



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE LAS SEMILLAS DE
Gliricidia sepium (Leguminosae) Y
DEL EXTRACTO METANOLICO DE
LA RAIZ DE *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae)

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTAN
MAGDALENA FUENTES GALVAN
MARISOL HERNANDEZ ESQUIVEL



MEXICO, D.F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



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	Prof. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Prof. Elvia del Socorro Reynoso Herrera
Secretario	Prof. Rachel Mata Essayag
1er Suplente	Prof. Francisco Aguilar Pérez
2° Suplente	Prof. Blas Flores Pérez

Sitio de realización de la tesis:

Laboratorio 125, Departamento de Farmacia, Edificio E.
Facultad de Química, UNAM.

Asesor:



Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Sustentantes:



Magdalena Fuentes Galván



Marisol Hernández Esquivel

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por la formación académica recibida y por permitirnos un mejor futuro.

A DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN206900.

Al personal técnico de la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación), por el registro de los espectros utilizados en el trabajo que aquí se presenta.

Al STUNAM y a la UNAM por las facilidades otorgadas para la realización de la tesis a través de los permisos brindados a Marisol Hernández E.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro, al profesor Jesús Arrieta Valencia y a sus alumnas Elena y Edith por la asesoría y ayuda en la realización de la evaluación hipoglucemiante.

Al Dr. Alexandre Cardoso Taketa por la asesoría brindada.

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

A los compañeros del laboratorio 125, por su agradable compañía y ayuda durante la realización de esta tesis (Ana Lilia, David, Francisco, Geidi, Nayeli, Martha, Olmo y Victor).

Al Dr. Eugene Bratoeff y a la Dra. Elena Ramírez por su motivación y buenos deseos.

A la Dra. Isabel Aguilar por su asesoría, paciencia, enseñanzas, consejos, agradables pláticas y compañía.

DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida y permitirme alcanzar esta meta.

A mis padres: Celia Galván y Silvino Fuentes por todo su apoyo, comprensión, consejos y cariño incondicional, porque han dedicado gran parte de su vida en formarme y educarme; gracias por todo.

A mis hermanos: Norma, Silvino, César y Rosario por estar a mi lado y por tener su compañía y cariño.

A mis sobrinas Brenda y Jacqueline, porque con su ternura e inocencia alegran mis días, las quiero mucho.

A Raúl por hacer feliz a mi hermana y por su presencia.

A mis amigos: Diana, Marisol, Mireya, Omar y Jorge por brindarme excelentes momentos y porque se que siempre puedo contar con ustedes; gracias, los quiero mucho.

A mis amigos y compañeros de la carrera por su ayuda y compañía; por todos aquellos momentos felices y por los difíciles también, en especial a Ana Elizabeth y Enrique Navoa por su amistad, cariño y apoyo y a todos los que alguna vez formaron parte de “la banquita”.

A Marisol por permitirme compartir este proyecto y por su amistad.

A todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido en mi formación como persona y como profesionalista, gracias.

Magdalena Fuentes Galván

DEDICATORIAS

A mis padres:

Martha Esquivel y Enrique Hernández por darme la vida y la oportunidad de realizar una carrera profesional y darme su apoyo.

A mis hermanas Martha Patricia, Arisbeth, Deisy porque ustedes contribuyeron a que alcanzara esta meta.

A mis sobrinos Luisa, Leonardo y Diego quienes son para mi fuente de alegría y entusiasmo.

A mis abuelitas, tías, tíos y primos.

A mis amigas y amigos de la Facultad Ana Elizabeth, Nallely, Lourdes, Fernando, Lorena, Jovita por todos esos momentos felices que compartimos y de manera muy especial quiero agradecer a Magda por compartir este trabajo conmigo y por su valiosa amistad.

A mis compañeros de trabajo de la Facultad de Medicina: Biol. Teresa Ruenes, Dr. Ernesto Vértiz, Bertha, Héctor†, Laura, Mauricio, Pablo, Lic. Carlos Díaz, Lic. Carolina Galván por sus pláticas siempre tan amenas y sus consejos para ser una profesionalista.

Marisol Hernández Esquivel

CONTENIDO

	Página
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de cuadros.....	ix
Lista de esquemas y figuras.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	2
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo general.....	3
3.2. Objetivos Particulares.....	3
4. ANTECEDENTES	
4.1. Generalidades de <i>Gliricidia sepium</i> (Leguminosae).....	5
4.2. Generalidades de la familia Bignoniaceae.....	14
4.2.1. Usos y principales metabolitos secundarios de algunas especies de la familia Bignoniaceae	15
4.2.2. Generalidades de <i>Parmentiera edulis</i>	18
5.PARTE EXPERIMENTAL	
5.1. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO.....	20
5.2. REACCIÓN GENERAL DE ACETILACIÓN.....	21
5.3. PRUEBA DE BEILSTEIN (identificación de halógenos).....	21
5.4. MATERIAL VEGETAL.....	22

	Página
5.5. ENSAYOS BIOLÓGICOS	
5.5.1. Determinación tóxica en el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.....	22
• Preparación de los organismos y muestras.....	22
• Bioensayo.....	23
 5.6. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE	
<i>Gliricidia sepium</i>.	
 5.6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO	
DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE <i>Gliricidia sepium</i>23	
 5.6.2. PRUEBA DE TOXICIDAD EN <i>Artemia salina</i> DE LOS EXTRACTOS	
OBTENIDOS DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE <i>Gliricidia sepium</i>24	
 5.6.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL	
EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS	
DE <i>G. sepium</i>	25
• Aislamiento de una mezcla de ácidos grasos (01)-(07).....	25
• Aislamiento de un triacilglicerol (08).....	28
• Aislamiento de una mezcla de esteroides: campesterol (09), estigmasterol (10)	
y β sitosterol (11).....	29
• Aislamiento del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo .	
tetracetilado (12).....	33
 5.6.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL	
EXTRACTO HEXÁNICO.....35	
• Obtención del compuesto (13).....	35
• Obtención del compuesto (14).....	36

	Página
5.6.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE <i>Gliricidia sepium</i>	37
• Acetilación del extracto metanólico de las semillas desgrasadas de <i>G. sepium</i>	37
• Fraccionamiento del extracto metanólico acetilado.....	37
• Aislamiento de la <i>O</i> -metil- α -D-galactosa.....	37
5.7. ESTUDIO QUIMICO DE LAS RAICES DE <i>Parmentiera edulis</i>	
5.7.1. EXTRACCIÓN DE LAS RAÍCES DE <i>Parmentiera edulis</i>	39
5.7.2. PRUEBA DE TOXICIDAD PARA <i>Artemia salina</i> DE LA ESPECIE <i>Parmentiera edulis</i>	39
5.7.3. EVALUACIÓN HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LAS RAÍCES DE <i>Parmentiera edulis</i>	40
5.7.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO MeOH.....	42
• Aislamiento de la mezcla de azúcares constituida por 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - acetil- β -D-manopiranosido(16), 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-glucopiranosido (17) y 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - acetil- β -D-glucopiranosido (18).....	43
• Aislamiento e identificación del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D- glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19).....	44

	Página
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
6.1. <i>Gliricidia sepium</i>.....	45
6.1.1. Obtención de los extractos clorofórmico y metanólico de las semillas desgrasadas de <i>Gliricidia sepium</i>	45
6.1.2. Prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i> de los extractos obtenidos de las semillas desgrasadas de <i>Gliricidia sepium</i>	45
6.1.3. Análisis del extracto clorofórmico	46
• Aislamiento de los ácidos grasos (01), (02), (03), (04), (05),(06) y (07).....	47
• Aislamiento de un triacil glicérido (08).....	49
• Aislamiento de la mezcla de esteroides: campesterol (09), estigmasterol (10) y β sitosterol (11).	50
• Aislamiento del 2',3',4',6'-tetra- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo.(12).....	52
6.1.4. Análisis del extracto hexánico.....	53
6.1.5. Análisis del extracto metanólico.....	56
• Aislamiento de <i>O</i> -metil- α -D-galactosa (15).....	56
6.2. <i>Parmentiera edulis</i>.....	57
6.2.1. Obtención de los extractos clorofórmico y metanólico de las raíces de <i>Parmentiera edulis</i>	57
6.2.2. Pruebas biológicas de los extractos clorofórmico y metanólico de las raíces de <i>Parmentiera edulis</i>	57
• Prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i> de las raíces de <i>Parmentiera edulis</i>	57

	Página
• Evaluación hipoglucemiante de los extractos metanólico y clorofórmico de las raíces de <i>Parmentiera edulis</i>	58
6.2.3. Análisis del extracto metanólico.....	62
• Aislamiento de la mezcla de azúcares constituida por 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - acetil- β -D-manopiranosido (16), 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-glucopiranosido (17) y 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> - acetil- β -D-glucopiranosido (18).....	62
• Aislamiento e identificación del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19).....	63
7. CONCLUSIONES	64
8.-BIBLIOGRAFIA	66
ANEXO	72

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	por ciento
>	mayor que
≥	mayor o igual
A. C.	antes de Cristo
AcOEt	acetato de etilo
<i>A. salina</i>	<i>Artemia salina</i>
C.	carbono
°C	grados centígrados
CCF	cromatografía de capa fina
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CHCl ₃	cloroformo
CG-EM	Cromatografía de gases espectrometría de masas
CL ₅₀	concentración letal media
cm	centímetros
COSY	correlación
δ _{13C}	desplazamiento de carbono 13 en ppm
d	doblete
D ₂ O	agua deuterada
dd	doble de dobletes
DEPT	distortionless enhancement polarization transfer
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
g	gramos
<i>G. sepium</i>	<i>Gliricidia sepium</i>
FAB	Fast Atom Bombardment positive
IR	infrarrojo
H	hidrógeno
h	horas
HCl	ácido clorhídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico

Abreviatura	Significado
H ₂ O	agua
<i>J</i>	constante de acoplamiento
KBr	bromuro de potasio
kg	kilogramo
L	litros
m	multiplete
M ⁺	ion molecular
m/z	relación masa/carga
MeOH	metanol
mg	miligramos
MHz	megahertz
min	minutos
mL	mililitros
μL	microlitros
mm	milímetros
N	normal
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
Nm	nanometro
<i>v</i> _{máx}	frecuencia máxima
<i>P. edulis</i>	<i>Parmentiera edulis</i>
pH	concentración de iones H ⁺
ppm	partes por millón
PROBIT	Programa de Análisis de Probabilidad de Finney
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
S	Siglo
s	singulete

Abreviatura	Significado
sa	singulete ancho
SSI	solución salina isotónica
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
tr	tiempo de retención
UV	ultravioleta
umas	unidades de masa atómica

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Metabolitos aislados de <i>Gliricidia sepium</i>	7
Cuadro 2. Usos y principales metabolitos secundarios de especies selectas de la familia Bignoniaceae.....	15
Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de ácidos grasos aislados de <i>G. sepium</i>	26
Cuadro 4. Constantes espectroscópicas del triacilglicerol aislado de <i>G. sepium</i>	28
Cuadro 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de esteroles: campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11) aislados de <i>G. sepium</i>	31
Cuadro 6. Constantes espectroscópicas del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12) aislado de <i>G. sepium</i>	33
Cuadro 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (13) aislado de <i>G. sepium</i>	35
Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (14) aislado de <i>G. sepium</i>	36
Cuadro 9. Constantes espectroscópicas de <i>O</i> -metil- α -D-galactosa (15) aislado de <i>G. sepium</i>	38
Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de azúcares (16), (17) y (18) aislados de <i>P. edulis</i>	43
Cuadro 11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de <i>P. edulis</i>	44
Cuadro 12. Resultados de la prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i> de la especie <i>Gliricidia sepium</i>	45
Cuadro 13. Resultados de la prueba de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> de las fracciones mayoritarias del extracto clorofórmico de las semillas desgrasadas de <i>Gliricidia sepium</i>	46
Cuadro 14. Resultados de la prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i> de la especie <i>Parmentiera edulis</i>	57

	Página
Cuadro 15. Variación de glucemia observada para el extracto MeOH de la raíz de <i>Parmentiera edulis</i>	60
Cuadro 16. Variación de glucemia observada para el extracto CHCl ₃ de la raíz de <i>Parmentiera edulis</i>	60
Cuadro 17. Variación de glucemia observada para el control negativo.....	61
Cuadro 18. Variación de glucemia observada para la Glibenclamida (10 mg/kg) (control positivo).....	61

LISTA DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Página
Esquema 1. Diagrama de extracción de las semillas desgrasadas de <i>G. sepium</i>	24
Esquema 2. Extracción de las raíces de <i>Parmentiera edulis</i>	39
Esquema 3. Experimento para determinar la concentración de glucosa en sangre en los animales de experimentación.....	41
Figura 1. Cromatograma de gases del compuesto (13) aislado de <i>G. sepium</i>	109

1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, dentro de las diferentes culturas del planeta, es conocido el uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades, siendo esto la base de la medicina tradicional.

Los registros más antiguos datan del año 2600 A. C. en Mesopotamia, en los cuales ya se menciona el uso de muchas plantas medicinales, algunas de las cuales se siguen empleando en la actualidad, por ejemplo *Papaver somniferum* (amapola) y *Heterotheca inuloides* (árnica).

Otras civilizaciones antiguas que también cuentan con este tipo de registros son la China, Griega, India, Tibetana y Egipcia, entre otras.

En México, el registro más antiguo de plantas medicinales que se tiene es el del Códice Badiano escrito por Martín de la Cruz en 1552, que fue traducido al latín por Juan Badiano y que contiene la descripción sobre el uso de las plantas medicinales de aquella época, acompañado con ilustraciones a color de las mismas.

Otras obras importantes son: La Historia Natural de la Nueva España (S. XVI) por Francisco Hernández, Cuatro Libros de la Naturaleza y virtudes de las Plantas (S. XVII) por Francisco Ximénes y Las Plantas Medicinales de México (1934) por Maximino Martínez.

En la actualidad, las plantas siguen siendo importantes no sólo por su uso en las prácticas médicas populares y tradicionales, sino también como materia prima que pudiera ser aprovechada para el aislamiento de metabolitos activos y su posterior procesamiento para la producción de nuevos fármacos. Sin embargo, relativamente pocas especies botánicas han sido estudiadas desde un enfoque fitoquímico y/o farmacológico por lo que es necesario un estudio amplio de especies vegetales para obtener sus metabolitos activos que pudieran posteriormente ser aprovechados como fármacos.

2. JUSTIFICACIÓN.

1. Se ha encontrado que las semillas de *Gliricidia sepium* (Leguminosae) presentan un alto contenido de proteínas con gran potencial nutricional (Martínez, 2001). Sin embargo, un estudio nutricional reciente en ratones de las semillas desgrasadas de *G. sepium* resultó en la muerte del 100% del lote empleado. Existen datos en la literatura de la presencia de factores tóxicos en las partes aéreas de esta especie de plantas, como cumarinas y un aminoácido raro presente en las semillas, característico de la especie (cannavanina), considerado como un antimetabolito de la arginina (De la Hidalga, 2003).

Las semillas empleadas en el estudio mencionado en el párrafo anterior habían sido previamente destoxificadas (cannavanina y ácido fítico) por lo que se planteó la necesidad de llevar a cabo el estudio fitoquímico del material destoxificado de las semillas de *G. sepium* para discriminar la presencia de otros factores tóxicos que pudieran estar presentes.

2. La diabetes es un padecimiento que afecta a gran número de la población en México y otros países del mundo (División de informática, 2001; INEGI, 1999; IMSS, 2001). Existen ciertas especies vegetales apreciadas dentro de la medicina tradicional mexicana por sus propiedades antidiabéticas, por lo que puede presumirse un contenido en ellas de metabolitos secundarios activos contra este padecimiento. Una de estas plantas es *Parmentiera edulis*, cuyos usos medicinales se describen en el capítulo de Antecedentes. Hasta el momento del estudio que aquí se presenta, solamente hay datos de evaluaciones biológicas previas a los frutos y no hay datos sobre un análisis de la actividad hipoglucemiante que pudieran tener las raíces de la planta a las que se les confiere propiedades antidiabéticas (Martínez, 1989). A este respecto, existen antecedentes en la literatura de la propiedad antidiabética de *Tecoma stans* (Tronadora), perteneciente a la misma familia de *P. edulis*. Lo anterior, motivó nuestro interés para la evaluación hipoglucemiante preliminar de la raíz de *Parmentiera edulis* y en caso de obtener resultados positivos, proseguir con un estudio biodirigido hacia la búsqueda de los componentes activos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar los principales metabolitos secundarios de las semillas desgrasadas de *Gliricidia sepium* (Leguminosae) y evaluar la actividad potencial hipoglucemiante de la raíz de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae).

3.2. Objetivos Particulares

1. Realizar la investigación bibliográfica de los antecedentes químicos y farmacológicos descritos para las especies *Gliricidia sepium* (Leguminosae) y *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae).
2. Preparar los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las semillas desgrasadas de *Gliricidia sepium* (Leguminosae).
3. Realizar el fraccionamiento primario de los extractos obtenidos de las semillas desgrasadas de *Gliricidia sepium*, mediante un proceso de cromatografía en columna abierta.
4. Aislar los productos naturales contenidos en las fracciones primarias por posteriores procesos cromatográficos (columna abierta o placa fina).
5. Determinar la toxicidad sobre *Artemia salina* Leach de los extractos y fracciones mayoritarias obtenidas de los puntos 2 y 3.
6. Determinar la estructura molecular de los principales componentes de las fracciones secundarias mediante técnicas analíticas espectroscópicas y espectrométricas.

7. Preparar los extractos clorofórmico y metanólico de la raíz de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae).
8. Determinar la toxicidad sobre *Artemia salina* Leach de los extractos del punto 7.
9. Evaluar la actividad potencial hipoglucemiante de los extractos del punto 7.
10. Realizar el fraccionamiento primario de los extractos que resultasen activos en los puntos 8 y 9, mediante un proceso de cromatografía en columna abierta e identificar en su caso, los componentes responsables de la actividad.

4. ANTECEDENTES

4.1. Generalidades de *Gliricidia sepium* (Leguminosae).

Clasificación:

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Fabales
Familia:	Leguminosae
Subfamilia:	Lotoideae
Género:	<i>Gliricidia</i>
Especie:	<i>Gliricidia sepium</i>

Nombres comunes: Cacahuanano, Madre cacao, cacahuananche, cocoite, cocohite, lengua de perico, mata ratón.

Nombre científico: *Gliricidia sepium* (Jacq) Steud.

Sinónimos: *Gliricidia maculata* Steud, *Robinia sepium* (Jacq).

Época de cosecha: febrero–marzo.

Descripción

Árbol pequeño raras veces mayor a 10 m, copa extendida o piramidal, tronco de 30 cm o menos de diámetro, corteza café claro o marrón oscuro, ramas largas cilíndricas frondosas arqueadas y plumosas. Hojas deciduas de color verde brillante, con 7 a 17 folíolos, lanceolado–oblongos a ovado-elípticos, de 3 a 7 cm de largo y de 2 a 3 cm de

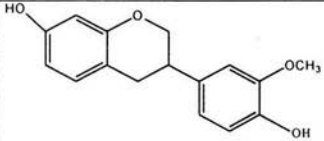
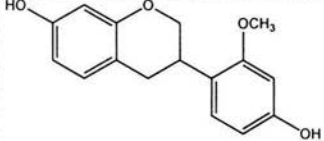
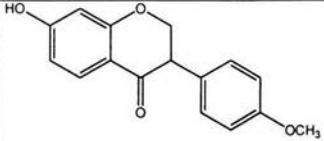
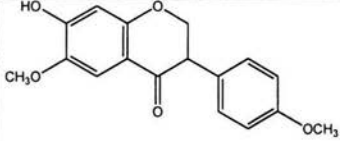
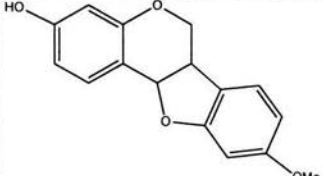
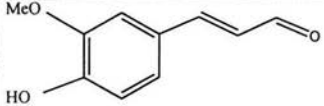
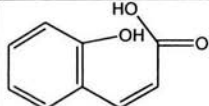
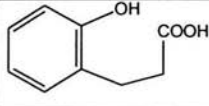
ancho, atenuados en la base y agudo a obtuso-acuminados en el ápice, lámina espaciadamente ceracea en ambas caras. Inflorescencia en racimos de 5 a 10 cm de largo, con muchas flores, brácteas ovadas de 1mm de largo y pedicelos de 5 mm. Flores con el cáliz pulverulento o poco glabro y de 4 a 5 mm de largo; corola de 1.5 a 2 cm de largo de color rosa brillante a casi blanca (Centurión, *et al.*, 2000). El fruto es una legumbre de 10 a 15 cm de largo y de 1 a 1.5 cm de ancho, cortamente estipada glabra y de valvas delgadas, el cual contiene de 8 a 10 semillas lenticulares marrón oscuro de casi 1 cm de diámetro.

Este árbol es utilizado como sombra para plantaciones de cacao y café, como soporte para la vainilla, para cercas y ornato. Se utiliza también como abono verde en los arrozales y como fuente de proteínas para ganado (Chadhokar, 1982). Las hojas se utilizan como alimento para rumiantes pero son venenosas para caballos y perros. También se emplean como remedios caseros en forma de cataplasmas, atribuyéndoseles propiedades antihistamínicas y antipiréticas. En algunos países las flores se comen hervidas o fritas. Las semillas tóxicas así como la corteza, las hojas y las raíces se usan para envenenar ratas, ratones y otros roedores (Centurión, *et al.*, 2000).

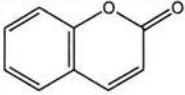
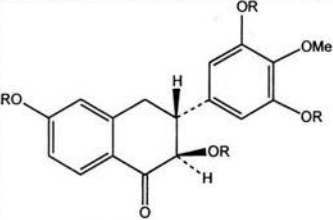
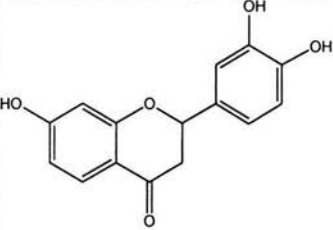
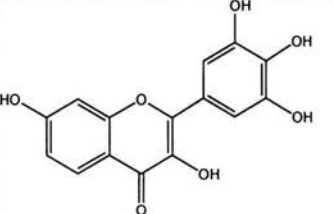
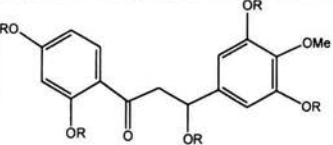
La harina de esta especie puede ser ingrediente muy útil como fuente de pigmentos en alimentación de aves y presenta los siguientes contenidos: carotenos, xantofilas, monohidroxipigmentos y polioxipigmentos (Montilla, *et al.*, 1980). Estudios previos han revelado que todas las partes de la planta tienen actividad insecticida y tienen la capacidad de proteger a las plantaciones de té en Sri Lanka, contra las plagas que dañan dichas plantaciones, esta propiedad de *G. sepium* ha sido encontrada en algunos extractos orgánicos que exhiben atracción olfativa y alta toxicidad hacia la termita *Glyptotermes dilatatus* responsable del daño a las plantaciones del té (Rastrelli, *et al.*, 1999b).

El Cuadro 1 muestra los principales metabolitos secundarios que se han identificado en *G. sepium*.

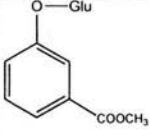
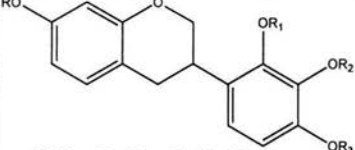
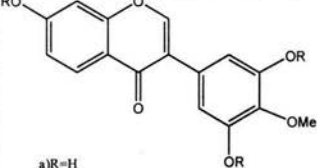
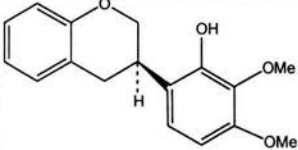
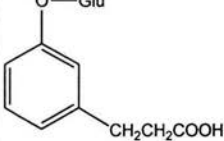
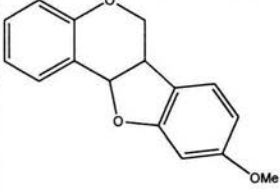
Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium*.

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	7,4'-dihidroxi-3'-metoxiisoflavona	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	isovestitol	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	formonometina	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	afrormosina	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	medicarpina	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído	tronco (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	ácido- <i>O</i> -cumárico	hojas (Herath, <i>et al.</i> , 1998)
	ácido melilótico	hojas (Herath, <i>et al.</i> , 1998)

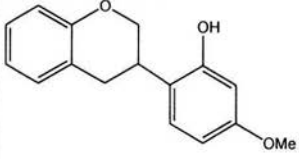
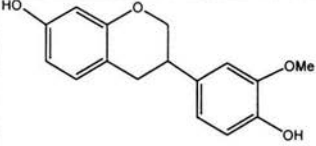
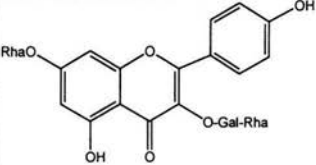
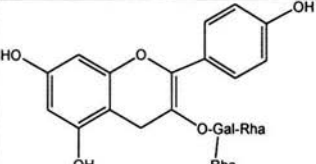
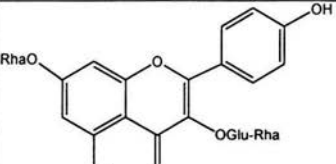
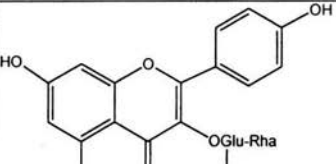
Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia septium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	<p>cumarina</p>	<p>hojas (Griffiths, 1962; Murugesan, 1993)</p>
 <p>a) R=H b) R=Ac</p>	<p>a) sepiol b) 2'-O-metilsepiol</p>	<p>tronco (Manners, 1979 y Manners, 1977)</p>
	<p>butina (flavanona)</p>	<p>tronco (Manners, 1979)</p>
	<p>robinetina (flavonol)</p>	<p>tronco (Manners, 1979 y Manners, 1977)</p>
 <p>a) R=H b) R=Ac</p>	<p>a) gliricidol b) pentacetato de gliricidol</p>	<p>tronco (Manners, 1979)</p>

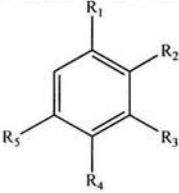
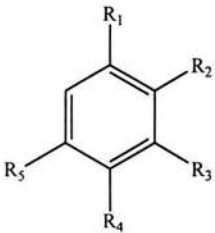
Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	<p>Ester metílico del ácido 3-O-β-D- glucopiranosilbenzoico</p>	<p>hojas (Rastrelli <i>et al.</i>, 1999b)</p>
 <p>a) R=H, R₁=H, R₂=Me, R₃=Me b) R=H, R₁=Me, R₂=H, R₃=Me c) R=Et, R₁=Et, R₂=Me, R₃=Me d) R=Ac, R₁=Ac, R₂=Me, R₃=Me</p>	<p>a) isocionololol b) mucronulolol c) dietoxi- isomucronulolol d) diacetato de (-)-iso mucronulolol</p>	<p>tronco (Manners, 1979)</p>
 <p>a) R=H b) R=Ac</p>	<p>a) gliricidina b) triacetato de gliricidina</p>	<p>tronco (Manners, 1979)</p>
	<p>3R- (-)-isomucronulolol</p>	<p>tronco (Manners, 1979)</p>
	<p>Ácido m-O-β-D- glucopiranosil- hidroxicinámico</p>	<p>hojas (Rastrelli <i>et al.</i>, 1999b)</p>
	<p>medicarpina</p>	<p>hojas (Rastrelli <i>et al.</i>, 1999b)</p>

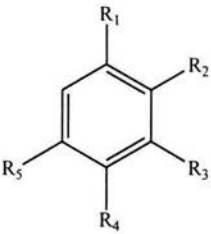
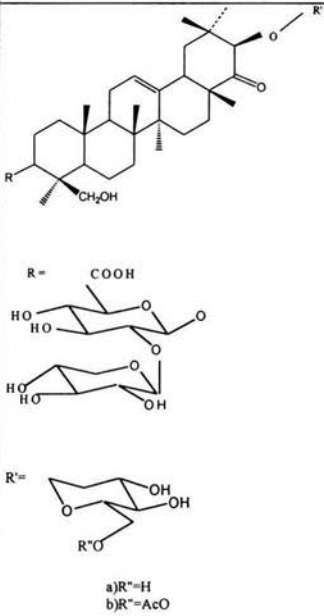
Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	Isoflavan vestitol	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)
	7-4'-dihidroxi-3'-metoxi isoflavano	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)
	3-robinobiosido-7-O- α -L-ramnopiranosido de kaempferol	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)
	3-(2 ^{GAL} -ramnosil-robinobiosido) de kaempferol	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)
	3-rutinósido-7-O- α -L-ramnopiranosido de kaempferol	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)
	3-(2 ^{GLU} -ramnosilrutinosido) de kaempferol	hojas (Rastrelli, <i>et al.</i> , 1999b)

Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	ácido gálico $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_{3,4,5} = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido protocatéquico $R_1 = \text{COOH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_{3,4} = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido p-hidroxibenzoico $R_1 = \text{COOH}$, $R_4 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido gentísico $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{COOH}$, $R_4 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido β-resorcílico	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido vainílico $R_1 = \text{COOH}$, $R_3 = \text{OCH}_3$, $R_4 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido siríngico $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{OGlc}$, $R_3 = \text{OMe}$ $R_5 = \text{CH}_2\text{CHCHCOOH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido-p-cumárico $R_1 = \text{CHCHCOOH}$, $R_4 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido-m-cumárico $R_1 = \text{CHCHCOOH}$, $R_2 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	Ácido-o-cumárico $R_1 = \text{CHCHCOOH}$, $R_3 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)
	ácido ferúlico $R_1 = \text{CHCHCOOH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OH}$	hojas (Murugesan, 1993)

Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
	<p>ácido sinapílico</p> <p>$R_1 = \text{CHCHCOOH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{OMe}$ (trans y cis)</p>	<p>hojas (Murugesan, 1993)</p>
	<p>Vestitol y 2-O-metilvestito</p>	<p>corteza (Rastrelli, <i>et al.</i>, 1999a)</p>
 <p>a) $R'' = \text{H}$ b) $R'' = \text{AcO}$</p>	<p>a) 3-O-β-D-xilopiranosil-(1-2)-β-D-glucopiranosil-3-β, 21β, 24-trihidroxi-22-oxolean-12-en-21-O-β-D-glucopiranosido</p> <p>b) 3-O-β-D-xilopiranosil-(1-2)-β-D-glucopiranosil-3-β, 21β, 24-trihidroxi-22-oxolean-12-en-21-O-β-D-(6-O-acetil)-glucopiranosido</p>	<p>raíces (Rastrelli, <i>et al.</i>, 1999b)</p>

Cuadro 1. Metabolitos aislados de *Gliricidia sepium* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	PARTE ESTUDIADA Y REFERENCIA
<p>e)R=H</p>	<p>a) hederagenin-3-<i>O</i>-(4-<i>O</i>-acetil-β-D-xilopiranosil)-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-α-L-arabinopiranosido</p> <p>b) hederagenin-3-<i>O</i>-(3,4-di-<i>O</i>-acetil-β-D-xilopiranosil)-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-α-L-arabinopiranosido</p> <p>c) hederagenin-3-<i>O</i>-β-D-xilopiranosil-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-α-L-arabinopiranosido</p> <p>d) hederagenin-3-<i>O</i>-(3,4-di-<i>O</i>-acetil-α-L-arabinopiranosil)-(1-3)-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-α-L-arabinopiranosido</p> <p>e) hederagenin-3-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1-2)-α-L-arabinopiranosido</p>	<p>frutos (Herath, <i>et al.</i>, 1998)</p>

Distribución geográfica

Gliricidia sepium se localiza en México, Centroamérica, Sudamérica, las Filipinas y al Sur de Asia.

En México se encuentra principalmente en los estados de Chiapas, Tabasco, Yucatán, Jalisco, Veracruz, Oaxaca, Sinaloa, San Luis Potosí, Guerrero, Estado de México y Nayarit.

4.2. Generalidades de la familia Bignoniaceae

Familia de plantas dicotiledóneas, muy semejante a la de las escrofulariáceas, representada por árboles o arbustos, volubles, trepadores con ayuda de zarcillos foliáceos, frecuentemente lianas, con las hojas opuestas bifoliadas, trifoliadas, pinnado o palmeado-compuestas, rara vez sencilla, sin estípulas; flores hermafroditas irregulares, pentámeras, con corolas labiadas o acampanadas irregulares; 5 estambres casi siempre, de los cuales 4 son didínamos provistos de antenas biloculares e introrsa, y el restante queda reducido a un filamento delgado; ovario envuelto en su base con un anillo granuloso, carnoso, bilocular, con dos placentas multiovuladas en cada cavidad; fruto cápsula poliperma loculicida o septifraga o silicuiforme conteniendo muchas semillas, ordinariamente son un ala membranosa y siempre desprovistas de albumen (Enciclopedia, 1974).

Se conocen unas 450 especies esparcidas por casi todas las regiones cálidas del globo, pero principalmente en América del Sur, de las cuales se conocen dos especies en Panamá y México, una de ellas es la *Parmentiera cerifera* o el árbol de las bujías (Panamá) con frutos amarillos, colgantes, todo el año y que sirve de pasto muy apetecido por el ganado en tiempo seco y *Parmentiera edulis* con fruto de pepino (México), se emplea para combatir el dolor de riñones, y la raíz en el tratamiento de diabetes mellitus y para padecimientos tan diversos como el dolor de cabeza, cálculos biliares, la sordera y la diarrea (Diccionario, 1972).

4.2.1. Usos y principales metabolitos secundarios de algunas especies de la familia Bignoniaceae.

Algunos usos de especies selectas de la familia Bignoniacea se describen en el Cuadro 2 (Argueta, 1994; www.botany.com; www.desert-tropicals.com).

Cuadro 2. Usos y principales metabolitos secundarios de especies selectas de la familia Bignoniaceae.

Nombre de la planta	Usos	Metabolitos
<i>Arrabidaea floribunda</i> (Kunth) Loes	Tratamiento para la tos.	Desconocidos.
<i>Arrabidaea iittoralis</i> (Kunth) Standley	Desconocidos	Desconocidos.
<i>Astrianthus viminalis.</i> Baillon	Tratamiento del mal nefrítico, aborto, paludismo, hepatitis, hemorragia.	En el tallo y raíz: triterpenos, ácidos oleanólico y ursólico, iridoideos, campenósido y 5-hidroxicampenósido y algunos grupos fenólicos, ácido cinámico y p-metoxicinámico.
<i>Crescentia alata</i> (Kunth)	Afecciones respiratorias, trastornos ginecológicos, problemas de la piel, diarrea, disentería, indigestión, úlcera, riñón, dolor de oído, insomnio.	En el fruto: aceites grasos, pepsina ácida, ácido tánico y pectina; en la flor: dos glucósidos de flavonoide, rutinósido y el glucósido de cianidina.
<i>Macfadyena unguiscati</i> (L) A.Gentri	Inflamación intestinal y disminuye la fiebre, muy usada para la mordedura de víbora. Las partes más usadas de la planta son las ramas y hojas.	Desconocidos.

Cuadro 2. Usos y principales metabolitos secundarios de especies selectas de la familia Bignoniaceae (continuación).

Nombre de la planta	Usos	Metabolitos
<i>Crescentia cujete</i> L.	Tratamiento del asma, bronquitis, tos, gripe, fortalecer el pulmón, trastornos de la matriz, provocar o acelerar el aborto, dolor de oído, fiebre, vómito.	En la hoja: ácido cafeico; En la semilla: ácido oleico, linoleico, palmítico y esteárico, glucósidos cianogénicos y polifenoles. En la pulpa del fruto: Glucósidos cianogénicos y los siguientes ácidos cianhídrico, cítrico, clorogénicos y tartárico.
<i>Tabebuia chrysantha</i> (Jacq) Nicholson	Tratamiento de anemia, dolor abdominal y estreñimiento.	Desconocidos
<i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) D.C.	Disminuye la calentura, muy empleada la corteza para la disentería y fiebre, inflamación de estómago y reuma.	En la raíz y el tronco: compuestos quinoides, lapachol y deshidro a y b lapachona. En el tronco: derivados de naftofurandiona, compuestos fenólicos como ácido p-cumárico, monoterpenos isoociósido triterpeno, lupeano y β -sitosterol. En las flores: ácido cafeico, p-hidroxicumárico y ferúlico, glucósido flavonoide y rutinósido de cianidina..

CUADRO 2. Usos y principales metabolitos secundarios de especies selectas de la familia Bignoniaceae (continuación).

Nombre de la planta	Usos	Metabolitos
<i>Tecoma stans</i> (L) Juss ex Kunth "La tronadora"	Diabetes, dolor de estómago, disentería, bilis, gastritis, anorexia, problemas de hígado, fiebre, desinflamación por golpes, analgésico y como tónico en la borrachera y en posparto, en el tratamiento de la sífilis y trastornos ginecobstétricos.	En la hoja: alcaloides monoterpénicos actidina, boshniakina, tecomanina, tecostatina y tecostidina, alcaloides del indol, eslantol y triptamina, compuestos fenólicos como el ácido cafeico, p-cumárico y ferúlico y flavonoides y ácido siríngico. En la flor: flavonoides glucósidos y rutinósido de cianidina.
<i>Cydista potosina</i> (Schum&Loes)Loes	Desconocidos.	Desconocidos.
<i>Kigelia pinnata</i>	Desconocidos.	Desconocidos.

4.2.2. Generalidades de *Parmentiera edulis*.

Clasificación:

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Scrophulariales
Familia:	Bignoniaceae
Género:	<i>Parmentiera</i>
Especie:	<i>Parmentiera edulis</i>

Nombres comunes: Chote, Cuajilote, Guachilote, Guetoxiga, Turi, Cuachilote, Flor de Cuajilote, Huajilote, Pepino de Monte, Platanillo.

Nombre científico: *Parmentiera edulis* DC.

Sinónimos: *Crescentia edulis* Desv., *Crescentia aculeata* Kunth., *Crescentia musaecarpa* Zaldívar ex Heller, *Parmentiera foliosa* Miers., *Parmentiera lanceolata* Miers.

Época de cosecha: todo el año.

Descripción

Árbol de 4 a 9 m (Martínez, 1989) y hasta 15 m de altura (Argueta, 1994), de tronco grueso y leñoso, con numerosas ramas, protegido por espinas cortas (2 espinas en la base de la hoja), las hojas de 5 folíolos oblongo-elípticos y agudos en ambas extremidades, de color verde claro, pecíolos a los lados, las flores son solitarias o en grupo de color verdoso o blanquizco de forma irregular de 5 a 8 cm, creciendo directamente del tronco. Los frutos en forma de plátano de 16 a 19 cm por 2 a 5 cm de ancho de color verde, rojizo o amarillento y

de gran número de semillas morenas y pequeñas, jugosos con sabor dulce y comestible que florece en invierno.

El árbol de pepino o árbol espinoso, tiene virtudes que residen en todo él, su fruto es bueno para puchero y ensalada, también para el mal de orina, para toda purgación y males nefríticos (Enciclopedia, 1974). Los frutos se emplean contra los resfriados y contra la hidropesía; las hojas en casos de inflamación del oído externo o sordera y contra el empacho; la corteza contra la fiebre tifoidea. La infusión preparada con la raíz se usa contra la hidropesía y también se le atribuye propiedades antidiabéticas.

Distribución geográfica

Planta originaria de México y Guatemala.

En México se localiza principalmente en Tamaulipas, San Luis Potosí, Oaxaca, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Morelos, Puebla, Tabasco, Veracruz, Hidalgo y Sinaloa (Argueta, 1994; Martínez, 1989).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. MATERIAL Y EQUIPO UTILIZADO

Para las cromatografías en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm) Merck. El análisis por cromatografía en capa fina tipo analítico se llevó a cabo en placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel Kiesegel 60 F₂₅₄). Como agentes reveladores se emplearon: una lámpara de UV Spectroline modelo CM10 Fluorescence Analysis Cabinet a 254 y 365 nm, solución de sulfato cérico amoniacal (NH₄)₄Ce(SO₄)₄·2 H₂O al 1% en ácido sulfúrico 2 N y solución de cloruro de cobalto (CoCl₂) al 1% en H₂SO₄ 2 N.

Para la separación y purificación de los compuestos por medio de cromatografía en capa fina preparativa se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm y placas de aluminio de 10 x 10 cm recubiertas con el mismo adsorbente con un espesor de 0.25mm (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck y sílica gel Kiesegel 60 F₂₅₄ respectivamente).

Para la purificación de los compuestos por medio de cromatografía en columna abierta se utilizó como fase estacionaria gel de sílice C-18 (fase inversa) y para fase normal gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 mm) Merck.

Para pesar los compuestos obtenidos se utilizó una balanza analítica Explorer Ohaus con alcance de 62 g y una linealidad de ±0.2 mg.

Los espectros en el IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, utilizando la técnica de pastilla de KBr o película.

Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en un espectrómetro de masas HP5890.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN-¹H) y de Carbono 13 (RMN-¹³C) se registraron en un aparato Unity Inova, marca Varian VXR-300S, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz; empleando CDCl₃ o Piridina-d₅ como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los análisis espectroscópicos y espectrométricos anteriormente citados se realizaron en la Unidad de Servicios de apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

5.2. REACCIÓN GENERAL DE ACETILACIÓN

Se acetilaron 100 mg de compuesto o fracción con 1 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina con agitación magnética y a temperatura ambiente durante 24 h. Al cabo de este tiempo se añadieron 5.0 g de hielo/agua y se aciduló con HCl al 10 %. Se extrajo con tres porciones de 15 mL cada una de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con tres porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO₃, tres porciones de 5 mL de agua y finalmente el extracto orgánico se secó con Na₂SO₄ anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los componentes acetilados (Shriner, 1997).

5.3. PRUEBA DE BEILSTEIN (identificación de halógenos)

En el extremo de un alambre de cobre se forma un anillo pequeño y se calienta en la llama de un mechero Bunsen hasta que la llama quede incolora. Se enfría el alambre; el anillo se introduce en el compuesto original, tomando un poco de éste y se calienta en la orilla de la llama del mechero. Una llama verde indica presencia de halógenos (Shriner, 1997).

5.4. MATERIAL VEGETAL

Las raíces de *Parmentiera edulis* se recolectaron en julio del 2001 en Los Cuajilotes estado de Morelos en el municipio de Tlayacapan. La identificación de la planta estuvo a cargo de la bióloga Gilda Ortiz y una muestra de esta especie se conserva en el Herbario Nacional de México (MEXU), en el Instituto de Biología con el número de registro 1023315.

Las semillas de *Gliricidia sepium* se recolectaron en mayo del 2000 en el estado de Guerrero y fueron identificadas por los biólogos Carlos Monroy y Alberto Correa del Instituto de Biología de la UNAM en 1979. Posteriormente se molieron y desgrasaron exhaustivamente con hexano en un aparato Soxhlet de acuerdo al método empleado por De la Hidalga (2003).

5.5. ENSAYOS BIOLÓGICOS

5.5.1. Determinación tóxica en el crustáceo *Artemia salina* Leach.

Preparación de los organismos y muestras.

Se preparó una solución de agua de mar comercial (38 g de medio salino artificial por litro de agua destilada), dentro de un recipiente de vidrio previamente acondicionado con una bomba de oxígeno, un termómetro y una lámpara. Se adicionaron los huevecillos de *Artemia salina* Leach y se dejaron en maduración durante 48 h a 28 °C. Al cabo de este tiempo, se disolvieron 20 mg de cada muestra (extracto o fracción) en 2 mL de un disolvente adecuado. De esta solución se transfirieron 500, 50 y 5 μ L a frascos viales. Posteriormente, se evaporó completamente el disolvente de cada frasco con corriente de nitrógeno y cada uno de los residuos se aforó a 5 mL con medio salino artificial (Ocean Instant), con lo que se obtuvieron concentraciones de 1000, 100 y 10 μ g/ml, respectivamente. La prueba con cada muestra se realizó por triplicado (Meyer *et al.*, 1982 y McLaughlin, 1991).

Bioensayo

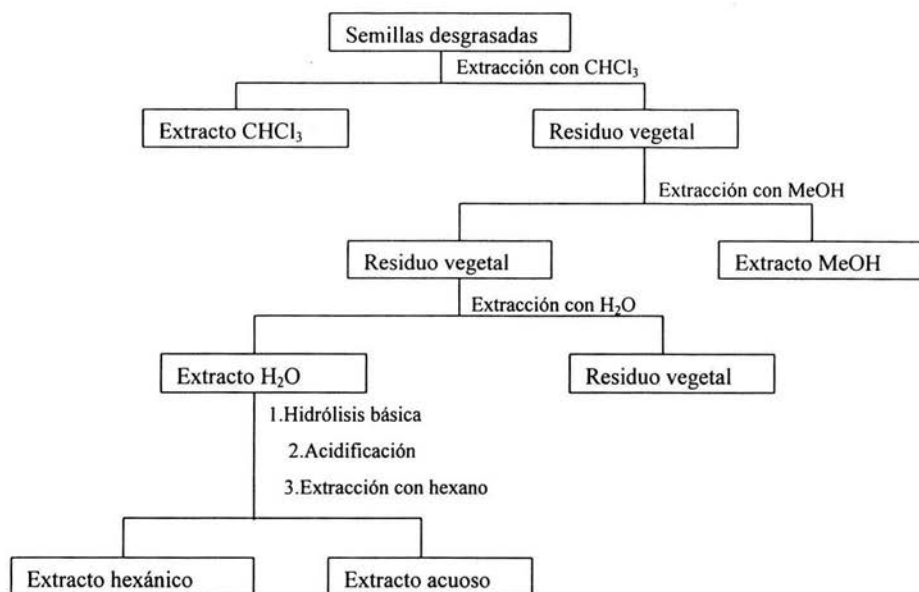
Se realizó transfiriendo 10 larvas de *Artemia salina* dentro de cada vial que contenía la muestra por evaluar. Después de 24 h de contacto entre las larvas y la muestra a 28 °C, se contaron los crustáceos sobrevivientes (Teng, 1993) y el resultado se expresó por medio de la CL_{50} calculada mediante el programa PROBIT (Liebermann, 1983).

Para la interpretación de los resultados, se considera que un extracto o fracción es tóxico para el crustáceo, si presenta un valor de $CL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ y en el caso de compuestos puros, un valor de $CL_{50} < 200 \mu\text{g/mL}$ indica toxicidad (Mata, 2000).

5.6. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*

5.6.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*.

Las semillas secas, molidas y desgrasadas (496 g), se extrajeron con 3 L de CHCl_3 mediante un proceso de maceración hasta agotarlas, resultando 11.87 g del extracto clorofórmico. Posteriormente las semillas se extrajeron con MeOH por maceración (3 L) resultando 15.4 g del extracto metanólico y finalmente se realizó una maceración con H_2O destilada. Este último extracto contenía residuos de MeOH de la extracción previa, los cuales se eliminaron por evaporación en rotavapor y el extracto acuoso remanente se basificó con NaOH 2 N hasta $\text{pH}=10$ y se calentó a 40 °C en parrilla con agitación durante 2 horas; al cabo de ese tiempo el extracto se aciduló con HCl 2N hasta $\text{pH}=4.5$ y posteriormente se extrajo con hexano, resultando 15.5 mg de un residuo de color amarillo. El procedimiento anterior se encuentra en el Esquema 1.



Esquema 1. Diagrama de extracción de las semillas desgrasadas de *G. sepium*.

5.6.2. PRUEBA DE TOXICIDAD EN *Artemia salina* DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*.

Se realizó la prueba de toxicidad sobre el crustáceo *Artemia salina*, de los extractos clorofórmico y metanólico de las semillas desgrasadas de *G. sepium* de acuerdo al método descrito en el punto 5.4.1. Los resultados de dicha prueba se muestran en el Cuadro 12 (Capítulo 6).

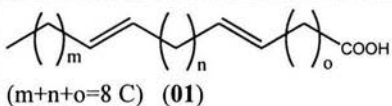
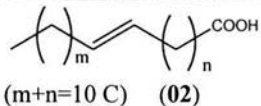
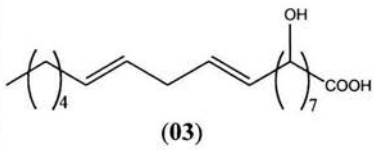
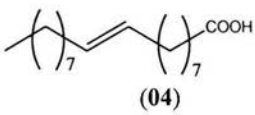
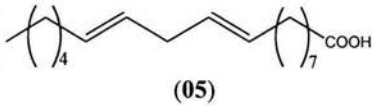
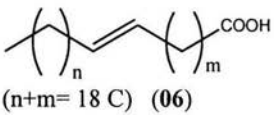
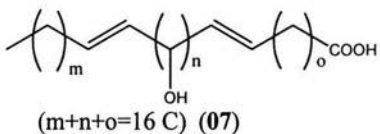
5.6.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *G. sepium*.

Se adsorbieron 11.8 gramos del extracto clorofórmico disueltos en CHCl_3 en la suficiente cantidad de gel de sílice y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicaron en una columna cromatográfica de gel de sílice de 4.5 cm de diámetro y 60 cm de largo, en proporción 1:20 (g de muestra por g de gel de sílice), que se eluyó con una mezcla de CHCl_3 -acetona de polaridad creciente, obteniéndose un total de 298 fracciones primarias de 75 mL, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, resultando 34 fracciones, numeradas secuencialmente de FC01 a FC34. A las fracciones mayoritarias se les realizó la prueba de toxicidad con *Artemia salina* y los resultados se muestran en el Cuadro 13 (Capítulo 6). Del fraccionamiento anterior se logró aislar una mezcla de ácidos grasos de FC02 ((01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07)), un triacilglicerol de FC04 (08), una mezcla de esteroides de FC26-27 ((09), (10) y (11)) y β -sitosterol glicosidado de FC30 (12).

Aislamiento de una mezcla de ácidos grasos

De la fracción FC02 se obtuvo un semisólido ámbar opalescente (34 mg) que por cromatografía en capa fina mostró una sola mancha y fue enviado a CG-EM, IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C ; el cromatograma de gases obtenido reveló que se trataba de una mezcla de ácidos grasos, los cuales se identificaron como ácido tetradecadienoico (01), tetradecaenoico (02), hidroxilinoico (03), oleico (04), linoleico (05), docosaenoico (06) e hidroxidocosadienoico (07) (Aldrich, 1985 y Hilditch, 1956). Las características espectroscópicas de dichos compuestos se resumen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de ácidos grasos aislados de *G. sepium*.

 	
 	
 	
	
Fórmulas moleculares	$C_{14}H_{24}O_2$ (01), $C_{14}H_{26}O_2$ (02), $C_{18}H_{32}O_3$ (03), $C_{18}H_{34}O_3$ (04), $C_{18}H_{32}O_2$ (05), $C_{22}H_{42}O_2$ (06) y $C_{22}H_{40}O_3$ (07).
IR ν_{\max} .(película) cm^{-1} (Espectro 1)	3300 (OH), 3000 (-CH=CH y -CH-), 2923 (-CH st), 2852 (-CH ₂ y -CH ₃), 1737 (O-C=O), 1657 (C=O st), 1463 (-CH ₃ y -CH ₂), 1377 (-CH ₃), 1171 (-C-O), 721 ((CH ₂) _n n>4).
EMIE m/z (%) tr=11.74 min (01)	224 [M ⁺] (9.6), 196 (6.4), 182 (3.2), 170(3.2), 154(6.4), 140(9.7), 125(22.6), 111(54.8), 97(90.3), 83(100), 69(77.4), 57(83.9), 55(83.9), 43(58).
tr=11.82 min (02)	226 [M ⁺] (19.3), 197(6.2), 183(6.2), 169 (9.4), 155(9.4), 141(12.5), 127(12.5), 113(15.6), 99(21.9), 85(62.5), 71(84.4), 57(100), 43(46.8), 41(18.6).

Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de ácidos grasos aislados de *G. sepium* (continuación).

EMIE m/z (%)	
tr=17.39 min (03)	296 [M ⁺] (16.12), 287 (3.2), 264(100), 236(9.7), 222(48.4), 220(16.1), 194(6.4), 180(25.8), 166(12.9), 152(12.9), 137(16.1), 123(22.58), 110(29), 97(54.8), 83(58), 69(67.7), 55(74.2), 43(32.2), 41(25.8).
tr=17.64 min (04)	298 [M ⁺] (12.5), 2.86(1.6), 2.69 (6.2), 2.55 (10.9), 2.41(3.12), 2.27 (0.16), 213 (3.12), 199(6.2), 185(3.1), 171(1.56), 157(3.12), 143(24.9), 129(9.4), 115(3.12), 101(6.2), 87(76.56), 74(100), 55(24.87), 43(25), 41(12.5).
tr=17.72 min (05)	280[M ⁺] (64.6), 253 (6.1), 226 (9.2), 219 (6.1), 196(12.3), 182 (15.4), 154 (13.8), 140 (21.5), 109 (43), 95 (70.7), 81 (96.9), 67 (100), 57 (76.9), 43(36.9), 41(33.8).
tr=20.06 min (06)	338[M ⁺] (15.1), 309 (3), 295(6.1), 2.81 (6.1), 267 (7.6), 153(6.1), 239 (7.6), 2.25(12.1), 211(12.1), 197(12.1), 183(12.1), 169(12.1), 155(12.1), 141(19.7), 127(18.2), 113(24.2), 99(27.3), 85(63.6), 71(90.9), 57(100), 43(28.8), 41(9.1).
tr=20.91 min (07)	352 [M ⁺] (4.6), 313(3.1), 295(3.1), 281(3.1), 239(4.6), 225(4.6), 197(6.2), 169(6.2), 127(12.3), 113(18.5), 99(20), 85(60), 71(75.4), 57(100), 43(47.7).

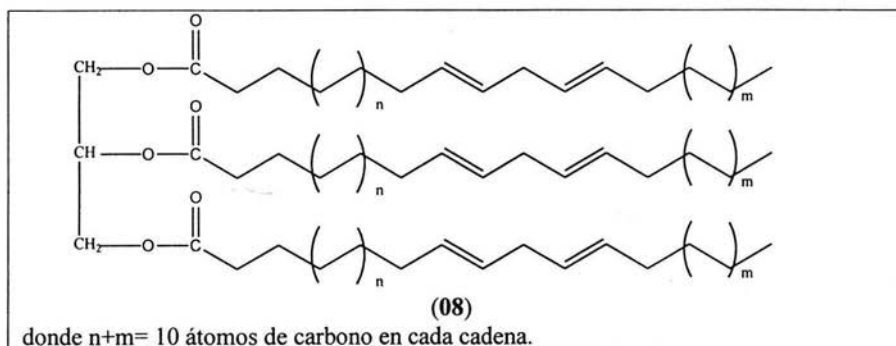
Cuadro 3. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de ácidos grasos aislados de *G. sepium* (continuación).

<p>RMN-¹H (CDCl₃) (Espectro 2)</p>	<p>5.35 (m, -CH=CH-), 5.12 (m, -CH=CH-), 4.59 (d, <i>J</i>: 7.5 Hz), 2.77 (H, doblemente alílico), 2.28 (t, -CH₂-CO), 2.02 (m, -CH₂-alílico), 1.64 (s, -(CH₂)_n-), 1.24 (sa, -(CH₂)_n-), 0.85 (m, CH₃-).</p>
<p>RMN-¹³C (CDCl₃) (Espectro 3)</p>	<p>173.2, 173.2, 172.7, (3 x O-CO-CH₂-), 130.2, 130, 128.0, 127.9, 122.5, 124.4, 124.3 (-CH=CH-, 73.6, (-CH-OH-), 38.1, 34.8, 34.7, (-CH₂-COO-), 32.1 (-CH-COO-), 31.9, 31.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 29.1 (-(CH₂)_n-), 27.9 (=CH-CH-), 39.7, 31.9, 27.2, 26.7, 26.6 (=CH-CH₂-CH₂-), 25.7 (CH₃-), 25.6, 25.1 (=CH-CH₂-CH=), 19.8, 19.7, 19.3, 19.1, 14.1, 14.0, 11.9, 11.8 (-CH₃).</p>

Aislamiento de un triacilglicerol

De la fracción FC04 se obtuvo un semisólido blanquecino (1.4 g) que por cromatografía en capa fina mostró una sola mancha. Fue enviado a CG-EM, IR, RMN-¹H y RMN-¹³C y se identificó como un triacilglicerol (**08**) (Jiang, 1990 y Shoolery, 1977). Las características espectroscópicas de este compuesto se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Constantes espectroscópicas del triacilglicerol aislado de *G. sepium*.



Cuadro 4. Constantes espectroscópicas del triacilglicerol aislado de *G. sepium* (continuación).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (Espectro 4)	3008 (-CH=CH), 2923 y 2853 (-CH alifático, -CH ₂ y -CH ₃), 1745 (O-C=O), 1465 (-CH ₃ y -CH ₂), 1377 (-CH ₃), 1162 (C-O), 722 ((CH ₂) _n , n>4).
RMN- ¹ H (CDCl ₃) (Espectro 5)	5.36 (m, -CH=CH-), 5.33 (m, -CH-OCO-), 4.14 y 4.29 (-CH ₂ -OCO-), 2.77 (H doblemente alílicos), 2.31 (-CH ₂ -COO-), 2.07 (=CH-CH ₂ -), 1.60 (m, -OOC-CH ₂ -CH ₂ - ó =CH-CH ₂ -CH ₂ -), 1.31(-(CH ₂) _n -), 1.25 (-(CH ₂) _n -), 0.88 (m, CH ₃ -).
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) (Espectro 7)	173.24, 173.2, 172.7, (3 x O-CO-CH ₂ -), 130.1, 129.97, 129.95, 129.6, 129.6, 128, 127.8 (-CH=CH-), 68.8 (-CH-OCO-), 62 (-CH-CH ₂ -OCO-), 34.1, 34.03, 34.01 (-CH ₂ -COO-), 31.91, 31.98, 31.51, 29.75, 29.68, 29.64, 29.61, 29.51, 29.47, 29.34, 29.33, 29.31, 29.26, 29.18, 29.16, 29.11, 29.07, 29.03 (18x-(CH ₂) _n -), 27.18 (=CH-CH ₂ -CH ₂ -), 25.61 (-CH-CH ₂ -CH-), 24.85 (-OOC-CH ₂ -CH ₂ -), 22.67, 22.56, (=CH-CH ₂ -CH ₂ -), 14.09, 14.04 (CH ₃).

Aislamiento de una mezcla de esteroides: campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11)

De las fracciones FC26 y FC27 precipitó un sólido cromatográficamente similar, el cual se juntó, lavó con CHCl₃ y denominó FC26-I (48 mg). Esta fracción que por CCF, presentó un compuesto mayoritario que adquirió una coloración violeta al revelarse con solución de cloruro de cobalto en H₂SO₄, se sometió a un fraccionamiento secundario vía cromatografía en microcolumna abierta de 0.8 cm de diámetro y 21 cm de largo, utilizando como adsorbente gel de sílice y como sistema de eluyentes hexano-CHCl₃ (diversas proporciones). Se obtuvieron 32 fracciones (de 5 mL cada una) que se agruparon en 3 fracciones mayoritarias con base en su similitud cromatográfica y se les denominó FC26-IA, FC26-IB y FC26-IC, respectivamente.

La fracción FC26-IB presentó en CCF el compuesto mayoritario violeta al revelado y otros 5 compuestos minoritarios, por lo que se sometió a un tercer fraccionamiento vía cromatografía en microcolumna abierta de 0.8 cm de diámetro y 21 cm de largo, utilizando como adsorbente gel de sílice y como eluyente CHCl_3 . Se obtuvieron 45 fracciones de 5 mL cada una, que se agruparon con base en su similitud cromatográfica, en 5 fracciones mayoritarias denominadas FC26-IB1, FC26-IB2, FC26-IB3, FC26-IB4 y FC26-IB5.

La fracción FC26-IB3 contenía dos compuestos: el compuesto violeta al revelado y otro compuesto minoritario, el cual se eliminó realizando un último fraccionamiento vía cromatografía en microcolumna abierta fase inversa de 0.8 cm de diámetro y 21 cm de largo, utilizando como eluyentes acetonitrilo-etanol en diversas proporciones; así se obtuvieron 45 fracciones de 5 mL cada una que se agruparon en 4 fracciones mayoritarias, en base a su similitud cromatográfica y se les denominó FC26IB3a, FC26IB3b, FC26IB3c y FC26IB3d. De esta última fracción se obtuvieron 8 mg de un sólido blanquecino (compuesto de interés), que al ser analizado mediante sus espectros de IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y CG-EM se concluyó que estaba integrado por dos ácidos grasos, campesterol (**09**), estigmasterol (**10**) y β -sitosterol (**11**) (Aldrich, 1986; Della Greca, 1990; Geng, 1988 y Lynne, 1993). Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos anteriores se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de esteroides: campesterol (09), estigmasterol (10) y β-sitosterol (11) aislados de *G. sepium*.

<p>R=Azúcar de 5 carbonos o cadena de ácido graso (16 o 18 átomos de carbono)</p>	
Fórmula molecular	Campesterol (09) C ₂₈ H ₄₈ O, estigmasterol (10) C ₂₉ H ₄₈ O y β-sitosterol (11) C ₂₉ H ₅₀ O
IR v _{máx} (película) cm ⁻¹ (Espectro 9)	3350 (-OH), 2924, 1465 y 1376 (C-H alifáticos, -CH ₃ y -CH ₂), 2852 (-CH), 1732 (O-C=O), 1665 (C=C), 1257 y 1171 (C-O), 1080 (-CH ₃), 1021 (C-O), 721 ((CH ₂) _n , n>4).
EMIE m/z (%)	
tr=16.04 min	278 [M ⁺] (2.2), 239(100), 227(2.2), 213(48.8), 199(8.8), 185(20), 171(20), 157(17.7), 143(6.6), 129(51.1), 115(17.7), 97(17.7), 85(24.4), 73(77.7), 60(53.3), 57(42.2), 43(31.1), 41(15.5).
tr=17.99 min	284 [M ⁺] (100), 267(2.1), 256(6.5), 242(6.5), 241(39.1), 227(0.4), 213(4.3), 199(8.6), 185(26), 171(8.6), 157(4.3), 143(4.3), 129(39.1), 115(10.8), 97(15.2), 85 (17.3), 73(47.8), 60(32.6), 57 (32.6), 43(19.5), 39(2.1).

Cuadro 5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de esteroides: campesterol (**09**), estigmasterol (**10**) y β -sitosterol (**11**) aislados de *G. sepium* (continuación).

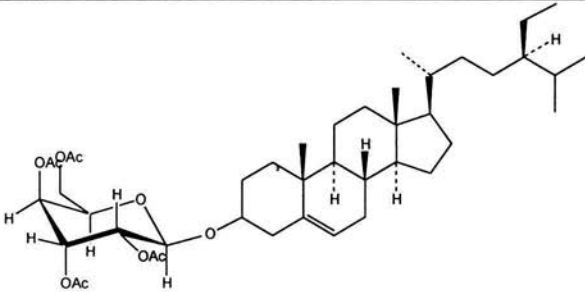
tr=28.10 min (09)	400[M ⁺] (100), 382(75.5), 367(42.2), 340(8.8), 315(40), 289(55.5), 273(20), 255(26.6), 231(17.7), 213(31.11), 199(8.8), 161(20), 145(26.6), 133(15.5), 107(24.4), 95(17.7), 81(17.7), 43(11.1)
tr=28.57 min (10)	412[M ⁺] (100), 394(31.1), 369(28.8), 351(42.2), 327(4.4), 300(35.5), 271(46.6), 255(73.3), 229(8.8), 213(22.2), 199(0.8), 159(31.1), 145(24.4), 133(26.6), 97(22.2), 83(33.3), 81(26.6), 55(24.4), 43(4.4)
tr=29.54 min (11)	414[M ⁺], 396(100), 381(60.8), 354(36.9), 329(34.7), 303(47.8), 273(19.5), 255(26), 231(39.1), 213(26), 199(6.5), 159(17.3), 145(21.7), 133(13), 107(19.5), 95(15.2), 81(13), 43(10.8)
RMN- ¹ H (CDCl ₃) (Espectro 10)	5.36 (H-6), 4.96 (H-1'), 4.84 (dd, J=5.4, 6.0; H-2'), 4.07 (H-3'), 4.05 (H-4'), 3.9 (m, H-3) ((09), (10), (11)), 2.36 (t CH ₂ -COO-), 2.17 (m CH ₂ alílicos), 1.86 (H-4 y H-7) ((09), (10), (11)), 1.59 y 1.61 (m, CH ₂ -CH ₂ -COO), 1.35 (H-20 y H-24) (10), 1.24 ((CH ₂) _n), 0.97 (H-24) ((09) y (11)), 0.955 (H-20) ((09) y (11)), 0.92 (H-25) ((09) y (11)), 0.95 -0.657 (H-18, H-19, H-24', H-24'', H-26 y H-27)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) (Espectro 11)	174.1 (-COO-), 141.5 (C-5), 135.3 (C-22)(10), 123.2 (C-23) (10), 122.4 (C-6) ((09), (10) y (11)), 103.3 (C-1'), 79.3 (C-3), 75.7, 72.2, 65.2, 57.4 (C-20) (11), 56.8 (C-20) (09),
RMN ¹³ C (CDCl ₃) (Espectro 11)	50.9 (C-25) ((09) y (11)), 46.6 (C-24) ((09) y (11)), 43 (C-13) ((09), (10) y (11)), 39.9 (C-2) ((09), (10) y (11)), 37.5 (C-10)((09), (10) y (11)), 36.9 (C-20 y C-24) (10), 20.5, 19.9, 19.7, 19.5, 14.7. 13.1, 12.6, 12.5 (C-18, C-19, C-24', C-24'', C-26 y C-27).

Aislamiento del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12)

Acetilación de la fracción FC30

De la fracción FC30 se separó un sólido (15.5 mg) insoluble en todos los disolventes (hexano, CHCl_3 , acetona, MeOH y agua) del cual se acetilaron 9.8 mg de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2, resultando un sólido blanco, aparentemente puro por CCF, el cual se identificó mediante el análisis de sus espectros de IR, RMN- ^1H y RMN- ^{13}C como el β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12) (Aldrich, 1986; Della Greca, 1990; Geng, 1988 y Lynne, 1993).

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12) aislado de *G. sepium*.

 <p>(12)</p>	
Fórmula molecular	$\text{C}_{43}\text{H}_{68}\text{O}_{10}$
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (Espectro 12)	2959 (-CH), 2868 (-CH alifáticos, - CH_2 y - CH_3), 1752 (O-C=O), 1464 y 1376 (- CH_3 y - CH_2), 1223 y 1039 (- CH_3), 907 (=C-H).

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (**12**) aislado de *G. sepium* (continuación).

<p>RMN-¹H (CDCl₃) (Espectro 13)</p>	<p>5.35 (d, $J=5.09$; H-6), 5.20 (dd, $J=9.59, 9.59$; H-3'), 5.07 (dd, $J=9.59, 9.59$; H-4'), 4.95 (dd, $J=8.09, 9.59$; H-2'), 4.6 (d, $J=7.79$; H-1'), 4.25 (dd, $J=12.28, 4.79$; H-6a'), 4.10 (dd, $J=12.28, 2.39$; H-6b'), 3.67 (m; H-5'), 3.48 (m; H-3), 2.26 (-H-4), 2.07, 2.05, 2.02, 2.00, (4x CH₃-), 1.95 (-H-7a), 1.82 (H-1), 1.65 (H-25), 1.56 (H-15), 1.47 (H-11), 1.43 (H-7b), 1.42 (H-8), 1.37 (H-20), 1.25(H-2), 1.25 (H-24'), 1.08 (H-17), 1.14 (H-23), 0.98 (H-19), 0.95 (H-14), 0.91 (H-24), 0.90 (H-21), 0.86 (H-9), 0.82 (H-24''), 0.82 (H-26), 0.80 (H-27), 0.67 (H-18).</p>
<p>RMN-¹³C (CDCl₃) (Espectro 14) Espectro flock (Espectro 15)</p>	<p>170.6, 170.3, 169.3, 169.2 (4x-COO-), 140.3, (C-5) (Flock H-19), 122.1 (C-6), 99.6 (C-1'), 80.0 (C-3), 72.9 (C-3'), 71.6 (C-5'), 71.5 (C-2'), 68.5 (C-4'), 62.1 (C-6'), 52.7 (C-14), 56.0 (C-17), 50.1 (C-9), 45.8 (C-24), 42.3 (C-13) (Flock H-18), 39.7 (C-12) (Flock H-18), 38.9 (C-4), 37.1 (C-1), 36.7 (C-10) (Flock H-19), 36.1 (C-20) (Flock H-21), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7), 31.8 (C-8), 29.4 (C-2), 29.1 (C-25) (Flock H-26), 28.2 (C-16), 26.0 (C-23), 24.2 (C-15), 23.0 (C-24'), 21.0 (C-11), 20.7, 20.7, 20.6, 20.5 (4 x CH₃COO-), 19.8 (C-26) (Flock H-27), 19.3 (C-19) (Flock H-9), 19.0 (C-27) (Flock H-26 y H-24), 18.7 (C-21), 11.9 (C-24''), 11.8 (C-18).</p>

5.6.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

Se adsorbieron 15.5 mg del extracto hexánico disueltos en CHCl_3 en la suficiente cantidad de gel de sílice y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicaron en una micro columna cromatográfica de gel de sílice de 8.0 cm y 0.6 cm de diámetro, que se eluyó con una mezcla de hexano-AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose un total de 51 fracciones primarias de 25 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica resultando 8 fracciones que se denominaron como FH01 hasta FH08.

Obtención del compuesto (13)

De la fracción FH03 se obtuvieron 3 mg de un sólido amarillo (13) ($r_f=0.40$, hexano-AcOEt 8:2), cuyas constantes espectroscópicas y espectrométricas se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.

Fórmula molecular	$\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm^{-1} (Espectro 16)	3374 (-OH), 3118, 2921 y 2852 (CH=CH, -CH ₂ y -CH ₃), 1695 (N-C=O), 1571(NH ó C-N), 1479 (C-N), 1337 y 1277 (=CH), 1236 (C-O ó C-N), 967 y 935 (CH=CH), 895 (-CH ₃), 861(=CH oop), 758 y 747 (C-Cl), 633 y 577 (C-Cl st)
EMIE m/z (%) $t_r=20.17$ (Espectro 17)	252 [M^{+4}] (2.25), 250 [M^{+2}] (11.29), 248 [M^{+1}] (17.6), 206 (100), 162 (11.7), 160 (19.1), 133 (8.8), 112 (2.2), 97 (5.8), 88 (2.9), 43 (30.1)
RMN- ¹ H (CDCl_3) (Espectro 18)	10.32 (1H, sa, -OH), 9.07 (1H, s, H-C sp^2), 8.34 (1H, s, H-C sp^2), 2.31 (3H, s, CH ₃ -CO ó CH ₃ -N), 1.63 (sa, -NH-)
RMN- ¹³ C (CDCl_3) (Espectro 19)	168.9 (COOH ó CONH), 141.1 (C sp^2), 133.8 (C sp^2), 126.8 (-CH=CH-), 123.2 (-CH=CH-), 25.6 (CH ₃ -CO ó CH ₃ -N)

Obtención del compuesto (14)

De la fracción FH05 se obtuvieron 5 mg de un sólido amarillo (14) en forma de agujas (rf=0.14, hexano-AcOEt 8:2), sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.

Fórmula molecular	C ₈ H ₇ Cl ₂ N ₃ O ₂
Punto de fusión (°C)	125-128
IR ν _{máx.} (película) cm ⁻¹ (Espectro 21)	3225 (-OH ó NH), 3100, 2925, 2854 y 1660 (-CH aromáticos y alifáticos), 1731 y 1715 (terftalato de isooctilo contaminación), 1687 (O-C=O ó N-C=O), 1548, 1358 y 1283 (=CH ó C-N st), 1270 (-C-N st), 878 (-CH ₃), 829 y 768 (C-Cl), 665 (-N-H oop)
EMIE m/z (%) tr=10.20 min (Espectro 22)	252 [M ⁺⁴] (1.34), 250 [M ⁺²] (9.39), 248 [M ⁺] (15.2), 206 (100), 176 (5.08), 160 (20.3), 124 (11.8), 112 (1.6), 97 (4.2), 88 (3.3), 43 (30.5)
RMN- ¹ H (CDCl ₃) (Espectro 23)	8.17 (d, J=9), 7.81 (sa), 7.59 (dd; J=0.3, 9.3.), 2.21 (s, CH ₃ -CO ó CH ₃ -N), 1.83 (sa, -NH-)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) (Espectro 24)	168.3 (COOH ó CONH), 132.5 (-CH=CH-), 130.9 (C sp ²), 125.4 (C sp ²), 122.8 (-CH=CH-), 24.6 (CH ₃ -CO ó CH ₃ -N).

5.6.5. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*.

Acetilación del extracto MeOH de las semillas desgrasadas de *G. sepium*

Se acetilaron 7.580 g del extracto MeOH con 76 mL de anhídrido acético y 23 mL de piridina calentando a reflujo y con agitación durante toda la noche. El producto de la reacción se procesó según el método descrito en la sección 5.2 obteniéndose 7.191 g del extracto acetilado.

Fraccionamiento del extracto MeOH acetilado.

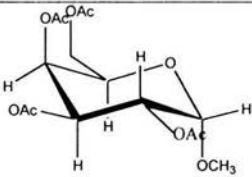
Se adsorbieron 4.6 g del extracto MeOH acetilado disueltos en acetona en la suficiente cantidad de gel de sílice. El disolvente fue eliminado por aereación en la campana de extracción. Una vez seca ésta mezcla se aplicó a una columna de 3 cm de ancho y 80 cm de altura. La muestra se eluyó con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad ascendente, acetona y MeOH; obteniéndose un total de 109 fracciones primarias de 50 mL cada una, las cuales se reunieron tomando en cuenta su similitud cromatográfica, resultando 20 fracciones que se nombraron como FM01 a FM20.

Aislamiento de la *O*-metil- α -D-galactosa (15)

La fracción FM06 homogénea por CCF (5 mg), fue identificada como la *O*-metil- α -D-galactosa de acuerdo a sus constantes físicas y espectroscópicas (Cuadro 9) comparadas con datos reportados por Aldrich (1986) y Jiang (1990).

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas de *O*-metil- α -D-galactosa (15) aislado de

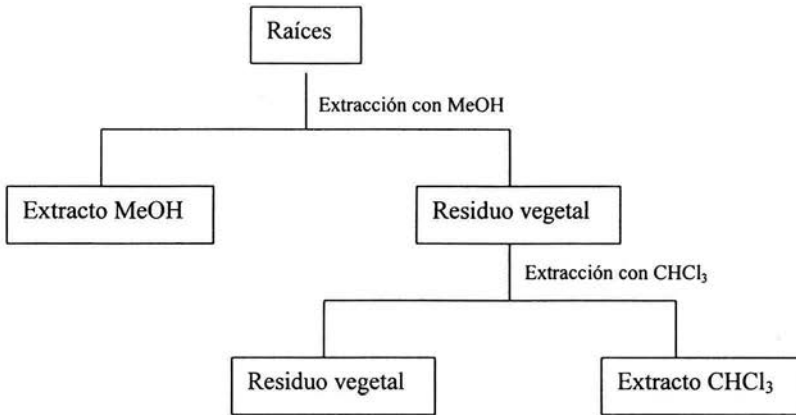
G. sepium.

 <p>(15)</p>	
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm ⁻¹ (Espectro 27)	3475, 2939 (-CH st), 1748 (O-C=O), 1432 (-CH ₃ y -CH ₂ alifáticos), 1372(-CH ₃), 1227 y 1048 (C-O),
RMN- ¹ H (CDCl ₃) (Espectro 28)	5.45 (dd; <i>J</i> =1.5, 3.45; H-4), 5.35 (dd; <i>J</i> =3.3,10.8; H-3), 5.15 (dd; <i>J</i> =3.6,10.8; H-2), 5.0 (d; <i>J</i> =3.9), 4.19 (m, H-5), 4.19 (m, H-6a ó b), 4.10 (d; <i>J</i> =1.2; H-6a ó b), 3.41(s; <u>CH</u> ₃ -), 2.151, 2.09, 2.05, 1.98 (4 x <u>CH</u> ₃ COO-)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) (Espectro 29)	170.4, 170.3, 170.2, 169.9 (4x-COO-), 97.1(C-1), 68.1(C-2), 68.1(C-4), 67.5(C-3), 66.1 (C-5), 61.7 (C-6), 55.4 (<u>CH</u> ₃ -)20.8, 20.6, 20.6, 20.6 (4 x <u>CH</u> ₃ COO-).

5.7. ESTUDIO QUÍMICO DE LAS RAÍCES DE *Parmentiera edulis*.

5.7.1. EXTRACCIÓN DE LAS RAÍCES DE *Parmentiera edulis*.

Se extrajeron 1.457 kg. de raíz de *Parmentiera* a temperatura ambiente con 6 L de MeOH mediante un proceso de maceración durante una semana. Posteriormente las raíces se sometieron a una segunda maceración con CHCl_3 .



Esquema 2. Extracción de las raíces de *Parmentiera edulis*.

5.7.2. PRUEBA DE TOXICIDAD PARA *Artemia salina* DE LA ESPECIE *Parmentiera edulis*.

Se realizó la prueba de toxicidad, sobre el crustáceo *Artemia salina*, de los extractos clorofórmico y metanólico de la raíz de *Parmentiera edulis* de acuerdo al método descrito en el punto 5.4.1. Los resultados de la prueba se presentan en el Cuadro 14 (Capítulo 6).

5.7.3. EVALUACIÓN HIPOGLUCEMIANTE DE LOS EXTRACTOS METANÓLICO Y CLOROFÓRMICO DE LAS RAÍCES DE *Parmentiera edulis*.

Determinación de la actividad potencial hipoglucemiante de la especie *Parmentiera edulis*

La determinación de glucosa sanguínea se realizó empleando un medidor portátil de glucosa en sangre y tiras reactivas One Touch Basic, estas tiras se utilizan para cuantificar la glucosa en sangre total.

Esta prueba cuenta con una tecnología que emplea reactivo seco basada en un método de glucosa-oxidada y es de uso específico para D-glucosa. La pequeña almohadilla que contiene el reactivo va adherida a una tira de plástico, la cual contiene los siguientes reactivos químicos y biológicos en concentraciones aproximadas:

Glucosa-oxidada	14 U.I/cm ²
Peroxidasa	11 U.I/cm ²
Clorhidrato de hidrazona 3 metil-2-benzotiazolinona	0.06 mg/cm ²
Ácido 3-dimetilaminobenzoico	0.12 mg/cm ²

Preparación de los organismos y muestras

Se utilizó una población homogénea de roedores especie Rattus norvegicus cepa Wistar albino macho de peso aproximado a 100-150 g. Se prepararon con 18 h de ayuno y agua en jaulas individuales.

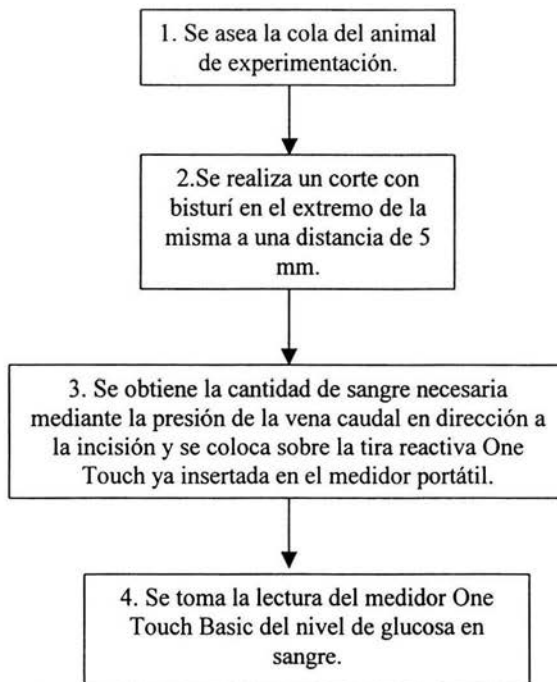
Se humectaron 75 mg de cada uno de los extractos con tween 80, se adicionaron 7.5 mL de solución salina isotónica (SSI) y se agitaron hasta lograr una suspensión homogénea.

Bioensayo

Se realizó formando 3 grupos de 6 roedores cada uno a los cuales se les determinó el nivel de glucosa sanguínea previamente al tratamiento y a 1.5, 3, 5, 7 y 9 h después del mismo.

Tratamiento

A dos de los grupos de roedores se les administró por vía oral la suspensión de cada uno de los extractos a una dosis de 50 mg/kg y al tercer grupo una solución de tween 80 y SSI como control negativo; la administración se realizó por incubación gástrica mediante una sonda naso gástrica infantil de látex FR8. Las muestras de sangre requeridas en el experimento, se tomaron del extremo de la cola del animal de experimentación, como se describe en el Esquema 3.



Esquema 3. Experimento para determinar la concentración de glucosa en sangre en los animales de experimentación.

La evaluación hipoglucemiante de los extractos metanólico y clorofórmico de las raíces de *Parmentiera edulis* se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente. Los datos experimentales obtenidos directamente (nivel de glucosa en

sangre) se procesaron estadísticamente con la finalidad de obtener los porcentajes de variación de glucemia con respecto al nivel inicial, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de variación de glucemia} = \frac{G_t - G_i}{G_i} \times 100$$

Donde G_i es el valor de la glucemia inicial y G_t es el valor de la glucemia a 1.5, 3, 5, 7 y 9 horas posteriores a la administración del extracto, ponderando de ésta manera la actividad hipoglucemiante de los extractos analizados. Para el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de t de Dunnett ($p < 0.05$) y la construcción de la gráfica se utilizaron los programas computacionales Sigma Plot Scientific Graph System, Jandel Versión 1.02^a y SigmaStat for Windows Versión 1.0. Los resultados de esta prueba se muestran en el Capítulo 6.

5.7.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROSCÓPICO DEL EXTRACTO MeOH DE LAS RAÍCES DE *Parmentiera edulis*.

Se acetiló 1.0 g del extracto MeOH de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2 y se obtuvieron 1.216 g del producto acetilado. El producto obtenido se disolvió en acetona y se adsorbió en la suficiente cantidad de gel de sílice y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó en una columna cromatográfica de gel de sílice de 3 cm de ancho y 80 cm de altura, que se eluyó con una mezcla de hexano-AcOEt de polaridad creciente y finalmente se lavó con MeOH, se obtuvieron 238 fracciones primarias de 75 mL cada una, las cuales se reunieron de acuerdo a su similitud cromatográfica, resultando 19 fracciones numeradas secuencialmente de Pe-01 a Pe-19. De la fracción Pe-06 (20 mg) se aisló una mezcla de azúcares constituida por 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-manopiranosido, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido ((**16**), (**17**) y (**18**)) y de la fracción Pe-08 (10 mg) el 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (**19**).

Aislamiento de la mezcla de azúcares constituida por 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-manopiranosido(16), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranosido (17) y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosido (18).

De la fracción primaria Pe-06 se obtuvo un semisólido amarillo, que estuvo constituido por una mezcla de 3 azúcares mayoritarios: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-manopiranosido (16), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranosido (17) y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosido (18), sus características espectroscópicas y espectrométricas se enlistan en el Cuadro 10, las cuales coinciden con las muestras de los mismos compuestos obtenidas en nuestro laboratorio (Silva, 2002).

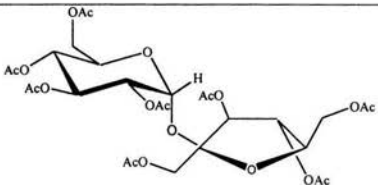
Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la mezcla de azúcares (16), (17) y (18) aislados de *P. edulis*.

Fórmula molecular	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁
IR ν _{máx.} (película) cm ⁻¹ Espectro 30	3470, 2938 (-CH alifático), 1746 (O-C=O), 1432 (-CH ₃ y -CH ₂ alifáticos), 1370 (-CH ₃), 1039 (-C-O).
EMIE <i>m/z</i> (%) tr=9.89 min Espectro 31	331[M ⁺ -15] (8.6), 317 (8.6), 275(73.9), 245 (2.17), 233 (16.3), 228 (19.5), 211 (26.1), 186 (19.5), 169 (28.2), 145 (17.3), 126 (23.9), 101 (52.1), 98 (8.6), 73 (8.6), 43 (100)
tr=10.17 min Espectro 32	331[M ⁺ -15] (6.6), 271(2.2), 242(22.2), 200 (33.3), 157 (64.4), 115(75.5), 98 (42.2), 43(100)
tr=10.31min Espectro 33	331 [M ⁺ -15] (2.2), 287 (11.1), 242 (20), 200(31.1), 157(60), 115(71.1), 98 (42.2), 43(100)

Aislamiento e identificación del 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19).

De la fracción primaria Pe-08 se obtuvo un sólido cristalino amarillo pálido identificado como el 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) (Aldrich, 1986 y Fukuyama, 1983), sus características espectroscópicas y espectrométricas se enlistan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de *P. edulis*.

 <p>(19)</p>	
Fórmula molecular	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₉
Punto de fusión (°C)	75-77
IR $\nu_{\text{máx}}$ (película) cm ⁻¹ Espectro (34)	3473, 2962 (-CH ₃ y -CH ₂), 1747 (O-C=O), 1434 (-CH ₃ y -CH ₂), 1371 (-CH ₃), 1224 y 1039 (C-O), 900 (-CH ₃), 757 (-CH ₂).
FAB-MS m/z Espectro (35)	663 [M ⁺ -15], 331 (97.4), 169 (100)
RMN- ¹³ C (CDCl ₃) Espectro (37)	103.9 (C-2'), 89.8 (C-1), 79.07 (C-5'), 75.6 (C-3'), 74.9 (C-4'), 70.2 (C-2), 69.5 (C-3), 68.4 (C-5), 68.1 (C-4), 63.6 (C-6), 62.8 (C-1'), 61.7 (C-6') 170.6, 170.4, 170.1, 170.1, 170.0, 169.8, 169.6, 169.4 (8x -C=O-) 20.69, 20.67, 20.64, 20.63, 20.59, 20.56, 20.55, 20.54 (8x -CH ₃ -)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**6.1. *Gliricidia sepium***

Uno de los objetivos del estudio de las semillas de *Gliricidia sepium* fue aislar compuestos tóxicos diferentes a los reportados en la literatura que fueran los responsables de la muerte de un lote de ratones de estudio en los que se estaba ensayando el potencial nutricional de la proteína aislada de las semillas mencionadas. Por lo anterior, las semillas molidas y desgrasadas exhaustivamente con hexano, se obtuvieron directamente del laboratorio de toxicología del Departamento de Farmacia.

6.1.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*.

Las semillas fueron extraídas mediante un proceso de maceración con CHCl_3 , posteriormente con MeOH y finalmente con H_2O destilada; de este último extracto se realizó una hidrólisis básica con NaOH 2N y después se extrajo con hexano, ya que este último procedimiento mencionado fue el practicado en el laboratorio de toxicología para obtener las proteínas de las semillas.

6.1.2. PRUEBA DE TOXICIDAD EN *Artemia salina* DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS SEMILLAS DESGRASADAS DE *Gliricidia sepium*.

Cuadro 12. Resultados de la prueba de toxicidad en *Artemia salina* de la especie *Gliricidia sepium*.

MUESTRA	CL ₅₀ (µg/mL)
Extracto metanólico	>1000
Extracto clorofórmico	588
Control negativo	>1000

Cuadro 13. Resultados de la prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*, de las fracciones mayoritarias del extracto clorofórmico de las semillas desgrasadas de *Gliricidia sepium*.

MUESTRA	CL ₅₀ (µg/mL)
FC02	>1000
FC04	>1000
FC05	>1000
FC08	>1000
FC09	211
FC28	>1000
Control negativo	>1000

La prueba de toxicidad sobre el crustáceo *Artemia salina* Leach del extracto clorofórmico de las semillas desgrasadas de *G. sepium*, dió como resultado una CL₅₀= 588 µg/mL, lo cual indica que este extracto es tóxico para dicho crustáceo ya que podría contener sustancias bioactivas. Posterior al fraccionamiento del extracto, se realizó la misma prueba de toxicidad sobre las fracciones mayoritarias del extracto, resultando activa la fracción FC09, la cual estuvo constituida en su mayoría por pigmentos.

Para el extracto metanólico de las semillas desgrasadas de *G. sepium*, se obtuvieron resultados de CL₅₀ mayor a 1000 µg/mL, lo cual indica que dicho extracto no es tóxico para el crustáceo, sin embargo se procedió a su fraccionamiento, para analizar el tipo de componentes, ya que no existe un estudio fitoquímico previo de estas semillas.

6.1.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO.

El extracto clorofórmico estuvo compuesto por varias sustancias según se apreció por el análisis cromatográfico en capa fina. De las fracciones mayoritarias obtenidas mediante el tratamiento cromatográfico en columna abierta de gel de sílice se obtuvieron varios componentes que se detallan a continuación.

Aislamiento de los ácidos grasos (01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07)

De la fracción FC02 se obtuvo un semisólido ámbar opalescente (34 mg) que por cromatografía en capa fina mostró una mancha homogénea. Dicha fracción fue enviada a análisis espectroscópico y CG-EM.

El cromatograma de gases obtenido reveló que se trataba de una mezcla de ácidos grasos, de los cuales los mayoritarios fueron los ácidos tetradecadienoico (01), tetradecaenoico (02), hidroxilinoico (03), oleico (04), linoleico (05), docosaenoico (06) e hidroxi-docosaenoico (07).

El espectro en el IR (Espectro 1) corroboró el resultado obtenido por la técnica CG-EM al mostrar las absorciones para ácidos grasos ya que evidenció el grupo hidroxilo (3300 cm^{-1}); grupos C-H con dobles y simples ligaduras en 3000 , 2923 , 2852 , 1463 y 1377 cm^{-1} ; un grupo carboxilo en 1737 cm^{-1} y en 721 cm^{-1} , la banda diagnóstica para grupos metileno ($-(\text{CH}_2)_n-$, siendo $n \geq 4$).

El espectro de RMN- ^1H (Espectro 2) fue el típico encontrado en ácidos grasos ya que mostró dos multipletes en 5.35 y 5.12 ppm , que se asignaron a hidrógenos de grupos vinílicos. En 2.77 ppm se encontró la señal correspondiente a hidrógenos doblemente alílicos. En 2.28 ppm se observó un triplete que se asignó a un grupo metileno de una cadena alquílica y vecino a un grupo carbonilo; en 2.02 ppm se observó un multiplete que se asignó a un metileno de tipo alílico; en 1.64 y 1.24 ppm dos singuletes anchos observados se asignaron a grupos metileno de una cadena alquílica. Por último, el multiplete en 0.85 ppm se asignó a grupos metilo terminales de una o varias cadenas alquílicas.

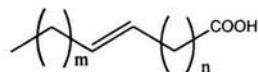
El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 3) mostró tres señales en 173.2 , 173.2 y 172.7 ppm que corresponden a tres grupos carboxilo de éster. Las señales en 135 , 134.8 , 131.2 , 130.2 , 130 , 128.0 , 127.9 , 122.5 , 124.4 y 124.3 ppm , corresponden a carbonos con hibridación sp^2 , unidos a hidrógenos ($-\text{CH}=\text{CH}-$). En 73.6 ppm se observó una señal para

un grupo metino unido a un hidroxilo ($-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{OH}$). En 38.1, 34.8 y 34.7 ppm, se observaron tres señales para grupos metileno $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$ unidos a grupos carboxilo. La señal en 32.1 ppm se asignó a un metino ($-\text{CH}-$) unido a un carboxilo. En 31.9, 31.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1 y 27.9 ppm, se observaron señales correspondientes a grupos metileno ($-(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_n-$). En 39.7, se presenta una señal ancha para metinos alílicos y en 31.9, 27.2, 26.7 y 26.6 ppm, 5 señales para metilenos alílicos $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$. En 25.6 y 25.1 ppm, se observaron dos señales para metilenos doblemente alílicos y por último las señales en 25.7, 19.8, 19.7, 19.3, 19.1, 14.1, 14.0, 11.9 y 11.8 ppm se asignaron a grupos metilo. El espectro IR fue comparado con los reportados para el ácido oleico, linoleico, hidroxilinoico y docosaenoico (Aldrich, 1985), así como los datos obtenidos en RMN- ^1H y RMN- ^{13}C se compararon con datos reportados de compuestos estructuralmente relacionados (Aldrich, 1983).

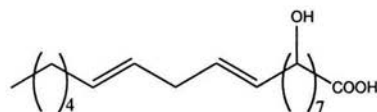
A continuación se muestran las estructuras propuestas para los compuestos (01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07).



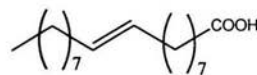
(m+n+o=8 C) (01)



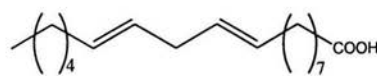
(m+n=10 C) (02)



(03)



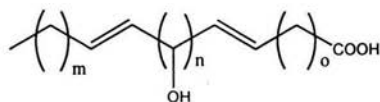
(04)



(05)



(06)



(m+n+o=16 C) (07)

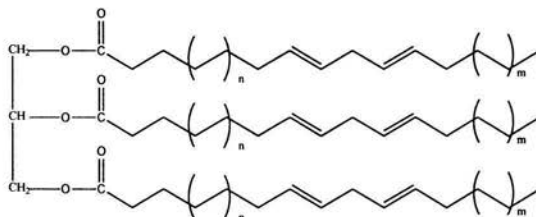
Aislamiento de un triacil glicérido (08).

De la fracción F04 se obtuvo un semisólido blanquecino que por cromatografía en capa fina mostró una sola mancha y fue enviado a CG-EM y análisis espectroscópicos.

El análisis e integración de esos resultados sugería la estructura de un triacil glicérido por los siguientes datos: el espectro en el IR (Espectro 4) presentó absorciones en 3008, 2923, 2853, 1465 y 1377 cm^{-1} características para grupos C-H de metilos y metilenos; la banda en 1745 cm^{-1} correspondió al grupo carboxilo de éster; la banda en 1162 cm^{-1} correspondió a la vibración para el grupo C-O y en 722 cm^{-1} , la presente en grupos metileno $-(\text{CH}_2)_n-$, siendo $n \geq 4$.

El espectro de RMN- ^1H (Espectro 5), también fue diagnóstico para un triacil glicérido ya que dió evidencia del residuo del glicerol por la señal en 5.33 ppm del metino base del oxígeno de un grupo éster (-CH-OCO-), vecino a dos grupos metileno, en 4.14 y 4.23 ppm también bases de oxígeno de un grupo éster. Las cadenas de ácidos grasos esterificados al glicerol contienen instauraciones observadas en 5.36 ppm. En 2.77 ppm se observó un triplete que se asignó a hidrógenos de metileno doblemente alílicos; en 2.07 ppm un multiplete que se asignó a hidrógenos alílicos; el triplete dobleteado en 2.31 ppm se asignó a hidrógenos de metileno unidos a carboxilo ($-\text{CH}_2-\text{COO}-$); una señal en 1.31 ppm integró para gran cantidad de protones por lo que se trata de grupos metileno en cadenas hidrocarbonadas largas; un multiplete en 0.88 ppm, constituido por la sobre posición de varios tripletes se asignó a metilos terminales en cadenas hidrocarbonadas; la señal en 1.60 ppm, que se presentó como un multiplete, se asignó a los grupos metileno intermedios en las cadenas hidrocarbonadas y cercanos a dobles ligaduras o a grupos carbonilo.

Las correlaciones encontradas en el espectro COSY (Espectro 6), así como el análisis de los espectros de RMN- ^{13}C (Espectro 7) y DEPT (Espectro 8) confirmaron la estructura del triacil glicérido (08) (Jiang, 1990 y Shoolery, 1977).



(08).

$$n+m=10$$

Aislamiento de la mezcla de esteroides: campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11).

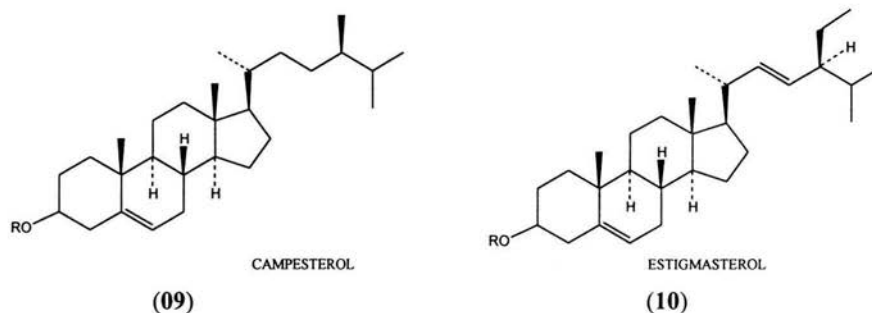
De las fracciones FC26 y FC27 precipitó y se colectó un sólido cromatográficamente homogéneo, el cual después de sucesivas cromatografías en columna y a pesar de mostrar una sola mancha por CCF, resultó ser una mezcla que mediante sus espectros en el IR (Espectro 9), RMN-¹H (Espectro 10), RMN-¹³C (Espectro 11) y CG-EM se concluyó que estaba integrada por campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11). Es probable que uno o más de los esteroides se encuentren esterificados con un ácido graso de cadena larga (16 y 18 átomos de carbono) y otro a un azúcar de cinco átomos de carbono, por la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados en la literatura (Aldrich, 1986; Della Greca, 1990; Geng, 1988 y Lynne, 1993).

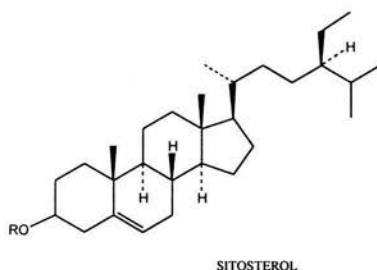
El espectro de IR mostró absorciones para grupos hidroxilo (3350 cm⁻¹), carbono-hidrógeno alifáticos (2924, 1465 y 1376 cm⁻¹), carboxilo de éster (1732 cm⁻¹), carbono-oxígeno (1257 y 1171 cm⁻¹) y cadena de más de cuatro metilenos (721 cm⁻¹).

Los espectros de masas confirmaron el peso molecular del campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11) (400, 412 y 414 uma), así como el de dos ácidos grasos con cadenas de 16 y 18 átomos de carbono.

El espectro de RMN-¹H mostró la presencia de los esteroides y la cadena hidrocarbonada, siendo posible hacer las siguientes asignaciones: las señales entre 0.65 y 0.95 ppm a los metilos 18, 19, 21 (**09**, **10** y **11**), 24' en campesterol (**09**), 24'' (estigmasterol (**10**) y 24'''sitosterol (**11**)), 26 y 27 (**09**, **10** y **11**) (δ_{13C} 20.5, 19.9, 19.7, 19.5, 14.7, 13.1, 12.6 y 12.5); los metilos 20 en 0.955 ppm (δ_{13C} 57.4 (sitosterol (**11**)) y 56.8 (campesterol (**09**)), en 0.92 y 0.97 ppm los metinos 24 y 25 (δ_{13C} 46.6 y 50.98) del sitosterol (**11**) y campesterol (**09**); en 1.35 ppm los metinos 20 y 24 (δ_{13C} 36.9) del estigmasterol (**10**); en 1.86 ppm, los metilenos alílicos 4 y 7 del sitosterol (**11**), campesterol (**09**).y estigmasterol (**10**); los hidrógenos 3 β de los esteroides se evidenciaron en 3.9 ppm como un multiplete (δ_{13C} 79.3); el hidrógeno vinílico en 6, en 5.36 ppm (δ_{13C} 122.4). El ácido graso se evidenció por las señales en 2.17 ppm para metilenos alílicos; en 2.36 ppm un triplete para metilenos alfa a un grupo carboxilo; en 1.59 y 1.61 ppm multipletes para metilenos beta a un grupo carboxilo. El azúcar se determinó por las señales para el metino del carbono anomérico en 4.96 ppm (δ_{13C} 103.3) y las señales en 4.84 (dd, $J=5.4$ y 6.0 ; H-2'), 4.07 (H-3, δ_{13C} 72.2), 4.05 (H-4, δ_{13C} 75.7) y finalmente la señal en 65.2 ppm se asignó al carbono 5. Desafortunadamente la sobre posición de las señales del azúcar con las del H-3 de los esteroides en RMN¹H y con las señales de la piridina empleada como disolvente no permitió una visualización espectral más completa.

El resto de las señales se encuentra con detalle en el Cuadro 5.





(11)

R=Azúcar de 5 átomos de carbono o cadena de ácido graso (16 ó 18 átomos de carbono)

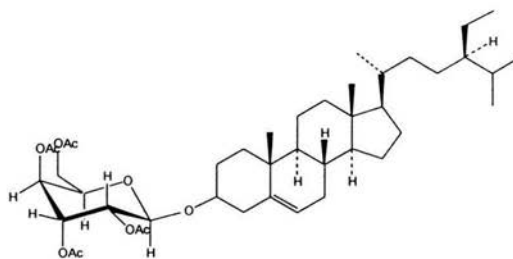
Aislamiento del 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo (12).

De la fracción FC30 acetilada se obtuvo un sólido blanco, el cual fue identificado como el 2',3',4',6'-tetra-*O*-acetil-β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo por el análisis de sus espectros de IR, RMN-¹H y RMN-¹³C.

El espectro de IR (Espectro 12) mostró características similares a las de la mezcla de los compuestos (09), (10), y (11).

El espectro de RMN-¹H (Espectro 13) mostró las señales características de un esteroil glicosidado. La señales observadas para el azúcar se asignaron de la siguiente manera: en 5.07 ppm el H-4' (δ_{13C} 68.5), en 5.20 ppm el H-3' (δ_{13C} 72.9), en 4.95 ppm el H-2' (δ_{13C} 71.5), en 4.6 ppm el carbono anomérico H-1' (δ_{13C} 99.6); en 4.25 y 4.10 ppm el H-6'a y H-6'b, respectivamente (δ_{13C} 62.1) y por último en 3.67 ppm el H-5' (δ_{13C} 71.6). En 2.07 (δ_{13C} 20.74), 2.05 (δ_{13C}, 20.70), 2.02 (δ_{13C} 20.62) y 2.00 ppm (δ_{13C} 20.59), se observaron cuatro señales características de hidrógenos base de acetilo.

Integrando las señales del esteroil y del azúcar y comparándolos con datos espectroscópicos y espectrométricos reportados en la literatura (Aldrich, 1986; Della Greca, 1990; Geng, 1988 y Lynne, 1993), la identidad del compuesto correspondió al β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo tetracetilado (12) y representó el compuesto mayoritario de las semillas.



(12)

6.1.4. ANÁLISIS DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

El extracto hexánico proveniente de la hidrólisis del extracto acuoso de las semillas de *G. sepium* estaba constituido por dos compuestos principales según se visualizó por CCF. Ambos compuestos se apreciaron a simple vista en la placa por un color amarillo, y presentaron coloración café con el reactivo de sulfato cérico amoniacal y absorción con luz ultravioleta. Estos dos compuestos se separaron por cromatografía en columna preparativa de gel de sílice. El compuesto de menor polaridad (13) se presentó como un sólido (3 mg) con absorciones en el espectro de infrarrojo (Espectro 16) para grupos -OH o -NH, en 3374 cm^{-1} , como una banda muy fina; también se apreciaron bandas en 3118 , 2921 y 2852 cm^{-1} para grupos C-H de dobles y simples ligaduras, que se confirmaron con las bandas en 967 y 935 cm^{-1} , para vibraciones C-H de doble enlace. La banda confirmativa para vibración C-C con doble ligadura probablemente se encuentre empalmada en la banda intensa en 1695 cm^{-1} , que probablemente corresponda a un carbonilo de amida. En 747 y 758 cm^{-1} , las bandas de absorción observadas pudieran justificar la presencia de grupos cloro unidos a carbono. La banda en 1236 cm^{-1} , podría adjudicarse a la vibración proveniente de un grupo C-O ó C-N. El análisis elemental de (13) reveló la presencia de nitrógeno, sin embargo los porcentajes obtenidos en dicha prueba no son confiables debido a que se contaba con muy poca muestra y la prueba no se realizó por triplicado. La presencia de halógeno en la molécula se confirmó mediante la prueba de Beilstein.

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 19) mostró ocho señales que corresponden a: un grupo carboxilo que pudiera ser de ácido o de amida ($\delta_{\text{C}} 168.9$). En 141.1 y 133.8 ppm dos

señales de carbono con hibridación sp^2 no unidos a hidrógeno (Espectro 20), en 126.8 y 123.2 ppm, dos señales de carbono con hibridación sp^2 unidos a hidrógeno, sobrepuestas con otras dos de menor intensidad y por último, en 25.6 ppm, una señal para un metilo adyacente a un grupo carbonilo o amino.

El espectro de RMN- 1H (Espectro 18) mostró dos singuletes en 10.32 y 1.63 ppm que integraron cada uno para un hidrógeno y que pudieran asignarse a dos hidroxilos ó aminos. En 9.07 y 8.34 ppm, aparecen dos singuletes que integraron cada uno para un hidrógeno y se asignaron a dos hidrógenos aromáticos no vecinales, probablemente dentro de un heterociclo con nitrógeno, debido a los desplazamientos de éstas dos señales a campo más bajo que los hidrógenos bencénicos; estas señales correlacionaron con las de δ_{13C} 126.8 y 123.2. En 2.31 ppm aparece un singulete que integró para 3 hidrógenos y se asignó a un grupo metilo de acetilo.

Por otra parte, el cromatograma de gases con espectro de masas, mostró un pico mayoritario (Figura 1), con un tiempo de retención de 20.17 min, con un peso molecular de 248 (Espectro 17). Se observó la contribución isotópica en $M^+ + 2$ en un 66.1 %, por lo que deben existir en la molécula dos átomos de cloro, además de átomos de oxígeno. De acuerdo a la presencia en la molécula de dos átomos de cloro, el peso molecular del compuesto debería ser non, pero si existe un número non de átomos de nitrógeno, el peso del compuesto sería par, como es el caso de este compuesto (13). La fragmentación más importante de la molécula ocurre con la pérdida de 42 unidades de masa, para dar un fragmento de 206 umas que constituye el pico base del espectro. Esta pérdida se documenta en las tablas (Seibl) como la pérdida de $C_3H_6^{+*}$, $C_2H_2O^{+*}$, CON^+ ó de $C_2H_4N^+$. Hay pérdida de 15 umas, para un grupo metilo. También se observa un fragmento de 43 umas, para un probable grupo acetilo o n-propilo, pero éste último no se hace evidente en el espectro de RMN- 1H .

El segundo producto (14) aislado de la fracción hexánica (5 mg) mostró características físicas y espectroscópicas similares a las del compuesto (13). También se trató de un sólido amarillo con punto de fusión 125-128 °C. Como en el caso del producto

(13), el producto (14) tuvo absorción en el visible y ultravioleta y desarrolló color con el sulfato cérico amónico, pero tuvo un tiempo de retención de 10.2 min en el cromatograma de gases, que mostró además una pequeña contaminación. El peso molecular de (14) fue idéntico al de (13) (248 umas) (Espectro 22), así como su patrón de fragmentación, salvo algunas pequeñas diferencias. La pérdida principal fue de 42 umas, dando el fragmento (206) que también correspondió al pico base del espectro.

El espectro en el infrarrojo (Espectro 21) mostró bandas de absorción para grupos –OH ó –NH (3225 cm^{-1}); 3100 , 2925 , 2854 y 1660 cm^{-1} , para grupos C-H aromático y alifáticos, en 1731 , 1715 y 1687 cm^{-1} , tres bandas asignadas a grupos carbonilo; las dos primeras de mucha menor intensidad que la tercera, por lo que se adjudicaron a la contaminación observada en el cromatograma de gases cuya estructura corresponde al terftalato de isooctilo de acuerdo al espectro de masas observado. La tercera señal podría adjudicarse a un grupo carbonilo de ácido carboxílico o de amida. Otras bandas presentes fueron en 1270 (C-N st si), 829 y 768 (C-Cl) y 665 cm^{-1} (N-H oop). El espectro de resonancia magnética de carbono 13 (Espectro 24) mostró 8 señales que se asignaron de la siguiente manera: en 168.3 ppm, un carbono cuaternario que podría pertenecer a un carbonilo de ácido o amida; en 132.5 y 122.8 ppm dos señales de carbono con hibridación sp^2 unidos a hidrógeno (Espectro 26), sobrepuestas con otras dos de menor intensidad; en 130.9 y 125.4 ppm, dos señales de carbono con hibridación sp^2 cuaternarios y por último, en 24.6 una señal para un metilo adyacente a un grupo carbonilo o amino.

El espectro de RMN- ^1H (Espectro 23) mostró dos singuletes que integraron cada uno para un hidrógeno que pudieran asignarse a dos hidroxilos ó aminos, en 7.81 y 1.83 ppm, no se realizó el experimento de intercambio con D_2O . En 8.17 y 7.59 ppm, dos singuletes que integraron cada uno para un hidrógeno, se asignaron a dos hidrógenos aromáticos vecinos (Espectro 25), que al igual que en el compuesto (13), probablemente se encuentren dentro de un heterociclo con nitrógeno, debido a los desplazamientos de éstas dos señales a campo más bajo que los hidrógenos bencénicos y que correlacionan con los carbonos en 132.5 y 122.8 ppm. También se localizó en 2.21 ppm un singulete que integró

para 3 hidrógenos y se asignó a un grupo metilo de acetilo o unido a un nitrógeno, que correlacionó con la señal en 24.6 ppm en ^{13}C .

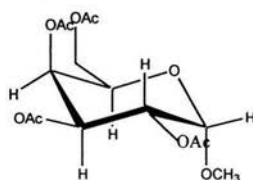
Los datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos de (13) y (14), sugieren una estructura para tales compuestos de tipo heteroaromático y de acuerdo al peso molecular par, con 3 nitrógenos (dado que existen dos átomos de cloro en la molécula), uno de ellos probablemente en forma de acetamida; sin embargo, no se encontró en la búsqueda bibliográfica efectuada compuesto alguno que pudiera satisfacer tales características estructurales (Cuadro 1; Handbook, 1999 y The Pesticide Manual, 1994).

6.1.5. ANÁLISIS DEL EXTRACTO METANÓLICO.

El extracto metanólico acetilado estuvo compuesto por varias sustancias según se apreció por el análisis cromatográfico en capa fina, siendo una la fracción mayoritaria FM06, la cual se describe a continuación.

Aislamiento de *O*-metil- α -D-galactosa

De la fracción FM06, se obtuvo un sólido cristalino, identificado como *O*-metil- α -D-galactosa (15), de acuerdo con sus características espectroscópicas que se detallan en el Cuadro 9 y que muestran las características típicas de un azúcar acetilado de 6 átomos de carbono (Aldrich, 1986 y Jiang, 1990).



(15)

6.2. *Parmentiera edulis*

Como uno de los objetivos principales de este trabajo consistió en la determinación del potencial hipoglucemiante de los extractos de la raíz de *Parmentiera edulis*, un primer paso fue la obtención de dichos extractos.

6.2.1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO DE LAS RAICES DE *Parmentiera edulis*

Las raíces de *P. edulis*, se procesaron como se menciona en el punto 5.5.6., empleando dos disolventes: cloroformo y metanol.

6.2.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO DE LAS RAICES DE *Parmentiera edulis*

Prueba de toxicidad en *Artemia salina* de las raíces de *Parmentiera edulis*

Cuadro 14. Resultados de la prueba de toxicidad en *Artemia salina* de la especie *Parmentiera edulis*.

MUESTRA	CL ₅₀ (µg/mL)
Extracto metanólico	>1000
Extracto clorofórmico	>1000
Control negativo	>1000

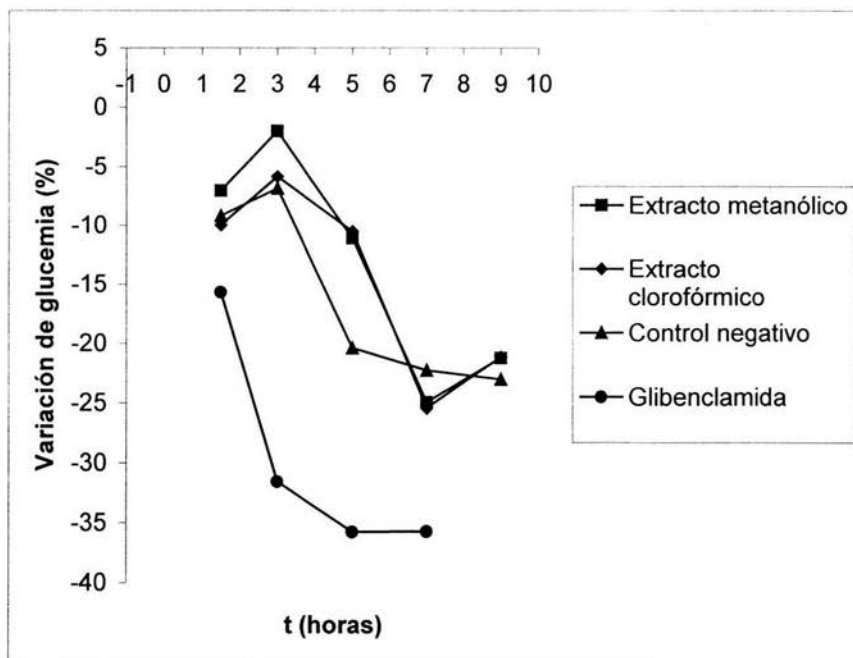
Los resultados en la prueba de toxicidad al crustáceo *A. salina* de los extractos clorofórmico y metanólico de las raíces de *Parmentiera edulis* fueron negativos, lo cual nos indica que estos extractos no son tóxicos para dicho crustáceo.

Evaluación hipoglucemiante de los extractos metanólico y clorofórmico de las raíces de *Parmentiera edulis*

La actividad hipoglucemiante se probó en ambos extractos y los resultados obtenidos se procesaron como se describe en el Capítulo 5. Los datos estadísticos se presentan en los Cuadros 15, 16 y 17 y muestran los valores de variación de glucemia (%) a los diferentes tiempos (1.5, 3, 5, 7 y 9 horas) después de cada uno de los tratamientos, se calculó el promedio de dichos valores (media) y se graficó contra el tiempo (Gráfica 1).

Como referencia de control positivo se tomaron los datos experimentales obtenidos en el trabajo de tesis de Garduño, donde se realizó un experimento similar utilizando como control positivo glibenclamida (agente hipoglucemiante comercial empleado como referencia farmacológica) a una dosis de 10 mg/kg (Cuadro 18).

En la siguiente gráfica se muestra la variación de glucemia (%) para los extractos ensayados, así como para el control negativo a los diferentes tiempos (1.5, 3, 5, 7 y 9 h) y para la glibenclamida (control positivo) (t=1.5, 3, 5 y 7 h), en ella se observa que la tendencia del extracto metanólico y clorofórmico de la raíz de *Parmentiera edulis*, es la misma y muy similar a la del control negativo. Al tiempo t=1.5 h se observa un incremento de la glucemia, posteriormente hay una disminución de la misma hasta t= 7 h. Finalmente se observó un incremento de la glucemia al tiempo t= 9 h. Sin embargo el resultado del análisis estadístico reflejó que los extractos ensayados presentaron valores porcentuales no significativos en la disminución de la glucemia en los animales de experimentación para un valor de $p < 0.05$ a la concentración probada (50mg/kg). Esto se debe a que probablemente se requiera de una mayor dosis de extracto para poder observar un efecto hipoglucemiante o éste actúe mediante un mecanismo de acción diferente.



Gráfica 1. Variación de la glucemia observada para los extractos MeOH y CHCl₃ de las raíces de *Parmentiera edulis*.

Cuadro 15. Variación de glucemia observada para el extracto MeOH de la raíz de *Parmentiera edulis*.

	Porcentaje de varianza al tiempo t=				
	1.5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
N ₁	-14.89	-0.19	-	-	-
N ₂	-21.05	0	2.63	-21.06	-5.26
N ₃	-4.76	-2.38	-16.67	-26.19	-23.8
N ₄	2.22	4.44	-13.33	-31.11	-26.67
N ₅	-6.0	-12.0	-22.0	-28.0	-32
N ₆	2.04	-2.04	-6.12	-18.37	-18.37
Media (x)	-7.07	-2.03	-11.10	-24.94	-21.22
Desv. Std (S)	9.29	5.46	9.59	5.17	10.19
Error Std (μ_x).	3.79	2.23	4.28	2.31	4.55

Cuadro 16. Variación de glucemia observada para el extracto CHCl₃ de la raíz de *Parmentiera edulis*.

	Variación de glucemia (%) al tiempo t=				
	1.5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
N ₁	-10.64	-25.53	-34.04	-33.3	-42.55
N ₂	-23.44	-34.37	-42.19	-48.44	-51.56
N ₃	53.0	22.5	12.5	-40.0	10.0
N ₄	2.86	31.43	34.28	14.28	11.43
N ₅	-15.91	-15.91	-18.18	-25.0	-36.36
N ₆	-17.78	-13.33	-15.5	-20.0	-17.78
Media (x)	-9.985	-5.87	-10.52	-25.41	-21.14
Desv. Std (S)	11.55	26.65	28.90	21.95	27.04
Error Std (μ_x).	4.71	10.88	11.90	8.96	11.04

Cuadro 17. Variación de glucemia observada para el control negativo.

	Variación de glucemia (%) al tiempo t=				
	1.5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h	9.0 h
N ₁	2.56	5.13	-2.56	-5.13	-7.69
N ₂	-20.37	-7.41	-37.04	-38.89	-40.74
N ₃	0	4.35	13.04	-13.04	-8.7
N ₄	-12.76	-4.25	-34.04	-12.76	-19.15
N ₅	-8.33	-16.67	-27.08	-29.17	-29.17
N ₆	-16.33	-22.45	-34.69	-34.69	-32.65
Media (x)	-9.20	-6.88	-20.39	-22.28	-23.02
Desv. Std (S)	9.07	11.09	20.73	13.76	13.41
Error Std (μ_x).	3.70	4.53	8.46	5.62	5.47

Cuadro 18. Variación de glucemia observada para la Glibenclamida (10 mg/kg)
(control positivo).

	Variación de glucemia (%) al tiempo t=			
	1.5 h	3.0 h	5.0 h	7.0 h
Media (x)	-15.68	-31.56	-35.79	-35.75
Error Std (μ_x).	3.66	7.75	6.74	4.33

El extracto metanólico se procesó fitoquímicamente para tratar de identificar el tipo de metabolitos secundarios presentes en él.

6.2.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO MeOH.

Debido a que en los análisis preliminares por cromatografía en capa fina se evidenció la presencia de componentes muy polares, se procedió a acetilar el extracto para su posterior tratamiento por cromatografía en columna preparativa abierta de gel de sílice.

Las diferentes fracciones obtenidas fueron muy similares en el espectro en el I.R. determinado. Todas ellas mostraron un carbonilo en la zona de 1747 cm^{-1} , entre otras señales y al integrar los resultados del análisis en el I.R., RMN- ^1H y RMN- ^{13}C , se evidenció la presencia de azúcares acetilados en todas estas mezclas.

Aislamiento de la mezcla de azúcares constituida por 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-manopiranosido (16), 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (17) y 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido (18)

De la fracción primaria Pe-06, homogénea por CCF, se obtuvo un semisólido amarillo que se identificó como una mezcla de 3 azúcares mayoritarios:

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-manopiranosido (16);

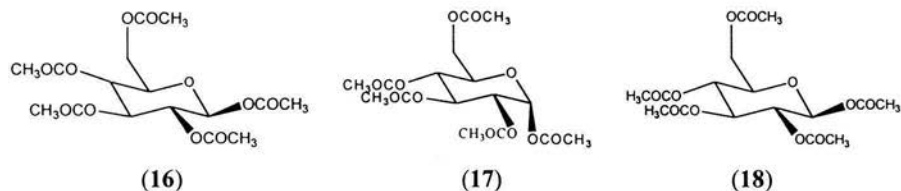
2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (17) y

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-glucopiranosido (18).

El espectro de IR (Espectro 30) mostró las siguientes absorciones: en 2938 cm^{-1} para grupos C-H alifáticos, la banda en 1746 cm^{-1} reveló la presencia del grupo carboxilo de éster, en 1432 cm^{-1} se observó una banda característica de grupos metilo y metileno alifáticos, 1370 cm^{-1} corroboró la presencia de grupos metilo. La banda en 1039 cm^{-1} correspondió a las vibraciones para el grupo C-O del acetato.

Los espectros de masas (Espectros 31, 32 y 33) presentaron pesos moleculares iguales para los tres compuestos además del ión por pérdida del grupo acetil-oxi en $[\text{M}^+ - 59]$ en m/z 331. Las características espectroscópicas de los compuestos (16), (17) y (18)

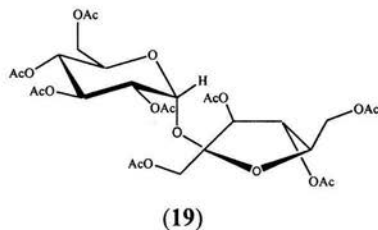
coincidieron con las muestras de los mismos compuestos obtenidas en nuestro laboratorio (Silva, 2002), las estructuras de los compuestos encontrados se muestran a continuación:



Aislamiento e identificación del 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19).

De la fracción Pe-08, se obtuvo un sólido que mostró un solo pico en cromatografía de gases con un peso molecular de 663 ($M^+ - 15$) en el análisis EM-FAB (Espectro 35). Del análisis de sus características espectroscópicas se concluyó la identidad del 2,3,4,6,1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) de acuerdo a lo siguiente.

Presencia de dos carbonos anóméricos en RMN- ^{13}C ; doce átomos de carbono en total, de los cuales siete correspondieron a metinos base de oxígeno, tres metilenos base de oxígeno y dos anoméricos y finalmente ocho señales de acetilos. Por comparación de los datos obtenidos con los informados en la literatura (Aldrich, 1986 y Fukuyama, 1983), se comprobó la estructura (19) para este compuesto.



7. CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico de las semillas de *G. sepium* dio como resultado el aislamiento de una mezcla de ácidos grasos (01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07), un acil glicerol (08), un esteroil glicosidado (12), y acil esteroides (09), (10) y (11) como componentes del extracto clorofórmico y como componentes principales del extracto metanólico, azúcares libres.
- De las semillas de *G. sepium* tratadas según el procedimiento de De la Hidalga, se obtuvieron dos compuestos heterocíclicos. Es probable que el extracto acuoso del cual se obtiene el concentrado proteico de estas semillas contenga cantidades significativas de estos productos y que esto justifique la mortandad observada en el lote de ratones empleado en el experimento nutricional.
- La prueba de toxicidad al crustáceo *Artemia salina* que se empleó para monitorear la presencia de componentes tóxicos dentro de los extractos de *G. sepium* dió resultados negativos para el extracto metanólico. El extracto clorofórmico presentó una CL₅₀ de 588 µg/mL; sin embargo, al monitorear las fracciones de éste extracto, se encontró que la fracción activa FC09 (CL₅₀ de 211 µg/mL) estuvo constituida por pigmentos.
- La prueba de toxicidad al crustáceo *Artemia salina* no pudo practicarse al extracto hexánico que contenía a los metabolitos (13) y (14), por estar en muy pequeña cantidad. Se propone para un estudio posterior la búsqueda de la presencia de estos dos compuestos en la planta y probar directamente la toxicidad del extracto acuoso en el crustáceo para tener resultados más contundentes al respecto.

- En el estudio fitoquímico preeliminar del extracto metanólico de la raíz de *Parmentiera edulis*, se determinaron azúcares como los constituyentes mayoritarios.
- El bioensayo para determinar actividad hipoglucemiante no dio resultados positivos a la dosis ensayada (50mg/kg); sin embargo, no se descarta la posibilidad de que a dosis mayores pudiera tener actividad, por lo que se propone para estudios posteriores probar dosis más altas de los extractos, además de utilizar otros modelos biológicos para la búsqueda de la actividad hipoglucemiante.
- La prueba de toxicidad al crustáceo *Artemia salina* de los extractos clorofórmico y metanólico de *Parmentiera edulis*, dio resultados negativos para ambos, lo cual indica la ausencia de componentes tóxicos que pudieran tener actividad biológica.
- El análisis fitoquímico realizado a ambas especies constituye una aportación al conocimiento del contenido metabólico de la flora medicinal mexicana

8.-BIBLIOGRAFIA

Akihisa, T.; Ghosh P.; Thakur, S.; Oshikiri, S.; Tamura, T. Matsumoto, T. (1987). 24 β -methylcholesta-5,22E,25-trien-3 β -ol and 24 α -ethyl-5 α -cholest-22E-en-3 β -ol from *Clerodendrum fragans*. *Phytochemistry*, **27** (1), pp 241-244.

Alán, E.; Barrantes, U. (1988). Efecto Alelopático del Madero Negro (*Gliricidia sepium*) en la Germinación y Crecimiento Inicial de Algunas Malezas Tropicales. *Turrialba*, **38** (4) pp 271-278.

Aldrich (1983). The Sigma Library of NMR Spectra. USA, pp 437, 452-454.

Aldrich (1985). The Sigma Library of FT-IR Spectra. USA, pp 501.

Aldrich (1986). The Sigma Library of FT-IR Spectra. USA, pp 1072, 1142, 1317, 1318, 1393, 1394 ,1413, 1414 y 1443.

Álvarez, M. A. (2001). Evaluación Bromatológica del Aceite de la Semilla de Cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Argueta, V. A. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Editorial INI, México, vols. 1-3.

Castro, N. (1995). Aislamiento y Determinación de la Estructura Molecular de los Constituyentes Químicos Mayoritarios Presentes en *Lopezia racemosa* (Onagraceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Centurión, D.; Espinosa, J. y Cázares, J. G (2000). Catálogo de Plantas de Uso Alimentario Tradicional en la Región Sierra del Estado de Tabasco. Fundación Produce Tabasco, A.C. Tabasco, pp 10.

Chadhokar, P. (1982). *Gliricidia maculata* una Leguminosa Forrajera Prometedora. *Revista Mundial de Zootecnia*, **44**, pp 36-43.

Common Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands (1964). United States, Department of Agriculture, Washington, pp 277-278.

Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press, New York, pp 588, 968.

De la Hidalga, C. (2003). Evaluación Toxicológica de la Fracción Proteínica de la Semilla de Cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Della Greca, M.; Mónaco, P. and Previtera, L. (1990). Stigmasterols from *Typha Latifolia*. *Journal of Natural Products*, **53** (6) pp 1430-1435.

Dewick, P. (1997). Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons. pp 32-42, 228-250.

Diccionario Enciclopédico abreviado (1972). 7a. Edición. Madrid, Vols.1-6, 7.

División de Informática, Coordinación de Salud Comunitaria (2001). Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Dyas, L.; Goad, L. (1993). Steryl Fatty Acyl Esters in Plants. *Phytochemistry*, **34** (1) (Review article number 81), pp 17-29.

Enciclopedia Universal Ilustrada Europea-Americana (1974). Editorial Espasa-Calpe, Madrid, Vols. 7, 17, 28, 30, 55 y 56.

Fessenden, R.; Fessenden J. (1983). Química Orgánica 2a edición, Grupo editorial Iberoamérica. México, Capítulos 12 y 18.

Fukuyama, Y.; Sato, T.; Miura, Y.; Asakawa, Y. and Takemoto, T. (1983). Hidropiperoside a Novel Coumaryl Glycosid from the Root of *Polygonum hydropiper*. *Phytochemistry*, **22** pp 549.

Garduño, M. (2001). Búsqueda de Substancias con Actividad Hipoglucemiante a Partir de Ciertos Vegetales Empleados en la Medicina Tradicional Mexicana. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, UNAM.

Griffiths, L. (1962). On the Co-occurrence of Coumarin, *O*-coumaric acid, and melilotic acid in *Gliricidia sepium* and *Dipteryx odorata*. *Journal of Experimental Botany*, **13**, (38) pp 169-175.

Gutiérrez, P. (1992). Aislamiento y Caracterización Estructural de Acil glicosil Esteroles y Otros Constituyentes de *Chenopodium nuttalliae* (Huauzontle). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Handbook of Pest Management (1999). John R. Ruberson (editor), Marcel Dekker, Inc. New York.

Herath, H.; Dassanayake, R.; Priyadarshani, A.; De Silva, S.; Wannigama, G. y Jaime, J. (1998). Isoflavonoids and a Pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, **47** (1), pp 117-119.

Hilditch, T. (1956). The Chemical Constitution of Natural Fats. Chapman & Hall, London, pp.169.

Jiang, Z. y Gerwick, W.(1990). Galactolipids from the Temperate Red Marine Algae *Gracilariopsis lemaneiformis*. *Phytochemistry*, **29** (5), pp 1433-1440.

Liebermann, H. (1983). Estimating LD₅₀ Using the Probit Technique: a Basic Computer Program Drug. *Chemical toxicology*, **6**, pp 111-116.

Manners G.; Jurd L. (1977). Isoflavene, Isoflavan, and Flavonoid Constituents of *Gliricidia sepium*. *J.Agric. Food Chem.*, **25** (4), pp 723-726.

Manners, G.; Jurd, L. (1979). Additional Flavanoids in *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*, **18** pp 1037-1042.

Maritim, A.; Sanders, R. y Watkins III, J. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: a Review. *J Biochem Molecular Toxicology*, **17** (1), pp 24-38.

Martínez, A. (2001). Evaluación Bromatológica y Toxicológica de la Fracción Proteínica de la Semilla de Cacahuanano (*Gliricidia sepium*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Martínez, M. (1979). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de cultura económica, México, pp 449.

Martínez, M. (1989). Las Plantas Medicinales de México. 6ª edición. Ediciones Botas. México, pp 91-92.

Mata, R. (2000). Curso Teórico de Farmacognosia. Material Didáctico. Facultad de Química UNAM, pp 11.

McLaughlin, J. (1991). Crown Gall, Tumors on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fraction Methods, in Plant Biochemistry. *Academic Press*, **6**, pp 8-9.

Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D. y McLaughlin, J., (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plants Constituents. *Planta Médica*, **45**, pp 31-34.

Montilla, J.; Reverón, A.; Schmidt, B.; Wiedenhofer, H y Castillo, P. (1980) La Harina de Follaje de Rabo de Ratón (*Gliricidia sepium*) en raciones para ponedoras. *Agronomia tropical*, **24** (6), pp 505-511.

Murugesan, R. y Kailash, P. (1993). Allelopathic Compounds in Leaves of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth Ex Walp and its Effect on *Sorghum vulgare* L. *Journal of Chemical Ecology*, **19** (8), pp 1691-1701.

Pei-Wu, G.; Fukuyama, Y.; Rei, W.; Jinxian, B. y Nakagawa, K. (1988). An Acylated Sitosterol Glucoside from *Alisma Plantago-aquatica*. *Phytochemistry*, **27** (6), pp 1895-1896.

Pérez, R.; Pérez, C.; Zavala, M. y Pérez, S. (1998). Actividad Hipoglucemiante de *Bouvardia terniflora*, *Brickellia veronicaefolia* y *Parmentiera edulis*. *Salud pública de México*, **40** (4), pp 354-358.

Ramos, R.; Lara, A.; Alarcón, F. y Flores, J. (1992). Hypoglycemic Activity of some Antidiabetic Plants. *Archives of Medical Research*, **23** (3), pp 105-109.

Rastrelli L.; Berger, I.; Kubelka, W.; Cáceres, A.; De Tommasi, N. y De Simone, F. (1999a). New 12a-Hydroxyrotenoids from *Gliricidia sepium* Bark. *Journal of Natural Products*, **62** (4), pp 188-190.

Rastrelli, L.; Cáceres, A.; De Simone, F. y Aquino, R. (1999b). Studies on the Constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) Leaves and Roots: Isolation and Structure Elucidation of New Triterpenoid Saponins and Aromatic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, pp 1537-1540.

Seibl, J.; Clerc, T.; y Pretsch, E. (1980). Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Editorial Alhambra, España.

Shriner, R. (1997). Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Editorial Limusa, México, pp 78, 269.

Shoolery, J. (1977). Some Quantitative Applications of ^{13}C -RMN Spectroscopic. *Progress in NMR Spectroscopy*, **11** (79).

Silva, R. (2002). Estudio Químico y Biológico Preliminar de los Frutos de *Parmentiera edulis* (Bignoniaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Teng, W. (1993). Bioactive Natural Products: Toxicity Testing using the Brine Shrimp: *Artemia salina*. S.M. Colgate & R.J. Molyneaux, CRC Press, INC. E.U.A, pp 441-457.

The Pesticide Manual (1994). Clive Tomlin (editor), Tenth Edition, Crop Protection Publications, United Kingdom.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (1999).

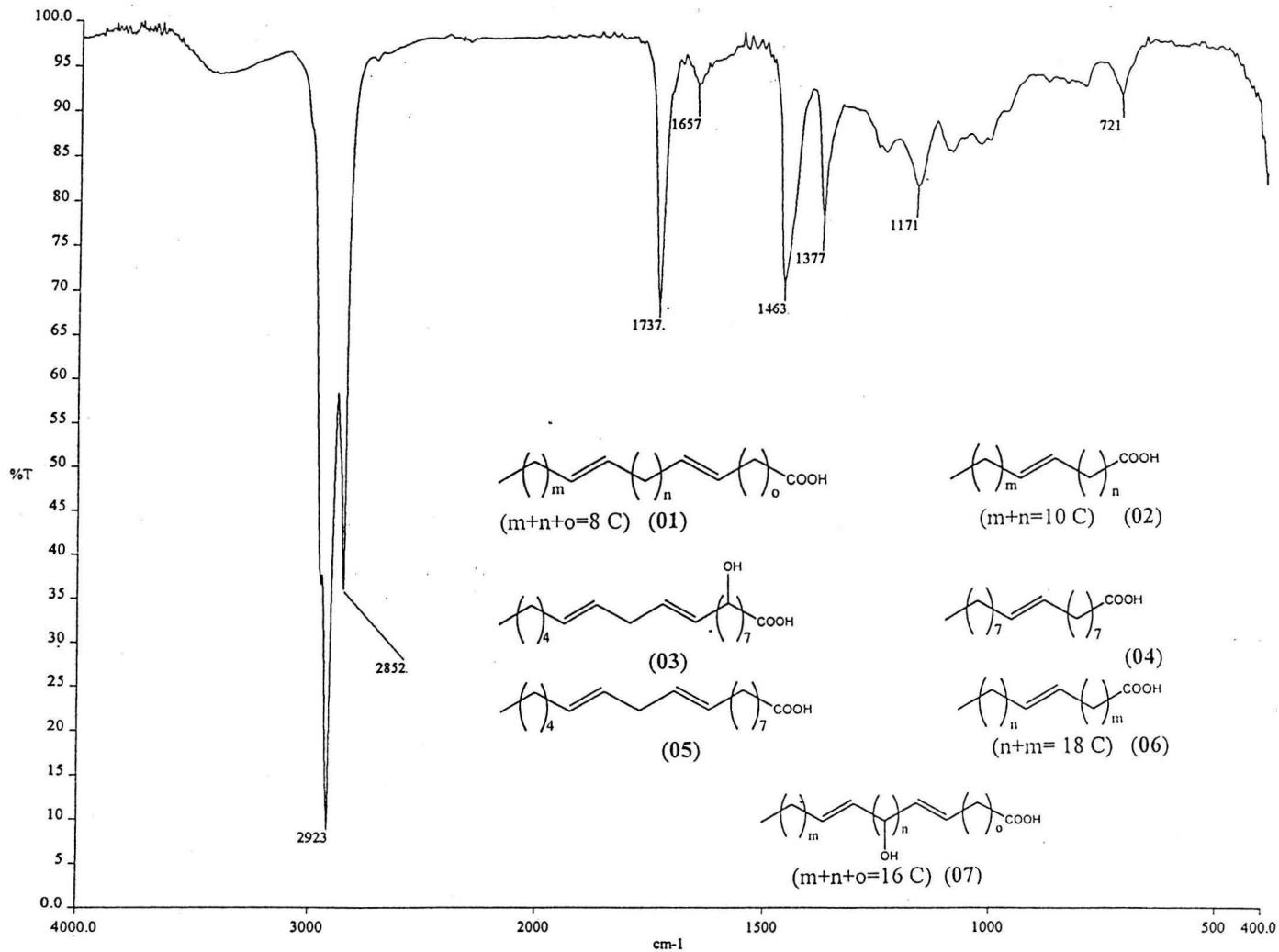
<http://www.inegi.gob.mx/homepara/estadistica/sociodem/salud/sal-3.html>

Instituto Mexicano del Seguro Social (2001) <http://www.imss.gob.mx/cgi-bin/web.exe>

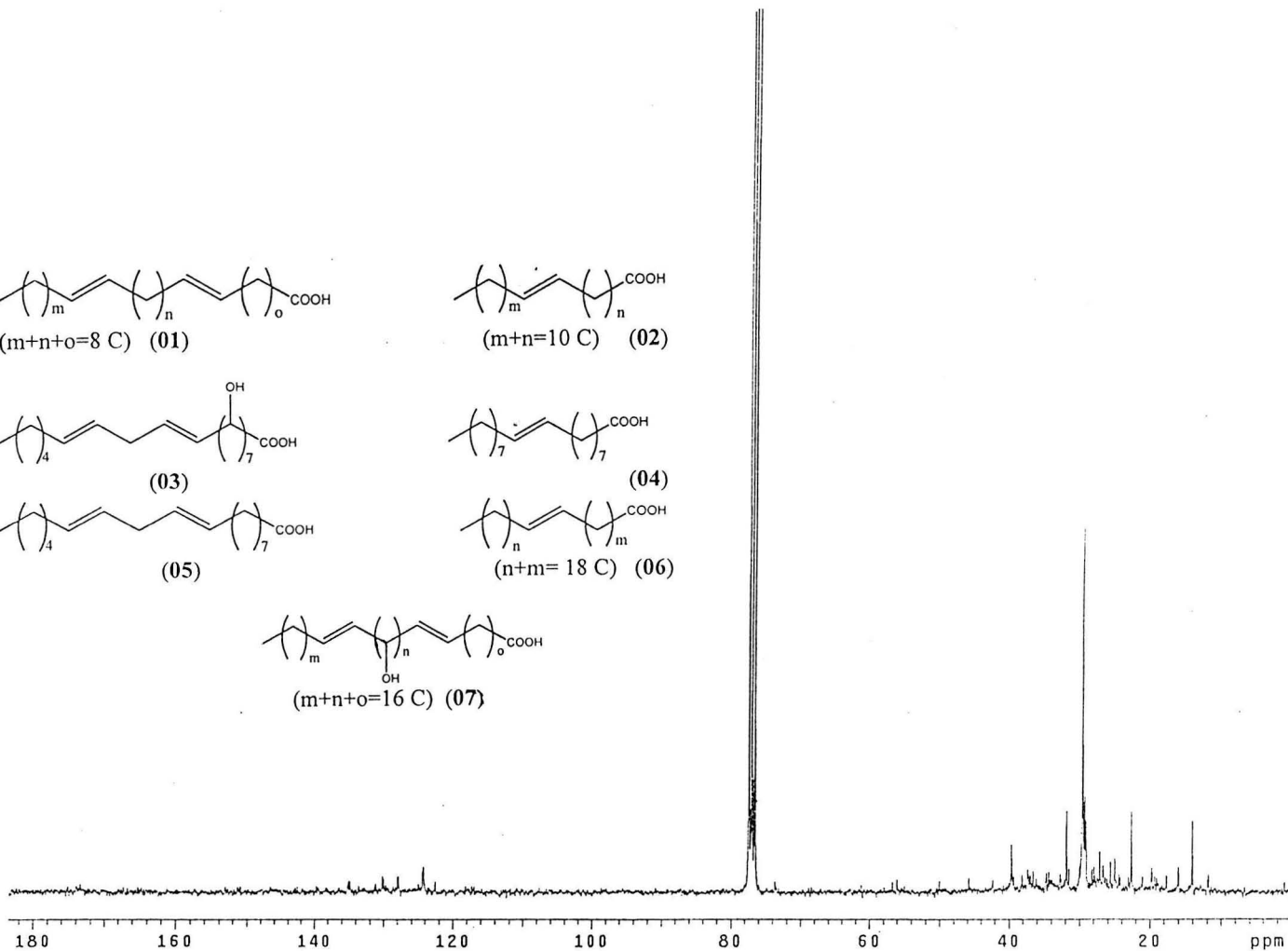
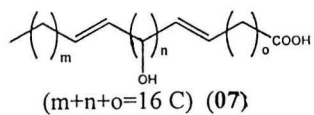
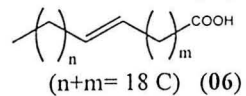
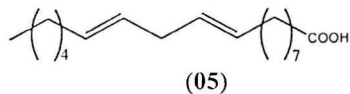
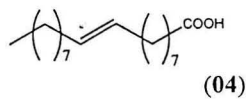
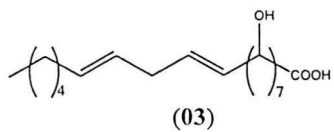
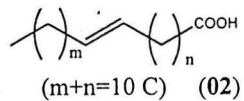
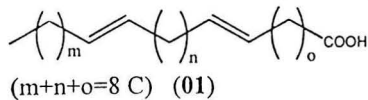
www.botany

www.desert-tropicals

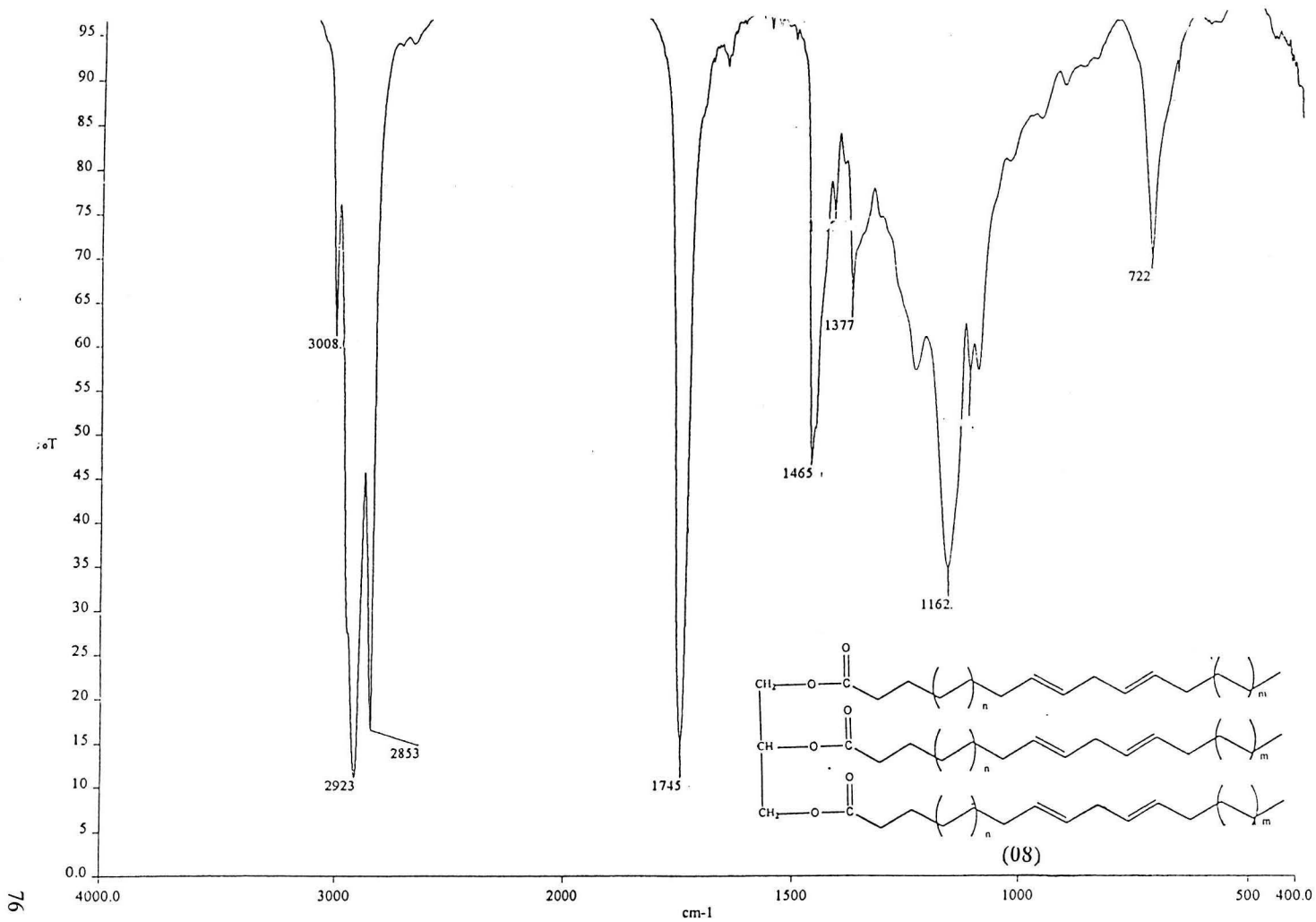
ANEXO



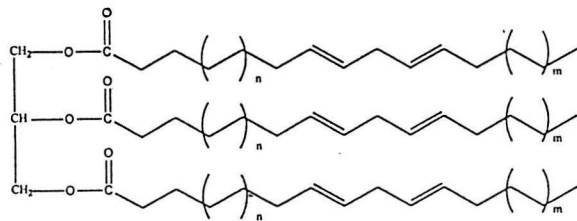
Espectro 1. Espectro de IR de la mezcla de ácidos grasos (01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07) aislados de *G. sepium*.



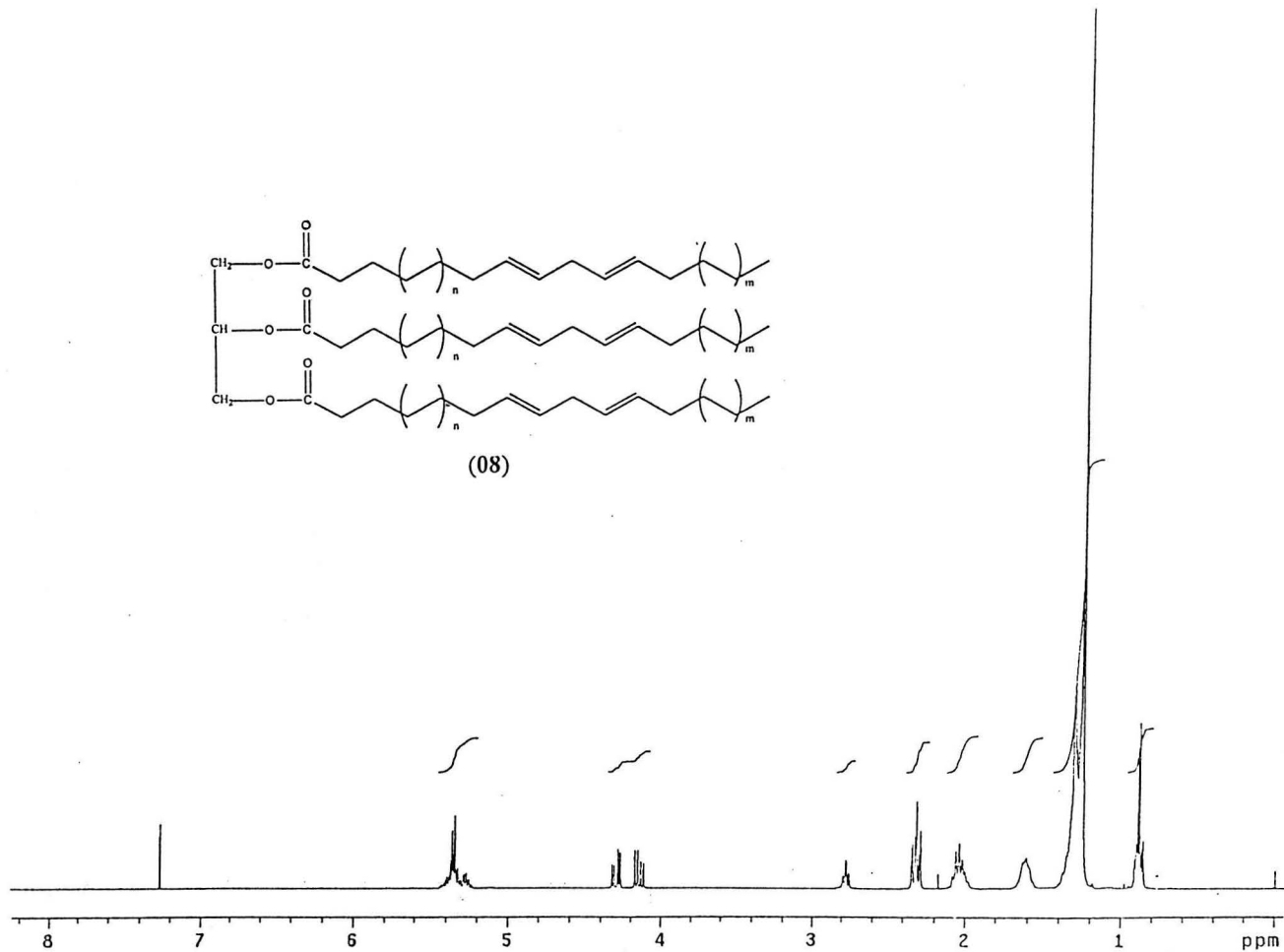
Espectro 3. Espectro de RMN-¹³C de mezcla de ácidos grasos (01), (02), (03), (04), (05), (06) y (07) aislados de *G. sepium*.



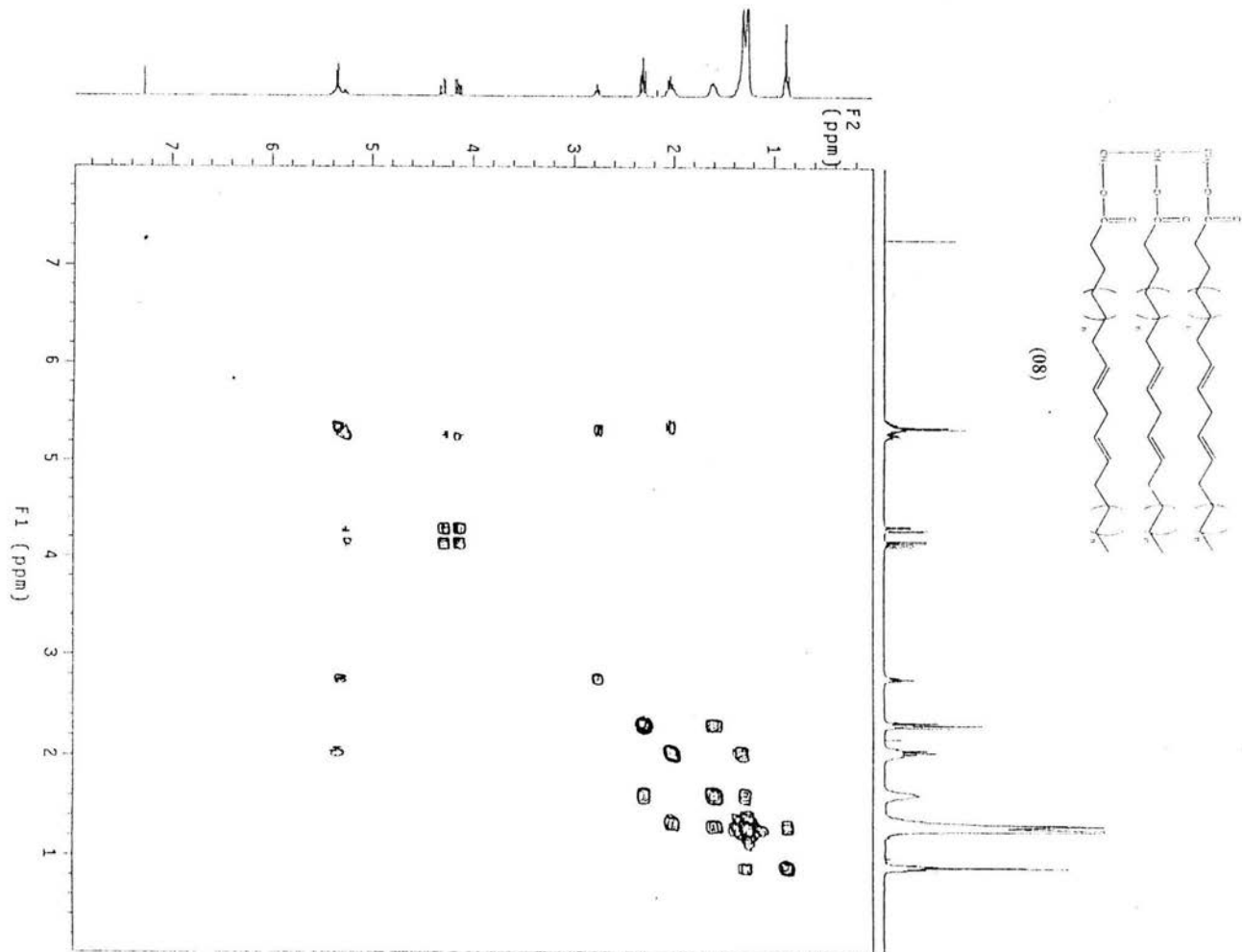
Espectro 4. Espectro de IR del triacilglicerol (08) aislado de *G. sepium*.



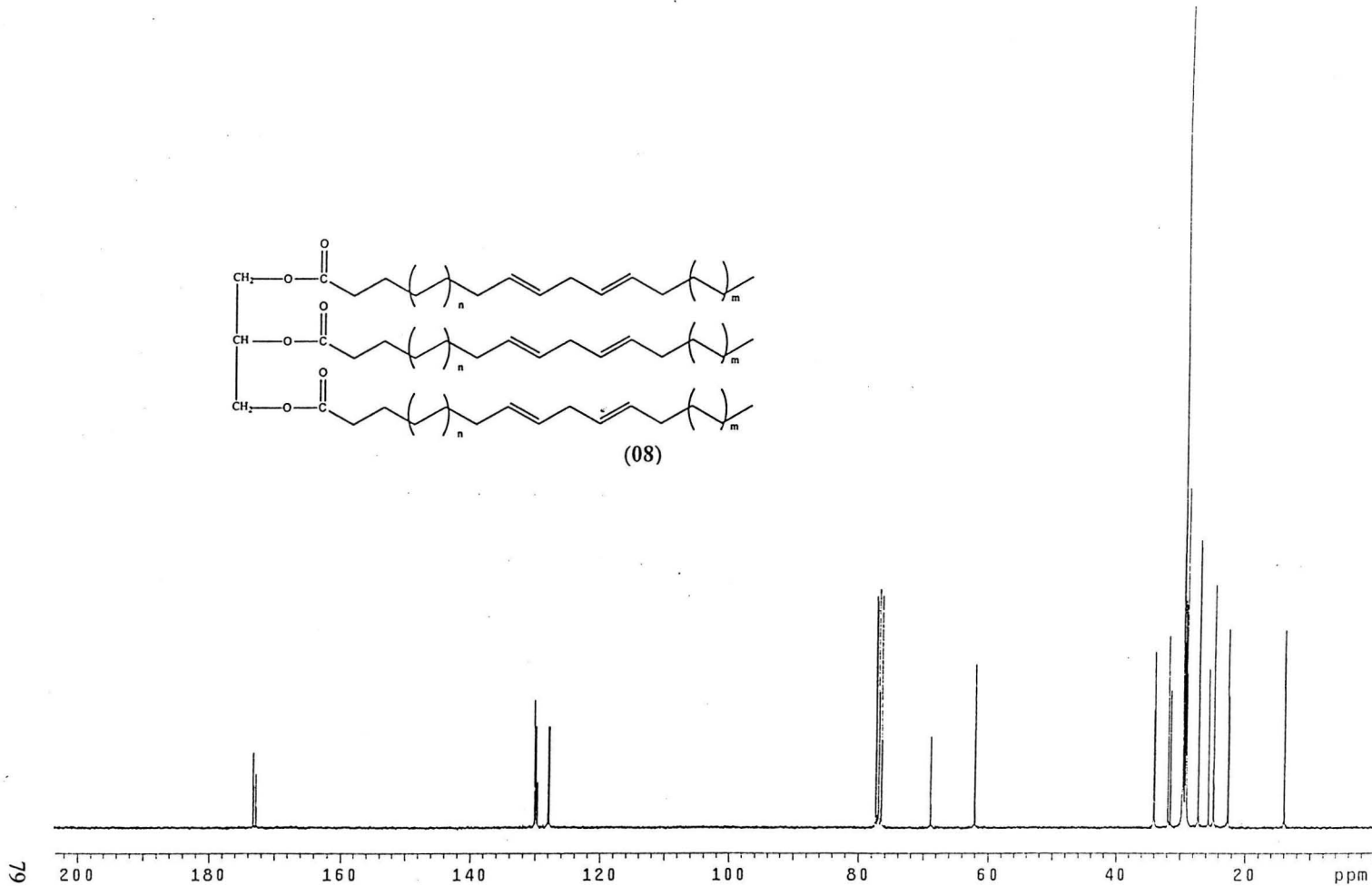
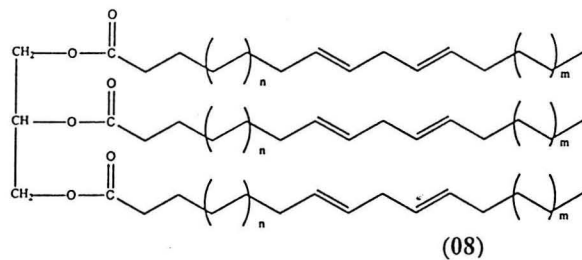
(08)



Espectro 5. Espectro de RMN- ^1H del triacilglicerol (08) aislado de *G. sepium*.

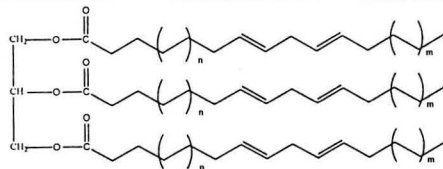


Espectro 6. Espectro de RMN modalidad ^1H - ^1H -COSY del triacilglicerol (08) aislado de *G. septium*.



Espectro 7. Espectro de RMN- ^{13}C del triacilglicerol (08) aislado de *G. sepium*.

CH3 carbons

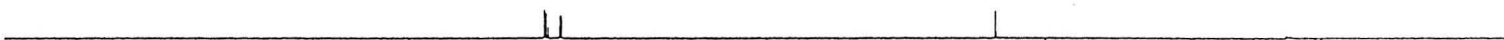


CH2 carbons

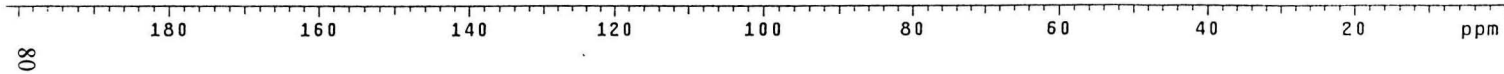


(08)

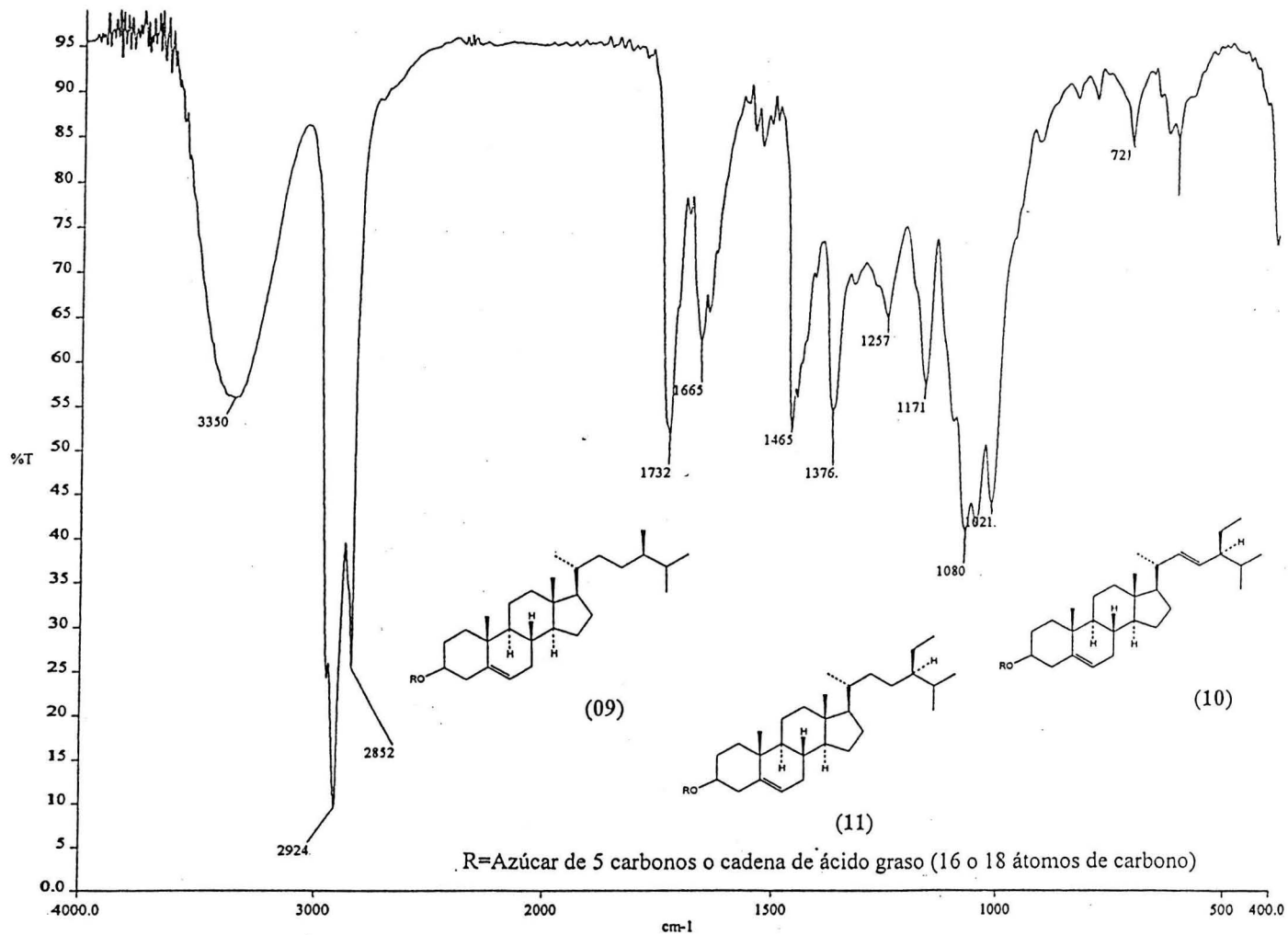
CH carbons



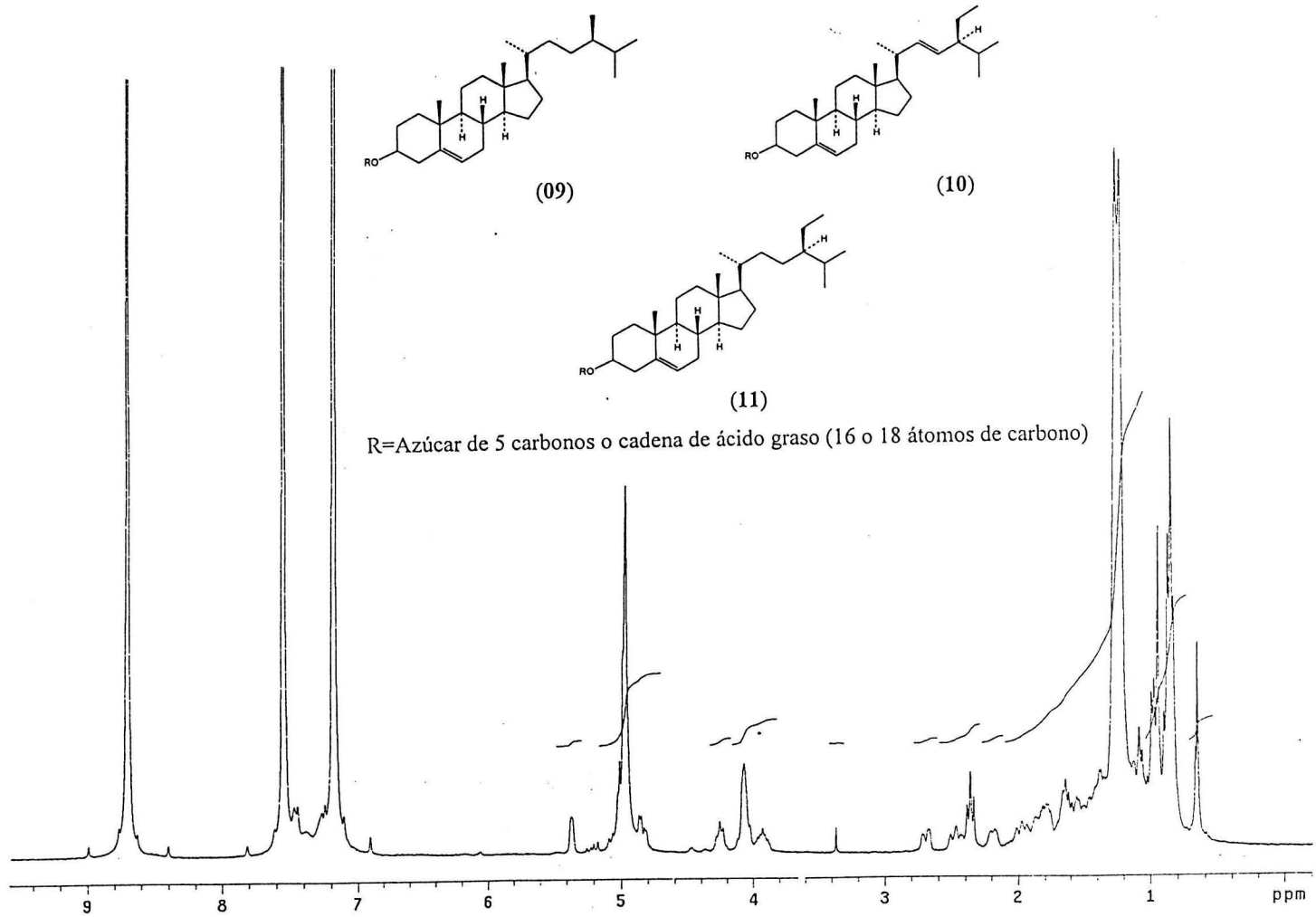
all protonated carbons



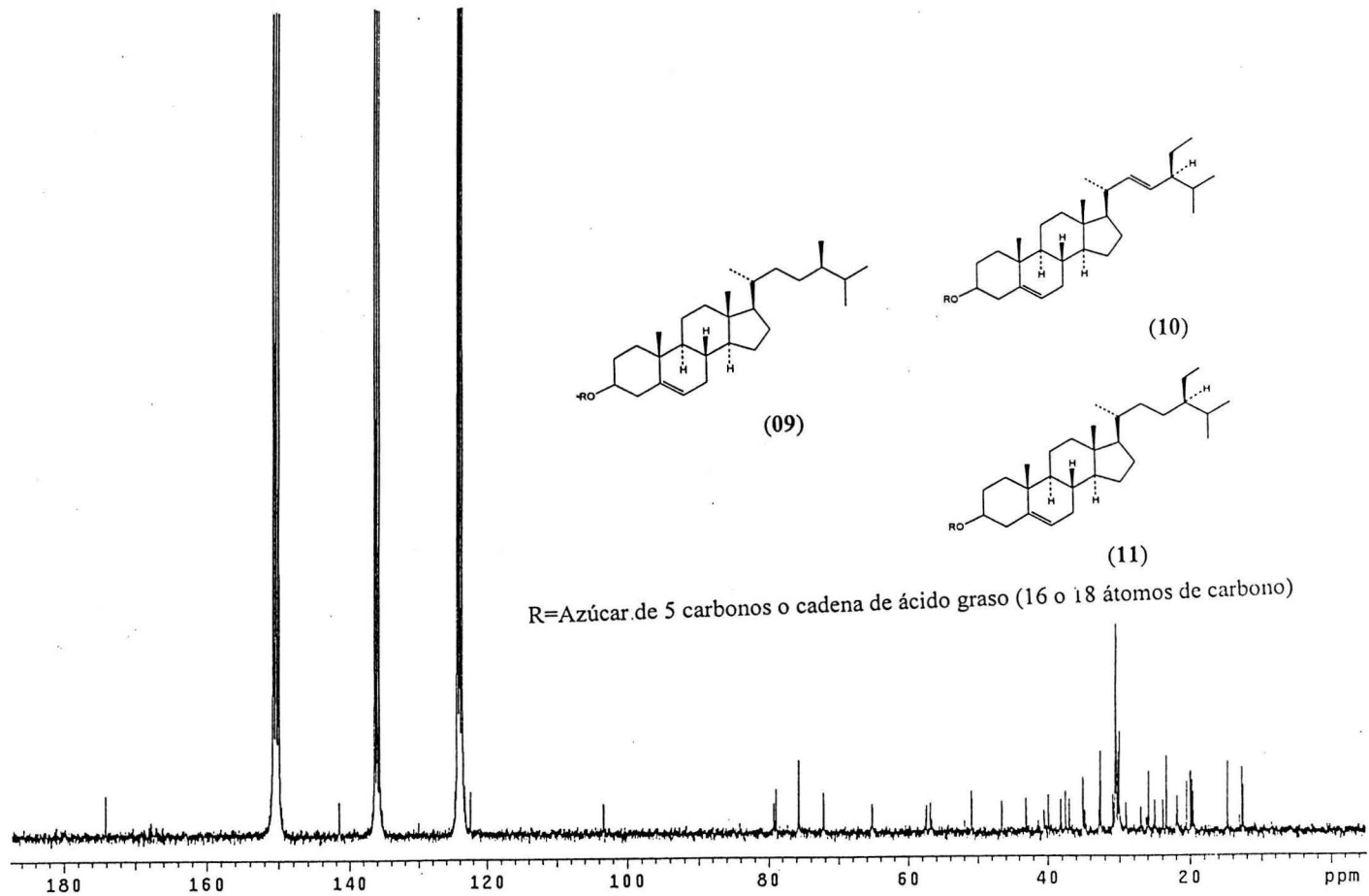
Espectro 8. Espectro de RMN modalidad DEPT del triacilglicerol (08) aislado de *G. sepium*.



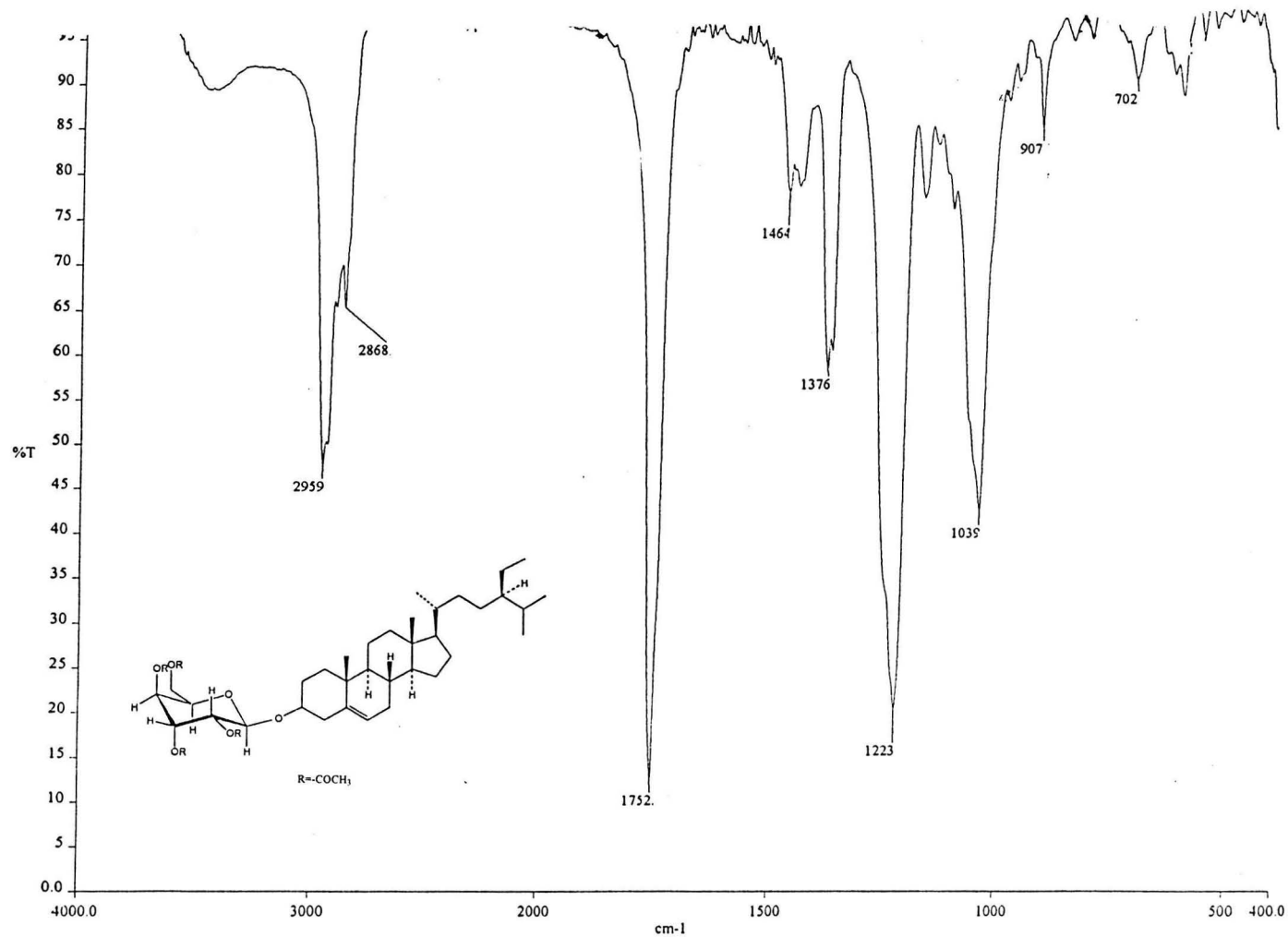
Espectro 9. Espectro de IR del campesterol (09), stigmasterol (10) y β -sitosterol (11) aislados de *G. sepium*.



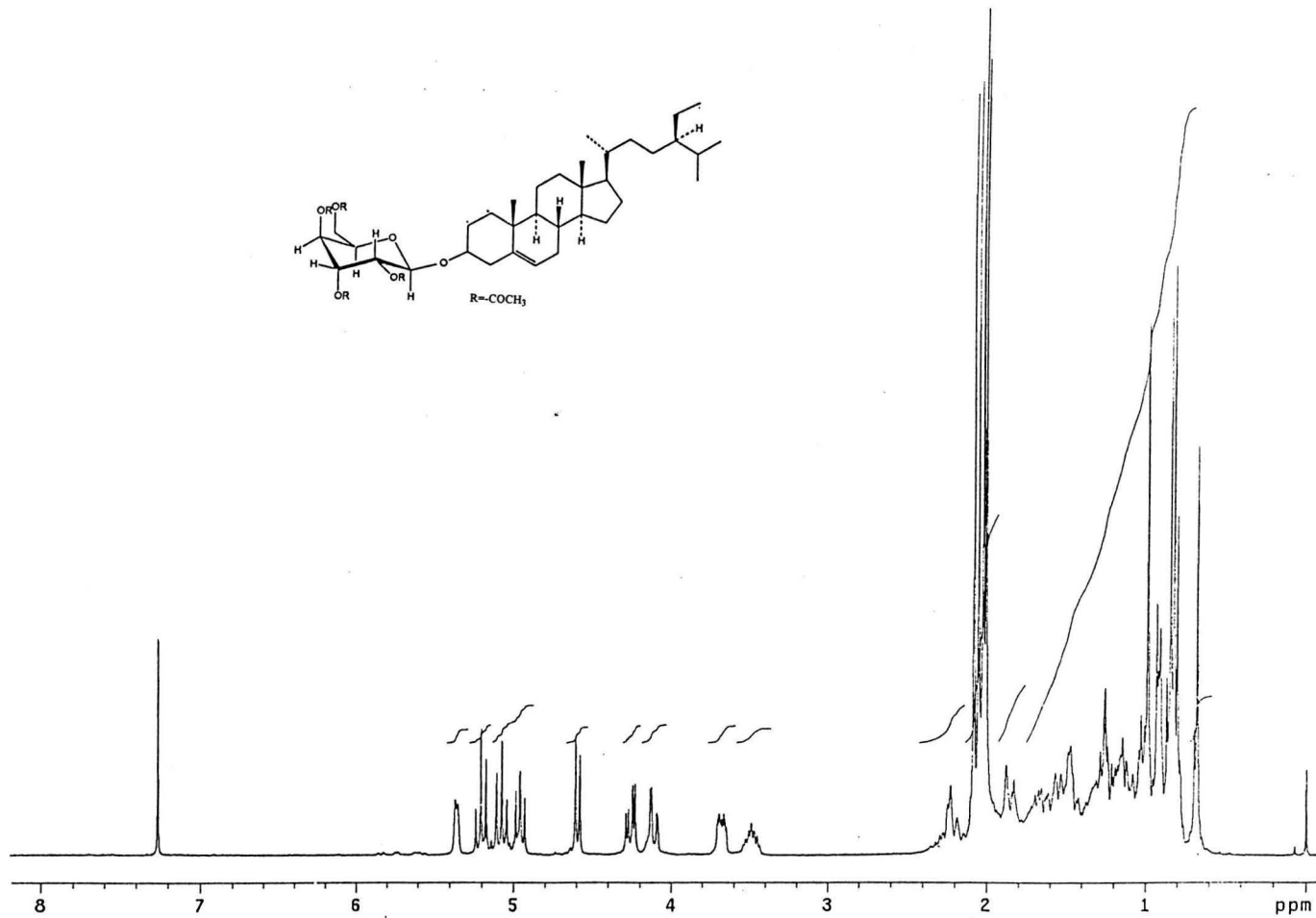
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H del campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11) aislados de *G. sepium*.



Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C del campesterol (09), estigmasterol (10) y β -sitosterol (11) aislados de *G. sepium*.

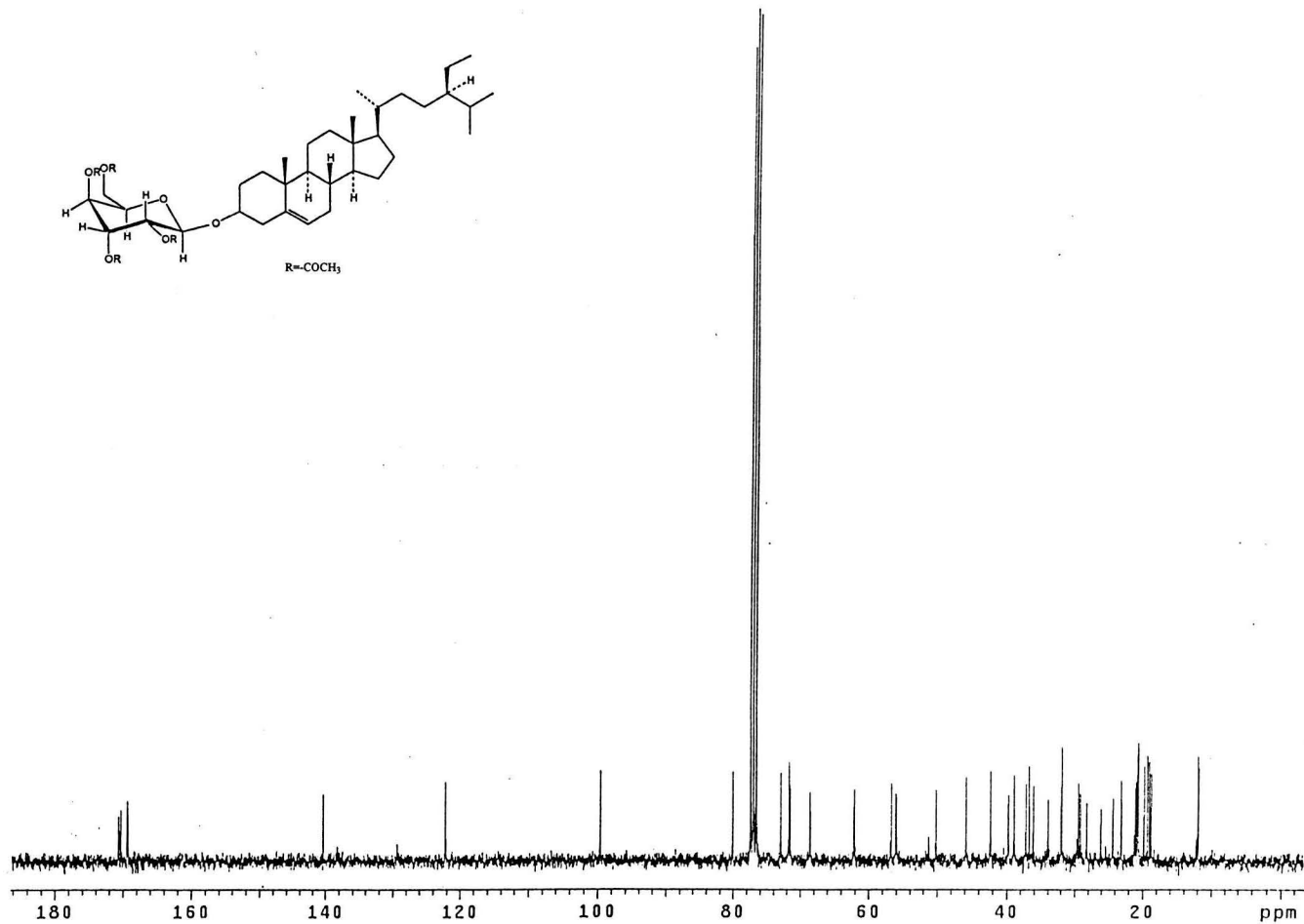
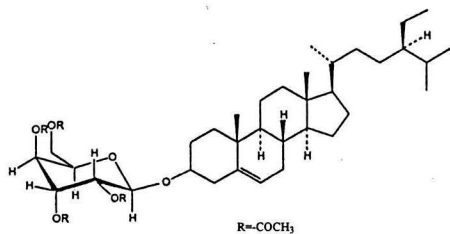


Espectro 12. Espectro de IR del β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo tetracetilado (12) aislado de *G. sepium*.

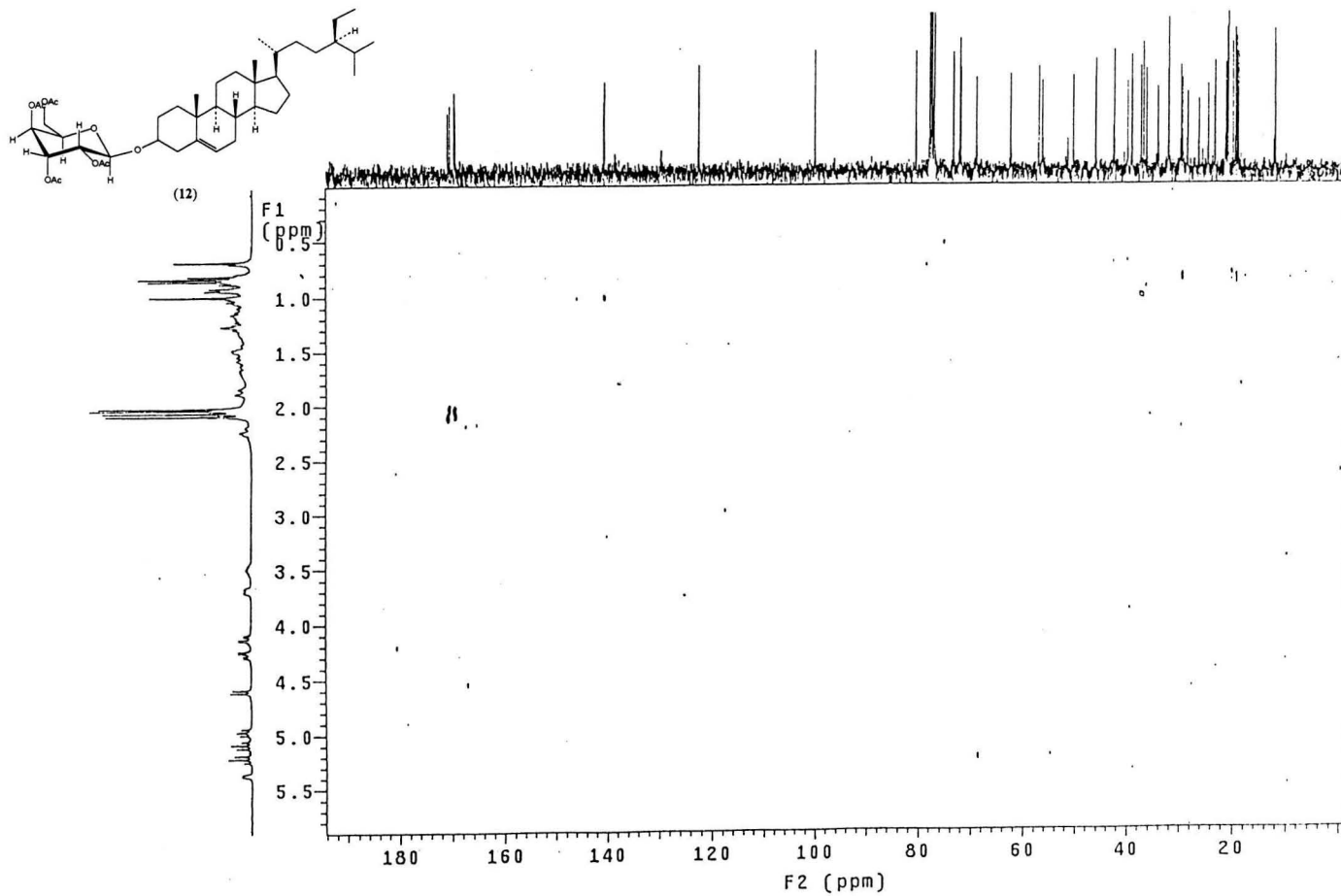


85

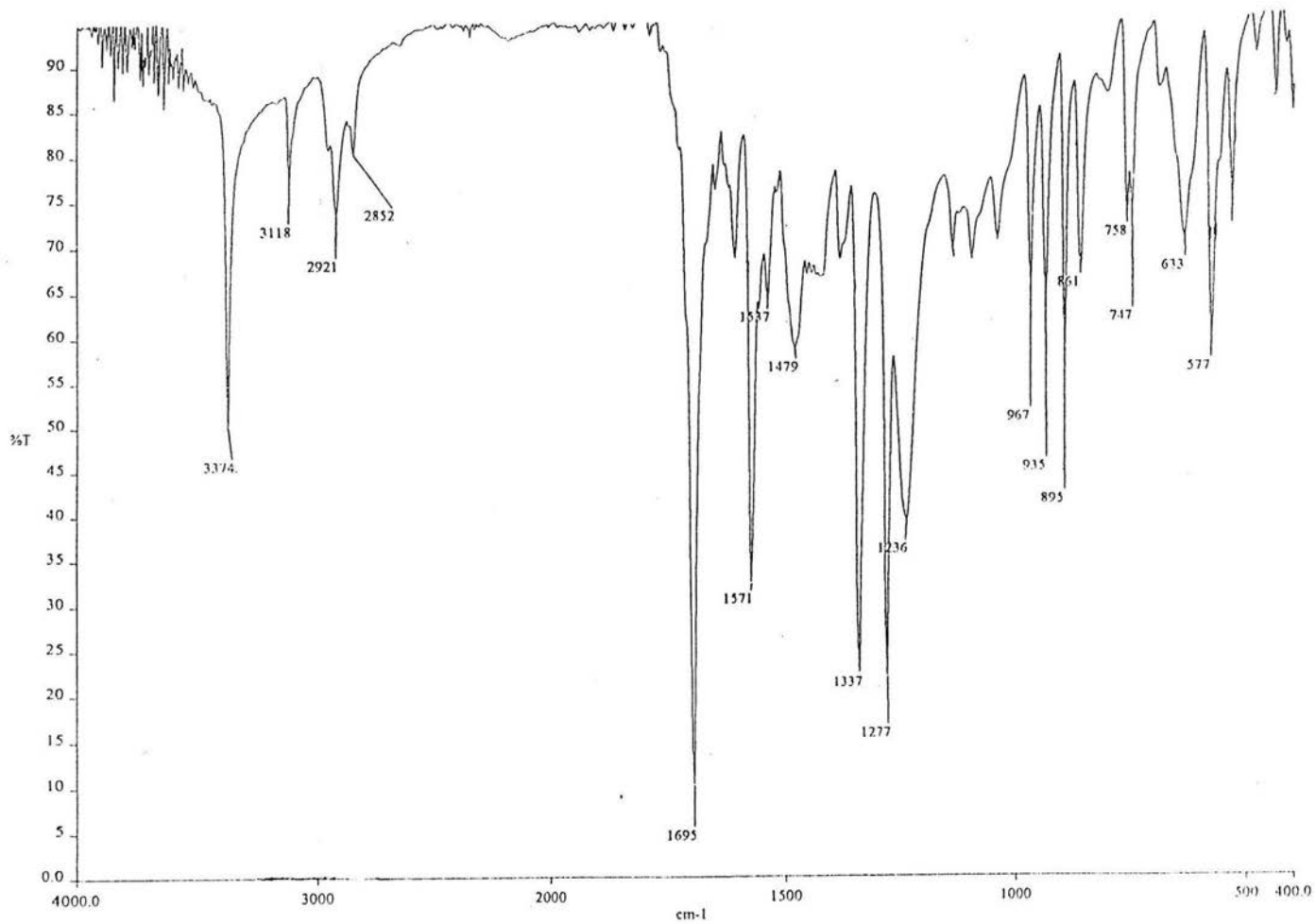
Espectro 13. Espectro de RMN- ^1H del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12) aislado de *G. sepium*.



Espectro 14. Espectro de RMN-¹³C del β-D-glucopiranosido de β-sitosterilo tetracetilado (12) aislado de *G. sepium*.

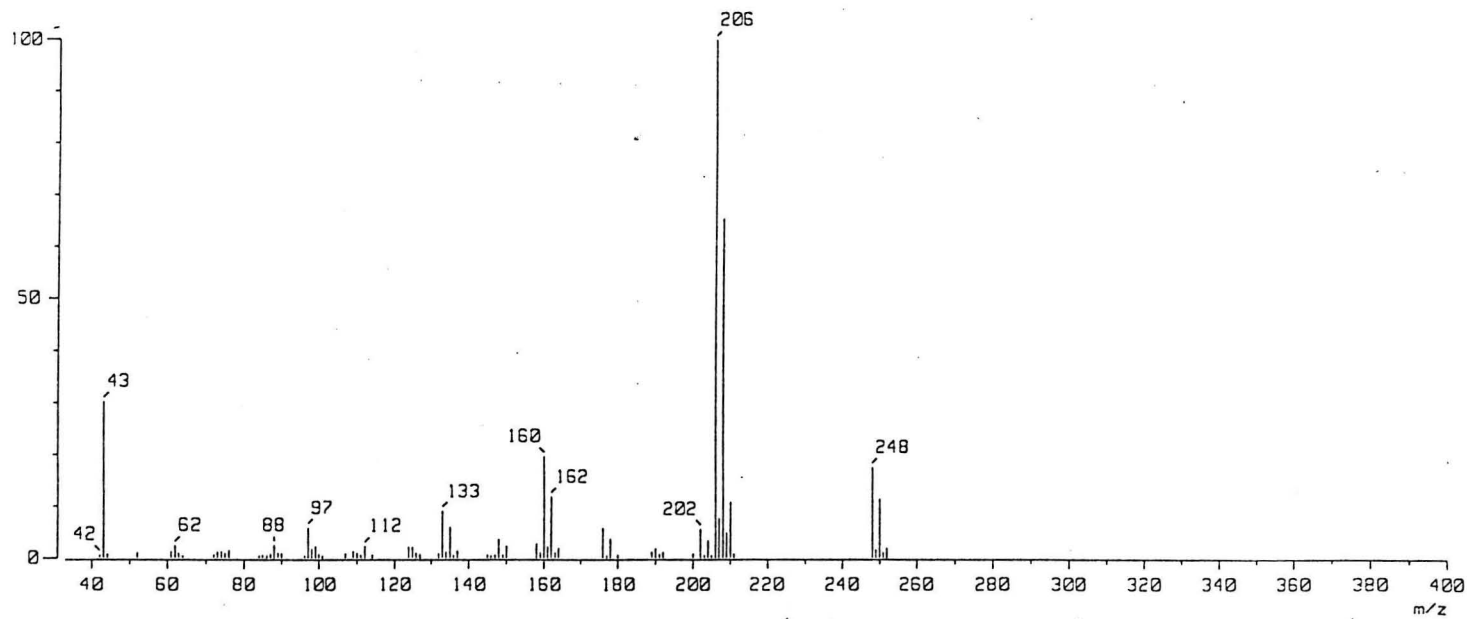


Espectro 15. Espectro de RMN modalidad ^1H - ^{13}C -Flock del β -D-glucopiranosido de β -sitosterilo tetracetilado (12) aislado de *G. sepium*.



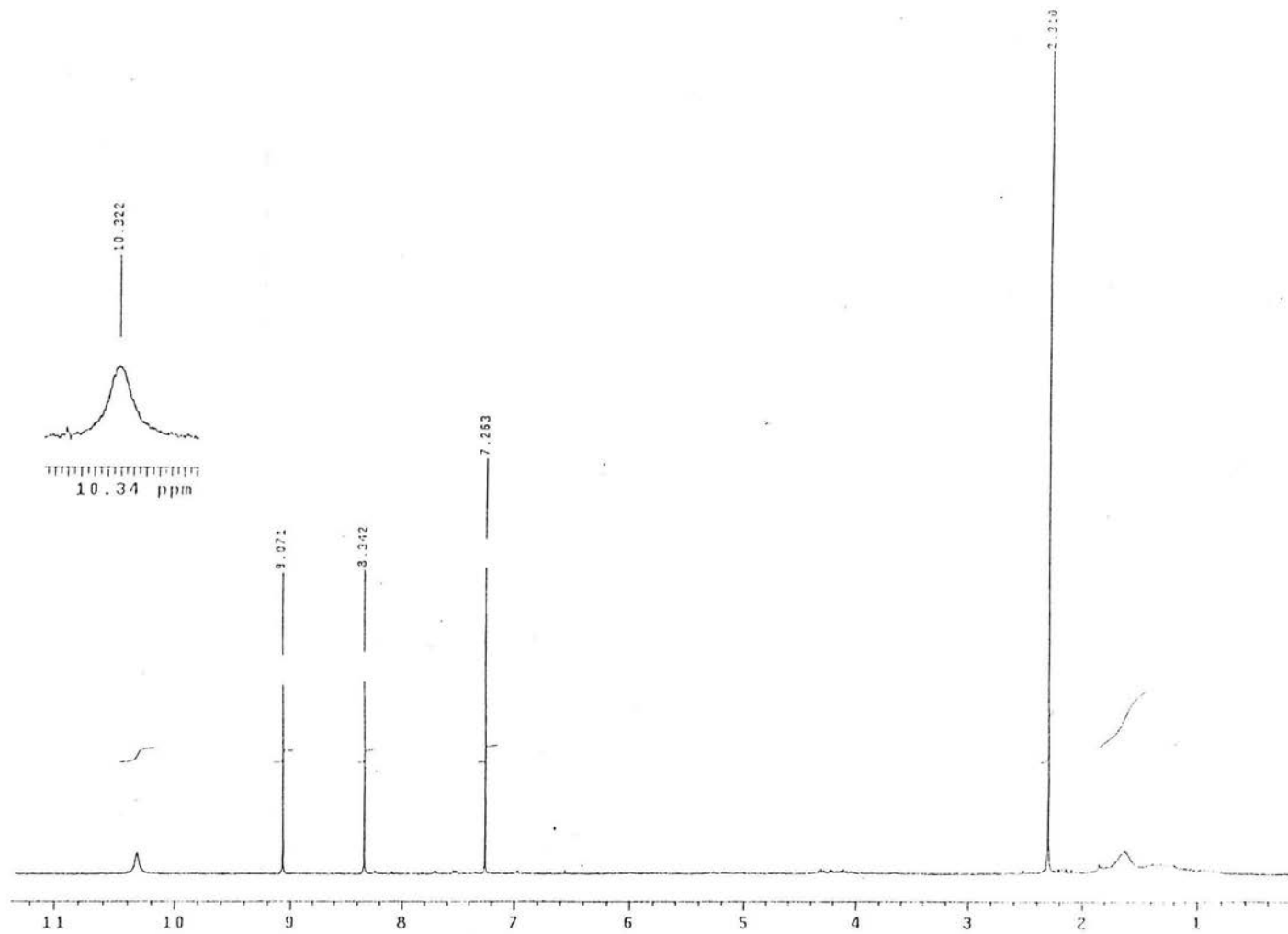
Espectro 16. Espectro de IR del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.

tr= 20.17 min

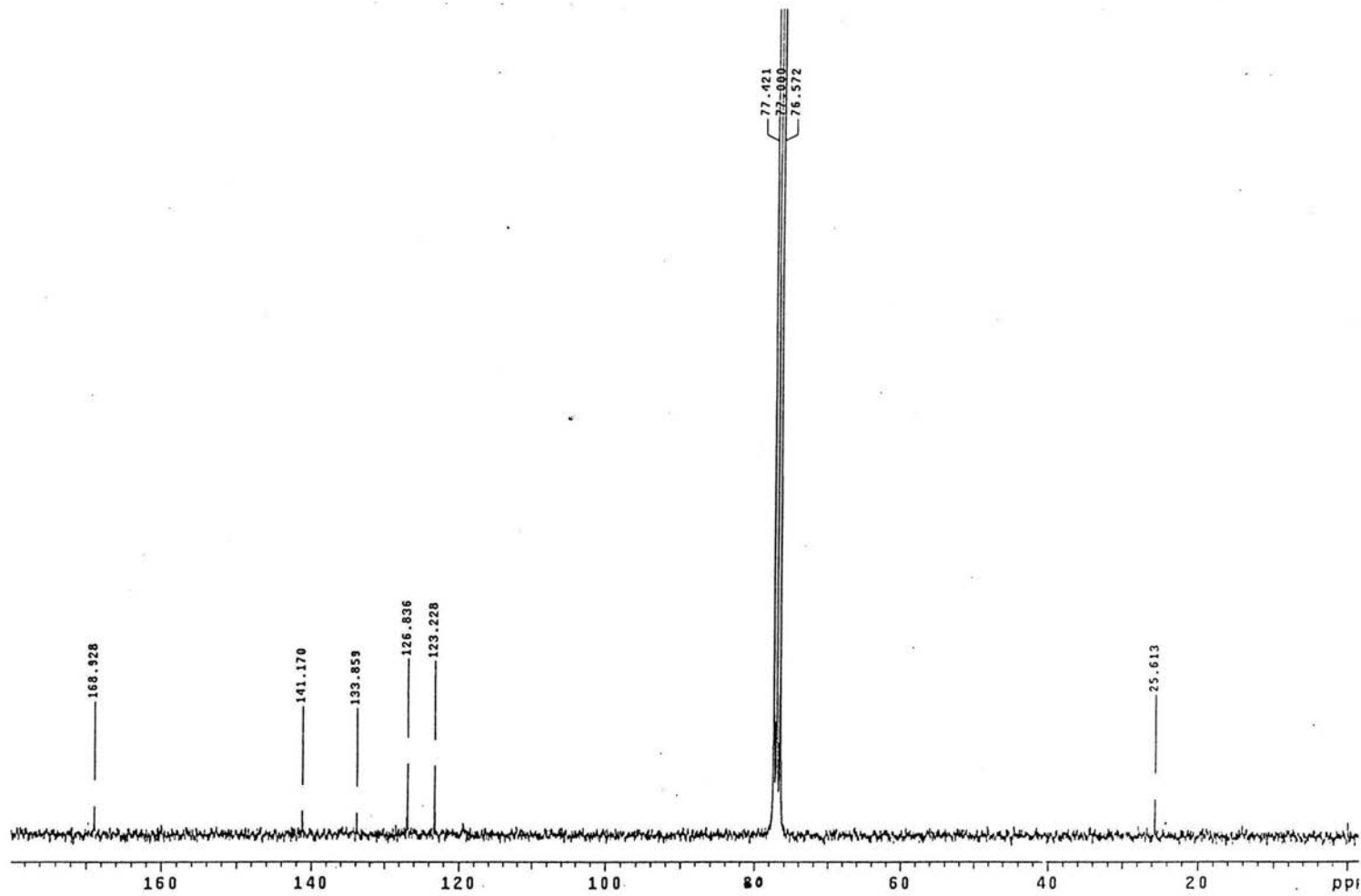


68

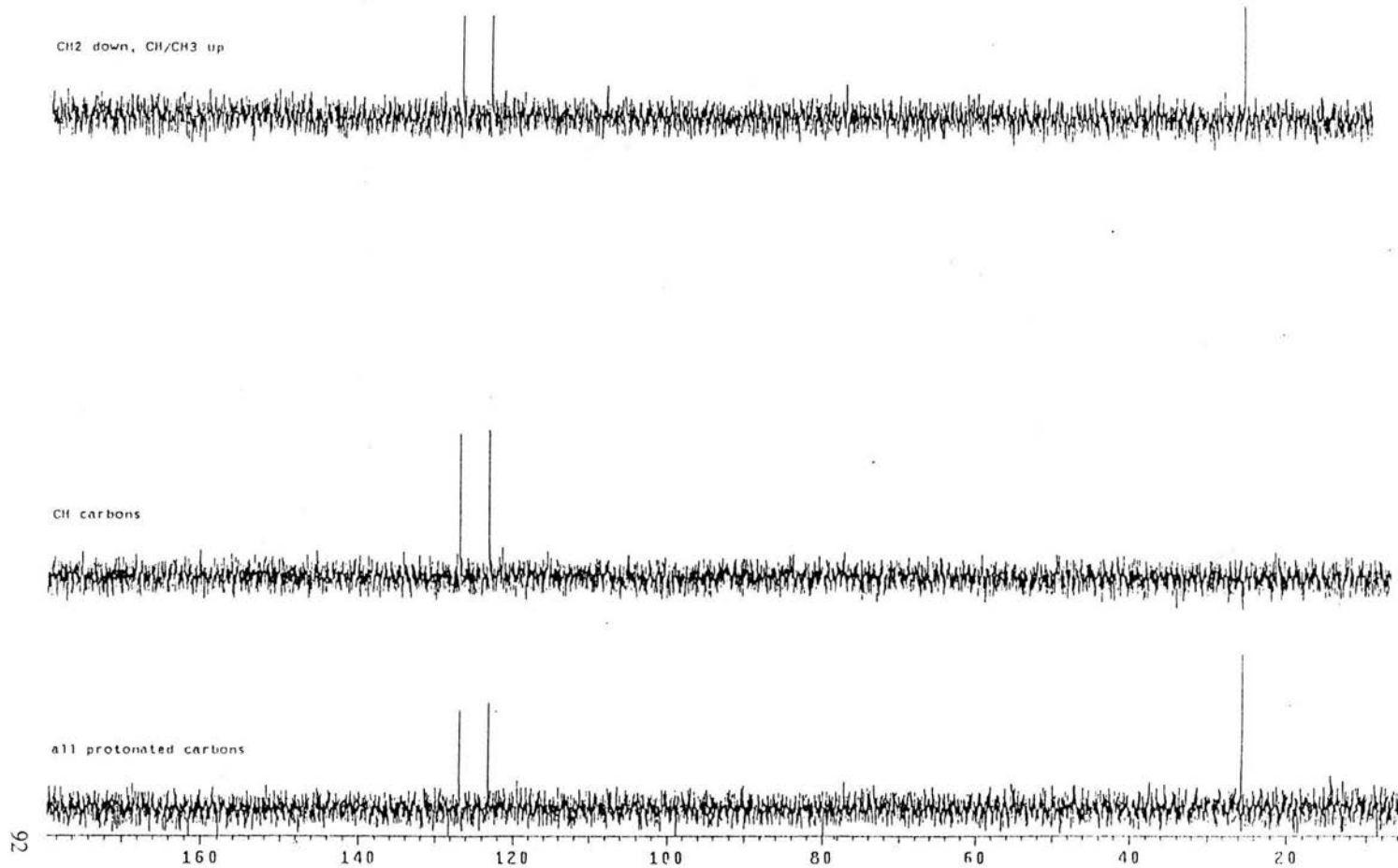
Espectro 17. Espectro de EM modalidad IE del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.



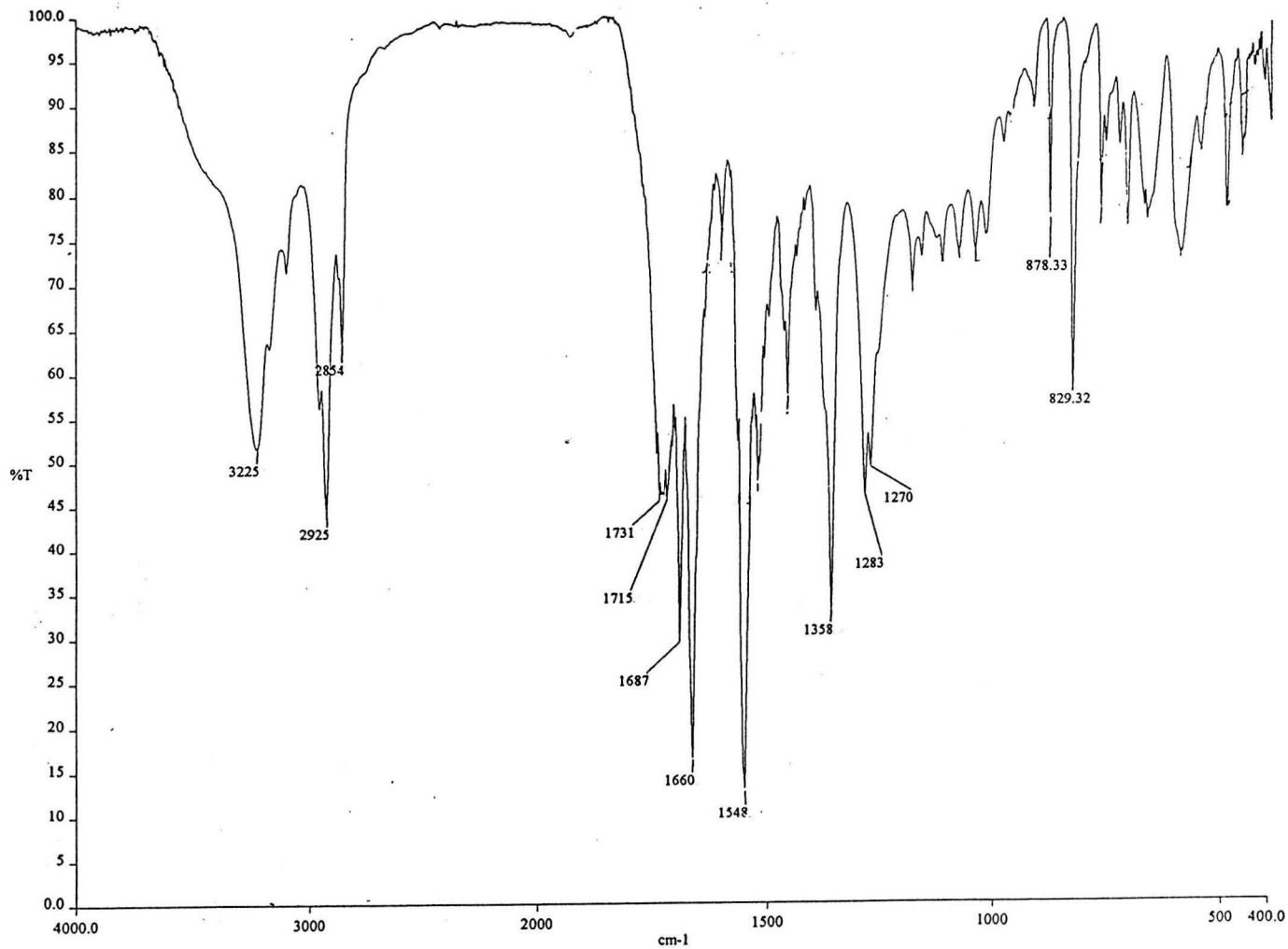
Espectro 18. Espectro de RMN- ^1H del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.



Espectro 19. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.

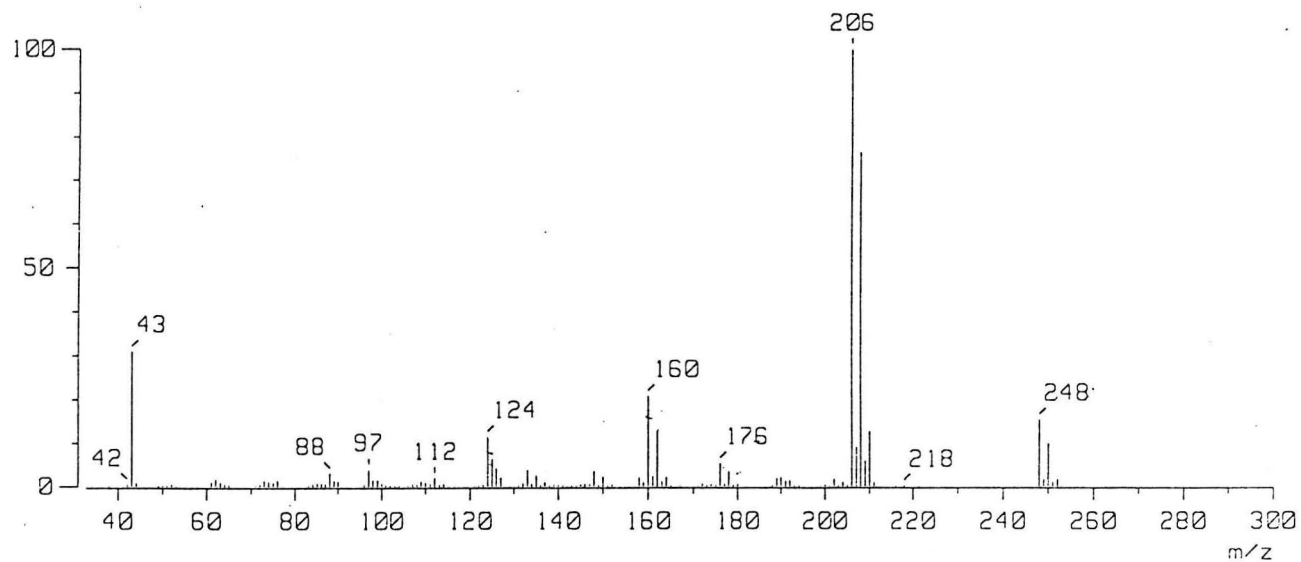


Espectro 20. Espectro de RMN modalidad DEPT del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.

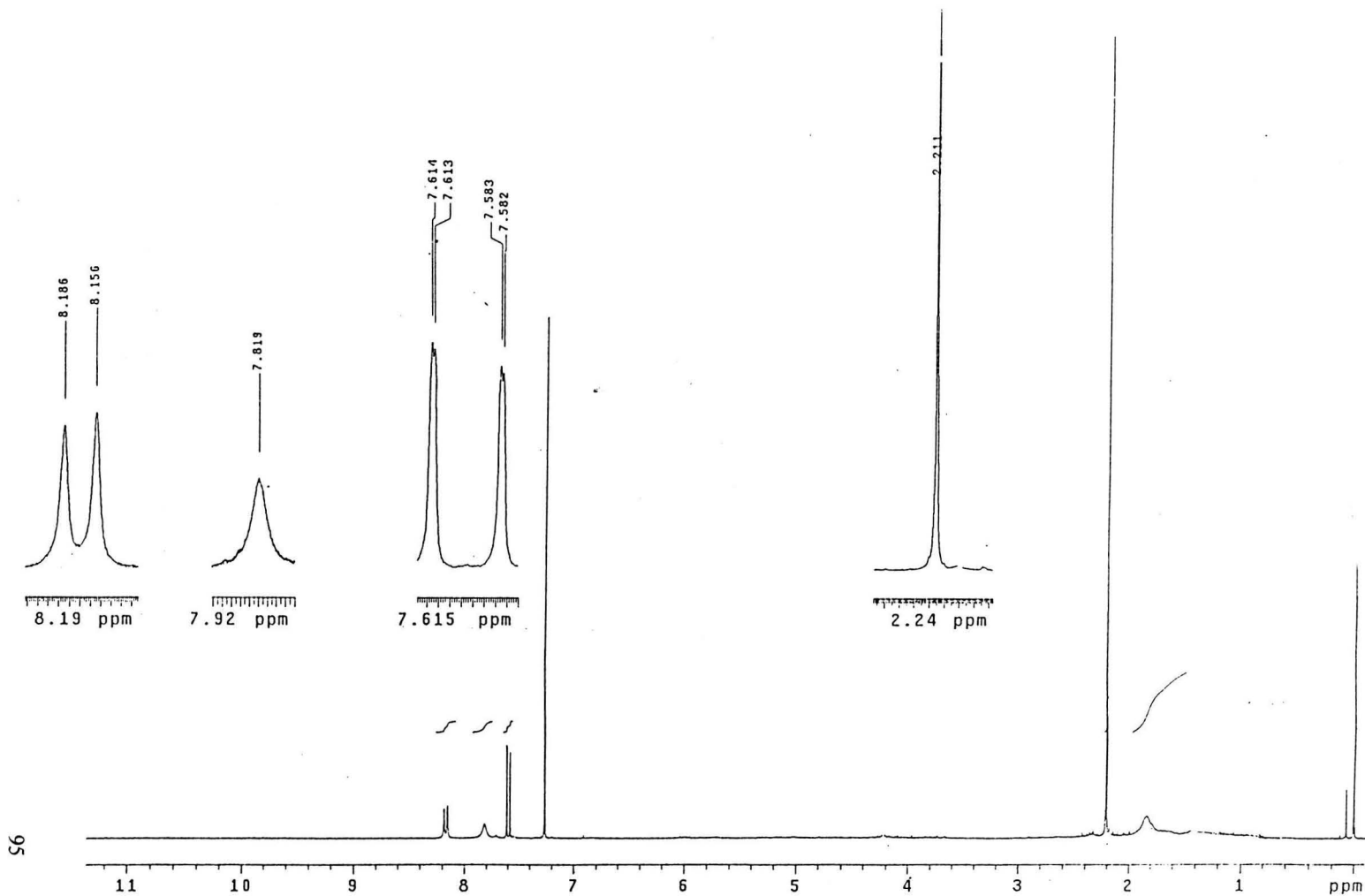


Espectro 21. Espectro de IR del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.

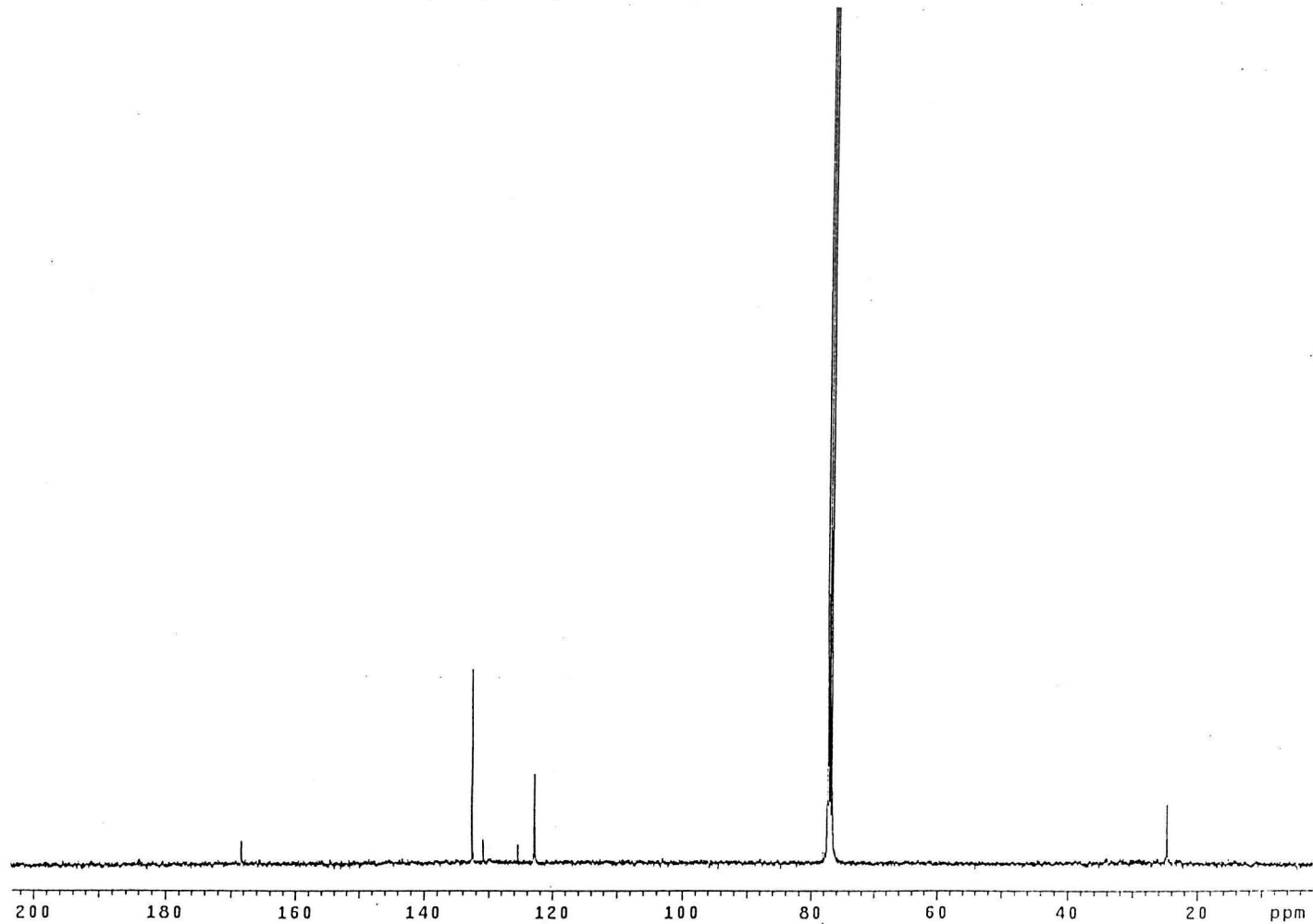
tr= 10.20 min



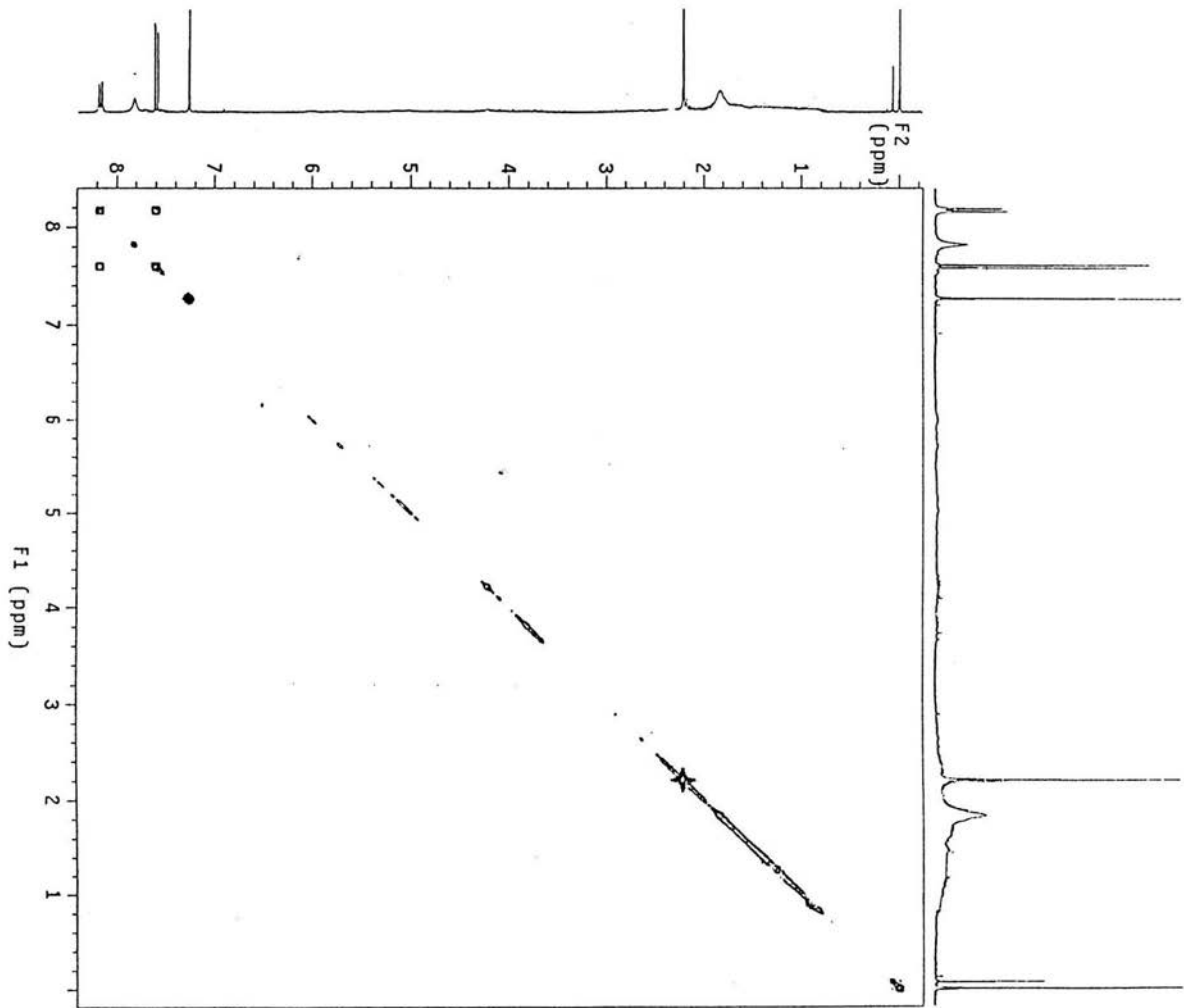
Espectro 22. Espectro de EM modalidad IE del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.



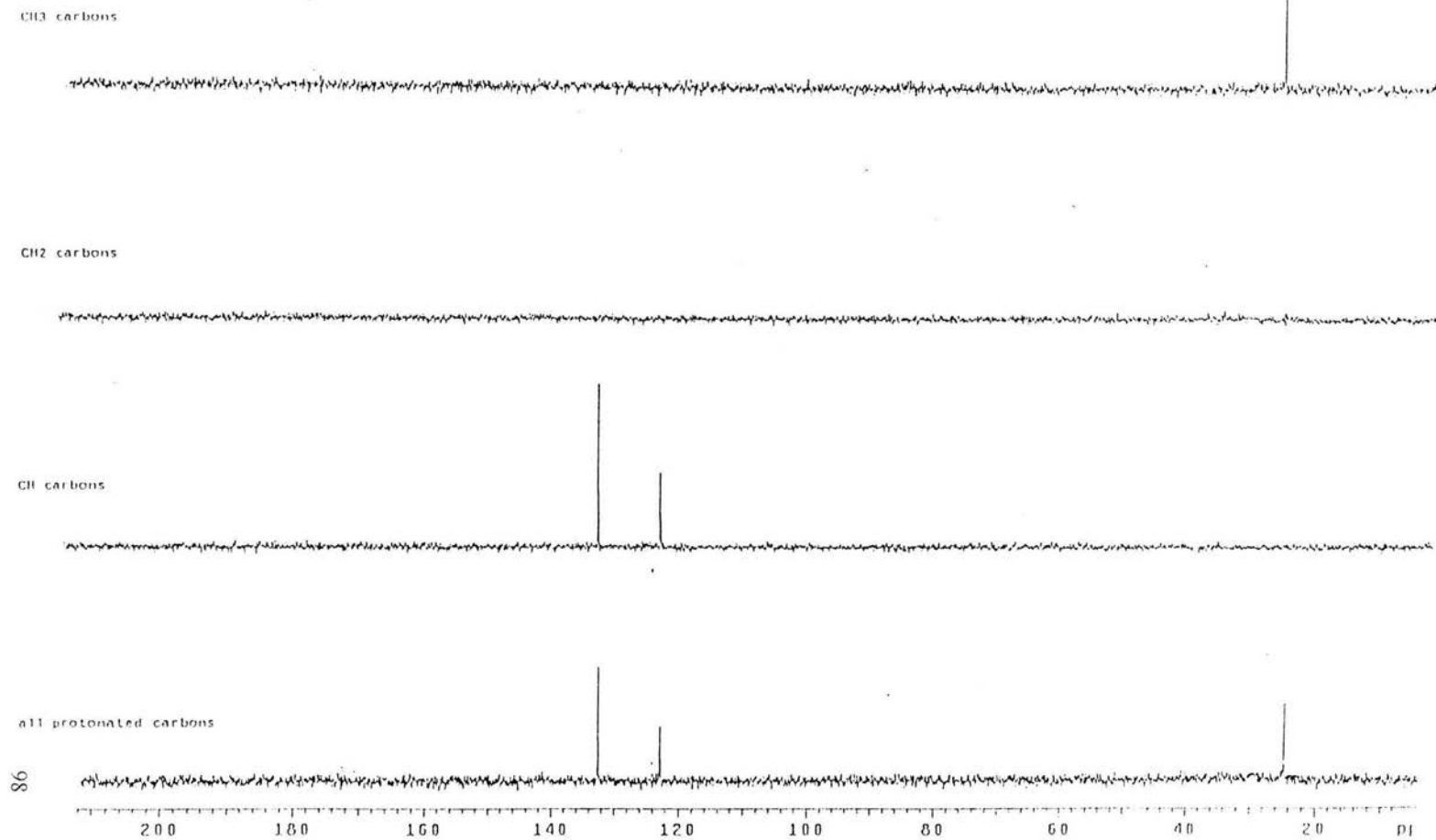
Espectro 23. Espectro de RMN- ^1H del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.



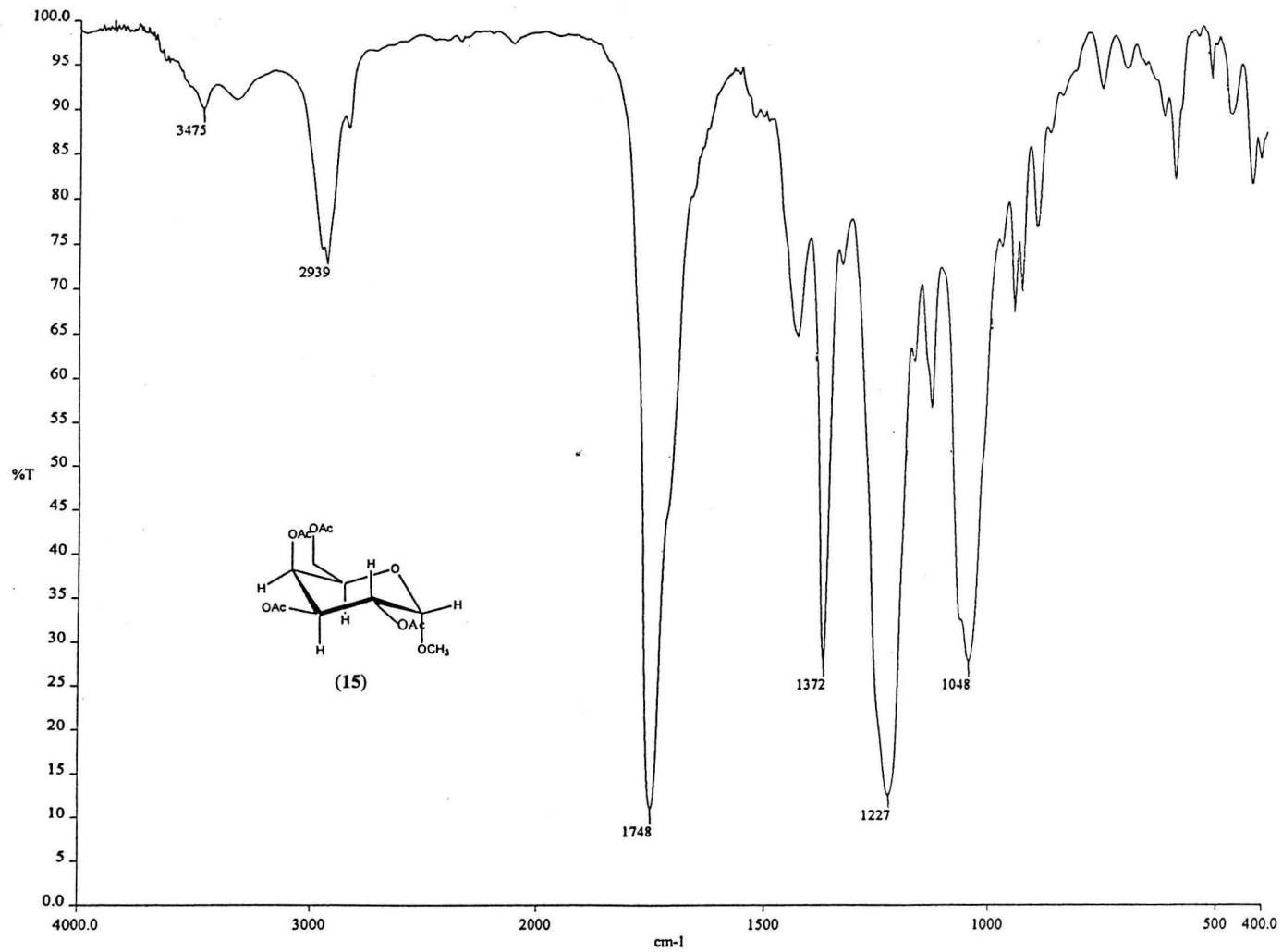
Espectro 24. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.



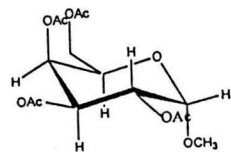
Espectro 25. Espectro de RMN modalidad ^1H - ^1H -COSY del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.



Espectro 26. Espectro de RMN modalidad DEPT del compuesto (14) aislado de *G. sepium*.

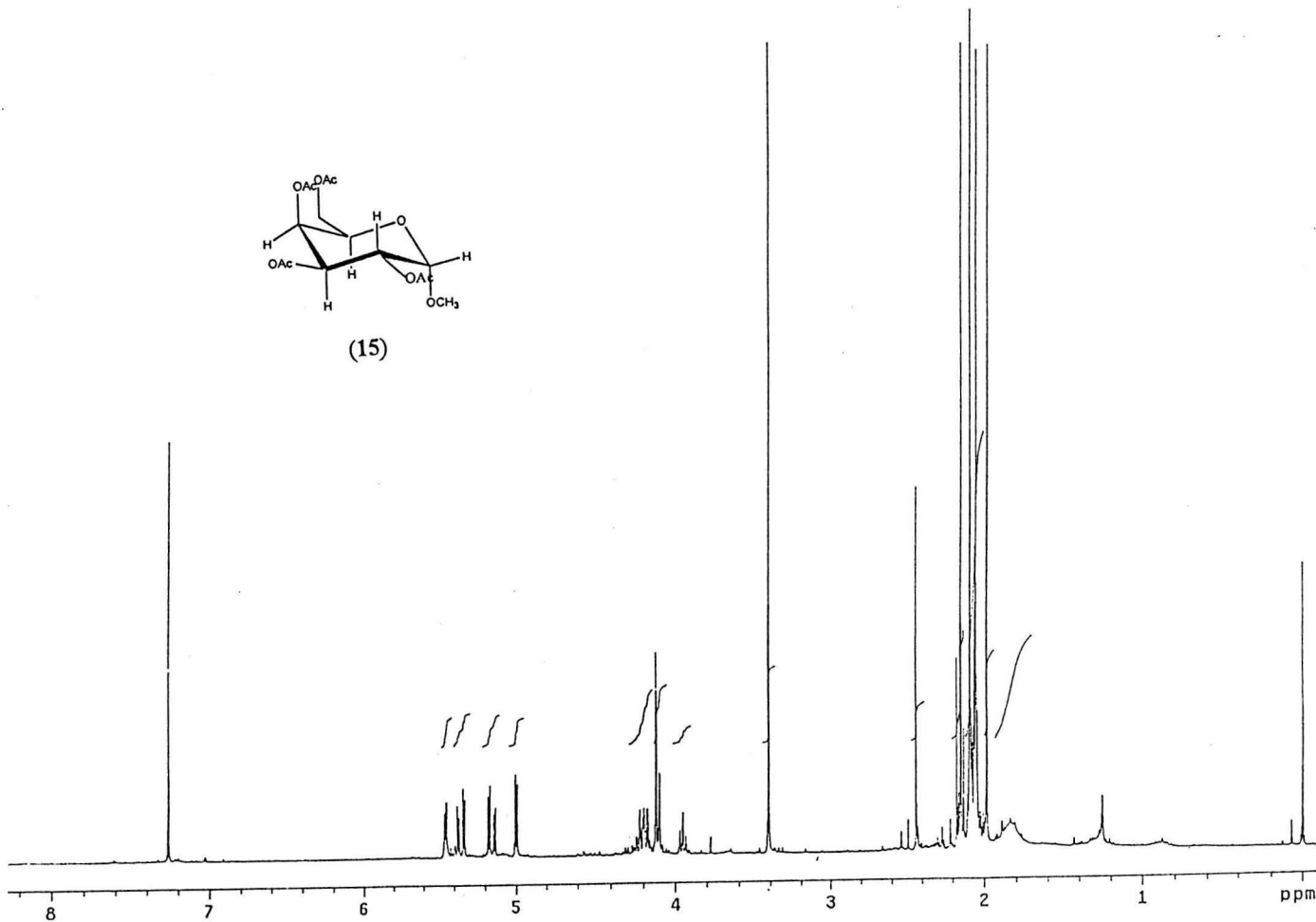


Espectro 27. Espectro de IR de la *O*-metil- α -D-galactosa (15) aislada de *G. sepium*.

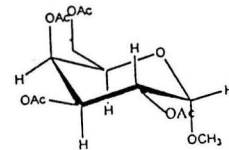


(15)

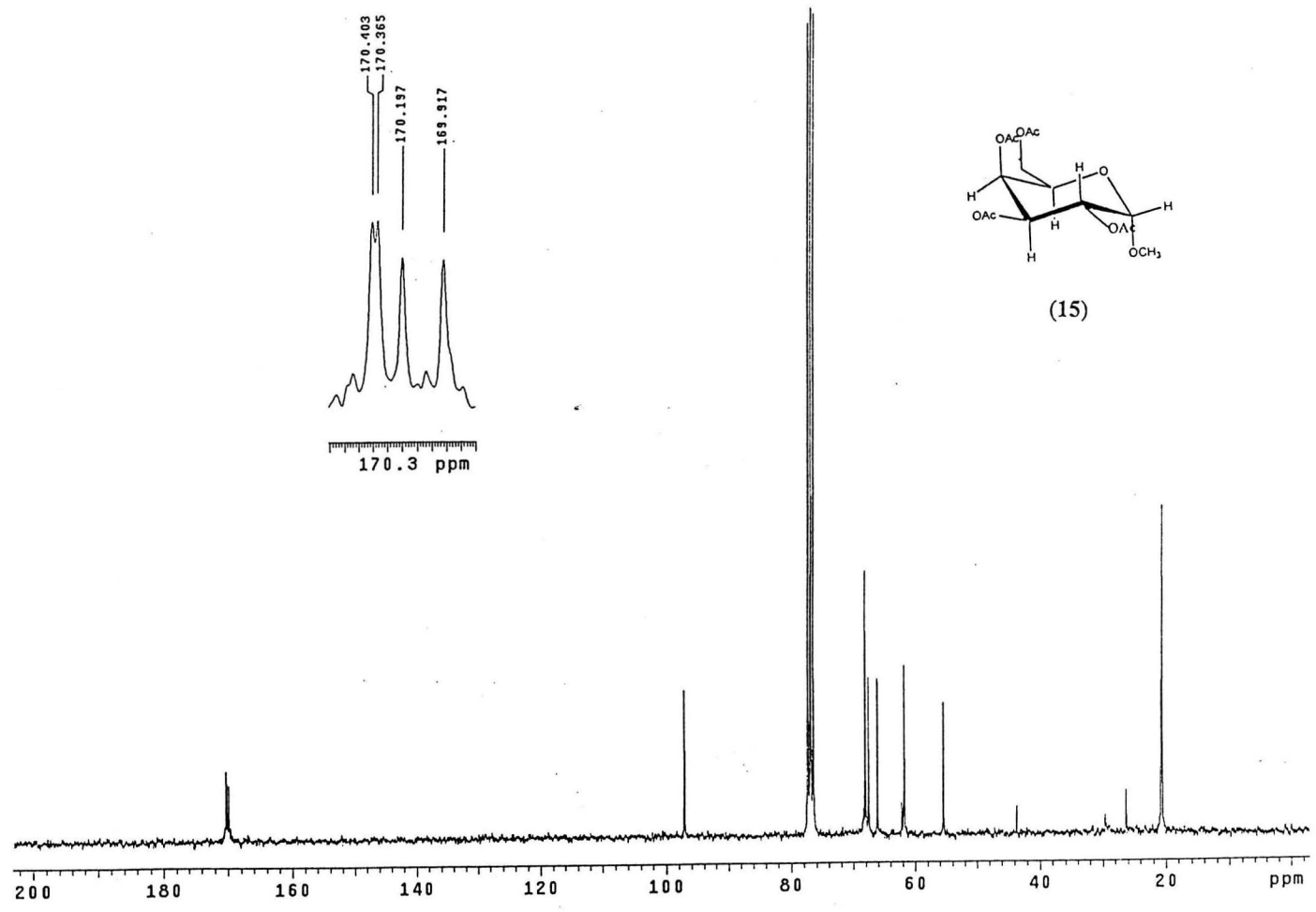
100



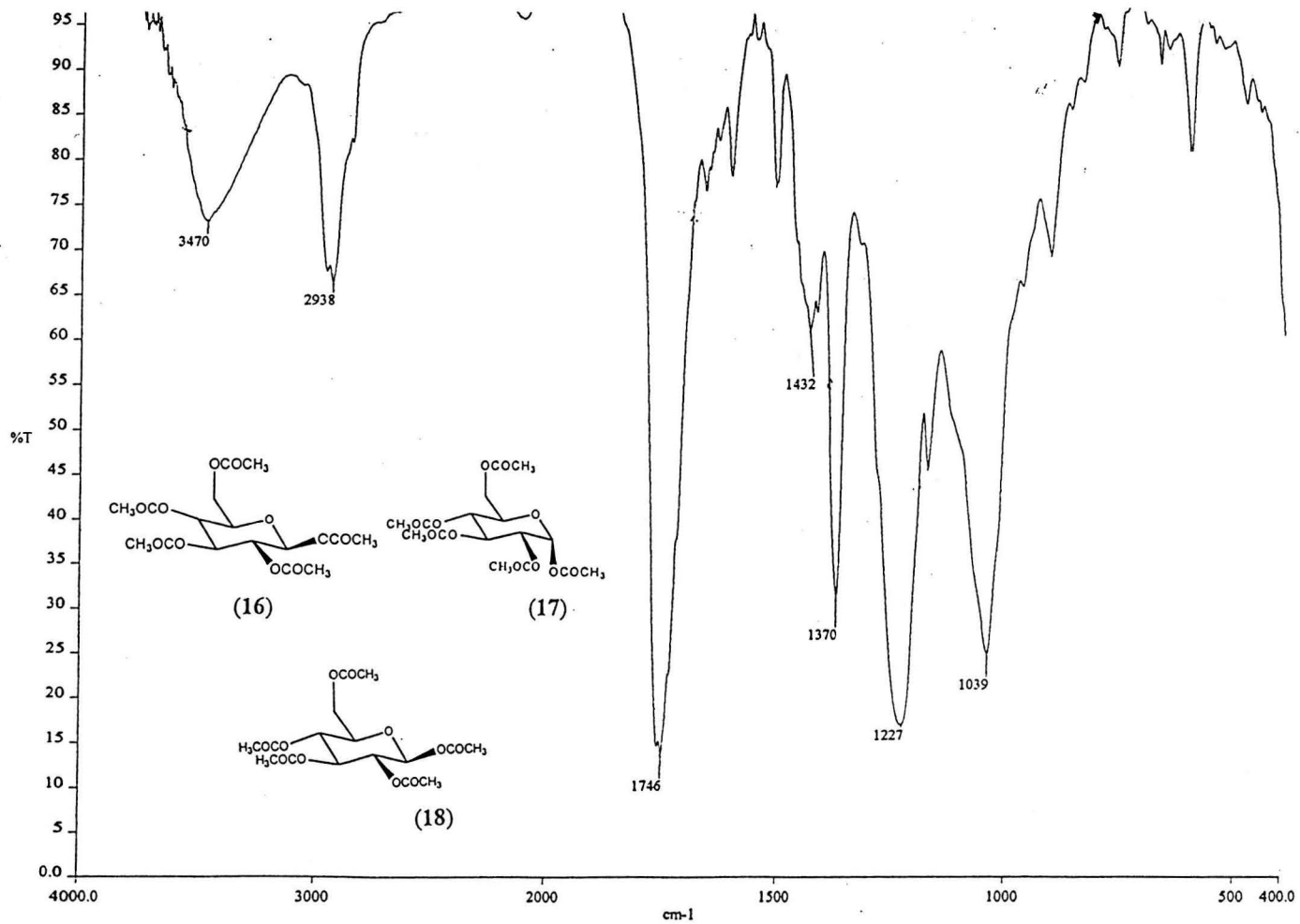
Espectro 28. Espectro de RMN-¹H de la *O*-metil- α -D-galactosa (15) aislada de *G. sepium*.



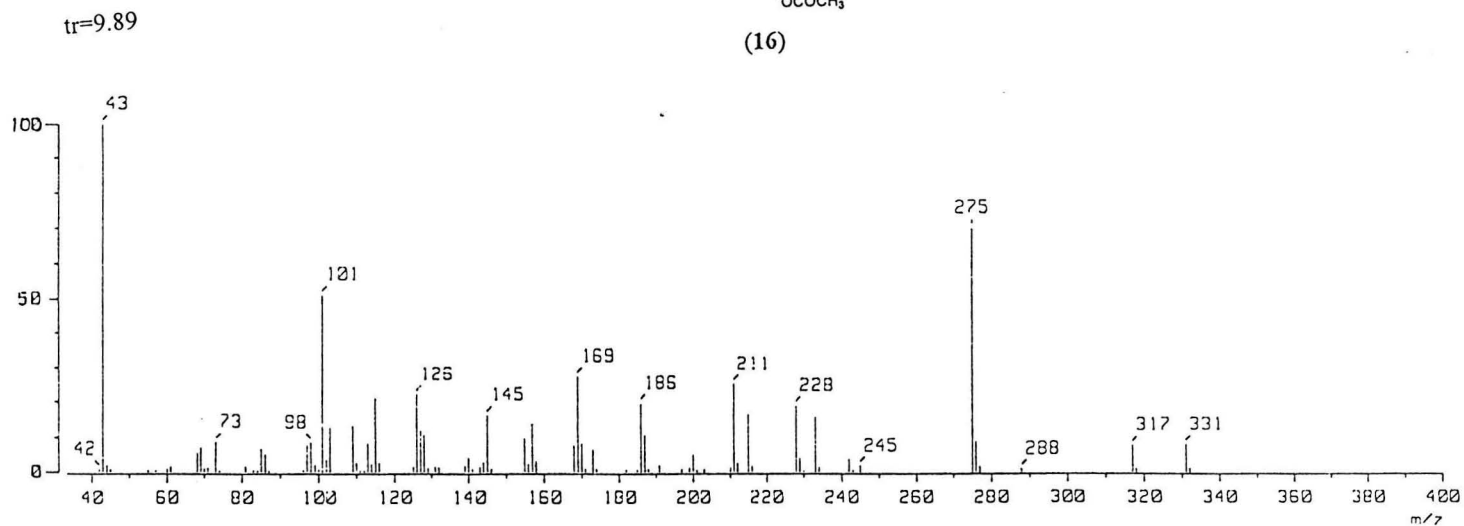
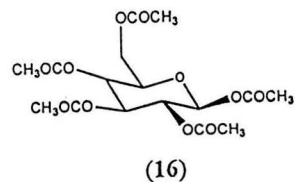
(15)



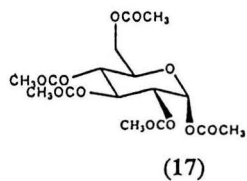
Espectro 29. Espectro de RMN-¹³C la *O*-metil- α -D-galactosa (15) aislada de *G. sepium*.



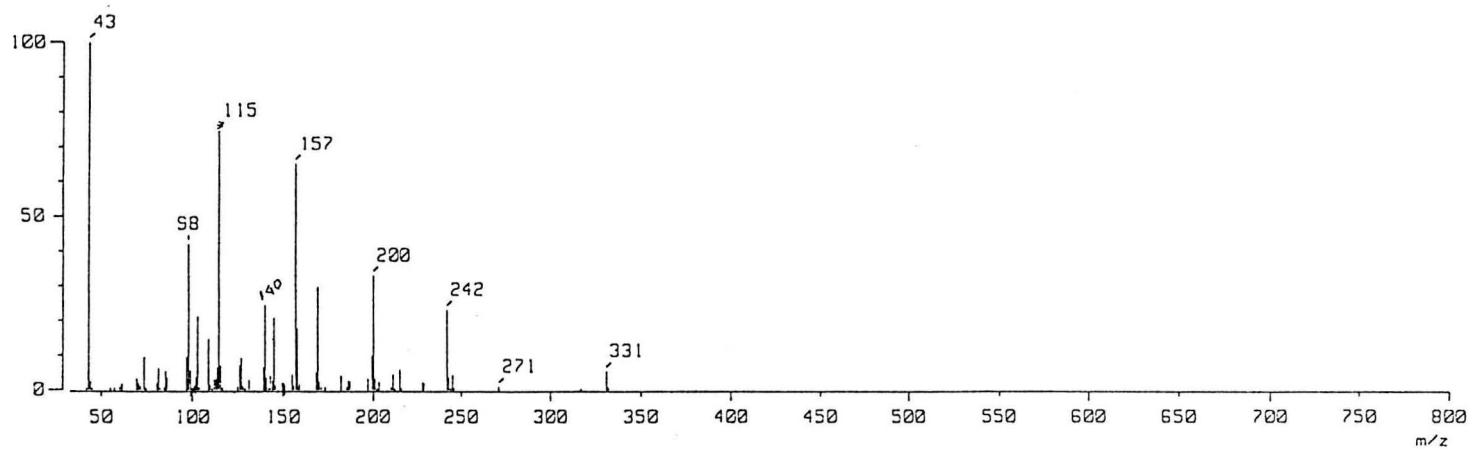
Espectro 30. Espectro de IR de la mezcla de azúcares (16), (17) y (18) aislados de *G. sepium*.



Espectro 31. Espectro de EM modalidad IE del 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-manopiranosido (16) aislado de *P. edulis*.

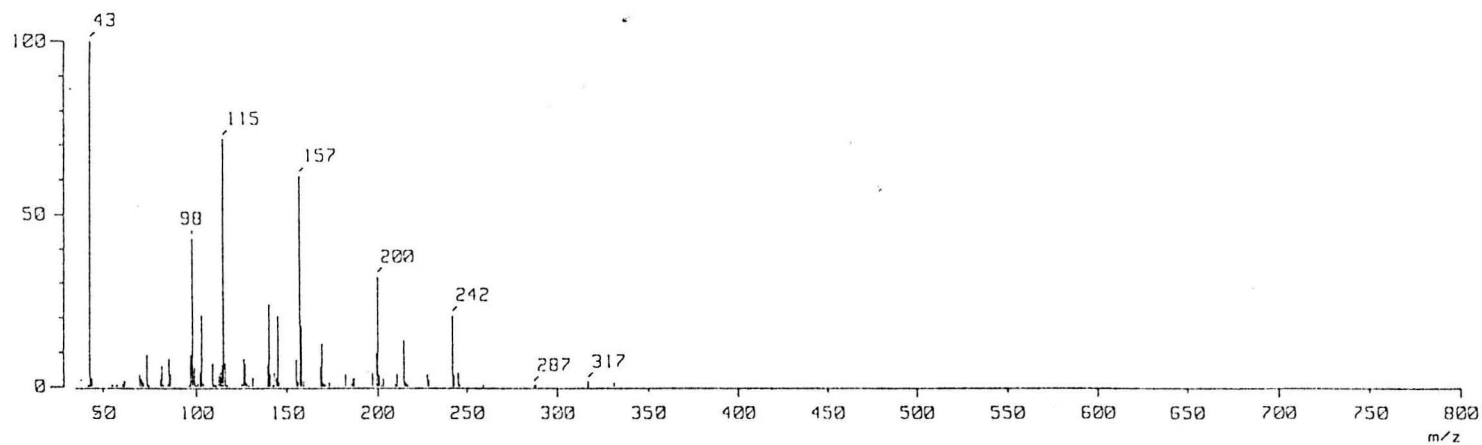
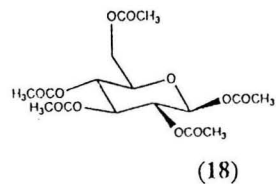


tr=10.17

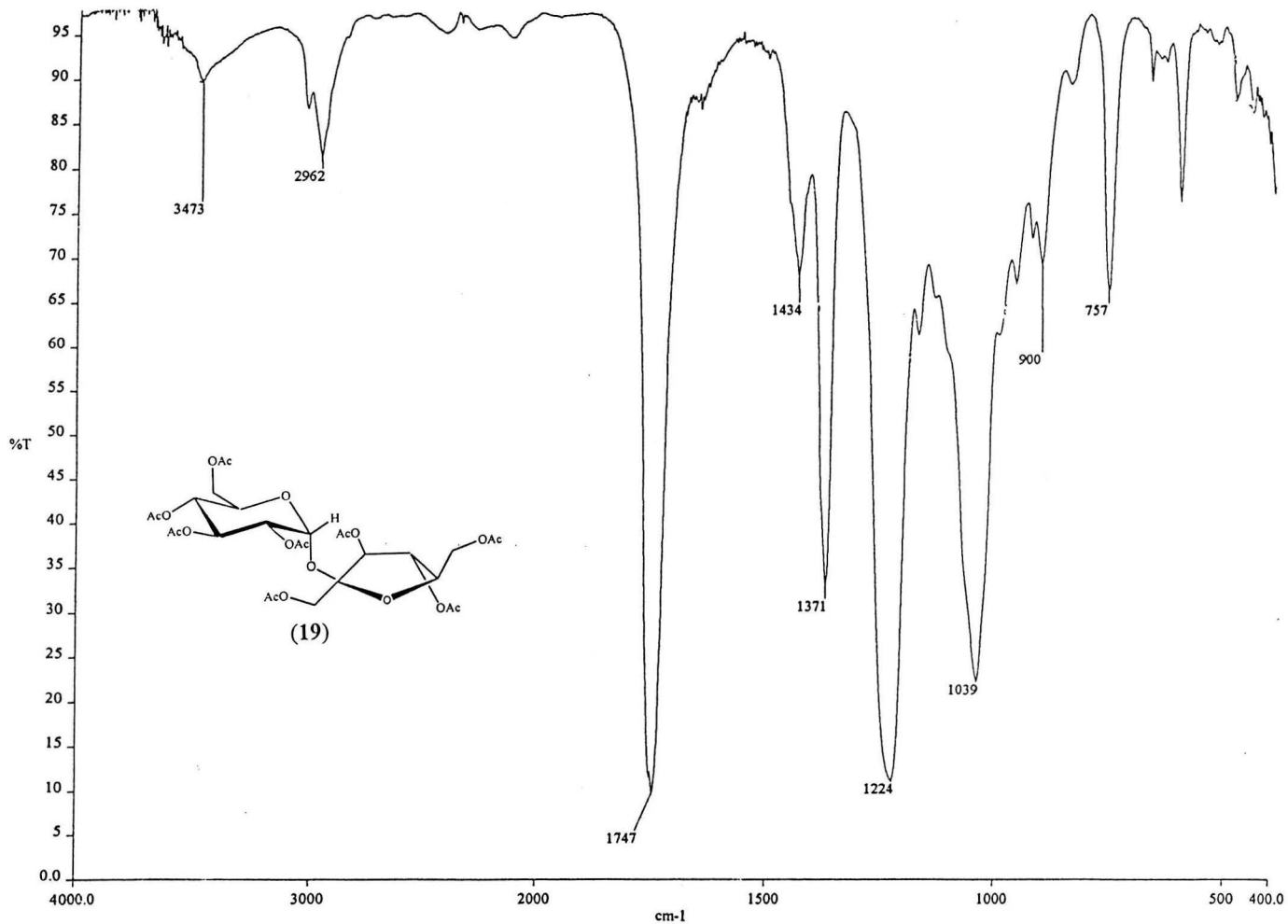


Espectro 32. Espectro de EM modalidad IE del 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido (17) aislado de *P. edulis*.

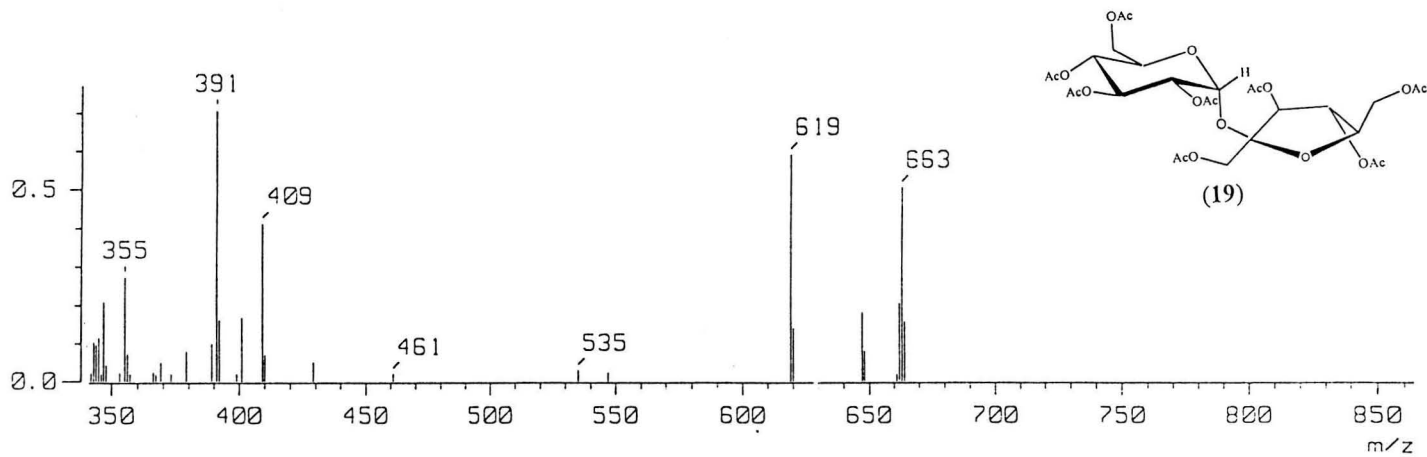
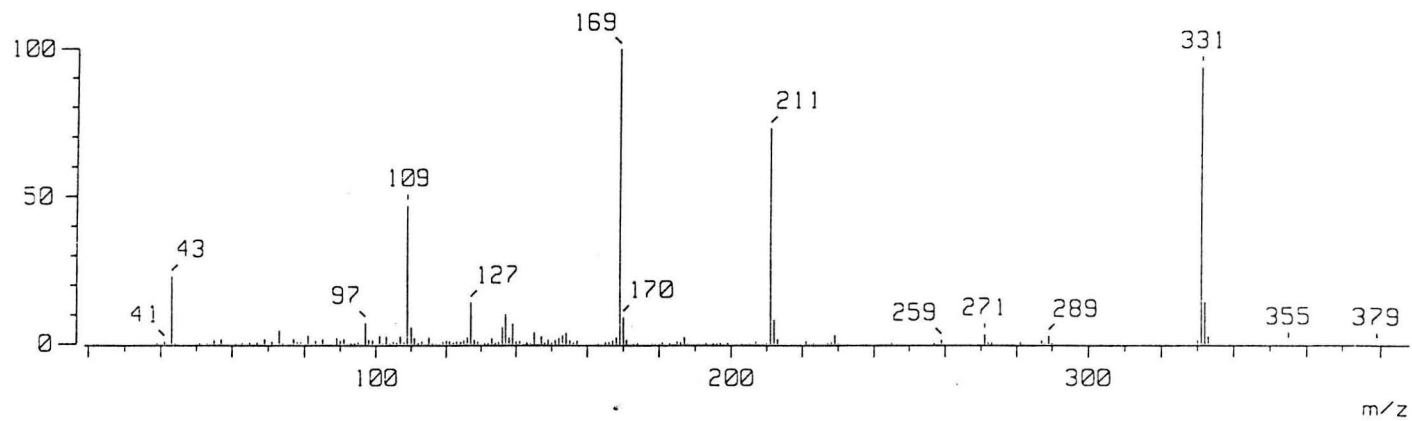
tr=10.31



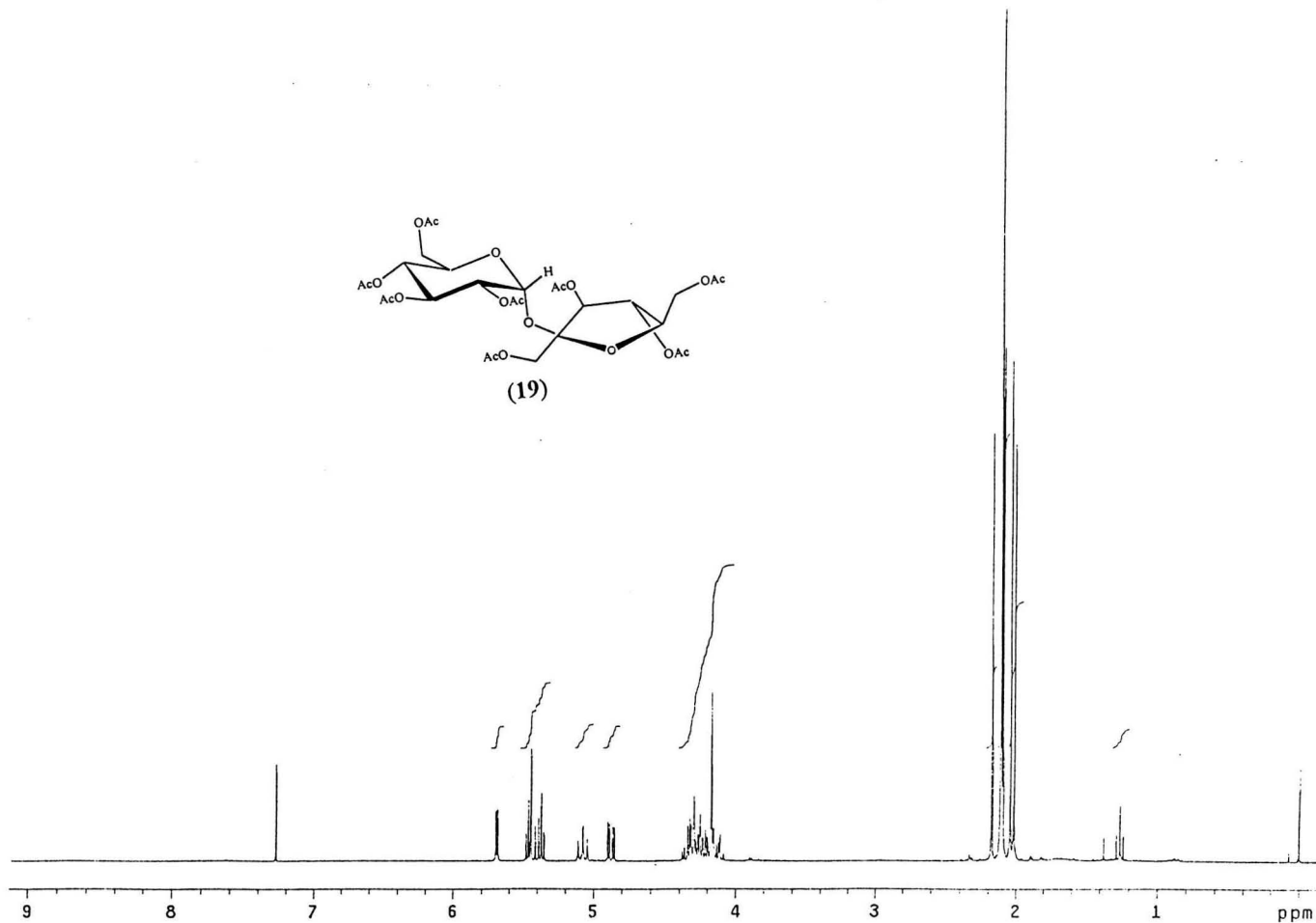
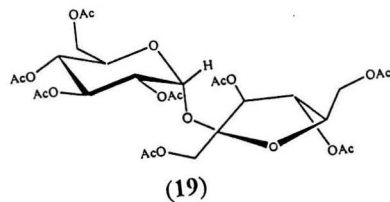
Espectro 33. Espectro de EM modalidad IE del 2,3,4,6-tetra-O- acetil- β -D glucopiranosido (18) aislado de *P. edulis*.



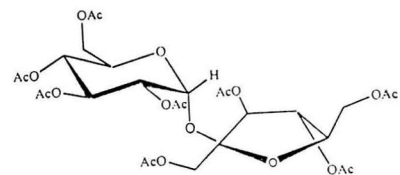
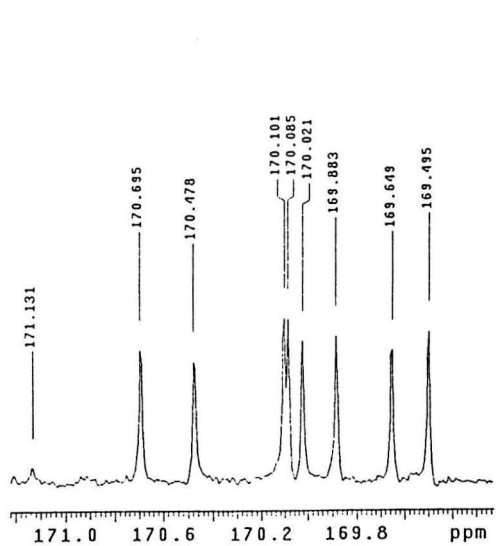
Espectro 34. Espectro IR del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de *P. edulis*.



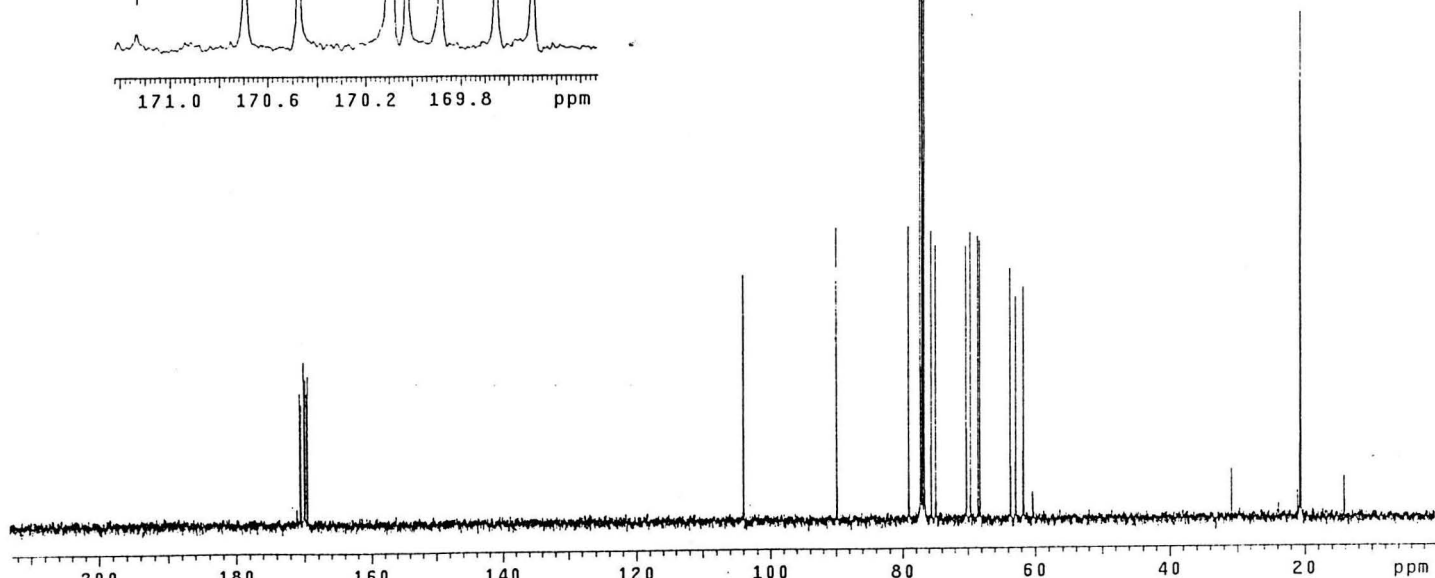
Espectro 35. Espectro EM modalidad FAB del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de *P. edulis*.



Espectro 36. Espectro de RMN-¹H del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de *P. edulis*.



(19)



Espectro 37. Espectro de RMN- ^{13}C del 2,3,4,6, 1',3',4',6'-octaacetil- α -D-glucopiranosido de β -D-fructofuranosilo (19) aislado de

P. edulis.

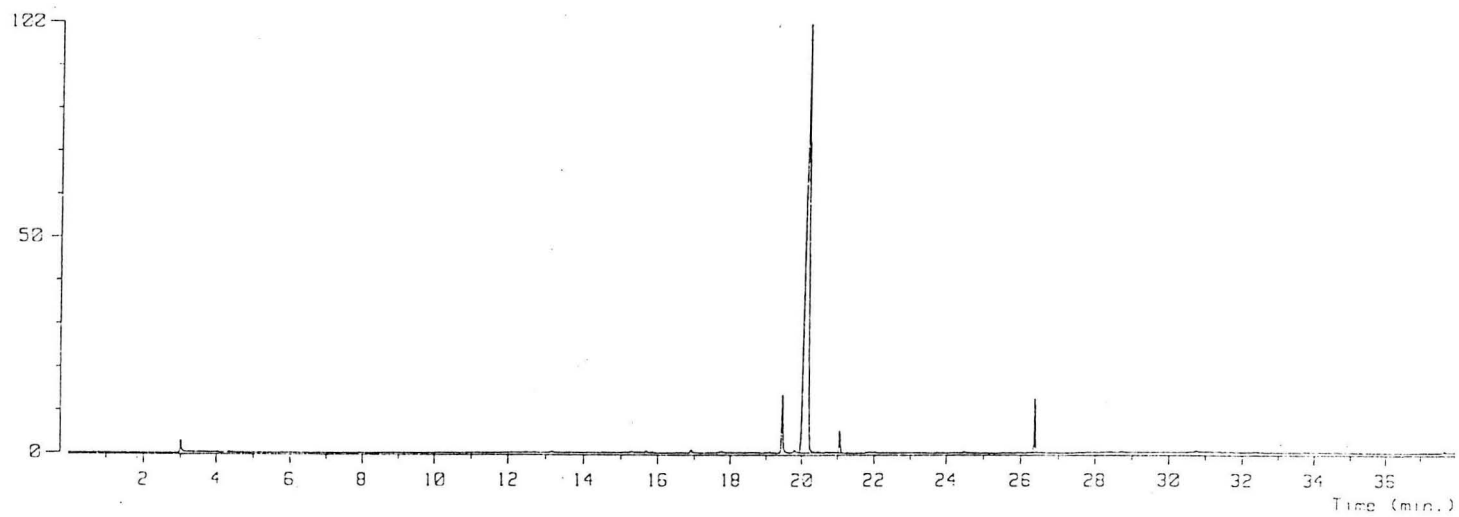


Figura 1. Cromatograma de gases del compuesto (13) aislado de *G. sepium*.