. PARTE EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Material Vegetal.

La corteza exterior de la *Buddleja cordata* se recolectó al sur del Valle de México, D.F., el 10 de octubre de 1995. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, (Voucher G. Morales 251), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. La identificación de la especie la realizó el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, U.N.A.M.).

De la corteza de *Buddleja cordata*, se aislaron tres líquenes. El aislamiento se efectuó el 18 de marzo de 1998, al sur del Valle de México en el Distrito Federal. Un ejemplar de referencia de cada uno de los líquenes se depositó en el Hebario Nacional MEXU, (Voucher: Bye 22553, *Líquén I*; Bye 22554, *Líquén II* y Bye 22555, *Líquén III*), Instituto de Biología, U.N.A.M. La identificación de éstos líquenes se encuentra en proceso.

Tanto la corteza vegetal como los líquenes se desecaron a temperatura ambiente bajo sombra y se molieron con un molino Willey Modelo 4.

#### 3.2 Procedimientos Generales.

##### 3.2.1 Análisis Cromatográficos.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron de acuerdo con las técnicas convencionales en placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (silica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck) utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los sistemas de elución y los reactivos reveladores empleados se resumen en los Cuadro 4 y 5,

respectivamente. Para los análisis cualitativos en placa fina se emplearon placas con un espesor de 0.25 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM.

Cuadro 4. Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION
A	HEXANO	100%
B	HEXANO:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DIVERSAS
C	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100%
D	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :METANOL	DIVERSAS
E	METANOL	100%

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina\*.

REACTIVO	COMPOSICION	REFERENCIA
1) SULFATO CERICO*	12.0 g de sulfato cérico. 22.2 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. 350.0 g de hielo picado	Stahl, 1969 Lowrey <i>et al.</i> , 1993
2) AlCl <sub>3</sub> 5% aq	5.0 g de AlCl <sub>3</sub> 100.0 ml de H <sub>2</sub> O destilada	Wannan, 1985.

\*En el caso del cromógeno 1, antes de revelar, se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta, 254 nm, onda larga, 365 nm). Para el desarrollo del color fue necesario calentar aproximadamente 2 min. A 110°C.

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectrofotómetro de masas modelo Jeol JMS-AX505HA, mediante la inyección de 0.2 µl de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP. Se utilizó helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm<sup>2</sup> y con flujo de 2 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 260°C, la temperatura de la columna inicial fue de 150°C y se programó para alcanzar una temperatura de 260°C con un calentamiento gradual de 10°C/min.

Para los registros de los espectros de masas por la técnica de impacto electrónico se utilizó un voltaje de 70 eV. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 33 a 630 unidades de masa/carga ( $m/z$ ) por segundo.

### 3.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa software millenium 2000 (Waters). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna de gel de sílice (Waters,  $\mu$ porasil, 125Å, tamaño partícula 10 $\mu$ M) de 19 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. La detección se ajustó entre 278 y 302 nm.

### 3.2.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B; o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o película.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890, serie II, mediante introducción directa a 70 eV y los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB) se registraron en un aparato Jeol DX300 con un sistema JMA-3500 utilizando una matriz de glicerol.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- $^1$ H) y de Carbono 13 (RMN- $^{13}$ C) se generaron en un aparato Varian VXR-300S, el cual se operó a una

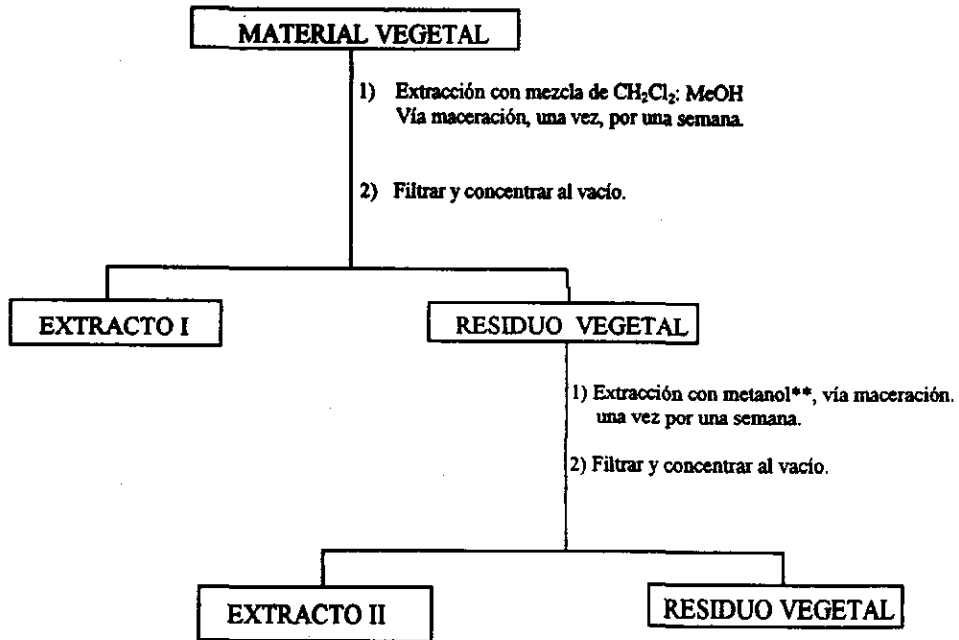
frecuencia de 300 ó 500 MHz, respectivamente. Los espectros se registraron en  $\text{CDCl}_3$  y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades  $\delta$  (ppm), referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulsos estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) y heteronuclear (HETCOR).

Los análisis arriba indicados se efectuaron en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### 3.3 Estudio químico de *Buddleja cordata* H.B.K.

#### 3.3.1 Preparación del extracto orgánico.

El material vegetal seco y molido (4.6 Kg), se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : $\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1). Posteriormente, el material vegetal se sometió a una segunda maceración con metanol. En el Esquema 1 se resume el procedimiento que se utilizó. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos de capa delgada.



- \*Volumen total de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 12 \text{ l}$ .
- \*\*Volumen total de metanol = 8 l.
- Peso combinado de los extractos I y II = 82.9 g.

Esquema 1. Proceso de extracción de la corteza de *Buddleja cordata*.

### 3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de *Buddleja cordata*.

El extracto total (82.9 g) se fraccionó en una columna cromatográfica abierta utilizando como adsorbente 984 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, diferentes proporciones de hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (en diferentes proporciones) y CH<sub>3</sub>OH. Se recolectaron 90 fracciones de 700 ml cada una. Cada fracción se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que resultaron cromatográficamente similares. Este proceso generó un total de 14 fracciones primarias. En el Cuadro 6, se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto total de la corteza de *Buddleja cordata*.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento preliminar via cromatografía en columna abierta del extracto crudo de la corteza de *Buddleja cordata*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVES	PESO (g)
HEXANO:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	1-6	1-5	F001	0.5299
	80:20	7-14	6	F002	0.4395
	70:30	15-24	7-11	F003	0.5886
	60:40	25-32	12-17	F004	0.3127
	50:50	33-41	18-24	F005	0.4302
	40:60	42-46	25-28	F006	0.1830
	20:80	47-55	29-41	F007	1.3206
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	56-61	42-45	F008	0.4967
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH	80:20	62-73	46-49	F009*	2.7548
	60:40	74-80	50-60	F010*	2.3317
	40:60	81-86	61-63	F011	0.3236
	20:80	87-89	64	F012	14.9757
CH <sub>3</sub> OH	100	90	65-72	F013	18.3435
			73-93	F014	22.5037

\*Fracciones activas

### 3.3.3 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias activas derivadas del extracto íntegro de *B. cordata*.

#### 3.3.3.1 Aislamiento de $\beta$ -sitosterol (26) y del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67) de la fracción F009.

La fracción F009 (2.75 g, Cuadro 6) se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna cromatográfica abierta, utilizando 50 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diversas proporciones), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (diversas proporciones) y MeOH. Se recolectaron un total de 309 fracciones, de 25 ml cada una y se analizaron por cromatografía en capa fina, combinándose todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó un total de 11 fracciones secundarias. En el Cuadro 7 se resume este fraccionamiento secundario.

Cuadro 7 Resumen del fraccionamiento secundario via cromatografía en columna abierta de la fracción F009 de *Buddleja cordata*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	FRACCION/CLAVES	PESO (g)
HEXANO:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	1-74	1-15	F009-I	0.0124
	45:55	75-125	16-27	F009-II	0.0245
	40:60	126-139	28-88	F009-III	0.9190
	30:70	140-193	89-116	F009-IV	0.2140
	20:80	194-210	117-138	F009-V	0.1453
	10:90	211-225	139-147	F009-VI	0.0849
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	226-238	148-175	F009-VII	0.0743
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH	99:1	239-257	176-252	F009-VIII	0.0719
	97:3	258-273	253-254	F009-IX	0.1694
	95:5	274-282	255-263	F009-X	0.0568
	90:10	283-291	264-309	F009-XI	0.0943
	70:30	292-299	-	-	-
	50:50	300-304	-	-	-
CH <sub>3</sub> OH	100	305-309	-	-	-

De la fracción combinada III (Cuadro 7), cristalizaron de manera espontánea 137.7 mg de un producto de color blanco, con un punto de fusión de 137-140°C caracterizado como el éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).

De manera adicional se obtuvieron 12.3 mg de  $\beta$ -sitosterol (26), idéntico en todos sus aspectos a una muestra auténtica.

**3.3.3.2 Aislamiento de la mezcla constituida por palmitato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (68), heptadecanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (69), estearato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (70), nonadecanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (71), eicosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (72), docosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (73), tricosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (74), tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (75), pentacosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (76) y hexacosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil]etilo (77) de la fracción primaria F010 de *B. cordata*.**

La fracción F010 (2.5 g, Cuadro 6) se sometió a un fraccionamiento secundario en una columna cromatográfica abierta, utilizando 50.4 g de sílice como adsorbente. El proceso de elución se realizó mediante la utilización de hexano, mezclas de hexano:diclorometano (diversas proporciones), diclorometano, diclorometano:metanol (diversas proporciones) y metanol. Se recolectaron 196 fracciones de 25 ml cada una. Se analizaron por cromatografía en capa fina y se combinaron todas aquellas que presentaron similitud cromatográfica. El proceso generó un total de seis fracciones secundarias. En el Cuadro 8 se resume este fraccionamiento secundario.



**Cuadro 8.** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F010 de *B. cordata*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	FRACCIONES/CLAVES	PESO (g)
HEXANO	100	1-4			
HEXANO:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	5-52	1-62	F010-I	0.0304
	40:60	53-120	63-70	F010-II	0.3721
	30:70	121-153	71-75	F010-III	0.0849
	10:90	154-163	76-78	F010-IV	0.2548
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	164-172	79-99	F010-V	0.6012
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH	90:10	173-184	100-196	F010-VI	0.5988
	70:30	185-188			
	50:50	189-193			
CH <sub>3</sub> OH	100	194-196			

De la fracción F010-II (**Cuadro 8**) precipitaron de manera espontánea 128.5 mg de un producto de color blanco, con un punto de fusión de 72-74°C. Este polvo representa una mezcla de 10 ésteres derivados del 2-[4-hidroxi-fenil]etanol (mezcla F017). Posteriormente, de las aguas madres cristalizaron 37.2 mg del producto 67.

### 3.3.3.3 Separación del tetracosanoato de 2-[4-hidroxi-fenil] etilo (75) a partir de la mezcla F017.

La separación del tetracosanoato de 2-[4-hidroxi-fenil] etilo mediante CLAR a partir de la mezcla F017, se realizó en una columna de fase normal empacada con gel de sílice utilizando un flujo de 0.35 ml/min y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por hexano:iPr:MeOH, en las proporciones 90:5:5. De 23 mg de la mezcla F017 que se sometió al análisis fue posible separar 3 mg del producto puro.

### 3.3.3.4 Metilación de la mezcla F017.

La mezcla F017 se sometió a un proceso de metilación con el fin de determinar el número exacto de componentes de la mezcla. Para ello, a 3 mg de la mezcla (en 3 ml de metanol) se le adicionaron 20 ml de una solución etérea de diazometano y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 h. La solución de diazometano se preparó a partir de una solución de KOH, (5.0 g de KOH en 7.5 ml de agua destilada) 25 ml de metanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald-Aldrich) en 45 ml de éter etílico.

Como resultado de esta reacción se obtuvieron 3.8 mg de un residuo de color blanco (Mezcla F019, mezcla de fenil etanoides metilados) la cual fue analizada posteriormente mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), siguiendo las especificaciones citadas en el inciso 3.2.1 de la parte experimental.

### 3.3.3.5 Saponificación de las mezclas F017, F019 y del producto puro 75.

A 5 mg de la mezcla F017 se le agregaron 0.5 ml de una solución de KOH 0.2 M en etanol. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas. Al cabo de este tiempo se acidificó con HCl 1 N hasta obtener un pH de 3. La solución ácida resultante se sometió dos veces a un proceso de partición con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml por vez). La fase orgánica resultante de esta partición se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  al 1% y agua destilada. Por último, la fase orgánica se desecó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró al vacío para generar 3 mg de un residuo de color blanco constituido por una mezcla de ácidos grasos (Mezcla F018-A, mezcla de ácidos proveniente de la saponificación de la Mezcla F017).

La mezcla metilada F019 (2 mg) y el producto puro 75 (1 mg) se saponificaron siguiendo el mismo procedimiento. Como resultado de esta reacción se obtuvo ácido lignocérico en el caso del producto puro 75 y una mezcla de ácidos grasos (3 mg, **Mezcla F018-B**) en el caso de la mezcla metilada F019.

### **3.3.3.6 Metilación de las mezclas de ácidos grasos F018-A, F018-B y del ácido lignocérico (75 a).**

El ácido lignocérico y las mezclas **F018 A y B** y puro se sometieron a un proceso de metilación, con el fin de identificar los ácidos grasos presentes bajo la forma de sus ésteres metílicos. Para ello a 3 mg de las mezclas se adicionaron 20 ml de una solución etérea de diazometano preparada de igual forma que en el inciso 3.3.3.4. Las mezclas se dejaron reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. Como resultado de esta reacción se obtuvieron 3.7 mg de cada una de las mezclas de ácidos grasos metilados (**Mezclas F020 A y B**) las cuales se analizaron por CG-EM.

En cuanto al ácido lignocérico se procesó de igual manera que las mezclas, éste proceso dió origen a 1.5 mg del éster metílico del ácido lignocérico (**75 a**).

### **3.4 Estudio fitoquímico de las muestras de *Líquén sp.***

#### **3.4.1 Preparación de los extractos orgánicos.**

##### **3.4.1 a. *Líquén sp I.***

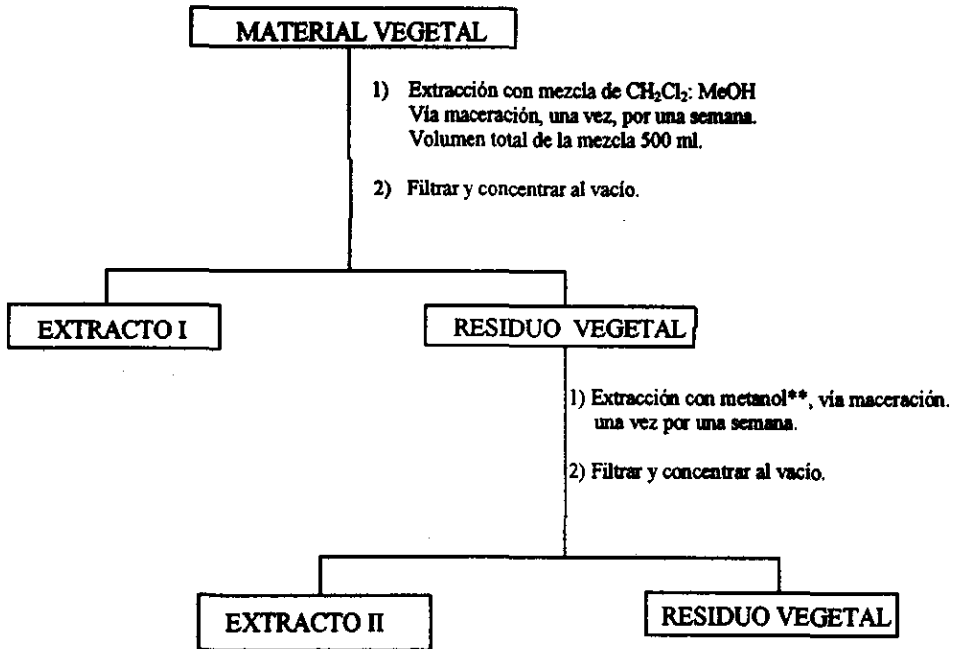
El material vegetal seco y molido (45 g) se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración con una mezcla binaria de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$  (proporción 1:1). Posteriormente, el material se sometió a una segunda maceración con  $\text{CH}_3\text{OH}$ . El Esquema 2 resume el procedimiento empleado. Los dos extractos resultantes se combinaron ya que presentan similitud cromatográfica.

##### **3.4.1 b. *Líquén sp II.***

El material vegetal seco y molido (40 g) se extrajo de la misma manera que el *Líquén sp I*. En el Esquema 3 se resume el procedimiento que fue utilizado.

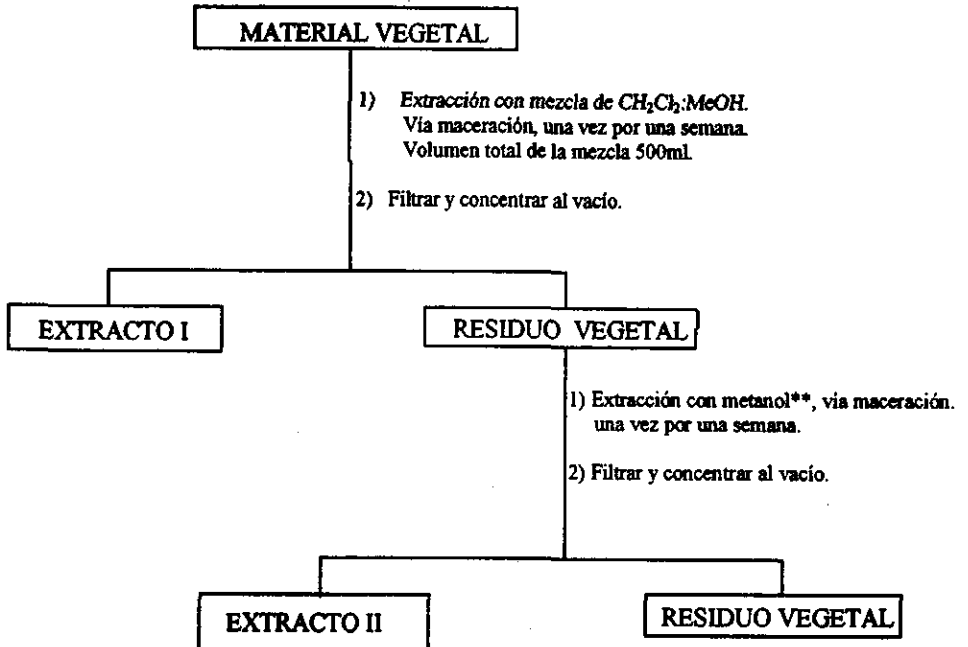
##### **3.4.1 c. *Líquén sp III.***

El material seco y molido (130 g) se extrajo utilizando el mismo procedimiento citado en los incisos anteriores (ver Esquema 4)



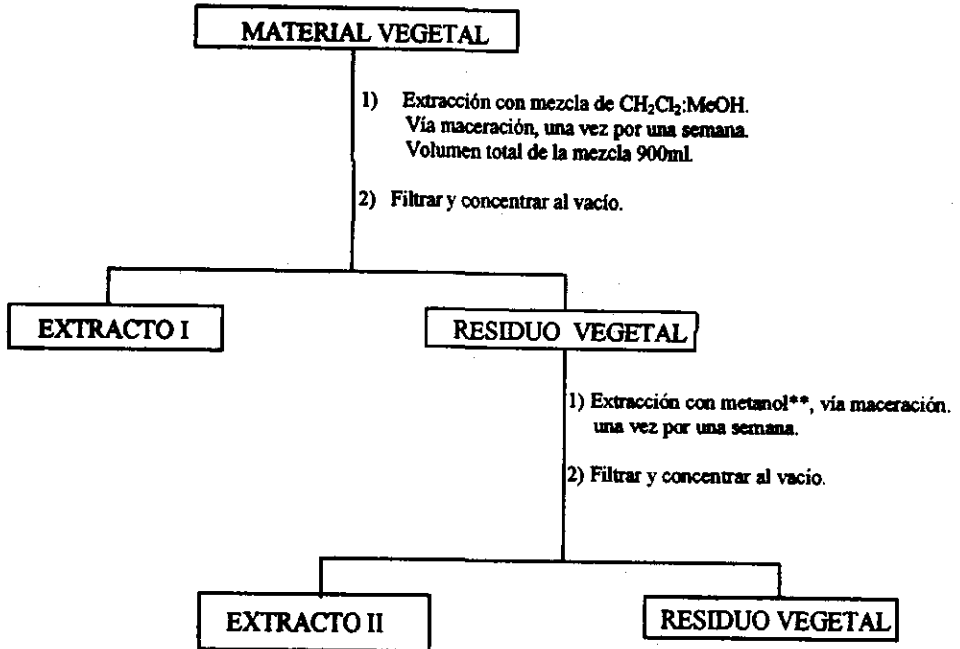
Peso combinado de los Extracto I y II = 16.5 g.

Esquema 2. Proceso de extracción del *Líquen sp I*



Peso combinado de los extractos I y II = 17.4 g.

**Esquema 3.** Proceso de extracción del *Líquen sp II*.



Peso combinado de los extractos I y II = 18.8 g.

Esquema 4. Proceso de extracción del *Liquen sp III*.

### 3.4.2 Aislamiento del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67) a partir del extracto íntegro del *Líquén sp III*.

El extracto íntegro se fraccionó en una columna cromatográfica abierta, utilizando 355 g de sílica gel como adsorbente. El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (en diversas proporciones), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (diversas proporciones). Se recolectaron 125 fracciones de 100 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, mezclándose todas aquellas fracciones que presentaron homogeneidad cromatográfica. Este proceso generó un total de 10 fracciones primarias. En el Cuadro 9 se resume el fraccionamiento mediante cromatografía en columna del extracto total del *Líquén sp III*.

Cuadro 9. Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna abierta del *Líquén sp III*.

ELUYENTE	PROPORCION %	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	FRACCIONES/CLAVE	PESO (g)
HEXANO	100	1-16	-	-	
HEXANO:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	17-24	1-28	L-1	0.0581
	70:30	25-34	29-35	L-2	0.0480
	50:50	35-44	36-46	L-3	0.0218
	30:70	45-61	47-65	L-4	0.1515
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	62-79	66-79	L-5	0.1140
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH	90:10	80-99	80-81	L-6	0.0255
	85:15	100-130	82-89	L-7	1.7232
	80:20	131-137	90-108	L-8	0.9144
	70:30	138-141	109-131	L-9	1.5991
	50:50	142-145	132-145	L-10	1.8392

De la fracción L-5 cristalizaron de manera espontánea 153.2 mg de un producto cristalino, de punto de fusión de 127-130°C, idéntico en todos sus aspectos al producto 67 obtenido de *Buddleja cordata*.



## IV RESULTADOS Y DISCUSION.

### 4.1 Estudio fitoquímico de *Buddleja cordata*.

La preselección de la especie *Buddleja cordata* se realizó con base en el criterio etnomédico, el cual constituye uno de los criterios más importantes para seleccionar materias primas destinadas al descubrimiento de sustancias biológicamente activas (Hamburger and Hostettmann, 1991). Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares, realizados por los laboratorios subcontratados por el proyecto Bioactive Agents from Dryland Plants of Latin American, se estableció que esta especie constituye una fuente de productos bioactivos de interés terapéutico. Como se indicó previamente, los acuerdos de confidencialidad establecidos con la Universidad de Arizona no permiten indicar las actividades biológicas encontradas en el presente trabajo.

Con base a los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico biodirigido de *Buddleja cordata* con la finalidad de aislar los principios activos. Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad terapéutica a nivel de extracto inicial.

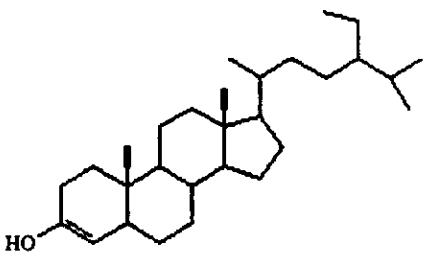
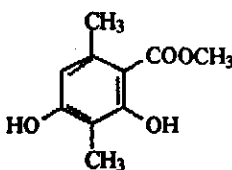
La preparación del extracto en gran escala se realizó mediante un proceso de maceración como se indicó en la sección experimental (inciso 3.3.1). Posteriormente, el extracto se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 14 fracciones primarias (Cuadro 6).

Las fracciones primarias activas (F009 y F010) se sometieron a un fraccionamiento secundario por métodos cromatográficos, para aislar él o los compuestos activos responsables de la actividad biológica (sección experimental 3.4.3). Este proceso permitió el aislamiento de un compuesto del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> [el éster metílico del ácido-4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico] (67), un esteroil [β-sitosterol] (26) y una mezcla de diez metabolitos

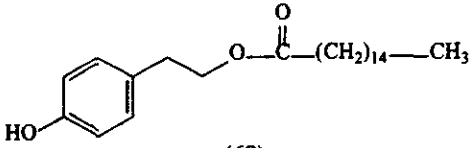
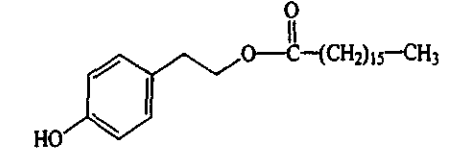
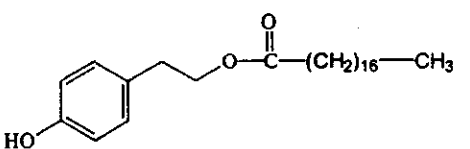
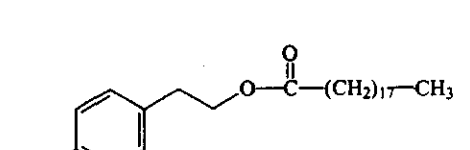
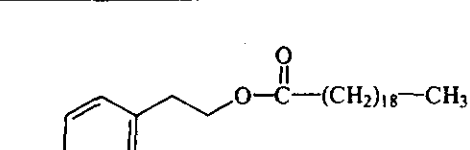
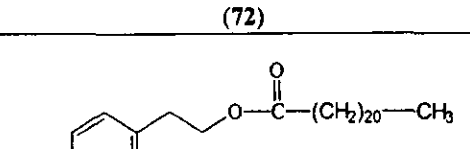
de naturaleza fenil etanoide: palmitato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (68), heptadecanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (69), estearato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (70), nonadecanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (71), eicosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (72), docosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (73), tricosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (74), tetracosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (75), pentacosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (76) y el hexacosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (77).

La aplicación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), permitió el aislamiento en forma pura del fenil etanoide mayoritario de la mezcla (figura 8); es decir, del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi fenil]etilo (75). En el Cuadro 10 se indican las estructuras de los compuestos identificados y su proporción.

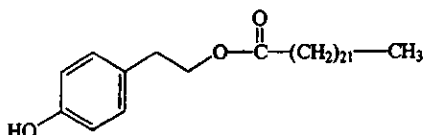
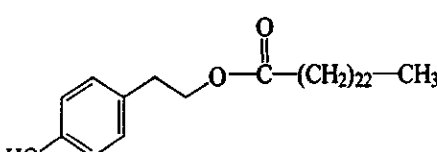
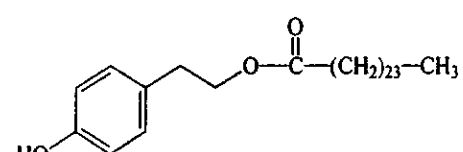
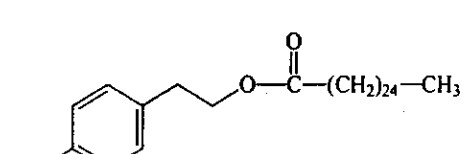
Cuadro 10. Metabolitos aislados de la especie *Buddleja cordata*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO
 <p style="text-align: center;">26</p>	$9 \times 10^{-9}\%$
 <p style="text-align: center;">67</p>	$9.7 \times 10^{-8}\%$

Cuadro 10. Metabolitos aislados de la especie *Buddleja cordata* (continuación).

COMPUESTO	PROPORCIÓN
 <p>(68)</p>	$1.5 \times 10^{-4} \%$
 <p>(69)</p>	$3.0 \times 10^{-4} \%$
 <p>(70)</p>	$4.9 \times 10^{-4} \%$
 <p>(71)</p>	$8.4 \times 10^{-5} \%$
 <p>(72)</p>	$7.5 \times 10^{-5} \%$
 <p>(73)</p>	$3.3 \times 10^{-4} \%$

Cuadro 10. Metabolitos aislados de la especie *Buddleja cordata* (continuación).

COMPUESTO	PROPORCIÓN
 <p>(74)</p>	$1.4 \times 10^{-4}\%$
 <p>(75)</p>	$1.4 \times 10^{-3}\%$
 <p>(76)</p>	$1.4 \times 10^{-4}\%$
 <p>(77)</p>	$3.7 \times 10^{-5}\%$

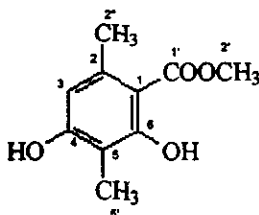
En general, los compuestos puros aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectrométricas (EM) y espectroscópicas (IR, UV, RMN) convencionales. Para la identificación de los constituyentes de la mezcla F017, además, fue necesario hidrolizarla con KOH en etanol para obtener los ácidos grasos correspondientes, los cuales

se identificaron bajo la forma de sus ésteres metílicos mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

#### 4.1.1 Caracterización del éster metílico del ácido [4,6-dihidroxi-2,5-dimetil] benzoico (67).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (67) se resumen en las Tablas 1-3.

Tabla 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del éster metílico del ácido [4,6-dihidroxi-2,5-dimetil] benzoico (67).



Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular	196
Punto de fusión	137-140°C
IR $\nu_{\text{max}}$ . <sup>KBr</sup> cm <sup>-1</sup> (Espectro 1)	3405, 3082, 2960, 2920, 2849, 1627, 1501, 1446, 1423, 1314, 1274, 1198, 1162, 1111, 1033.
EMIE $m/z$ (int. rel.) (Espectro 2)	196 [M+(49)], 164 (100), 163 (8), 136 (90), 135 (11), 107 (11), 83 (5), 79 (9), 53 (5), 39 (5)

Tabla 2. Datos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

PROTON	$\delta_H$	MULTIPLICIDAD
H-6'	12.01	s
H-3	6.21	s
H-4'	5.05	s
H-2'	3.92	sa
H-2''	2.46	s
H-5'	2.01	s

Tabla 3. Datos de RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

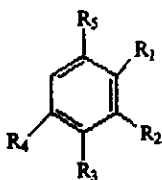
CARBONO	δ <sub>c</sub>
C-1	140.14
C-2	105.29
C-3	110.52
C-4	163.14
C-5	108.49
C-6	157.98
C-1''	172.59
C-2''	51.78
C-2'	24.04
C-5'	7.61

El espectro en el IR (Espectro 1) presenta absorciones asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3405 cm<sup>-1</sup>), aromaticidad (3082, 1615, 1501 cm<sup>-1</sup>), carbonilo de éster (1627, 1446, 1423 cm<sup>-1</sup>) e hidroxilo fenólico (1198 cm<sup>-1</sup>). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ión molecular en una relación de *m/z* de 196 uma (Espectro 2), correspondiente a la fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>. Esta fórmula permite 5 grados de insaturación.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 3-5), permiten establecer que el compuesto es un derivado del ácido 6-metil benzoico (Bruun, 1971).

Las características más importantes del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Espectro 3) se resumen a continuación:

- En la zona donde absorben los hidrógenos aromáticos se observa un singulete en δ<sub>H</sub> 6.20 (H-3) consistente con un compuesto aromático simple en el que el anillo benzoico se encuentra pentasustituido, como se indica en la estructura parcial A.



Estructura A.

- b) En  $\delta_H$  12.01 se aprecia un singlete que puede atribuirse al hidrógeno de un hidroxilo quelatado; esta señal desaparece al equilibrar la muestra con agua deuterada. Por otro lado, la señal en  $\delta_H$  5.05, que también desaparece al equilibrar la muestra con agua deuterada, indica la presencia de otro grupo hidroxilo en la molécula.
- c) En  $\delta_H$  3.9 aparece una señal típica del grupo metoxilo de un éster de un ácido carboxílico aromático.
- d) Por último, en la región donde absorben los hidrógenos alifáticos se observan dos singletes en  $\delta_H$  2.46 (H-2'') y 2.10 (H-5') que se asignan a dos grupos metilos unidos a un anillo aromático.

El espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Espectro 5) presenta señales para diez carbonos, en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El espectro de RMN-<sup>13</sup>C en su modalidad DEPT (Espectro 6) indica claramente que estas señales corresponden a: un metino, un metoxilo, dos metilos y seis carbonos cuaternarios. El metino es de naturaleza aromática  $\delta_C$  108.5 (C-5) y muestra correlación en el espectro HMQC (Figura 4) con la señal previamente asignada en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H al hidrógeno aromático en  $\delta_H$  6.2 (H-3). Las señales de los metilos se encuentran en  $\delta_C$  51.8, 24 y 7.6. La primera muestra correlación en el espectro HMQC con la señal del metoxilo en  $\delta_H$  3.9. Las dos últimas señales, en tanto, correlacionan con los metilos en  $\delta_H$  2.4 y 2.01.

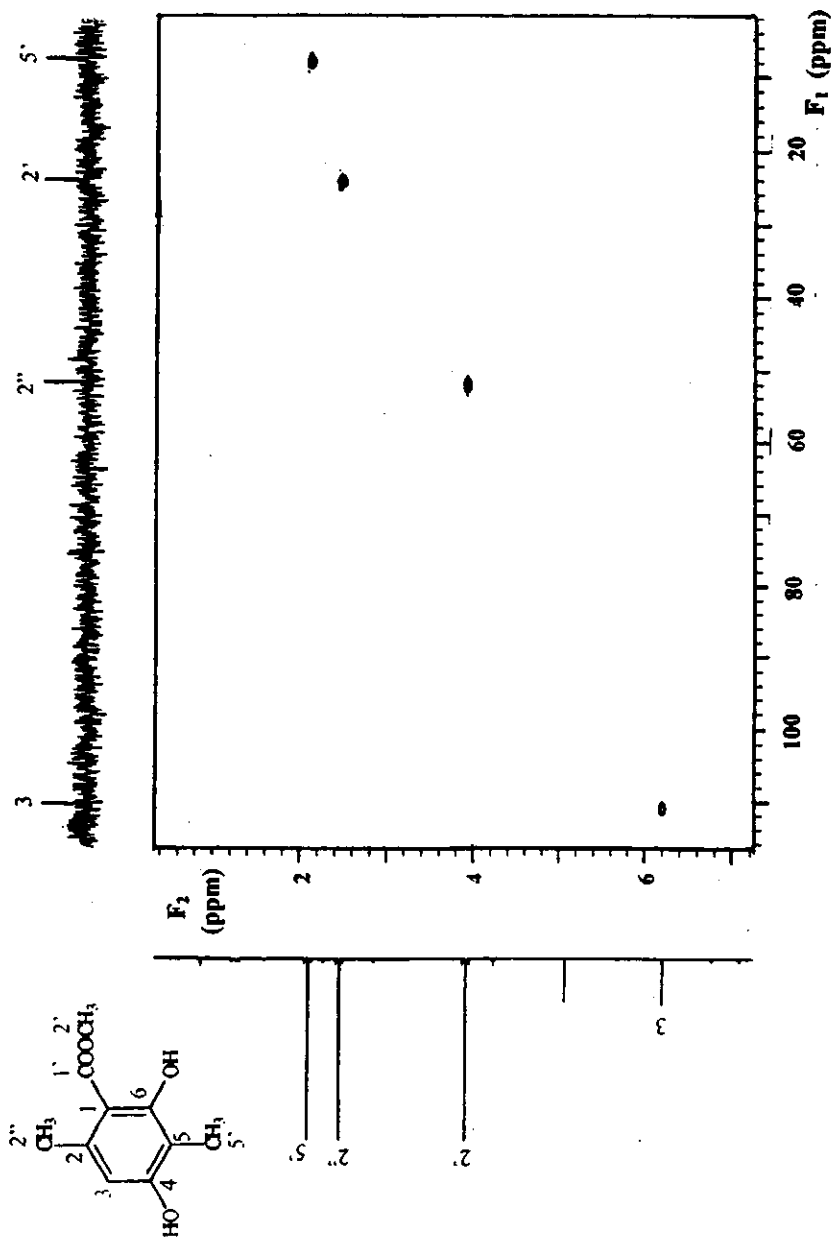


Figura 4 Espectro de RMN-HMQC del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67)



Las señales de los carbonos cuaternarios se discriminaron de la siguiente forma:

La señal en  $\delta_c$  172.6 se asignó al carbonilo de la función éster evidenciado en el espectro de IR (Espectro 1); las tres señales restantes corresponden a carbonos aromáticos, dos de ellos ( $\delta_c$  163.1 y 158) sustituidos con funciones oxigenadas de acuerdo a la magnitud de su desplazamiento químico. Estas funciones oxigenadas corresponden a los grupos hidroxilo detectados en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 3) e IR. El cuarto carbono cuaternario se encuentra en  $\delta_c$  140.1 (C-1) y se trata del carbono aromático *ipso* a la función éster.

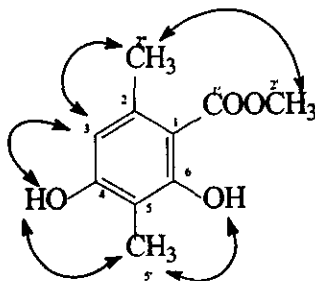
El análisis efectuado hasta el momento, de los espectros en el IR, masas y RMN permiten proponer que el producto natural es un éster metílico derivado del ácido benzoico, cuyo anillo bencénico se encuentra sustituido por dos grupos hidroxilo y dos grupos metilos.

Para establecer la posición de los grupos funcionales en la molécula se realizaron las siguientes consideraciones:

- (i) La presencia de una señal para un grupo hidroxilo quelatado en el espectro de RMN indica claramente que uno de los grupos hidroxilo se encuentra *orto* a la función carboximetilo.
  
- (ii) Por otro lado, los cuadros de conectividad observados en el espectro NOESY (Figuras 5 y 6) entre el metoxilo del carboximetilo y uno de los grupos metilo ( $\delta_H$  2.5) son consistentes con la ubicación de uno de los grupos metilo, *orto* a la función carboximetilo. La correlación de este metilo ( $\delta_H$  2.5) con el único hidrógeno aromático presente en la molécula indica que el metilo *orto* al carboximetilo se encuentra *orto* a su vez al metino aromático (H-3). Este último muestra también un cuadro de conectividad con el otro grupo hidroxilo presente en la molécula, indicando entonces que éste se encuentra *orto* al metino aromático.

- (iii) Por último, el otro grupo metilo presente en la molécula presenta una clara correlación con los dos grupos hidroxilos, lo cual era consistente con su ubicación entre estos dos grupos funcionales.

Con base a las evidencias presentadas, el compuesto se caracterizó como el éster metílico del ácido [4,6-dihidroxi-2,5-dimetil] benzoico (67).



**Figura 5.** Correlaciones más importantes observadas en el espectro NOESY del compuesto éster metílico del ácido [4,6-dihidroxi-2,5-dimetil] benzoico (67).

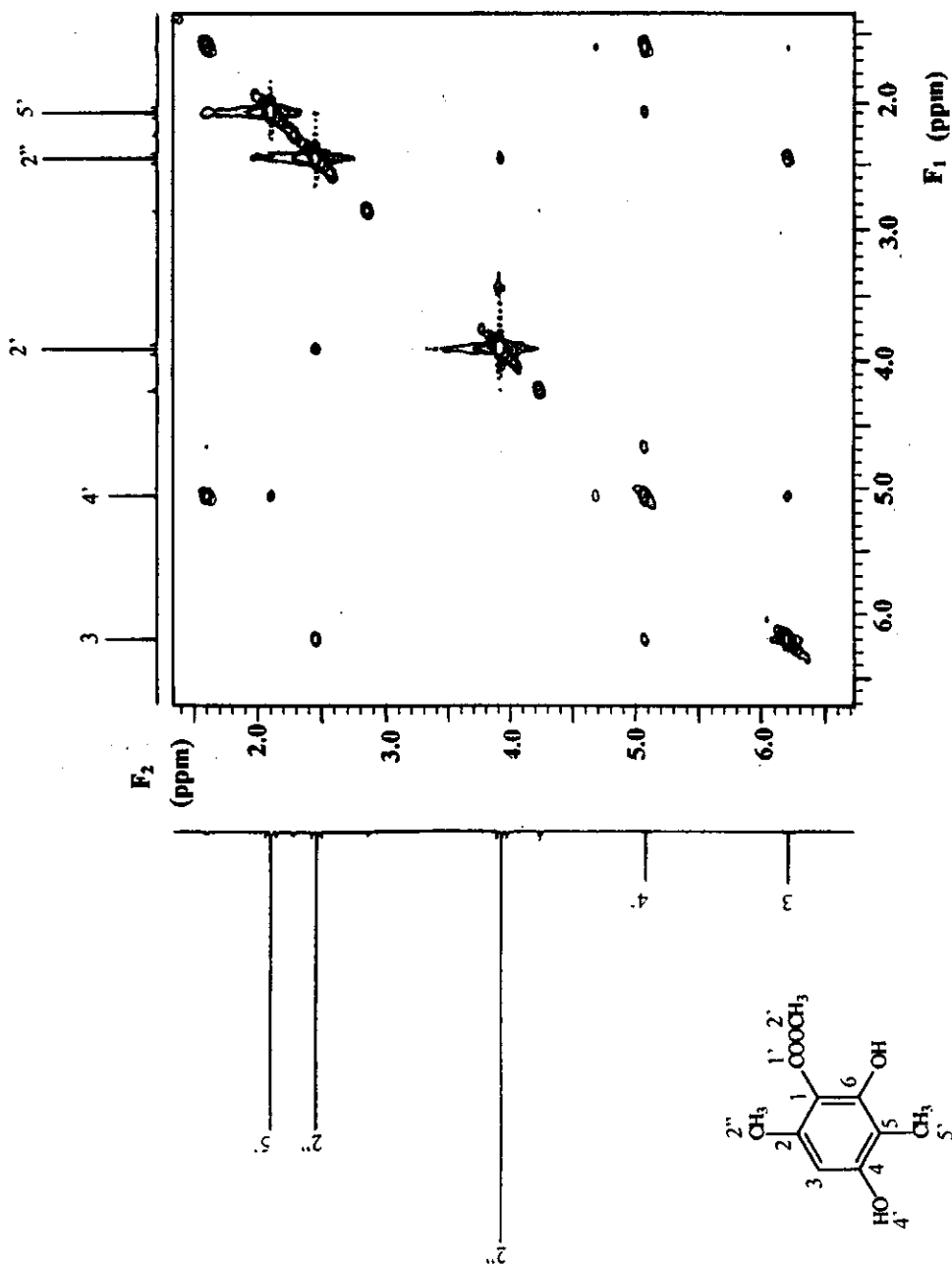


Figura 6. Espectro NOESY del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).

### 3.1.2 Caracterización del tetracosonato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (75).

El compuesto (75) se aisló a partir de la mezcla de fenil etanooides F017, obtenida a partir de la fracción activa F010. La aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución, empleado el método de rasurado y reciclado, permitió la obtención del fenil etanoide 75 en forma pura (Figura 7 y 8).

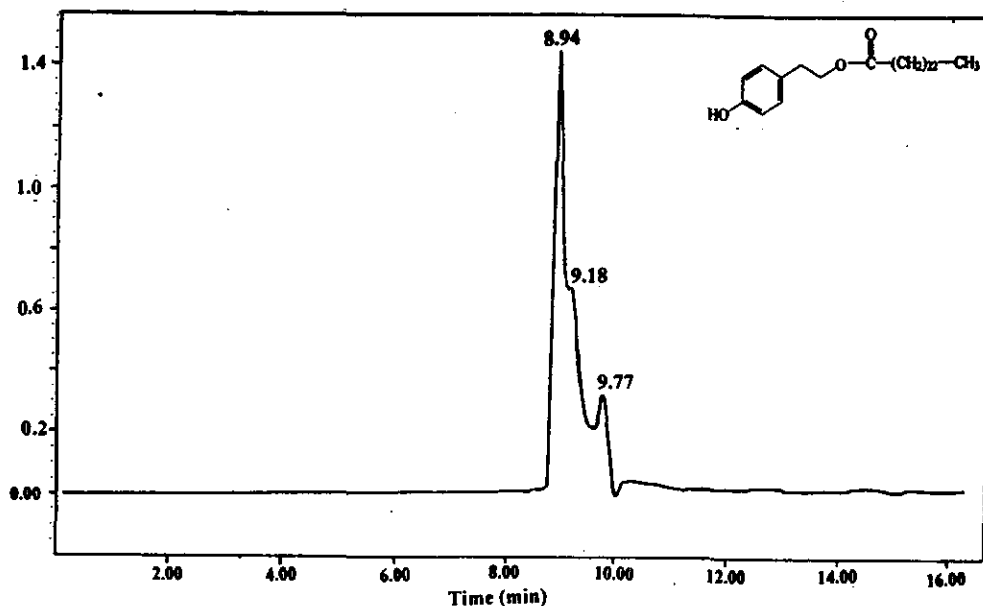


Figura 7. Cromatograma de Líquidos de Alta Resolución de la mezcla F017 de donde se obtiene el tetracosonato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (75).

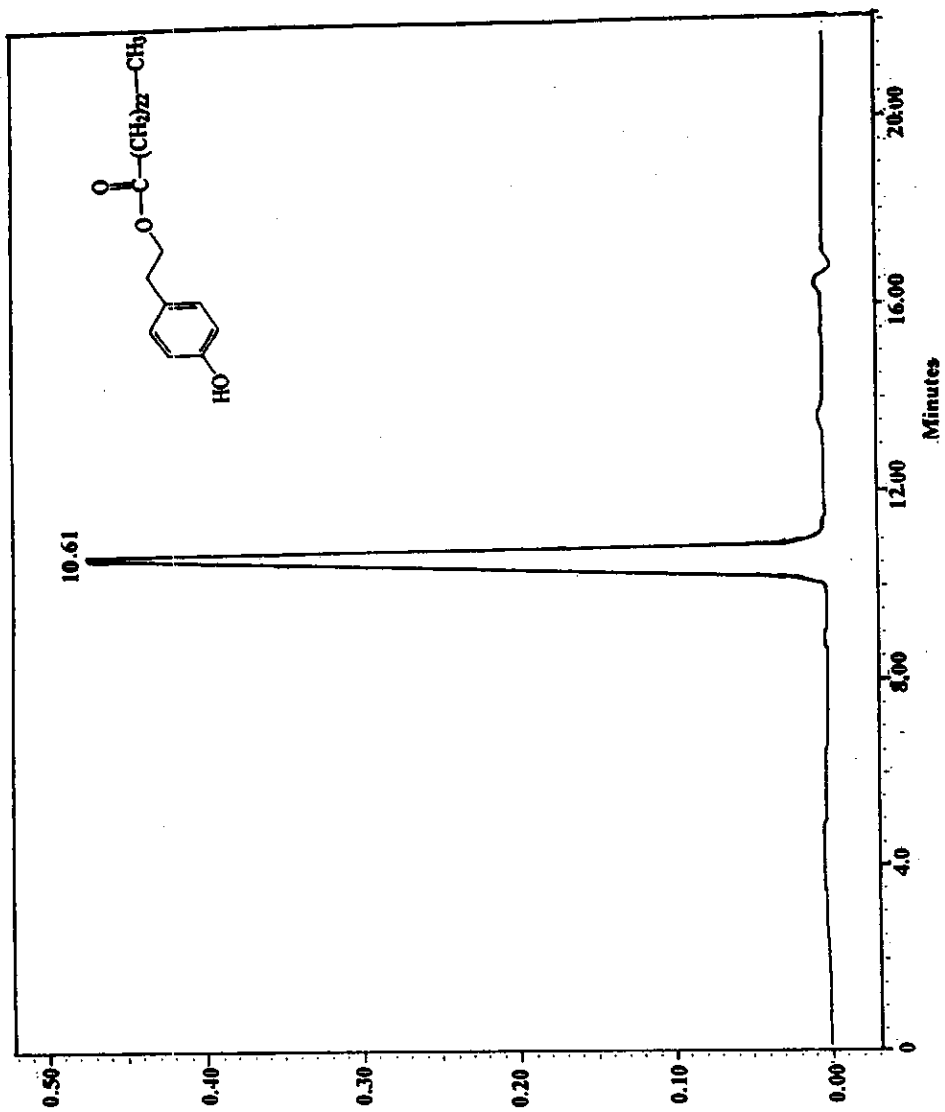
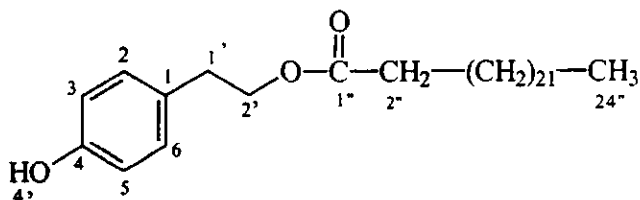


Figura 8. Cromatograma de Líquidos de Alta Resolución donde se observa el tetraicosanoato de 2-[4-hidroxifenil] etilo (75) en forma pura.

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de este nuevo producto natural se indican en las **Tablas 4-6**.

**Tabla 4** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del tetracosanoato de 2'[4-hidroxifenil] etilo (75)



<b>Fórmula molecular</b>	$C_{32}H_{56}O_3$
<b>Peso molecular</b>	488 uma
<b>Punto de fusión</b>	72-74°C
<b>IR <math>\nu_{max}</math> <math>KBr</math> <math>cm^{-1}</math></b> (Espectro 8)	3429, 2918, 2850, 1733, 1517, 1466, 1200, 1176, 800, 725, 700.
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.)</b> (Espectro 9)	120 (100), 121 (10), 105 (5), 71 (3), 57 (8), 43 (8), 41 (3).
<b>EM-FAB<sup>+</sup> <math>m/z</math> (int. rel.)</b> (Espectro 10)	489 [M+1 (3)], 307 (11), 289 (8), 154 (55), 121 (100).

**Tabla 5.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del tetracosanoato de 2'[4-hidroxifenil] etilo (75).

PROTON	δ <sub>H</sub>	MULTIPLICIDAD	J (Hz)
H-2,6	7.08	<i>d</i>	8.70
H-3,5	6.76	<i>d</i>	8.70
H-1'	2.86	<i>t</i>	7.05
H-2'	4.23	<i>t</i>	7.05
H-2''	2.3	<i>t</i>	7.35
H-4''-23''	1.25	<i>sa</i>	-
H-24''	0.88	<i>t</i>	6.45
-OH	1.58	<i>s</i>	-

Los desplazamientos químicos son relativos al TMS y las asignaciones se realizaron con la ayuda del experimento COSY.

**Tabla 6.** Datos de RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del tetracosanoato de 2'[4-hidroxifenil] etilo (75)

CARBONO	δ <sub>C</sub>
C-1	130.10
C-2	130.04
C-3	115.33
C-4	154.23
C-5	115.33
C-6	130.04
C-1'	34.37
C-2'	64.92
C-1''	173.90
C-2''	34.29
C-3''-23''	22.7-34.4
C-24''	14.10

Las asignaciones se realizaron con base en el análisis del espectro DEPT.

Este compuesto (75) se obtuvo como un polvo de color blanco con un punto de fusión de 72-74°C. El espectro en el IR (Espectro 8) presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de grupos hidroxilo (3429 cm<sup>-1</sup>); carbonilo de éster (1733, 1200 cm<sup>-1</sup>); aromaticidad

(1517, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ) y de una cadena hidrocarbonada larga (2918, 2850  $\text{cm}^{-1}$ ). Su fórmula molecular se determinó como  $\text{C}_{32}\text{H}_{56}\text{O}_3$  por EM modalidad  $\text{FAB}^+$  (Espectro 10). El espectro de masas generado por impacto electrónico (Espectro 9) no presentó el ión molecular, sin embargo, se observa un fragmento intenso en  $m/z$  120 (pico base) (Figuras 8 y 9). El pico de  $m/z$  120 corresponde al fragmento vinilfenol resultante de un reordenamiento de McLafferty (Silverstein, 1997). También se observan picos en  $m/z$  107, 92 y 91.

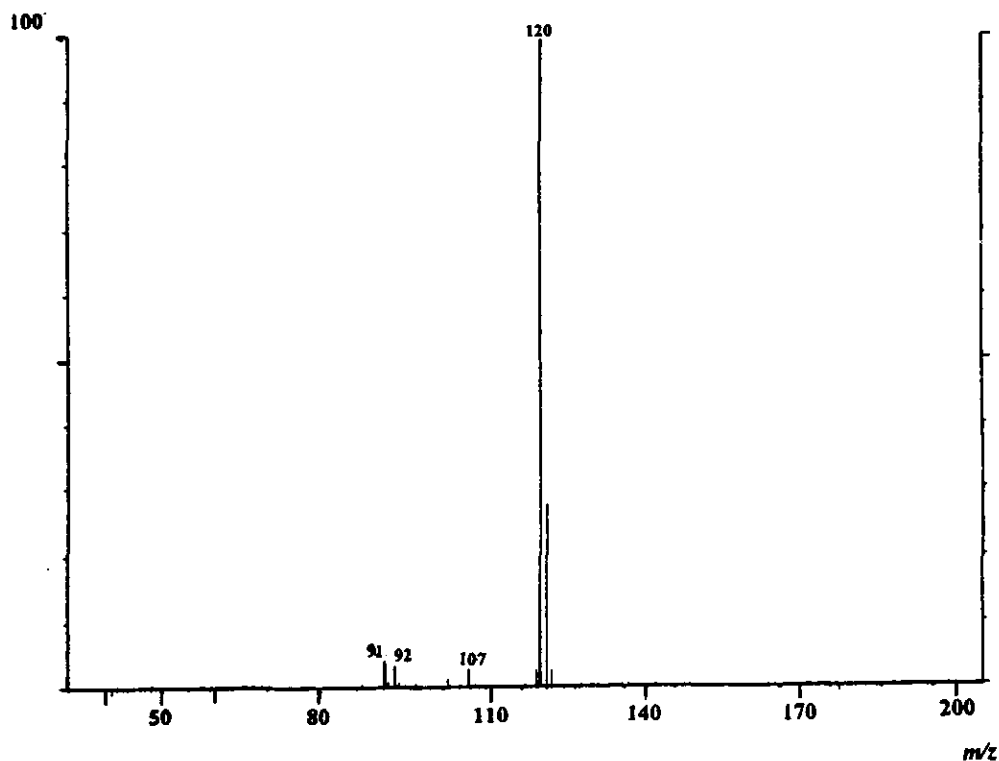
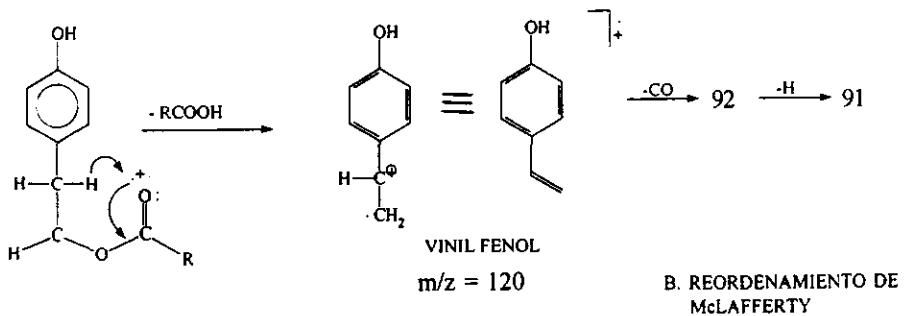
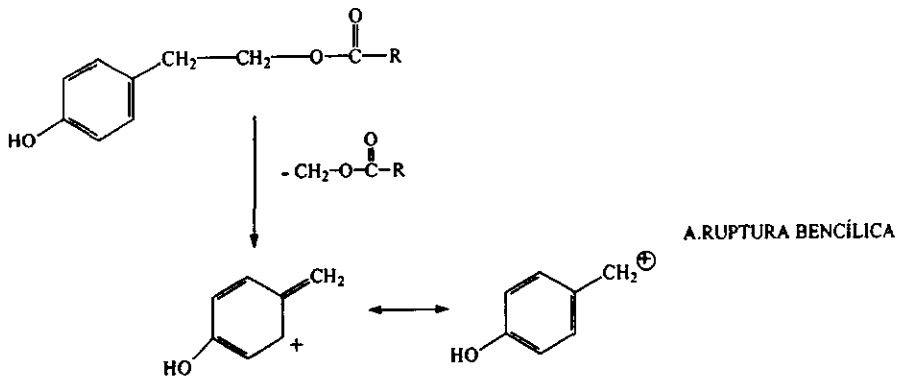


Figura 9. Espectro de masas del tetracosanoato de 2-[4-hidroxifenil] etilo (75).

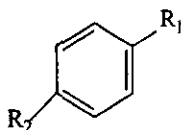




**Figura 10** Fragmentos más importantes observados en el espectro de masas por impacto electrónico del tetracosanoato de 2[4-hidroxi-fenil]etilo (75). A. Ruptura bencílica. B. Reordenamiento de McLafferty.

Los espectros de RMN confirman que el producto natural **75** es un éster derivado del 4-hidroxi fenil etanol (Houghton, 1985; Yamamoto *et al.*, 1993; Arciniegas *et al.*, 1995) y un ácido graso lineal de 24 carbonos. Así las señales correspondientes al fenil etanoide se observan en los espectros de RMN (**Espectros 11-13**) como se describe a continuación:

- (i).- Las señales de los hidrógenos aromáticos del anillo carbocíclico forman un sistema  $A_2X_2$  típico de un compuesto aromático disustituido, como se indica en la estructura parcial **B**. Las señales para el sistema  $A_2X_2$ , aparecen en  $\delta_H$  7.08 (*d*,  $J = 8.7$  Hz; H-2,6) y  $\delta_H$  6.7 (*d*,  $J = 8.7$  Hz; H-3,5) y muestran una clara correlación en el Espectro COSY (**Figura 11**). Por otro lado, éstas correlacionan en el espectro de HETCOR (**Espectro 14**) con las señales en  $\delta_C$  130 y  $\delta_C$  115, respectivamente.



Estructura B

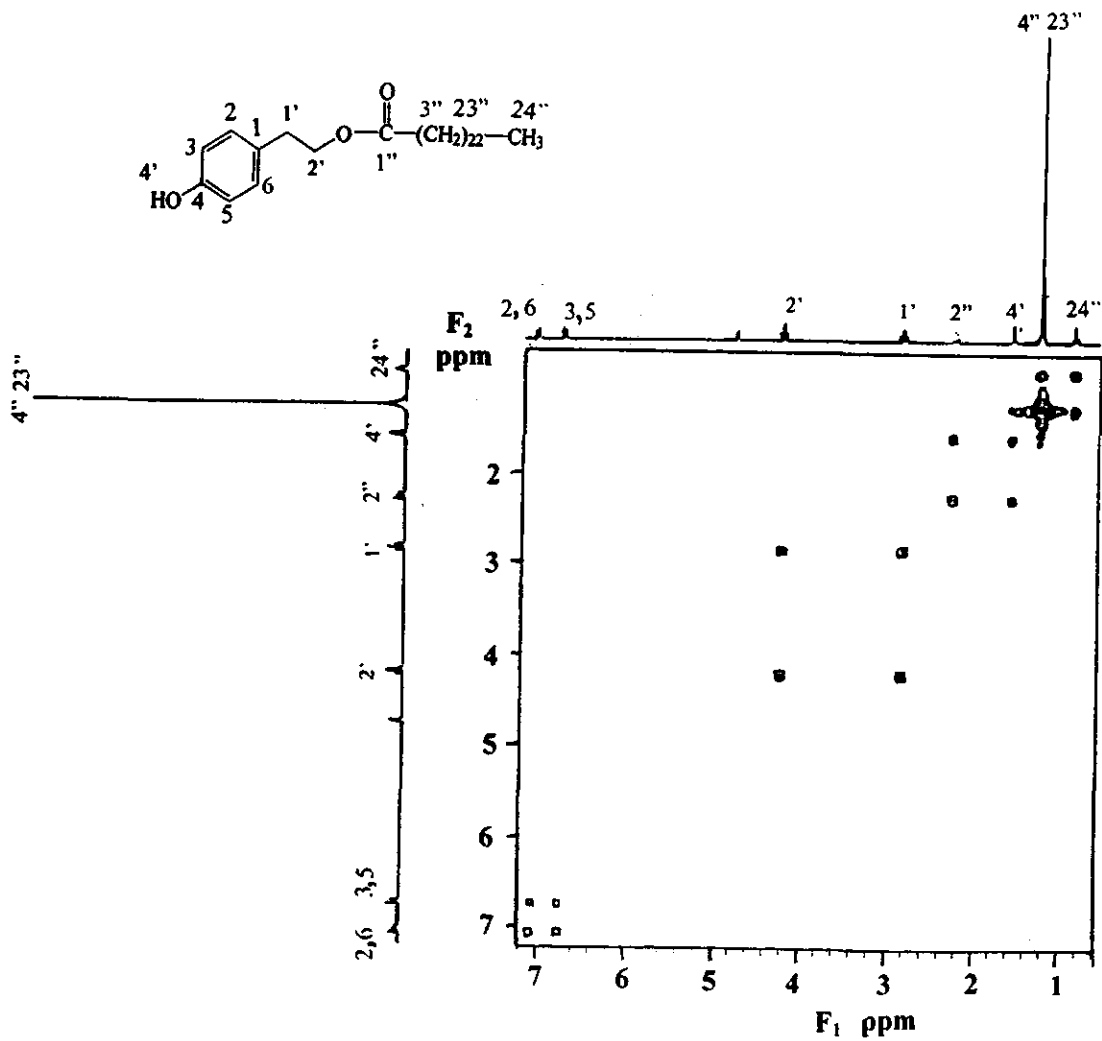


Figura 11. Espectro RMN modalidad COSY del tetracosanoato de 2-[4-hidroxifenil] etilo (75).

(ii) En  $\delta_H$  1.58 se observa la señal del grupo hidroxilo fenólico; esta señal desaparece al equilibrar la muestra con agua deuterada (Espectro 11 y 12).

(iii) Las resonancias de la función etiloxi aparecen en  $\delta_H$  4.2 ( $t, J = 7.05 \text{ Hz}, H-1'$ ) y en  $\delta_H$  2.8 ( $t, J = 7.05 \text{ Hz}, H-2'$ ) y conforman un sistema  $A_2X_2$ . Estas señales correlacionan con los metilenos en  $\delta_C$  64.92 (C-2') y 34.37 (C-1') en el espectro de HETCOR (Espectro 14).

Por otra parte las señales más relevantes de la unidad del ácido graso son:

(i).-Las correspondientes a los metilenos  $\alpha$  [ $\delta_H$  2.3 (H-2''),  $\delta_C$  34.3 (C-2'')] y  $\beta$  [ $\delta_H$  1.25 (H 4''-23''),  $\delta_C$  22.7-34.4 (C 3''-23'')] al carbonilo de la función éster.

(ii).-El metilo terminal de la cadena hidrocarbonada [ $\delta_H$  0.88 ( $t, J = 6.45 \text{ Hz}$ );  $\delta_C$  14.10].

(iii).-Por último, el carbonilo del éster aparece en el espectro de RMN- $^{13}C$  (Espectro 13) en  $\delta_C$  173.90.

La hidrólisis del producto natural 75 en condiciones básicas permitió la obtención del ácido lignocérico, el cual se identificó bajo la forma de éster metílico por CG-EM.

Las evidencias presentadas permitieron identificar al producto natural como el tetracosanoato de 2'[4-hidroxifenil] etilo (75) el cual constituye un nuevo producto natural.

#### 4.1.3 Elucidación estructural de los compuestos presentes en la mezcla de fenil etanoides (mezcla F017).

El polvo F017 presenta un espectro RMN-<sup>1</sup>H muy similar al del compuesto puro 75, sin embargo, al analizar el producto por CG-EM se obtuvo que él mismo era una mezcla de al menos cinco productos muy similares incluyendo el producto 75 (Figura 12). Los espectros de masas generados por los componentes de la mezcla resultaron idénticos y presentaron el pico base en una relación de  $m/z$  120, el cual corresponde al fragmento vinil fenol detectado en el espectro del producto puro 75.

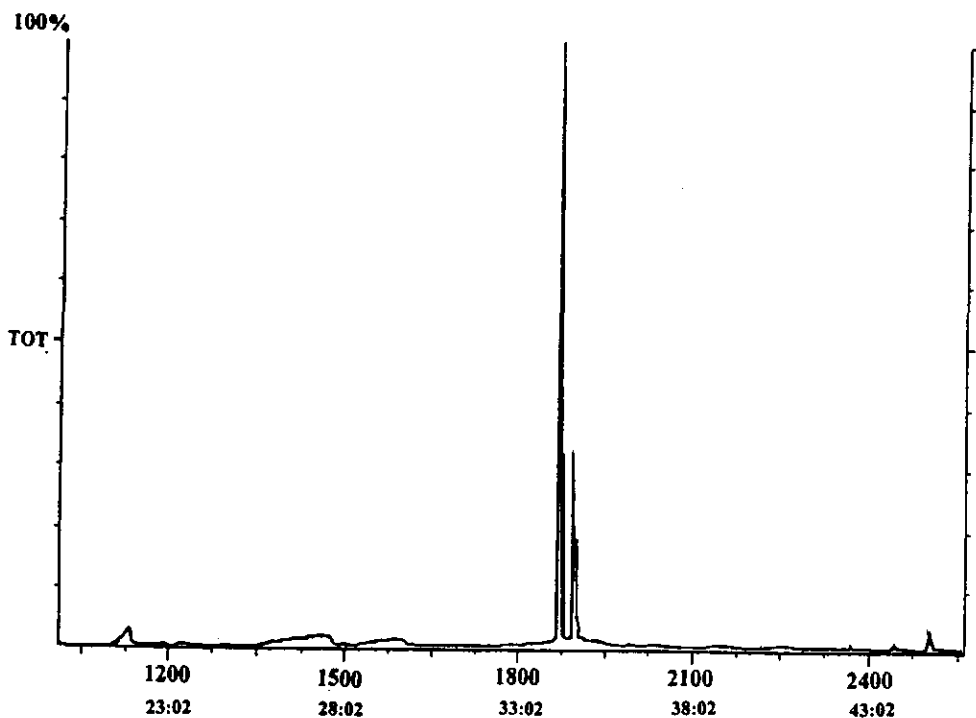


Figura 12. Cromatograma de gases de la mezcla F017.

El tratamiento de la mezcla F017 con diazometano permitió la obtención de la mezcla F019 la cual presentó un espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Espectro 15) muy similar al de la mezcla original. La principal diferencia observada en el espectro es la presencia de una señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.8, que puede atribuirse al metoxilo del éter metílico generado por la reacción con diazometano. El análisis por CG-EM de la mezcla metilada permitió comprobar que la misma estaba constituida por diez productos fenil etanoides diferentes (Figura 13). Los espectros de masas generados por cada uno de los constituyentes resultaron idénticos. En este caso el pico base se observó en una relación  $m/z$  de 134; es decir, catorce unidades de masa más que en el caso del producto puro 75 (Figura 14 y 15). Este fragmento se origina también por un reordenamiento de McLafferty y corresponde al vinil fenol metilado.

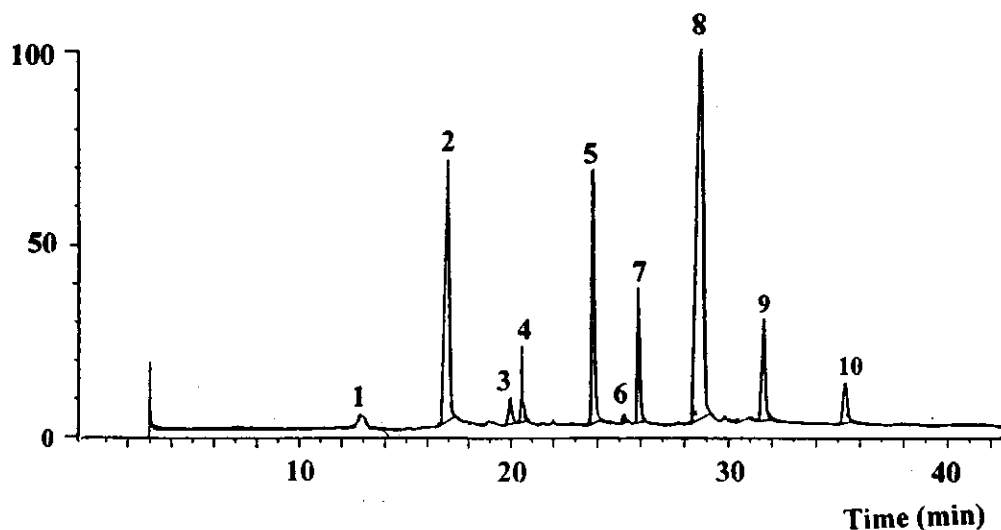
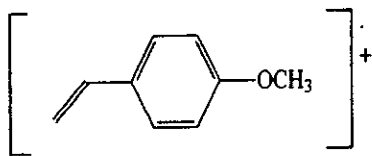


Figura 13. Cromatograma de gases de la mezcla de éteres metílicos (F019) derivados de la mezcla de fenil etanoides (F017). Asignación de los picos: éteres metílicos de los ácidos: palmítico (1), heptadecánico (2), esteárico (3), nonadecanoico (4), araquidónico (5), behénico (6), tricosanoico (7), lignocérico (8), hiénico (9) y cerótico (10).



134

Figura 14. Fragmento característico de los éteres metílicos de ácidos grasos

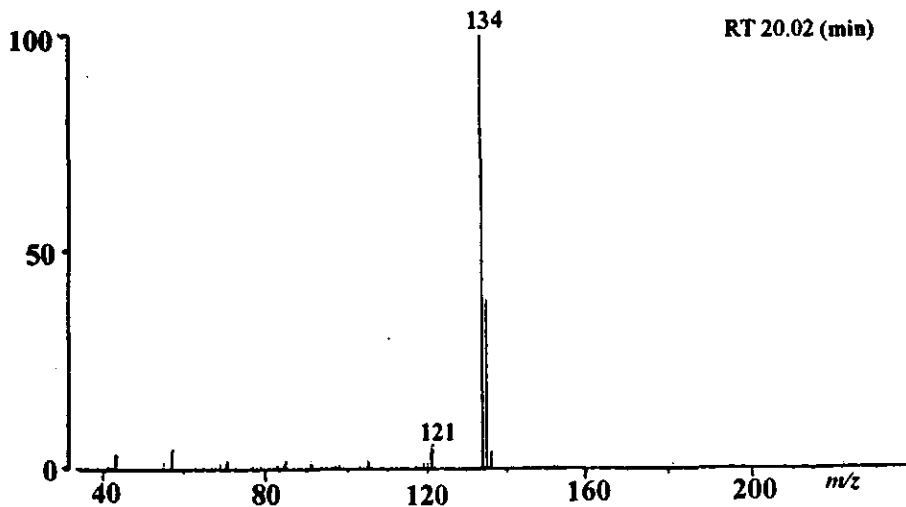
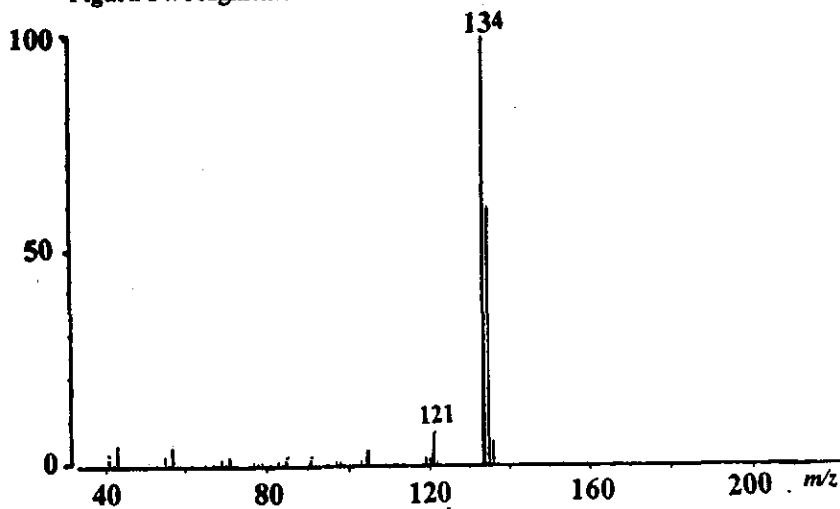
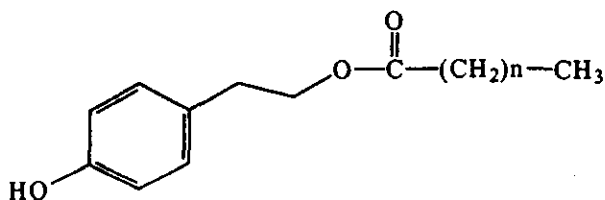


Figura 15. Espectros de masas (CG-EM IE) generados por los picos de t.r. 16.99 min (78a) y 20.02 min (79a) presentes en la mezcla de fenil etanoides (F018).

El análisis de los espectros de masas generados por la técnica FAB modalidad positivo de la mezcla F017 permitió detectar 10 iones cuasimoleculares confirmándose así la presencia de 10 ésteres incluyendo al compuesto 75 (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Fenil etanoideos detectados en el espectro de masas modalidad FAB de la mezcla de fenil etanoideos (F017).



COMPUESTO	n	PESO MOLECULAR ([M+H] <sup>+</sup> )
Palmitato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (68)	14	376
Heptadecanoato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (69)	15	390
Estearato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (70)	16	404
Nonadecanoato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (71)	17	418
Araquidato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (72)	18	432
Behenato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (73)	20	460
Tricosanoato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (74)	21	474
Lignocerato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (75)	22	488
Hienilato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (76)	23	502
Cerotoato del 2'[4-hidroxi fenil] etanoide (77)	24	516



NOMBRE	t.r. (min.)	%	FORMULA	P.M. (g/mol)	FRAGMENTOS				ESPECTRO
					M+	M-31	87	74	
Acido palmítico	14.29	4.5	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	20	17	80	100	19
Acido heptadecanóico	15.00	9.02	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284	28	5	100	16	20
Acido esterárico	16.47	14.82	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298	40	15	82	100	21
Acido nonadecanóico	17.11	2.54	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	312	30		100	17	22
Acido araquimóico	18.32	2.31	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326	60	5	85	98	23
Acido bohénico	20.02	10.31	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	354	61	5	85	100	24
Acido tricosenóico	20.84	4.5	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	368	50	3	87	100	25
Acido lignocérico	21.63	45.52	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	382	53	3	95	100	26
Acido híenico	22.36	4.69	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	396	61	5	89	100	27
Acido cerótico	23.09	1.2	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	410	85	5	90	100	28

Cuadro 12. Acidos grasos de la hidrólisis de la mezcla de fenil etanoideos (F017) indicados como sus ésteres metílicos en CG-EM.

Para comprobar la identidad de los diez compuestos resultantes presentes en la mezcla original de feniletanoides (F017), se procedió a la hidrólisis total de los mismos utilizando las condiciones aplicadas para el compuesto puro (parte experimental 3.4.3.3). Como resultado de este proceso se obtuvo una mezcla de ácidos grasos (F018-A), los cuales se metilaron con una solución etérea de diazometano (Mezcla F020-A) y se analizaron por CG-EM. Los cromatogramas de gases resultantes fueron idénticos e indicaron la presencia de diez componentes los cuales se caracterizaron mediante la interpretación de sus espectros de masas como los ésteres metílicos de los ácidos [palmitico, heptadecanoico, esteárico, araquidónico, behénico, docosanoico, tricosanoico, lignocérico, pentacosanoico y el cerótico].

Cabe señalar que la mezcla de ácidos metilados (F020-B) proveniente de la hidrólisis alcalina de la mezcla de éteres F019 resultó idéntica a la obtenida a partir de la mezcla F017. En el Cuadro 12 se resumen los tiempos de retención, proporción en la mezcla y los fragmentos masa carga más importantes observados en los espectros de masas de cada uno de los componentes presentes en la mezcla de ácidos grasos metilados (Mezcla F020-A).

Los ácidos grasos son fácilmente identificados bajo la forma de sus ésteres metílicos utilizando la técnica de CG-EM. Los ésteres generados son más volátiles, y por lo tanto la separación por cromatografía de gases es más eficiente. Además los fragmentos característicos en la espectrometría de masas, permiten su clara identificación. Los números de  $m/z$  de los fragmentos diagnósticos son productos con oxígeno o resultantes de la transposición sencilla de hidrógeno del tipo McLafferty (Seibi, 1973). En el caso de los primeros, la fragmentación es de ambos lados del carbonilo y los iones resultantes no producen necesariamente señales intensas, pero sí características. Estos fragmentos se diferencian solamente en 14 unidades de masa por exceso ( $m/z$  59, 87... n). El fragmento de  $m/z$  74 es el producto de transposición de McLafferty y generalmente representa el pico base

en los espectros de masas de los ésteres metílicos con más de dos metilenos (Espectros 20-29). La intensidad del ión molecular ( $M^+$ ) en los ésteres metílicos de ácidos saturados, forma parte de las señales más intensas de los espectros, lo que facilita su interpretación y determinación del peso molecular.

#### 4.2 Estudio fitoquímico del *Liquen sp III*.

El análisis de la estructura del producto **67** permitió establecer la hipótesis que él mismo podría provenir de los líquenes que usualmente crecen en la corteza del árbol *Buddleja cordata*. Para comprobar esta hipótesis se procedió a realizar el estudio fitoquímico de los tres líquenes que crecen con mayor abundancia en el árbol.

El análisis fitoquímico de los tres extractos obtenidos a partir de los tres líquenes, utilizando la cromatografía en capa delgada permitió la detección del metabolito **67** en los tres casos. De manera adicional, en el caso del *Liquen III*, el fraccionamiento del extracto mediante cromatografía en columna abierta de gel de sílice condujo al aislamiento de un metabolito idéntico en todos sus aspectos al producto **67**, obtenido de la fracción activa F009 de *Buddleja cordata*. Este compuesto se encontró en el *Liquen III* en una proporción de 0.81 %.

En consecuencia las evidencias obtenidas del estudio fitoquímico de los tres líquenes permitieron comprobar la hipótesis de que el metabolito **67** es de origen líquénico y por lo tanto no es un producto del metabolismo secundario de *Buddleja cordata*.

## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

1.- El estudio químico biodirigido de la especie *Buddleja cordata* permitió el aislamiento y caracterización de un compuesto del tipo  $C_6-C_1$ , el cual se caracterizó como el éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67), un esteroil caracterizado como  $\beta$ - sitosterol (26) y diez compuestos del tipo fenil etanoide de estructuras novedosas. Los fenil etanoides se identificaron como: palmitato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (68), heptadecanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (69), estearato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (70), nonadecanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (71), eicosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (72), docosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (73), tricosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (74), tetracosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (75) pentacosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (76) y hexacosanoato de 2'[4-hidroxi fenil] etilo (77). Esta investigación representa una contribución original al conocimiento de la química del género *Buddleja*, ya que la misma constituye la primera descripción de ésteres derivados del metabolito  $C_6-C_2$  fenil etanol.

En general la caracterización de los productos naturales se realizó por métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

2.- El estudio fitoquímico de las especies de líquenes más abundantes en la corteza de *B. cordata*, permitió comprobar que el metabolito identificado como el éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67), no se deriva del metabolismo de la planta sino que éste es parte de la biosíntesis metabólica de los *Líquenes* que se encuentran parasitando a *Buddleja cordata*.

3.- Este estudio constituye una aportación adicional al conocimiento de la flora nacional mexicana y al campo de los fenil etanoides.

## VI. PERSPECTIVAS.

1.- El presente trabajo presenta como una perspectiva aislar en forma pura los otros nueve metabolitos de naturaleza fenil etanoide detectados por el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) aislados a partir de la mezcla F017 de *Buddleja cordata*, mediante la aplicación de la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

2.- Caracterizar taxonómicamente las especies parásitas de *Líquen* más abundantes de la corteza del árbol de *Buddleja cordata*.

3.- Validar el uso popular medicinal de la especie *Buddleja cordata* mediante la evaluación biológica de los extractos íntegros a partir de las hojas y la corteza de la especie, así como de los líquenes mayoritarios.

**VII BIBLIOGRAFIA.**

Aguilar, A; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jácquz, P y López, M.E. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, Información Etnobotánica*. 253. México D.F., I.M.S.S.

Arciniegas, A., Avendaño, A.; Pérez-Castorena, A.; Romo de Vivar, A. (1997) *Flavonoids from Buddleja parviflora. Biochemical Systematics Ecology*, 25, 185-186.

Argueta, V.; Cano, A y Rodarte M.E. Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana. (1994) 1786 p. México D.F. Instituto Nacional Indigenista.

Bate-Smith, E.C. (1962) *The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. Journal of the Linnaean Society*, 58, 95-173.

Bruun T. (1971) *The Isomeric m-methoxytrimethylphenols and related compounds. Acta Chemica Scandinavica*. 25(8), 2837-2851.

Bye, R., Linares, E y Estrada E. (1995) *Biological diversity of medicinal plants in Mexico* En: Arnason J, Mata R. y Romero J. (Editores) *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 29, New York, Plenum Press, pp 65-82.

Bye, R (1983) *Medicinal plants of the Tarahumaras Indians of Chihuahua, Mexico*. En: Tyson, R.A. y Elerick D.V (Editores) *Two mummies from Chihuahua: A Multidisciplinary Study*, San Diego, San Diego of Museum Paper, pp 77-104.

Cárdenas, F. (1993) *Remedios y Prácticas Curativas en la Sierra Tarahumara, Chihuahua, Chih.* Ed. Camino 228p.

Díaz, J. L. *Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales, Cd. México, p 16.*

Ding, N.; Yahara, S.; Nohara, T. (1992) *Structure of mimengosides A and B, new triterpenoid glycosides from **Buddleja parviflora** produced in China. Chemical Pharmacology Bulletin. 40, 780-782.*

Emam, A. M.; Moussa, A. M.; Faure, R.; Favel, a.; Delmas, F.; Elias, R.; and Balansard, G. (1996) *Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A from the leaves of **Buddleja madagascarensis**. Planta Medica 62, 92-93.*

Hamburger, M. and Hostettmann, K. (1991) *Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. Phytochemistry. 30, 3864-3874.*

Harbane, J. B.; and Williams, C. A. (1971) *6-Hydroxyluteolin and Scullarein as phyletic markers in higher plants. Phytochemistry. 10, 367-378.*

Houghton P. (1984) *Ethnopharmacology of some **Buddleja** species. Journal of Ethnopharmacology. 11, 293-308.*

Houghton P. (1985) *Lignans and neolignans from **Buddleja davidii**. Phytochemistry. 24, 819-826.*

Houghton P. (1985) *Phenylpropanoid glycosides in **Buddleja davidii**. Journal of Natural Products. 48(4), 1005-1006.*

Houghton, P.; Woldemariam, T.; Candau, M.; Bernardo, A.; Khen-Alafun, O; Shangxiao, L. (1996) *Buddleione a diterpene from Buddleja albiflora*. *Phytochemistry* 42, 485-488.

Hultin, E. And Torsell, K. (1965) *Alkaloid screening of Swedish plants*. *Phytochemistry* 4, 425-433.

Jogen, R., Sala, T.; Sarggent, M. (1979) *Depsidone synthesis. Part 13. The total synthesis of variolaric acid*. *Journal Chemical Society Perkin, Trans. I.* 10, 2588-2592.

Kubo, I.; Yokokawa, Y. (1992) *Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from Buddleja coriacea*. *Phytochemistry*, 63, 1075-1077.

López, J., Sierra, J., Vegazo, M. E., and Cortes, M. (1979) *Chemical constituents of Buddleja globosa*. *Fitoterapia*. 5, 195-198.

Lowrey, C. (1993) *Reagent chemicals. American Chemical Society Specification*, Washington, D. C. pp. 90-91.

Martínez, M.; (1999) *Las plantas Medicinales de México*. 6<sup>th</sup>, México D.F., Ediciones. Botas, p 284.

Martínez-Vázquez, M., Apan, T., Ramírez, O.; Aguilar, M; Bye, R. (1996) *Analgesic and antipyretic activities of an aqueous extract of the flavone linarin of Buddleja cordata*. *Planta Medica*, 62, 137-140.



Martínez-Vázquez, M., Apan, T., Ramírez, O.; Lastra, L.; Bye, R. (1998) *A comparative study of the analgesic and Anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from **Buddleja cordata***. *Planta Medica*, 64, 134-137.

Norman, E. M. (1973) *The genus **Buddleja** in North America*. *Gentes Herbarium*. 10, 47-114.

Passanati, S., and Paternostro, M. P. (1981) *Constituents of **Buddleja** species leaves*. *Fitoterapia*, 52, 235-237.

Romo de Vivar, A., Nieto, D.; Gavino, R., Pérez-Castorena, A., (1995) *Isocapnell-9-en-8-one, and 6- $\alpha$ -hidroxisocapnell-9-en-8-one, sesquiterpenes from **Buddleja** species*. *Phytochemistry*. 40, 167-170.

Seibl, J. (1973) *Espectrometría de masas*. Editorial Alhambra, Madrid, España.

Silverstein, R. M. (1997) *Spectrometric identification of organic compounds*. 5<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc. p 443.

Singhal, A., Sharma, R., Thyagarajan, G., Herz, W., Govindan, S. (1980) *New prenylated isoflavones and a prenylated dihydroflavonol from *Mitlettia pachycarpa* and **Buddleja sesiliflora***. *Phytochemistry*. 19, 929-934.

Stahl, E. (1969) *Thin layer chromatography*. Academic Press Inc., New York.

Standley, P. (1924) *Trees and shrubs of Mexico. Contributions to the U.S. National Herbarium*. 23, 1144-1147 (1920-1926).

Suffeness, M.; Cragg, G.; Grever, M.; Grifo, F.; Johnson, G.; Mead, J., Schepartz, S., Venditti, J., Wolpert, M. (1995) *The National Cooperative Natural Products Drug Discovery Group (NCNPDDG) and International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. International Journal of Pharmacognosy*. Vol. 33, Supplement, pp 5-16.

Wannan, B., Waterhouse, J., Gadek, P., Quinn, C. (1985) *Biflavonoids and affinities of Blepharocarya, biochemical systematic and ecology. Phytochemistry*, 13, 105-108.

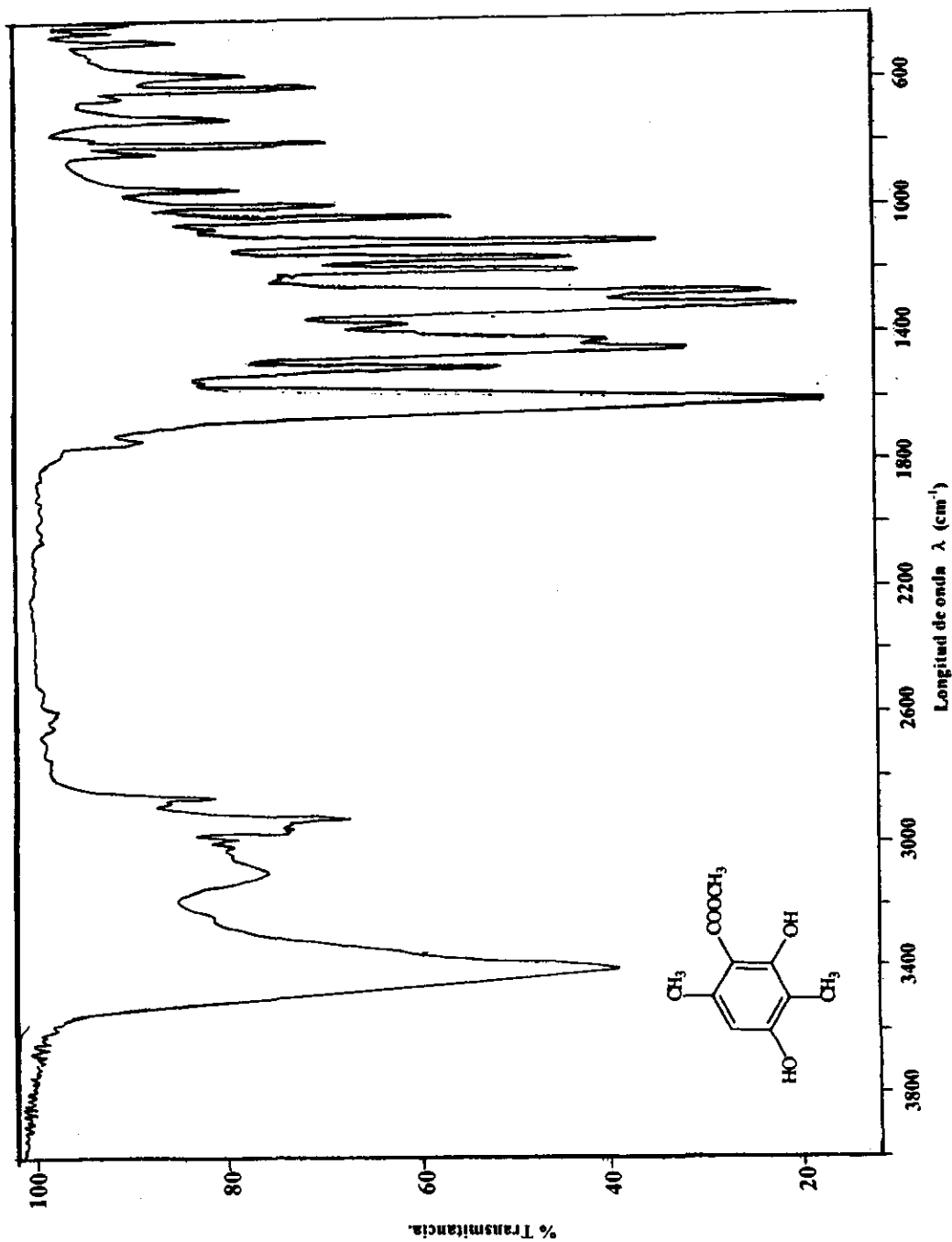
Yamamoto, A., Miyase, T., Ueno, A., Maeda, T. (1991) *Buddlejasaponins I-IV, four new oleanane-triterpene saponins from the aerial parts of Buddleja japonica H. Chemical Pharmacology Bulletin*. 10, 2764-2766

Yamamoto, A., Nitta, S., Miyase, T., Ueno, A., Wu, L. (1993) *Phenylethanoid and lignan-iridoid complex glycosides from roots of Buddleja davidii. Phytochemistry*, 32, 421-425.

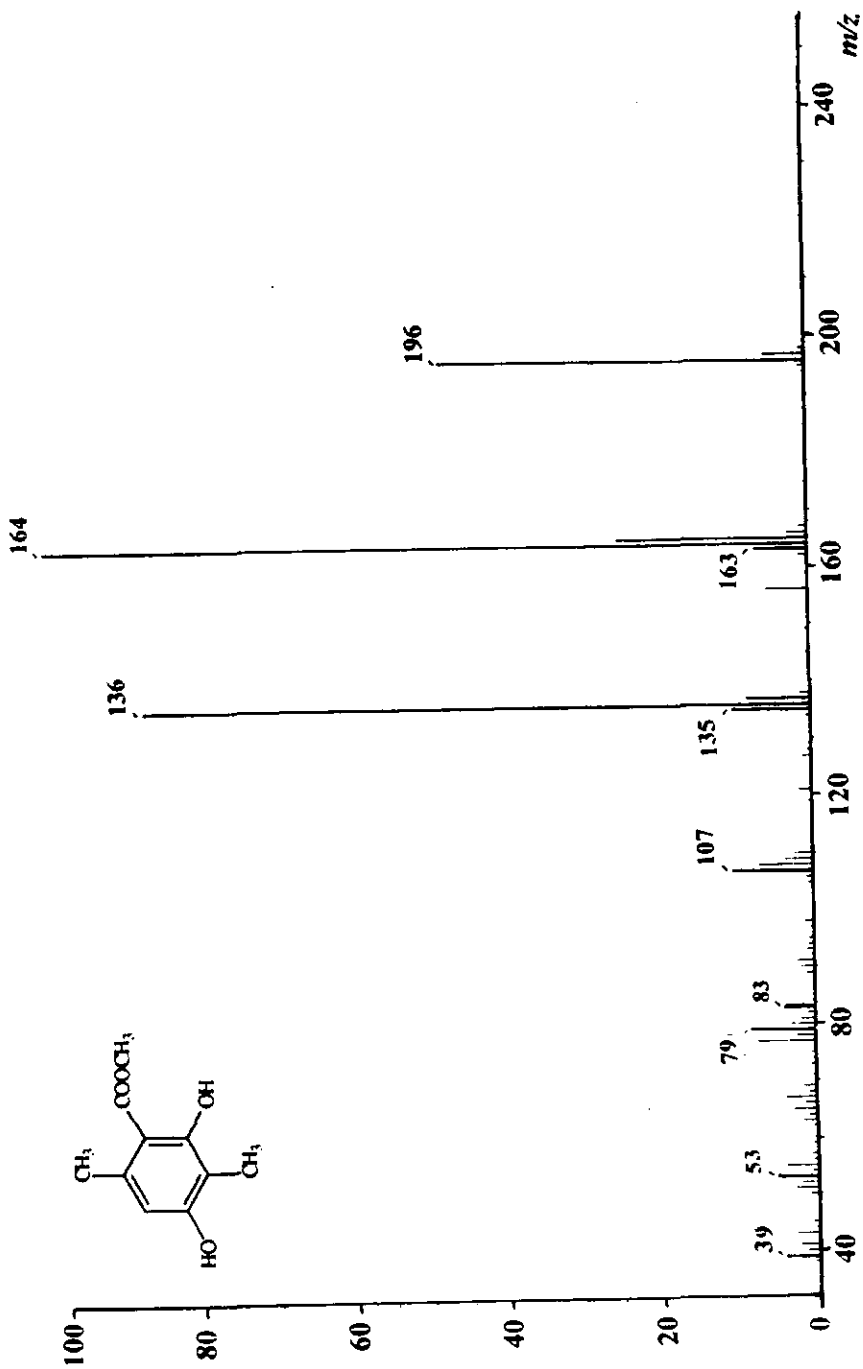
Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., and Okuda, T. (1976) *Buddledin A, B and C, piscicidal sesquiterpenes from Buddleja davidii Franch. Tetrahedron Letters*, 3717-3720.

Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., and Okuda, T. (1978) *Studies on the constituents of Buddleja species I. Structures of Buddledin A and B, two new toxic sesquiterpenes from Buddleja davidii Franch. Chemical Pharmacology Bulletin*. 8, 2535-2542.

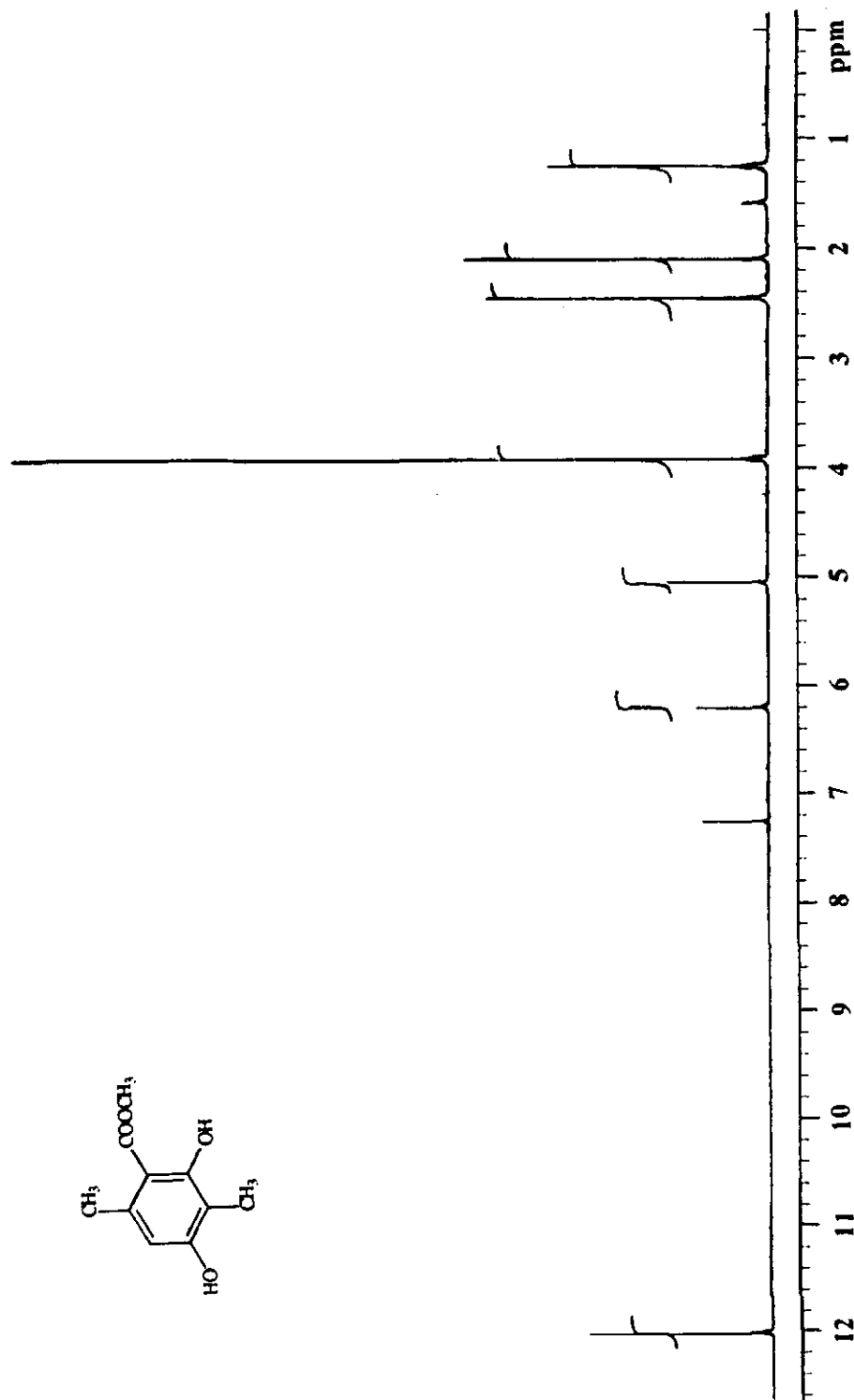
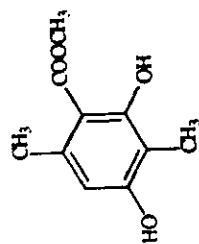
Yoshida, T., Nobuhara, J., Uchida, M., and Okuda, T. (1978) *Studies on the constituents of Buddleja species II. Buddledin C, D and E, new sesquiterpenes from Buddleja davidii Franch. Chemical Pharmacology Bulletin*. 8, 2543-2549.



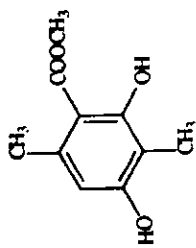
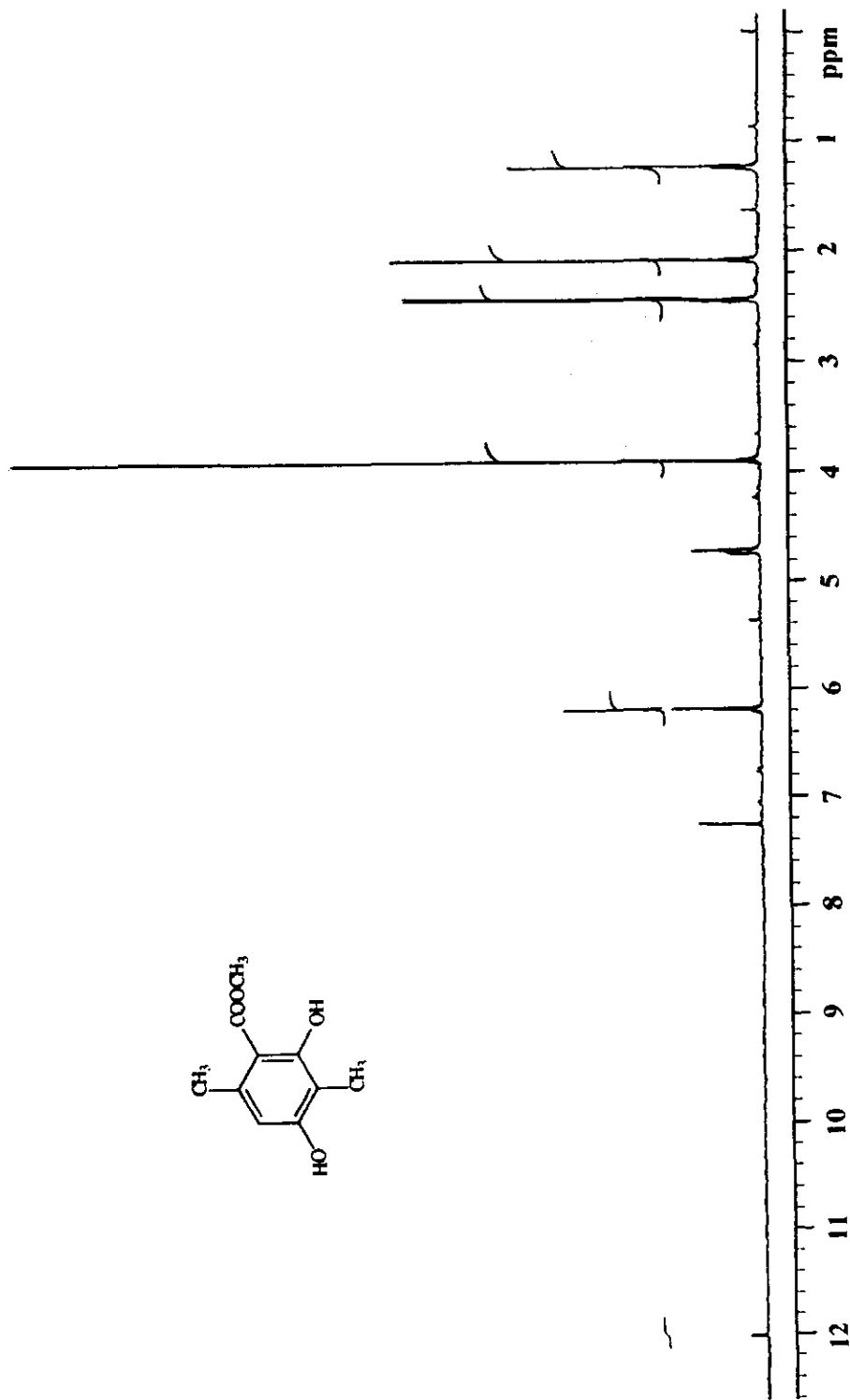
Espectro 1. Espectro en el IR del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).



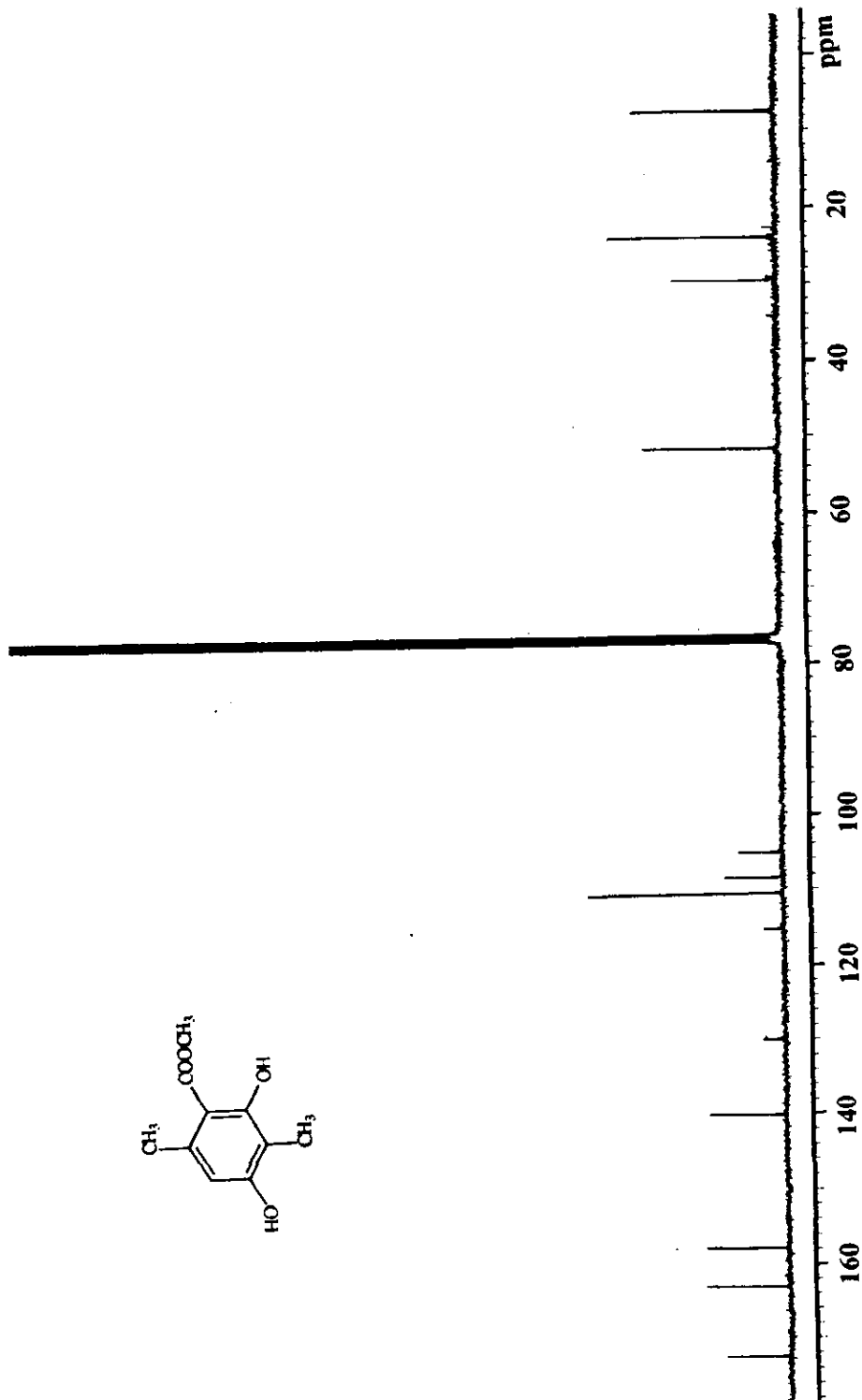
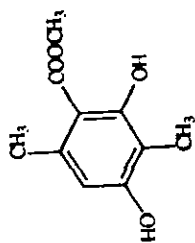
**Espectro 2.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).



Espectro 3. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).

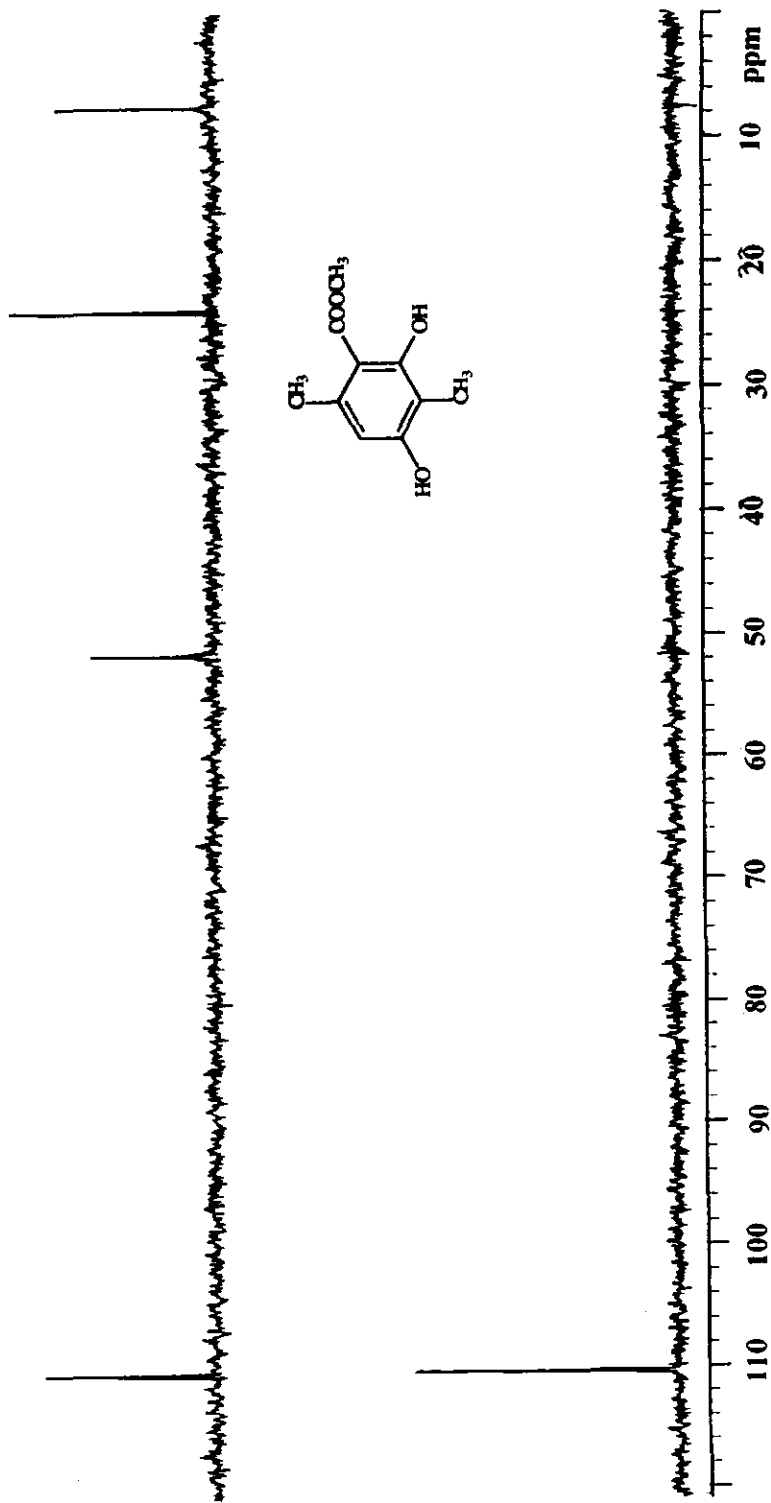


**Espectro 4.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67) en presencia de agua deuterada



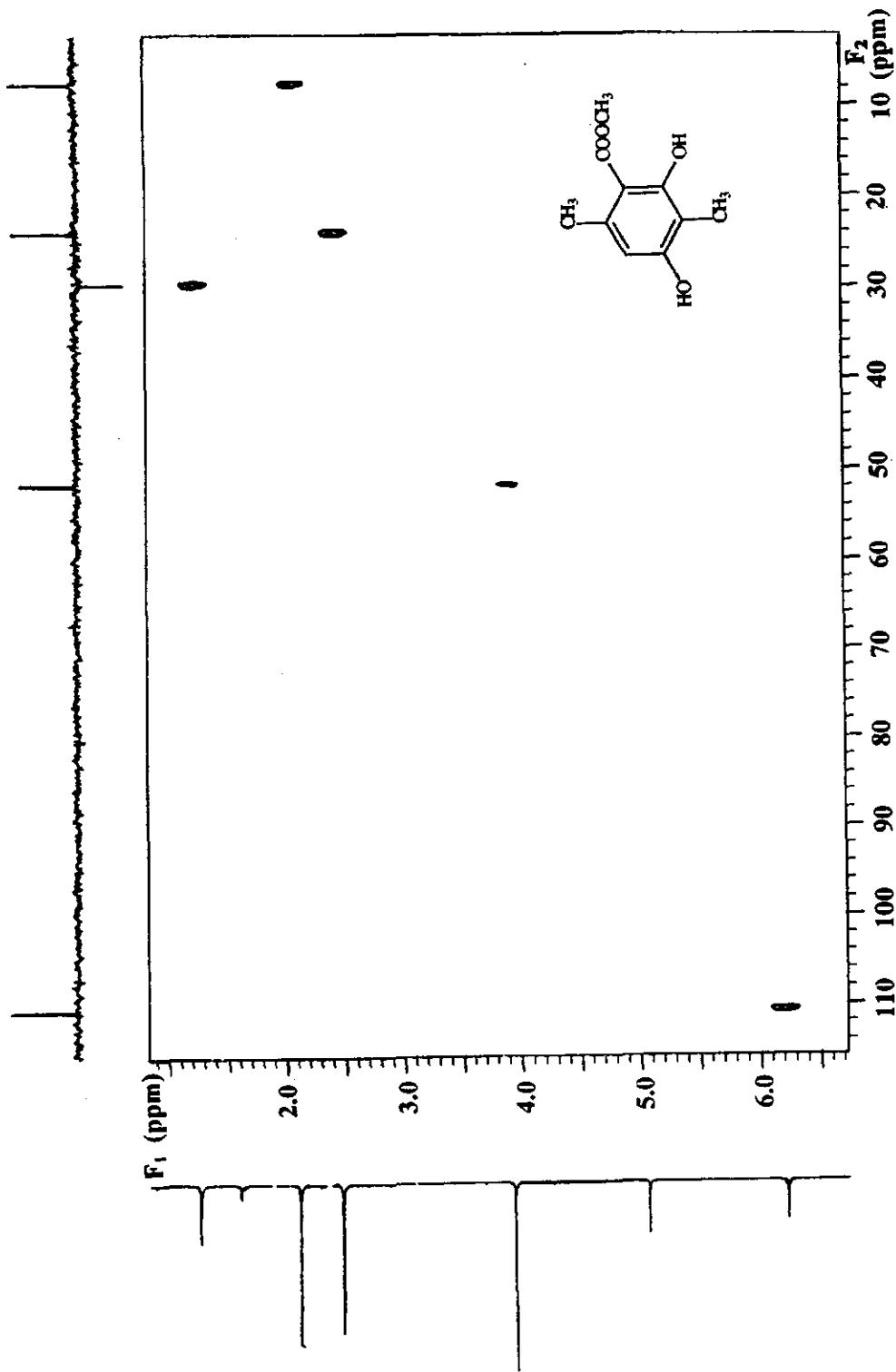
Espectro 5. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

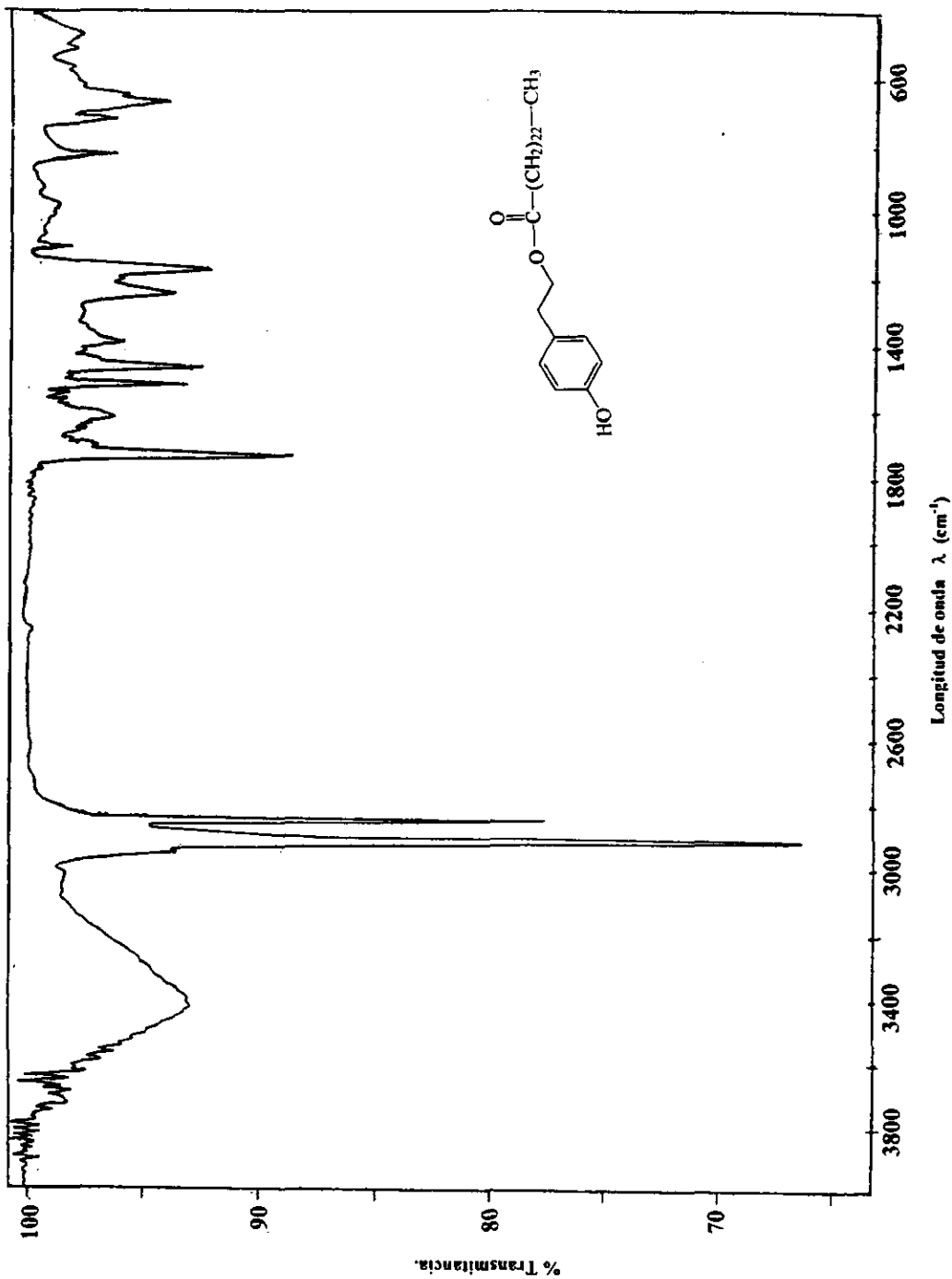


Espectro 6. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).

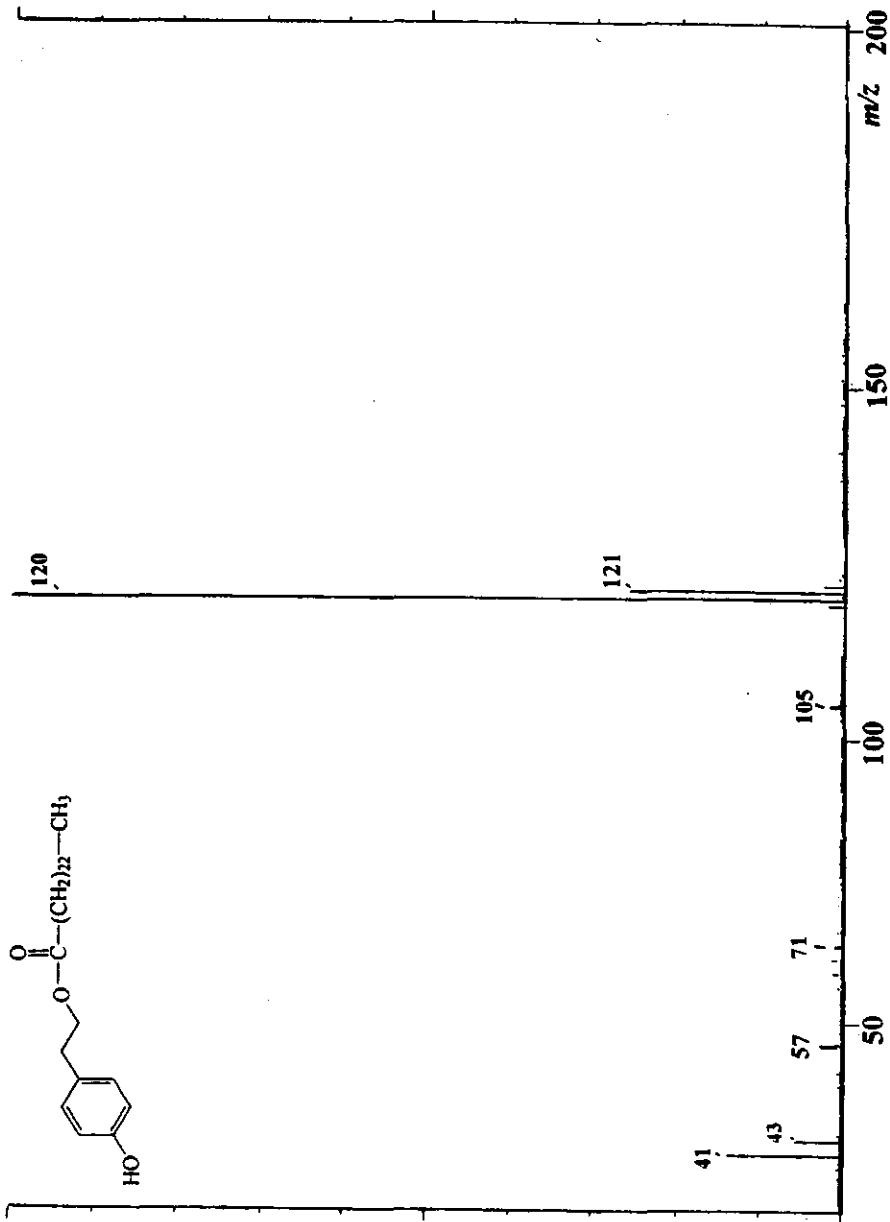




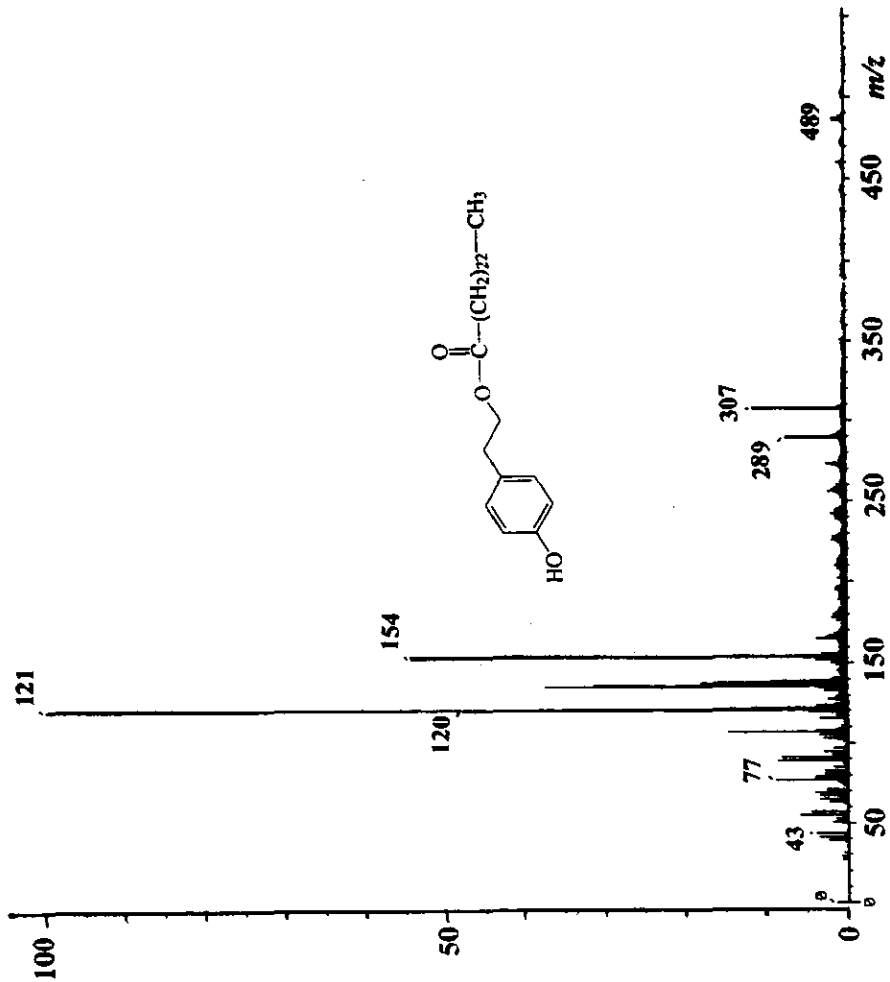
Espectro 7. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  modalidad HETCOR del éster metílico del ácido 4,6-dihidroxi-2,5-dimetil benzoico (67).



Espectro 8. Espectro en el IR del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).

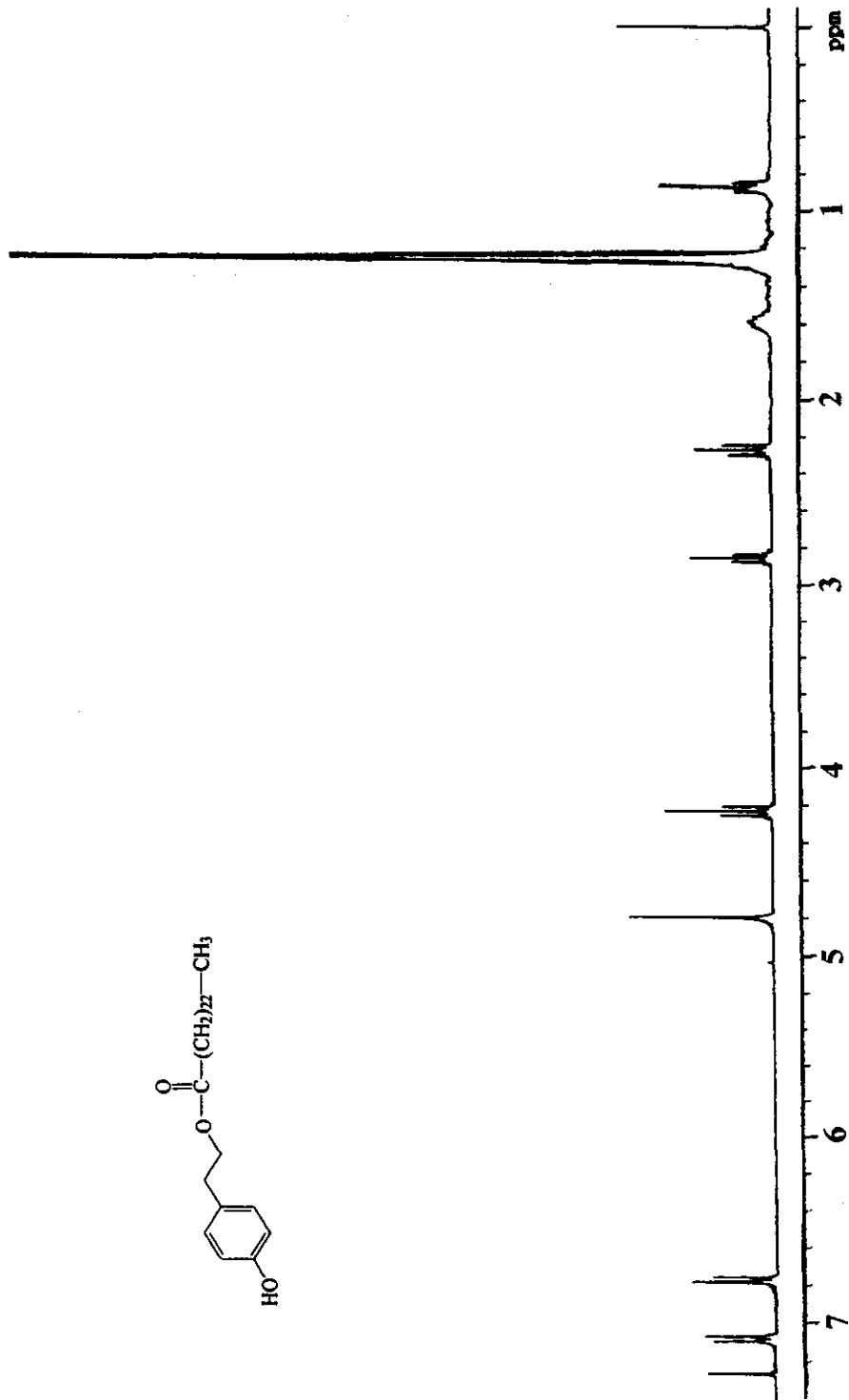
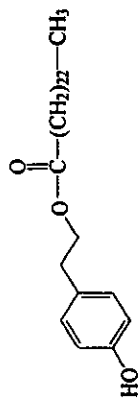


**Espectro 9.** Espectro de masas modalidad IE del tetracosanoato de 2' [4-hidroxi-fenil] etilo (75).

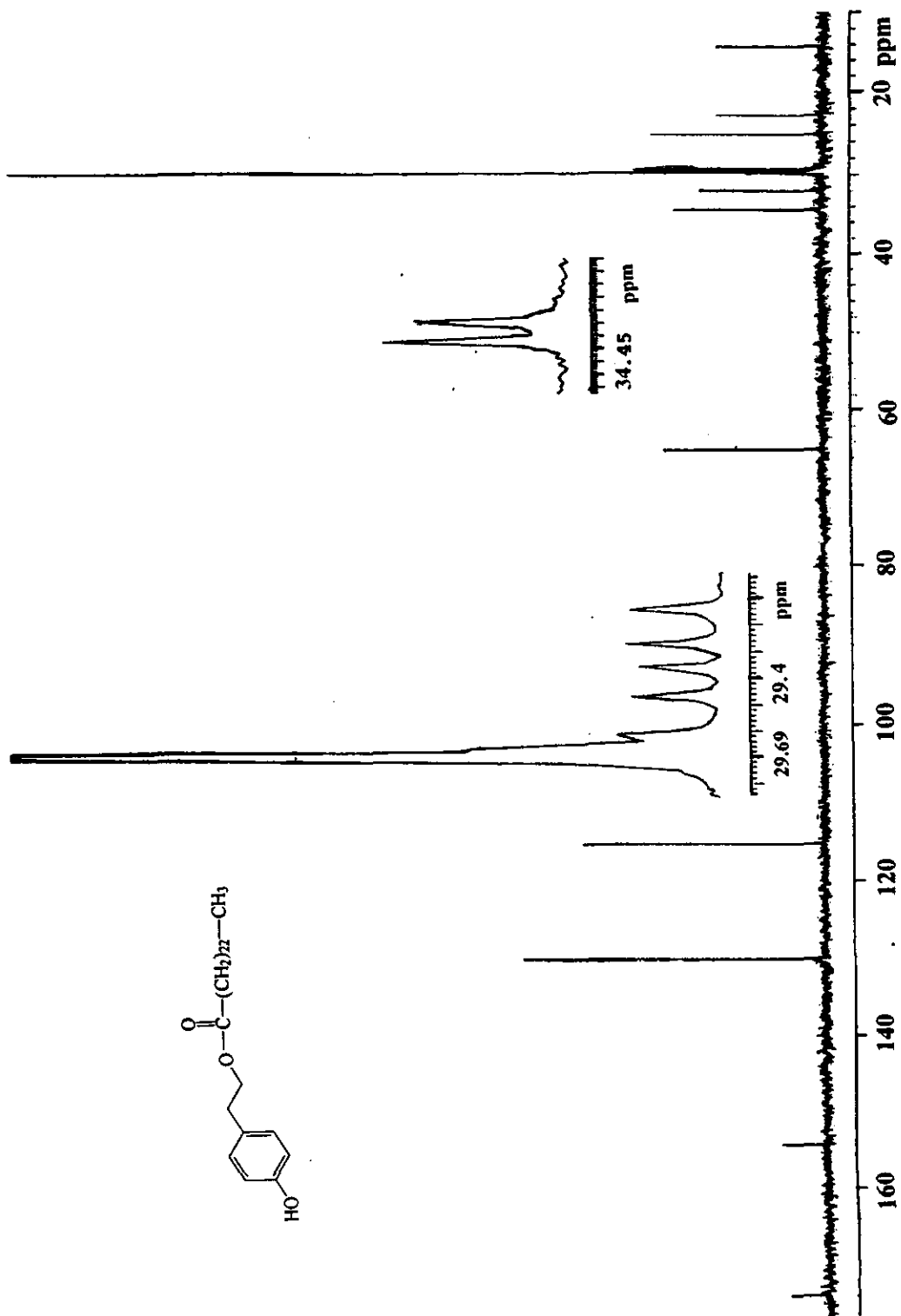
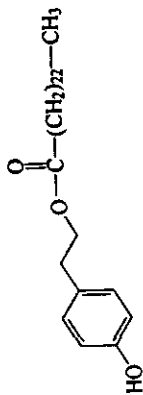


Espectro 10. Espectro de masas modalidad FAB<sup>+</sup> del tetracosanoato de 2-[4-hidroxi-fenil] etilo (75).

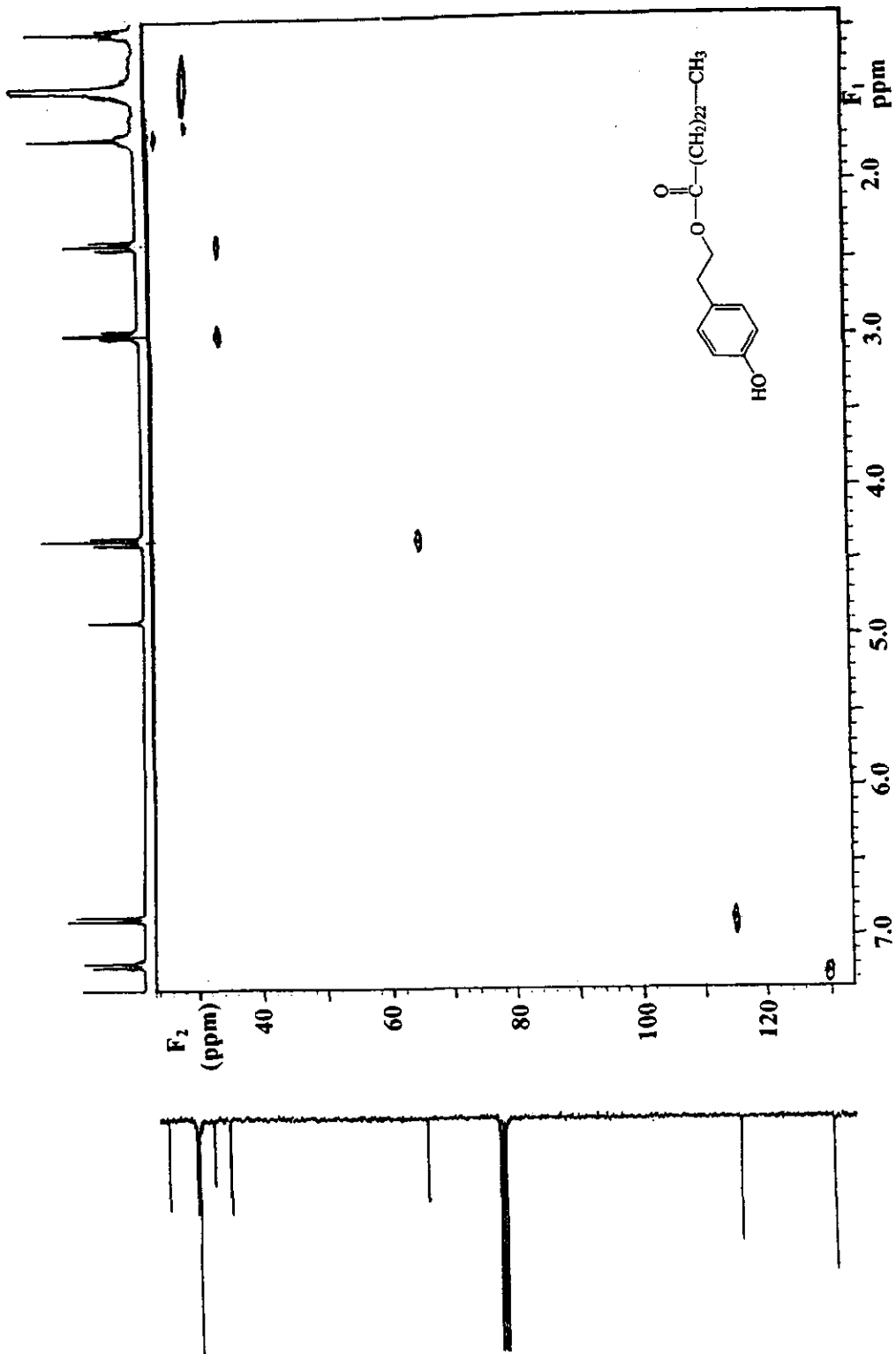




**Espectro 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75). En presencia de agua deuterada.

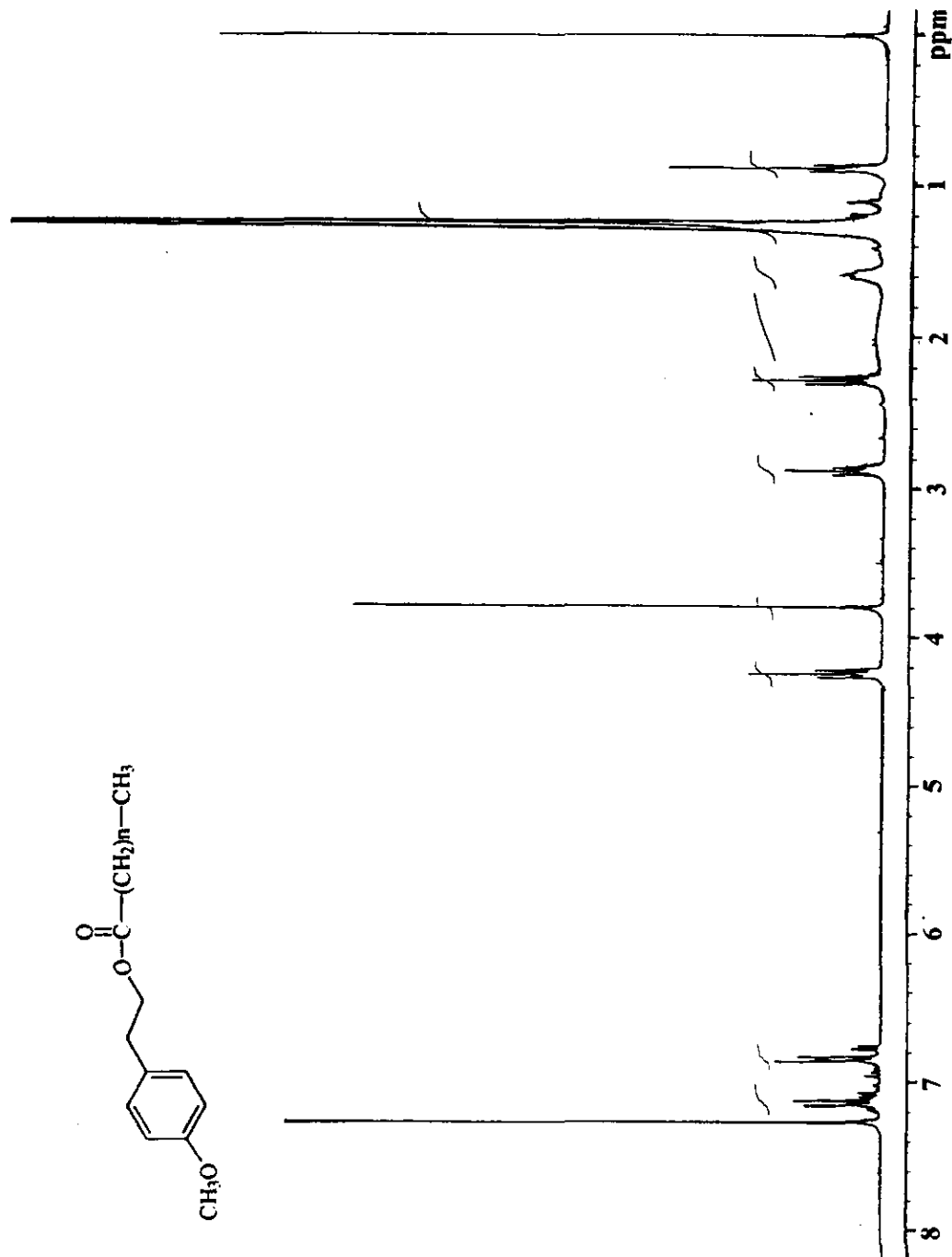
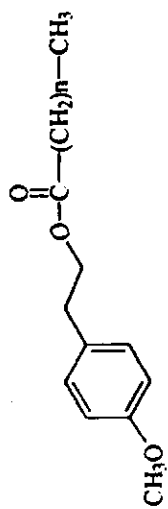


Espectro 13. Espectro RMN-<sup>13</sup>C del tetraacetato de 2-[4-hidroxi-fenil] etilo (75).

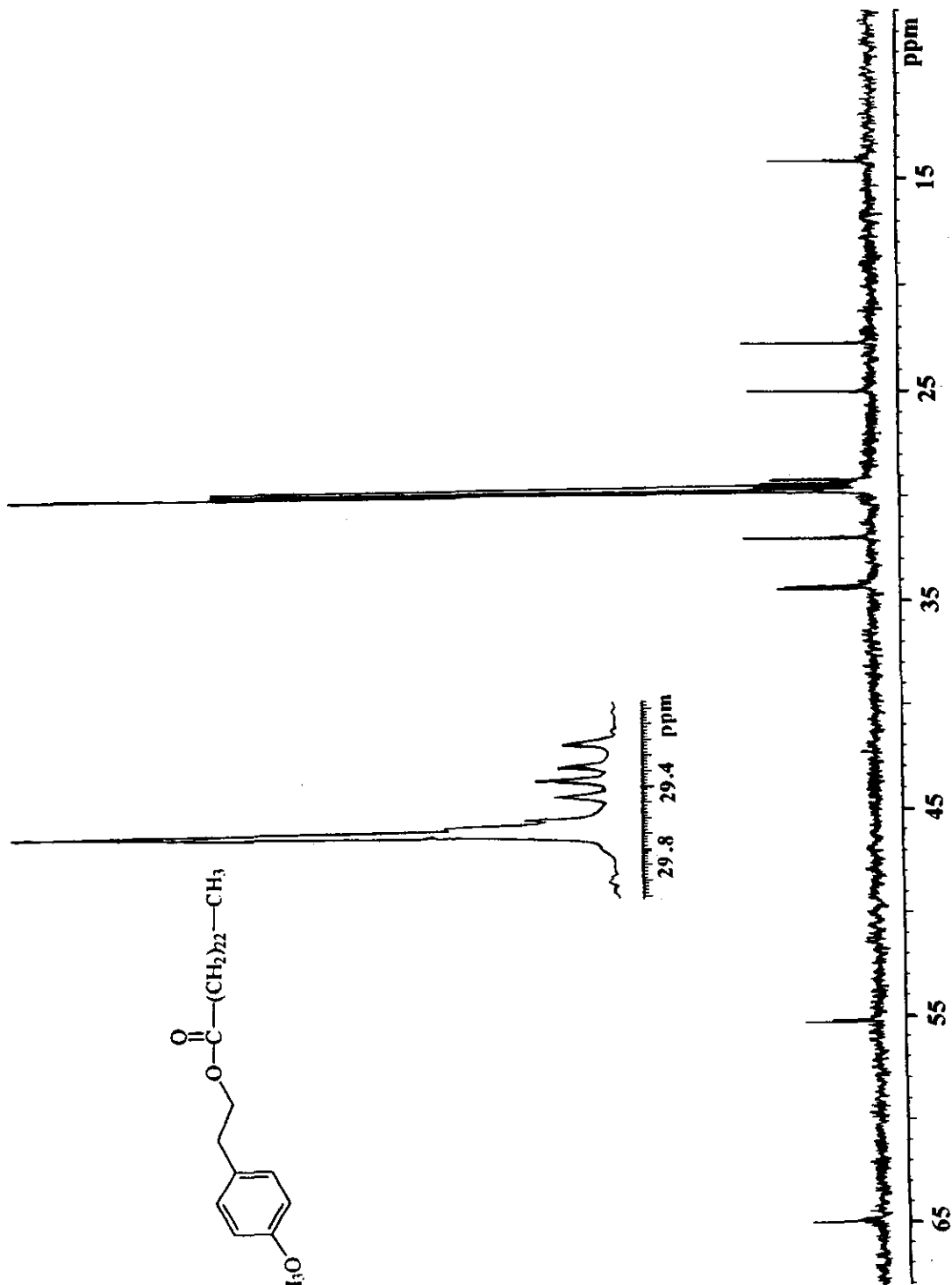
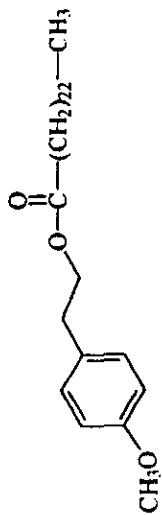


Espectro 14. Espectro de RMN modalidad HETCOR del tetracosanoato de 2'[4-hidroxi-fenil] etilo (75).

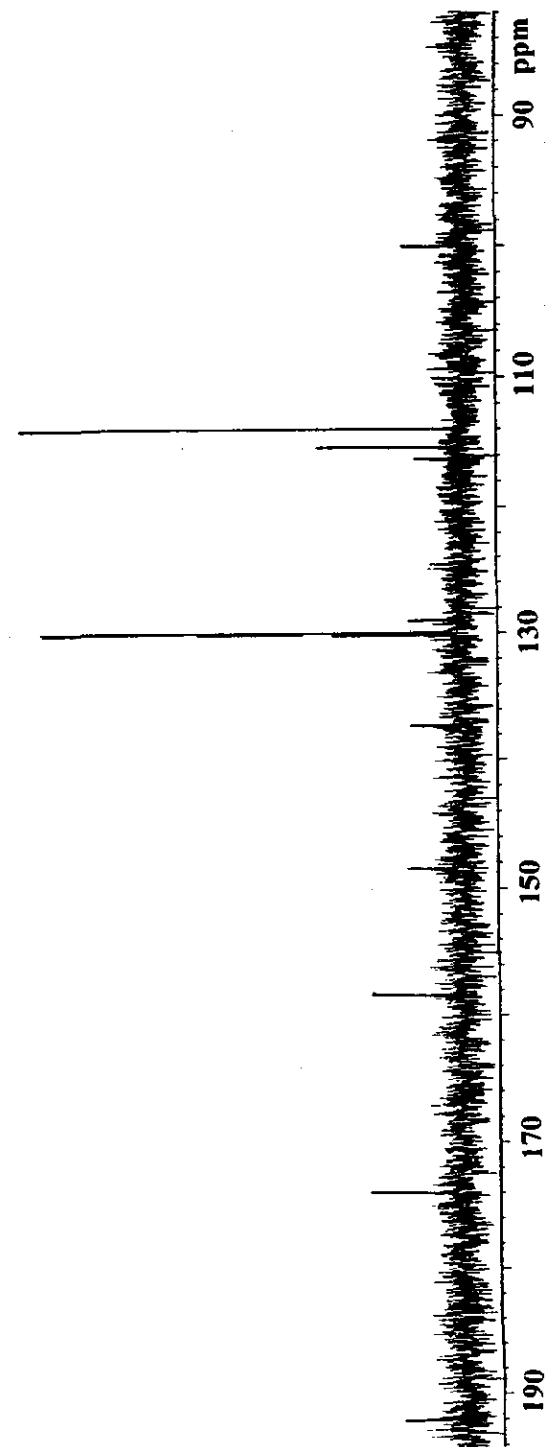
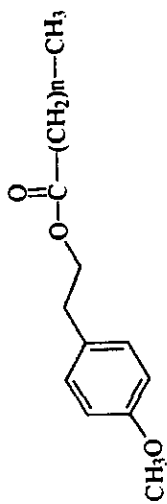




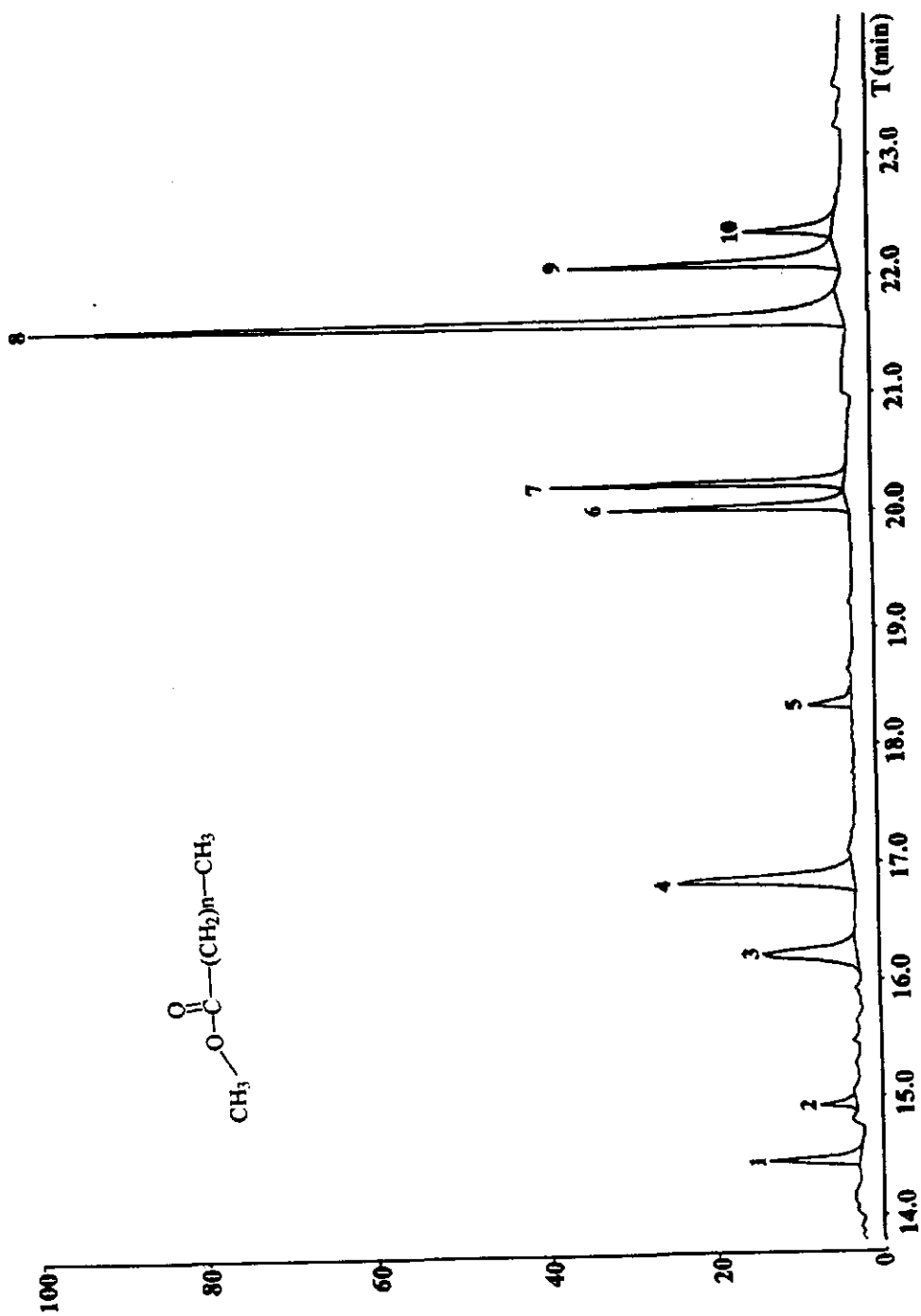
Espectro 15. . . Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la mezcla F017 metilada (F019).



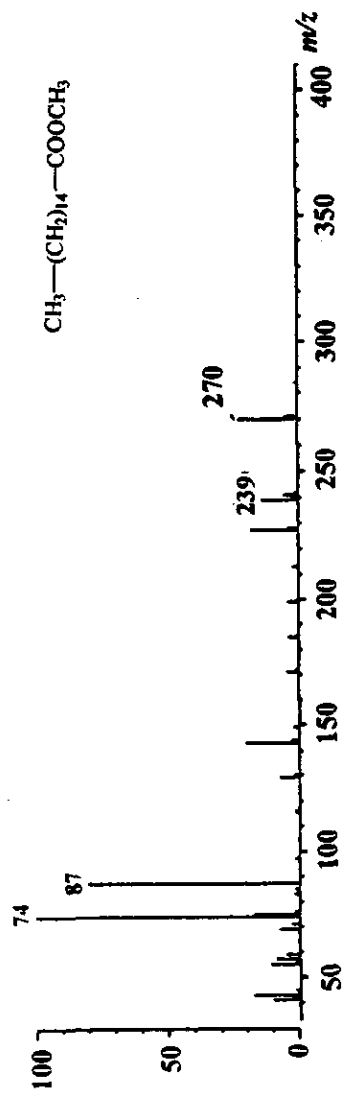
Espectro 16 Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la mezcla F019.



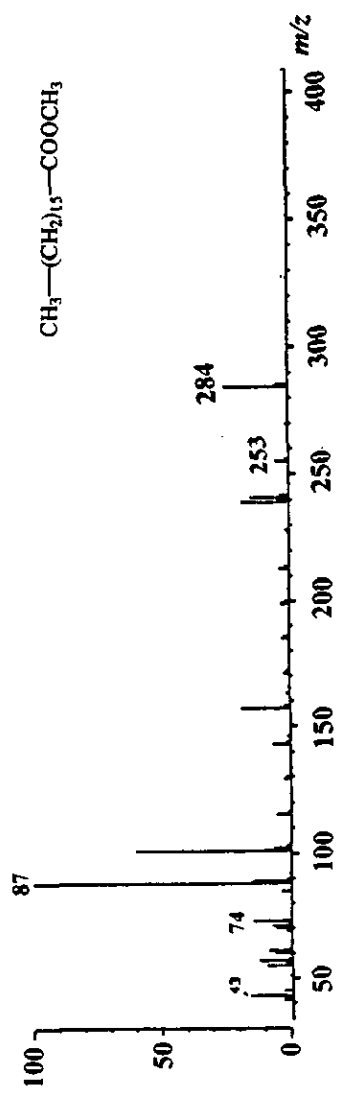
Espectro 17. . Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  de la mezcla F019 (continuación).



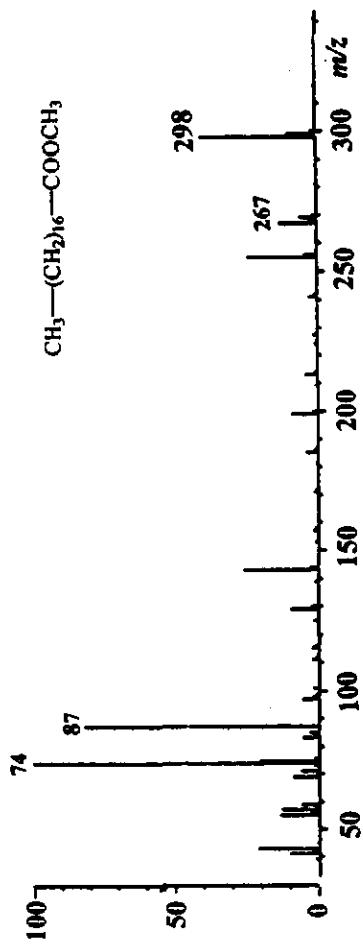
Espectro 18. Cromatograma de gases de la mezcla F020-A.



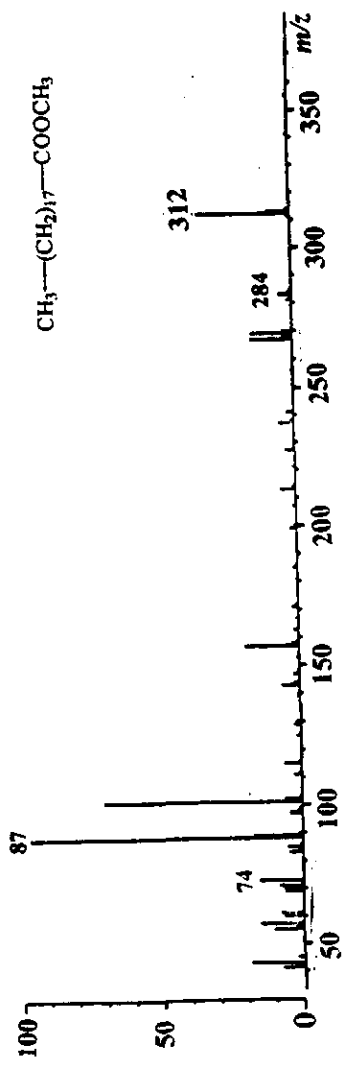
**Espectro 19.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido palmítico (68 a).



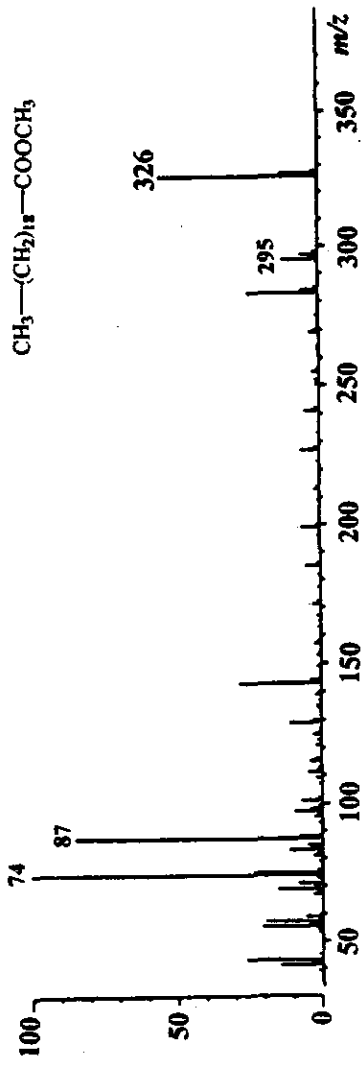
**Espectro 20.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido heptadecanoico (69 a).



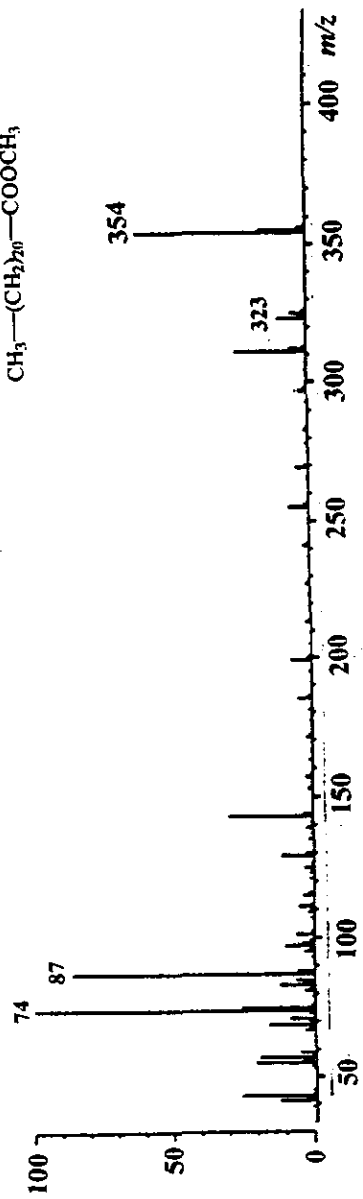
**Espectro 21.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido estearico (70 a).



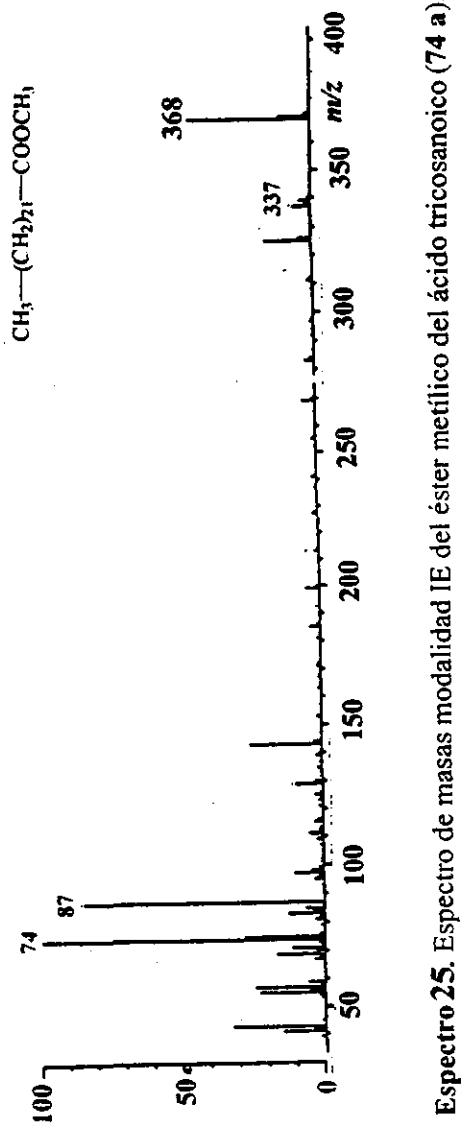
**Espectro 22.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido nonadecanoico (71 a).



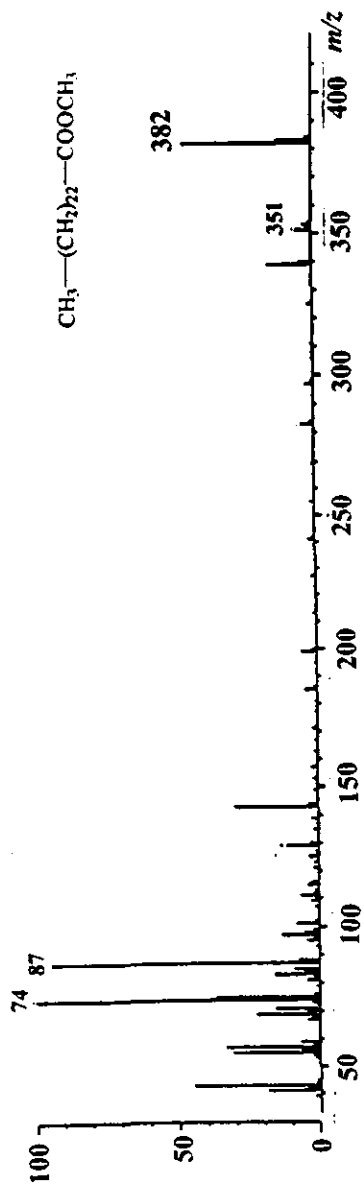
Espectro 23. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido araquidónico (72 a).



Espectro 24. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido behénico (73 a).

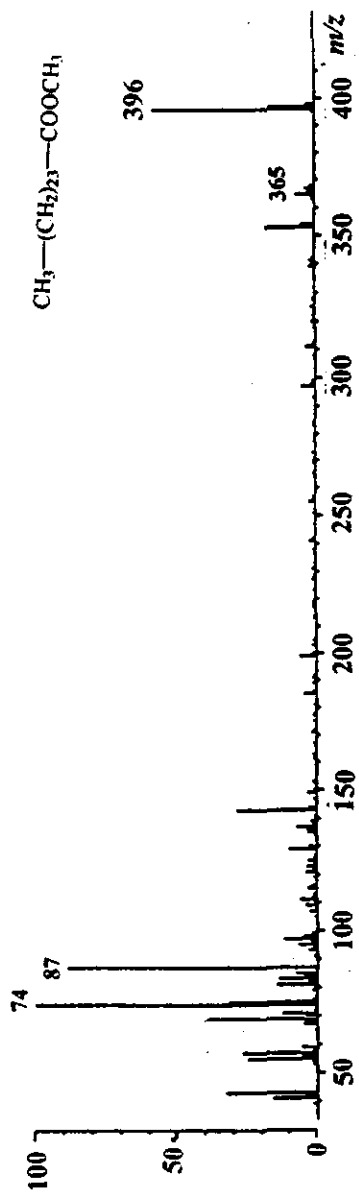


**Espectro 25.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido tricosanoico (74 a).

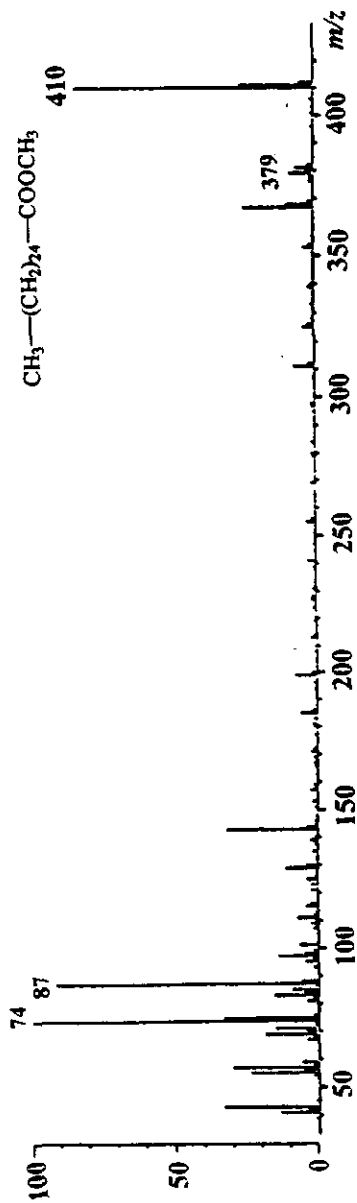


**Espectro 26.** Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido lignocérico (75 a).





Espectro 27. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido hienico (76 a).



Espectro 28. Espectro de masas modalidad IE del éster metílico del ácido cerótico (77 a).