

74



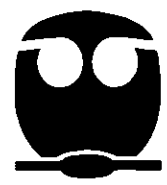
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE QUÍMICA

CONSTITUYENTES BIOACTIVOS ADICIONALES DE AMPHYPTERYNGIUM ADSTRINGENS SHIEDE EX SCHLECHT (JULIANIACEAE)

T E S I S QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA PRESENTA ILIANA MORALES BARRIENTOS

286745

MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUÍMICA

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Yolanda Caballero Arroyo
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	M. en C. Martha Lydia Macías Rubalcava
1er. Suplente	M. en C. Laura Alicia Acevedo Arteaga
2o. Suplente	Q.F.B. Ernestina Hernández García

### Sitio de realización de la tesis:

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

### Asesor:

  
Rachel Mata de Essayag  
Dra. Rachel Mata de Essayag

### Supervisor técnico:

  
Rivero Cruz José Fausto  
M. en C. José Fausto Rivero Cruz

### Sustentante:

  
Iliana Morales B.  
Iliana Morales Barrientos

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres Leticia y Arturo por todo su amor y apoyo para crecer en todos los sentidos.*

*A mis hermanos Leticia, Gabriela, Katia y Arturo con cariño. En especial a Lety por ser mi otra mamá.*

*A Nina <sup>t</sup> por mis primeras letras.*

*A mi tía Yoli por tenerme siempre presente.*

*A Pedro por apoyarme y quererme como a otra hija.*

*A mis amigos Claudia, Blanca, Ma. Elena, Lupita, Eduardo, David y Bart por todo su tiempo.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de ser parte de ella.*

## INDICE

	Página
Lista de Cuadros.....	iii
Lista de Figuras .....	v
Lista de Espectros .....	vi
Lista de Abreviaturas .....	vii
Agradecimientos .....	ix
<b>I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1 Aspectos taxonómicos de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	4
2.2 Etnobotánica y antropología de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	7
2.3 Aspectos Químicos y Farmacológicos.....	8
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>15</b>
3.1 Material vegetal .....	15
3.2 Procedimientos generales .....	15
3.2.1 Análisis cromatográficos .....	15
3.2.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.....	17
3.3 Estudio químico de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	17
3.3.1 Preparación del extracto orgánico.....	17
3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de la corteza de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	18

## INDICE (continuación...)

	Página
3.3.2.1 Identificación del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3).....	20
3.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F003.....	20
3.3.3.1 Separación del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) de la mezcla F017 .....	21
3.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F004.....	21
3.3.5 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F004-IV.....	22
3.3.5.1 Aislamiento del ácido masticadienónico (2), de la fracción F004-IV-II.....	23
3.3.6 Preparación de derivados químicos.....	23
3.3.6.1 Obtención de los derivados acetilados del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) y del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).....	23
3.3.6.2 Obtención de derivados metilados del ácido masticadienónico (2), del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) y del ácido 3 $\alpha$ -acetilmasticadienónico (3 a).....	24
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
4.1 Selección de la especie <i>Amphypteryngium adstringens</i> como un candidato idóneo para la obtención de principios activos.....	25
4.2 Aislamiento de los ácidos masticadienónico (2), 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3), y 1,8- dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) a partir del extracto activo de <i>Amphypteryngium</i> <i>adstringens</i> .....	25

## INDICE (continuación...)

	Página
4.3 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados químicos.....	27
4.3.1 Caracterización del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).....	27
4.3.2 Caracterización del ácido masticadienónico (2) y del ácido 3 $\alpha$ - hidroximasticadienónico (3).....	41
<b>V. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>43</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>44</b>
<b>APÉNDICE (Espectros)</b> .....	<b>46</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1	Terpenoides de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	9
2	Compuesto esteroidales aislados de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	10
3	Ácidos anacárdicos de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	11
4	Aldehidos anacárdicos aislados en <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	12
5	Biflavonoides aislados de <i>Amphyteryngium amplifolium</i> .....	13
6	Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.....	15
7	Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina..	16

INDICE (continuación...)

	Página
4.3 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados químicos.....	27
4.3.1 Caracterización del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	27
4.3.2 Caracterización del ácido masticadienónico ( <b>2</b> ) y del ácido 3 $\alpha$ - hidroximasticadienónico ( <b>3</b> ).....	41
<b>V. RESUMEN Y CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>VI. PERSPECTIVAS</b> .....	44
<b>APÉNDICE (Espectros)</b> .....	46

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1	Terpenoides de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	9
2	Compuesto esteroidales aislados de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	10
3	Ácidos anacárdicos de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	11
4	Aldehídos anacárdicos aislados en <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	12
5	Biflavonoides aislados de <i>Amphyteryngium amplifolium</i> .....	13
6	Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.....	15
7	Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina..	16



## LISTA DE CUADROS (continuación...)

Cuadro	Contenido	Pág.
8	Procedimiento de extracción de la especie <i>Amphyteryngium adstringens</i> ..	17
9	Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía abierta del extracto crudo de la corteza de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	19
10	Resumen de los sólidos obtenidos por cristalización espontánea durante el fraccionamiento primario del extracto activo de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	19
11	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción activa F003 de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	20
12	Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción activa F004 de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	22
13	Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria F004-IV de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	22
14	Metabolitos aislados de <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	27
15	Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).....	28
16	Datos de RMN del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) .....	31
17	Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) .....	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	<i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	5
2	Distribución del género <i>Amphyteryngium</i> en la República Mexicana.....	6
3	Proceso de extracción de la especie <i>Amphyteryngium adstringens</i> .....	20
4	Cromatograma de gases de la mezcla <b>F017</b> .....	26
5	Espectro en el IR del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	29
6	Espectro de masas modalidad IE del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	30
7	Espectro en el UV del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	30
8	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	34
9	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	34
10	Espectro de RMN modalidad COSY del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	36
11	Región aromática del espectro COSY a larga distancia del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	37
12	Región aromática del espectro de RMN modalidad HMQC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	38
13	Vista parcial del espectro HMBC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ) ...	39
14	Propuesta de biogénesis para el ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico ( <b>21</b> ).....	42

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro	Contenido	Pág.
1	Espectro en el IR del ácido masticadienónico (2).....	49
2	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido masticadienónico (2).....	50
3	Espectro en el IR del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3).....	51
4	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3).....	52
5	Espectro en el IR del masticadienoato de metilo (2 a).....	53
6	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del masticadienoato de metilo (2 a).....	54
7	Espectro en el IR del ácido 3 $\alpha$ -acetilmasticadienónico (3 a).....	55
8	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 3 $\alpha$ -acetilmasticadienónico (3 a).....	56
9	Espectro en el IR del 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoato de metilo (3 b).....	57
10	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoato de metilo (3 b).....	58
11	Espectro en el IR del 3 $\alpha$ -acetilmasticadienoato de metilo (3 c).....	59
12	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 3 $\alpha$ -acetilmasticadienoato de metilo (3 c).....	60
13	Espectro de RMN modalidad HMQC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).....	61
14	Espectro de RMN modalidad COSY a larga distancia del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).....	62
15	Espectro en el IR del ácido 1,8-diacetil-3-dodecil-2-naftoico (21 a).....	63
16	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido 1,8-diacetil-3-dodecil-2-naftoico (21 a).....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etilo
cm	centímetro
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
<i>J</i>	constante de acoplamiento
COSY	correlated spectroscopy
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
$\delta$	desplazamiento químico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
DEPT	distortionless enhancement polarization transfer
d	doblete
dd	doble de doble
eV	electron volts
°C	grados centígrados
g	gramo
HETCOR	heteronuclear correlation
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence
Hz	hertz
Hex	hexano
h	hora
IR	Infrarrojo
Int. Rel	intensidad relativa
M <sup>+</sup>	ión molecular
Kg	kilogramo
L	litro

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación...)

$\lambda$	longitud de onda
$v_{\text{máx}}$	frecuencia máxima
MHz	megahertz
MeOH	metanol
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{L}$	microlitros
mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
m	multiplete
nm	nanómetro
NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
ppm	partes por millón
%	por ciento
p.f.	punto de fusión
$m/z$	relación masa-carga
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
sa	singulete ancho
snm	sobre el nivel del mar
TMS	tetrametilsilano
t	triplete
ta	triplete ancho
UV	ultravioleta

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de ésta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin America", (NIH GRANT 5U01TW\*\*00316/03) y 27978N del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

A la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química por el respaldo económico como ayudante de profesor B otorgado a través del Sub-programa 127.

Al Dr. Raúl Enriquez, investigador del Instituto de Química, por permitirme iniciar en su laboratorio el trabajo experimental de ésta tesis, durante los momentos críticos que vivió la Universidad Nacional en 1999.

A los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo, cuyos comentarios mejoraron la versión final de ésta tesis.

A las Q.F.B. Graciela Chávez y Marisela Gutiérrez, por el registro de los espectros de IR; a la Q. Georgina Duarte, por el registro de los espectros de masas; y a los Q.F.B. Rosa Isela Del Villar y Oscar Yáñez, por el registro de los espectros de RMN, todos ellos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Rachel Mata por su dirección y apoyo en la elaboración de este trabajo y por ser un ejemplo para mi superación académica.

Al M. en C. Fausto Rivero Cruz por la supervisión, apoyo y amistad brindados.

A la Dra. Perta Castañeda por su apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 124: Lupita, Isabel, Blanca, Martha, Ma.Elena, Susana, Ma.Carmen, Laura, Norma, Emma, Tere, Olga, Sandra, Janet y Samuel por la convivencia, los consejos y la amistad. Gracias

## I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El presente trabajo de tesis se originó en el marco del proyecto de investigación "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American", el cual está incluido dentro de un programa de carácter internacional denominado "International Cooperative Biodiversity Group Program" (ICBG). Este programa cuenta con el patrocinio de 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).

El programa ICBG (Suffness, *et al.*, 1995) tiene los siguientes objetivos:

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 el estudio de los recursos naturales regionales.
4. Establecer nuevas industrias de tipo farmoquímico en los países en vías de desarrollo que participan en el programa.
5. Descubrir nuevos fármacos de origen natural para tratar enfermedades que ocasionan problemas en vastos sectores de la población mundial.
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.

El proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American" se realiza en Estados Unidos de América del Norte, Argentina, Chile y México.

Las instituciones norteamericanas a las que pertenece el proyecto científico, antes señalado son: la Universidad de Arizona, donde reside el investigador principal del proyecto, BASF Corporation, Wyeth-Ayerst Laboratories y GWL Hansen's Disease Center. En Argentina participa la Universidad Nacional de la Patagonia y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA; en Chile la Universidad Católica y finalmente en México, la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Química y el Instituto de Biología, son las responsables de colaborar con el proyecto.

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

- a. Preparación de extractos vegetales en pequeña escala de las especies seleccionadas, principalmente a partir del criterio etnomédico. Los extractos resultantes se envían a los laboratorios participantes en los Estados Unidos para determinar su actividad biológica. Las pruebas biológicas se realizan en los laboratorios de las compañías BASF Corporation, Wyeth-Ayerst Laboratories, así como en los laboratorios de investigación de GWL Hansen's Disease Center.
- b. Preparación de los extractos en gran escala de aquellas especies que resultasen activas en las evaluaciones preliminares.
- c. Fraccionamiento en forma biodirigida de los extractos activos.
- d. Aislar y purificar los compuestos activos responsables de las actividades biológicas, detectadas.
- e. Caracterizar las estructuras moleculares de los componentes activos.

Evidentemente las actividades que se realizan en la Facultad de Química, están referidas en el objetivo número cinco del programa ICBG, cuya meta primordial es el descubrimiento de nuevos fármacos potenciales, a partir de algunas especies medicinales de las zonas áridas de la República Mexicana.



El convenio realizado con la Universidad de Arizona establece un apartado de confidencialidad con relación a los resultados de las pruebas biológicas, estos resultados no pueden ser difundidos sin el registro de patentes que justifiquen los descubrimientos que se derivan de la investigación, en consecuencia, y respetando ésta cláusula, en este trabajo de tesis no se reportará ningún tipo de resultado biológico.

En el marco del proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American", la planta medicinal *Amphypteryngium adstringens* Schiede ex Schlecht (Julianiaceae) fue seleccionada como una fuente de principios activos de interés terapéutico. Por consiguiente, el objetivo primordial del presente trabajo es el aislamiento y la caracterización de algunos de los principios activos responsables de la actividad biológica determinada en las evaluaciones preliminares, a partir del extracto íntegro de la corteza de *A. adstringens*. Para el cumplimiento de este objetivo, se formularon los siguientes objetivos particulares:

- i. Preparar el extracto íntegro a gran escala de la corteza de *Amphypteryngium adstringens*, mediante un proceso de maceración.
- ii. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total, utilizando la técnica de cromatografía en columna abierta.
- iii. Separar los principios de interés, de al menos dos de las fracciones activas mediante la aplicación de técnicas cromatográficas convencionales.
- iv. Caracterizar los compuestos activos mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos.

## II. ANTECEDENTES

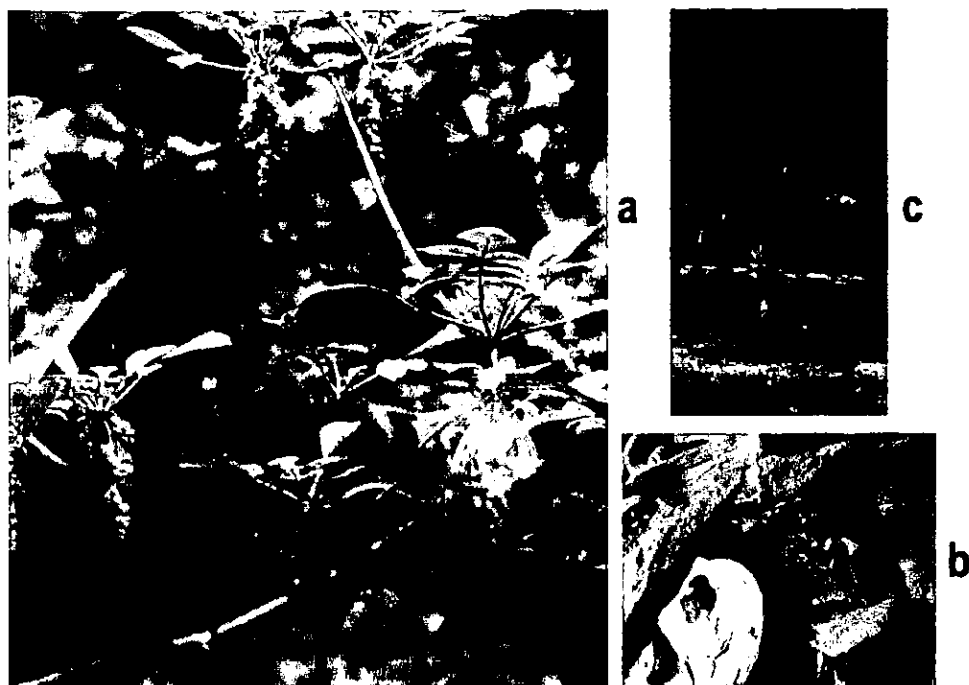
### 2.1 Aspectos taxonómicos de *Amphyteryngium adstringens*.

*Amphyteryngium adstringens* Shiede ex Schlecht (Sin: *Juliania adstringens* Schlecht), es una planta de la pequeña familia Julianiaceae cuyas especies se caracterizan por ser árboles resinosos (Navarrete, 1986). Esta familia se distribuye principalmente en México y se extiende a Centroamérica y extremo norte de Sudamérica (Rzedowski, 1978).

*Amphyteryngium adstringens* (Figura 1) es de origen desconocido aunque según algunos autores es endémica de México. Esta especie habita en clima cálido, semicálido y templado desde los 100 a los 3000m snm. Crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, de matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino. En México se distribuye en los estados de Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Nayarit y Jalisco (Figura 2). La especie se conoce popularmente como cuachalalate, cuachalalá, volador y matixerán; entre otros (Lara, 1996; Estrada, 1987).

En el Atlas de las Plantas Medicinales de la Medicina Tradicional Mexicana I, se hace una descripción detallada de la especie (Argueta, 1994).

Árbol de 10 m de altura, con el tronco torcido de corteza moreno grisáceo o gris plumizo con grandes escamas. Las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas en número de tres a cinco, en el anverso son verde ópaco y en el reverso verde grisáceo. Las flores pueden encontrarse solitarias o en ramilletes. Los frutos son nueces abultadas y alargadas que están en ramas de color verde pálido.



- a. Acercamiento de las hojas
- b. Corteza del árbol
- c. Árbol entero

Figura 1. *Amphyteryngium adstringens*.



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

## 2.2 Etnobotánica y antropología de *Amphyteryngium adstringens*.

En varios estados de la República, se menciona el empleo del cuachalalate, principalmente del cocimiento, para tratar úlceras, lesiones cutáneas, la tifoidea, dolor de muelas, fuegos de la boca, estomatitis, cáncer de estómago, gastritis, dolor de estómago y otros trastornos gastrointestinales. Para curar las úlceras también se remoja la corteza hasta que el agua tome color para administrarla como agua de uso. Para el tratamiento de las heridas se bebe su cocimiento o se pone en polvo sobre ellas, o se macera en agua y con ésta se lavan. Los granos se curan mediante la ingestión del cocimiento o la aplicación de la goma blanca o la resina de la corteza, al igual que en llagas. Las rozaduras de bebés se lavan una vez diariamente por cinco días. Asimismo, la corteza se utiliza en golpes o postemas, mordeduras o piquetes de animales venenosos y como cicatrizante. Este mismo cocimiento de la corteza se toma o se pone en fomentos sobre los tumores o "cáncer"; se utiliza para lavados vaginales cuando se presentan infecciones en la vagina, flujo, fiebre puerperal, frío, inflamación, infección o caída de la matriz y de ovarios. Si hay granos en los genitales, con la cocción de conteloloache, árnica y sal, se hacen lavados las veces que sean necesarias (Argueta, 1994).

La corteza de la planta también se usa para el cachán o cachanes, enfermedad que según las parteras tradicionales contraen las mujeres puérperas como consecuencia de que les "entra frío" al interior del cuerpo, afecciones respiratorias, tos, inflamación de anginas, resfriados, tuberculosis y enfermedades pulmonares. Para esto último, se hierva la cáscara, sólo a que pinte el agua, se endulza y se toma cuatro veces diarias, el tiempo que sea necesario o se bebe como agua de uso. De igual forma se emplea para curar la tos, aunque para ésta también se puede preparar un jarabe con la corteza, una tripita de cuatecomate, árnica, alcohol, miel de abeja y bagazo de caña, administrando una cucharada cada hora.

Para enfermedades del riñón, incluyendo dolor e inflamación, se ingiere tres veces al día la decocción de la corteza, preparada junto con un tallo de tres costillas. También se emplea en problemas relacionados con la sangre y su circulación, para purificarla o desintoxicarla, curar várices y úlceras varicosas. Se usa como analgésico para dolor de cintura, cabeza, espalda o pulmones, hernia, reuma o punzadas. Otras aplicaciones medicinales de que se tiene noticia son: fiebres intermitentes, paludismo, calentura, caída del cabello, manchas en la piel, gangrena y como antidiabético.

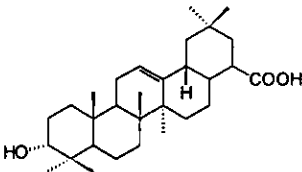
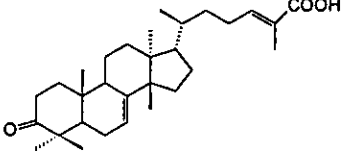
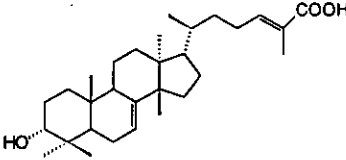
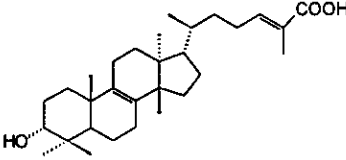
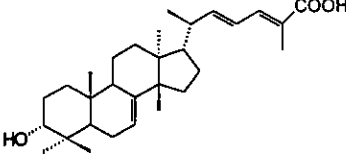
En el siglo XVI, Francisco Hernández comenta: "la corteza es fría y secante, resuelve los tumores, machacada y aplicada". Más información aparece hasta el siglo XX en la obra de Maximino Martínez donde se registra como: anticancerosa, antipalúdica, astringente y para la fiebre tifoidea; y posteriormente, la Sociedad Farmacéutica de México, la registra como astringente (Argueta, 1994).

### 2.3 Aspectos Químicos y Farmacológicos.

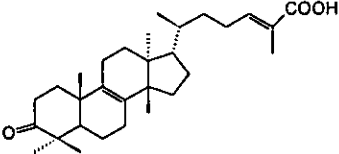
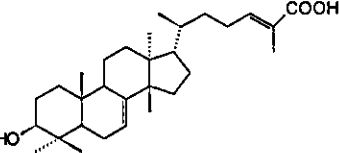
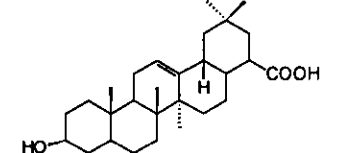
Desde el punto de vista químico, la corteza de *A. adstringens*, ha sido objeto de diferentes estudios. Así en 1962 González *et al.* reportaron la presencia de la sarsapogenina en el extracto metanólico de la corteza (González, Mckenna y Delgado, 1962). Posteriormente, otras investigaciones sobre la corteza de esta planta condujeron al aislamiento y caracterización de varios triterpenoides de tipo tirucalano, numerosos ácidos anacárdicos, algunos aldehídos anacárdicos y dos compuestos esteroidales. Los terpenoides aislados incluyen a los ácidos epioleanólico (1), masticadienónico (2), 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3), instipolinácico (4), cuachalácico (5), isomasticadienónico (6), 3-epihidroximasticadienónico (7) y oleanólico (8) y sus estructuras se incluyen en el Cuadro 1. Los compuestos esteroidales fueron caracterizados como la sarsapogenina (9) y el  $\beta$ -sitosterol (10) [Cuadro 2]. Los ácidos anacárdicos se identificaron como los ácidos: 6-pentadecilsalicílico (11), 6-hexadecilsalicílico (12), 6-heptadecilsalicílico (13), 6-nonadecilsalicílico (14), 6-[15'(Z)-nonadecenil]salicílico (15) y sus estructuras se presentan en el Cuadro 3. Por último, los aldehídos anacárdicos aislados se identificaron como: el 6-octadecilsalicilaldehído (16), 6-eicosilsalicilaldehído (17), 5-docosilsalicilaldehído (18) y sus estructuras se incluyen en el Cuadro 4. (Dominguez, 1981; Watson, 1987; Navarrete *et al.*, 1988; Mata, 1991; Argueta, 1994).

Otra especie del género *Amphyteryngium* que ha sido estudiada es *A. amplifolium* y los constituyentes descritos fueron los biflavonoides amentoflavona (19) y agatisflavona (20); las estructuras correspondientes se presentan en el Cuadro 5 (Wannan *et al.*, 1988).

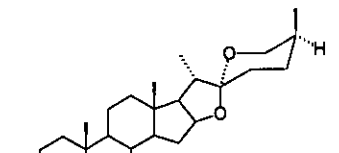
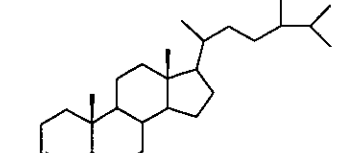
**Cuadro 1.** Terpenoides de *Amphyteryngium adstringens*

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(1)</p>	ácido epioleanólico	Seo <i>et al.</i> , 1986
 <p>(2)</p>	ácido masticadienónico	Navarrete, 1982
 <p>(3)</p>	ácido 3 $\alpha$ -hidroximastica-dienónico	Navarrete, 1982
 <p>(4)</p>	ácido instipolinácico	Dominguez <i>et al.</i> , 1981
 <p>(5)</p>	ácido cuachalálico	Watson <i>et al.</i> , 1987

Cuadro 1. Terpenoides de *Amphyterygium adstringens* (Continuación).

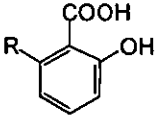
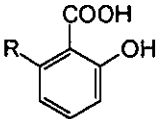
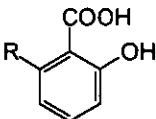
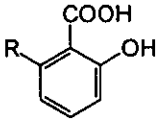
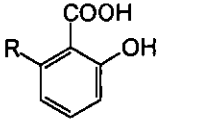
Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(6)</p>	ácido isomasticadienónico	Navarrete, 1982
 <p>(7)</p>	ácido 3-epihidroximasticadienónico	Navarrete, 1982
 <p>(8)</p>	ácido oleanólico	Seo <i>et al.</i> , 1986

Cuadro 2. Compuestos esteroidales aislados de *Amphyterygium adstringens*

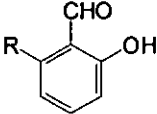
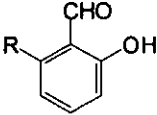
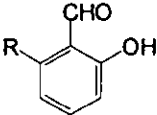
Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>(9)</p>	sarsapogenina	González <i>et al.</i> , 1962
 <p>(10)</p>	β-sitosterol	Navarrete, 1982



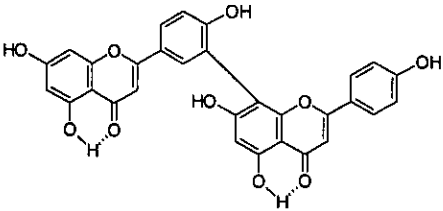
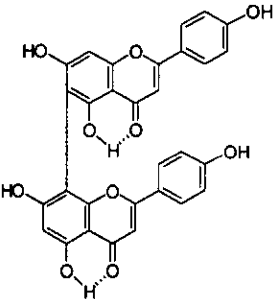
Cuadro 3. Ácidos anacárdicos de *Amphypteryngium adstringens*.

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub> (11)</p>	ácido 6-pentadecilsalicílico	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>CH<sub>3</sub> (12)</p>	ácido 6-hexadecilsalicílico	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>3</sub> (13)</p>	ácido 6-heptadecilsalicílico	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>18</sub>CH<sub>3</sub> (14)</p>	ácido 6-nonadecilsalicílico	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R=-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- CH<sub>3</sub> (Z) (15)</p>	ácido 6-[15'(Z)-nonadecenil]salicílico	Mata <i>et al.</i> , 1991

**Cuadro 4.** Aldehídos anacárdicos aislados de *Amphyteryngium adstringens*.

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p>R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>CH<sub>3</sub> <b>(16)</b></p>	6-octadecilsalicilaldehído	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>19</sub>CH<sub>3</sub> <b>(17)</b></p>	6-eicosilsalicilaldehído	Mata <i>et al.</i> , 1991
 <p>R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>21</sub>CH<sub>3</sub> <b>(18)</b></p>	5-docosilsalicilaldehído	Mata <i>et al.</i> , 1991

Cuadro 5. Biflavonoides aislados de *Amphypteryngium amplifolium*.

Estructura	Compuesto	Referencia
 <p style="text-align: center;">(19)</p>	amentoflavona	Wannan <i>et al.</i> , 1988
 <p style="text-align: center;">(20)</p>	agatisflavona	Wannan <i>et al.</i> , 1988

A la fecha se han descrito varios estudios farmacológicos sobre extractos y compuestos de *A. adstringens*. En 1962, González *et al.* descubrieron las propiedades antitumorales del extracto metanólico en ratones con adenocarcinoma mamario (González, McKenna y Delgado, 1962).

Una investigación farmacológica en ratas mantenidas en ayuno por 24 horas demostró que la administración subcutánea del extracto hexánico de la corteza, en una dosis de 100 mg/kg, indujo un efecto hipocolesterolemia significativo, disminuyendo los niveles de colesterol en un 31% (Mata *et al.*, 1991).

La administración oral de la corteza de Cuachalalate, redujo el porcentaje de mortalidad y de perforación del duodeno en ratas Wistar, a las que se les indujo úlcera duodenal experimentalmente, con dos dosis de indometacina (5 mg/Kg) y cinco dosis de diclorhidrato de histamina (40 mg/Kg). En los estómagos de los animales tratados con los extractos no se observaron úlceras gástricas, en cambio en los animales del grupo control, las lesiones del duodeno fueron mayores y se presentaron también úlceras gástricas. Estos resultados permitieron sugerir que el efecto antiulceroso no es debido a un efecto antihistaminérgico sino más bien a un efecto de tipo local (Navarrete *et al.*, 1990).

Más recientemente se comprobó que el extracto metanólico de la corteza provoca un efecto antiulcerogástrico dependiente de la dosis en ratas. En este caso la úlcera gástrica se indujo por la administración intragástrica de etanol. El fraccionamiento biodirigido del extracto activo permitió concluir que una fracción rica en triterpenoides es la responsable de la actividad biológica del extracto. El efecto antiulcérico de esa fracción fue mayor que la del subsalicilato de bismuto, utilizado como control positivo (Navarrete *et al.*, 1998).

Por último en 1999, se demostró que el ácido  $3\alpha$ -hidroximasticadienónico posee una actividad antiinflamatoria significativa. A una dosis de 10 mg/Kg, provocó una inhibición del 93% del edema inducido por carragenina en ratas Wistar (Olivera *et al.*, 1999).

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal.

La corteza exterior de *Amphyteryngium adstringens* Shiede ex Schlecht se adquirió en el puesto número 81 de la Central de Abastos, en la ciudad de Oaxaca, Oaxaca; el día 21 de marzo de 1998. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional MEXU, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (Voucher, R. Bye 22564). La identificación de la especie la realizó el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y se fragmentó en 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 de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck) utilizando varios sistemas de elución y sulfato cérico como agente cromógeno. En el caso de los análisis a nivel preparativo se utilizaron placas de vidrio recubiertas con el mismo adsorbente y con un espesor de 1 mm (sílica gel 60 GF<sub>254</sub> Merck). El reactivo revelador y los sistemas de elución empleados se resumen en los Cuadros 6 y 7, respectivamente. Para la técnica de cromatografía en columna abierta se utilizó gel de sílice ( sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230) como adsorbente.

**Cuadro 6.** Agente cromógeno utilizado para los análisis cromatográficos en capa fina.

Reactivo	Composición	Referencia
Sulfato cérico*	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	Lowery <i>et al.</i> ; 1993

\*Antes de efectuar el revelado, 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 minutos a 110 °C.

**Cuadro 7.** Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Sistema de eluyentes	Composición	Proporción
1	hexano	100 %
2	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diversas
3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100 %
4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	diversas
5	metanol	100 %
6	AcOEt	100 %
7	AcOEt-MeOH	diversas

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  $\mu$ l 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 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.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp. , Waters Chromatography División Milford, MA, USA) equipado con un detector de UV con arreglo de diodos (996) o un detector UV dual. 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 del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**) se efectuó empleando una columna de gel de sílice fase reversa (prep. Nova-Pak ® HR C<sub>18</sub> 60 Å, 6  $\mu$ m). La detección se ajustó entre 200 y 300 nm para el detector de arreglo de diodos (PDA) y a 211 nm para el detector dual.

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

Los puntos de fusión se midieron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, FT 1605 en pastilla de KBr o película.

Los espectros de masas generados por la técnica de impacto electrónico se determinaron en un aparato JEOL 5X 102 A, mediante introducción directa a 70 eV.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de Carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un aparato Varian Unity INOVA, el cual se operó a una frecuencia de 300 ó 75 MHz. Los espectros HMBC y HMQC se generaron en un aparato Bruker DMX500 operado a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) y 125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). 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 realizaron secuencias de pulsos estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY).

Los análisis arriba indicados se efectuaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, (USAI).

### 3.3 Estudio químico de *Amphypteryngium adstringens*.

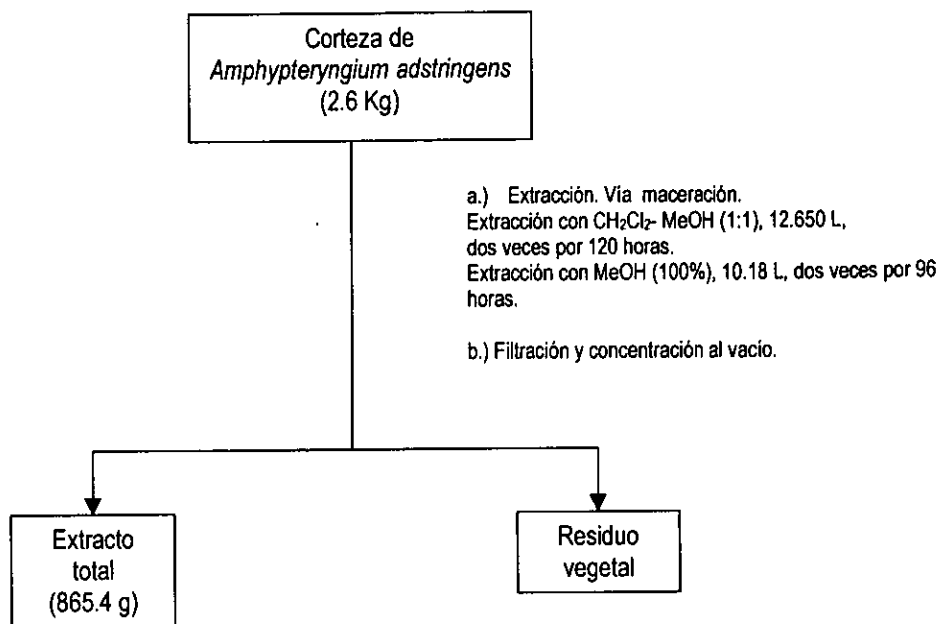
#### 3.3.1 Preparación del extracto orgánico.

El material vegetal seco y molido (2.6Kg), se extrajo cuatro veces mediante un proceso de maceración. En el Cuadro 8 se resumen las condiciones de extracción.

**Cuadro 8.** Procedimiento de extracción de la especie *Amphypteryngium adstringens*.

Tiempo (h)	Eluyentes	Proporción	Volumen (L)
72	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	1:1	6.650
48	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH	1:1	6.000
48	metanol	---	5.900
48	metanol	---	4.280

Al finalizar el tiempo de extracción, el extracto resultante se filtró y se concentró al vacío obteniéndose 865.4 g de extracto seco. En la **Figura 3** se resume el procedimiento que se utilizó



**Figura 3.** Proceso de extracción de la especie *Amphyteryngium adstringens*.

### 3.3.2 Fraccionamiento preliminar del extracto total de la corteza de *Amphyteryngium adstringens*.

El extracto total (865.4 g) se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 600 g de gel de sílice como adsorbente. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, mezclas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>- MeOH, MeOH y por último con una mezcla de MeOH-acetona.



Se recolectaron un total de 86 fracciones de 1 L cada una, las cuales se analizaron mediante cromatografía en capa fina, reuniéndose todas aquellas que cromatográficamente resultaron similares. Este proceso nos permitió obtener un total de 11 fracciones primarias, este proceso se resume en el **Cuadro 9**.

**Cuadro 9.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía abierta del extracto crudo de la corteza de *Amphipteryngium adstringens*.

Fracciones	Proporción (%)	Eluyente(s)	Fracciones Combinadas	Clave	Peso (g)
1-8	100	hexano	1-18	F001	0.513
9-18	90:10	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	----	----	----
19-24	80:20	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	19-25	F002	0.732
25-33	70:30	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	26-31	F003*	7.804
34-42	60:40	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	32-41	F004*	69.85
43-50	50:50	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	42-51	F005*	79.785
51-56	30:70	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	52-54	F006*	7.502
57-62	100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	55-64	F007*	2.681
63-68	90:10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	65-72	F008	147.76
69-72	70:30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	----	----	----
73-76	50:50	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - MeOH	73-76	F009	90.375
77-81	100	MeOH	77-81	F010	49.573
82-86	80:20	MeOH-acetona	82-86	F011	6.8260

\*Fracciones activas

De las fracciones primarias F004, F006, F007 y F008 precipitaron espontáneamente varios sólidos los cuales se describen en el **Cuadro 10**.

**Cuadro 10.** Resumen de los sólidos obtenidos por cristalización espontánea durante el fraccionamiento primario del extracto activo de *Amphipteryngium adstringens*.

Fracción primaria	Clave	Peso (g)	Punto de fusión (°C)	Características
F004	F013*	0.445	64-70	Sólido blanco
F006	F014	0.961	114-156	Sólido amarillo
F007	F015	6.614	144-150	Sólido blanco cristalino
F008	F016	14.178	142-145	Sólido blanco opalescente

\*sólido inactivo aún no identificado

### 3.3.2.1 Identificación del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3).

Los compuestos F014, F015 y F016 resultaron ser iguales y fueron identificados como el ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con aquellas de una muestra auténtica (Navarrete, 1986).

### 3.3.3 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F003.

La fracción primaria activa F003, se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 360 g de gel de sílice como adsorbente. Como eluyentes se emplearon hexano, Hex-AcOEt (diversas proporciones), AcOEt, AcOEt- MeOH (diversas proporciones). Se obtuvieron 161 fracciones de 125 mL, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa delgada y se reunieron aquellas que resultaron cromatográficamente similares. El proceso anterior generó un total de ocho fracciones secundarias. En el Cuadro 11 se resume este fraccionamiento secundario.

**Cuadro 11.** Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción activa F003 de *Amphyteryngium adstringens*.

Fracciones	Proporción (%)	Eluyente(s)	Fracciones Combinadas	Clave	Peso (g)
1-12	100	hexano	1-29	F003-I	0.0546
13-20	99:1	Hex- AcOEt	----	----	----
21-60	98:2	Hex- AcOEt	30-42	F003-II*	1.7316
61-76	97:3	Hex- AcOEt	43-71	F003-III	1.3176
77-95	95:5	Hex- AcOEt	71-82	F003-IV	0.1859
96-102	93:7	Hex- AcOEt	83-105	F003-V	0.0794
103-112	90:10	Hex- AcOEt	106-137	F003-VI	1.4081
113-120	85:15	Hex- AcOEt	----	----	----
121-128	80:20	Hex- AcOEt	----	----	----
129-138	70:30	Hex- AcOEt	----	----	----
139-148	60:40	Hex- AcOEt	138-160	F003-VII	0.5732
149-155	40:60	Hex- AcOEt	----	----	----
156-160	100	AcOEt	----	----	----
161	100	MeOH	161	F003-VIII	0.3444

\*Fracción activa

De la fracción F003-II, se obtuvo un precipitado con aspecto oleoso. La cantidad total obtenida de este producto fue de 0.0177 g y se denominó **F017**.

### **3.3.3.1 Separación del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) de la mezcla F017.**

Los análisis cromatográficos del sólido F017 por CLAR y CG-EM permitieron demostrar que este sólido era una mezcla de varios componentes. Para la separación del compuesto mayoritario por CLAR se utilizaron las siguientes condiciones: Flujo de 0.35 y 8.2 mL/seg y como fase móvil una mezcla ternaria constituida por MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O, (50:45:5). La longitud de onda utilizada para la detección de los compuestos fue de 229 nm. Las inyecciones se realizaron a una concentración de 5.0 mg/100 µl.

La aplicación de este procedimiento permitió la separación de 3.0 mg del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**), con un punto de fusión de 62-64 °C y un tiempo de retención de 25.0 minutos.

### **3.3.4 Fraccionamiento secundario de la fracción activa F004.**

La fracción primaria F004, se sometió a un fraccionamiento secundario empleando cromatografía en columna abierta utilizando 101.5 g de gel de sílice como adsorbente, y hexano, Hex-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diversas proporciones), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>- MeOH (diversas proporciones) como eluyentes. Se obtuvieron 104 fracciones de 500 mL, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa delgada y se reunieron aquellas que presentaron similitud cromatográfica. Este proceso generó un total de seis fracciones secundarias (**Cuadro 12**).

**Cuadro 12.** Resumen del fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción activa F004 de *Amphypteryngium adstringens*.

Fracciones	Proporción (%)	Eluyente(s)	Fracciones Combinadas	Clave	Peso (g)
1-10	100	hexano	1-26	F004-I	0.110
11-16	90:10	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	----	----	----
17-22	80:20	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	----	----	----
23-28	70:30	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	27-34	F004-II	0.315
29-68	60:40	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35-52	F004-III*	1.212
69-84	50:50	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	53-101	F004-IV*	23.675
85-101	30:70	Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	----	----	----
102-103	100	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	102	F004-V	0.560
104	70:30	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	103-104	F004-VI	3.737

\*Fracciones activas

### 3.3.5 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria F004- IV.

La fracción secundaria F004-IV, se sometió a un fraccionamiento terciario, empleando de nueva cuenta una cromatografía en columna abierta. Para ello se utilizaron 175 g de gel de sílice y hexano, mezclas Hex-AcOEt y AcOEt, como disolventes de elución. Se obtuvieron 59 fracciones de 75 mL. El análisis cromatográfico en capa delgada de las mismas condujo a su agrupamiento en cinco fracciones terciarias (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Resumen del fraccionamiento terciario vía cromatografía en columna abierta de la fracción F004- IV de *Amphypteryngium adstringens*.

Fracciones	Proporción (%)	Eluyente(s)	Fracciones Combinadas	Clave	Peso (g)
1-8	100	hexano	1-15	F004-IV-I	15.2322
9-36	95:5	Hex-AcOEt	16-27	F004-IV-II*	1.8493
37-43	90:10	Hex-AcOEt	28-45	F004-IV-III	1.9283
44-49	80:20	Hex-AcOEt	46-57	F004-IV-IV	1.9672
50-51	70:30	Hex-AcOEt	----	----	----
52-53	60:40	Hex-AcOEt	----	----	----
54-55	50:50	Hex-AcOEt	----	----	----
56-57	25:75	Hex-AcOEt	----	----	----
58	50:50	Hex-AcOEt	58-59	F004-IV-V	0.6766
59	100	AcOEt	----	----	----

\*Fracción activa

### 3.3.5.1 Aislamiento del ácido masticadienónico (2), de la fracción F004-IV-II.

Una porción de la fracción F004-IV-II (30 mg), se sometió a una cromatografía preparativa en capa delgada en gel de sílice, utilizando como eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Este proceso permitió la separación de 11 mg de un compuesto con un punto de fusión de 176-178 °C. Este producto, fue identificado como el ácido masticadienónico por comparación con una muestra auténtica (Rivero, 1994).

### 3.3.6 Preparación de derivados químicos.

#### 3.3.6.1 Obtención de los derivados acetilados del ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) y del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

El compuesto 3 (40 mg) se sometió a un proceso de acetilación. Para ello, se utilizaron 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante cinco días y al término de este tiempo el producto acetilado fue separado de manera convencional; obteniéndose 24.4 mg de un sólido cristalino de color blanco (3 a), que corresponde al derivado del ácido 3 $\alpha$  acetilmasticadienónico con un punto de fusión de 164-167 °C. El mismo procedimiento se llevó a cabo para acetilar el producto 21 (2 mg) generándose 1.4 mg de un residuo aceitoso que corresponde al derivado diacetilado del ácido 1,8-diacetil-3-dodecil-2-naftoico (21 a).

### 3.3.6.2 Obtención de derivados metilados de los ácidos masticadienónico (2), 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) y 3 $\alpha$ -acetilmasticadienónico(3 a).

Para obtener los derivados metilados de los ácidos **3** (45 mg), **2** (8.0 mg), y **3 a** (8.0 mg) se utilizó una solución etérea de diazometano, la cual se preparó a partir de una disolución 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. Por cada 100 mg del producto a metilar se utilizaron 20 mL de la disolución etérea de diazometano; el producto a metilar se disolvió en metanol o éter etílico y la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas.

Como resultado de ésta reacción se obtuvieron 6.2 mg de un sólido cristalino con un punto de fusión de 114-116 °C correspondiente al masticadienoato de metilo (**2 a**) y 33.7 mg del 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoato de metilo (**3 b**) y 3.4 mg del 3 $\alpha$ - acetilmasticadienoato de metilo (**3 c**).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### **4.1 Selección de la especie *Amphyteryngium adstringens* como un candidato idóneo para la obtención de principios activos.**

La preselección de la especie *Amphyteryngium adstringens* 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 (Miller y Gerau, 2000). Posteriormente, durante la realización de los ensayos biológicos preliminares, realizados por los laboratorios subcontratados por el proyecto "Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American", se estableció que ésta especie constituye una fuente de productos bioactivos de interés terapéutico. Como se indicó anteriormente, los acuerdos de confidencialidad establecidos con la Universidad de Arizona no permiten indicar las actividades biológicas encontradas en el presente trabajo.

Considerando los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas preliminares, se decidió realizar el estudio fitoquímico biodirigido de *A. adstringens* con la finalidad de comenzar el aislamiento de los principios activos. Como ensayo biológico de monitoreo se empleó el mismo que permitió detectar la actividad terapéutica a nivel de extracto total.

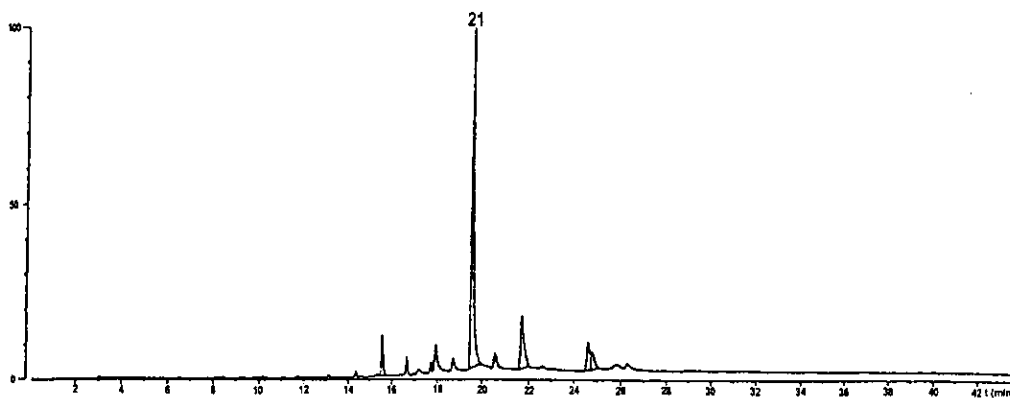
##### **4.2 Aislamiento del ácido masticadienónico (2), ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (3) y ácido 1,8 - dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21) a partir del extracto activo de *A. adstringens*.**

La preparación del extracto a gran escala se realizó mediante un proceso de maceración como se indicó en la parte experimental (inciso 3.3.1).

Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Este proceso generó 11 fracciones primarias. De estas, las fracciones F003-F007 demostraron actividad biológica.

Las fracciones primarias activas F003 y F004, de manera independiente, se sometieron a un fraccionamiento secundario por métodos cromatográficos para detectar la porción activa de las mismas. Los resultados de las evaluaciones biológicas indicaron que la fracción F004-IV era la parte activa, por lo que se sometió a un fraccionamiento terciario. En la fracción terciaria F004-IV-II se observó la presencia de un compuesto mayoritario, que fue separado mediante una cromatografía en capa fina preparativa. Este proceso condujo al aislamiento del ácido masticadienónico (**2**).

El fraccionamiento secundario de la fracción activa F003 conllevó a la obtención de una mezcla de productos que se designó con la clave F017. El análisis de esta mezcla por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (**Figura 4**), permitió comprobar que la mezcla contenía cinco compuestos, el mayoritario presentó un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 19.51 minutos y su ión molecular se observó en una relación  $m/z$  de 372. La aplicación de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), permitió el aislamiento de este producto en forma pura. El compuesto mayoritario se caracterizó como el ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**), el cual constituye un nuevo producto natural.



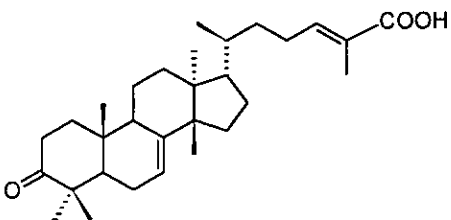
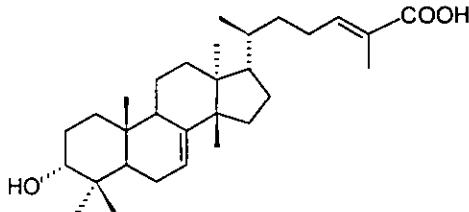
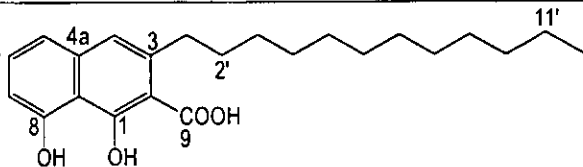
**Figura 4.** Cromatograma de gases de la mezcla F017



Durante el proceso de fraccionamiento primario, cristalizó un sólido (21.8 g) de las fracciones F006-F008, el cual fue identificado como el ácido 3 $\alpha$  - hidroximasticadienónico (3).

En el Cuadro 14 se indican las estructuras y los rendimientos de los compuestos identificados.

**Cuadro 14.** Metabolitos aislados de *Amphyteryngium adstringens*.

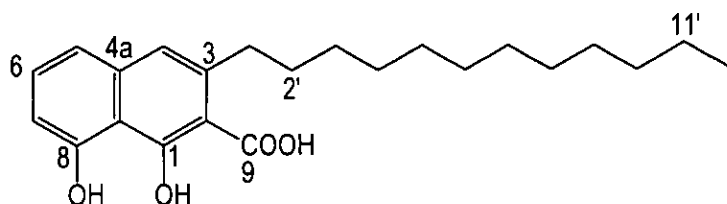
Compuesto	Rendimiento (%)
 <p>(2)</p>	0.026
 <p>(3)</p>	0.83
 <p>(21)</p>	$4.73 \times 10^{-4}$

#### 4.3 Caracterización de los compuestos aislados y sus derivados químicos.

##### 4.3.1 Caracterización del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (21) se resumen en los Cuadros 15-16.

**Cuadro 15.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**).



<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>
<b>Peso molecular</b>	372.2300
<b>IR <math>\nu_{\text{máx.}}</math> (película) cm<sup>-1</sup> (Figura 5)</b>	3500, 3017, 3005, 2915, 2849, 1681, 1637, 1611, 1571, 1503, 1471, 1459, 1413, 1226, 715
<b>EMIE <math>m/z</math> (int. rel.) (Figura 6)</b>	372(100), 329(2), 213(7), 189(18), 176(25), 134(20), 105(8)
<b>UV <math>\lambda_{\text{máx.}}</math> MeOH (log <math>\epsilon</math>), nm (Figura 7)</b>	341(2804), 234(10280), 228(10355), 258(4598), 222(9168), 206(11831)

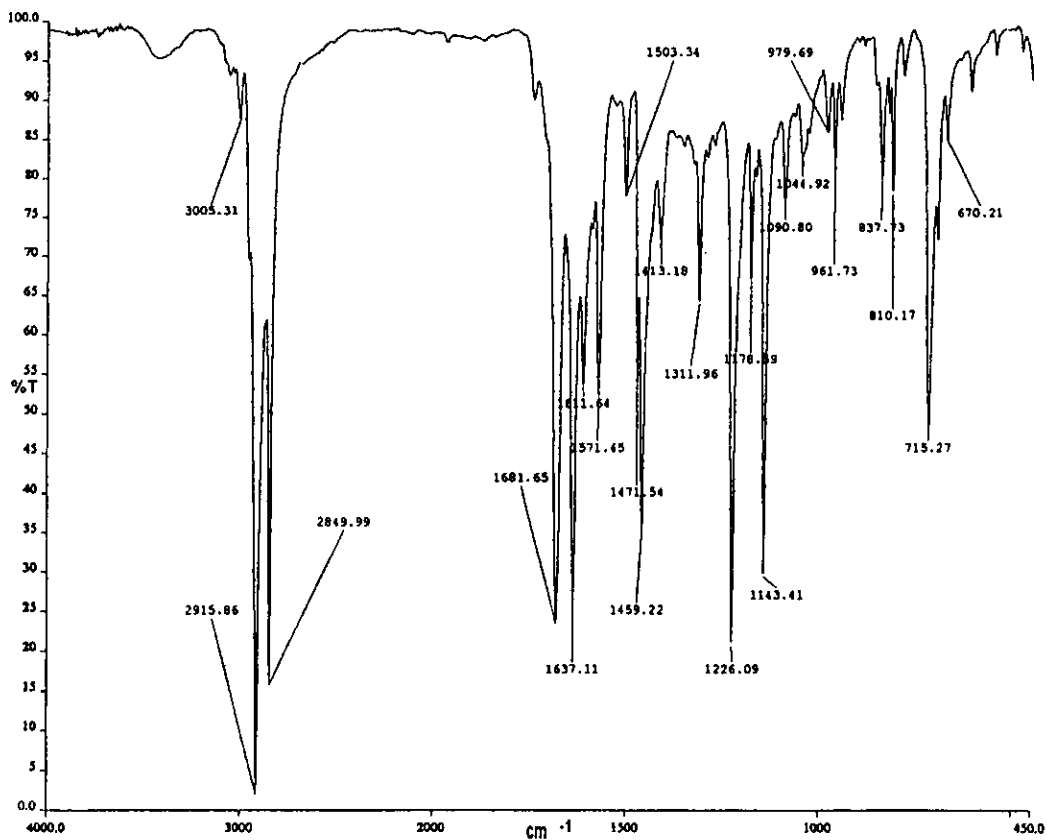


Figura 5. Espectro en el IR del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

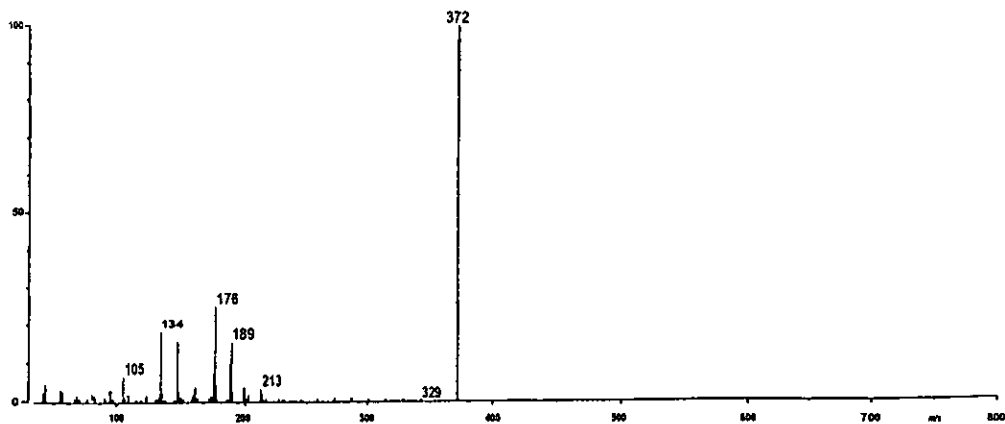


Figura 6. Espectro de masas modalidad IE del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico(21).

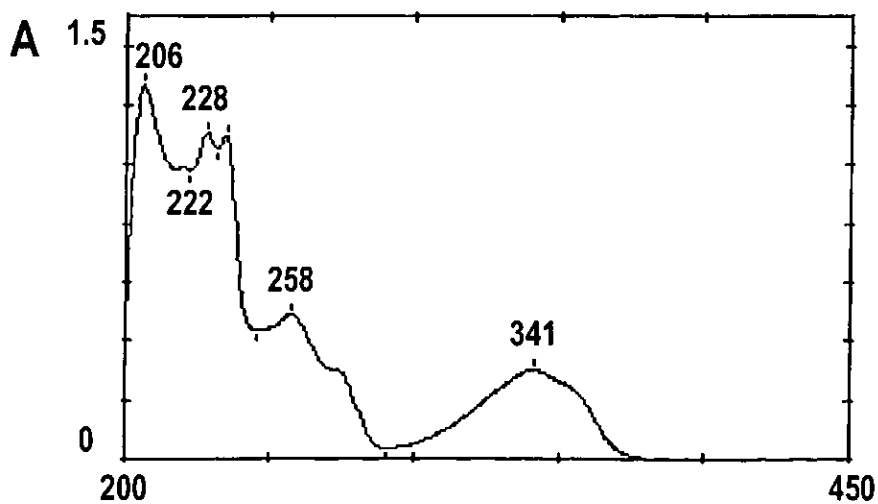
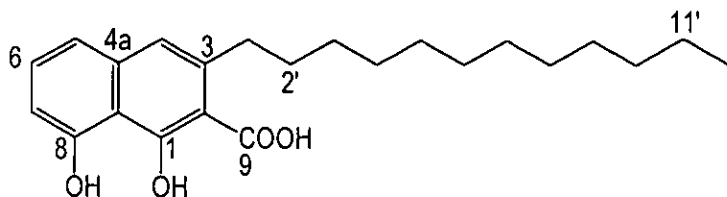


Figura 7. Espectro en el UV del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

**Cuadro 16.** Datos de RMN del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**).

Posición	$\delta_c$	$\delta_H$
1	157.8*	---
2	115.3	---
3	157.7*	---
4	104.0	6.26, sa
4a	139.2	---
5	115.3	6.81, dd (8.1, 1)
6	137.3	7.56, dd (8.8, 8.8)
7	114.6	6.92, dd(8.4, 1)
8	161.6	---
8a	106.1	---
COOH - 9	166.9	---
1'	33.3	2.51, ta (7.5)
2'	26.8	1.65, m
3'-11'	29.6-28.9	1.33 - 1.26, m
CH <sub>3</sub> - 12'	14.5	0.99, t (7.5)
OH-1	---	11.02, s
OH-8	---	11.02, s

\*señales intercambiables. Los valores en paréntesis corresponden a las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en 300 Hz.

El producto **21** se aisló como un sólido blanco con un punto de fusión de 62-64 °C. Su fórmula molecular se estableció como C<sub>23</sub> H<sub>32</sub> O<sub>4</sub> por espectrometría de masas de alta resolución observándose el ion molecular en una relación *m/z* 372.2300. La fórmula molecular calculada permite un índice de deficiencia de hidrógenos de ocho.

El espectro en el IR presenta bandas de absorción asociadas con la presencia de carbonilo de ácido conjugado (1681 cm<sup>-1</sup>), aromaticidad (3005, 1571, 1503 y 1471 cm<sup>-1</sup>) e hidroxilo fenólico (3500 y 1226 cm<sup>-1</sup>). El espectro en el UV contiene bandas congruentes con una sustancia aromática y altamente conjugada (Silverstein, 1997). El tratamiento del producto natural con anhídrido acético y piridina generó el derivado diacetilado **21a**, comprobándose químicamente la presencia de dos grupos fenólicos en la molécula. En el apéndice se ilustran los espectros de IR (**Espectro 15**) y RMN-<sup>1</sup>H (**Espectro 16**) de este derivado.

El análisis de los espectros de RMN (**Figuras 8 y 9, Cuadro 16**) permitió establecer que el producto natural era un derivado del ácido 2-naftoico, con una cadena alquímica lineal de 12 carbonos y dos grupos fenólicos (Pfefferle *et al.*, 1997). Las características más relevantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:

- 1) La presencia en  $\delta_H$  11.02 de un singulete ancho que integra para dos hidrógenos sugiere la presencia de dos hidroxilos fenólicos quelatados en la molécula.
- 2) Las señales en  $\delta_H$  7.56 (dd,  $J=8.8$  Hz, H-6), 6.92 (dd,  $J=8.4, 1$  Hz, H-7) y 6.81 (dd,  $J=8.1, 1$  Hz, H-5) conforman un sistema ABC característico de un anillo aromático trisustituido. Todas las señales del sistema ABC correlacionan entre sí en los espectros COSY (**Figura 10**) y COSY a larga distancia (**Figura 11**). De manera adicional, la señal doble de doble en  $\delta_H$  6.92 (H-7) muestra una clara interacción a larga distancia con la señal correspondiente a los hidroxilos quelatados en  $\delta$  11.02. Por último, las tres señales aromáticas antes descritas correlacionan en el espectro HMQC (**Figura 12**) con las señales en  $\delta_C$  137.3 (C-6), 114.6 (C-7) y 115.3 (C-5), respectivamente.

- 3) En  $\delta_H$  6.26 (H-4) se observa un singulete ancho atribuible a un hidrógeno aromático aislado. Esta señal muestra un pico cruzado con la absorción en  $\delta_H$  6.81 (H-5) en el espectro COSY a larga distancia; evidenciando así la presencia del núcleo de naftaleno. La señal en  $\delta_H$  6.26 correlaciona en el espectro HMQC con la absorción en  $\delta_C$  104.0.
- 4) En 2.51 (H-1') se observa un triplete ( $J=7.5$  Hz) característico de un metileno bencílico (Acevedo *et al.*, 2000). Esta señal correlaciona en el espectro COSY (Figura 10) con el multiplete en  $\delta_H$  1.65 (H-2') asignable a otro grupo metileno, y con la señal del hidrógeno aromático aislado (H-4). Esta última interacción es de naturaleza bencílica. Las señales de estos metilenos aparecen en  $\delta_C$  33.3 y  $\delta_C$  26.8, respectivamente, en el espectro de RMN- $^{13}C$  (Figura 9).
- 5) Entre  $\delta_H$  1.33-1.26 (H-3'-H-11') y en  $\delta_H$  0.99 (t,  $J=7.5$  Hz, H-12') se aprecian las señales asignables a los metilenos restantes y al metilo terminal, de la cadena hidrocarbonada, respectivamente. Los carbonos correspondientes se observaron en el rango  $\delta_C$  29.6-28.9 y en  $\delta_C$  14.5.
- 6) La señal del carbonilo del ácido conjugado se observa en  $\delta_C$  166.9 (C-9). Por último, las señales de los carbonos cuaternarios restantes se observaron en  $\delta_C$  157.8 (C-1), 115.3 (C-2) y 139.2 (C-4a), 157.7 (C-3), 161.6 (C-8) y 106.1 (C-8a).

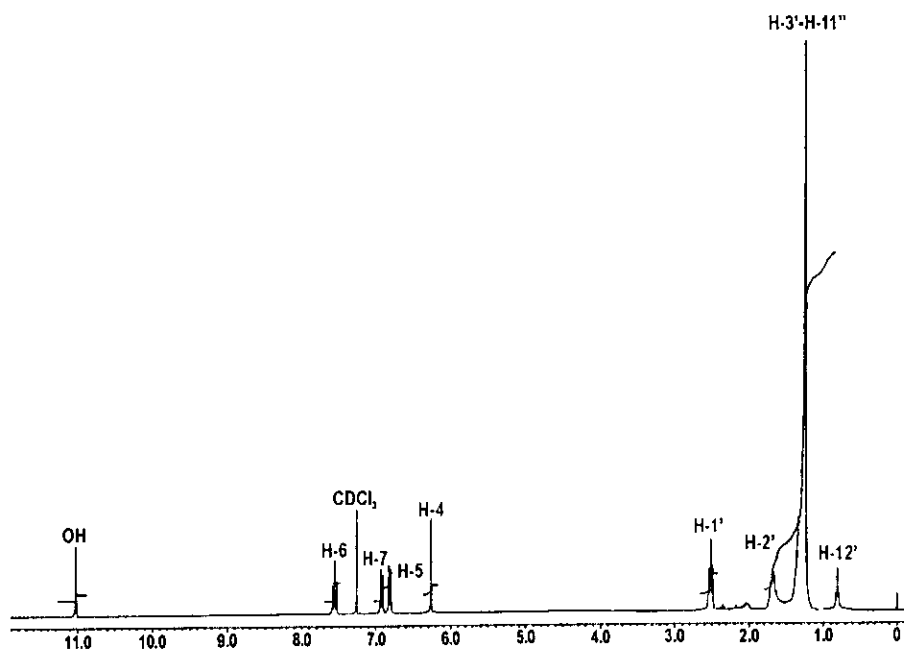


Figura 8. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

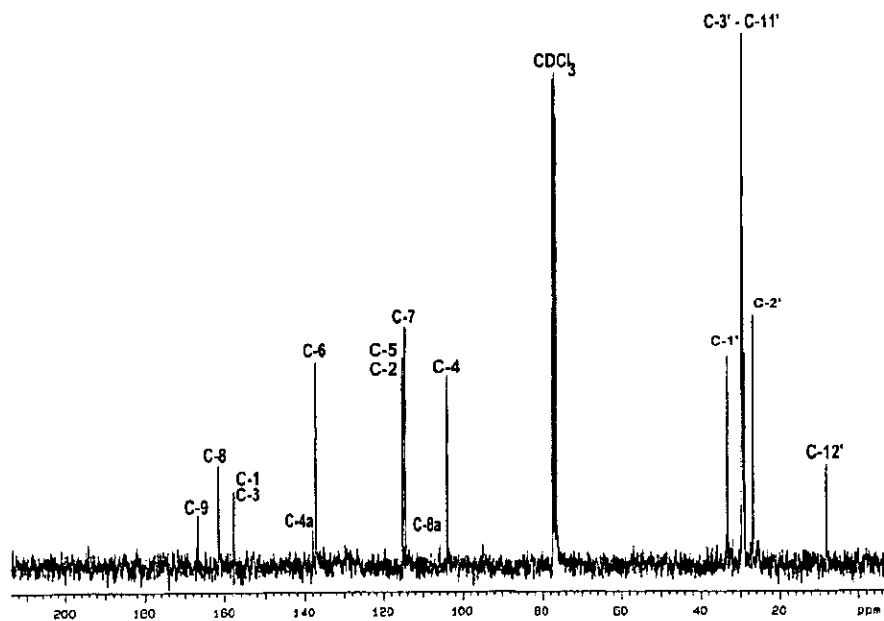


Figura 9. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).



La ubicación de los grupos funcionales en el núcleo naftaleno se realizó fundamentalmente con base en el análisis de los espectros COSY (**Figura 10**), COSY a larga distancia (**Figura 11**) y HMBC (**Figura 13**). Las consideraciones más importantes se resumen a continuación:

- 1) En primer lugar, uno de los grupos hidroxilo fenólicos se ubico en la posición C-8 del núcleo base considerando: **(a)** el desplazamiento químico de los hidrógenos que conforman el sistema ABC; **(b)** la interacción observada en el espectro COSY a larga distancia (**Espectro 14**), entre la señal correspondiente a H-6 ( $\delta_H$  7.56) y los hidroxilos fenólicos; y **(c)** por último las correlaciones a larga distancia C-8/H-6 ( $\delta_C$  161.6), C-5/H-7 ( $\delta_C$  115.3) y C-7/OH-8 ( $\delta_C$  114.6) observada en el espectro HMBC (**Figura 13**). Al ubicar el primer hidroxilo fenólico en la posición C-8 resultaba evidente que la cadena alquímica, el segundo grupo fenólico y el grupo carboxilo se debían localizar en el anillo adyacente. En este sentido, la interacción *peri* observada en el espectro COSY a larga distancia (**Figura 11**), entre las señales en  $\delta_H$  6.81 (H-5) y  $\delta_H$  6.26 (H-4) indicaron que el hidrógeno aislado detectado en el espectro de RMN- $^1H$  debía localizarse en la posición H-4 del núcleo base. En consecuencia los restantes grupos funcionales debían estar ubicados en las posiciones C-1, C-2 y C-3. El acoplamiento entre H-4 y el metileno bencílico observado en los espectros COSY (**Figura 10**) y COSY a larga distancia (**Figura 11**), permitieron determinar de manera inequívoca que la cadena lateral se encontraba C-3. Por último, la ubicación del grupo carboxilo en C-2 y, por lo tanto del segundo fenol en C-1, se realizó considerando la correlación observada entre la señal en  $\delta_C$  115.3 (C-2) y H-4 ( $\delta_H$  6.26) en el espectro HMBC (**Figura 13**), la cual solo era posible si el grupo carboxilo se ubicaba en C-2. Otras correlaciones observadas en el espectro HMBC y que fueron de utilidad para la ubicación de los grupos funcionales se indican en el **Cuadro 17**.

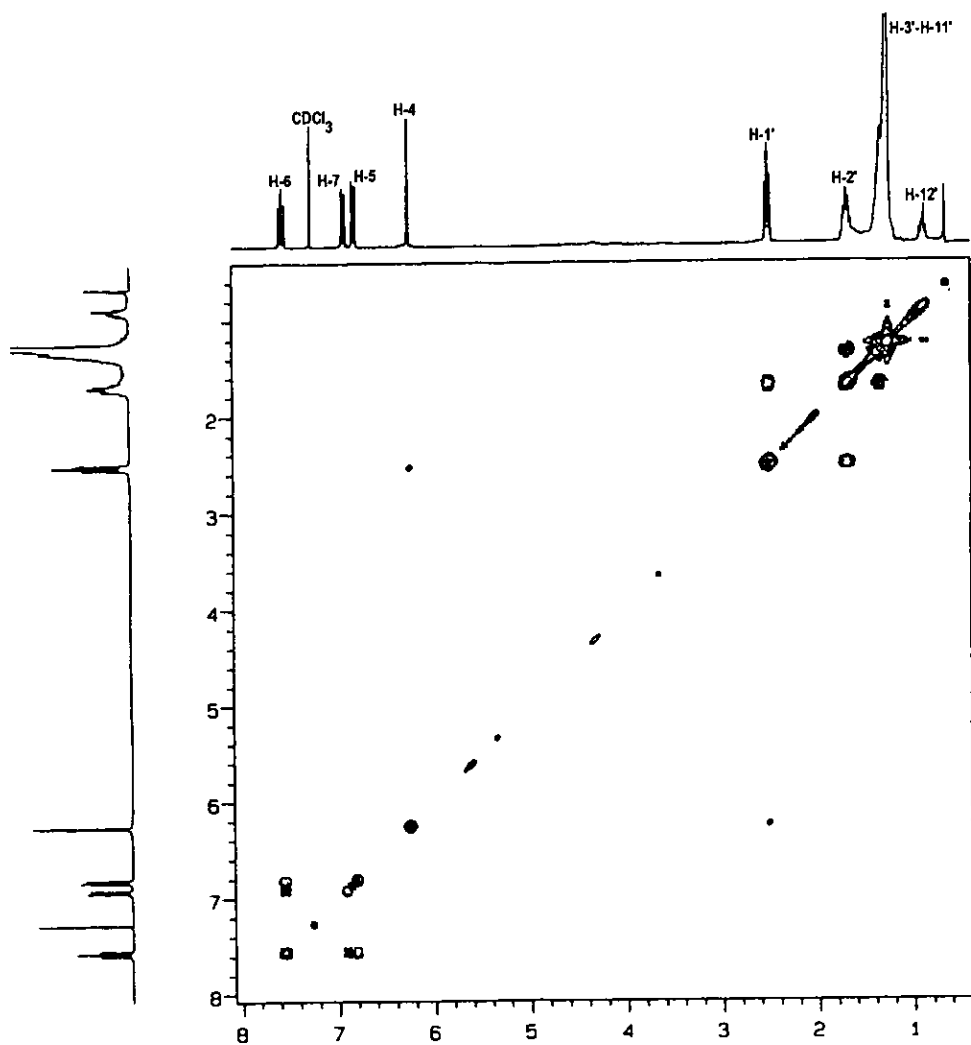


Figura 10. Espectro de RMN modalidad COSY del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

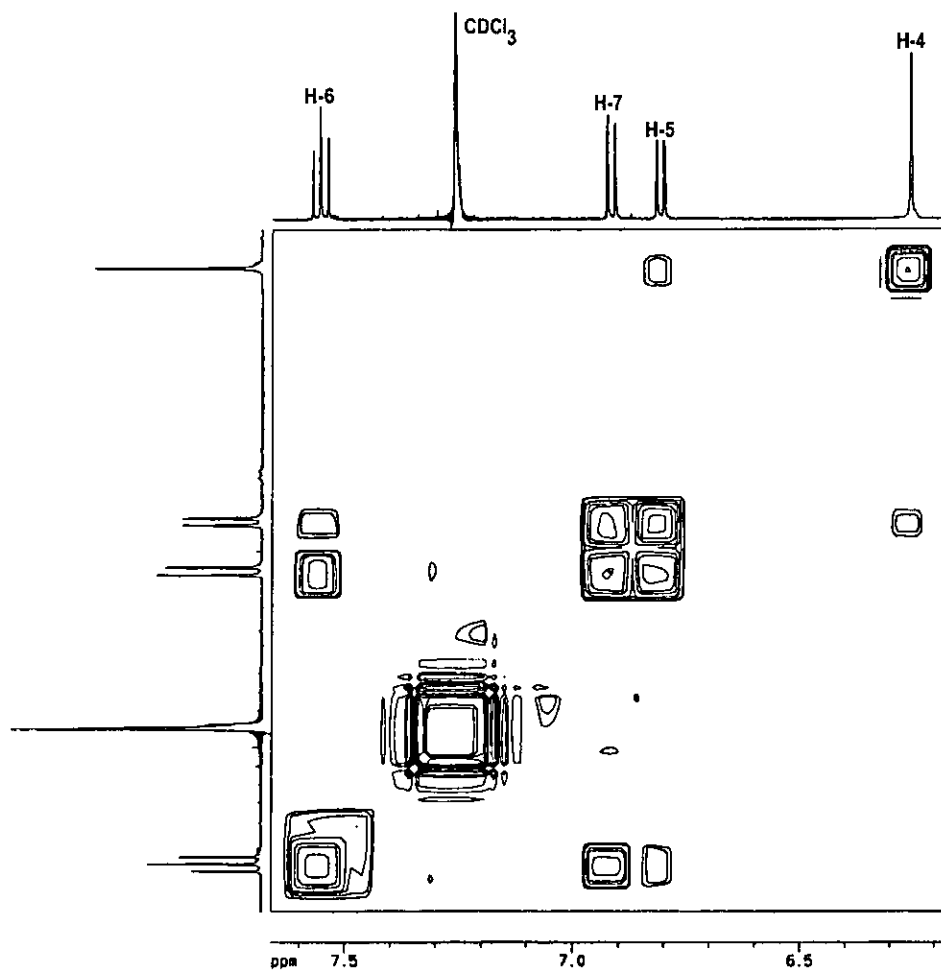


Figura 11. Región aromática del espectro COSY a larga distancia del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**).

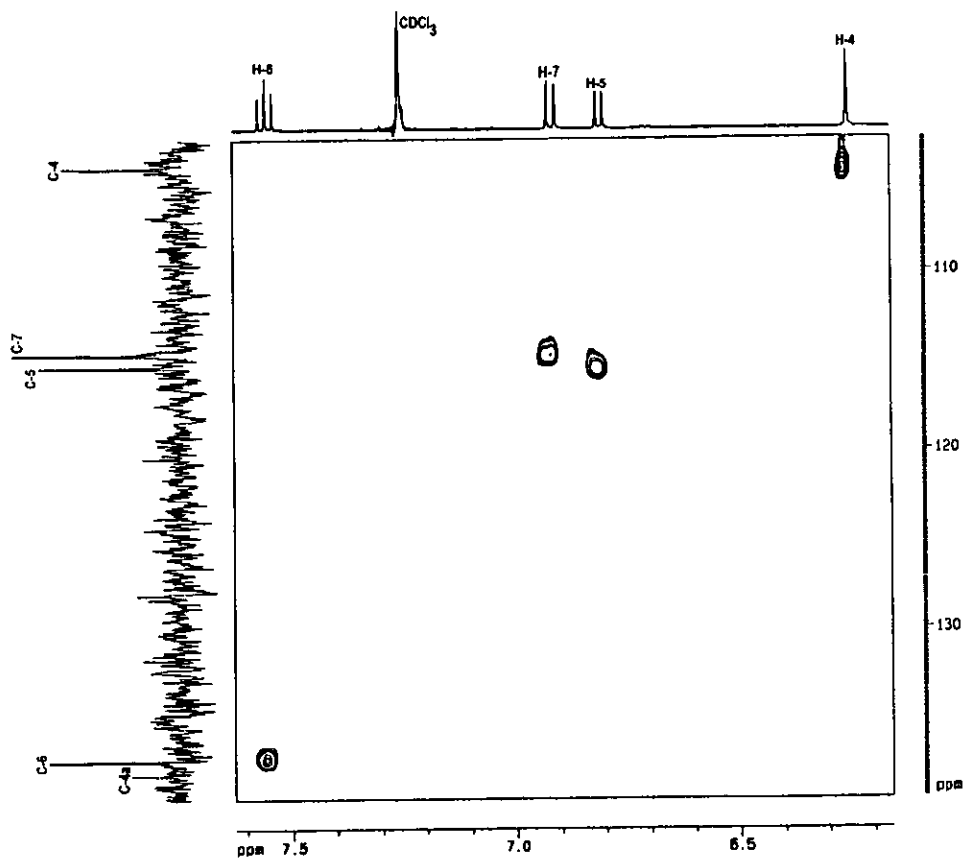


Figura 12. Región aromática del espectro de RMN modalidad HMBC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

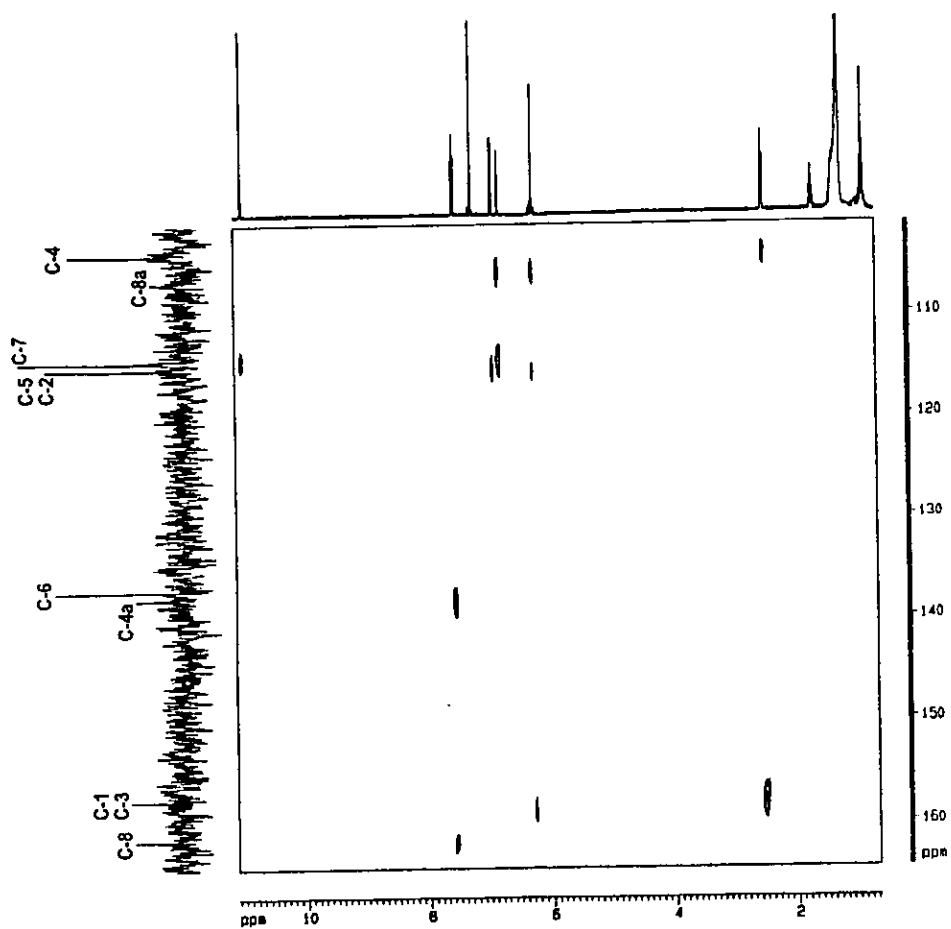
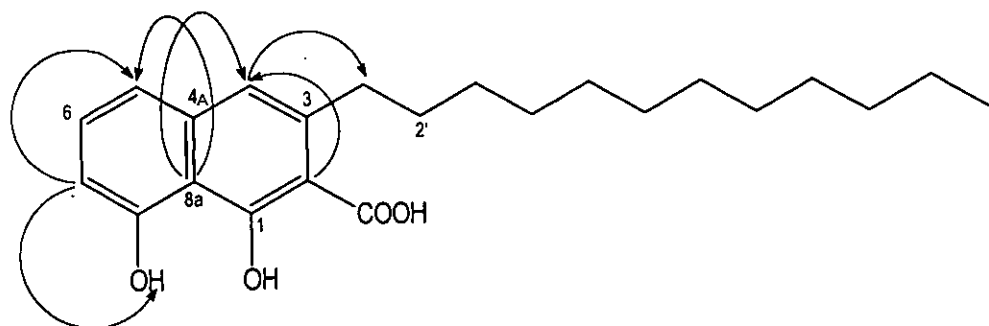


Figura 13. Vista parcial del espectro HMBC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).

**Cuadro 17.** Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC del ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).



Carbono	$\delta_c$	Correlaciones C-H HMBC
8a	106.1	H-4, H-5
7	114.6	H-5, OH-8
5	115.3	H-7, H-4
4a	139.2	H-6
8	161.6	H-6
3	157.7	H-4, H-1'
4	104.0	H-1'
2	115.3	H-4

Con base en las evidencias presentadas el nuevo producto natural se identificó como el ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**). Este producto representa un análogo de tipo naftaleno de los ácidos anacárdicos previamente descritos en esta especie (Mata *et al.*, 1991; Navarrete *et al.*, 1989).

Desde el punto de vista biogénico es probable que este producto se genere por la ruta acetato-malonato. Posiblemente; el ácido tridecanoico bajo la forma de tridecanoilCoA (**a**) se condensa con cinco unidades de malonilCoA (**b**) para generar el policétido intermediario (**c**). Posteriormente la reducción del grupo carbonilo en la posición C-5 genera el policétido (**d**), el cual se deshidrata para formar el policétido (**e**). A su vez, el policétido (**e**) se cicliza para generar el producto **21**. En la **Figura 14** se representa la propuesta de biogénesis para el ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**).

#### 4.3.2 Caracterización del ácido masticadienónico (**2**) y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (**3**).

Para realizar la caracterización de los ácidos masticadienónico (**2**) y 3 $\alpha$ -hidroximasticadienónico (**3**), así como de sus derivados químicos el ácido 3 $\alpha$ -acetilmasticadienónico (**3a**), el 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoato de metilo (**3b**), el 3 $\alpha$ -acetilmasticadienoato de metilo (**3c**) y el masticadienoato de metilo (**2a**), se compararon sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas con aquellas de muestras auténticas (Rivero, 1996; Navarrete, 1989; Navarrete, 1982).

Es importante destacar que los derivados químicos de los compuestos se prepararon con la finalidad de comparar su actividad biológica con respecto a la de los productos naturales, mismos que presentaron una notable bioactividad. Los espectros de IR y RMN de los productos **2** y **3**, así como la de sus derivados se incluyen en el apéndice (**Espectros 1-12**).

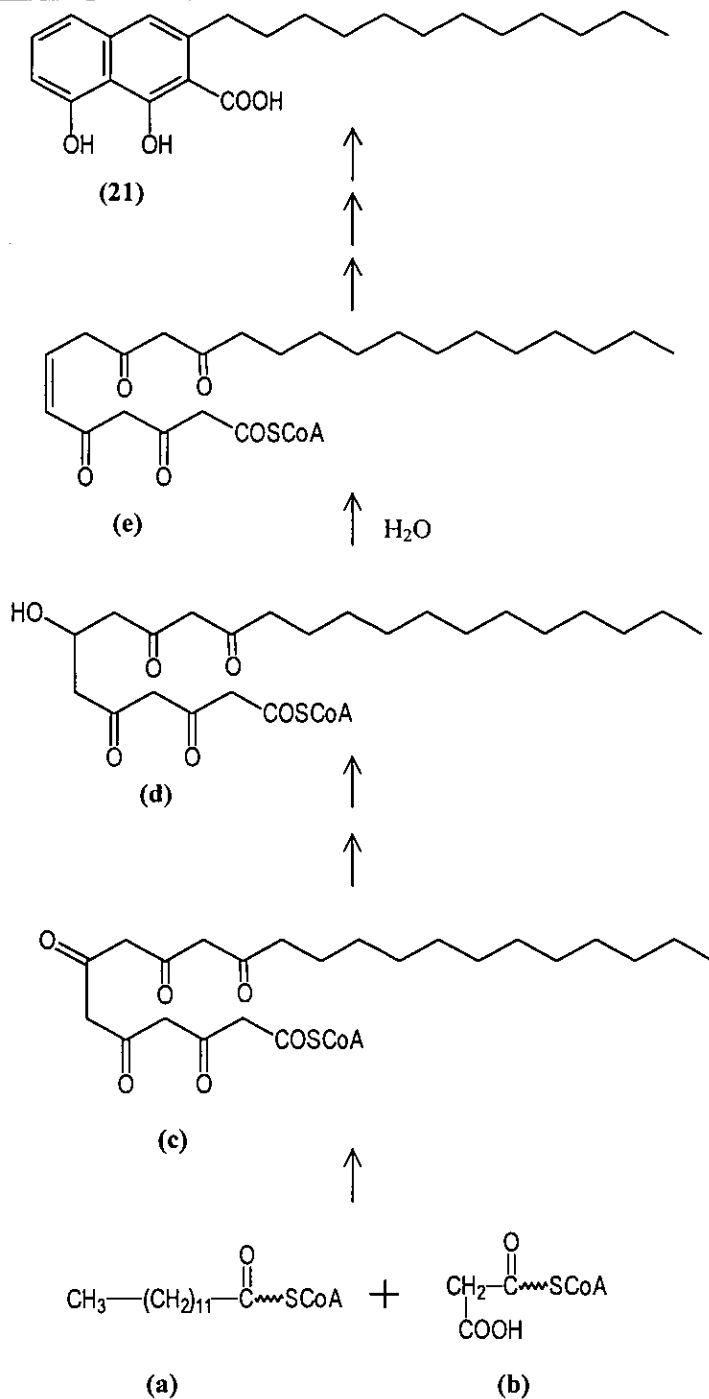


Figura 14. Propuesta de biogénesis para el ácido 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (21).



## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas preliminares conducidos en el marco del proyecto “Bioactive Agents from Dryland Biodiversity of Latin American” indicaron, de nueva cuenta, que la especie *Amphyteryngium adstringens* constituye una fuente valiosa de principios biodinámicos.

2. El estudio químico biodirigido de la especie *A. adstringens* permitió el aislamiento y caracterización de un derivado novedoso del ácido 2-naftoico, el cual se caracterizó como 1,8-dihidroxi-3-dodecil-2-naftoico (**21**). La caracterización del nuevo producto natural se realizó por métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos. Cabe destacar que este producto constituye el primer derivado de tipo alquil naftaleno que se describe en la naturaleza. Indudablemente este hallazgo constituye una contribución al conocimiento de la química del género *Amphyteryngium*; de la flora medicinal mexicana y de los productos naturales biosintetizados a través de la ruta acetato-malonato.

3. De manera adicional se obtuvieron los ácidos 3 $\alpha$ - hidroximasticadienónico y masticadienónico previamente descritos en esta especie. Se prepararon varios derivados de estos ácidos con la finalidad de evaluar su actividad biológica y compararla con la de los productos naturales.

## VI. PERSPECTIVAS.

A partir del presente trabajo se generaron las siguientes perspectivas:

1. Aislar y caracterizar los cuatro metabolitos restantes de la mezcla F017 de *Amphypteryngium adstringens*, detectados durante el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
2. Continuar con el estudio químico de las fracciones primarias (F005-F007) activas de *A.adstringens*.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Acevedo, L.; Martínez, E.; Castañeda, P.; Franzblau, S.; Timmermann, B.; Linares, E.; Bye, R.; Mata, R. (2000). New Phenylethanoids from *Buddleja cordata*. *Planta Medica* **66**, 257-261.
- ✓ Argueta, A.; Cano, A. y Rodarte. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana I. Instituto Nacional Indigenista. 1ª. Edición, México D.F., pp. 542-543.
- ✓ Breitmaier, E. (1993). Structure elucidation by NMR in Organic Chemistry. A Practical Guide. John Willey and Sons, West Sussex, p. 265.
- ✓ Calzada, F. (1989). Metilenquinonas triterpénicas y alcaloides sesquiterpénicas de *Hippocratea excelsa* H.B.K. Alquilfenoles de *Amphyteryngium adstringens* Shiede ex Schlecht. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Díaz, G.J.L. (1974). Índice y sinonimia de las plantas medicinales de México. IMEPLAM, México D.F., pp. 138-139.
- ✓ Domínguez, S.X.; Franco, R.; García, S. (1993). Plantas Medicinales Mexicanas XVIII. Estructura del ácido Instipolinácico separado de la corteza del cuachalalate (*Amphyteryngium adstringens*). *Revista Latinoamericana de Química* **14**, 99-100.
- ✓ Durrani and Tyman. (1979). Long-chain Phenols. Part 14. Synthesis of 6-n-Alkylsalicylic Acids and 3-n-Alkylphenols. *Journal Chemical Society*, Perkin **1**, 2069-2078.
- ✓ Estrada, L.D. (1987). Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo. , Chapingo, Fondo de Cultura Económica, pp 233.

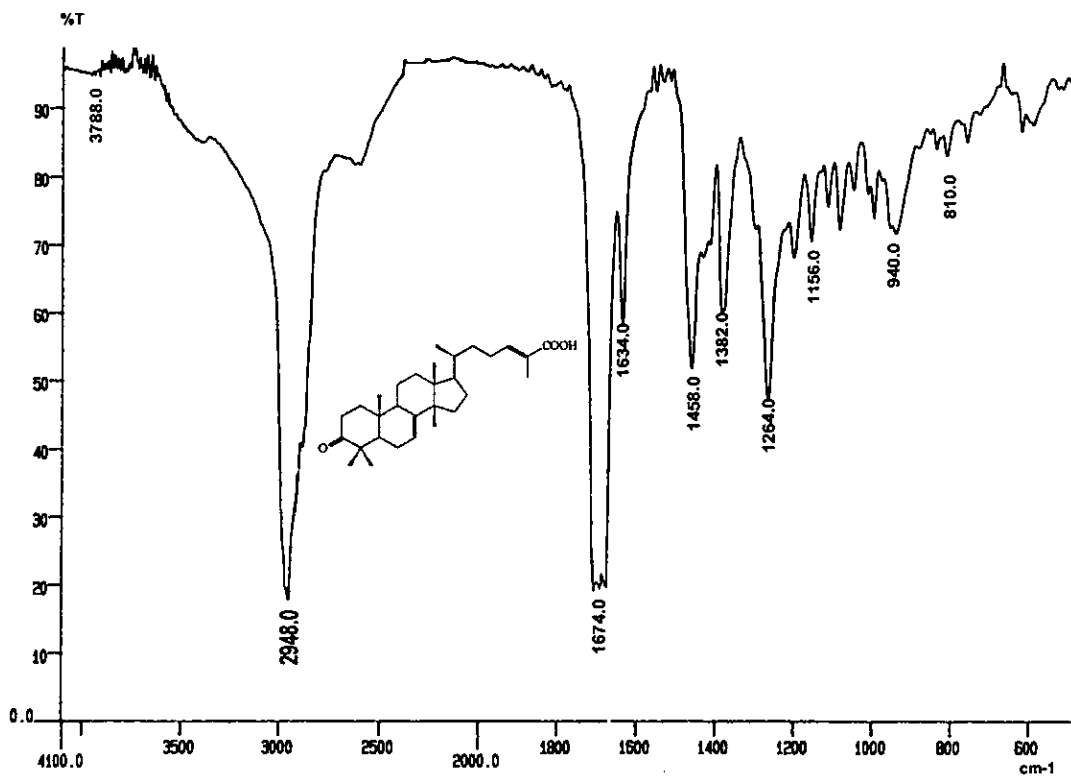
- 
- ✓ Grifo, F. (1994). The Role of Chemical Prospecting in Sustainable Development. Chemical prospecting an overview of the International Cooperative Biodiversity Groups Program. PAHO, San Jose, Costa Rica. , 19, 1-18.
  - ✓ González, E.E.; Mckenna, G. Y Delgado, J. (1962). Anticancer activity of de *Amphypteryngium adstringens*. *Journal Pharmacology Science* 51, 901-905.
  - ✓ González E.E.; Delgado, N. (1962). Phytochemical investigation of *Amphypteryngium adstringens*, *Journal Pharmacology Science* 51, 786-790.
  - ✓ Lara Ochoa. (1996). Plantas Medicinales de México, Composición, Usos y Actividad Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, 1ª. Edición, México D.F., p.43.
  - ✓ Lowery, C. (1993). Reagent chemicals. American Chemical Society Specification, Washington, D.C., pp 90-91.
  - ✓ McLafferty. (1973). Interpretation of mass spectra, W.A. Benjamin, Inc. , 2ª. Edición, Philippines. , p. 278.
  - ✓ Mata, R. (1993). Estudios Químicos y Aspectos Biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. En la Investigación Científica de la Herbolaria Medicina Mexicana. Secretaria de Salud, México D.F., pp.143-156.
  - ✓ Mata, R.; Calzada, F.; Navarrete, A.; Delgado, G. y del Río, F. (1991). Long-chain phenols from the bark of *Amphypteryngium adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology* 34,147-154.
  - ✓ Miller, J.S. and Gerau, R.E. (2000). Therapeutic Potential y Plant\_Derived Compounds: Realizing the Potential. En Biologically Active natural Products: Pharmaceuticacs (S.J. Cutter y H.G. Cutter, Eds). CRC Press; Nueva York. , pp 25-38.

- ✓ Navarrete, A. (1982). Estudio Químico y Pruebas Farmacológicas Preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (cuachalalate). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Navarrete, A.; Mata, R. (1988). Alkylsuccinic acids from *Amphyteryngium adstringens*. *Planta Medica* **55**, 479.
- ✓ Navarrete, A.; Reyes, B.; Silva, A. (1990). Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphyteryngium adstringens* (cuachalalate). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **21**, 28-32.
- ✓ Navarrete, A. (1996). Estudio Químico de Plantas Mexicanas usadas en Medicina Tradicional. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Navarrete, A.; Martínez-Urbe and Reyes, B. (1998). Gastroprotective Activity of the Stem Bark of *Amphyteryngium adstringens* in Rats. *Phytotherapy Research* **12**, 1-4.
- ✓ Olivera, G.; Soto, M.; Martínez, M. (1999). Phytochemical study of cuachalalate (*Amphyteryngium adstringens*, Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* **68**, 109-113.
- ✓ Pande, A. y Shukia, Y. (1993). Naphthoic acid derivate from *Valeriana wallichii*. *Phytochemistry*, **32**, 1350-1351.
- ✓ Pérez, R.; Pérez, C and Pérez. (1993). A new triterpenoids from the bark of *Juliania adstringens*. *International Journal Pharmacognosy* **31**, 185-188.
- ✓ Pfefferle, C.; Gurtler, H. (1997). 1-hydroxy-4-methoxy-2-naphthoic acid, a herbicidal compound produced by *Stertosporangium cinnabarinum* ATCC31213. *Journal of Antibiotics*. **50:12**, 1067-1068.

- 
- ✓ Rivero, F. (1994). Constituyentes Bioactivos de *Metopium brownei* (Jacq). Urban (Anacardiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
  
  - ✓ Rzedowski, J. (1978). Vegetación de México. Limusa, México D.F.; pp. 210.
  
  - ✓ Seo, S.; Uomori, A.; Yoshimura, Y. (1986). Biosynthesis of Triterpenes, Ursolic Acid and Oleanolic Acid, from Acetate in Tissue Cultures of *Rabdosia Japonia* Hara . *Journal Chemical Society and Chemical Commun*, 1141-1142.
  
  - ✓ Silvestein, R.M. (1997). Spectrometria identification of organic compounds., 5ª. Edition. , John Wiley & Sons, Inc. , p. 419.
  
  - ✓ Shrader, S. (1974). Introductory Mass Spectrometry. , Allyn and Bacon. Inc. , 2ª. Edition. , Boston. , p.246.
  
  - ✓ Suffness, M.; Cragg. M.; Grever, M.R.; Grifo, F.J.; Mead, J.; Schepartz, S.A.; Venditti, J.M.; Wolpert, M. (1991). The National Cooperative Group (ncnpddg) AND International Cooperative Biodiversity Group (ICBG) Programs. *International Journal of Pharmacognosy* 33, Supplement, 5-16.
  
  - ✓ Wannan, B.S.; Quinn, C.J. (1988). Biflavonoids in the *Julianiaceae*. *Phytochemistry*, 27, 3161-3162.
  
  - ✓ Watson, W.H.; Domínguez, X.; Vázquez; G. And García, S. (1987). Cuachalalc acid, a new triterpene from *Amphipterygium adstringens*. *Revista Latinoamericana de Química* 18, 89-90.

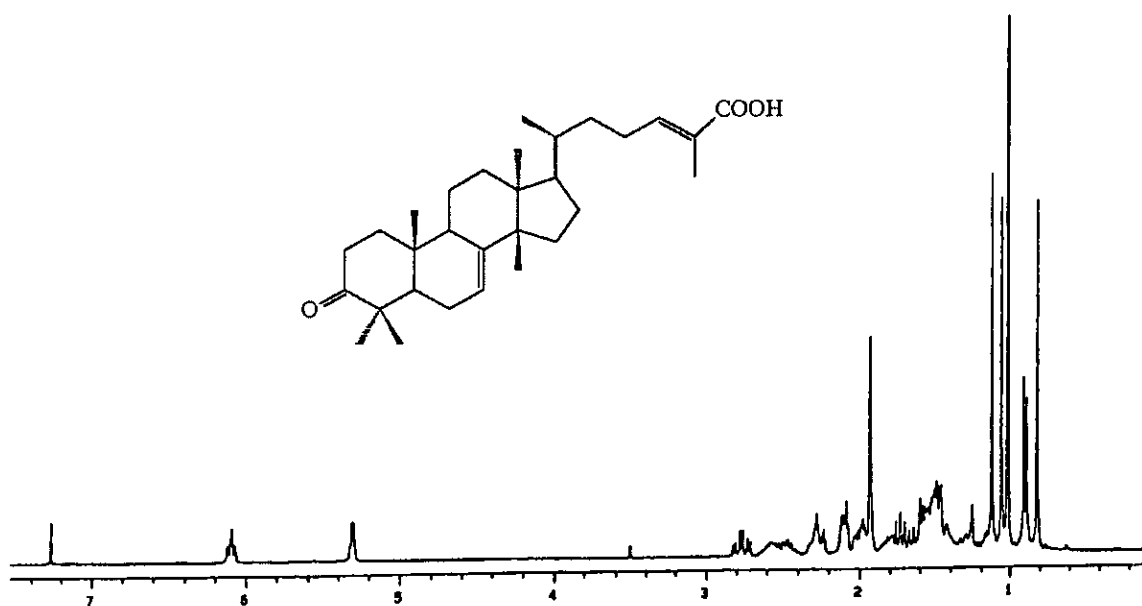
*APÉNDICE*

*ESPECTROS*

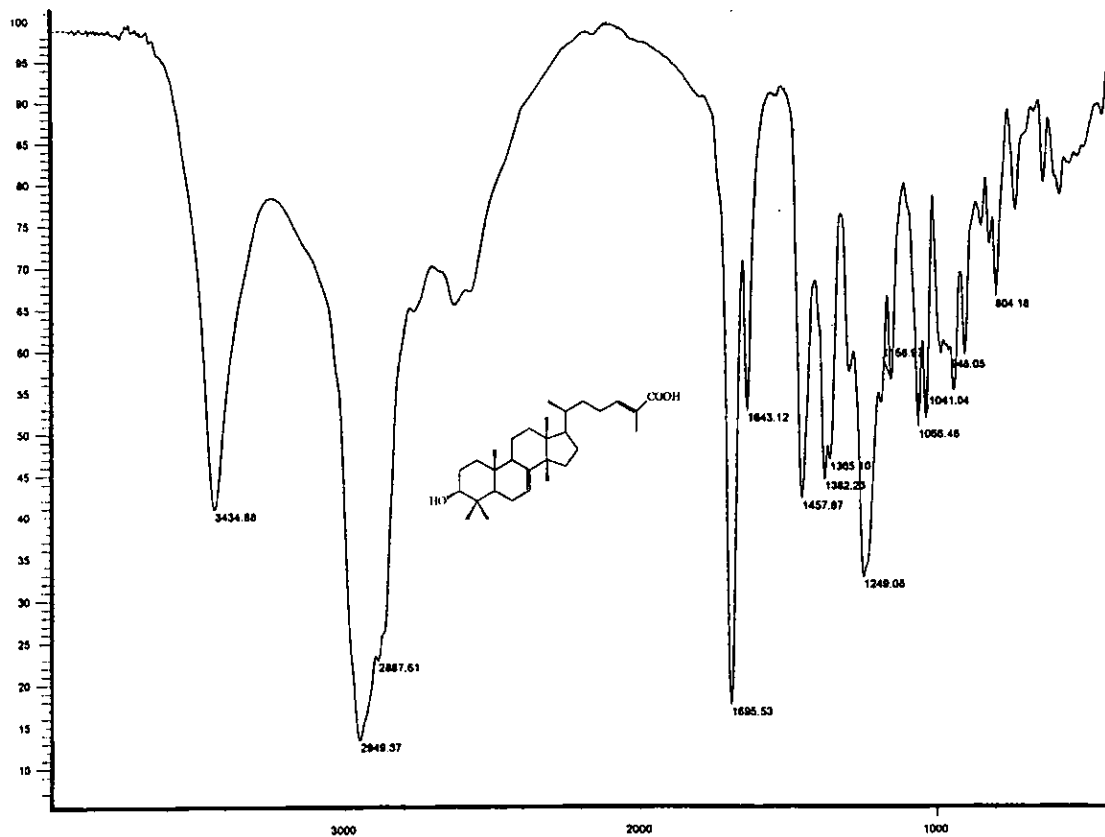


Espectro 1. Espectro en el IR del ácido masticadienónico (2).

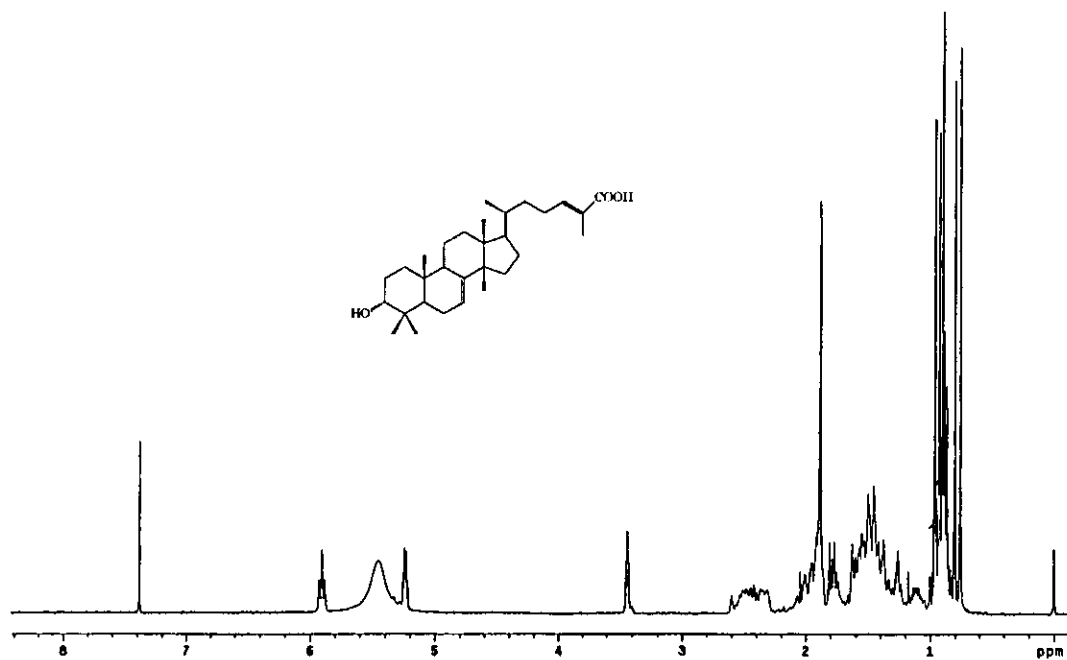




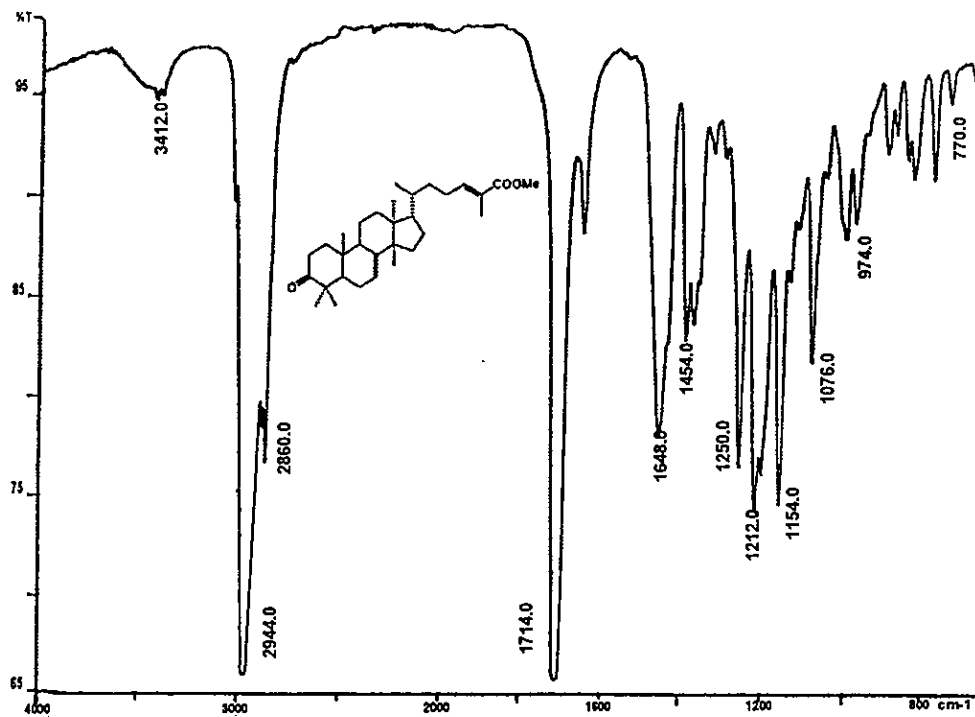
**Espectro 2.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido masticadienónico (2).



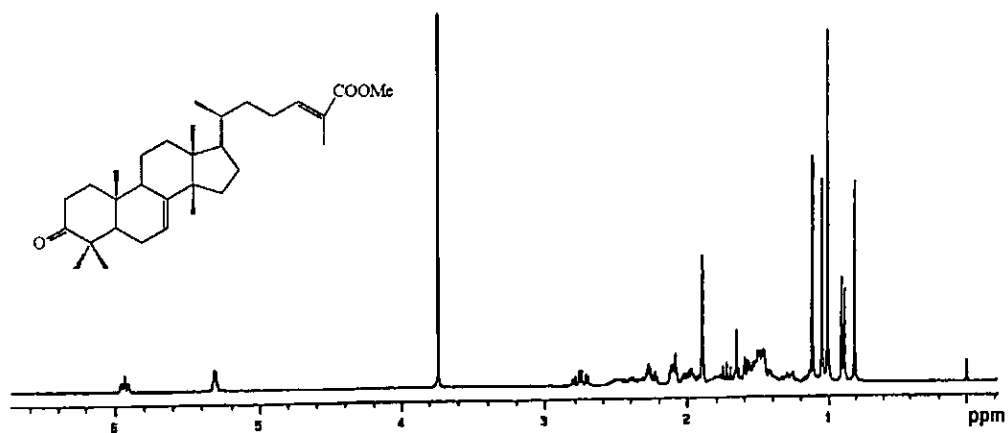
**Espectro 3.** Espectro en el IR del ácido 3α- hidroximasticadienónico (3).



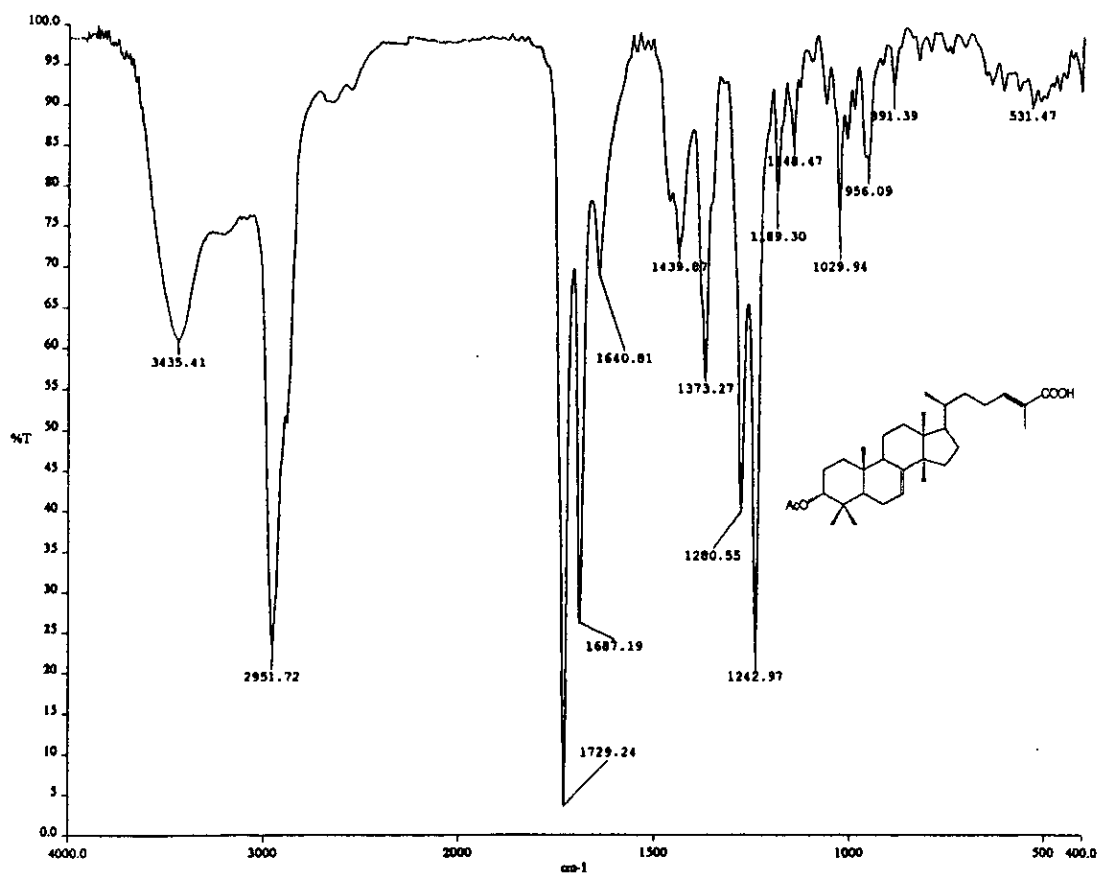
**Espectro 4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido 3α- hidroximasticadienónico (3).



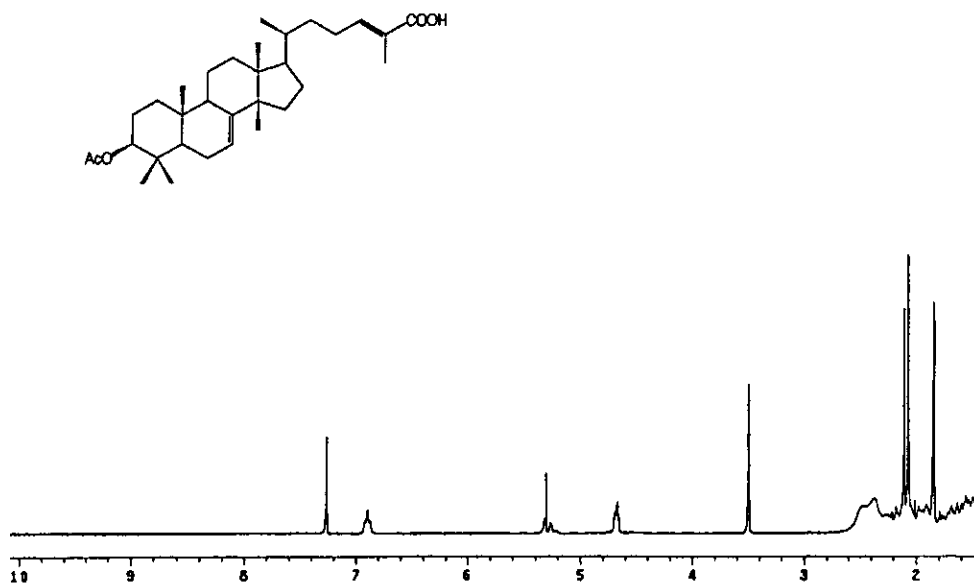
Espectro 5. Espectro en el IR del masticadienoato de metilo (2a).



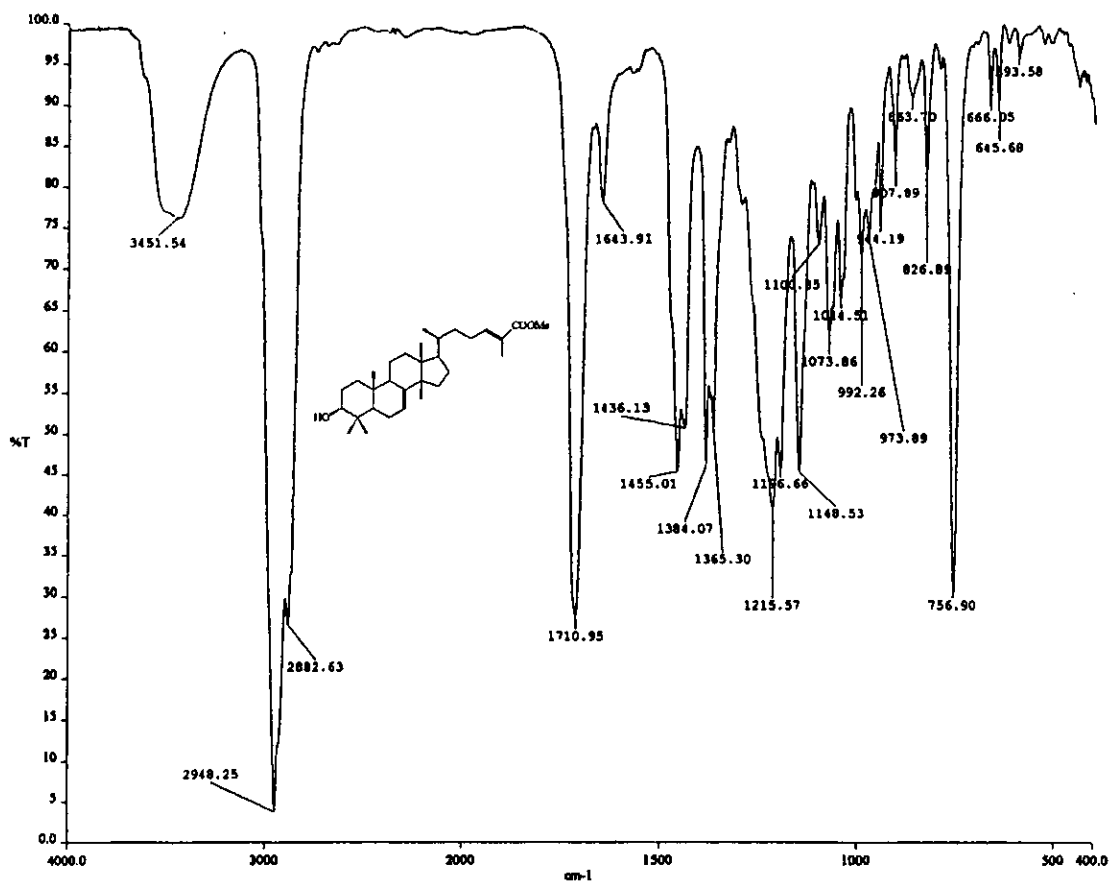
**Espectro 6.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del masticadienoato de metilo (**2a**).



**Espectro 7.** Espectro en el IR del ácido 3α- acetilmasticadienónico (3a).

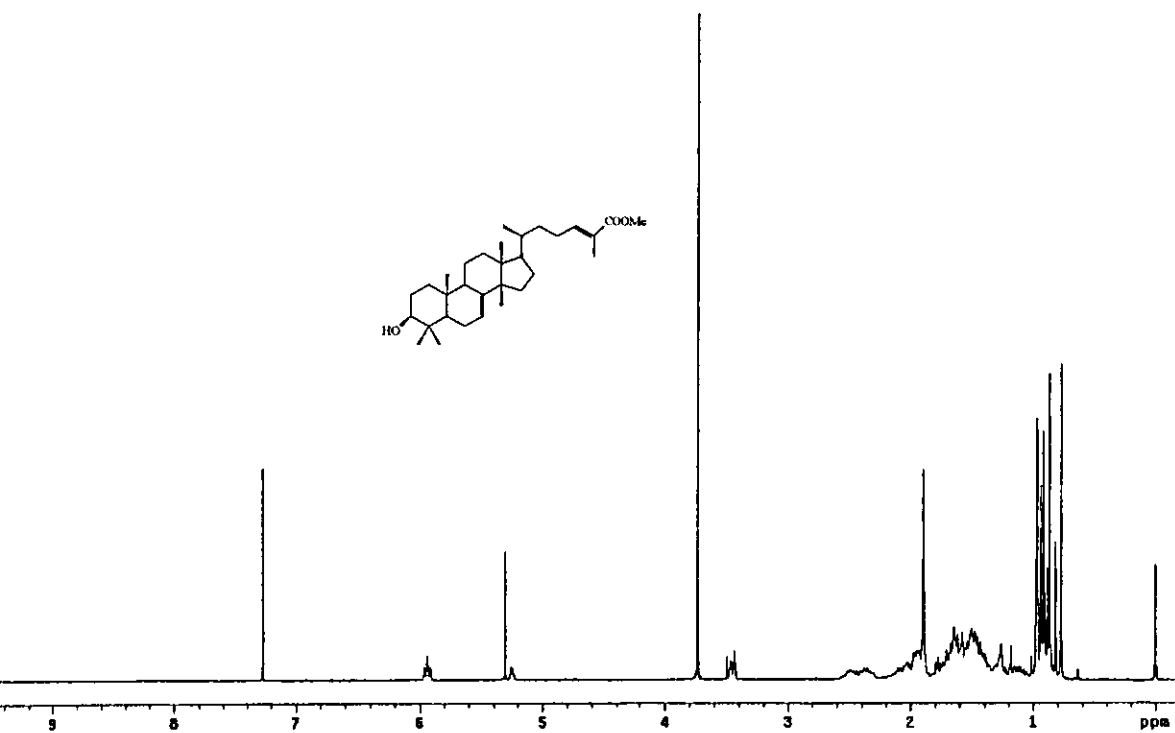


**Espectro 8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido 3 $\alpha$ - acetilmasticadienónico (3a).

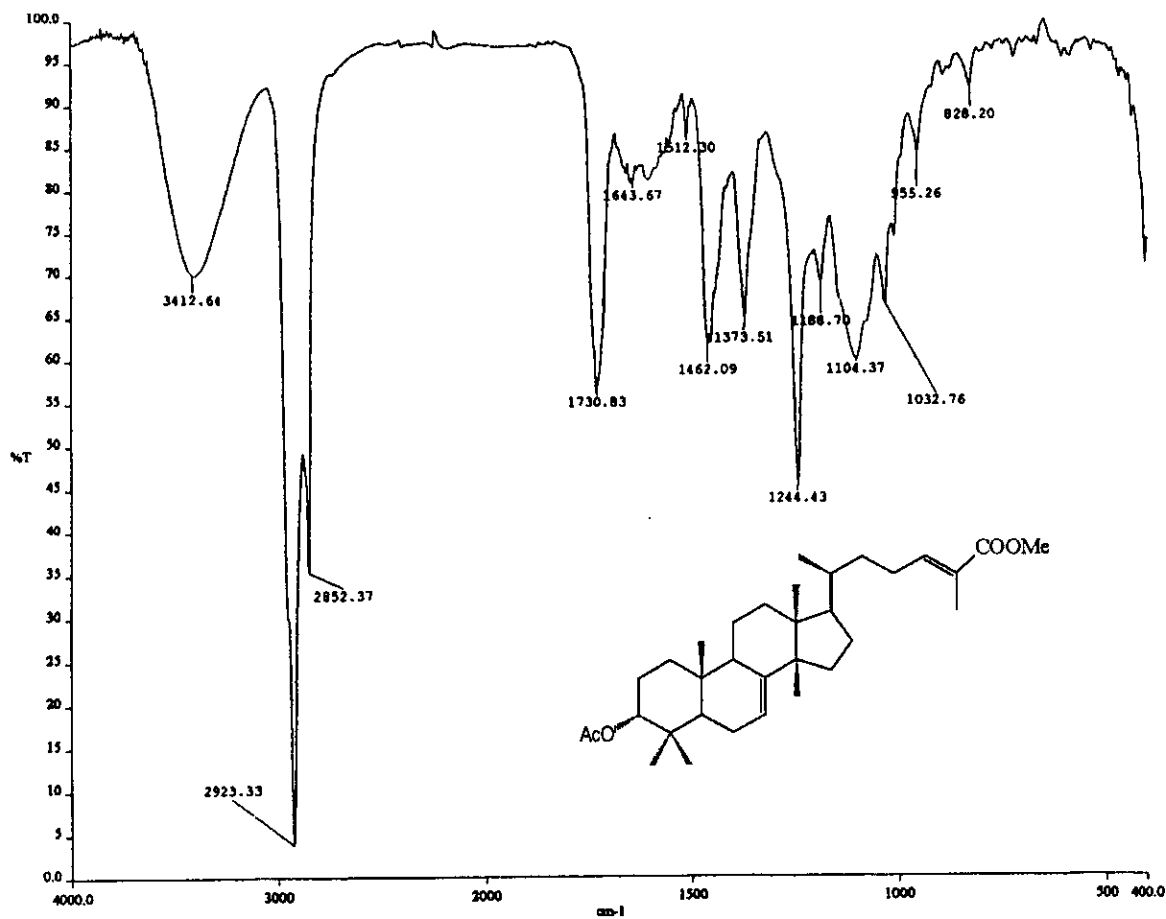


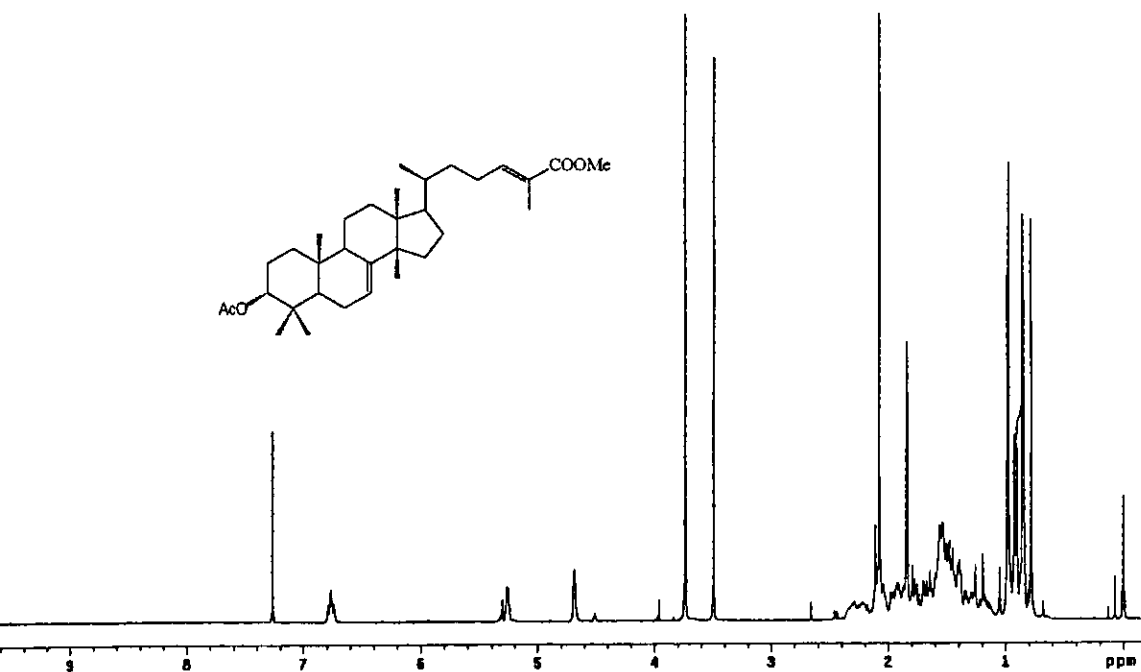
**Espectro 9.** Espectro en el IR del ácido 3α- hidroximasticadienoato de metilo (**3b**).



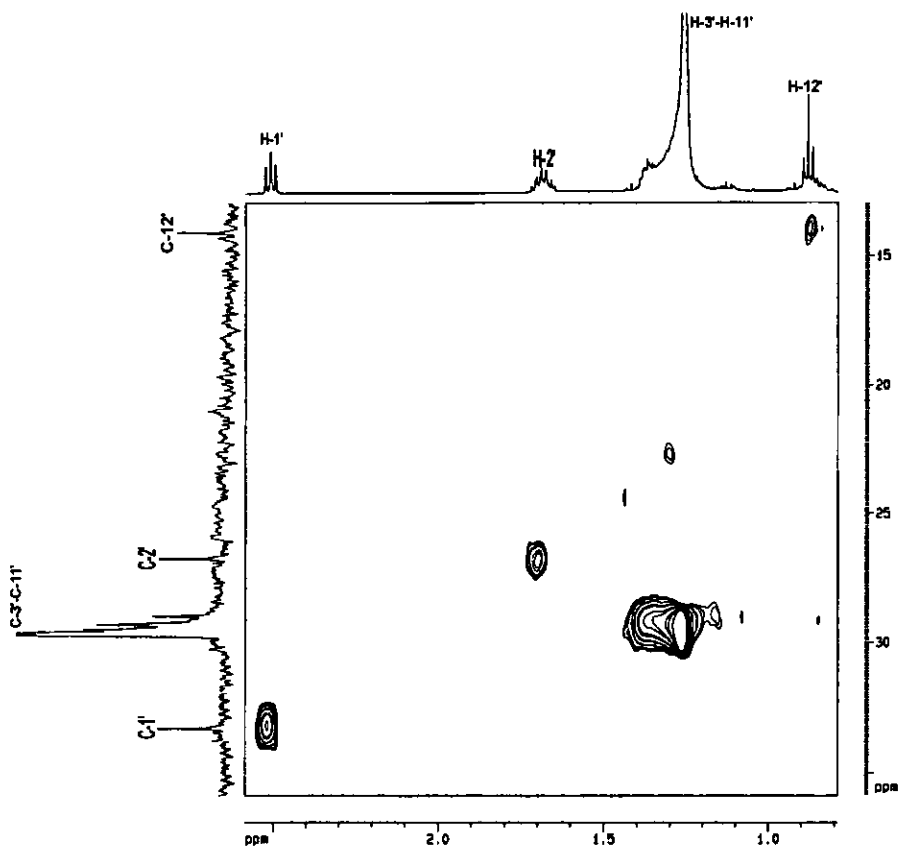


**Espectro 10.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3α- hidroximasticadienoato de metilo (**3b**).

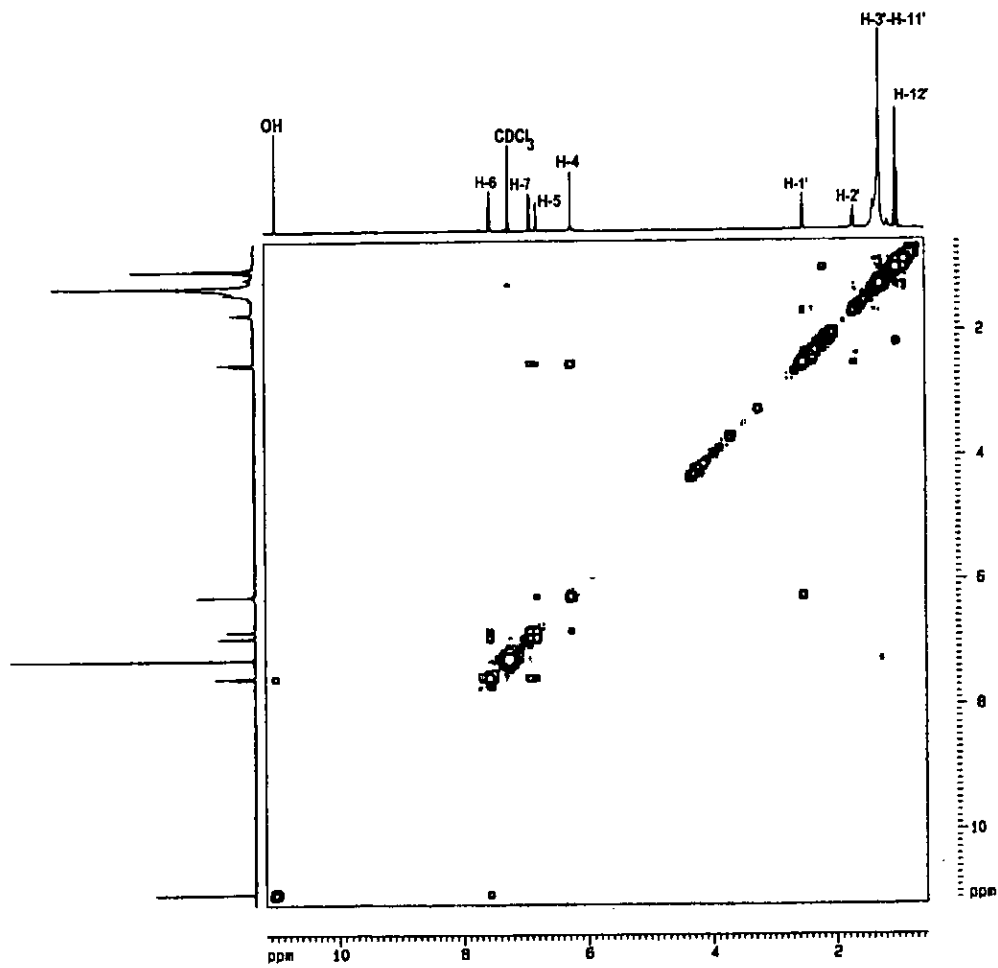
Espectro 11. Espectro en el IR del 3 $\alpha$ - acetilmastichdienoato de metilo (3c).



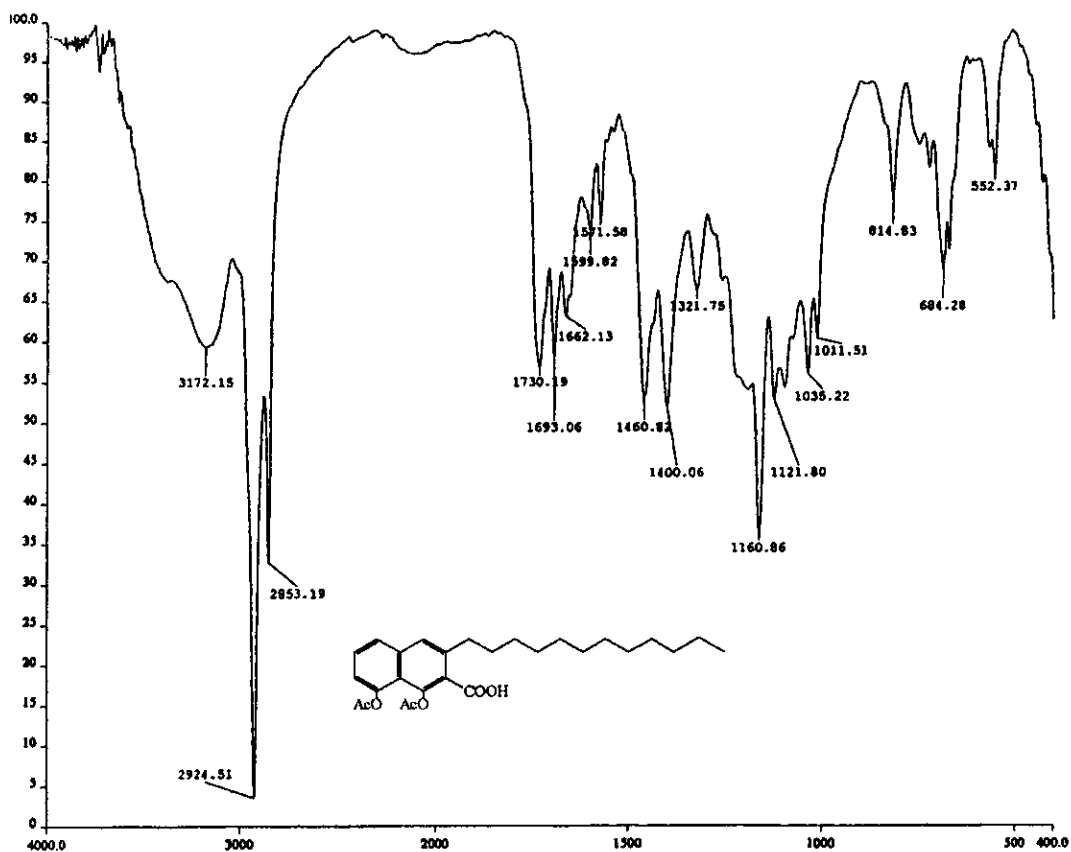
**Espectro 12.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del 3 $\alpha$ - acetimasticadienoato de metilo (**3c**).



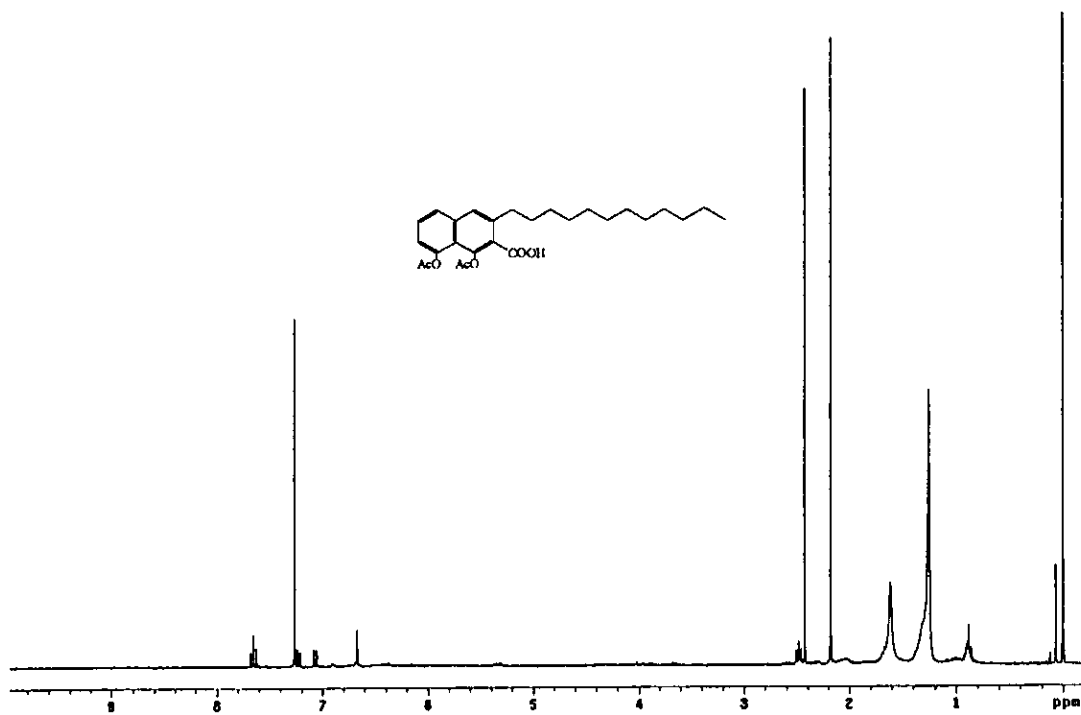
**Espectro 13.** Espectro de RMN modalidad HMQC del ácido 1,8-dodecil-2-naftoico (21).



**Espectro 14.** Espectro de RMN modalidad COSY a larga distancia del ácido 1,8-dodecil-2-naftoico (21).



Espectro 15. Espectro en el IR del ácido 1,8-diacetil-3-dodecil-2-naftoico (21 a).



**Espectro 16.** De  $\text{RMN}^1\text{H}$  del ácido 1,8-diacetil-3-dodecil-2-naftoico (21 a).