



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS DE *Vitex hemsleyi* Y DE *V. mollis*.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. CLARISA VILLEGAS GÓMEZ.

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

TUTOR: Dr. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

AÑO: 2009



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.

El presente trabajo se desarrollo en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido de una beca con número de registro 195011

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por el apoyo brindado para realizar éste proyecto y por darme la oportunidad de incorporarme en su grupo de investigación.

A la Dra. Azucena González Coloma por darme la oportunidad de trabajar en una estancia de investigación en el departamento de protección vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias del Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Centro de Ciencias Medioambientales (CSIC-CCMA). Madrid, España.

Al Dr. Eduardo Aranda Escobar^(†) y la M. en C. Laura Lina Patricia García por su asistencia en la parte técnica para la cría del modelo de prueba *Spodoptera frugiperda*.

Al comité tutor, Dr. Manuel Jiménez Estrada y el Dr. Juan Servando Núñez Farfán.

INDICE

Abreviaturas.	
Índice de tablas.	
Índice de esquemas.	
Índice de gráficas.	
Índice de espectros.	
Resumen	
Abstract	
Capítulo 1. Introducción y objetivos.	1
Introducción.	2
Objetivos.	11
Capítulo 2. Antecedentes.	12
2.1 La familia Labiatae y el género <i>Vitex</i> .	13
2.2 <i>Vitex mollis</i> y <i>Vitex hemsleyi</i>	15
2.3 La familia Labiatae y el género <i>Vitex</i> en la medicina tradicional.	15
2.4 Familias de plantas en el control de plagas.	18
2.5 Actividad insecticida y antialimentaria del género <i>Vitex</i> .	21
Capítulo 3. Método Experimental.	28
Parte 1. <i>Vitex mollis</i> .	30
3.1.1 Recolección.	31
3.1.2 Extracción.	31
3.1.3 Fraccionamiento de los extractos de las partes aéreas de <i>V. mollis</i> .	32
Parte 2. <i>Vitex hemsleyi</i> .	35
3.2.1 Recolección.	36
3.2.2 Extracción.	36
3.2.3 Fraccionamiento del extracto hexánico	36
3.2.4 Aislamiento del ácido anticopálico	36
3.2.5 Derivados semisintéticos del ácido anticopálico.	38
Parte 3. Evaluación de la actividad antialimentaria.	44
3.3.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> .	45
3.3.2 Cría de la especie <i>Spodoptera frugiperda</i> .	48
3.3.3 Preparación de la dieta artificial.	49
3.3.4 Bioensayo de elección.	50

Capítulo 4. Resultados y discusión.	54
Parte 1. Estudio y actividad antialimentaria de <i>Vitex mollis</i> .	55
4.1.1 Extracción.	56
4.1.2 Fraccionamiento.	56
4.1.3 Resultados de la actividad antialimentaria de los extractos y fracciones pertenecientes a <i>Vitex mollis</i> .	58
4.1.4 Elucidación estructural de los metabolitos secundarios correspondientes a las fracciones activas.	74
a) Ftalato de di-(2-metil)heptilo.	74
b) Ftalato de dibutilo.	75
Parte 2. Estudio y actividad antialimentaria del ácido anticopálico aislado de <i>Vitex hemsleyi</i> .	76
4.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del ácido anticopálico.	77
4.2.2 Aislamiento y elucidación estructural del ácido 3 β -hidroxianticopálico	79
4.2.3 Derivados semisintéticos.	82
a) Elucidación estructural del éster metílico del ácido anticopálico.	82
b) Elucidación estructural del éster metílico 8 α ,17-epoxianticopálico.	84
c) Elucidación estructural del éster metílico 7 α -hidroxianticopálico.	87
d) Elucidación estructural del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.	92
e) Elucidación estructural del ácido 7 α -hidroxianticopálico.	94
4.2.4 Resultados de la actividad antialimentaria del ácido anticopálico y sus derivados semisintéticos.	96
Capítulo 5. Conclusiones y bibliografía.	103
Conclusiones	104
Perspectivas	107
Bibliografía	108
Apéndice	119

ABREVIATURAS

IR	Espectroscopía en el infrarrojo.
ν	Número de onda
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón.
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono.
RMN-2D	Resonancia magnética nuclear en dos dimensiones.
COSY	Correlation spectroscopy.
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer.
NOE	Nuclear overhauser effect.
HETCOR	Heteronuclear chemical shift correlation.
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
TMS	Tetrametilsilano.
ppm	Partes por millón.
MHz	Megahertzio.
Hz	Hertzio.
δ	Desplazamiento químico.
<i>s</i>	Singulete
<i>d</i>	Doblete.
<i>t</i>	Triplete.
<i>c</i>	Cuadruplete.
<i>q</i>	Quintuplete.
<i>m</i>	Multiplete.
<i>br a</i>	Señal ancha.
<i>br t</i>	Triplete ancho ó triplete deformado.
<i>dd</i>	Doble de dobles.
<i>br dd</i>	Doble de dobles ancho.
<i>ddd</i>	Doble de dobles de dobles.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado.
EM (I.E)	Espectrometría de masas por Impacto Electrónico.
EM (FAB ⁺)	Espectrometría de masas por FAB ⁺ .
FAB ⁺	Fast atom bombardment.
Rel. Int.	Intensidad relativa.
M ⁺	Ión molecular.
m/z	Masa/Carga.
HPLC	High performance liquid cromatography.
C.C	Cromatografía en columna.
C.C.F	Cromatografía en capa delgada.
[α] _D	Rotación óptica.
L	Litro.
mL	Mililitro.

μL	Microlitro.
% FI	Porcentaje de factor de Inhibición.
C	Control.
T	Tratamiento.
In ²	Pulgadas Cuadradas.
SiO ₂	Silica gel.
ACMPB	Acido <i>m</i> -cloroperbenzoico.
CH ₂ N ₂ ⁺	Diazometano.
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i> .
<i>V. mollis</i>	<i>Vitex mollis</i> .
<i>V. hemsleyi</i>	<i>Vitex hemsleyi</i> .

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Manejo integral de plagas (MIP).	3
Tabla 2	Hongos entomopatógenos usados como insecticidas de origen natural.	7
Tabla 3	Algunos géneros de la familia Labiatae.	14
Tabla 4	Algunas especies del género <i>Vitex</i> .	14
Tabla 5	Familias de plantas utilizadas en la medicina tradicional.	16
Tabla 6	Actividad biológica del género <i>Vitex</i> .	17
Tabla 7	Familias de plantas con propiedades insecticidas.	19
Tabla 8	Algunos insecticidas comerciales de origen natural	19
Tabla 9	Especies utilizadas de manera tradicional para el control de plagas.	20
Tabla 10	Aceites esenciales obtenidos de <i>Vitex trifolia</i> .	25
Tabla 11	Derivados semisintéticos del ácido anticopálico aislado de <i>Vitex hemsleyi</i>	38
Tabla 12	Tamaño de cabeza y cuerpo de la fase larvaria de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera:Noctuidae) según el estadio.	47
Tabla 13	Componentes de la dieta artificial para la cría de la especie <i>Spodoptera frugiperda</i> .	49
Tabla 14	Número de fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna de los extractos de las partes aéreas de <i>Vitex mollis</i> .	57
Tabla 15	Porcentajes de factor de inhibición de los extractos de las partes aéreas de <i>Vitex mollis</i> .	59
Tabla 16	Porcentajes de factor de inhibición de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de <i>Vitex mollis</i> .	63
Tabla 17	Porcentajes de factor de inhibición de las fracciones del extracto acetónico de corteza de <i>Vitex mollis</i> .	64

Tabla 18	Tiempo de retención en que se encuentran los ftalatos dentro de los extractos de <i>Vitex mollis</i> y los disolventes empleados.	69
Tabla 19	Ejemplos de algunos compuestos del grupo de los ftalatos.	70
Tabla 20	Porcentajes de factor de inhibición de los compuestos aislados de las fracciones activas del extracto diclorometánico de hojas y acetónico de corteza de <i>Vitex mollis</i> .	72
Tabla 21	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ftalato de di-2-metilheptilo	74
Tabla 22	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ftalato de dibutilo.	75
Tabla 23	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ácido anticopálico.	77
Tabla 24	Asignación de señales de RMN- ¹³ C para el ácido anticopálico.	78
Tabla 25	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ácido 3β-hidroxicopálico.	80
Tabla 26	Asignación de señales de RMN- ¹³ C para el ácido 3β-hidroxicopálico.	81
Tabla 27	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el éster metílico del ácido anticopálico.	83
Tabla 28	Asignación de señales de RMN- ¹³ C para el éster metílico del ácido anticopálico.	83
Tabla 29	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el éster metílico del ácido 8α,17-epoxicopálico.	86
Tabla 30	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el éster metílico del ácido 7α-hidroxicopálico.	88
Tabla 31	Asignación de señales de RMN- ¹³ C para éster metílico del ácido 7α-hidroxicopálico.	91
Tabla 32	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ácido 8α,17-epoxicopálico	93

Tabla 33	Asignación de señales de RMN- ¹ H para el ácido 7 α -hidroxianticopálico.	95
Tabla 34	Porcentajes de factor de inhibición del ácido anticopálico aislado de <i>Vitex hemsleyi</i> y sus derivados semisintéticos.	97

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Piretrinas aisladas de <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> .	9
Esquema 2	Estructura de la Azadiractina.	10
Esquema 3	Estructura de la 20-hidroxiecdisona	10
Esquema 4	Metabolitos secundarios aislados de <i>Vitex negundo</i> L.	22
Esquema 5	Metabolitos secundarios aislados de <i>Vitex negundo</i> L.	23
Esquema 6	Ecdisteroides aislados de <i>V. canescens</i> , <i>V. glabrata</i> , <i>V. pinnata</i> .	27
Esquema 7	Metodología general seguida durante el estudio de <i>Vitex mollis</i> .	34
Esquema 8	Metodología general seguida durante el estudio de <i>Vitex hemsleyi</i> . Aislamiento del ácido anticopálico	37
Esquema 9	Estructura del ácido anticopálico aislado de <i>V. hemsleyi</i> .	38
Esquema 10	Reacción de esterificación del ácido anticopálico.	39
Esquema 11	Reacción de epoxidación del éster metílico del ácido anticopálico.	40
Esquema 12	Reacción de oxidación del éster metílico del ácido anticopálico.	41
Esquema 13	Reacción de epoxidación del ácido anticopálico.	42
Esquema 14	Reacción de oxidación del ácido anticopálico.	43
Esquema 15	<i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith).	45
Esquema 18	Bioensayo de elección contra <i>S. frugiperda</i> para medir efectos antialimentarios	51
Esquema 19	Medición de los resultados para la interpretación de la actividad antialimentaria.	52

Esquema 20	Estructura del ftalato de di-(2-metil)heptilo y ftalato de dibutilo.	68
Esquema 21	Ftalato de di-2-(metil)heptilo.	74
Esquema 22	Ftalato de dibutilo.	75
Esquema 23	Ácido anticopálico.	77
Esquema 24	Ácido 3 β -hidroxianticopálico.	79
Esquema 25	Ester metílico del ácido anticopálico.	82
Esquema 26	Ester metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.	84
Esquema 27	Posibles interacciones estéricas observadas en el éster metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.	86
Esquema 28	Ester metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.	87
Esquema 29	Correlaciones de interés observadas en el espectro COSY.	89
Esquema 30	Principales correlaciones observadas en el espectro NOESY.	90
Esquema 32	Algunas correlaciones ^1H - ^{13}C presentes en el espectro HMBC.	90
Esquema 32	Ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.	92
Esquema 33	Ácido 7 α -hidroxianticopálico	94

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de los extractos de <i>Vitex mollis</i> , por <i>Spodoptera frugiperda</i> .	61
Gráfica 2	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición de los extractos de <i>Vitex mollis</i> .	61
Gráfica 3	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de las fracciones del extracto diclorometánico de las hojas de <i>Vitex mollis</i> , por <i>Spodoptera frugiperda</i> .	65
Gráfica 4	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición de las fracciones del extracto diclorometánico de las hojas de <i>Vitex mollis</i> .	66
Gráfica 5	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de las fracciones del extracto acetónico de la corteza de <i>Vitex mollis</i> , por <i>Spodoptera frugiperda</i> .	66
Gráfica 6	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición de las fracciones del extracto acetónico de la corteza de <i>Vitex mollis</i> .	67
Gráfica 7	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas del extracto diclorometánico de hojas y acetónico de corteza de <i>Vitex mollis</i> , por <i>Spodoptera frugiperda</i> .	71
Gráfica 8	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas del extracto diclorometánico de hojas y acetónico de corteza de <i>Vitex mollis</i> .	73
Gráfica 9	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento del ácido anticopálico y sus derivados semisintéticos por parte del insecto prueba <i>Spodoptera frugiperda</i> .	98
Gráfica 10	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición del ácido anticopálico y sus derivados semisintéticos.	99

Gráfica 11	Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento del ácido anticopálico a diferentes concentraciones (ppm).	100
Gráfica 12	Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición a diferentes concentraciones del ácido anticopálico.	100
Gráfica 13	Efecto dosis respuesta dependiente de la dosis del ácido anticopálico para el cálculo de la EC_{50} .	101

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1	RMN- ¹ H del ácido anticopálico.
Espectro 2	RMN- ¹³ C del ácido anticopálico.
Espectro 3	RMN- ¹ H del ácido 3 β -hidroxianticopálico.
Espectro 4	RMN- ¹³ C del ácido 3 β -hidroxianticopálico.
Espectro 5	RMN- ¹ H del éster metílico del ácido anticopálico.
Espectro 6	RMN- ¹³ C del éster metílico del ácido anticopálico.
Espectro 7	RMN- ¹ H del éster metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.
Espectro 8	RMN- ¹ H del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 9	RMN-2D (COSY) del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 10	RMN-2D (NOESY) del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 11	RMN- ¹³ C del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 12	RMN-2D (HMBC) éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 13	RMN-2D (HSQC) del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.
Espectro 14	RMN- ¹ H del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.
Espectro 15	RMN- ¹ H del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

RESUMEN

Investigaciones etnobotánicas han señalado que algunas especies del género *Vitex* (Labiatae) son utilizadas en la medicina tradicional del país, como remedios para diferentes enfermedades. Los análisis químicos de estas especies han permitido el aislamiento de diversos metabolitos secundarios tales como diterpenos, triterpenos, flavonoides, iridoides, entre otros. Las evaluaciones biológicas de estos metabolitos secundarios han señalado sus propiedades anticancerosas, anti-inflamatorias, antivirales, entre otras. Así mismo, se conoce que algunas plantas medicinales también sintetizan metabolitos secundarios con propiedades insecticidas y antialimentarias.

En el presente trabajo se informa de los resultados del estudio biodirigido de la actividad antialimentaria contra *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) de extractos y metabolitos secundarios obtenidos de las partes aéreas y semillas de *Vitex mollis* Kunth y *V. hemsleyi* Briq (Labiatae).

De los extractos de diclorometano de hojas y acetónico de corteza de *V. mollis*, se aislaron dos ftalatos con actividad antialimentaria, el ftalato de di-(2-metil)heptilo y ftalato de dibutilo. Por otro lado, dos diterpenos del tipo labdano con actividad antialimentaria, el ácido anticopálico y el ácido 3 β -hidroxianticipálico fueron aislados de los extractos de las partes aéreas de *V. hemsleyi*. Con el fin de realizar un estudio de relación de cambios de estructura con la actividad se obtuvieron varios derivados del ácido anticopálico. Los resultados mostraron que ningún derivado fue más activo que el ácido anticopálico.

Este es el primer informe acerca del estudio químico de *Vitex hemsleyi*, también constituye el primer informe de la actividad antialimentaria de un diterpeno del tipo labdano, al ácido anticopálico contra *Spodoptera frugiperda*.

ABSTRACT

Ethnobotanic studies had been pointed out that some species of *Vitex* (Labiatae) genus are recommended, in the traditional Mexican medicine, to treat several diseases. The chemical analyses of these medicinal species led to the isolation of diverse compounds such as diterpenes, triterpenes, flavonoids and iridoids. The biologic evaluations of the isolates demonstrated their anti-inflammatory, antitumoral, antiviral among others properties. Additionally, it is well known that some medicinal plants also synthesize secondary metabolites with insecticides and antifeeding activities.

This work presents the results of the antifeeding bio-directed studies of the aerial parts and seeds of *V. mollis* Kunth and *V. hemsleyi* (Labiatae).

Then, from the dichloromethane leaves extract and the acetone bark extract of *V. mollis*, di-(2methyl)heptylphthalate and dibutylphthalate were isolated, both showed a moderate antifeedant activity against *Spodoptera frugiperda*. On the other hand, two labdane-type diterpene, anticopalic acid and 3 β -hydroxyanticopalic acid isolated from extracts of the aerial parts of *Vitex hemsleyi* showed antifeedant dose-dependent activity against *S. frugiperda*. In order to conduct a structure-activity relationship, several derivatives from anticopalic acid were synthesized. However none was more active than anticopalic acid.

This is the first report about the antifeedant activity of a labdane-type diterpene, the anticopalic acid, against *S. frugiperda*. It, also, constituted the first phytochemical study of *Vitex hemsleyi*.

Capítulo 1

1.1 Introducción.

- * Manejo integral de plagas.
- * Insecticidas sintéticos.
- * Insecticidas de origen natural.

Definición de antialimentario.

1.2 Objetivos.

INTRODUCCION.

Insecticidas sintéticos contra insecticidas de origen natural: manejo integral de plagas.

El control de plagas es un aspecto muy importante y vital para la producción de cultivos. Es bien sabido que la creciente población mundial requerirá de suficiente alimento, por lo tanto, es de vital importancia tener un adecuado control de plagas. Por otro lado, se calcula que existen aproximadamente un millón de especies de insectos en el mundo, constituyendo aproximadamente al 70% de todas las especies del reino animal. Alrededor de 10.000 especies han sido reconocidos como dañinos o perjudiciales. Se estima que el 14% de de la pérdida en las cosechas son ocasionadas por plagas de insectos.¹

Varios productos sintéticos destinados a controlar plagas y enfermedades en los cultivos han ayudado en el incremento de la producción agrícola. Sin embargo, el uso continuo de estas sustancias, tales como los insecticidas organofosforados, como es el caso del malatión ha causado diferentes enfermedades al hombre entre las que podemos mencionar a la leucemia.² Por otro lado, el uso indiscriminado de estos pesticidas sintéticos ha propiciado su acumulación en los diferentes suelos de cultivo, así como también en diferentes cuerpos de agua, como ríos, lagunas y presas, entre otras. Adicionalmente, se ha demostrado que estos insecticidas sintéticos inducen resistencia por parte de los insectos. Inclusive, al no ser selectivos, también provocan la destrucción de parásitos, predadores naturales y polinizadores, así como también, modifican el ciclo de vida de especies que tienen roles ecológicos específicos.³ Todos estos efectos alteran el equilibrio ecológico donde estos plaguicidas sintéticos se aplican.

Debido a la necesidad de encontrar una opción para el control de plagas, se creó el “El Manejo Integral de Plagas (MIP)”^{4,5} el cual ayuda a diseñar una serie de

estrategias enfocadas a la preservación de los recursos considerando aspectos del tipo ecológico, económico y social. (Tabla 1).

Estrategias en el Manejo Integral de Plagas (MIP).
1.- Control biológico: se refiere a la utilización de organismos vivos, con el fin de regular la población de otro organismo indeseable.
2.- Control fitogenético: se refiere al uso de variedades de maíz, tomate, hortalizas etc. que sean resistentes, tolerantes o menos susceptibles al ataque de plagas.
3.- Prácticas culturales: se refiere a la disminución de la densidad poblacional de una plaga, tales como, la preparación de suelo, manejo del agua, cultivos asociados, eliminación de hierbas hospederas perjudiciales, control de la época de siembra etc.
4.- Control mecánico y físico: consiste en la construcción de barreras físicas, como el uso del fuego e instrumentos de labranza para abatir malezas.
5.- Control etológico o por confusión sexual: se basa en la manipulación de feromonas, por lo general producidas por las hembras para atraer a los machos.
6.- Control químico: los insecticidas son y serán un elemento indispensable en los programas de fitoprotección, pues son versátiles, fáciles de aplicar, eficaces y comercialmente atractivos, aunque sus serias inconveniencias sobre el ambiente y la salud limitan su utilidad y demandan un manejo juicioso.

Tabla 1. Manejo Integral de Plagas (MIP).⁴

Debido a la búsqueda de nuevas alternativas para el control de plagas (Tabla 1) y eliminar en cierto modo el uso de insecticidas sintéticos, una estrategia fundamental dentro del MIP es el control biológico, el cual consiste en el uso de bacterias, virus, nemátodos, hongos y plantas:

a) Bacterias: existen un gran número de especies de bacterias entomopatógenas, las cuales se han aislado de insectos, de plantas y del suelo; muy pocas de estas especies han sido estudiadas, pero *Bacillus thuringiensis* ha sido la bacteria mas analizada, desarrollándose a partir de ella insecticidas comerciales.⁶

B. thuringiensis es una bacteria gram-positiva que forma bacilos y produce una proteína cristalina en la esporulación, ésta es tóxica a ciertas pestes de insectos al

momento de la ingestión y por lo tanto pueden ser usados como insecticidas. Muchas veces la ingestión de este cristal por sí sólo es suficiente para causar parálisis y muerte en el insecto. Se han identificado aproximadamente 30 subespecies de *B. thuringiensis*, de las cuales se han producido algunos insecticidas, tales como la δ -endotoxina y la β -exotoxina, las cuales son usadas actualmente en la agricultura contra lepidópteros, insectos chupadores y coleópteros. Cabe señalar que las esporas de ésta bacteria se presentan como polvos humectables, concentrados suspendibles y gránulos para ser aplicados sobre los cultivos de campo y para controlar mosquitos y moscas.⁶

Con respecto a la toxicidad de éstas bacterias, se ha encontrado que las variedades de *B. thuringiensis* de uso comercial sobreviven cuando se inyectan a ratones y se ha comprobado que por lo menos una de las toxinas insecticidas purificadas es tóxica para el ratón. Las infecciones en humanos son extremadamente raras. Se ha informado solamente un caso de ingestión y éste fue un consumo deliberado de *B. thuringiensis var. galleriae* por voluntarios, la ingestión produjo fiebre y síntomas gastrointestinales; sin embargo, esta bacteria no está registrado como pesticida. No se han descrito efectos irritantes ni de sensibilización en los trabajadores que preparan y aplican los productos comerciales.

b) Virus: Los virus entomopatógenos son organismos que generalmente se han utilizado para el control de plagas, especialmente del tipo larvario, estos son altamente activos y no muestran ser una amenaza para las plantas y humanos. Se conocen alrededor de 450 especies de virus capaces de causar enfermedades a insectos y ácaros. En la familia Baculoviridae, se ubican los llamados baculovirus, debido a que el material genético de estos virus es fácilmente destruido por su exposición al sol o por las condiciones fisiológicas del intestino del insecto, una partícula infecciosa de baculovirus (virion) está protegida por una capa llamada polihedro. Por lo tanto la mayoría de los baculovirus, deben ser ingeridos por el huésped para producir una infección, la cual es normalmente fatal para el insecto.⁶

La mayoría de los baculovirus, utilizados como agentes de control biológico, se ubican en el género *Virus de la polihedrosis nuclear* (VPN). Por lo que generalmente se tiende simplemente a nombrar baculovirus o simplemente virus, para referirse a especies del género VPN.⁶

Una vez liberado el virus en el cuerpo del insecto suceden varios eventos, entre estos están: el insecto deja de comer, no puede ovipositar y se reducen sus movimientos provocando su muerte en un lapso de 3 a 8 días. Los síntomas de las larvas afectadas se manifiestan por el cambio de coloración de la larva, es decir, se vuelven blanquecinas y granulares, o en su caso oscuras y estas se suelen colgar del ápice de las hojas, así, el esqueleto queda licuificado y es roto fácilmente, exponiendo así nuevos virus, hasta el momento de que sean ingeridos por otros insectos y así propagar la infección.⁷

Los baculovirus, son usados en numerosos cultivos y contra una importante cantidad de insectos como *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae) que se encuentra en el algodón, tomate y maíz, *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) localizado en algodón, tabaco y tomate, así como, en *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae) que ataca a invernaderos.⁶

c) Nemátodos: Los nemátodos entomopatógenos son conocidos como los causantes de enfermedades en las plantas, humanos y animales. Sin embargo, ciertas especies son benéficas por su efecto tóxico contra especies de insectos plaga. Los nemátodos entomopatógenos son altamente letales para los insectos, siendo de interés en el manejo de plagas que afectan al suelo. Géneros como *Steinernema* y *Heterorhabditis* son usados principalmente en cultivos agrícolas, atacando principalmente a aquellos insectos que poseen un estadio susceptible en el suelo o en la superficie del mismo, tales como, el gorgojo negro del vino *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera:Curculionidae) y el gorgojo de la raíz de los cítricos *Pachnaeus litus* (Coleoptera:Curculionidae).⁸

Phasmarhabditis hermaphrodita, es un nemátodo comercializado en Reino Unido, utilizado para el manejo de babosas y caracoles que se encuentran en trigo y oleaginosas. El uso de este organismo se ha recomendado para el control de más de 13 especies de moluscos.

d) Hongos: Ciertos insectos por naturaleza son susceptibles al ataque por hongos entomopatógenos, éstos llegan a ser muy específicos, por lo tanto, no atacan a las plantas y a los animales. Los hongos se han convertido en una alternativa en el control de plagas, debido a su rápida propagación en diferentes clases de insectos, pues estos hongos pueden atacar o infectar a insectos chupadores tales como áfidos y ácaros que no son atacados por virus y bacterias.⁶

El 80% de las enfermedades en los insectos son causadas por hongos, esto puede deberse a que actualmente se conocen más de 700 especies de hongos entomopatógenos que afectan tanto a insectos como a ácaros. Cuando un insecto tiene contacto con un hongo, el proceso de ataque comienza con la adhesión de las esporas a la cutícula del insecto hasta que penetran al interior del mismo; una vez dentro, se multiplican rápidamente y se dispersan a través del cuerpo. La muerte del huésped es ocasionada por la destrucción de los tejidos, así como por las toxinas producidas por los hongos. Una vez que el insecto muere, los hongos emergen de su cuerpo para producir esporas, las cuales son dispersadas por medio del viento, lluvia u otros insectos.⁶

Beauveria bassiana es el hongo de mayor uso en el manejo de plagas, éste se encuentra en el suelo y en las plantas, y se ha reportado su efecto sobre más de 200 insectos, principalmente en lepidópteros tales como la palomilla de la manzana y de coleópteros como el escarabajo de la papa. Los insectos muertos por la acción de este hongo muestran una cubierta algodonosa conformada por el micelio y las esporas del hongo.⁹

Matarhizium anisopliae es el segundo hongo de mayor uso para el manejo de plagas, ataca a más de 300 especies de insectos, pero principalmente se utiliza en el control de la plaga de la caña *Aeneolamia varia* (Homoptera:Cercopidae).¹⁰

Verticillium lecanii se utiliza en invernaderos para el control de áfidos, mosquitas blancas. En la **Tabla 2** se describen los principales usos de los hongos entomopatógenos utilizados en el control de plagas.¹¹

Especie de hongo entomopatógeno	Utilidad
<i>Entomophthora muscae</i>	Control de los gusanos en la cebolla, col y semilla del maíz.
<i>Beauveria bassiana</i>	Control de saltamontes, langosta, grillos, áfidos, termitas, escarabajo de la papa, escarabajo del frijol, chinches y barrenador europeo del maíz.
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Control de mosquitas blancas y uso ornamental.
<i>Zoopthora radicans</i>	Control de orugas y áfidos.
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Control de ácaros.

Tabla 2. Hongos entomopatógenos usados como insecticidas de origen natural.^{6,9-11}

e) Plantas: Las plantas son organismos sésiles, por lo tanto todos sus órganos pueden ser potencialmente comidos por los herbívoros, aunque las hojas constituyen uno de los principales recursos alimenticios de éstos, la presión de selección ejercida por los herbívoros determinó la aparición de diversos mecanismos de defensa en las plantas, tales como:

1) Mecanismos de defensa físicos: se caracteriza por la presencia de espinas y tricomas en las hojas, follaje fibroso o resinoso, cutícula y corteza endurecida, gruesa y suberizada, así como, paredes celulares lignificadas.¹²

2) Mecanismos de defensa fenológicos: se refiere a las etapas del ciclo de vida de las plantas, las cuales se desfasan de los tiempos en que aparecen los herbívoros ó patógenos.¹²

3) Mecanismos de defensa de asociación: son relaciones mutualistas con diversos organismos, por ejemplo: hormigas, hongos y bacterias.¹²

4) Mecanismos de defensa químicos: éstos son de mucha importancia para la plantas, debido a que se centran en la síntesis de metabolitos secundarios entre los cuales podemos citar a los terpenos (mono, sesqui, di y triterpenos), flavonoides, alcaloides, iridoides, etc., los cuales ayudan a la planta a repeler el ataque de insectos, modifican el comportamiento de alimentación (antialimentario), alteran el ciclo de vida del insecto ó atraen a los enemigos de los mismos.¹²

Debido a esto, ha surgido el interés por estudiar los metabolitos secundarios de las plantas como probables insecticidas. Uno de los grupos más importantes son los compuestos que modifican ó alteran el comportamiento de los insectos, entre los cuales podemos citar a las feromonas¹³ y a los antialimentarios.

Un antialimentario (antifeedant) es una sustancia que aplicada o presente en las plantas, impide que sea ingerido por insectos, por lo tanto la muerte de éste puede ocurrir por inanición.^{14,15} Las características de éstos compuestos son:¹⁵

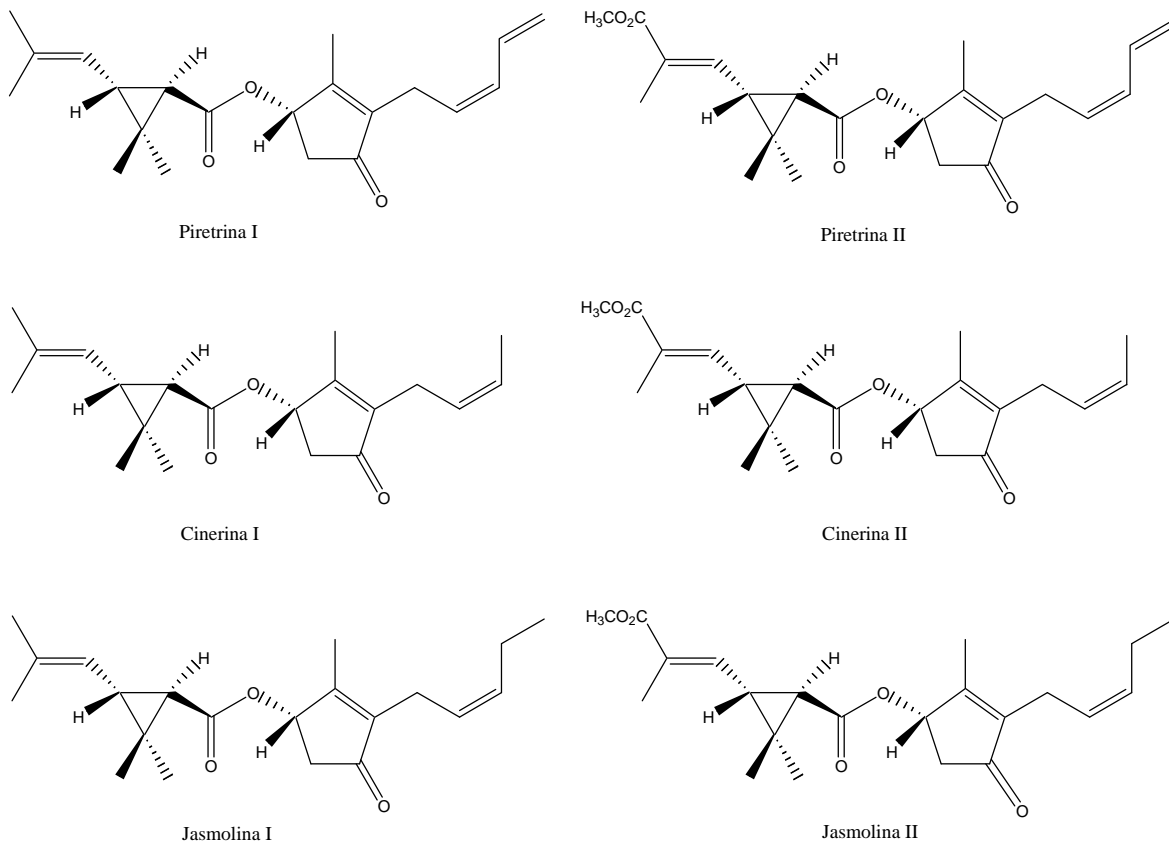
- 1.- No debe ser fitotóxico.
- 2.- No debe ser tóxico al hombre, animales, insectos útiles y otros organismos.
- 3.- Ser activo a bajas concentraciones.
- 4.- Ser razonablemente persistente cuando sea aplicado a un cultivo.
- 5.- No debe descomponerse en sustancias tóxicas o de mal sabor.
- 6.- Debe ser fácilmente absorbido por la planta y distribuirse por el vegetal.
- 7.- Ser fácilmente aplicable.
- 8.- Debe ser de bajo costo y fácilmente asequible.
- 9.- Ser compatible con otras formas de control de plagas.
- 10.- No debe afectar el sabor, el olor ó la apariencia de las partes de la planta (hojas ó frutos).

11.- No debe provocar resistencia en los insectos.

12.- Debe ser estable por mucho tiempo.

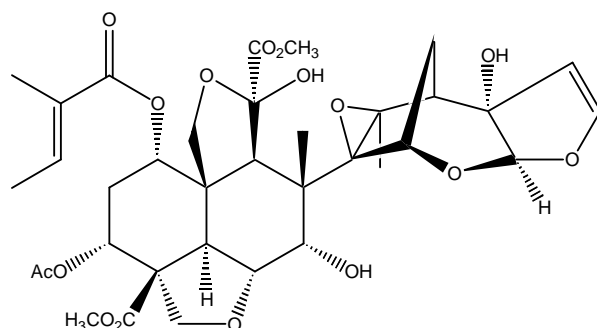
Algunos de estos productos al ser ingeridos en el estadio larval, si bien, no acaban con la totalidad de los insectos pero pueden causar trastornos importantes en el desarrollo posterior de su ciclo de vida.

Por otro lado, como ejemplo de metabolitos secundarios aislados de plantas y utilizados como insecticidas o antialimentarios, encontramos a las piretrinas. (**Esquema 1**) Estos compuestos se han aislado de *Chrysanthemum cinerariifolium* (Compositae) y poseen actividad insecticida, ocasionando en el insecto la parálisis de su sistema nervioso, resultando en una inhabilidad temporal para volar, las piretrinas son poco tóxicas para los humanos y animales y se utilizan para controlar plagas en interiores.^{16,17}



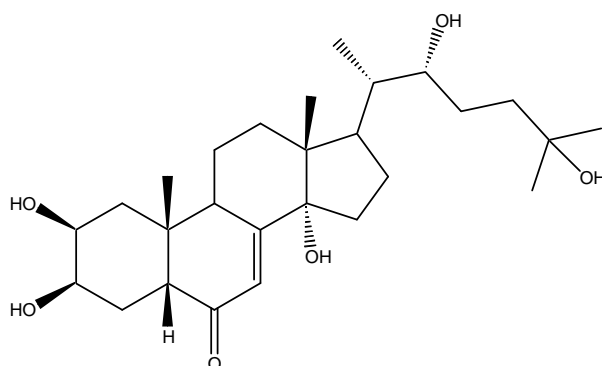
Esquema 1. Piretrinas aisladas de *Chrysanthemum cinerariifolium*.^{16,17}

La Azadiractina (**Esquema 2**), es un ejemplo de metabolitos secundarios con actividad antialimentaria. Este compuesto fue aislado del árbol Neem *Azadirachta Indica* (Meliaceae) originario de la India. El metabolito se aísla principalmente de las partes aéreas, siendo su mayor concentración en las semillas.



Esquema 2. Estructura de la Azadiractina.¹⁸

La azadiractina ha sido muy utilizada por sus propiedades antialimentarias, y actualmente se comercializa en la industria agrícola y ganadera. Por otro lado, en estudios previos se ha reportado que es reguladora del crecimiento de los insectos, es decir, interfiere con la 20-hidroxiecdisona, la hormona responsable de la muda, (**Esquema 3**) así como es inhibidora de la oviposición.¹⁸



Esquema 3. Estructura de la 20-hidroxiecdisona.

Sin lugar a dudas los insecticidas de origen natural a partir de extractos de plantas, constituyen una alternativa para el control de plagas. Por otro lado, se debe tomar en consideración que se han evaluado muy pocas plantas en relación a la fuente natural que nos ofrece el planeta, por lo que las perspectivas futuras en cuanto a la investigación de insecticidas de origen natural son aún mayores.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Evaluación de la actividad antialimentaria de extractos y metabolitos secundarios de *Vitex mollis* y *Vitex hemsleyi* (Labiatae).

Objetivos particulares:

- Evaluar la actividad antialimentaria de los extractos de hojas, semillas y corteza de *Vitex mollis*, frente a *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz), un insecto modelo.
- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antialimentaria, por medio de métodos espectroscópicos, tales como espectroscopía en el Infrarrojo (IR), de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C y Espectrometría de masas (EM).
- Evaluar la actividad antialimentaria de los diterpenos aislados de *Vitex hemsleyi* y de sus derivados con el fin de llevar a cabo un estudio comparativo de la actividad de otros compuestos, por ejemplo de diterpenos del tipo labdano frente a *Spodoptera frugiperda*.

Capítulo 2

Antecedentes.

2.1 La Familia Labiatae y el género *Vitex*.

2.2 *Vitex mollis* y *Vitex hemsleyi*.

2.3 La familia Labiatae y el género *Vitex* en la medicina tradicional.

2.4 Familias de plantas en el control de plagas.

2.5 Actividad insecticida y antialimentaria del género *Vitex*.

2.1 La Familia Labiatae y el género Vitex.

La humanidad a través del tiempo, ha llegado a conocer aquellas especies vegetales que le son útiles tanto para su alimentación como para la procuración de su salud. El hombre desde hace 20,000 años o quizás más, se ha relacionado con la naturaleza de forma muy estrecha y el éxito de sus actividades depende en gran parte de su habilidad para distinguir y reconocer diferentes tipos de nichos ecológicos que propiciaban el crecimiento de las especies útiles.

Rzedowski¹⁹ ha señalado que en el territorio mexicano están presentes todos los grandes biomas que se describen en la superficie de nuestro planeta desde desiertos, hasta las densas y frondosas selvas húmedas donde la vegetación es completamente tropical. Como consecuencia de esta riqueza vegetal México ha sido considerado como un país megadiverso. Hoy en día, se considera que existen 21,600 especies de plantas vasculares de las cuales 3,350 han sido utilizadas, desde tiempos prehispánicos como medicinales.²⁰

Dentro de las especies vegetales más estudiadas, ya sea por sus propiedades o por el uso que el hombre les ha dado dentro de la medicina tradicional, encontramos a las especies de la familia Labiatae:

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Labiatae

La familia Labiatae comprende aproximadamente 252 géneros y alrededor de 6700 especies. Su distribución es cosmopolita, aunque es especialmente abundante en la región mediterránea y hacia el este de Asia Central (**Tabla 3**).

<i>Agastache</i>	<i>Hyssopus</i>	<i>Renschia</i>
<i>Ajuga</i>	<i>Lavándula</i>	<i>Rosmarinus</i>
<i>Amethystea</i>	<i>Lamium</i>	<i>Scutellaria</i>
<i>Blephilia</i>	<i>Melissa</i>	<i>Teucrium</i>
<i>Ceratanthus</i>	<i>Mentha</i>	<i>Tetradenia</i>
<i>Eriothymus</i>	<i>Ocimum</i>	<i>Thymus</i>
<i>Fuerstia</i>	<i>Otostegia</i>	<i>Wiedemannia</i>
<i>Geniosporum</i>	<i>Phyllostegia</i>	<i>Zataria</i>
<i>Hesperozygis</i>	<i>Plectranthus</i>	<i>Zhumeria</i>

Tabla 3. Algunos géneros de la familia Labiatae.

El género *Vitex*²¹ está constituido aproximadamente por 250 especies entre árboles y arbustos (**Tabla 4**), ubicadas principalmente en los trópicos y regiones templadas. Pocas especies de éste género han sido estudiadas tanto fitoquímicamente como en su actividad biológica, como ejemplo podemos mencionar a *Vitex canescens*, *V. glabrata*, *V. pinnata*, *V. negundo*, *V. agnus-castus*, *V. trifolia*, *V. doniana*, *V. rotundifolia*, *V. poligama*, *V. megapotamica*, *V. gaumeri*, *V. pyramidata*, *V. mollis* y *V. pubescens*.

<i>V. agnus-castus</i>	<i>V. limonifolia</i>	<i>V. rehmanni</i> ^d	<i>V. vermoeseni</i>
<i>V. peduncularis</i>	<i>V. polygama</i>	<i>V. sereti</i>	<i>V. yaudensis</i>
<i>V. trifolia</i> ^{a, b}	<i>V. canescens</i>	<i>V. littoralis</i>	<i>V. zenkeri</i>
<i>V. lucens</i>	<i>V. leptobotrys</i>	<i>V. cooperi</i>	<i>V. mollis</i>
<i>V. pubescens</i>	<i>V. keniensis turril</i>	<i>V. gaumeri</i>	<i>V. hemsleyi</i>
<i>V. megapotamica</i>	<i>V. obovata</i>	<i>V. divaricata</i>	<i>V. cofassus</i>
<i>V. rotundifolia</i>	<i>V. payos</i>	<i>V. bidipensis</i>	<i>V. incisa</i>
<i>V. negundo</i> ^c	<i>V. shrubland</i>	<i>V. coriacea</i>	<i>V. lignum-vitae</i>
<i>V. cannabifolia</i>	<i>V. ugogoensis</i>	<i>V. cymosa</i>	<i>V. lindenii</i>
<i>V. madiensis</i>	<i>V. masoalensis</i>	<i>V. diversiflora</i>	<i>V. quinata</i>
<i>V. thyrsoflora</i>	<i>V. gigantea</i>	<i>V. epidictoydes</i>	<i>V. seyheri</i>
<i>V. glabrata</i>	<i>V. capitata</i>	<i>V. gamosepala</i>	<i>V. bunguensis</i>
<i>V. strickeri</i>	<i>V. turczaninowii</i>	<i>V. lehmbachii</i>	<i>V. doniana</i>
<i>V. fisherii</i>	<i>V. vestita</i>	<i>V. moronensis</i>	<i>V. scabra</i>
<i>V. fisherii gurke</i>	<i>V. parviflora</i>	<i>V. schliebenii</i>	<i>V. urceolata</i>
<i>V. leucoxydon</i>	<i>V. compressa</i>	<i>V. smilacifolia</i>	<i>V. montevidensis</i>
<i>V. pinnata</i>	<i>V. altissima</i>	<i>V. tripinnata</i>	<i>V. kuylenii</i>

^a var. *hisuta*; ^b var. *variegata*; ^c var. *purpurascens*; ^d var. *subtormentosa*

Tabla 4. Algunas especies del género *Vitex*.²¹

Varias especies de ésta familia son cultivadas ya que son utilizadas tradicionalmente como plantas aromáticas, por esta razón son cultivadas y recolectadas, entre las más conocidas están la Albahaca (*Ocimum basilicum*), el Romero (*Rosmarinus officinalis*), el Orégano (*Origanum heracleoticum*), el Tomillo (*Thymus vulgaris*), la Menta (*Mentha piperita*), el Toronjil (*Agastache mexicana*), las cuales se utilizan tanto en la gastronomía como en la medicina tradicional.

2.2. *Vitex mollis* y *Vitex hemsleyi*.

Vitex mollis (Labiatae), es también conocido como “Uvalama”, “Zapotillo” ó “Iqualama”, esta especie se distribuye en las selvas baja caducifolia y mediana subcaducifolia del país, principalmente en la cuenca del balsas. Se ha utilizado como forraje y los frutos maduros pueden comerse frescos ó en conserva. La medicina tradicional recomienda el uso de las hojas en infusión como remedio para la diarrea.

Por otro lado, *Vitex hemsleyi* (Labiatae) conocido comúnmente como capulín blanco,²² es un árbol que llega a medir hasta 20 m de altura, de flor violácea. Cabe señalar que esta especie no ha sido estudiada con anterioridad en su actividad biológica y de sus componentes químicos.

2.3 La familia Labiatae y el género *Vitex* en la medicina tradicional.

En todas las sociedades, a través del tiempo, la procuración de salud ha constituido una de las necesidades básicas. Ésta es una preocupación prioritaria del hombre, la cual se ha desarrollado desde el observar sus padecimientos hasta llegar a elaborar complejas concepciones sobre la vida y la muerte, las enfermedades y sus tratamientos. Parte importante del patrimonio cultural de cada pueblo es este desarrollo cognoscitivo, y a partir de él, se han conformado una serie de sistemas médicos que podemos llamar empíricos, donde los principales recursos son los naturales. Todos estos conocimientos se han transmitido de generación en generación

para preservar la vida y permitir la reproducción y florecimiento de la propia cultura. Miles de años de observación han sido necesarios para la evolución de los diversos sistemas médicos empíricos alrededor del mundo, de las concepciones que los fundamentan, así como del conocimiento de plantas, minerales y de animales que constituyen los nichos ecológicos.

Las plantas medicinales, constituyen la fuente más abundante en la práctica de la medicina tradicional, muchas familias de especies vegetales han sido utilizadas en la curación de diversas enfermedades, tales como amigdalitis, artritis, asma, hematomas, envenenamiento, entre otros (**Tabla 5**).²³

Familia	Especie	Nombre común	Enfermedad
Apiaceae	<i>Levisticum officinalis</i> Koch.	Levístico	Amigdalitis
Asteraceae	<i>Artemisia absinthium</i> L.	Ajenjo	Artritis
Lemnaceae	<i>Lemna minor</i> L.	Lenteja de agua menor	Antiespasmódico
Liliaceae	<i>Allium sativum</i> L.	Ajo	Bronquitis
Verbenaceae	<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbena	Cicatrizante
Araceae	<i>Arum maculatum</i> L.	Aro manchado	Depresión
Rosaceae	<i>Potentilla reptans</i> L.	Cincoenrama	Diarrea
Labiatae	<i>Mentha pulegium</i> L.	Poleo	Dolor de estómago
Brassicaceae	<i>Lepidium latifolium</i> L.	Piperisa	Debilidad cardíaca
Scrophulariaceae	<i>Veronica beccabunga</i> L.	Becabunga	Estreñimiento
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.	Vid	Encías sangrantes
Malvaceae	<i>Althaea officinalis</i> L.	Malvavisco	Fiebre
Labiatae	<i>Marrubium vulgare</i> L.	Marrubio común	Hernias intestinales
Rutaceae	<i>Dictamnus albus</i> L.	Díctamo blanco	Cálculos de riñón
Borraginaceae	<i>Pulmonaria officinalis</i> L.	Pulmonaria mayor	Pulmones
Graminaceae	<i>Triticum spelta</i> L.	Escanda	Osteopatías
Iridaceae	<i>Iris germanica</i> L.	Iris	Psoriasis
Piperaceae	<i>Piper cubeba</i> L.	Cubeba	Tristeza
Papaveraceae	<i>Chelidonium majus</i> L.	Celidona	Verrugas y úlceras
Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> Miller	Castaña	Venas varicosas

Tabla 5. Ejemplos de especies utilizadas en la medicina tradicional.²³

Debido a sus propiedades curativas, algunas especies del género *Vitex* (Labiatae) también han sido utilizadas dentro de la medicina tradicional; por ejemplo, tenemos a *Vitex agnus-castus*, que se utiliza para el tratamiento de la infertilidad, la menopausia y como regulador de ciclo menstrual, ó *Vitex mollis* indicado para ayudar a

controlar la diarrea y *Vitex negundo* el cual ha sido utilizado como antídoto para combatir el veneno de algunas serpientes y como repelente de insectos.

Estos hallazgos han impulsado el estudio de las propiedades biológicas de especies de éste género. Así en años recientes se han analizado cerca de 28 especies de *Vitex*, los resultados indican que varias especies poseen potentes actividades bactericidas, anticancerosas, antiinflamatorias, entre otras (Tabla 6).

Estudios biodirigidos han mostrado que los responsables de las actividades biológicas son metabolitos secundarios del tipo flavonoide, diterpenos, triterpenos, esteroides e iridoides.^{24,25}

Actividad Biológica	Especie de estudio	Parte de la planta en estudio	Ref.
Antihipertensiva	<i>Vitex doniana</i>	Corteza	26
Antídoto	<i>Vitex negundo</i>	Hojas	27,28
Antiinflamatoria	<i>Vitex negundo</i>	Hojas	29,30
Analgésicas	<i>Vitex negundo</i>	Hojas	30
Síndrome premenstrual Menopausia Regulador del ciclo menstrual Mastalgia	<i>Vitex agnus-castus</i>	Semillas y frutos	31-45
Antihiperpigmentación	<i>Vitex negundo</i>	Raíz	46
Bactericida	<i>Vitex negundo</i> <i>Vitex doniana</i> <i>Vitex trifolia</i> <i>Vitex rotundifolia</i>	Hojas Hojas Hojas Raíz	47-50
Antidiarreico	<i>Vitex doniana</i>	Hojas	51
Antialérgica	<i>Vitex rotundifolia</i> <i>Vitex trifolia</i>	Frutos Hojas	52-53
Anticancerígena	<i>Vitex rotundifolia</i> <i>Vitex agnus-castus</i>	Frutos Frutos	54-57
Citotóxica	<i>Vitex agnus-castus</i> <i>Vitex negundo</i>	Raíz Hojas	58-59
Fungicida	<i>Vitex negundo</i>	Hojas	60
Antiviral	<i>Vitex glabrata</i> <i>Vitex rotundifolia</i> <i>Vitex trifolia</i> <i>Vitex negundo</i> <i>Vitex polygama</i>	Hojas Hojas Hojas Hojas Hojas	61-62
Antihiper glucémica	<i>Vitex negundo</i> <i>Vitex megapotámica</i>	Hojas Hojas	63-64

Tabla 6. Actividad biológica del género *Vitex*.

Por otro lado, es conocido que existen cuantiosas pérdidas debido al ataque de diferentes plagas no solo en varios cultivos, sino también en las semillas y forrajes almacenados. Con el fin de evitar esta pérdida económica, se han utilizado varios compuestos sintéticos; sin embargo, algunos de estos compuestos son muy agresivos al medio ambiente, tal es el caso del DDT o el deltametrin. Como una aproximación diferente para la obtención de compuestos químicos, con menor agresividad al medio ambiente, se han estudiado algunos productos naturales. Estudios previos han mostrado que algunos metabolitos secundarios aislados de una gran variedad de especies vegetales, actúan inhibiendo, repeliendo, disuadiendo o eliminando insectos plagas de distinto tipo (rastreros, voladores, chupadores, defoliadores, etc.), además estimulan los procesos vitales de los cultivos para fortalecerlos y de esa manera protegerse de los ataques de distintas plagas.

2.4 Familias de plantas de donde se han aislado compuestos con propiedades insecticidas.

Se ha informado que existen mas de 2000 especies vegetales pertenecientes a aproximadamente 60 familias, las cuales son conocidas que poseen propiedades insecticidas. **(Tabla 7)**⁶⁵ Las familias Compositae, Flacourtiaceae, Leguminosae, Liliaceae y Solanaceae han proporcionado importantes insecticidas de valor comercial **(Tabla 8)**.

A pesar de las investigaciones que se han realizado sobre insecticidas de origen natural, numerosos vegetales se siguen utilizando de manera tradicional o popular para el control de insectos, ya sea en invernaderos, cultivos o para el cuidado de plantas de ornato. **(Tabla 9)**

Familia	Familia	Familia
Acanthaceae	Ebenaceae	Menispermaceae
Agavaceae	Ericaceae	Myristicaceae
Annonaceae	Euphorbiaceae	Myrtaceae
Apocynaceae	Flacourtiaceae	Papaveraceae
Araceae	Guttiferae	Piperaceae
Aristolochiaceae	Helleboraceae	Poaceae
Asclepiadaceae	Hippocastanaceae	Polygonaceae
Balanitaceae	Hypericaceae	Polypodiaceae
Berberidaceae	Illiciaceae	Ranunculaceae
Boraginaceae	Juglandaceae	Rosaceae
Brassicaceae	Labiatae	Rubiaceae
Burseraceae	Lamiaceae	Rutaceae
Capparaceae	Lauraceae	Sapindaceae
Capparidaceae	Leguminosae	Sapotaceae
Celastraceae	Liliaceae	Simaroubaceae
Chenopodiaceae	Loganiaceae	Solanaceae
Compositae	Lycopodiaceae	Stemonaceae
Convolvulaceae	Magnoliaceae	Taxaceae
Curcubitaceae	Malvaceae	Umbelliferae
Dioscoreaceae	Meliaceae	Verbenaceae

Tabla 7. Ejemplos de familias de plantas con propiedades insecticidas.⁶⁵

Familia	Especie	Compuesto insecticida
Compositae	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>	Piretrinas
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotina
Leguminosae	<i>Derris elliptica</i>	Rotenona
Flacourtiaceae	<i>Riania speciosa</i>	Rianodina
Annonaceae	<i>Annona squamosa</i>	Annonina-I
Celastraceae	<i>Celastrus angulatus</i>	Angulatina-A
Liliaceae	<i>Allium sativum</i>	Di-alil-disulfuro
Ericaceae	<i>Rhododendron molle</i>	Rhodoiaponina-III
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	Azadiractina
Asteraceae	<i>Artemisia annua</i>	Artemisina

Tabla 8. Algunos insecticidas comerciales de origen natural.

Especie de planta y nombre común	Uso popular
Equinácea (<i>Equinacea angustifolia</i>)	Las raíces de ésta planta contienen un componente tóxico para mosquitos, mosca doméstica e inhibe el crecimiento de los insectos de la harina.
Hisopo (<i>Hyssopus officinalis</i>)	Al igual que otras plantas aromáticas, el hisopo actúa ahuyentando orugas, pulgones y caracoles.
Lavanda (<i>Lavandula officinalis</i>)	Las flores ahuyentan la polilla del armario.
Poleo (<i>Mentha pulegium</i>)	Las hojas trituradas y secas son uno de los remedios más efectivos contra las garrapatas de los animales domésticos, ahuyenta también a hormigas.
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Controla polillas, áfidos, moscas etc.
Salvia (<i>Salvia officinalis</i>)	Repele a la mosquita blanca en diferentes cultivos, pulgas y otros insectos voladores.
Falsa acacia (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	Sirve para ahuyentar moscas.
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Se utiliza como repelente de pulgas y garrapatas.
Damasquina (<i>Tapetes patula</i>)	Planta tóxica para las larvas de diferentes mosquitos, sus secreciones radiculares son una barrera eficaz contra los nemátodos por lo que se cultivan en proximidad a plantas susceptibles como tomate ó papa.
Toronjil (<i>Agastache Mexicana</i>)	Repele pulgas, polillas y áfidos.
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Es usado contra piojos y controla larvas de diferentes cultivos como lechuga, zanahoria ó apio.
Frijol terciopelo (<i>Canavalia esnsiformis</i>)	Controla las hormigas y actúa como fungicida
Hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>)	Se utiliza para controlar hormigas.

Tabla 9. Ejemplos de especies utilizadas de manera tradicional para el control de plagas.⁶⁵

Debido a la necesidad de contar con compuestos para el control de plagas que no sean tan tóxicos al medio ambiente y conociendo que varias especies vegetales se utilizan de manera tradicional para el control de plagas recientemente ha surgido el interés por la búsqueda de novedosos insecticidas de origen natural.

Una gran variedad de géneros pertenecientes a la familia Labiatae han sido estudiados como potentes insecticidas naturales, tal es el caso, de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* los cuales mostraron tener propiedades insecticidas contra *Culex pipens* (Diptera:Culicidae) y *Spodoptera littoralis*. (Lepidoptera:Noctuidae)⁶⁶ Por otro lado, *Origanum majorana* L. (mejorana), *Lavandula angustifolia* L. (lavanda), *Mentha arvensis* (menta) y *Rosmarinus officinalis* (Romero)

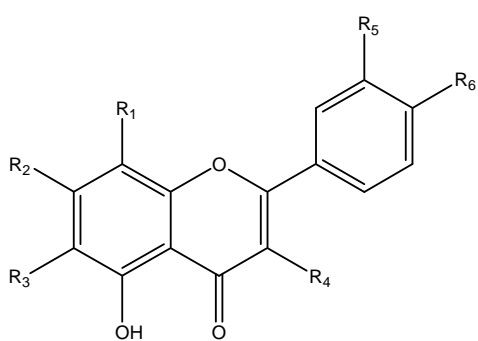
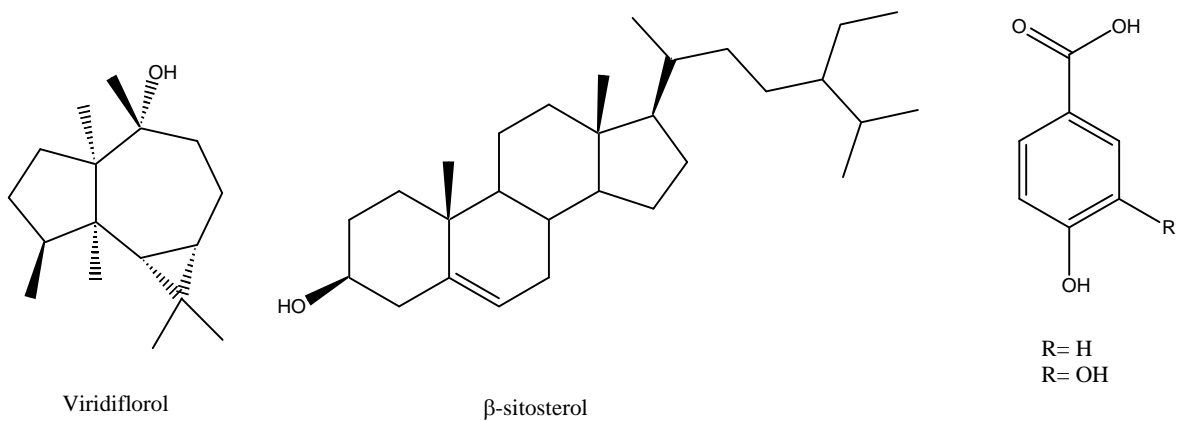
mostraron tener propiedades repelentes contra el insecto chupador *Thrips tabaci* (Thysanoptera:Thripidae).⁶⁷

2.5 Actividad insecticida y antialimentaria del género *Vitex*.

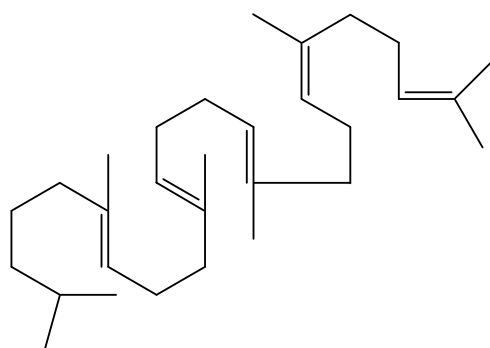
Estudios recientes han mostrado que especies del género *Vitex* (Labiatae) contienen compuestos con actividad insecticida, antialimentaria y repelente, convirtiendo a esas especies en candidatas adecuadas, para el desarrollo de novedosas insecticidas de origen natural. Hasta el momento aproximadamente seis especies del género *Vitex* originarias de la India, Sri Lanka, Tailandia y México han sido evaluadas como insecticidas y antialimentarios.

Rodríguez-López y col⁶⁸ evaluaron la actividad insecticida de los extractos de diclorometano, cloroformo-metanol y metanol de *V. mollis* Kunth frente a larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). Los resultados indicaron que, el extracto clorofórmico-metanol, mostró un 100% de mortalidad a una concentración de 75 ppm, siendo el extracto más activo de todos los evaluados.

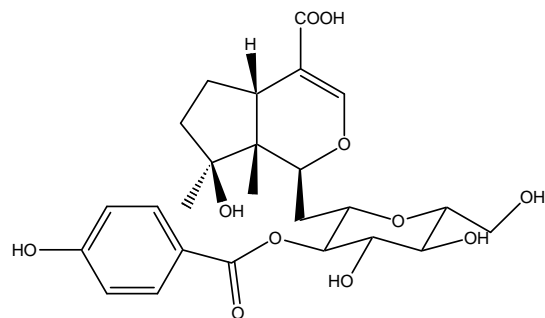
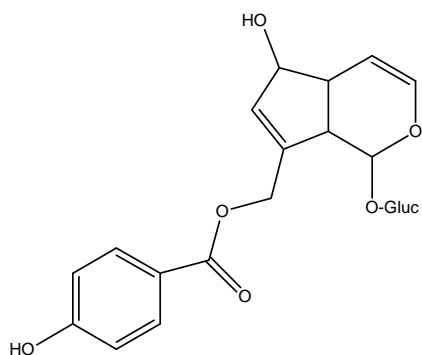
Por otro lado, Singh⁶⁹ en la India realizó un estudio fitoquímico de las hojas de *V. negundo* Linn., aislando un total de 12 compuestos (**Esquema 4**). Todos los compuestos aislados fueron evaluados en su actividad antialimentaria e insecticida contra las especies de insectos *Sitophilus oryzae* (Coleoptera:Curculionidae) y *Callosobruchus chinensis*, (Coleoptera:Bruchidae) encontrando que el Viridiflorol, compuesto del tipo sesquiterpenoide, es inhibidor de la oviposición contra *C. chinensis*, además de ser antialimentario contra *S. oryzae*.



- 1 R₁= H, R₂= OCH₃, R₃= OCH₃, R₄= OCH₃, R₅= OCH₃, R₆=OCH₃
- 2 R₁= H, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= OCH₃, R₅=OCH₃, R₆= OCH₃
- 3 R₁= OCH₃, R₂= OCH₃, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆= OCH₃
- 4 R₁= H, R₂= O-Gluc, R₃= H, R₄= H, R₅= OH, R₆=OH
- 5 R₁= H, R₂= OH, R₃= O-Gluc, R₄= OCH₃, R₅= OH, R₆= OH

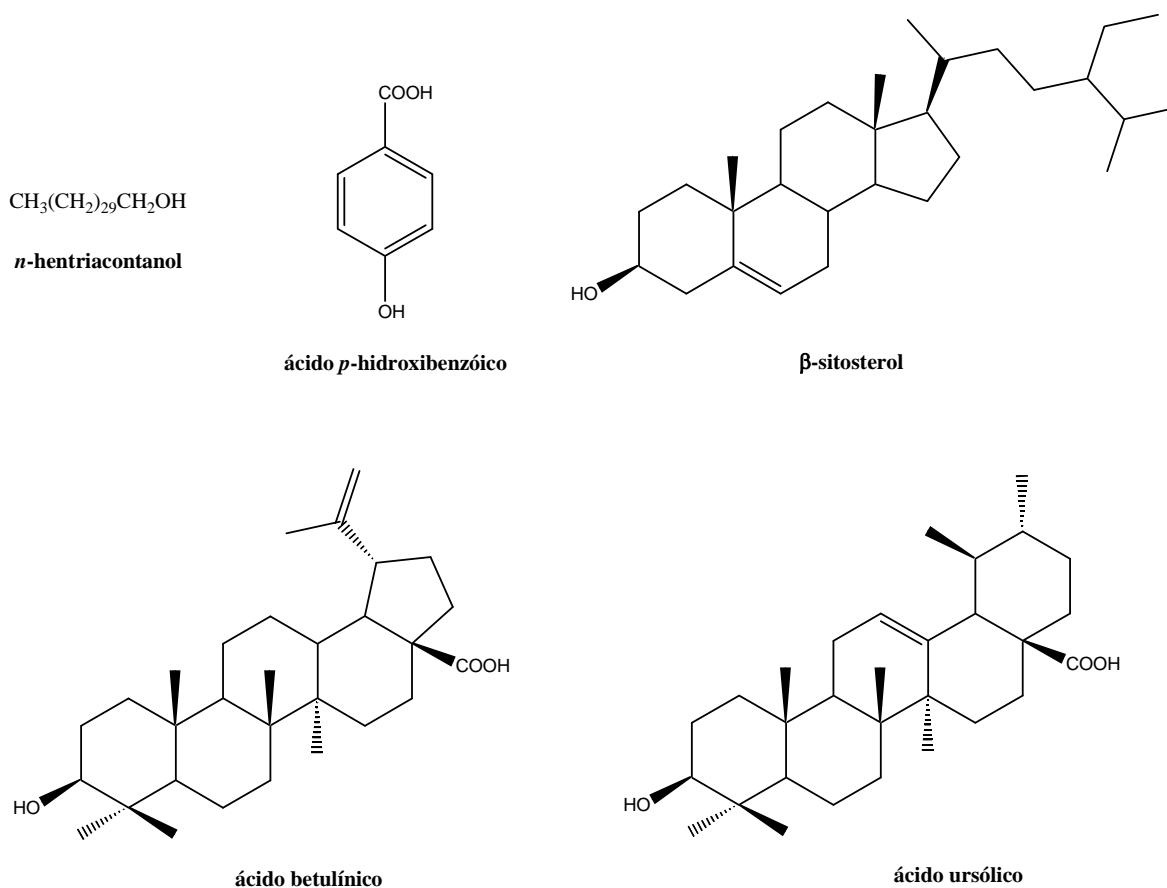


Escualeno



Esquema 4. Metabolitos secundarios aislados de *V. negundo* L.

Un estudio fitoquímico de *V. negundo* L, permitió el aislamiento de *n*-hentriacontanol, β -sitosterol, ácido *p*-hidroxibenzoico así como los ácidos betulínico y ursólico, dos triterpenos del tipo pentacíclico, siendo estos dos últimos aislados por primera vez de esta especie.⁷⁰ (Esquema 5)



Esquema 5. Metabolitos secundarios aislados de *Vitex negundo* L.⁷⁰

Estos compuestos fueron evaluados para determinar la actividad antialimentaria por medio de un bioensayo de no-elección contra larvas de tercer estadio de *Achoea janata* (Lepidoptera:Noctuidae), los resultados indicaron que los compuestos más activos fueron el *n*-hentriacontanol y los ácidos betulínico y ursólico, con factores de inhibición en la alimentación del 69.7, 73.3 y 92.9 % respectivamente. Cabe señalar que

los dos triterpenos aislados fueron los más activos, dando esto pauta al estudio de terpenos como insecticidas y antialimentarios de origen natural.

Los resultados de un estudio acerca de las actividades insecticida antialimentaria e inhibidora del crecimiento de los aceites esenciales provenientes de las especies *Callistemon lanceolatus*, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus sp.*, *Lantana camara*, *Nerium olenader*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctus* y *Vitex negundo*, todas endémicas de la India, contra larvas de tercer estadio de *Spodoptera littura* (Lepidoptera:Noctuidae), indicaron que el aceite esencial de *Vitex negundo* posee el 100 % de repelencia y el 0 % de mortalidad frente a *S. littura*. Por otro lado, la actividad antialimentaria de *V. negundo* fue del 55 % inhibidora de la alimentación por medio de un bioensayo de no-elección y del 31% por el bioensayo de elección.⁷¹

Los resultados de la evaluación de la actividad antialimentaria del extracto hexánico y de diclorometano de hojas de *V. trifolia* contra larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) por medio de un bioensayo de no-elección, mostraron que el extracto de diclorometano posee la actividad más alta debido a que las larvas disminuyeron notablemente el consumo de alimento a bajas dosis (10 y 100 ppm). Las larvas en contacto directo con el extracto murieron después de 7 días.⁷²

Adicionalmente se han determinado los efectos repelentes de los aceites esenciales de las hojas de *Vitex negundo L.* contra el insecto plaga *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera:Gelechiidae).⁷³ En un estudio posterior los aceites esenciales de *V. negundo* fueron aislados eficazmente.^{73a} Los resultados de la actividad repelente mostraron ser alentadores, con un alto factor del efecto de inhabilidad temporal para volar (“Knock down”) y de mortalidad, así como de inhibición sexual entre machos y hembras, lo que reduce las posibilidades de apareamiento.

Varias enfermedades transmitidas por mosquitos, tales como, malaria, filariasis y dengue, representan un serio problema de salud pública en regiones tropicales, especialmente en África y Asia. Estas enfermedades son transmitidas a seres humanos a través de las picaduras por mosquitos y no existe una vacuna eficaz disponible para el control de estas enfermedades. La prevención de picaduras de mosquito es una de las estrategias principales de controlar o reducir al mínimo la incidencia de estas enfermedades. El empleo de repelentes como insecticidas puede proporcionar un medio práctico y económico de prevenir enfermedades ocasionadas por insectos.

Tomando en cuenta lo anterior, en dicho trabajo se evaluó la actividad repelente, de los aceites esenciales de las hojas de *V. trifolia* (contra los insectos *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae) el cual es el hospedero del virus del dengue y de la fiebre amarilla), *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae), (es el responsable de la transmisión de enfermedades como el dengue y la encefalitis equina), *Anopheles dirus* (Diptera:Culicidae), que trasmite la malaria y *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae), el cual es responsable de la transmisión de filariasis.⁷⁴ (Tabla 10)

Compuesto	Compuesto
Eucaliptol	α -pineno
<i>p</i> -menth-1-en-8-ol	β -pineno
<i>p</i> -menth-1-en-4-ol	β -isometliona
Acetato de <i>p</i> -menth-1-en-ol	(-)-espatulenol
Cariofileno	β -felandreno
Óxido de Cariofileno	Camfeno

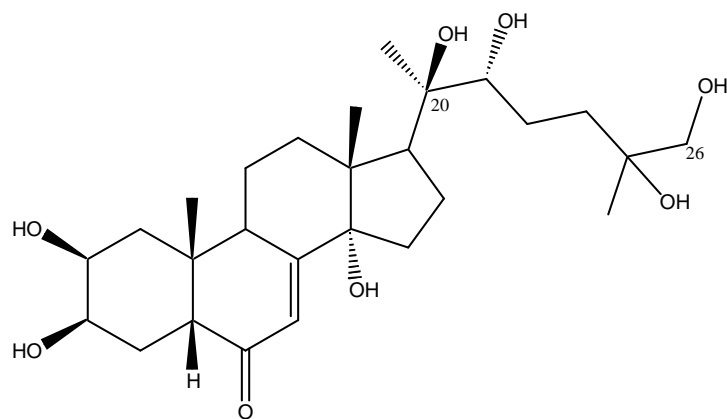
Tabla 10. Compuestos encontrados en los aceites esenciales obtenidos de *Vitex trifolia*.⁶⁹

Los resultados indicaron que los aceites esenciales mostraron una importante actividad repelente, contra las cuatro especies de mosquito. Los extractos presentaron una actividad del 89.1% de inhibición en la oviposición contra la especie *Aedes aegypti* en un periodo de 3-7 hrs.

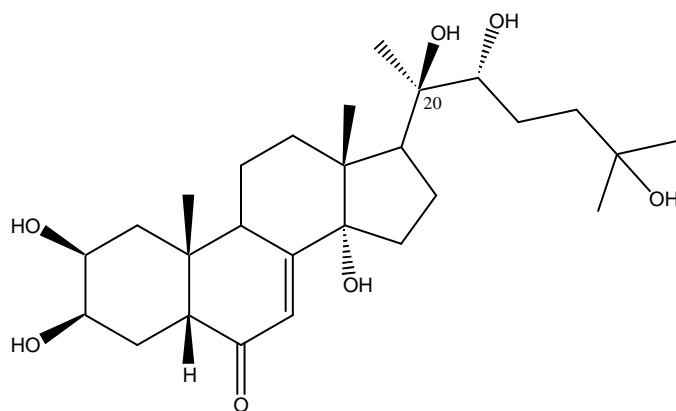
Por otro lado, se han llevado a cabo diversos estudios sobre el efecto de *B. thuringiensis* y los extractos de *V. negundo* L. sobre la enzima LDH (lactato dehidrogenasa). La LDH es una enzima glicolítica que se encuentra presente en todos los tejidos y está involucrada en el metabolismo de los carbohidratos. La inhibición de esta enzima es un parámetro ampliamente usado en toxicología y en química clínica para diagnosticar daños en las células, tejidos y órganos. Se ha estudiado el efecto de insecticidas biológicos y botánicos en el tracto digestivo del insecto plaga del arroz *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera:Pyralidae), encontrando que afectan la actividad de la LDH a varias dosis ocasionando la disminución de la actividad de las enzimas digestivas del insecto.⁷⁵⁻⁷⁷

Adicionalmente, en los estudios fitoquímicos de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Vitex canescens*, *V. glabrata* y *V. pinnata*, se detectó la presencia de dos epímeros en el C-25 de la hormona responsable de la muda de los insectos la 20,26-dihidroxiecdisona (20,26-ECD).⁷⁸ Inicialmente este ecdisteroide, fue aislado de la plaga del tabaco *Manduca sexta*, y de la planta *Podocarpus alatus*, estudios posteriores mostraron la abundancia de éste compuesto en otros invertebrados y en una gran variedad de especies vegetales. Por otro lado, también se ha indicado que este ecdisteroide es un metabolito derivado de la 20-hidroxiecdisona (20-ECD) aislado del mosquito *Calliphora erythrocephala*.

Estudios previos han mostrado que la 20,26-ECD es un producto de desactivación de la 20-ECD. Los epímeros de la 20,26-ECD fueron evaluados sobre *musca domestica* para determinar la actividad de la hormona de la muda, encontrando que la mezcla de los dos epímeros poseen una actividad menor que la 20-ECD, sin embargo al evaluarlos de manera individual, se observó que los dos epímeros muestran grados diferentes de actividad, siendo el epímero 1 de mayor actividad que el 2, este resultado sugirió que el enlace del epímero 2 a los receptores del insecto es más específico que el del formado por el epímero 1. **(Esquema 6)**



20,26-dihidroxiecdisona (20,26-ECD)



20-hidroxiecdisona (20-ECD)



Epímeros en el C-25 de la 20,26-ECD

Esquema 6. Ecdisteroides aislados de *Vitex canescens*, *V. glabrata* y *V. pinnata*.

Método Experimental

3.1 Parte 1. *Vitex mollis*.

3.1.1 Recolección.

3.1.2 Extracción.

3.1.3 Fraccionamiento de los extractos de las partes aéreas de *Vitex mollis*.

3.2 Parte 2. *Vitex hemsleyi*.

3.2.1 Recolección.

3.2.2 Extracción.

3.2.3 Fraccionamiento del extracto hexánico.

3.2.4 Aislamiento del ácido anticopálico.

3.2.5 Derivados semisintéticos del ácido anticopálico.

3.3 Parte 3. Evaluación de la actividad antialimentaria.

3.3.1 *Spodoptera frugiperda*.

3.3.2 Cría de la especie *Spodoptera frugiperda*.

3.3.3 Preparación de la dieta artificial.

3.3.4 Bioensayo de elección.

Material y aparatos utilizados.

- La identificación y la pureza de los compuestos se llevaron a cabo por medio de cromatografía en placa fina (CCF), utilizando placas de gel de sílice ALUGRAM[®], SIL G/UV₂₅₄. Reveladas con una solución al 1% de sulfato cérico en ácido sulfúrico 2N, previa visualización con una lámpara de luz ultravioleta ENF-260C.
- Para el desarrollo de las cromatografías en columna, se utilizó como fase estacionaria, gel de sílice Aldrich 200-400 mesh, 60 Å. El eluyente empleado se indica en cada caso.
- Los espectros de IR fueron realizados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27.
- Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C se adquirieron en espectrómetros, Varian Unity-300 Mhz ó Jeol Eclipse 300 Mhz, utilizando como disolvente CDCl₃ en concentraciones variables, los valores de los desplazamientos químicos se indican como δ (ppm) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.
- Los espectros de masas fueron realizados en un espectrofotómetro de masas Jeol-JMS-AX 505HA y Jeol-JMS-SX 102A utilizando impacto electrónico (IE) a 70 eV.
- Los valores de las rotaciones ópticas fueron determinadas en un polarímetro Perkin-Elmer 343. Para la medición se utilizó la línea D del sodio (589 nm).
- Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Mel-Temp II y no están corregidos.

Parte 1. *Vitex mollis*

3.1 Estudio de *V. mollis*

3.1.1 Recolección.

3.1.2 Extracción.

3.1.3 Fraccionamiento de los extractos de las partes aéreas de *V. mollis*.

3.1.1 Recolección.

Hojas, semillas y corteza de *Vitex mollis* fueron recolectados el 11 de junio de 2004 en la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla, ubicada en el estado de Morelos (REBIOSH). La REBIOSH se ubica en la región sur del estado de Morelos, entre los 18°34'20" norte y los 98°51'20" y 99°08'15" oeste.⁷⁹ Comprende parte de los municipios de Amacuzac, Jojutla, Puente de Ixtla, Tepalcingo y Tlalquitenango. La REBIOSH está comprendida en dos provincias fisiográficas. La primera comprende el eje neovolcánico e incluye la subprovincia del sur de Puebla, la segunda pertenece a la Sierra Madre del sur y está representada por la subprovincia de los Lagos y Volcanes de la región de Anáhuac.⁸⁰

La REBIOSH tiene un clima cálido subhúmedo, la temperatura media varía entre los 20 y los 29°C, siendo mayo el mes más caluroso y diciembre y enero los menos calurosos.⁸¹ En lo que respecta a la vegetación en la REBIOSH existen varias especies que dominan el paisaje siendo las más comunes *Conzattia multiflora*, *Lysiloma acapulcense* y *L. divaricata* (Fabaceae) y varias especies de los géneros *Bursera* (Burseraceae) y *Ceiba* (Bombaceae). Se han descrito 967 especies de plantas vasculares incluidas en 469 géneros y 130 familias. Las familias más abundantes en cuanto a número de especies son Asteraceae, Fabaceae, Poaceae. Las especies más representativas son: copal (*Bursera copallifera*), guayacán (*Guaiacum coulteri*), cazahuate (*Ipomea arborescens*), mezquite (*Prosopis laevigata*), nopal (*Opuntia atropes*), guamúchil (*Pithecellobium dulce*), cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) entre otros.⁸²

3.1.2 Extracción.

a) Extracción de hojas de *Vitex mollis*.

Hojas secas y finamente trituradas (644.1 g) se maceraron en 20 L de metanol, durante 72 h. La destilación del disolvente a presión reducida permitió la concentración del extracto, el cual se llevó a sequedad en una bomba de alto vacío, obteniendo así 100 g de extracto seco. (**Esquema 7**)

b) Extracción de semillas de *Vitex mollis*.

Los frutos colectados de *V. mollis* se dejaron madurar (la coloración del fruto pasó de verde a morado). De los frutos maduros, se separó la pulpa de la semilla. Las semillas (335 g) secas y molidas fueron extraídas con acetona (1.5 L X 3) durante 48 h, transcurrido éste tiempo el disolvente fue eliminado a presión reducida, lo cual permitió obtener 4.7 g de extracto seco. **(Esquema 7)**

c) Extracción de corteza de *Vitex mollis*.

La corteza seca de *V. mollis* (418.3 g) finamente cortada se extrajo con acetona vía maceración durante 48 h a temperatura ambiente (8 L X 3), finalizado este tiempo, el disolvente se concentró por medio de un rotavapor a presión reducida, obteniendo un peso total de 2.4 g de extracto seco. **(Esquema 7)**

d) Partición del extracto metanólico de hojas de *Vitex mollis*.

El extracto metanólico seco (100 g) fue sometido a una partición mediante una mezcla de disolventes hexano:agua y diclorometano:agua, el disolvente de cada partición se eliminó a presión reducida, obteniendo finalmente el extracto hexánico (13.1 g) y de diclorometano (3.2 g).

3.1.3 Fraccionamiento de los extractos de las partes aéreas de *Vitex mollis*.

a) Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas de *Vitex mollis*.

El extracto hexánico seco (13.1 g) se sometió a una cromatografía en columna (CC) empleando una columna de vidrio de 10 cm de ancho y 10 cm de altura, la cual se empacó con sílica gel como fase estacionaria y como eluyente se utilizó una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo, en orden creciente de polaridad. **(Esquema 7)** Las fracciones obtenidas se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (CCF), obteniéndose 22 fracciones en total.

b) Fraccionamiento del extracto de diclorometano de hojas de *Vitex mollis*.

Al extracto de diclorometano (3.2 g) se le realizó una cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y como eluyente se utilizó una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo, en orden creciente de polaridad. La columna fue monitoreada por medio de cromatografía en placa fina, obteniéndose un total de 10 fracciones. **(Esquema 7)**

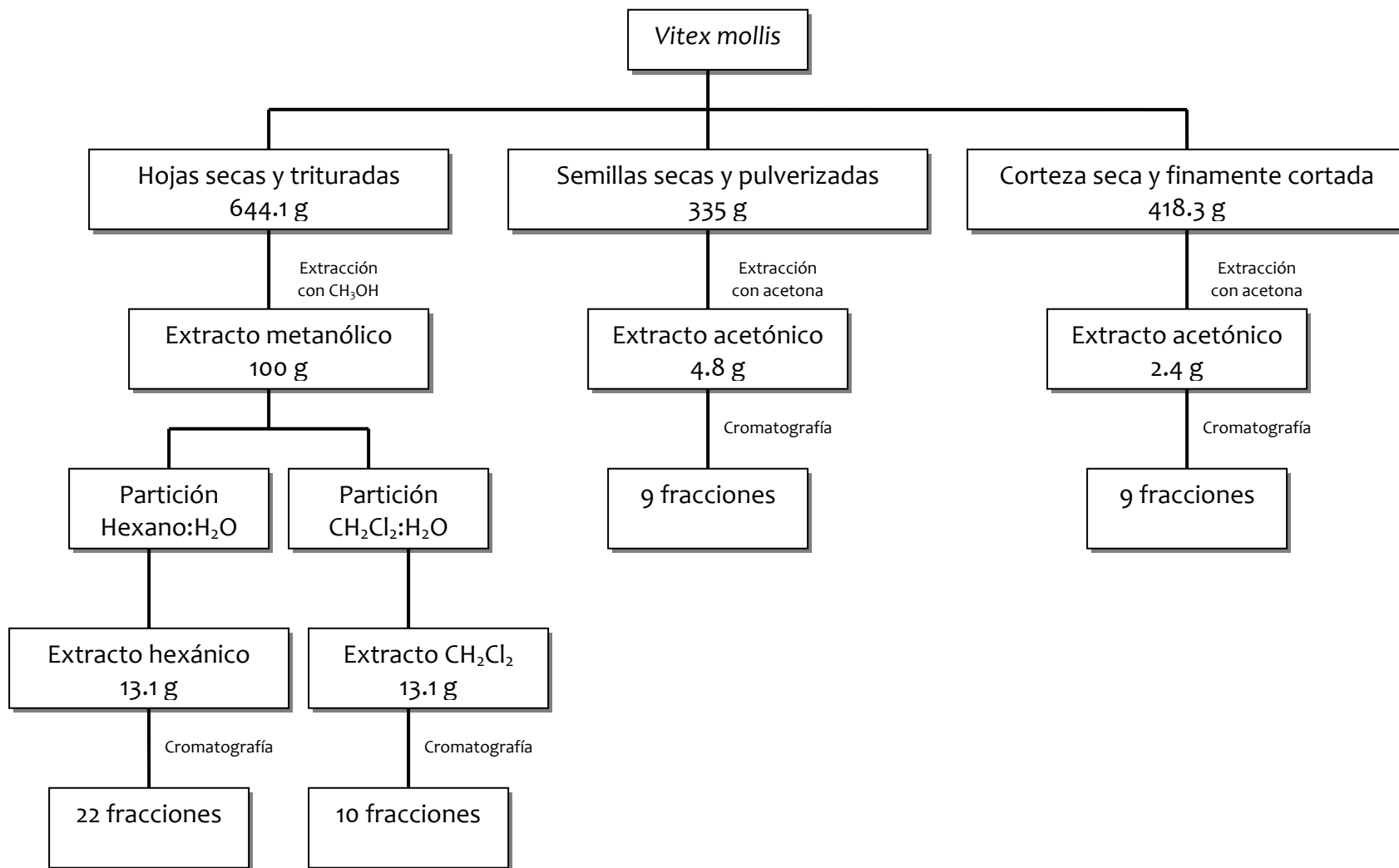
c) Fraccionamiento del extracto de semilla de *Vitex mollis*.

El extracto acetónico seco de las semillas (4.8 g) se sometió a una cromatografía en columna, empacada con sílica gel y utilizando como eluyente una mezcla de disolventes hexano:acetona en orden creciente de polaridad, las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por CCF, obteniéndose un total de 9 fracciones. **(Esquema 7)**

d) Fraccionamiento del extracto de corteza de *Vitex mollis*.

Al extracto de corteza seco de *V. mollis* (2.4 g) se le realizó una cromatografía en columna, siguiendo la metodología anteriormente descrita, se obtuvo un total de 9 fracciones. **(Esquema 7)**

La obtención de los metabolitos secundarios puros, a partir de las fracciones obtenidas de los extractos antes mencionados, se realizó por medio de cromatografía en columna “Rápida” (Flash).⁸³ Las estructuras fueron determinadas por el análisis de los datos de espectroscopia en el Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C y espectrometría de masas.



Esquema 7. Metodología general seguida durante el estudio de *Vitex mollis*.

Parte 2. Vitex hemsleyi

3.2. Estudio de *V. hemsleyi*

3.2.1 Recolección.

3.2.2 Extracción.

3.2.3 Fraccionamiento del extracto hexánico.

3.2.4 Aislamiento del ácido anticopálico.

3.2.5 Derivados semisintéticos del ácido anticopálico.

3.2.1 Recolección.

La especie *Vitex hemsleyi* fue recolectada en junio del 2000 en la Reserva de la Biosfera de la Sierra de Huautla en el estado de Morelos (REBIOSH).⁷⁹⁻⁸²

3.2.2 Extracción.

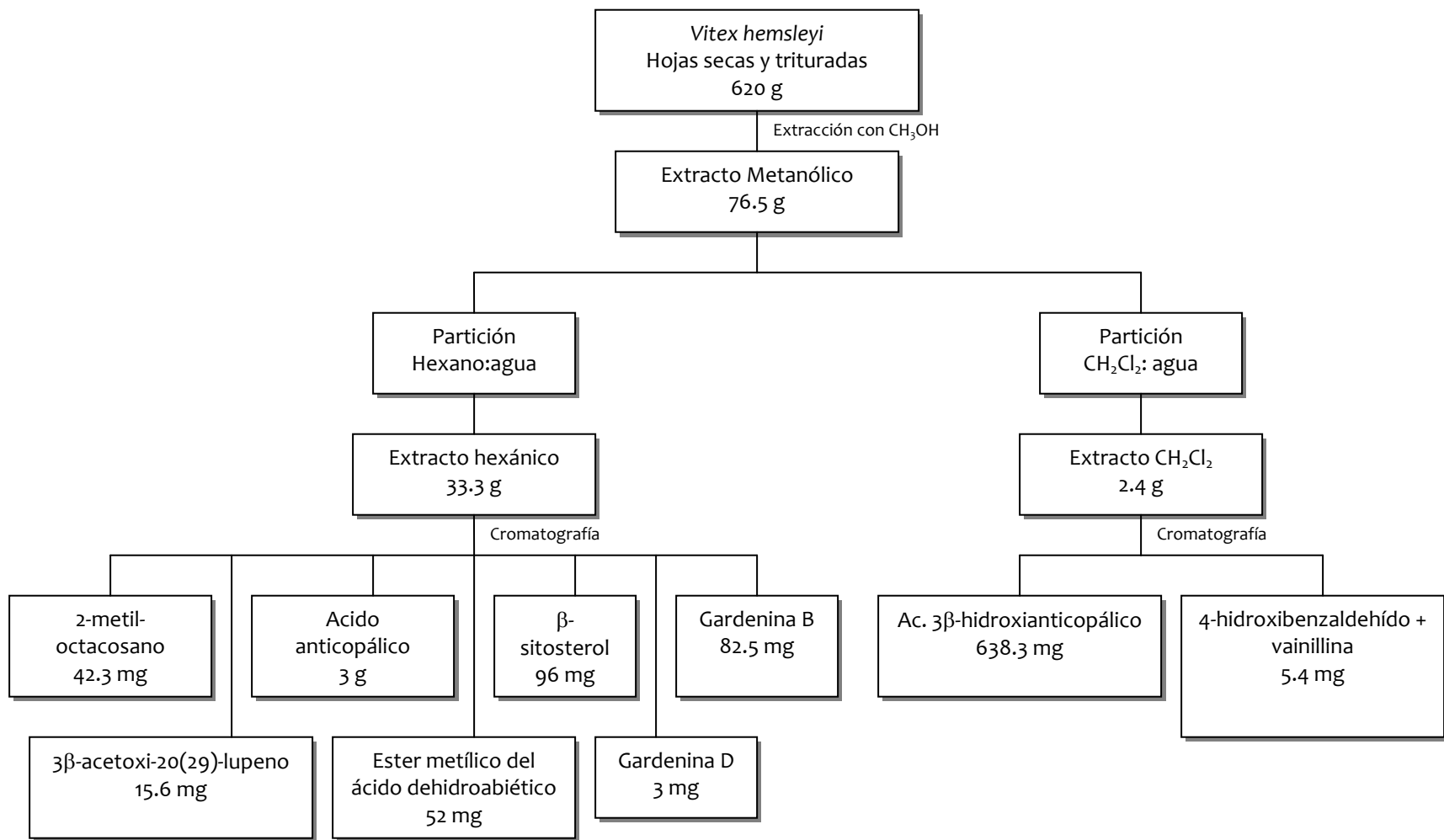
Un total de 620 g de hojas secas y trituradas, se maceraron en 20 L de metanol por un lapso de 5 días, al término de este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida y posteriormente se llevó a sequedad por medio de una bomba de alto vacío. Se obtuvieron 76.5 g de extracto seco. El extracto metanólico seco se sometió a una partición mediante una mezcla de disolventes hexano:agua y diclorometano:agua, el disolvente de cada partición se eliminó por medio de un rotavapor a presión reducida, obteniendo finalmente el extracto hexánico (33.3 g) y de diclorometano (2.4 g).

3.2.3 Fraccionamiento del extracto hexánico.

Se realizó una cromatografía del extracto hexánico seco (33.3 g) en una columna de vidrio y empacada con sílica gel y eluída como previamente se ha descrito, de la cual se obtuvieron 8 fracciones.²⁵ (**Esquema 8**)

3.2.4 Aislamiento del Ácido Anticopálico.

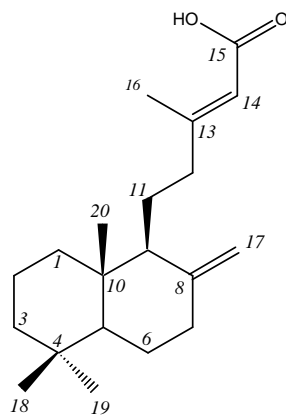
La separación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción número dos dio como resultado la obtención del ácido anticopálico, un diterpeno del tipo labdano.²⁵ (**Esquema 9**)



Esquema 8. Metodología general seguida durante el estudio de *Vitex hemsleyi*.
Aislamiento del ácido anticopálico.

3.2.5 Derivados semisintéticos del ácido anticopálico.

Del extracto hexánico de *V. hemsleyi*, se obtuvieron 3 g del ácido anticopálico, un diterpeno del tipo labdano con un rendimiento del 9%.



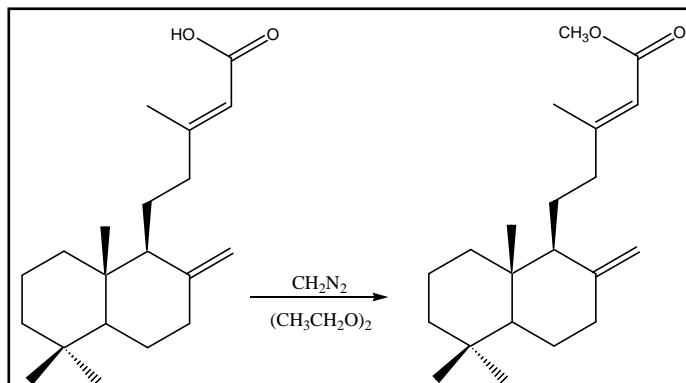
Esquema 9. Ácido anticopálico

Estudios previos han mostrado que el ácido anticopálico es activo contra el insecto de prueba *Spodoptera frugiperda*.²⁵ Tomando en cuenta lo anterior se decidió obtener varios derivados este metabolito secundario, principalmente transformando las posiciones 3, 8(17) y 15 de la molécula (**Esquema 9**). La **Tabla 11** muestra las transformaciones químicas realizadas sobre el ácido anticopálico.

Derivados		

Tabla 11. Derivados semisintéticos del ácido anticopálico.

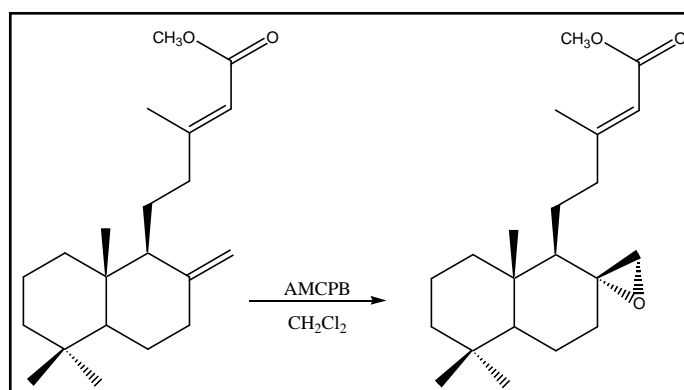
Ester metílico del ácido anticopálico.



Esquema 10. Reacción de esterificación del ácido anticopálico.

En un matraz erlenmeyer de 50 mL se colocó 1 g (0.0032 mol) de ácido anticopálico y se disolvió en éter etílico a una temperatura de 5°C; por otro lado, se añadieron 50 mL de diazometano previamente preparado de acuerdo a la técnica descrita por F. Arndt.⁸⁴ Al término de una este tiempo, la reacción se monitoreó por medio de cromatografía en placa fina, al terminar ésta se evaporó el disolvente y el producto fue cromatografiado por columna en sílica gel, usando como eluyente hexano;acetato de etilo en proporciones 60:40, obteniéndose 820 mg (78.2 % de rendimiento) de un aceite incoloro. (**Esquema 10**). $[\alpha]_D = +25^\circ$ (CH_3OH); RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3) δ 0.68 (s, 3, 20-H), 0.80 (s, 3, 18-H), 0.87 (s, 3, 19-H), 2.17 (d, 3, $J = 1.2$ Hz, 16-H), 4.49 (br s, 1, 17'-H), 4.84 (br s, 1, 17-H), 5.65 (c, 1, $J = 1.2$ Hz, 14-H), 3.69 (s, 3, -OCH₃); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl_3) δ 14.4 (C-20), 19.3 (C-16), 21.5 (C-18), 33.5 (C-19), 51.0 (C-21), 106.3 (C-17), 114.8 (C-14), 148.3 (C-8), 161.2 (C-13), 167.3 (C-15); IR ν_{max} (película) 1720, 1647, 888 cm^{-1} ; EM (I.E), m/z [M+1] 319 (58.0), 303 (93.1), 287 (33.5), 205 (55.5), 137 (100), 114 (95.0), 95 (77.2).

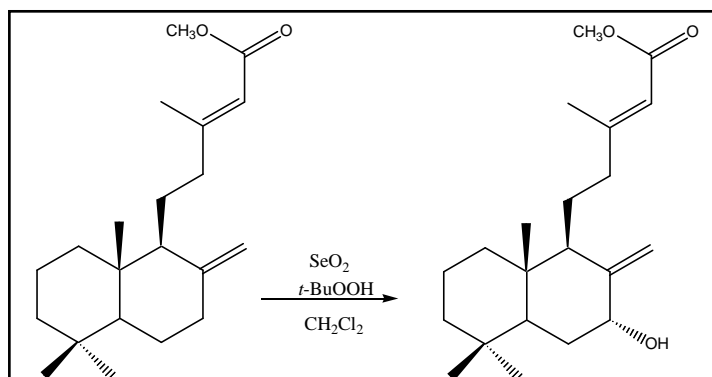
Ester metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.



Esquema 11. Reacción de epoxidación del ester metílico del ácido anticopálico.

En un matraz de bola de 25 mL provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se colocaron 200 mg (0.00062 mol) del éster metílico del ácido anticopálico disuelto en 5 mL de CH₂Cl₂, por otro lado, 1 equivalente (108 mg) (0.00062 mol) de ácido *meta*-cloroperoxibenzoico al 77% previamente disuelto en CH₂Cl₂ fue adicionado a la solución, se mantuvo en agitación por 24 h a temperatura ambiente, al término de este tiempo se filtró sobre un vidrio poroso y el disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano:acetato de etilo 90:10 obteniendo 180 mg del producto epoxidado (85% de rendimiento). (**Esquema 11**) RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 0.80 (s, 1, 20-H), 0.89 (s, 1, 19-H), 0.82 (s, 1, 18-H), 2.12 (d, 3, J = 1.7 Hz, 16-H), 2.50 (d, 1, J = 4.11 Hz, 17-H), 2.74 (dd, 1, J = 4.11, 1.7 Hz, 17'-H), 3.68 (s, 3, -OCH₃), 5.65 (c, 1, J = 1.7 Hz, 14-H). IR ν_{\max} (película) 1719, 1647, 1224 cm⁻¹; EM (I.E), m/z [M⁺] 334 (5.0), 289 (15.0), 205 (27.0), 177 (53.5), 109 (70.0), 95 (98.0), 69 (100), 41 (86.5), 28 (59.0).

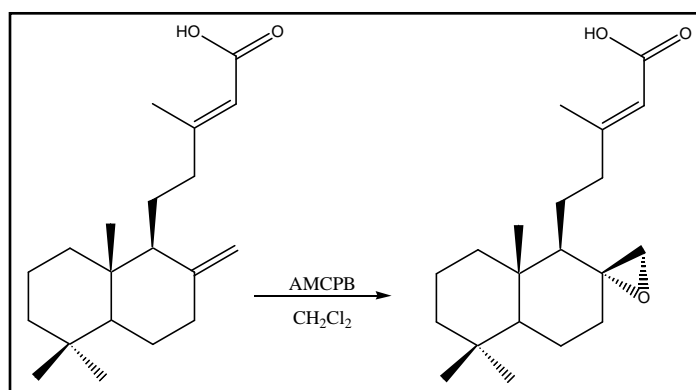
Ester metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.



Esquema 12. Reacción de oxidación del éster metílico del ácido anticopálico.

De acuerdo a la técnica descrita por Umbreit y col.⁸⁵ 26.2 mg (0.00023 mol) de dióxido de selenio (SeO₂) se disolvió en 1 mL de CH₂Cl₂ y se colocó en agitación, posteriormente se adicionaron 1.4 mL (0.015 mol) de peróxido de *tert*-butilo, la reacción se agitó por un lapso de 30 min a 25°C, al término de este tiempo se agregaron 200 mg (0.00062 mol) del éster metílico del ácido anticopálico previamente disuelto en 1 mL de CH₂Cl₂, la reacción permaneció en agitación por 48 h a 25°C, una vez finalizada, se evaporó el disolvente y el residuo fue purificado por medio de cromatografía en columna con un eluyente de hexano:acetato de etilo en proporciones 60:10, obteniendo el producto oxidado con un rendimiento del 55%. (**Esquema 12**) RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 0.66 (s, 1, 20-H), 0.80 (s, 1, 18-H), 0.88 (s, 1, 19-H), 2.10 (*br dd*, 1, $J = 1.5, 11.0$ Hz, 9-H), 2.16 (*d*, 3, $J = 1.5$ Hz, 16-H), 3.68 (s, 3, -OCH₃), 4.38 (*ddd*, 1, $J = 3.0, 5.5$ Hz, 7-H), 4.62 (*br t*, 1, 17_b-H), 5.07 (*br t*, 1, 17_a-H), 5.65 (*c*, 1, $J = 1.0$ Hz, 14-H); RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 38.8 (C-1), 18.8 (C-2), 42.0 (C-3), 39.8 (C-4), 47.6 (C-5), 30.9 (C-6), 74.0 (C-7), 149.4 (C-8), 50.2 (C-9), 39.8 (C-10), 21.0 (C-11), 39.3 (C-12) 160.7 (C-13), 115.0 (C-14), 167.2 (C-15), 19.3 (C-16), 109.6 (C-17), 21.5 (C-18), 33.2 (C-19), 13.4 (C-20), 50.7 (C-21); IR ν_{\max} (película) 3471, 1719, 1647, 862 cm⁻¹; EM (I.E), m/z [M⁺] 334 (5.0), 317 (5.0), 221 (29.0), 203 (40.0), 123 (100), 114 (66.5), 82 (83.0), 55 (49.0), 41 (38.5).

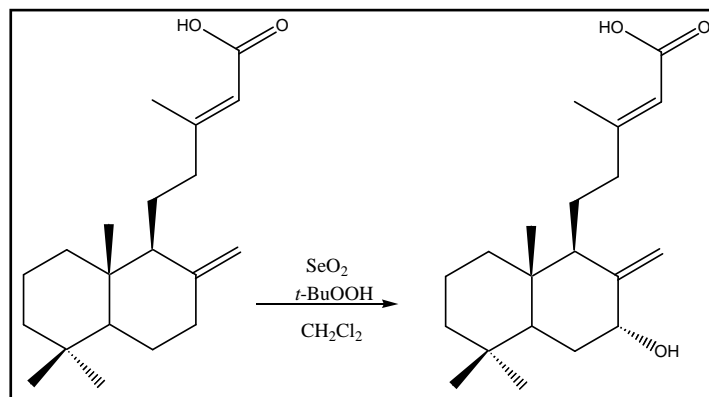
Ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.



Esquema 13. Reacción de epoxidación del ácido anticopálico.

Siguiendo la metodología antes mencionada para la epoxidación del éster metílico del ácido anticopálico, en un matraz de bola de 25 mL provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se colocaron 200 mg (0.00065 mol) de ácido anticopálico disuelto en 5 mL de CH_2Cl_2 . Por otro lado, 1 equivalente (113 mg) (0.00065 mol) de ácido *meta*-cloroperoxibenzoico al 77% previamente disuelto en CH_2Cl_2 fue adicionado a la solución. La agitación se mantuvo durante 24 h a temperatura ambiente, al término del cual se filtró sobre un vidrio poroso y el disolvente se evaporó a presión reducida, el residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano:acetato de etilo 80:20 obteniendo 70 mg del producto epoxidado con un rendimiento del 66.5%. (**Esquema 13**) RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 0.81 (s, 1, 20-H), 0.83 (s, 1, 18-H), 0.90 (s, 1, 19-H), 2.13 (d, 3, $J = 1.2$ Hz, 16-H), 2.50 (d, 1, $J = 4.2$ Hz, 17-H), 2.75 (dd, 1, $J = 4.5, 1.8$ Hz, 17'-H), 5.67 (c, 1, $J = 0.9$ Hz, 14-H); IR ν_{max} (película) 2945, 1689, 1253, 838 cm^{-1} ; EM (I.E), m/z [M^+] 320 (4.0), 302 (15.0), 275 (28.0), 205 (45.0), 177 (54.5), 149 (67.5), 137 (96.0), 95 (98.0), 69 (100), 55 (63.0), 41 (68.5).

Ácido 7 α -hidroxianticopálico.



Esquema 14. Reacción de oxidación del ácido anticopálico.

Continuando con la técnica descrita por Umbreit y col.⁸⁵ 18.3 mg (0.00016 mol) de dióxido de selenio (SeO_2) se disolvió en 1 mL de CH_2Cl_2 y se colocó en agitación, posteriormente se adicionaron 72.3 μL (0.0008 mol) de peróxido de *tert*-butilo, la reacción se agitó por un lapso de 30 min a 25°C, al término de este tiempo se agregó 100 mg (0.00032 mol) de ácido anticopálico previamente disuelto en 1 mL de CH_2Cl_2 , la reacción permaneció en agitación por 48 h a 25°C, una vez finalizada, se evaporó el disolvente y el residuo fue purificado por medio de cromatografía en columna con un eluyente de hexano:acetato de etilo en proporciones 30:10, y así obtener el producto oxidado con un rendimiento del 68%. (**Esquema 14**) RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3) δ 0.66 (s, 1, 20-H), 0.80 (s, 1, 18-H), 0.88 (s, 1, 19-H), 2.16 (d, 3, $J = 0.6$ Hz, 16-H), 4.39 (t, 1, 7-H), 4.63 (br s, 1, 17'-H), 5.08 (br s, 1, 17-H), 6.68 (d, 1, $J=0.6$ Hz, 14-H); IR ν_{max} (película) 3345, 3078, 1691, 1642, 868 cm^{-1} ; EM (I.E), m/z [M^+] 320 (3.0), 302 (14.0), 287 (17.5), 221 (27.0), 203 (35.0), 149 (75.0), 123 (100), 109 (32.5), 82 (52.0), 69 (48.5).

Parte 3. Evaluación de la actividad antialimentaria

3.3 Actividad antialimentaria.

3.3.1 *Spodoptera frugiperda*.

3.3.2 Cría de la especie *Spodoptera frugiperda*.

3.3.3 Preparación de la dieta artificial.

3.3.4 Bioensayo de elección.

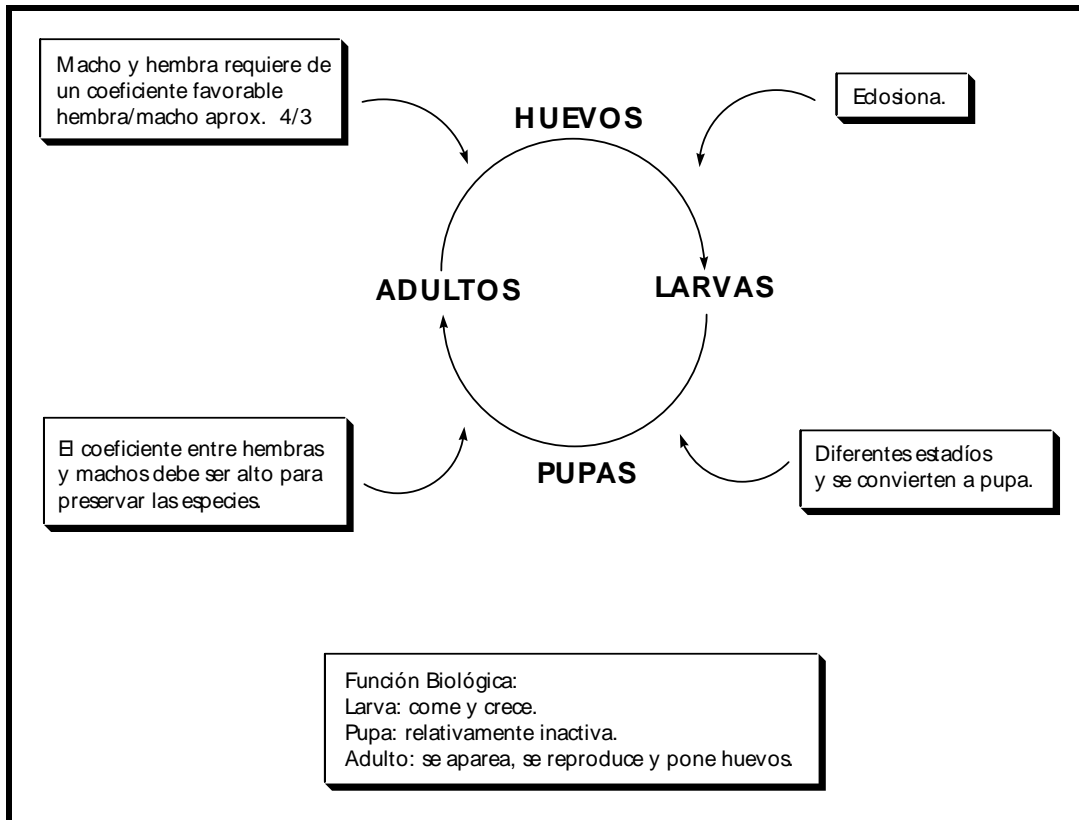
3.3.1 *Spodoptera frugiperda*.

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) (**Esquema 15**) es un insecto perteneciente a la familia Noctuidae, del orden Lepidoptera, el cual causa un daño físico a las plantas en su fase larvaria, se conoce comúnmente con el nombre de “gusano cogollero del maíz”.



Esquema 15. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Generalmente para poder realizar la evaluación de los efectos insecticidas o antialimentarios, son utilizados organismos que suelen dañar cultivos de interés agrícola tales como, maíz, frijol, tomate o sorgo. Entre estos organismos se han utilizado orugas de gusano bellotero *Helocoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae), gusano del fruto de tomate *Heliothis virescens* (Lepidoptera:Noctuidae) y el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). Esta especie es endémica de regiones tropicales y se presenta desde el hemisferio occidental de Estados Unidos hasta Argentina. Esta es una especie polífaga, pues puede alimentarse de alrededor de 60 cultivos, entre los cuales podemos mencionar al maíz, sorgo, arroz, pastos y muchos cultivos hortícolas tales como, jitomate, fresa, papa, entre otros. Este insecto puede desarrollarse sin ningún problema, en un rango comprendido entre 20 y 30 °C aunque puede soportar temperaturas entre 15 y 35 °C, esto según la fase de desarrollo en consideración. El ciclo de vida de ésta especie dura aproximadamente 30 días durante la primavera y el verano, 60 días en el otoño y hasta 80 días en el invierno.⁸⁶ (**Esquema 16**)



Esquema 16. Ciclo de vida de la especie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*

a) Huevos: Los huevos son colocados por las hembras sobre las hojas situadas, preferentemente, en la parte media de la planta, en el envés de la hoja y hacia la parte inferior de la misma. Las masas de 40-300 huevos están cubiertas por una tela fina formada con las escamas del cuerpo de la hembra adulta, los huevos inicialmente son de color verde claro, volviéndose luego de rosas a grisáceos antes de eclosionar, la duración de la etapa del huevo es de dos a tres días durante los meses del verano. **(Esquema 17)**

b) Larvas: La fase larvaria pasa normalmente por seis estadios (L1-L6), **(Esquema 17)** el tamaño de la cabeza y el cuerpo de la larva según el estadio en el que se encuentran se describe en la **Tabla 12**.

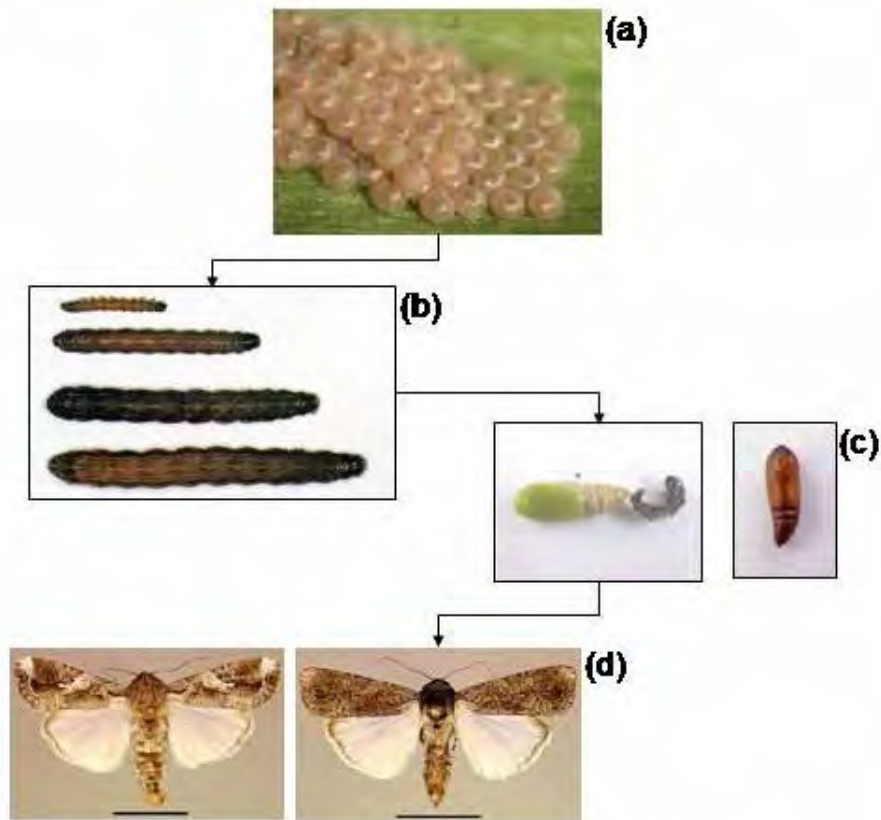
Estadío	Tamaño de la cabeza	Tamaño del cuerpo
L1	0.35 mm	1.7 mm
L2	0.45 mm	3.5 mm
L3	0.75 mm	6.4mm
L4	1.3 mm	10.0 mm
L5	2.0 mm	17.2 mm
L6	2.6 mm	34.2 mm

Tabla 12. Tamaño de cabeza y cuerpo de la fase larvaria de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera:Noctuidae) según el estadío.

Las larvas jóvenes de primero y segundo estadío son verdosas con la cabeza negra, en el tercer estadío las líneas blancas laterales a lo largo del cuerpo de la larva se empiezan a formar. Del cuarto al sexto estadio la cabeza es color marrón, las líneas laterales están completamente formadas y en estas etapas es muy característico encontrar en el dorso del antepenúltimo segmento del abdomen cuatro puntos negros formando un trapecio. La etapa larvaria dura aproximadamente 14 días durante el verano.

c) Pupas: La pupación ocurre normalmente en el suelo, a una profundidad de 2 a 8 cm, las pupas recién formadas son de color verdoso, volviéndose de color marrón-rojizo y miden aproximadamente de 14 a 18 mm de longitud y cerca de 4.5 mm de ancho. **(Esquema 17)** Esta etapa dura de ocho a nueve días durante el verano, cabe mencionar, que las pupas no son resistentes a periodos prolongados de frío.

d) Adultos: Las palomillas tienen un ancho aproximado de 32 a 40 mm, la palomilla macho generalmente es de color gris y marrón, su ala se caracteriza por tener puntos blancos triangulares en el centro del ala. Las hembras tienen un color grisáceo uniforme y se caracterizan por un punto color rojizo en la cabeza. **(Esquema 17)** La actividad de estas palomillas es nocturna, y llegan a ser más activos durante noches calientes y húmedas. La duración de la vida de los adultos se estima en 10 días.



Esquema 17. Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda* a) huevos ovipositados por los adultos b) larvas de tercer a sexto estadio c) Pupa d) Palomilla hembra y macho de *S. frugiperda*.

El daño que ocasionan las larvas de esta especie, es como masticador del tejido vegetal, la larva puede comportarse como raspador durante los primeros tres estadios, alimentándose de la epidermis de las hojas, en los últimos estadios, las larvas se introducen en el cogollo causando daños a las hojas tiernas que luego resultan en hojas con agujeros de tamaño y forma irregular.

3.3.2 Cría de la especie *Spodoptera frugiperda*.

La cría de la especie *Spodoptera frugiperda* se llevó a cabo en el “Laboratorio de Cultivo de Insectos” del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las condiciones para reproducir de forma artificial a esta especie en una cámara de crecimiento son las siguientes:

- Temperatura de 25 a 27 °C.
- 70 % humedad relativa.
- Fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad.
- Dieta artificial.

Esta especie, se empezó a cultivar a partir de los huevos ovipositados por los adultos, una vez eclosionadas las larvas se limpiaron y se alimentaron cada tercer día, esto por medio de una dieta artificial a las condiciones antes mencionadas.

3.3.3 Preparación de la dieta artificial.

El uso de una dieta artificial para el mantenimiento de determinada especie, deberá ser el apropiado en cuanto la facilidad en el consumo de ella por parte de los insectos⁸⁷ es decir, que los ingredientes de la dieta sean lo más cercanos a su habitat, así como también se debe tomar en cuenta la facilidad en la preparación y el mantenimiento de ésta. En la **Tabla 13**, se dan a conocer los componentes de ésta dieta.

Componente
Agua
Agar
Acido benzoico
Sémola de maíz
Germen de trigo
Levadura de Cerveza
Acido ascórbico
Nipagin *
Sales minerales
Vitaminas **

* Nipagin: p-hidroxibenzoato de etilo.

** Vitaminas: mezcla de vitaminas especial para la cría de lepidópteros (Vitamin mix-Bio Serv)

Tabla 13. Componentes de la dieta artificial para la cría de la especie *Spodoptera frugiperda*.⁸⁷

3.3.4 Bioensayo de elección.

El bioensayo de elección evalúa los efectos antialimentarios del tratamiento con respecto al control. Esta técnica se utiliza para la evaluación de la actividad antialimentaria tanto de extractos como de compuestos puros.⁸⁸

Este método se utiliza principalmente con insectos masticadores, entre los que podemos mencionar a lepidópteros (larvas), tales como, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae), *S. littoralis*, *S. exempta*, *S. exigua*, *Achoea janata*, (Lepidoptera:Noctuidae) *Sitotroga cerealella*, (Lepidoptera:Gelechidae) *Ornithoptera alexandre* (Lepidoptera:Papilionidae) y coleópteros (escarabajos) de los cuales podemos citar a *Leptinotarsa decemlineata*, (Coleoptera:Chrysomelidae) *Sitophilus oryzae*, (Coleoptera:Curculionidae) *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae) y *Pyrrhalla luteola* (Chrysomelidae).

DESARROLLO DE LA TÉCNICA.

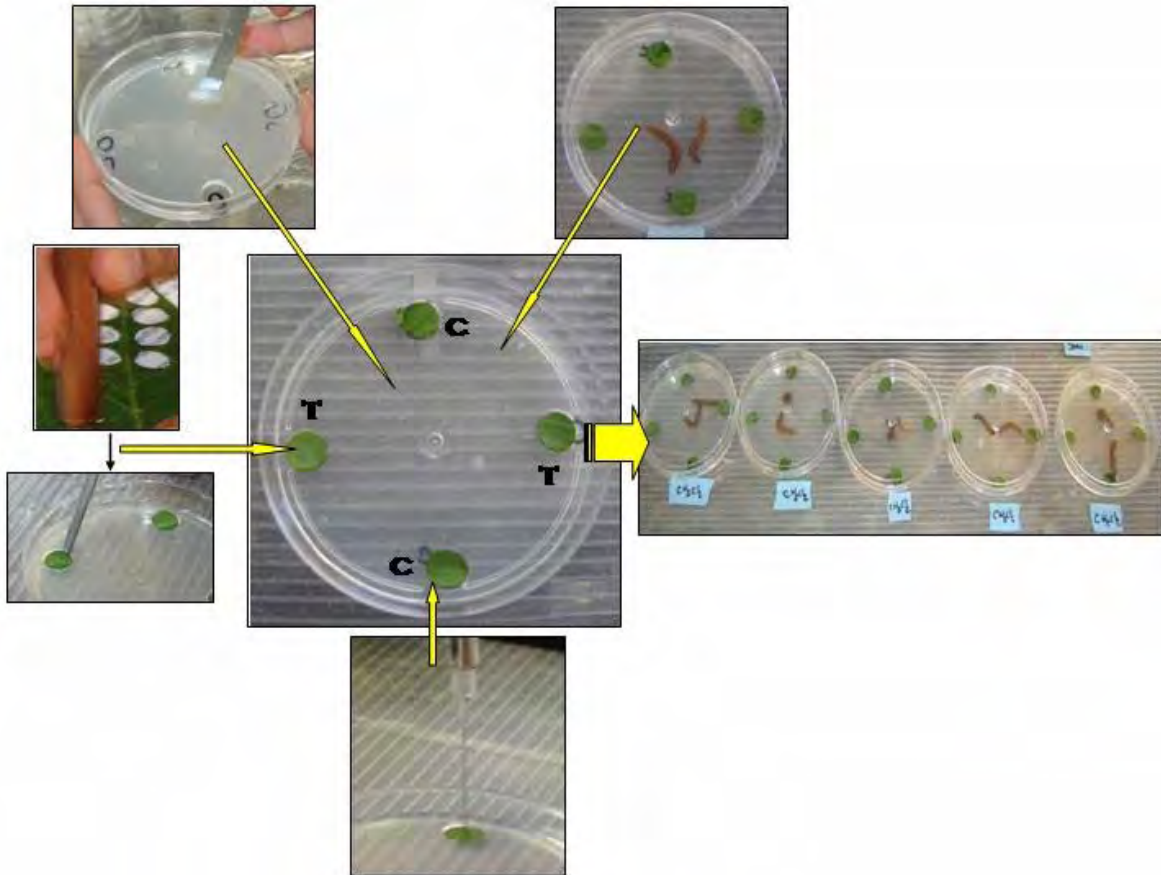
1.- En cajas petri de 9 cm de diámetro y 1.5 cm de alto, se coloca de manera uniforme agar al 3 % en la base de la caja, hasta cubrir a una altura de aproximadamente 9 mm.

2.- Una vez que el agar se ha solidificado, con la ayuda de un sacabocados se realizan 4 perforaciones en forma de cruz. (**Esquema 18**)

3.- Por otro lado, por medio del mismo sacabocados utilizado anteriormente, se cortan discos de hojas de espinaca comestible (*Spinaceae oleraceae*) y cada disco de hoja se coloca en las perforaciones del agar. (**Esquema 18**)

4.- Los discos de hojas que se encuentran de forma vertical en la caja se denominan hojas control y las hojas en posición horizontal son las hojas tratamiento. De ésta manera, se colocan en los discos tratamiento 10 µL del extracto ó compuesto a probar

a la concentración deseada, disuelto de preferencia en acetona, finalmente en las hojas control se depositan 10 μL de acetona. **(Esquema 18)**



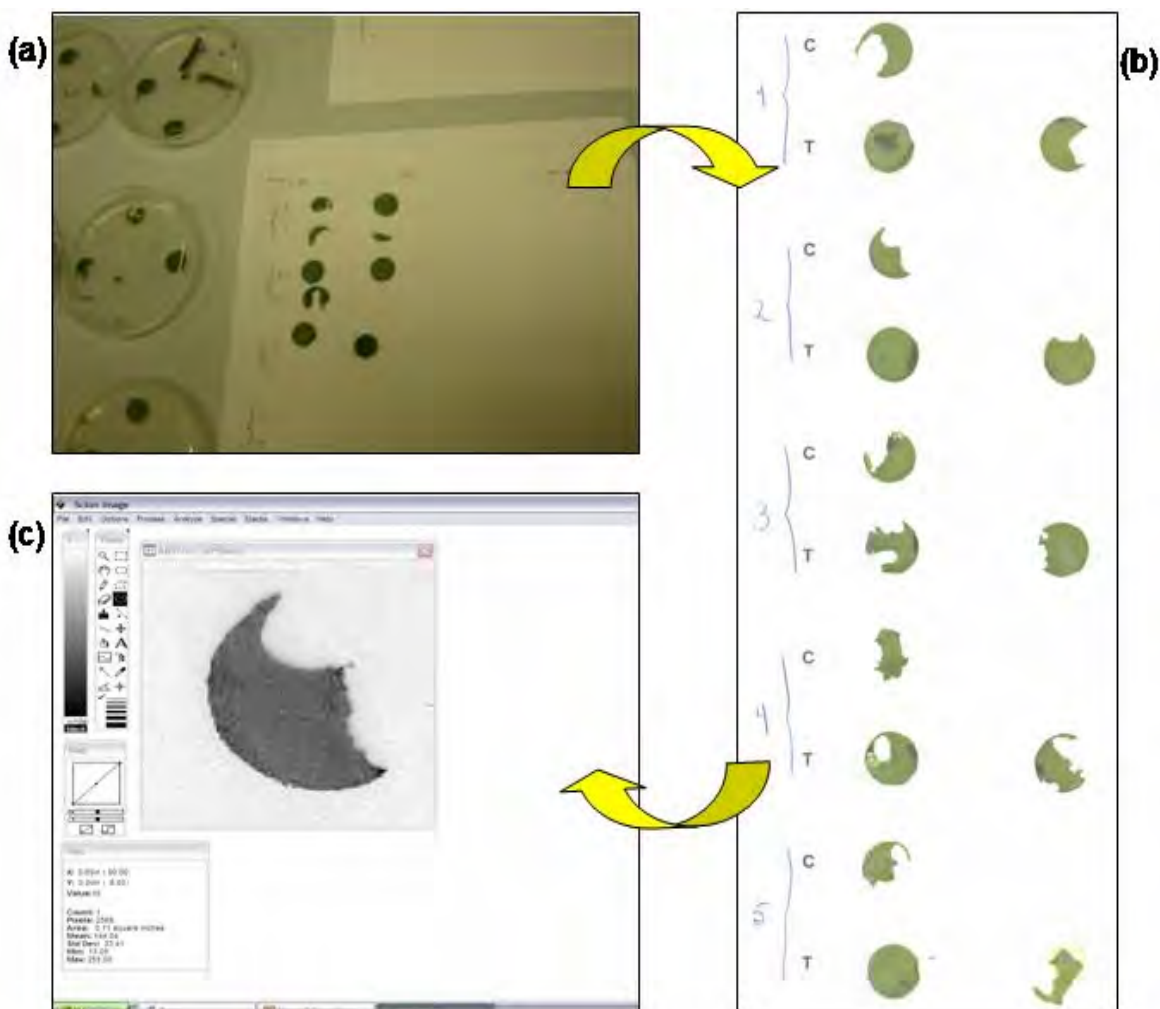
Esquema 18. Bioensayo de elección contra *S. frugiperda* para medir efectos antialimentarios

5.- Se deja evaporar el disolvente por un lapso de 30 min, finalizado éste tiempo, se colocan dos larvas de *Spodoptera frugiperda* de sexto estadio al centro de la caja y se da comienzo al bioensayo. **(Esquema 18)**

6.- Se realizan 5 cajas por compuesto o extracto a evaluar, dando como resultado, un total de 10 hojas control, 10 hojas tratamiento y 10 larvas de *S. frugiperda*. **(Esquema 18)**

7.- El bioensayo se da por terminado una vez que las larvas hayan consumido el 75% de los discos de hojas control ó el 75% de los discos de hojas tratamiento.

8.- Cuando el experimento ha finalizado, se reúnen los discos de hojas no consumidos de cada caja y se archivan con el fin de digitalizar cada uno, finalmente por medio de un programa computacional llamado Scion Image[®], se mide el área consumida de cada hoja.⁸⁹ (Esquema 19)



Esquema 19. Medición de los resultados para la interpretación de la actividad antialimentaria, a) colecta de los discos de hojas tratamiento y control consumidos b) y c) medición de área foliar de las hojas tratamiento y control consumidos.

9.- Una vez obtenidos estos datos, se mide el área consumida de los discos de hojas control y de las hojas tratamiento, para finalmente calcular el porcentaje de factor de inhibición (% FI), mediante la siguiente ecuación:⁹⁰

$$\% \text{ FI} = (1 - T/C) \times 100$$

Donde,

T = área total de hoja consumida de tratamientos.

C = área total de hoja consumida de controles

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

% FI > 25, se pueden considerar activos.

% FI < 25, se consideran no activos.

% FI negativos, se consideran fagoestimulantes.⁸⁸

3.3.5 Método estadístico.

Por medio de una prueba de *t-student* pareada se realizaron los análisis para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre los controles con respecto a los tratamientos.

Resultados y Discusión

4.1 Parte 1. Estudio y actividad antialimentaria de *Vitex mollis*.

4.1.1 Extracción.

4.1.2 Fraccionamiento.

4.1.3 Resultados de la actividad antialimentaria de los extractos y fracciones pertenecientes a *Vitex mollis*.

4.1.4 Elucidación estructural de los metabolitos secundarios correspondientes a las fracciones activas.

a) Ftalato de di-(2-metil)heptilo.

b) Ftalato de dibutilo.

4.2 Parte 2. Estudio y actividad antialimentaria del ácido anticopálico aislado de *Vitex hemsleyi*.

4.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del ácido anticopálico.

4.2.2 Aislamiento y elucidación estructural del ácido 3β -hidroxianticopálico.

4.2.3 Derivados semisintéticos.

a) Elucidación estructural del éster metílico del ácido anticopálico.

b) Elucidación estructural del éster metílico 8α , 17-epoxianticopálico.

c) Elucidación estructural del éster metílico 7α -hidroxianticopálico.

d) Elucidación estructural del ácido 8α ,17-epoxianticopálico.

e) Elucidación estructural del ácido 7α -hidroxianticopálico.

4.2.4 Resultados de la actividad antialimentaria del ácido anticopálico y sus derivados semisintéticos.

Parte 1. Estudio y actividad antialimentaria de *Vitex mollis*

4.1. Estudio y actividad antialimentaria de *V. mollis*

4.1.1 Extracción.

4.1.2 Fraccionamiento.

4.1.3 Resultados de la actividad antialimentaria de los extractos y fracciones pertenecientes a *V. mollis*.

4.1.4 Elucidación estructural de los metabolitos secundarios correspondientes a las fracciones activas.

a) Ftalato de di-(2-metil)heptilo.

b) Ftalato de dibutilo.

4.1.1 Extracción.

Las hojas secas y trituradas de *Vitex mollis* (644.1 g) se maceraron en metanol, obteniendo 100 g de extracto metanólico seco correspondiente al 15.5 % del material vegetal, éste extracto se sometió a una partición por medio de una mezcla de disolventes de hexano:agua y diclorometano:agua, el resultado fue la obtención de dos extractos, el hexánico con un peso de 13.1 g, y el de diclorometano, con un peso de 3.2 g los cuales corresponden al 13.1 % y 3.2 % del extracto metanólico seco, respectivamente.

La corteza seca y finamente cortada (418.3 g) se extrajo con acetona vía maceración, obteniendo finalmente 2.4 g de extracto seco (0.58% del material vegetal).

Las semillas secas y molidas (335 g) se maceraron con acetona, obteniendo un total de 4.7 g perteneciente al 1.41 % del material vegetal.

4.1.2 Fraccionamiento.

Al extracto hexánico se le realizó una cromatografía en columna con sílica gel como fase estacionaria y como eluyente se utilizó una mezcla de disolventes hexano:acetato de etilo en orden creciente de polaridad, obteniéndose 98 fracciones en total. Aquellas fracciones con un perfil cromatográfico similar en cromatografía en capa fina se reunieron obteniéndose finalmente 20 fracciones.

Mediante la misma metodología el extracto de diclorometano fue sometido a una cromatografía en columna, utilizando como eluyente mezclas de hexano:acetato de etilo en orden creciente de polaridad, obteniéndose 60 fracciones. Las fracciones con un perfil cromatográfico similar, en cromatografía de capa fina, se reunieron, para obtener finalmente 10 fracciones.

Al extracto correspondiente a las semillas, también se le realizó una cromatografía en columna por medio de una mezcla de hexano:acetona en orden creciente de polaridad como eluyente, obteniendo un total de 33 fracciones, y finalmente por medio del análisis de cromatografía en capa fina se redujo a 9 fracciones.

Finalmente el extracto de la corteza, al ser sometido a una cromatografía en columna empacada con sílice y eluída con una mezcla de hexano:acetona, en orden creciente de polaridad, dio como resultado la obtención de 170 fracciones, las cuales se resumieron a 9 por medio del monitoreo en cromatografía en capa fina.

En la **Tabla 14** se muestran el número de las fracciones obtenidas de cada extracto. Cada una de estas fracciones fueron evaluadas para determinar su posible actividad antialimentaria contra *S. frugiperda*.

Extracto	No. de fracciones	Eluyente
Hexánico (hojas)	20	Hexano:acetato de etilo
Diclorometánico (hojas)	10	Hexano:acetato de etilo
Acetónico (semilla)	9	Hexano:acetona
Acetónico (corteza)	9	Hexano:acetona

Tabla 14. Número de fracciones obtenidas por medio de cromatografía en columna de los extractos de las partes aéreas de *Vitex mollis*.

4.1.3 Resultados de la actividad antialimentaria de los extractos y fracciones pertenecientes a *Vitex mollis*.

Las pruebas de actividad antialimentaria se llevaron a cabo sobre el insecto prueba *Spodoptera frugiperda* en estado larval de sexto estadio de acuerdo al método descrito anteriormente en los métodos experimentales.⁸⁸ Discos de hoja de espinaca (*Spinaceae oleracea*) fueron usados en el bioensayo de elección y las áreas de los discos no consumidos fueron medidos de acuerdo a Escoubas y col.⁸⁹

La relación entre lo consumido por el insecto y lo que no consumió se mide mediante el Factor de Inhibición (%FI), el cual fue calculado para cada área de acuerdo a Bentley y col.⁹⁰

Con la finalidad de tener el número de individuos confiables y poder llevar a cabo un estudio estadístico apropiado, cada experimento, se realizó con tres réplicas cada una, siendo un total de 30 larvas por extracto a evaluar, 30 discos de hojas control y 30 discos de hojas tratamiento.

A los valores obtenidos a partir de las áreas de hojas consumidas, se les realizó un análisis estadístico con base en una prueba de *t-student* por medio del programa estadístico NCSS-PASS (NCSS-2004 y PASS-2005).

La actividad antialimentaria de los extractos hexánico y de diclorometano de hojas, así como de corteza y semillas de *Vitex mollis*, fueron evaluadas a una concentración de 1000 ppm.⁹¹ (**Tabla 15**)

Los resultados obtenidos señalaron que el extracto acetónico de la corteza de *Vitex mollis* fue el más activo, con un FI de 15.82%, lo cual indica una actividad moderada para este extracto. (**Tabla 15**)

Compuesto	Concentración ⁹¹	% FI
Extracto hexánico de las hojas de <i>Vitex mollis</i> .	1000 ppm	-10.04
Extracto de diclorometano de las hojas de <i>Vitex mollis</i> .	1000 ppm	0.910
Extracto acetónico de las semillas de <i>Vitex mollis</i> .	1000 ppm	-43.51
Extracto acetónico de la corteza de <i>Vitex mollis</i> .	1000 ppm	15.82

$$\% FI = [1 - (T / C)] \times 100$$

T = área de los discos de hojas tratamiento consumidas.

C = área de los discos de hojas control consumidas.

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

FI > 25, se pueden considerar activos.*

FI < 25, se consideran no activos.*

% FI negativos, se definen como fagoestimulantes.*

* Criterios de la técnica según González-Coloma y col.⁸⁸

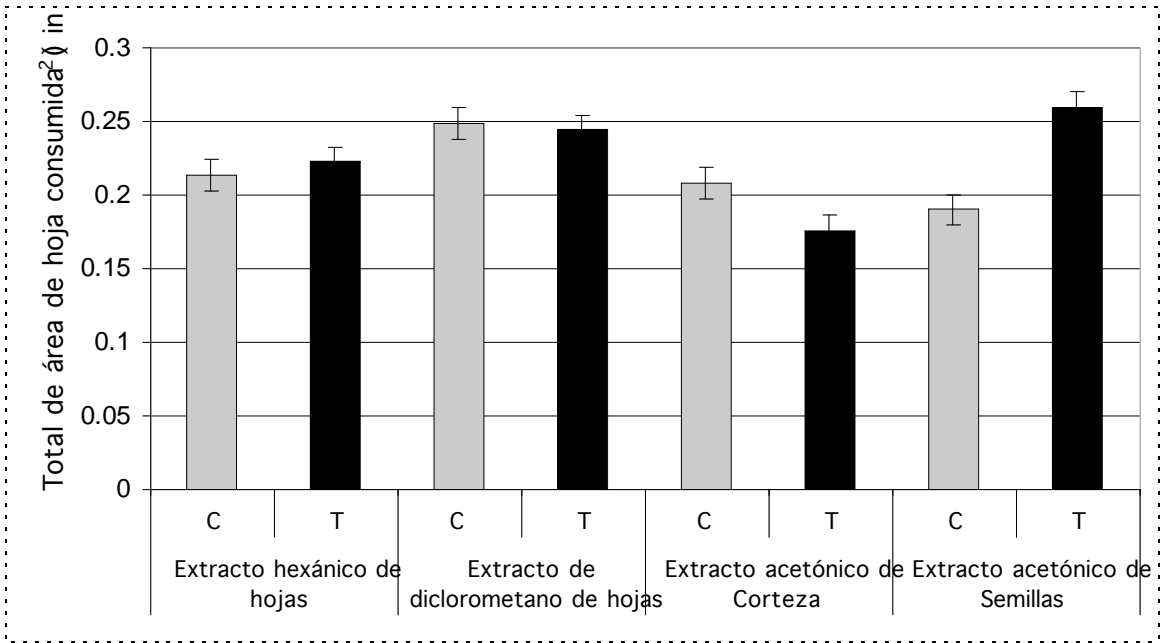
Tabla 15. Porcentajes de factor de inhibición de los extractos de las partes aéreas de *Vitex mollis*.

Por el contrario se puede observar que el valor de % FI del extracto hexánico de hojas y del extracto acetónico de las semillas son negativos, señalando un efecto fagoestimulante de estos extractos. Estos resultados indican que los extractos, en lugar de inhibir la ingesta de las hojas tratamiento por el insecto, lo inducen a un mayor consumo. Tomando en cuenta estos resultados ambos extractos se excluyeron para el estudio biodirigido en busca de metabolitos secundarios con actividad antialimentaria (**Tabla 15**).

Por otro lado, el extracto de diclorometano y acetónico de la corteza mostraron un FI de 0.910% y 15.82% respectivamente, éstos valores comparados con los descritos en la técnica⁷⁸ serían considerados no activos. Sin embargo es importante señalar diversos factores, tales como la concentración de cada metabolito secundario, así como, de los fenómenos de sinergismo que presentan los extractos. Por lo tanto es factible suponer que los valores de %FI de los metabolitos secundarios, aislados por métodos cromatográficos, serán diferentes de los extractos de donde se aislaron.

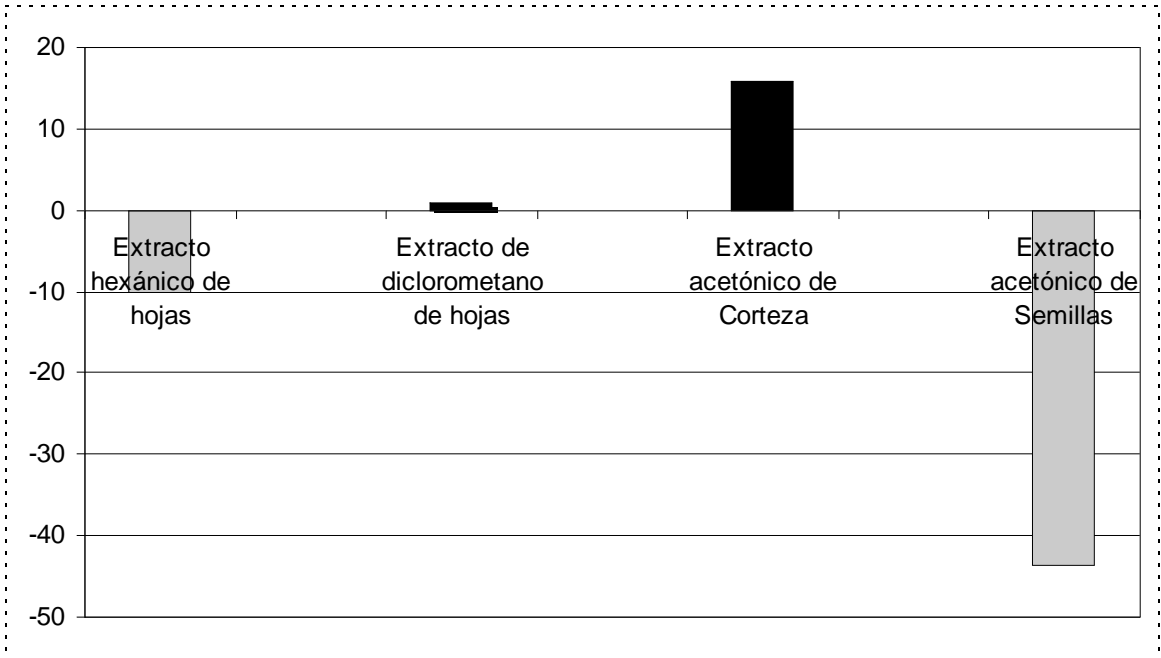
En la **Gráfica 1**, se muestra el área foliar consumida de hojas control y de hojas tratamiento. Se observa que en los extractos en donde podemos observar que en el caso del extracto acetónico de las semillas, así como en el hexánico de hojas, el consumo preferente por parte del insecto es de hojas tratamiento, por otro lado, el de corteza, muestra el consumo preferente de hojas control.

En la **Grafica 2**, se observa el grado de inhibición en la ingesta que causa el extracto acetónico de corteza, así mismo se puede observar claramente el comportamiento fagoestimulante del extracto de las semillas.



C = Control; T = Tratamiento.

Gráfica 1. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de los extractos de *Vitex mollis* por *Spodoptera frugiperda*.



Gráfica 2. Esquema del porcentaje de Factor de Inhibición de los extractos de *Vitex mollis*.

Con base en los resultados obtenidos, se observó que el extracto de diclorometano de hojas y el acetónico de corteza mostraron valores positivos de FI, por lo tanto, estos extractos se sometieron a la separación de sus fracciones por medio de cromatografía en columna y se realizó la evaluación de la actividad antialimentaria por medio de los bioensayos de elección.

Diez fracciones obtenidas del extracto de diclorometano de hojas y nueve fracciones del extracto acetónico de las semillas (**Tabla 14**) fueron evaluadas a concentraciones de 1000 ppm con tres réplicas cada una, los resultados obtenidos para las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas se muestran en la **Tabla 16** y para las fracciones del extracto acetónico de la corteza en la **Tabla 17**.

No. de Fracción del extracto de diclorometano de hojas de <i>V. mollis</i>	Concentración ⁹¹	% FI
Fracción 1	1000 ppm	3.04
Fracción 2	1000 ppm	14.94
Fracción 3	1000 ppm	21.17
Fracción 4	1000 ppm	26.02
Fracción 5	1000 ppm	17.62
Fracción 6	1000 ppm	-18.34
Fracción 7	1000 ppm	8.30
Fracción 8	1000 ppm	-17.69
Fracción 9	1000 ppm	11.85
Fracción 10	1000 ppm	12.14

$$\% FI = [1 - (T / C)] \times 100$$

T = área de hojas tratamiento consumidas.

C = área de hojas control consumidas.

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

FI > 25, se pueden considerar activos.*

FI < 25, se consideran no activos.*

% FI negativos, se definen como fagoestimulantes.*

* Criterios de la técnica según González-Coloma y col.⁸⁸

Tabla 16. Porcentajes de factor de inhibición de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de *Vitex mollis*.

No. de Fracción del extracto acetónico de corteza de <i>V. mollis</i> .	Concentración ⁹¹	% FI
Fracción 1	1000 ppm	13.28
Fracción 2	1000 ppm	1.68
Fracción 3	1000 ppm	4.36
Fracción 4	1000 ppm	17.22
Fracción 5	1000 ppm	9.38
Fracción 6	1000 ppm	1.49
Fracción 7	1000 ppm	41.75
Fracción 8	1000 ppm	16.49
Fracción 9	1000 ppm	-17.24

$$\% FI = [1 - (T / C)] \times 100$$

T = área de hojas tratamiento consumidas.

C = área de hojas control consumidas.

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

FI > 25, se pueden considerar activos.*

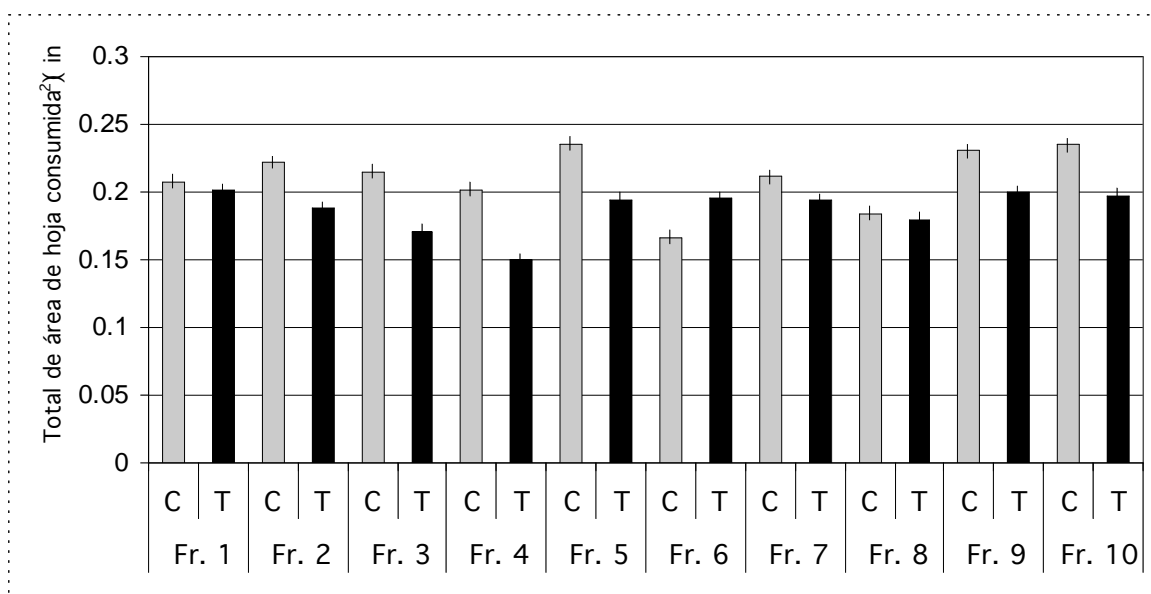
FI < 25, se consideran no activos.*

% FI negativos, se definen como fagoestimulantes.*

* Criterios de la técnica según González-Coloma y col.⁸⁸

Tabla 17. Porcentajes de factor de inhibición de las fracciones del extracto acetónico de la corteza de *Vitex mollis*.

Como podemos observar en la **Tabla 16**, los resultados muestran que las fracciones número 3 y 4 de las diez obtenidas del extracto de diclorometano de hojas de *V.mollis* poseen el valor más alto de porcentaje de factor de inhibición. En la **Gráfica 3**, se muestra el efecto antialimentario que muestran las fracciones 3 y 4, en donde el insecto, al entrar en contacto con ellas, prefiere el consumo de los discos de hojas control, comparado con los discos de hojas tratamiento.



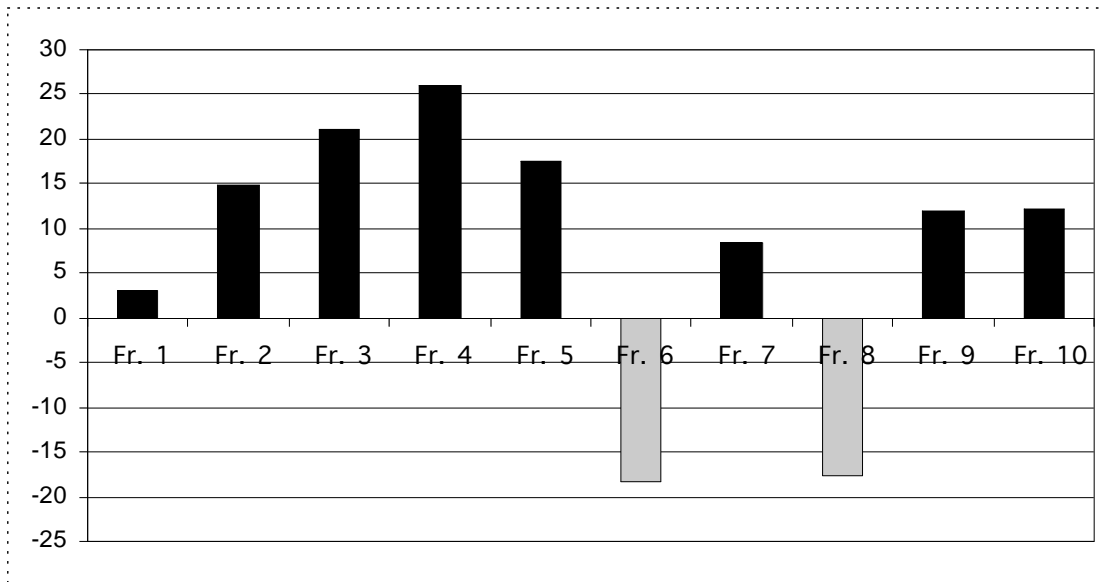
C = Control; T = Tratamiento

Gráfica 3. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de *Vitex mollis* por *Spodoptera frugiperda*.

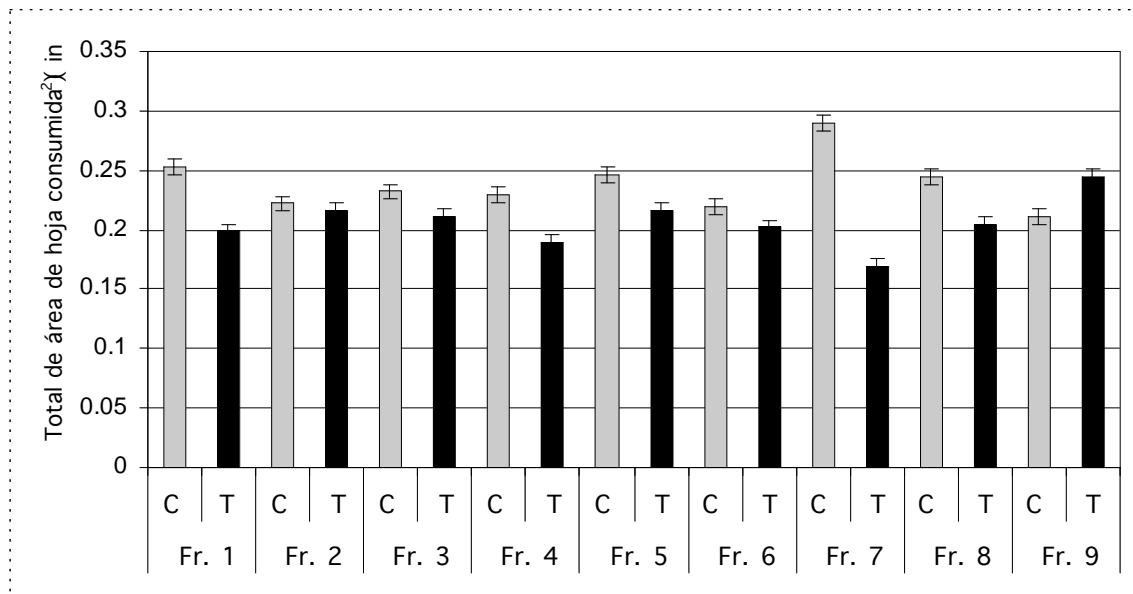
Del mismo modo, en la **Gráfica 4**, se muestra que el porcentaje de factor de inhibición que posee la fracción 4 seguida de la fracción 3 fue la más alta en comparación con las otras diez fracciones, debido a esto la fracción 4 se convirtió en inmediato en la fracción de interés correspondiente al extracto de diclorometano de hojas.

En la **Tabla 16** se muestra que de las nueve fracciones estudiadas correspondientes a la corteza, la fracción número 7 posee el porcentaje de factor de inhibición más alto (42%), este valor se puede considerar alto dentro del rango de

valores que se consideran activos. En la **Gráfica 5**, se observa el consumo preferente de los discos de hojas control a comparación de los tratamientos por parte del insecto prueba frente a la fracción 7.

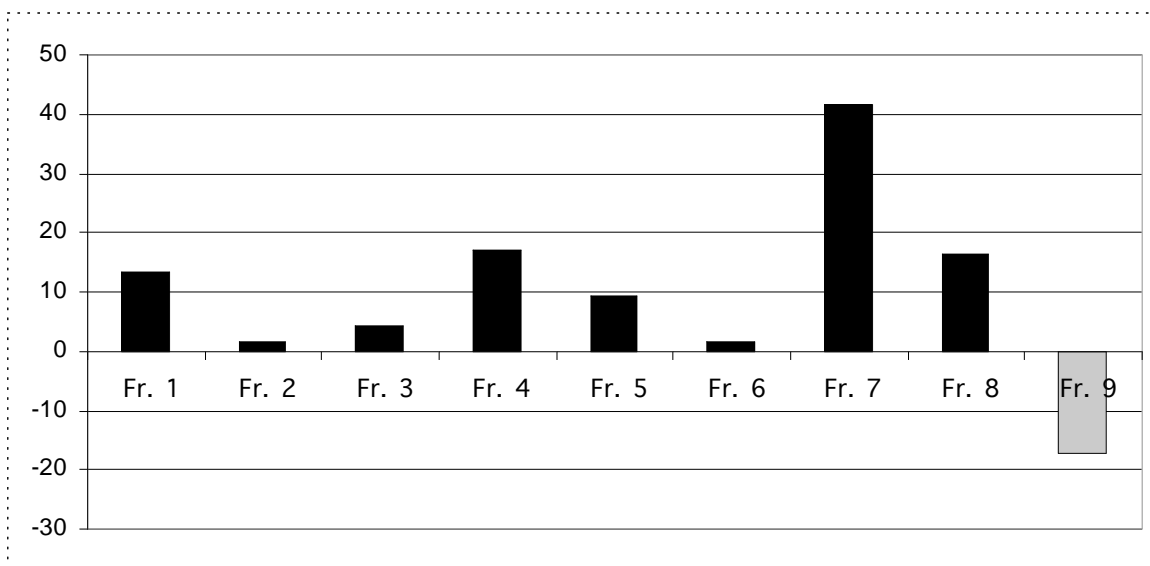


Gráfica 4. Esquema representativo del porcentaje de Factor de Inhibición de las fracciones del extracto de diclorometano de las hojas de *Vitex mollis*.



C = Control; T = Tratamiento

Gráfica 5. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de las fracciones del extracto acetónico de la corteza de *Vitex mollis* por *Spodoptera frugiperda*.

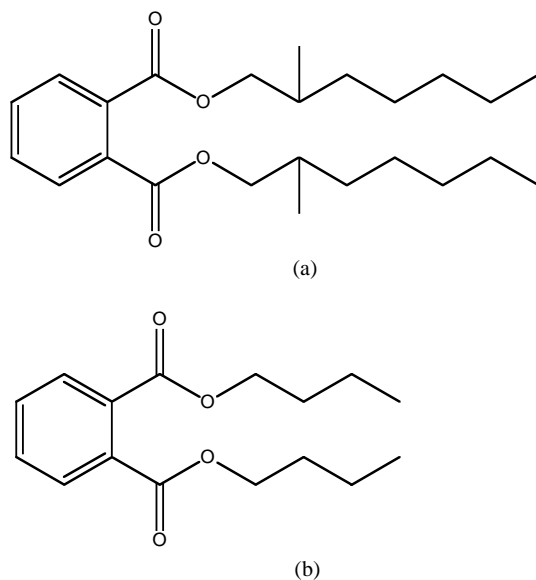


Gráfica 6. Esquema representativo del porcentaje de Factor de inhibición de las fracciones del extracto acetónico de la corteza de *Vitex mollis*.

En la **Gráfica 6**, se puede observar claramente el efecto antialimentario de la fracción 7 del extracto acetónico de corteza con relación a las fracciones restantes, por lo tanto, la fracción 7 se convierte en la fracción de interés correspondiente a éste extracto. Se realizó un análisis estadístico por medio de una t-student, con una $p=0.05$, mostrando que el consumo de controles respecto a tratamiento es estadísticamente significativa.

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antialimentaria, la fracción 4 del extracto de diclorometano de hojas y la fracción 7 del extracto acetónico de corteza fueron los más activos.

La separación de la fracción 4 del extracto de diclorometano y la fracción 7 del extracto acetónico de corteza dieron como resultado el aislamiento del ftalato de di-(2-metil)heptilo y el ftalato de dibutilo. La identidad de estos compuestos se estableció por el análisis de los datos espectroscópicos (IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EM. **(Esquema 20)**



Esquema 20. Estructura del ftalato de di-(2-metil)heptilo (a) y ftalato de dibutilo (b).

Cabe hacer notar, que estos resultados indican un correcto desempeño de los métodos experimentales propuestos, así como del buen seguimiento de un estudio biodirigido. No obstante, el origen de estos compuestos es incierto, debido a que es difícil aislar o detectar la presencia de éste tipo de compuestos de manera natural en las especies vegetales. Por el contrario, todo indicaría que la presencia de estos compuestos se deba a procesos de contaminación o a algunos residuos de los disolventes empleados para la elaboración de los extractos. Adicionalmente, estudios previos sobre el perfil químico del género *Vitex* no han mostrado la presencia de éste tipo de derivados.

No obstante lo anterior, estudios recientes han mostrado la presencia de derivados de ftalatos en otras especies de vegetales, tal es el caso de *Sambuca nigra* L., de la cual, se aisló ftalato de diisooctilo tanto de los aceites esenciales como del extracto de los frutos.⁹² Del mismo modo, este mismo compuesto se aisló de *Citrus sinensis* L y *Nigella*.⁹³ Salah El Din y col⁹⁴ al realizar un estudio fitoquímico del alga *Enteromorpha flexuosa* separó una serie de compuestos entre los que podemos mencionar al ácido hexadecanóico, β -sitosterol, 2-lanosterol, y ftalato de diisooctilo.

Zhuang⁹⁵ realizó el estudio de los compuestos volátiles existentes en *Camellia sinensis* L. por medio de cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS) y encontró que entre otros componentes existían una serie de ftalatos, tales como, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo, y ftalato de diisooctilo.

Jussi-Pekka⁹⁶ llevó a cabo la caracterización de la composición fenólica de la especie *Lythrum salicaria* por medio de técnicas como cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, (LC-MS) encontrando, ftalato de diisobutilo, ftalato de dibutilo, ftalato de diisooctilo, ftalato de diisoheptilo y ácido ftálico.

Existen otros datos bibliográficos los cuales atestiguan la presencia de derivados del grupo de los ftalatos en diferentes especies de vegetales,⁹⁷⁻¹⁰⁰ y en algunas algas.¹⁰¹⁻¹⁰² Tomando en cuenta estos resultados se ha propuesto que éstos compuestos probablemente sean de origen natural.

Con base a estos datos y para resolver el problema acerca del origen de los ftalatos dentro de los extractos de hojas y corteza de *Vitex mollis*, se realizó un estudio analítico por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución. (CLAR)

Los resultados de este análisis indicaron que el ftalato de di-(2-metil)heptilo y el ftalato de dibutilo se encuentran tanto en los extractos de corteza y hojas, así como, en los residuos de los disolventes empleados en la elaboración de los extractos, indicando que la presencia de éstos compuestos no son de origen biosintético en *Vitex mollis*, sino que, probablemente son contaminantes obtenidos del disolvente. (Tabla 18)

	Extracto metanólico de hojas	Extracto de diclorometano de hojas	Extracto acetónico de corteza	MeOH	Acetona
Ftalato de di-(2-metilheptilo)	12.555*	11.925*	11.845*	12.555*	12.543*
Ftalato de dibutilo	7.488	7.042*	7.012*	7.488*	7.560*

* Tiempo de retención en minutos.

Tabla 18. Análisis de CLAR de los extractos de *V. mollis* y de los disolventes empleados.

Los ftalatos se utilizan tanto para la elaboración de perfumes y cosméticos, como en productos plastificados tales como recubrimientos para autos, muebles, o prendas de vestir. Estos compuestos se utilizan principalmente en la industria de los plásticos, los cuales consumen alrededor del 87% de todos los ésteres ftálicos para producir PVC, el 13% restante se destina a la fabricación de barnices, dispersiones, celulosa, colorantes, caucho natural y sintético, lubricantes, repelentes de insectos, fijadores para perfumes, etc.

Existen una innumerable gama de este tipo de compuestos, desde sustituyentes alifáticos de cadena muy corta con cuatro carbonos, o cadenas largas de hasta 14 carbonos que pueden llegar a ser ramificadas. (**Tabla 19**)

Ftalato de butilbencilo	Ftalato de dibutilo	Ftalato de diisononilo
Ftalato de butilo	Ftalato de ciclohexilo	Ftalato de dimetilo
Ftalato de di-(2-etil)hexilo	Ftalato de dietilo	Ftalato de dioctilo
Ftalato de diisobutilo	Ftalato de diisodecilo	Ftalato de di-sec-octilo.

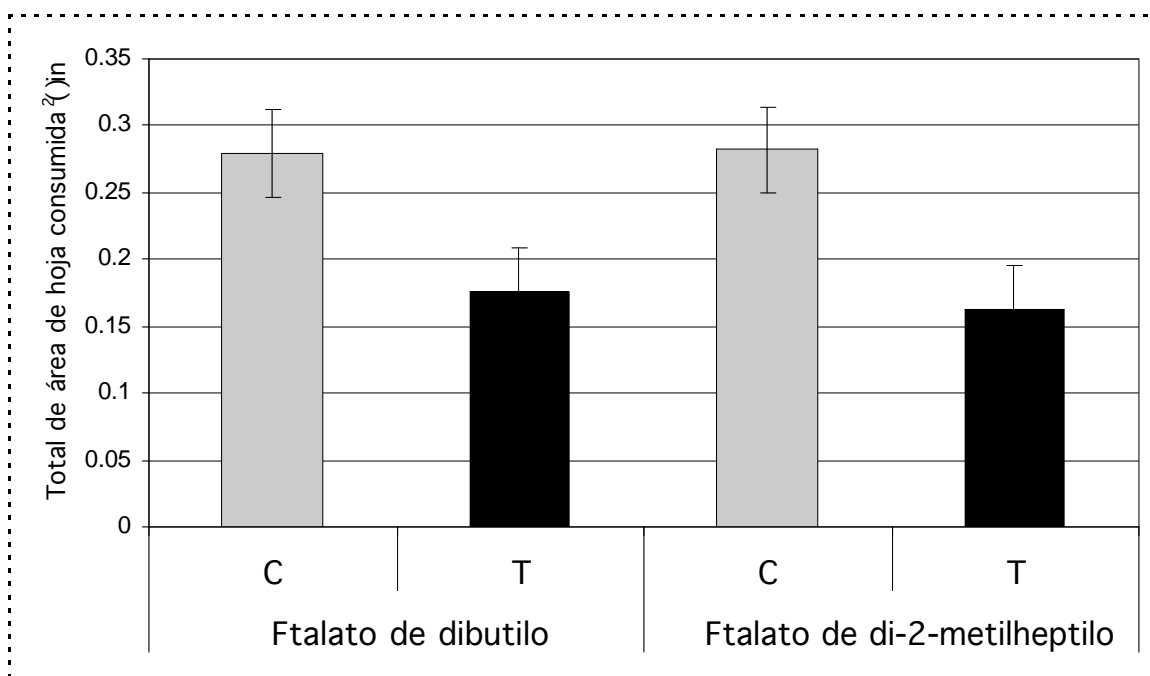
Tabla 19. Ejemplos de algunos compuestos del grupo de los ftalatos.

A pesar de que éste tipo de compuestos se han catalogado únicamente como contaminantes, cabe señalar que Shuguang Li y col.¹⁰³ realizaron un estudio sobre los efectos de diferentes ésteres del ácido ftálico (ftalatos), tales como, ftalato de dibutilo, ftalato de dioctilo y ftalato de diisooctilo en la longevidad de *drosophila malenogaster*, (mosca de la fruta) encontrando que al contacto tópico de la mosca con diferentes concentraciones de los ftalatos, resultaba en la notoria reducción de la vida útil del insecto.

Tomando en cuenta éste estudio, se decidió realizar el estudio individual de la actividad antialimentaria de los ftalatos aislados de las fracciones activas de las partes aéreas de *Vitex mollis* independientemente de su origen. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 20**. Ambos compuestos presentaron valores de FI

mayores de los 25%, resultados que indican que estos compuestos pueden ser considerados activos. El ftalato de di-(2-metil)heptilo, muestra una actividad mayor comparada con el ftalato de dibutilo, cabe señalar que el ftalato de di-(2-metil)heptilo fue el compuesto mayoritario en ambas fracciones.

El comportamiento que presentan las larvas de *Spodoptera frugiperda* frente a ambos compuestos, muestran un consumo preferente de los discos de hojas control, comparado con los discos tratamiento. (Gráfica 7).



Gráfica 7. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas del extracto de diclorometano de hojas y acetónico de corteza de *Vitex mollis*, por *Spodoptera frugiperda*.

No. de Fracción	Concentración ⁹¹	% FI
Ftalato de di-2-metilheptilo.	100 ppm	42.50
Ftalato de dibutilo.	100 ppm	37.94

$$\% FI = [1 - (T / C)] X 100$$

T = área de hojas tratamiento consumidas.

C = área de hojas control consumidas.

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

FI > 25, se pueden considerar activos.*

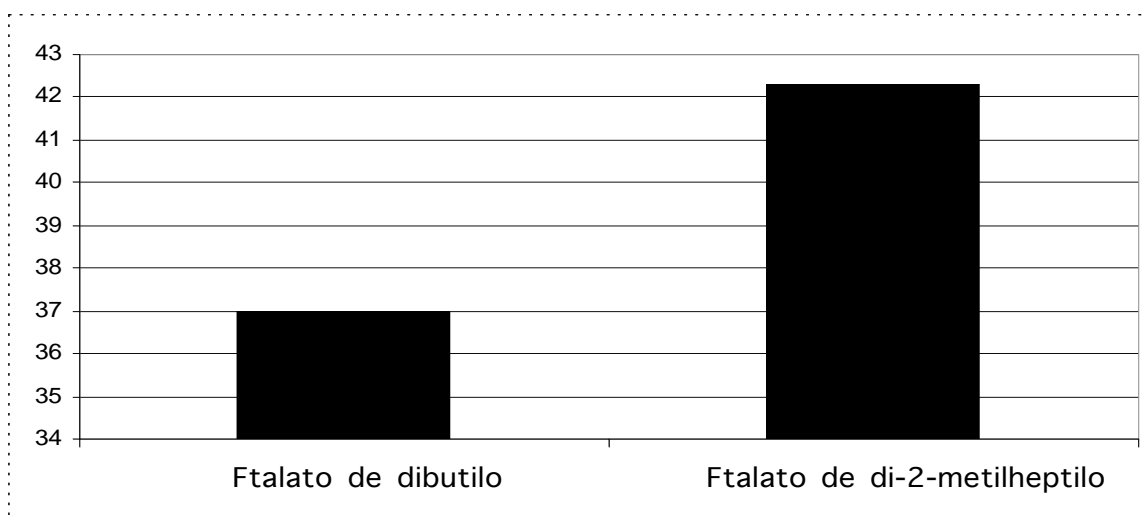
FI < 25, se consideran no activos.*

% FI negativos, se definen como fagoestimulantes.*

* Criterios de la técnica según González-Coloma y col.⁸⁸

Tabla 20. Porcentajes de factor de Inhibición de los compuestos aislados de las fracciones activas del extracto de diclorometano de hojas y acetónico de corteza de *Vitex mollis*.

La **Gráfica 8** nos muestra que el porcentaje de factor de inhibición que posee el ftalato de di-2-metilheptilo es más alto en comparación con el ftalato de dibutilo.



Gráfica 8. Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas del extracto de diclorometano de hojas y acetónico de corteza de *Vitex mollis*.

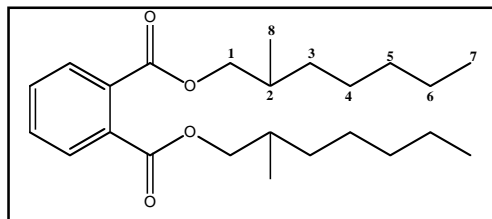
Finalmente se realizó el análisis estadístico adecuado por medio de una prueba de *t-student* pareada, con una $p=0.05$, mostrando que ambos compuestos son estadísticamente significativos.

Es de sumo interés mencionar, que nuestros resultados, indican inequívocamente que estos ftalatos tienen actividad antialimentaria contra *S. frugiperda*. Por consiguiente es de esperar que altere el ciclo de vida normal de este insecto. Aún más, de manera general, existe la posibilidad, dado la naturaleza contaminante de estos compuestos y su localización en grandes cantidades en la naturaleza, que también modifique el ciclo vital de muchos otros insectos, lo cual ocasionaría un daño ecológico irreversible.

4.1.4. Elucidación estructural de los metabolitos secundarios correspondientes a las fracciones activas.

a) Elucidación estructural del ftalato de di-(2-metil)heptilo.

El ftalato de di-(2-metil)heptilo es un aceite incoloro del cual se obtuvieron 2.2 mg del extracto acetónico de la corteza y 1.8 mg del extracto de diclorometano de las hojas. (**Esquema 21**)



Esquema 21. Ftalato de di-(2-metil)heptilo.

El espectro de RMN-¹H muestra dos señales doble de dobles a 7.71 y 7.52 ppm ($J= 5.7, 3.3$ Hz) pertenecientes al anillo aromático di sustituido en las posiciones 1, 2. En 4.22 ppm se encuentra un doble de dobles ($J= 6.3, 3.6$ Hz) que corresponde al metileno de la posición 1 de la cadena alifática. Este se encuentra desplazado a campos bajos debido a los fenómenos de desprotección que le causa el grupo éster sustituido a un anillo aromático. (**Tabla 21**)

H	δ (ppm)	Multiplidad	J (Hz)
H _a -aromático	7.71	dd	5.7, 3.3
H _b -aromático	7.52	dd	5.7, 3.3
Metileno-1	4.22	dd	6.3, 3.6
Metileno-3 al 6	1.36	m	-
Metilos 8 y 7	0.92	-	-
Metino-2	1.68	hept	-

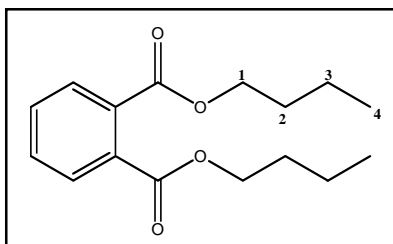
CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 21. Asignación de señales de RMN-¹H para el ftalato de di-(2-metil)heptilo.

En el espectro de masas, se observa un ion molecular M⁺ de 390, que corresponde a una formula molecular C₂₄H₃₈O₄. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 390 (1.0), 279 (18.5), 167 (36.5), 149 (100), 113 (10.0), 71 (16.0), 57 (23.5).

b) Elucidación estructural del ftalato de dibutilo.

El ftalato de dibutilo es un aceite incoloro, del cual se obtuvo 3.3 mg pertenecientes al extracto acetónico de la corteza y 4.2 mg del extracto de diclorometano de las hojas. **(Esquema 22)**



Esquema 22. Ftalato de dibutilo.

El espectro de RMN-¹H muestra dos señales doble de dobles ($J = 6, 3$ Hz) correspondiente a los protones del anillo aromático, el metileno de la posición 1 de la cadena alifática se encuentra en 4.30 ppm a causa del fenómeno de desprotección que causa el oxígeno del éster. **(Tabla 22)**

<i>H</i>	δ (ppm)	<i>Multiplicidad</i>	<i>J</i> (Hz)
H _a -aromático	7.71	<i>dd</i>	6.0, 3.0
H _b -aromático	7.53	<i>dd</i>	6.0, 3.0
Metileno-1	4.30	<i>t</i>	-
Metileno-2	1.72	<i>q</i>	-
Metileno-3	1.44	<i>q</i>	-
Metilo-4	0.96	<i>t</i>	-

CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 22. Asignación de señales de RMN-¹H para el ftalato de dibutilo.

En el espectro de masas, se observa un ion molecular M⁺ de 278, correspondiente a una fórmula molecular C₁₆H₂₂O₄. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 278 (5.0), 223 (23.0), 205 (21.0), 71 (7.0), 57 (18.0), 41 (15.5), 29 (13.0).

Parte 2. Estudio y actividad antialimentaria del ácido anticopálico aislado de Vitex hemsleyi

4.2 *Vitex hemsleyi*.

4.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del ácido anticopálico.

4.2.2 Aislamiento y elucidación estructural del ácido 3 β -hidroxianticopálico.

4.2.3 Derivados semisintéticos.

a) Ester metílico del ácido anticopálico.

b) Ester metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

c) Ester metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

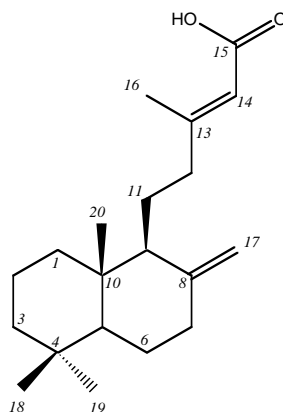
d) Ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

e) Ácido 7 α -hidroxianticopálico.

4.2.4 Resultados de la actividad antialimentaria del ácido anticopálico y los derivados semisintéticos.

4.2.1 Aislamiento y elucidación estructural del ácido anticopálico.

De la columna cromatográfica correspondiente al extracto hexánico (**Esquema 8**) de las hojas de *Vitex hemsleyi*, dio como resultado la obtención de 3 g de ácido anticopálico (ácido (E)-labda-8(17)-13-dien-15-oico) (0.48% del peso total de hojas, 3.9% del peso total del extracto metanólico, 9% del peso total del extracto hexánico) el cual se caracteriza por ser un aceite de color amarillo claro. (**Esquema 23**)



Esquema 23. Ácido anticopálico.

En el espectro de RMN-¹H, (**Espectro 1**) se observan a 4.85 y 4.48 ppm los protones gem vinílicos H-17 y 17'. En 5.67 ppm se observa el protón vinílico en H-14 que pertenece al sistema del carbonilo α,β -insaturado. (**Tabla 23**)

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-14	5.67	c	1.2
H-17	4.85	br s	-
H-17'	4.48	br s	-
Me-16	2.17	d	1.2
Me-18	0.80	s	-
Me-19	0.87	s	-
Me-20	0.68	s	-

CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 23. Asignación de señales de RMN-¹H del ácido anticopálico.

En el espectro de IR (Película) se observa una banda a 3072 cm^{-1} que sumada a la de 1687 cm^{-1} indican la presencia de un ácido carboxílico. En 1636 cm^{-1} se localiza la banda correspondiente a dobles ligaduras y una banda complementaria en 886 cm^{-1} el cual sugiere un doble enlace perteneciente a un metileno exocíclico.

En el espectro de masas se observa un ion molecular a M^+ 304 que corresponde a una fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_2$ con 5 insaturaciones. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 304 (27.5), 289 (78.5), 205 (45.0), 177 (42.7), 137 (100), 123 (63.0), 109 (62.0). La rotación óptica obtenida de éste compuesto es $[\alpha]_D = +44.3^\circ$ (c=10, $CHCl_3$).

En el espectro de RMN- ^{13}C (**Espectro 2**) observamos a 171.9 ppm la señal que corresponde al carbonilo localizado en el C-15 y en 114.7 y 106.3 ppm se encuentran los carbonos vinílicos C-14 y C-17 respectivamente, el carbono cuaternario C-13 se encuentra a 164.1 ppm y el C-14 a 114.7 ppm. (**Tabla 24**)

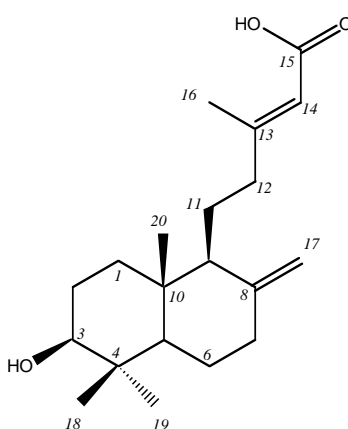
C	δ (ppm)	C	δ (ppm)
C-1	39.05	C-11	21.49
C-2	19.35	C-12	40.08
C-3	42.09	C-13	164.15
C-4	33.58	C-14	114.73
C-5	55.49	C-15	171.90
C-6	24.42	C-16	19.22
C-7	38.27	C-17	106.35
C-8	148.28	C-18	21.70
C-9	56.13	C-19	33.58
C-10	39.70	C-20	14.46

$CDCl_3$, TMS, 300 MHz.

Tabla 24. Asignación de señales de RMN- ^{13}C del ácido anticopálico.

4.2.2 Aislamiento y elucidación estructural del ácido 3β-hidroxianticopálico.

La columna cromatográfica correspondiente al extracto diclorometánico de las hojas de *V. hemsleyi*, dio como resultado la obtención de 638.6 mg (0.1% del peso total de hojas, 0.83% del peso total del extracto metanólico, 26.6% del peso total del extracto diclorometánico) de un sólido amorfo de color blanco con punto de fusión de 140 °C e identificado como el ácido 3β-hidroxianticopálico (ácido 3β-hidroxi-8(17), E-13-labdadien-15-oico). (**Esquema 24**)



Esquema 24. Ácido 3β-hidroxianticopálico.

El espectro de IR (nujol), muestra una banda característica en 3353 cm⁻¹ para un grupo hidroxilo y en 3072 cm⁻¹ la de un ácido carboxílico cuyo grupo carbonilo se observa en 1693 cm⁻¹. En 1651 cm⁻¹ observamos la banda característica para dobles ligaduras y una banda complementaria en 894 cm⁻¹ para un doble enlace exocíclico.

El espectro de masas muestra un ion molecular a M⁺ de 320 correspondiente a una fórmula molecular C₂₀H₃₂O₃, calculando 5 insaturaciones. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 320 (12.5), 302 (40.1), 287 (40.2), 203 (37.1), 175 (21.0), 135 (100), 107 (40.2).

En el espectro de RMN-¹H (**Espectro 3**) podemos observar a 2.14 ppm un doblete perteneciente a los protones del metilo de la posición 16, su multiplicidad se debe al acoplamiento con el H-14. En 4.85 y 4.51 ppm se observan dos singuletes anchos, que corresponden a los protones gem vinílicos H-17 y H-17'. (**Tabla 25**)

En 3.23 ppm encontramos un doble de dobles asignado al protón del carbono terciario de la posición 3 donde se encuentra un grupo OH. La orientación α -axial del protón H-3, se determinó por los valores del ángulo diedro, el cual fue deducido por sus constantes de acoplamiento, ($J= 11.43, 4.71$ Hz), de acuerdo con la regla de Karplus. Por consiguiente el grupo hidroxilo posee una orientación β ecuatorial.

<i>H</i>	δ (ppm)	Multiplicidad	<i>J</i> (Hz)
H-3	3.23	<i>dd</i>	11.43, 4.71
H-17	4.85	<i>br s</i>	-
H-17'	4.51	<i>br s</i>	-
H-14	5.64	<i>c</i>	1.17
Me-16	2.14	<i>d</i>	1.17
Me-18	0.76	<i>s</i>	-
Me-19	0.99	<i>s</i>	-
Me-20	0.68	<i>s</i>	-

CDCl₃/DMSO-d₆, TMS, 300 MHz.

Tabla 25. Asignación de señales de RMN-¹H para el ácido 3 β -hidroxianticopálico.

El espectro de RMN-¹³C (**Espectro 4**) se observa a 168.6, 159.9 y 147.5 ppm las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-15, C-13 y C-8 respectivamente. A 78.1 ppm se encuentra el C-3, que por su desplazamiento confirma ser un carbono unido a un átomo de oxígeno. (**Tabla 26**)

La rotación óptica que presenta dicho compuesto es $[\alpha]_D = +29.4^\circ$ ($c=0.85$, CH₃OH).

C	δ (ppm)	C	δ (ppm)
C-1	37.85	C-11	21.34
C-2	27.61	C-12	39.80
C-3	78.10	C-13	159.96
C-4	39.40	C-14	115.60
C-5	54.30	C-15	168.58
C-6	23.72	C-16	18.51
C-7	38.86	C-17	106.39
C-8	147.52	C-18	15.24
C-9	55.52	C-19	28.07
C-10	39.40	C-20	14.20

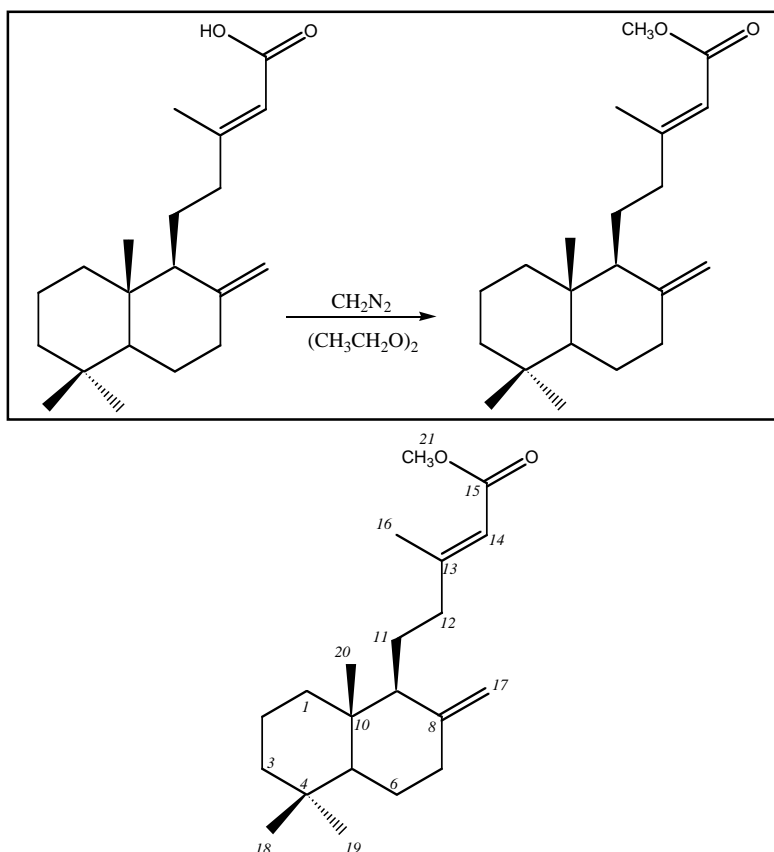
CDCl₃/DMSO-d₆, TMS, 300 MHz

Tabla 26. Asignación de señales de RMN-¹³C para el ácido 3β-hidroxiánticopálico.

4.2.3 Derivados.

a) Elucidación estructural del éster metílico del ácido anticopálico.

La reacción de esterificación del ácido anticopálico, utilizando diazometano⁸⁴ como resultado un aceite incoloro, con un rendimiento del 78%. (Esquema 25)



Esquema 25. Ester metílico del ácido anticopálico.

El espectro de IR (Película) muestra a 1720 cm^{-1} la banda perteneciente al carbonilo de éster, en 1647 cm^{-1} encontramos la presencia de un doble enlace trisustituido y a 888 cm^{-1} se encuentra una banda complementaria correspondiente al doble enlace exocíclico.

El espectro de masas nos muestra un ion molecular M^+ de 318 correspondiente a una fórmula molecular $C_{21}H_{34}O_2$. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 319 (58.0), 303 (93.1), 287 (33.5), 205 (55.5), 137 (100), 114 (95.0), 95 (77.2).

En el espectro de RMN-¹H (**Espectro 5**) se observa a 3.69 ppm un singulete característico perteneciente al metilo del éster. Las demás señales son muy parecidas a las del ácido anticopálico. (**Tabla 27**)

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-17	4.49	br s	-
H-17'	4.84	br s	-
H-14	5.65	c	1.2
OMe-15	3.69	s	-
Me-16	2.17	d	1.2
Me-18	0.80	s	-
Me-19	0.87	s	-
Me-20	0.68	s	-

CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 27. Asignación de señales de RMN-¹H del éster metílico del ácido anticopálico.

El espectro de RMN-¹³C (**Espectro 6**) muestra a 50.6 ppm la señal que corresponde al metilo del éster, en 167.3 ppm se encuentra la señal del carbonilo de la posición C-15, a 114.9 ppm encontramos al carbono vinílico α,β -insaturado, el cual explica la razón por la cual se encuentra en un desplazamiento a campo bajo, en 106.3 ppm encontramos el metileno exocíclico C-17. (**Tabla 28**) Por otro lado, este compuesto presenta un $[\alpha]_D^{20} + 43.52^\circ$ (c= 9.65, CHCl₃).

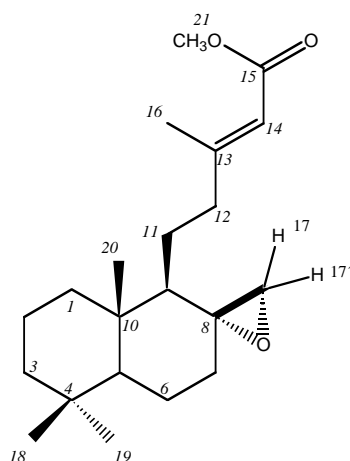
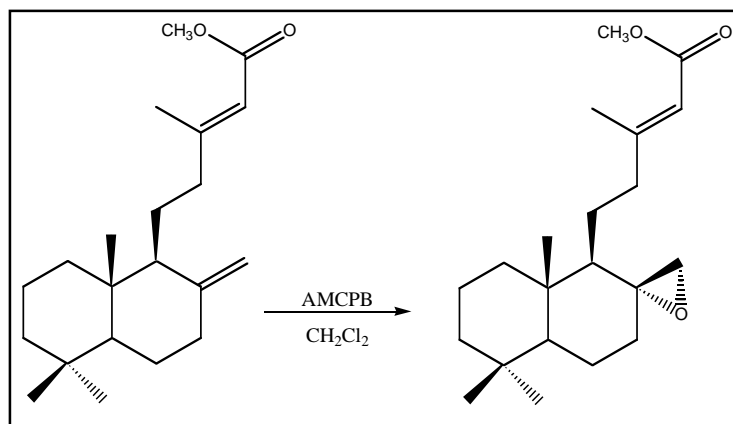
C	δ (ppm)	C	δ (ppm)
C-1	39.05	C-12	39.80
C-2	19.36	C-13	161.16
C-3	42.12	C-14	114.88
C-4	33.58	C-15	167.31
C-5	55.50	C-16	19.36
C-6	24.43	C-17	106.31
C-7	38.29	C-18	21.53
C-8	148.33	C-19	33.58
C-9	56.17	C-20	14.44
C-10	39.05	C-21	51.00
C-11	21.53		

CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 28. Asignación de señales de RMN-¹³C para el éster metílico del ácido anticopálico.

b) Elucidación estructural del éster metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

La reacción de epoxidación utilizando AMCPB sobre el doble enlace exocíclico de la posición 8-17 del éster metílico del ácido anticopálico, dio como resultado un aceite incoloro con un rendimiento del 85.7 %. (Esquema 26)



Esquema 26. Éster metílico del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

El espectro de IR (Película) muestra una banda a 1719 cm⁻¹ que corresponde al carbonilo de éster, en 1647 cm⁻¹ se observa una banda que pertenece al doble enlace α,β -insaturado, en 1224 cm⁻¹ se indica la presencia de un éter cíclico.

El espectro de masas nos muestra un ion molecular M⁺ de 334 el cual corresponde a una fórmula molecular C₂₁H₃₄O₃, con 5 insaturaciones. EM (I.E), m/z

(Rel.Int) 334 (5.0) 289 (15.0), 205 (27.0), 177 (53.5), 109 (70.0), 95 (98.0), 69 (100), 41 (86.5), 28 (59.0).

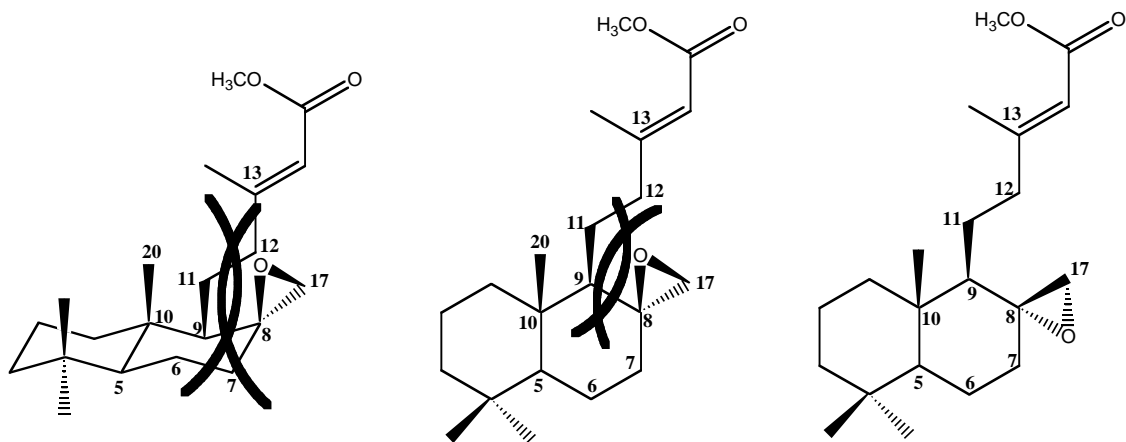
El espectro de RMN-¹H (**Espectro 7**) muestra un singulete a 3.68 ppm que corresponde al metilo del éster, en 2.50 ppm se encuentra una señal doble ($J= 4.11$ Hz) que corresponde a H-17' y en 2.74 ppm una señal doble de dobles ($J= 4.11, 1.7$ Hz) que pertenece al H-17, en 5.65 ppm se encuentra un cuarteto ($J= 1.17$ Hz) para el H-14. (**Tabla 29**)

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-17	2.50	d	4.11
H-17'	2.74	dd	4.11, 1.7
H-14	5.65	c	1.17
OMe-15	3.68	s	-
Me-16	2.12	d	1.17
Me-18	0.82	s	-
Me-19	0.89	s	-
Me-20	0.80	s	-

CDCl₃, TMS, 300 MHz

Tabla 29. Asignación de señales de RMN-¹H para el éster metílico 8 α ,17-epoxianticopálico.

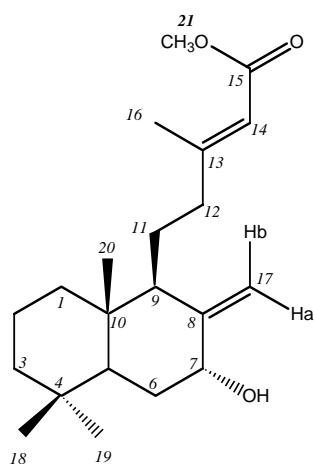
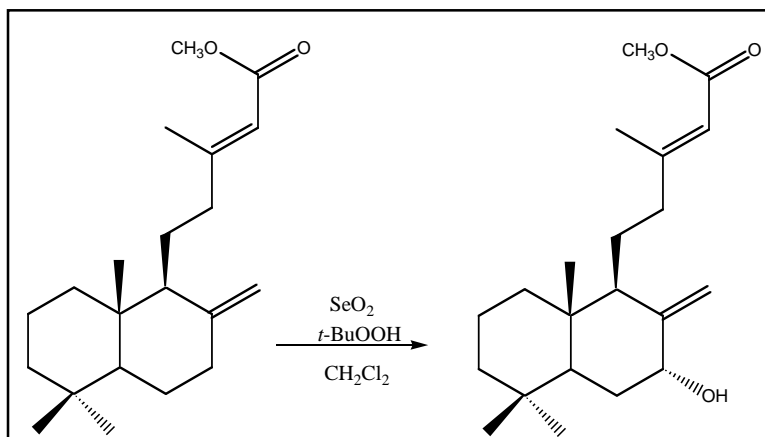
Dado que las constantes de acoplamiento de las señales que corresponden a los hidrógenos H-17 ($J= 4.11$ Hz) y H-17' ($J=4.11, 1.7$ Hz), solo indican la relación geminal entre ellas pero no indican la orientación del átomo de oxígeno, la estereoquímica del epóxido en la posición 17 se propone con una orientación α , de acuerdo con el siguiente razonamiento. La reacción de oxidación es estereoespecífica, y de adición *syn* del oxígeno al doble enlace, por lo tanto, tomando en cuenta el tipo de mecanismo de reacción y las interacciones estéricas de los carbonos 8, 9 y 10 de la molécula, el reactivo de epoxidación atacará al doble enlace por la cara con menor impedimento estérico, dando como resultado la adición del átomo de oxígeno con una orientación α . (**Esquema 27**)



Esquema 27. Posibles interacciones estéricas observadas en el éster metílico del ácido 8 α ,17-epoxiantipálico.

c) Elucidación estructural del éster metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

La oxidación del éster metílico del ácido anticopálico, dio como resultado un aceite incoloro que corresponde a la oxidación de la molécula en la posición 7, con un rendimiento del 54.9 % (**Esquema 28**)



Esquema 28. Ester metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

En el espectro de IR se observa una banda a 1719 cm⁻¹ que corresponde al carbonilo del éster, en 1647 cm⁻¹ se muestra la presencia de un doble enlace trisustituido, así como en 862 cm⁻¹ la banda complementaria a un doble enlace exocíclico, en 3471 cm⁻¹ se observa una banda ancha característica de un OH.

En el espectro de masas se observa un ion molecular M^+ de 334 correspondiente a una fórmula molecular $C_{21}H_{34}O_3$. EM (I.E), m/z (Rel. Int) 334 (5.0), 317 (15.0), 221 (29.0), 203 (40.0), 123 (100), 114 (76.5), 82 (83.0), 55 (49.0), 41 (38.5).

En el espectro de RMN- 1H (**Espectro 8**) se observa a 3.68 ppm la señal del metilo del éster, en 4.62 y 5.07 ppm se encuentran los hidrógenos H-17_b y H-17_a respectivamente, por otro lado, en 4.38 ppm se encuentra el hidrógeno de la posición H-7 el cual está localizado a campos bajos, debido a la desprotección que le ocasiona el OH. Las constantes de acoplamiento de éste protón, ($J= 3.0, 5.5$ Hz) fueron utilizadas para el cálculo del ángulo diedro, siguiendo las relaciones de Karplus, lo cual indicó una posición α -axial del OH. (**Tabla 30**) La estereoquímica de la posición del OH en el C-7 se complementó con los espectros de RMN-2D.

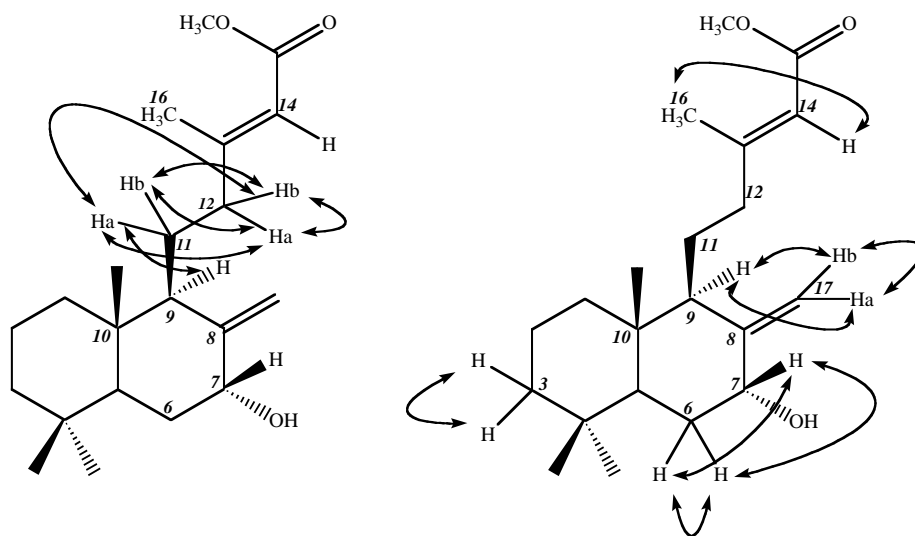
H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-7	4.38	<i>ddd</i>	3.0, 5.5
H-9	2.10	<i>br dd</i>	1.5, 11.0
H-14	5.65	<i>c</i>	1.0
H-17a	5.07	<i>br t</i>	-
H-17b	4.62	<i>br t</i>	-
Me-16	2.16	<i>d</i>	1.5
Me-18	0.80	<i>s</i>	-
Me-19	0.88	<i>s</i>	-
Me-20	0.66	<i>s</i>	-
OMe-21	3.68	<i>s</i>	-

CDCl₃, TMS, 500 MHz

Tabla 30. Asignación de señales de RMN- 1H para el éster metílico del ácido 7α -hidroxianticopálico.

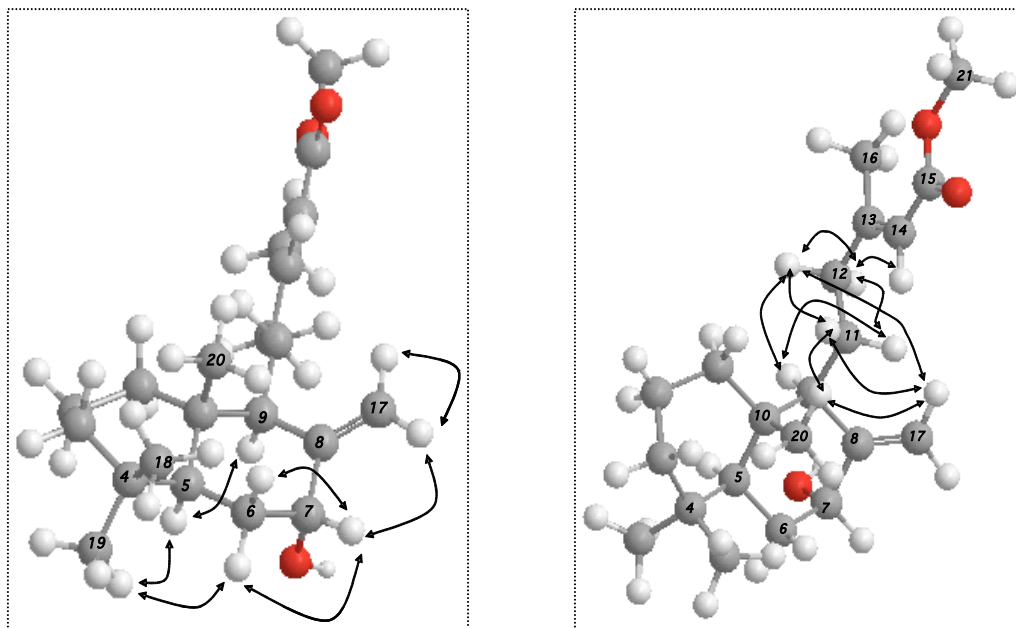
El espectro COSY (**Espectro 9**) muestra la correlación entre el hidrógeno de la posición H-14 y el metilo 16, esto explica la multiplicidad que presentan estos hidrógenos, pues el metilo de la posición 16 muestra una señal doble que indica el acoplamiento con el H-14 y éste se presenta como un cuadruplete, el cual apunta a un acoplamiento con el metilo. El hidrógeno H-17_a correlaciona con el hidrógeno H-17_b y con el hidrógeno de la posición H-9. Del mismo modo H-17_b muestra una correlación

con el H-7 β -ecuatorial, finalmente el hidrógeno β de la posición H-7 se encuentra acoplado con los hidrógenos de la posición H-6 localizados en 1.8 y 1.4 ppm. (Esquema 29)



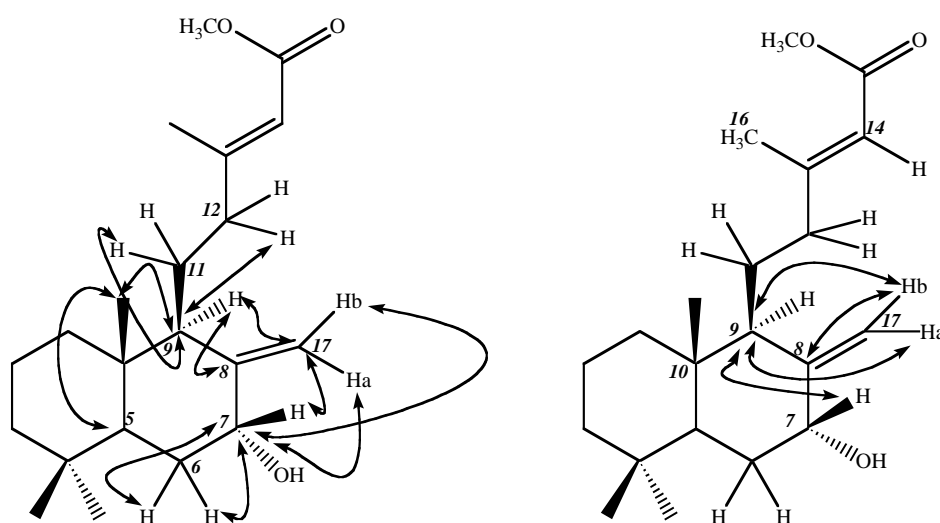
Esquema 29. Correlaciones de interés observadas en el espectro COSY.

El espectro NOESY (**Espectro 10**) muestra las correlaciones entre el protón vinílico H-17_a y los protones H-17_b y H-7, los cuales explican la identificación y el desplazamiento de los protones H-17, por otro lado, la configuración β -ecuatorial del H-7 y α -axial del OH, la podemos observar por medio de las correlaciones existentes de los protones β -ecuatoriales H-9, H-20 y H-18, del mismo modo, las interacciones de los protones α -axiales H-9, H-5 y H-19 (**Esquema 30**). Por otro lado, cabe señalar que se logra determinar la cercanía entre los protones H-9, H-11 y H-12.



Esquema 30. Principales correlaciones observadas en el espectro NOESY.

El espectro HMQC (**Espectro 12**) muestra las correlaciones que se presentan entre el carbono 8 y los hidrógenos 9 y 17, del mismo modo el carbono 17 muestra una correlación con los hidrógenos 7 y 9. Por otro lado, el carbono 7 presenta una correlación con los hidrógenos de la posición 6 y con los hidrógenos del doble enlace exocíclico 17. (**Esquema 31**).



Esquema 31. Algunas correlaciones ^1H - ^{13}C presentes en el espectro HMBC.

Por medio del espectro HSQC (**Espectro 13**) se lograron asignar las señales de RMN-¹³C (**Espectro 11**), encontrando a 167.2 ppm la señal del carbono que corresponde al carbonilo en la posición 15, del mismo modo en 115.0 y 160.7 ppm las señales de los carbonos vinílicos α,β -insaturados C-13 y C-14. En 149.4 ppm y 109.6 ppm se encuentran los carbonos del doble enlace exocíclico C-8 y C-17 respectivamente. El C-4 que posee los dos metilos C-18 y C-19 se localiza a 39.8 ppm. Finalmente a 74.0 ppm se encuentra el carbono 7 que por su desplazamiento corresponde a un átomo de carbono unido a un grupo OH. (**Tabla 31**).

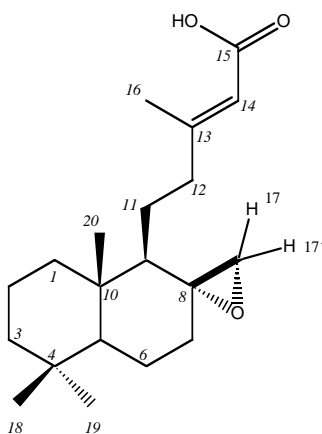
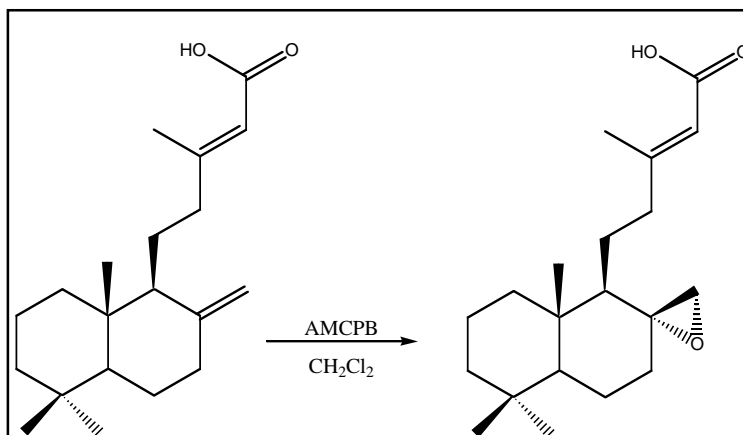
C	δ (ppm)
C-1	38.87
C-2	18.82
C-3	42.03
C-4	39.88
C-5	47.61
C-6	30.97
C-7	74.04
C-8	149.42
C-9	50.29
C-10	39.88
C-11	21.03
C-12	39.36
C-13	160.70
C-14	115.04
C-15	167.21
C-16	19.32
C-17	109.65
C-18	21.50
C-19	33.27
C-20	13.42
C-21	50.78

CDCl₃, TMS, 500 MHz.

Tabla 31. Asignación de las señales de RMN-¹³C para el ester metílico del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

d) Elucidación estructural del ácido 8 α ,17-epoxianticopálico

La reacción de epoxidación por medio de la técnica descrita anteriormente para el éster metílico del ácido anticopálico dio como resultado un aceite incoloro con un rendimiento del 66.5 %. (**Esquema 32**)



Esquema 32. Ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

En el espectro de IR (Película) se observa una banda por encima de 2945 cm⁻¹ que sumada a la de 1689 cm⁻¹ indican la presencia de un ácido carboxílico, en 1253 y 838 cm⁻¹ se encuentran las bandas que corresponden al anillo del epóxido.

El espectro de masas nos muestra un ion molecular M^+ de 320 que corresponde a una fórmula molecular $C_{20}H_{32}O_3$, de la cual se calculan 5 insaturaciones. EM (IE), m/z (Rel. Int) 320 (4.0), 302 (15.0), 275 (28.0), 205 (45.0), 177 (54.5), 149 (67.5), 137 (96.0), 95 (98.0), 69 (100), 55 (63.0), 41 (68.5).

El espectro de RMN- 1H (**Espectro 14**) se observa a 2.51 ppm una señal doble ($J= 4.2$ Hz) perteneciente al H-17' y en 2.75 ppm un doble de dobles ($J= 4.5, 1.8$ Hz) que corresponde al H-17, en 5.67 ppm ($J= 0.9$ Hz) se encuentra el H-14 y en 2.13 ppm la señal doble ($J= 1.2$ Hz) perteneciente al Me-16. (**Tabla 32**)

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-17	2.50	d	4.2
H-17'	2.75	dd	4.5, 1.8
H-14	5.67	c	0.9
Me-16	2.13	d	1.2
Me-18	0.83	s	-
Me-19	0.90	s	-
Me-20	0.81	s	-

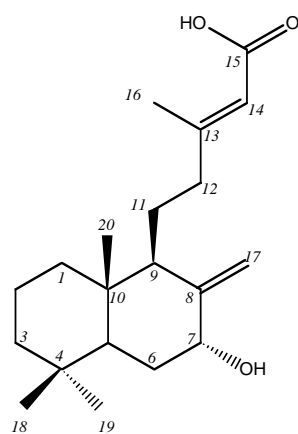
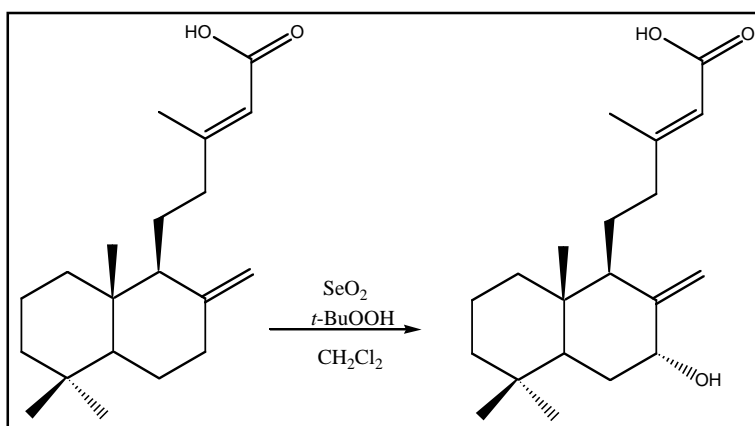
CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 32. Asignación de señales de RMN- 1H para el ácido 8 α ,17-epoxianticopálico.

Con base en los datos anteriormente mencionados para la reacción de epoxidación del éster metílico del ácido anticopálico, las señales de los hidrógenos de la posición 17, poseen una constante de acoplamiento ($J= 4.2$ Hz), la cual indica un acoplamiento vecinal cis para el anillo del epóxido, además de tomar en cuenta el respectivo mecanismo de reacción y las interacciones estéricas. (**Esquema 27**)

e) Elucidación estructural del ácido 7 α -hidroxianticopálico.

La oxidación en la posición 7 del ácido anticopálico dio como resultado un aceite incoloro con un rendimiento del 68%. (**Esquema 33**)



Esquema 33. Ácido 7 α -hidroxianticopálico.

En el espectro de IR se observa a 3345 cm^{-1} una banda característica que corresponde al OH, el grupo carbonilo de la posición 15 se encuentra a 1691 cm^{-1} , en 1642 cm^{-1} se observa la señal que pertenece a un doble enlace con una banda complementaria en 868 cm^{-1} perteneciente al doble enlace exocíclico.

En el espectro de masas se observa un ion molecular M^+ de 320, que corresponde a una fórmula molecular $C_{21}H_{34}O_3$, EM (I.E), m/z (Rel. Int) 320 (3.0), 302

(14.0), 287 (17.5), 221 (27.0), 203 (35.0), 149 (75.0), 123 (100), 109 (32.5), 82 (52.0), 69 (48.5), 55 (38.0), 41 (40.0).

En el espectro de RMN-¹H (**Espectro 15**) se muestra en 4.63 y 5.08 ppm los hidrógenos que corresponden a las posiciones 17' y 17 respectivamente, por otro lado, en 4.39 ppm se encuentra la señal que pertenece al H-7. (**Tabla 33**)

H	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
H-17	5.08	<i>br s</i>	-
H-17'	4.63	<i>br s</i>	-
H-14	6.68	<i>d</i>	0.6
H-7	4.39	<i>t</i>	-
Me-16	2.16	<i>d</i>	0.6
Me-18	0.80	<i>s</i>	-
Me-19	0.88	<i>s</i>	-
Me-20	0.66	<i>s</i>	-

CDCl₃, TMS, 300 MHz.

Tabla 33. Asignación de señales de RMN-¹H para el ácido 7α-hidroxicantopálico.

4.2.4 Resultados de la actividad antialimentaria del ácido anticopálico y sus derivados semisintéticos.

Siguiendo los mismos métodos experimentales antes mencionados para la evaluación de la actividad antialimentaria contra el insecto prueba *Spodoptera frugiperda*, se analizó dicha actividad sobre el ácido anticopálico y sus derivados sintéticos.

El ácido anticopálico, el ácido 3 β -hidroxianticopálico y sus derivados fueron evaluados para medir su actividad antialimentaria a una concentración de 100 ppm y tres réplicas por compuesto. En la **Tabla 34** se observa que a las mismas concentraciones, el ácido anticopálico muestra tener la actividad más relevante con un porcentaje de factor de inhibición del 82%, seguido del ester metílico 7 α -hidroxianticopálico con un valor del 30%.

En la **Gráfica 9** podemos observar el efecto antialimentario que muestra el ácido anticopálico, en donde el insecto prueba, al estar en contacto con éste compuesto, tiene una preferencia muy notable por el consumo de discos de hojas control en comparación con los discos de hojas tratamiento.

Compuesto	Concentración ⁹¹	% FI
Ácido anticopálico	100 ppm	81.70
Ácido 3β-hidroxicopálico	100 ppm	3.54
Ester metílico del ácido anticopálico	100 ppm	-11.58
Ester metílico 7α-hidroxicopálico	100 ppm	29.69
Ester metílico 8α,17-epoxicopálico	100 ppm	19.04
Acido 7α-hidroxicopálico	100 ppm	-3.23
Acido 8α,17-epoxicopálico	100 ppm	5.24

$$\% FI = [1 - (T / C)] X 100$$

T = área de hojas tratamiento consumidas.

C = área de hojas control consumidas.

% FI = 100, inhibición total de la alimentación.

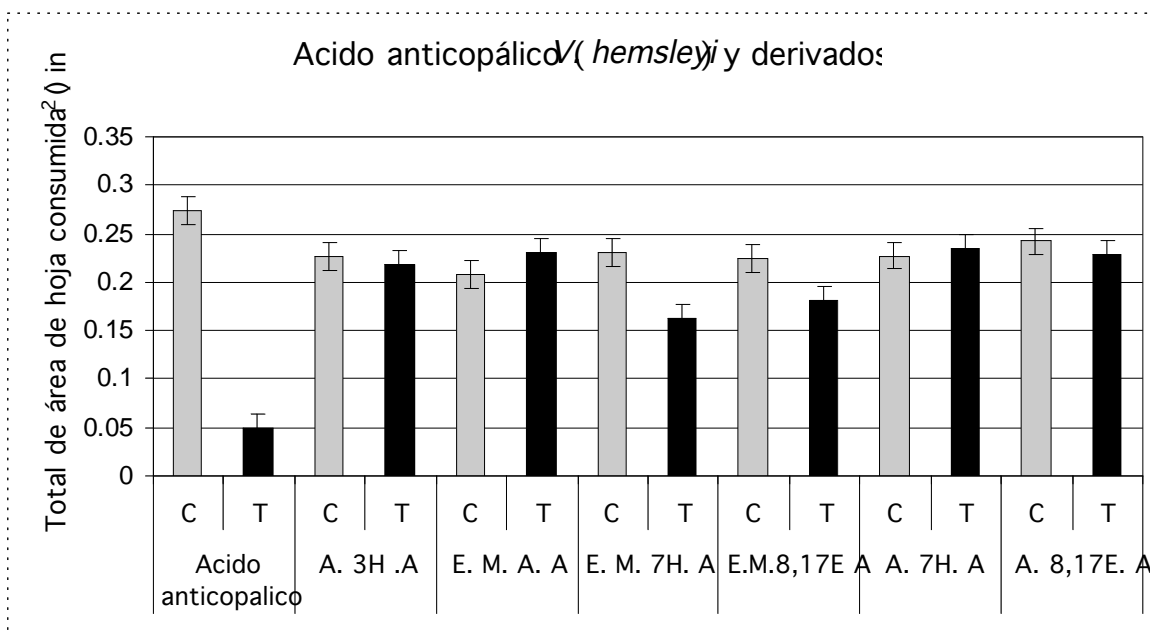
FI > 25, se pueden considerar activos.*

FI < 25, se consideran no activos.*

% FI negativos, se definen como fagoestimulantes.*

* Criterios de la técnica según González-Coloma y col.⁸⁸

Tabla 34. Porcentajes de factor de inhibición del ácido anticopálico aislado de *V. hemsleyi* y sus derivados



A. 3H. A = Ácido 3β -hidroxianticopálico.

E. M. A. A = Ester metílico del ácido anticopálico.

E. M. 7H. A = Ester metílico 7α -hidroxianticopálico.

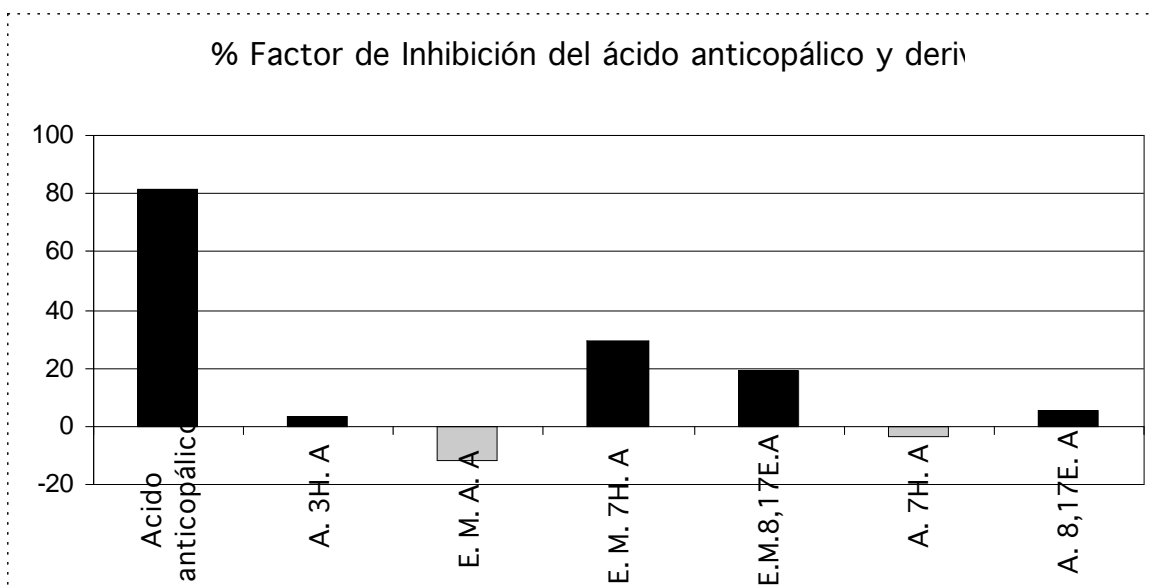
E. M. 8,17E. A = Ester metílico $8\alpha,17$ -epoxianticopálico.

A. 7H. A = Ácido 7α -hidroxianticopálico.

A. 8,17E. A = Ácido $8\alpha,17$ -epoxianticopálico.

Gráfica 9. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento del ácido anticopálico y sus derivados, por parte del insecto prueba *Spodoptera frugiperda*.

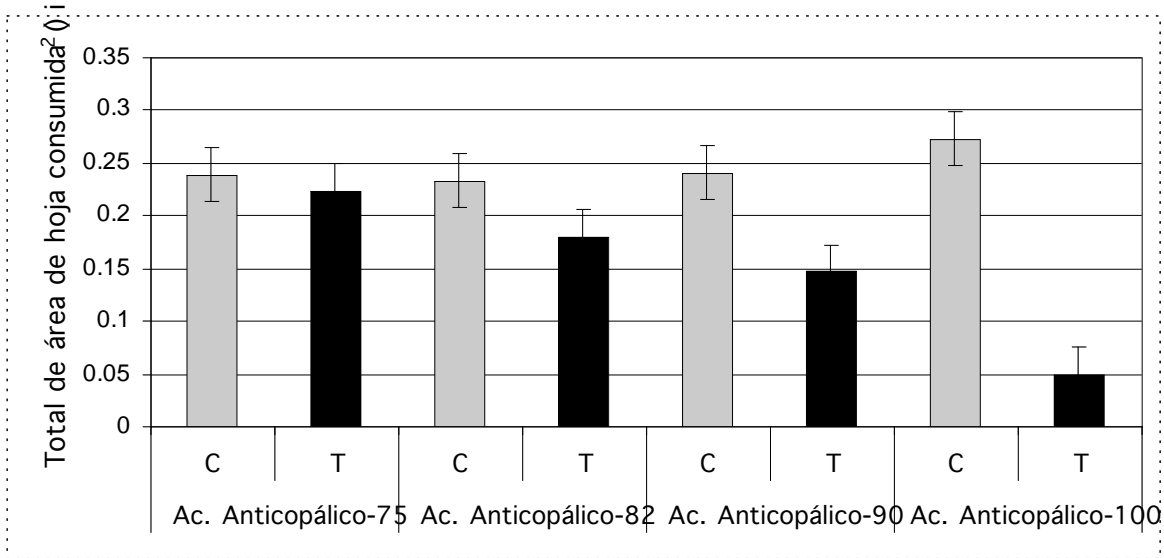
Por otro lado, en la **Gráfica 10**, se muestra la importancia en la actividad antialimentaria del ácido anticopálico, esto debido a su alto porcentaje de factor de inhibición, seguido del producto de oxidación (ester metílico 7α -hidroxianticopálico) y el producto de epoxidación (ester metílico $8\alpha,17$ -epoxianticopálico) los cuales fueron de actividad moderada, esto nos indica que de todas las transformaciones químicas realizadas sobre el ácido anticopálico, ninguno de los derivados obtenidos tuvo mayor actividad antialimentaria que el ácido anticopálico.



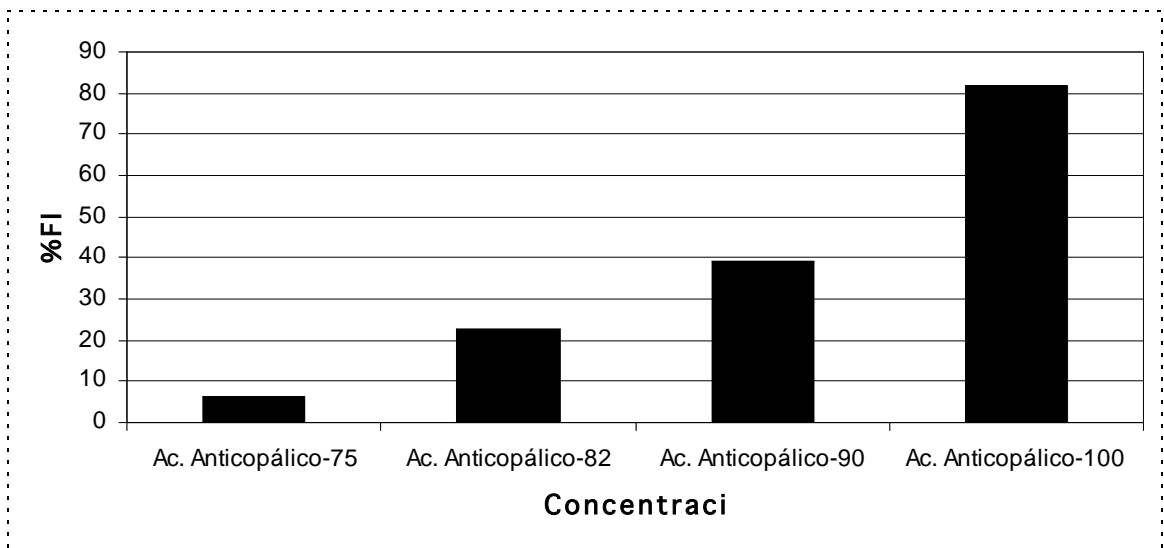
Gráfica 10. Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición del ácido anticopálico aislado de *Vitex hemsleyi* y sus derivados.

De acuerdo con la **Tabla 34** y las **Gráficas 9** y **10**, el compuesto con mayor actividad antialimentaria es el ácido anticopálico, éste se sometió a un análisis estadístico realizado por medio de una prueba de t-student ($P=0.05$) la cual, mostró que el consumo de hojas con respecto a los controles por parte del insecto prueba *S. frugiperda* es estadísticamente significativo.

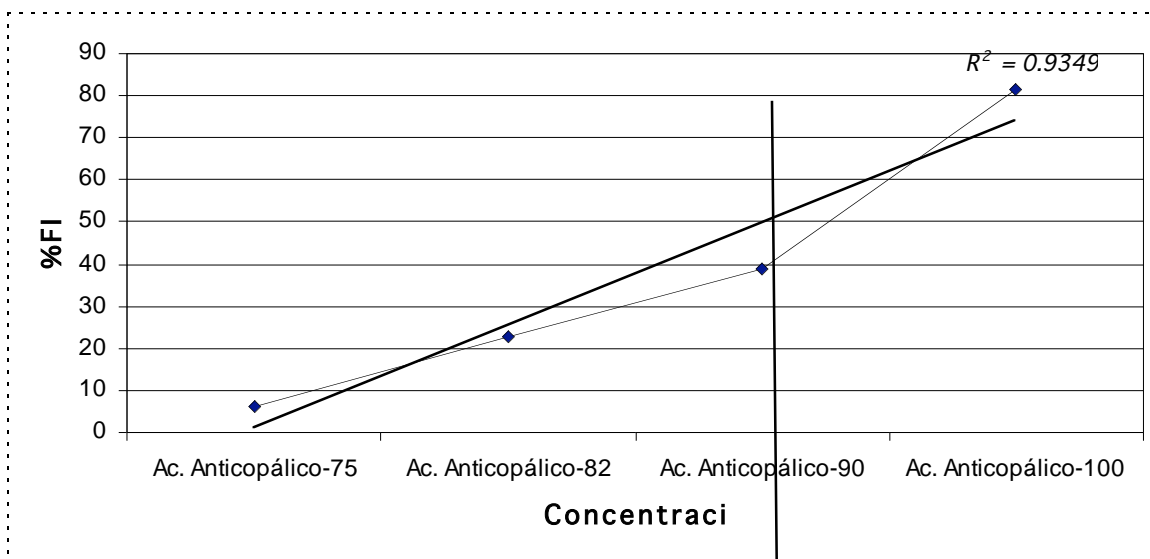
Tomando en cuenta los criterios de la técnica de González-Coloma y col.¹⁰⁴ para la evaluación de la actividad antialimentaria, los compuestos que se consideran activos y que posean un %FI > 50% se someten a un experimento de respuesta dependiente de la dosis con el objetivo de calcular la concentración efectiva (EC_{50} , dosis efectiva para el 50% de inhibición de la alimentación), esto por medio de un análisis de regresión lineal. (**Gráfica 11-13**)



Gráfica 11. Consumo preferente de hojas control y de hojas tratamiento del ácido anticopálico a diferentes concentraciones (ppm)



Gráfica 12. Esquema representativo del porcentaje de factor de inhibición a diferentes concentraciones del ácido anticopálico.



$$EC_{50} = 90.6 \text{ ppm } (83.6, 98.1)^*$$

* 95% de los límites de confianza (alto, bajo)

Gráfica 13. Efecto respuesta dependiente de la dosis del ácido anticopálico para el cálculo de la EC_{50} .

En las **gráficas 12 y 13** se observa una respuesta dependiente de la dosis del ácido anticopálico en un rango de concentraciones de 75, 82, 90 y 100 ppm frente a *S. frugiperda*, cabe señalar que a mayores concentraciones (\approx 90 y 100 ppm) la inhibición de alimentación aumenta, encontrando que la dosis efectiva de ácido anticopálico suministrado al insecto prueba es de 90.6 ppm.

Por otra parte, diversos estudios sobre la actividad insecticida y antialimentaria de metabolitos secundarios, han mostrado que el grupo de los terpenos son los más activos, del mismo modo, se ha determinado que los diterpenos especialmente los del tipo clerodánico han sido los de mayor interés, debido a que éstos son una fuente importante de antialimentarios.¹⁰⁵

Con base en ésta información, dentro de los diterpenos del tipo clerodano con actividad antialimentaria, encontramos a la ajugarina I, scutalpina C, clerodina y montanina D, éstos se consideran de interés debido a que poseen el 100, 96, 95 y 82% de inhibición en la alimentación respectivamente.

En comparación con los diterpenos clerodánicos, los estudios de diterpenos del tipo labdano y kaurano como potenciales antialimentarios han sido muy escasos.

Lo que respecta a los diterpenos con esqueleto de labdano, sólo se ha reportado que el ácido 8(20),13-ent-labdadien-16,15-olide oico aislado del extracto de *Eupatorium buniifolium*, es antialimentario contra *Tenebrio molitor* (Coleoptera:Tenebrionidae),¹⁰⁶ Del mismo modo, Fukushim y col. reportan la actividad antialimentaria del ácido trans-communico contra *Spodoptera littura* (Lepidoptera:Noctuidae).¹⁰⁷

En este trabajo se reporta por primera vez el estudio químico de *Vitex hemsleyi* así como la actividad antialimentaria del ácido anticopálico, la cual, dentro de los parámetros que se manejan en este tipo de ensayo, se puede considerar como una alta actividad. Los derivados obtenidos por medio de reacciones químicas del ácido anticopálico, fueron menos activos que el compuesto original. Estos resultados indican que la actividad del ácido anticopálico es dependiente tanto de sus grupos funcionales como de la estereoquímica de sus centros estereogénicos.

Capítulo 5

5.1 Conclusiones

- * Estudio biodirigido de *Vitex mollis*.
- * Estudio del Acido anticopálico aislado de *Vitex hemsleyi* y de los derivados semisintéticos.

5.2 Perspectivas

5.3 Bibliografía

CONCLUSIONES.

Estudio biodirigido de *Vitex mollis*.

Los resultados del estudio biodirigido de *V.mollis*, indicaron que los extractos acetónico de corteza y de diclorometano de hojas presentaron actividad antialimentaria.

El análisis cromatográfico de estos extractos permitió el aislamiento de ftalato de di-(2-metil)heptilo y ftalato de dibutilo. La identidad de estos compuestos se logró mediante la comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con aquellos informados para estos compuestos.

Aunque se ha informado de la presencia de este tipo de compuestos en extractos provenientes de especies vegetales, el aislamiento de ftalatos en *V. mollis* fue un resultado inesperado.

Con el fin de aclarar el origen de estos ftalatos en los extractos de esta especie, se realizó un análisis por cromatografía de alta resolución (CLAR), tanto de los extractos sin purificar como de los residuos de los disolventes empleados para la obtención de los extractos. Los resultados indicaron que los ftalatos aislados de los extractos de *V. mollis* provenían de los disolventes utilizados.

No obstante lo anterior, los resultados obtenidos señalaron las propiedades antialimentarias de estos dos ftalatos. Hallazgos que son de interés ecológico, ya que este tipo de compuesto, por su producción a nivel industrial y su pobre desgradación natural, los convierte en contaminantes ecológicos.

En este trabajo se confirmó que los ftalatos aislados mostraron capacidad de disuasión alimenticia en el insecto demostrando la posibilidad de alterar su ciclo de vida.

De manera general, el exceso de contaminantes de plástico y sus derivados que contienen ftalatos, serán capaces de alterar los ciclos naturales de varios tipos de insectos lo cual alterara el equilibrio ecológico.

Estudio del ácido anticopálico aislado de *Vitex hemsleyi* y de los derivados semisintéticos.

El extracto metanólico de las hojas de *Vitex hemsleyi*, fue sometido a una partición con una mezcla de disolventes hexano:agua y diclorometano:agua, obteniendo finalmente dos extractos, hexánico y diclorometánico.

Del extracto hexánico se aislaron 3 g de ácido anticopálico y del extracto de diclorometano 638.6 mg de ácido 3 β -hidroxianticopálico.

El ácido anticopálico mostró un %FI de 81.7 y una IF₅₀ de 90.6 ppm, resultado que motivó la obtención de derivados a partir del ácido anticopálico. Se sintetizaron 5 derivados, los cuales se obtuvieron con excelentes rendimientos.

Las estructuras de los derivados del ácido anticopálico fueron caracterizados por medio de técnicas analíticas tales como, Espectroscopia en el Infrarrojo (IR), Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C y en dos dimensiones (RMN-2D), tales como COSY, NOESY y HMBC, así como Espectrometría de Masas (EM).

Los resultados de la evaluación antialimentaria de los derivados del ácido anticopálico, demostraron que ninguno de ellos fue tan activo como el compuesto inicial. Estos hallazgos indican que las propiedades antialimentarias del ácido

anticopálico son altamente dependientes tanto de los grupos funcionales presentes así como de su estereoquímica.

La literatura indica que varios diterpenos del tipo clerodano tienen propiedades antialimentarias, sin embargo diterpenos del tipo labdano que posean propiedades antialimentarias son muy escasos.

Este es el primer informe acerca de las propiedades antialimentarias del ácido anticopálico en la especie *Spodoptera frugiperda*.

Así mismo, este es el primer informe acerca del estudio fitoquímico de *Vitex hemsleyi* así como de sus propiedades insecticidas. Este trabajo ha sido aceptado para su publicación en la revista *Zeitschrift für Naturforschung*. **64c**, 2009.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se informa la actividad antialimentaria del ácido anticopálico frente a *Spodoptera frugiperda*, conocido comúnmente como gusano cogollero del maíz. Este constituye el primer informe de la actividad de un diterpeno del tipo labdano contra este insecto. Este hallazgo abre toda una nueva posibilidad de estudio de la actividad antialimentaria de este tipo de diterpenos sobre este insecto u otros que constituyan una plaga en la agricultura tales como, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera:Noctuidae), *Mocis latipes* (Lepidoptera:Noctuidae), *Zediatraea lineolata* (Lepidoptera:Pyralidae) ó *Sitophilus zeamais* (Coleoptera:Curculionidae).

Por otro lado, tomando en cuenta las principales características de las que consiste un buen antialimentario¹⁵ se sugiere realizar los estudios pertinentes para evaluar la toxicidad del ácido anticopálico frente a humanos, animales y otros organismos, así como, la fitotoxicidad. Así mismo, se pretende desarrollar los análisis adecuados para determinar la forma de aplicación, su especificidad y su latencia (estabilidad y tiempo de vida en un cultivo). Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se podía determinar el estado de utilización de este compuesto como potente insecticida.

Tomando en cuenta que el ácido anticopálico se aisló de *Vitex hemsleyi* sería interesante estudiar de qué manera la presencia de este compuesto influye en la relación de esta especie en su entorno ecológico.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Prakash, A., Rao, J. *Botanical Pesticides in Agriculture*. Lewis Publishers, India, **1997**, pp. 1-298.
- 2.- Waterhouse, D., Carman, W.J., Schottenfeld, D., Gridley, G., Mac Lean, S. *Cancer*. **1996**, 77, 763-770.
- 3.- Bourguet, D., Genissel, A., Raymond, M. *Journal of Economic Entomology*. **2000**, 93, 1588-1595.
- 4.- Talavera, A. “*Manejo de Plagas en Cultivos Agrícolas*”, Gaceta Universitaria, 28 de Junio de **1999**. México D.F.
- 5.- Lewis, W.J., Van Lenteren, J.C., Phatak, S.C., Tumlinson, J.H. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences. USA*. **1997**, 94, 12243-12248.
- 6.- Godfrey, C.R.A. *Agrochemicals from Natural Products*. Marcel Dekker. Inc, New York, **1995**, p. 395.
- 7.- Heimpel, A.M., Thomas, E.D., Adams, J.R., Smith L.J. *Environmental Entomology*. **1973**, 2, 72-76.
- 8.- Appel, A.G., Benson, J.M., Ellemberger, J.M., Manweiler, S.A. *Journal of Economic Entomology*. **1993**, 86, 777-784.
- 9.- Champlin, F.R., Grula, E.A. *Applied and Environmental Microbiology*. **1968**, 37, 1122.
- 10.- Samuels, R.I., Charnley, A.K., Cooper, R.M. *Mycopathología*, **1988**, 104, 51.

- 11.- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M. *Journal of Invertebrate Pathology*, **1986**, 48-85.
- 12.- Anaya, A.A. *Ecología Química*. Plaza y Valdés Editores, México, **2003**, p. 140.
- 13.- Anaya, A.A. *Ecología Química*. Plaza y Valdés Editores, México, **2003**, pp.225-235.
- 14.- Esquivel, B., Rodríguez-Hahn, L., Simmonds, M. *Actividad Insecticida de Diterpenos Clerodánicos Aislados de Salvias Mexicanas*, 1^{er}. Simposium “La Química en la UNAM”, Instituto de Química y la Facultad de Química, **1992**, 140-156.
- 15.- Van Beek, T., De Groot, A. A. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. **1986**, 105, 513-527.
- 16.- Casida, J.E. *Pyrethrum, The Natural Insecticide*. Academic Press, E.U, **1973**.
- 17.- Atkinson, B.L., Blackman, A.J., Faber, H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2004**, 52, 280-287.
- 18.- Yamasaki, R.B., Klocke, J.A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1987**, 35, 467-471.
- 19.- Rzedowski, J. *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México. **1978**.
- 20.- Arnason, R., Mata, R., Romeo, T. *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent Advances in Phytochemistry*. **1995**, 29, 65-82.
- 21.- a) Walsingham, L., Atkins, S., *Kew Bulletin*. **2006**, 62, 615-617.

- 21.- b) Harley, R. M., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P.D., Conn, B., Grayer, R., Harley, M. M. *Labiatae*. In: J. W. Kadereit (ed). *The Families and Genera of Vascular Plants* (K. Kubitzki, ed. In chief), Vol. VII, *Lamiales*. Springer Berlin.
- 22.- Martínez, M. *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, México. **1979**.
- 23.- Briendl, E. *Hierbas Divinas: Biblioteca de Santa Hildegarda*, Tikal Ed. España.
- 24.- Ganapaty, S., Vidyadhar, K.N. *Journal of Natural Remedies*. **2005**, 5, 75-95.
- 25.- Villegas, Clarisa., Esquivel, Baldomero “*Estudio Fitoquímico y de la Actividad Insecticida de los Metabolitos Secundarios de Vitex hemsleyi*”. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM. **2004**.
- 26.- Ladeji, O., Okoye, Z. S. C., Uddoh F. *Phytotherapy Research*. **1996**, 10, 245-247.
- 27.- Alam, M.I., Gomes, A. *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**, 86, 75-80.
- 28.- Jiménez-Ferrer, J.E., Perez-Terán., Y.Y., Román-Ramos, R., Tortoriello, J. *Phytomedicine*. **2005**, 12, 116-122.
- 29.- Charla, A.S., Sharma, A.K., Handa, S.S. *Journal of Natural Products*. **1992**, 55, 2, 163-167.
- 30.- Dharmasiri, M.G., Jayakody, J.R.A.C., Galhena, G., Liyanage, S.S.P., Ratnasooriya, W.D. *Journal of Ethnopharmacology*. **2003**, 87, 199-206.
- 31.- Odenthal, K.P. *Phytotherapy Research*, **1998**, 12, S160-S161.

- 32.- Berger, D., Schaffner, W., Schrader, E., Meier, B. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, **2000**, 264, 150-153.
- 33.- Liu, J., Burdette, J., Xu, H., Chungang, G., Van Breemen, R.B., Bhat, K.P.L., Booth, N., Constantinou, A., Pezzuto, J., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Bolton, J.L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49, 2472-2479.
- 34.- Liu, J., Burdette, J., Sun, Y., Deng, S., Schlecht, M., Zheng, W., Nikolic, D., Mahady, G., Van Breemen, R.B., Fong, H.H.S., Pezzuto, J., Bolton, J.L., Farnsworth, N.R. *Phytomedicine*. **2001**, 11, 18-23.
- 35.- Chopin, B., Sørensen, J., Veal, L. *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery*. **2002**, 8, 148-154.
- 36.- Chopin, B. *Complementary Therapies in Nursing & Midwifery*. **2003**, 9, 157-160.
- 37.- Jarry, H., Leonhardt, S., Gorkow, C., Wuttke, W. *Experimental and Clinical Endocrinology*. **1994**, 102, 448-454.
- 38.- Wuttke, W., Splitt, G., Gorkow, C., Sieder, C. *Geburtsh u Frauenheilk*. **1997**, 57, 569-574.
- 39.- Jarry, H., Leonhardt, S., Wuttke, W., Spengler, B., Christoffel, V. *Zeitschrift für Phytotherapie*. **1999**, 20, 150-152.
- 40.- Wuttke, W., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Seidlová-Wuttke, D. *Phytomedicine*. **2003**, 10, 348-357.

- 41.- Hoberg, E., Sticher, O., Orjala, J.E., Meier, B. *Zeitschrift für Phytotherapie*. **1999**, 20, 140-158.
- 42.- Jarry, H., Spengler, B., Wuttke, W., Christoffel, V. *Maturitas*. **2006**, 55S, S26-S36.
- 43.- Andrzej, M., Diana, J. *Maturitas*. **2006**, 55S, S47-S54.
- 44.- Prilepskaya, V.N., Ledina, A.V., Tagiyeva, A.V., Revazova, F.S. *Maturitas*. **2006**, 55S, S55-S63.
- 45.- Webster, D.E., Lu, J., Chen, S.N., Farnsworth, N.R., Wang, J.Z. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 106, 216-221.
- 46.- Azhar-ul-Haq., Malik, A., Khan, M.T.H., Anwar-ul-Haq., Khan, S.B., Ahmad, A., Choudhary, M.I. *Phytomedicine*. **2006**, 13, 255-260.
- 47.- Samy, R.P., Ignacimuthu, S., Sen, A. *Journal of Ethnopharmacology*. **1998**, 62, 173-182.
- 48.- Taiwo, O., Xu, H.X., Lee, S.F. *Phytotherapy Research*. **1999**, 13, 675-679.
- 49.- Hossain, M.M., Paul, N., Sohrab, M.H., Rahman, E., Rashid, M.A. *Fitoterapia*. **2001**, 72, 695-697.
- 50.- Kawazoe, K., Yutani, A., Tamemoto, K., Yuasa, S., Shibata, H., Higuti, T., Takaishi, Y. *Journal of Natural Products*. **2001**, 64, 588-591.
- 51.- Agunu, A., Yusuf, S., Andrew, G.O., Zezi, A.U., Abdurahman, E.M. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 101, 27-30.

- 52.- Shin, T.Y., Kim, S.H., Lim, J.P., Suh, E.S., Jeong, H.J., Kim, B.D., Park, E.J., Hwang, W.J., Rye, D.G., Baek, S.H., An, N.H., Kim, H.M. *Journal of Ethnopharmacology*. **2000**, 72, 443-450.
- 53.- Ikawati, Z., Wahyuono, S., Maeyama, K. *Journal of Ethnopharmacology*. **2001**, 75, 249-256.
- 54.- Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, N.Y., Kim, Y.C., Sohn, D.H., Lee, B.H. *Food and Chemical Toxicology*, **2000**, 38, 861-865.
- 55.- Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, Y.C., Lee, B.H. *Phytotherapy Research*. **2001**, 15, 535-537.
- 56.- Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S. J., Kim, Y.C., Lee, B.H. *Phytotherapy Research*. **2001**, 16, 295-298.
- 57.- Ohyama, K., Akaike, T., Imai, M., Toyoda, H., Hirobe, C., Bessho, T. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **2005**, 37, 1496-1510.
- 58.- Hirobe, C., Qiao, Z.S., Takeya, K., Itokawa, H. *Phytochemistry*. **1997**, 46, 3, 521-524.
- 59.- Díaz, F., Chávez, D., Lee, D., Mi, Q., Chai, H.B., Tan, G.T., Kardono, L., Riswan, S., Fairchild, C., Wild, R., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzutto, J., Kinghorn, A.D. *Journal of Natural Products*. **2003**, 66, 865-867.
- 60.- Sathiamoorthy, B., Gupta, P., Kumar, M., Chaturverdi, A., Shukla, P.K., Maurya, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2007**, 17, 239-242.

- 61.- Gonçalves, J.L.S., Leitao, S.G., Monache, F.D., Miranda, M.M.F.S., Santos, M.G.M., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. *Phytomedicine*. **2001**, 8, 477-480.
- 62.- Woradulayapinij, W., Soonthornchareonnon, N., Wiwat, C. *Journal of Ethnopharmacology*. **2005**, 101, 84-89.
- 63.- Villaseñor, I., Lamadrid, M.A. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 104, 129-131.
- 64.- Zanatta, I., Sousa, E., Cazarolli, L.H., Junior, A.C., Piazzolatti, M.G., Szpoganicz, B., Barreto Silva, F.R.M. *Journal of Ethnopharmacology*. **2007**, 109, 151-155.
- 65.- Dev, S., Koul, O. *Insecticides of Natural Origin*. Harwood Academic Publishers, India, **1997**, pp.3-21.
- 66.- Hifnawy, M. S., Rashwan, O. A., Rabeh, M. A. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy*. **2001**, 39, 35-53.
- 67.- Koschier, E. H., Sedy, K. A., Novak, J. *Crop Protection*. **2002**, 21, 419-425.
- 68.- Rodríguez-López, V., Figueroa-Suárez., M.Z., Rodríguez, T., Aranda, E. *Fitoterapia*. **2007**, 78, 37-39.
- 69.- Singh, V., Dayal, R., Bartley, J. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. **2003**, 25, 94-98.
- 70.- Chandramu, C., Manohar, R.D., Krupadanam, D.G.L., Dashavantha, R.V. *Phytotherapy Research*. **2003**, 17, 129-134.

- 71.- Kumar, S., Hasan, S.A., Dwivedi, S., Kukreja, A.K., Sharma, A., Singh, A.K., Sharma, S., Tewari, R. *Journal of Medicinal and Aromatic and Plant Sciences*. **2001**, 22/4-23/1A, 373-377.
- 72.- Hernández, M.M., Heraso, C., Villareal, M.L., Vargas-Arispuro, I., Aranda, E. *Journal of Ethnopharmacology*. **1999**, 67, 37-44.
- 73.- Krishnarajah, S.R., Ganesalingam, V.K., Senanayake, U.M. *Tropical Sciences*. **1985**, 25, 249-252.
- 73a.- Senanayake, U.M. *The Nature, Description and Biosynthesis of Volatiles of Cinnamomum spp.* University of New South Wales, Kensington 2033 NSW. Australia, pp. 211. PhD. Thesis.
- 74.- Tawatsin, A., Asavadachanukorn, P., Thavara, U., Wongsinkongman, P., Basindhi, J., Boonruad, T., Chavalittumrong, P., Soonthornchareonnon, N., Komalamisra, N., Mulla, M.S. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. **2006**, 37, 5, 915-931.
- 75.- Senthil Nathan, S., Kalaivani, K., Murugan, K. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2006**, 65, 102-107.
- 76.- Senthil Nathan, S., Chung, P.G., Murugan, K., *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2006**, 64, 382-389.
- 77.- Senthil Nathan, S., Kalaivani, K., Murugan, K. *Chemosphere*. **2006**, 64, 1650-1658.
- 78.- Suksamrarn, A., Yingyongnarongkul, B., Promrangsan, N. *Tetrahedron*. **1998**, 54, 14565-14572.

79.-Valdespino, C.P.M. Flujos de N y P asociados a la ojarasca de bosques tropicales secos primarios y secundarios en la sierra de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura, Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. **2005**, p 68.

80.- INEGI. Síntesis geográfica del Estado de Morelos. Secretaría de Programación y Presupuesto. México. **1981**.

81.- Rzedowsky, J. Vegetación de México. Editorial Limusa, México. **1978** p. 432.

82.- Arias, D.M., Dorado, O., Maldonado, B. *Biodiversitas*, **2002**, 45, 7-12.

83.- Still, W.C., Kahn, M., Mitra, A. *Journal of Organic Chemistry*. **1978**, 43, 2923-2925.

84.- Arndt, F., Noller, C. R., Bergsteinsson, I. *Organic Syntheses*. Coll. Vol. 2, John Wiley & Sons, New York, **1946**, p. 365.

85.- Umbreit, M.A., Sharpless, K.B. *Journal of American Chemical Society*. **1977**, 99, 5526.

86.- Klocke, J.A., Kubo, I. *Florida Entomologist*. **1991**, 74, 18-22.

87.- Estancia de Estudios en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en el Centro de Ciencias Medioambientales, en Madrid, España. Dra. Azucena González Coloma. **2007**.

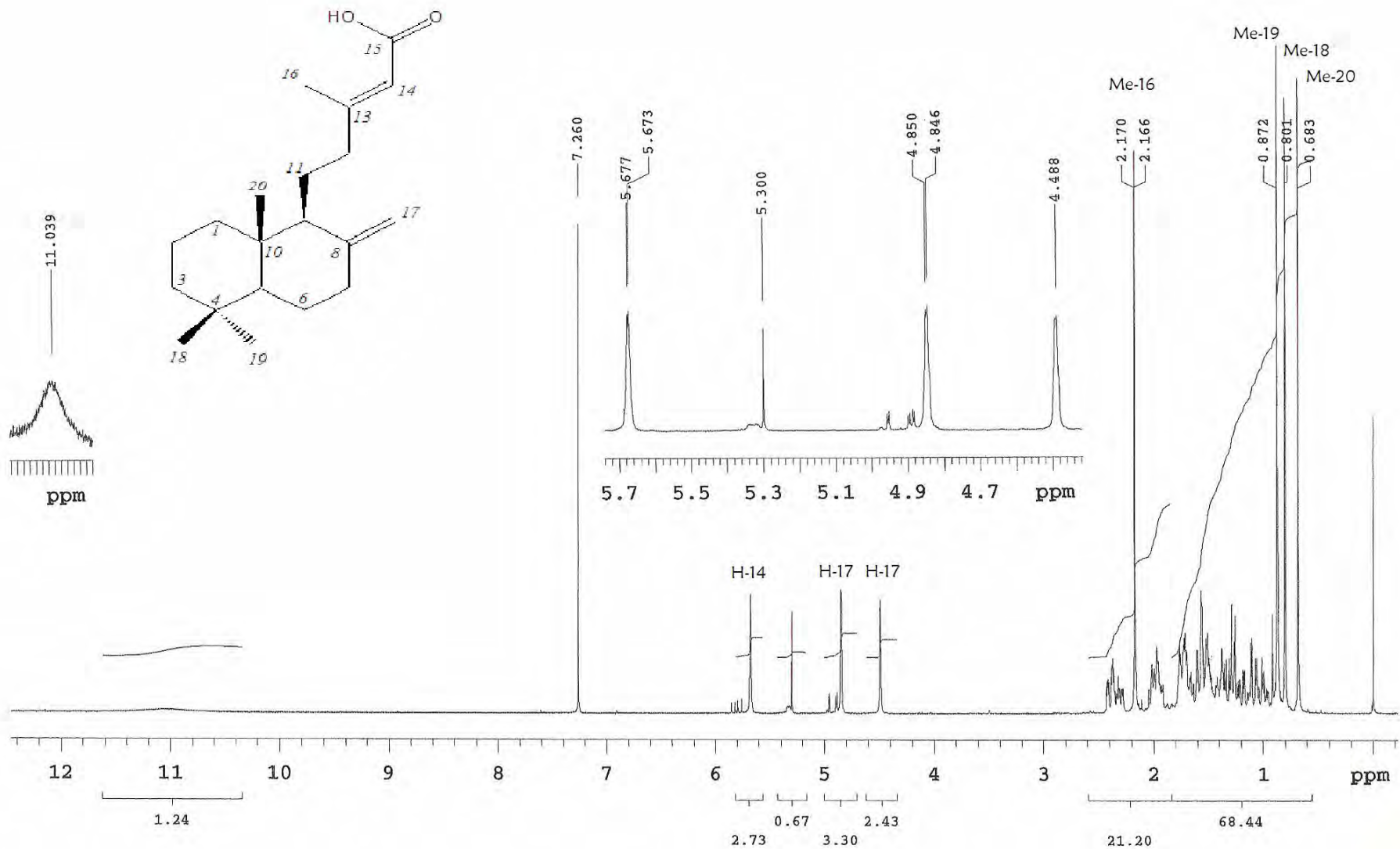
88.- González-Coloma, A., Valencia, E., Valenzuela, E., Barros, M., Hernández, M., Lazo, C. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. **2000**, 45, 2.

- 89.- Escoubas, P., Lajide, L., Mizutani, J. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **1993**, 66, 99.
- 90.- Bentley, M., Stoddard, W., Zalkow, L. *Annals of Entomological Society of America*. **1984**, 77, 393.
- 91.- La concentración adecuada para evaluar extractos es de 1000 ppm, debido al número de metabolitos secundarios existentes en mismo y por lo tanto, los efectos de sinergismo que pueden presentarse. Por otro lado compuestos puros se evalúan a 100 ppm.¹⁰⁴
- 92.- Merica, E., Lungu, M., Balan, I., Matei, M. *NutraCos*. **2006**, 5, 25-27.
- 93.- Emará, E.A., Abdel-Kader, Y.I. *Egyptian Journal of Food Science*. **2004**, 32, 15-26.
- 94.- Salah El Din, R. A., Soliman, H. S., Mahmoud, I. I., El-Dib, R., Ebead, G. A. *Egyptian Journal of Biomedical Sciences*. **2005**, 17, 52-60.
- 95.- Zhuang, W., Cai, J., Su, Q. *Asian Journal of Chemistry*. **2005**, 17, 2789-2792.
- 96.- Jussi-Pekka, R., Wolfender, J.L., Salminen, J.P., Pihlaja, K., Hostettmann, K., Vuorela, H. *Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences*. **2001**, 56, 13-20.
- 97.- Siliha, H., *Alexandria Science Exchange*. **1994**, 15, 155-168.
- 98.- Sturaro, A., Parvoli, G., Doretto, L. *Science of the Total Environment*. **1994**, 144, 285-295.

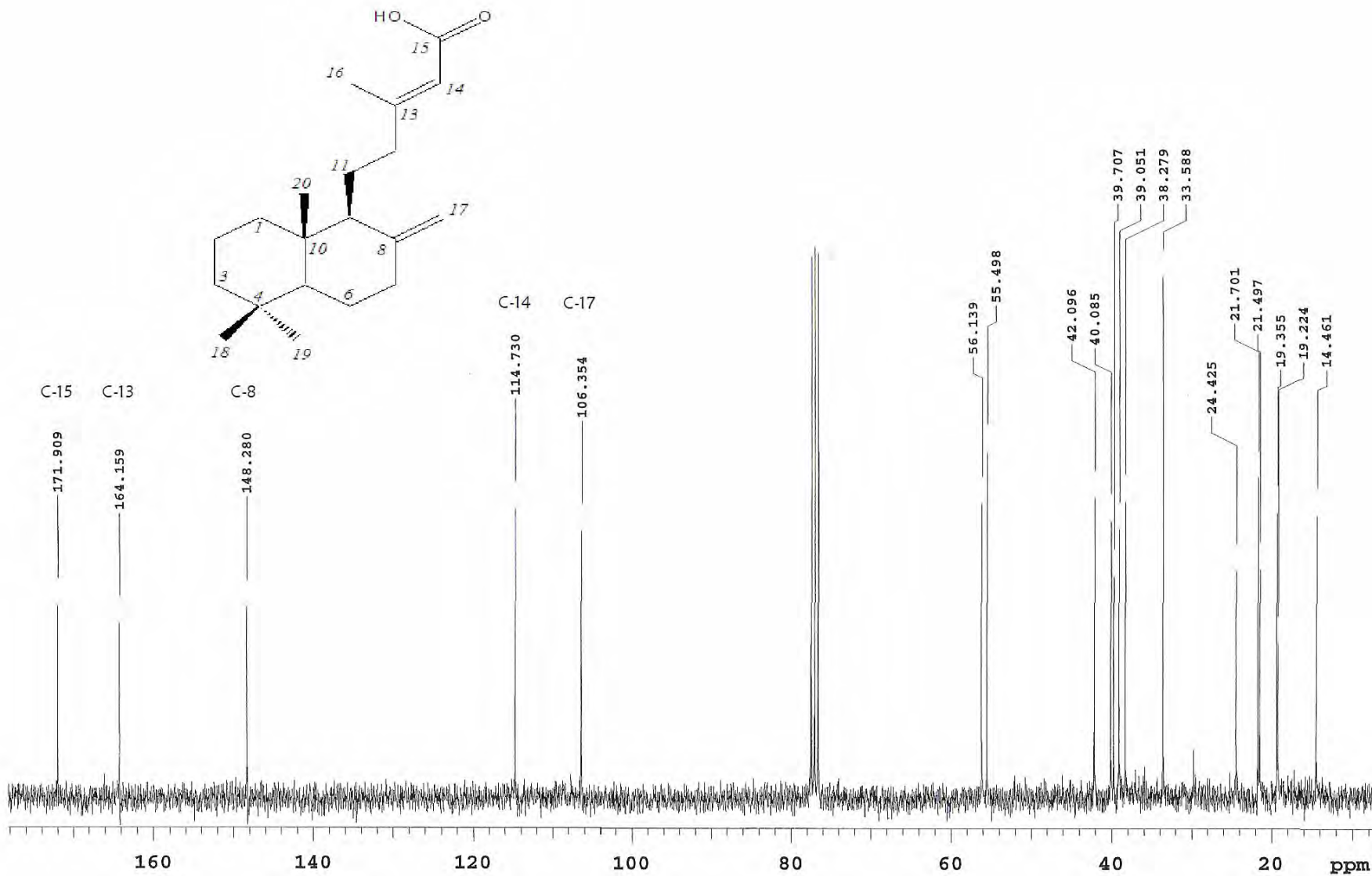
- 99.- Fujita, E., Saeki, Y., Ochiai, M., Inoue, T. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University*. **1972**, 50, 327-331.
- 100.- Wang, J., Tian, F. *Fenxi Kexue Xuebao*. **2006**, 22, 96-98 C.A 146:77420 AN 2006:329125.
- 101.- Wahidulla, S., D'Souza, L., Govenker, M. *Phytochemistry*. **1998**, 48, 1203-1206.
- 102.- Güven, K.C., Reisch, J., Kizil, Z., Güvener, B., Cevher, E. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 3115.
- 103.- Shuguang, L., Kefeng, Y., Wenhong, Z., Taiyi, J. *Dulixue Zazhi*. **2006**, 20, 40-41.
- 104.- Moreno-Osorio, L., Cortés, M., Armstrong, V., Bailén, M., González-Coloma, A. *Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences*. **2008**, 63c, 215-220.
- 105.- Gebbinck, E. A. K., Jansen, B. J. M., de Groot, A. *Phytochemistry*, **2002**, 61, 737-770.
- 106.- Cifuentes, D. A., Borkowsky, E. J., Sosa, M. E., Gianello, J. C., Giordano, O. S. Tonn, C. E. *Phytochemistry*. **2002**, 61, 899-905.
- 107.- Fukushima, J. I., Yatagi, M., Ohira, T. *Journal of Wood Science*. **2001**, 48, 326-330.

Apéndice

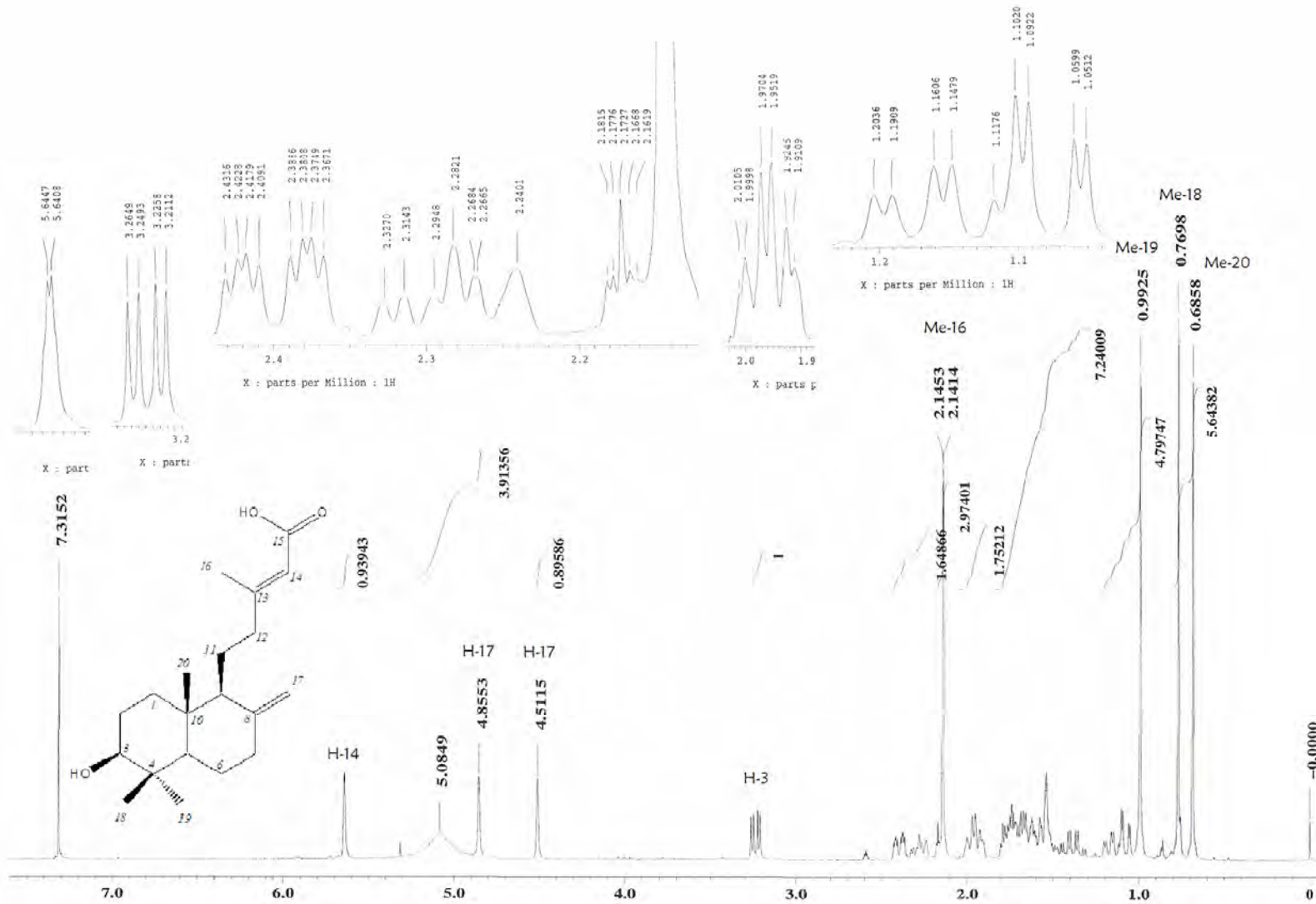
Espectros RMN.



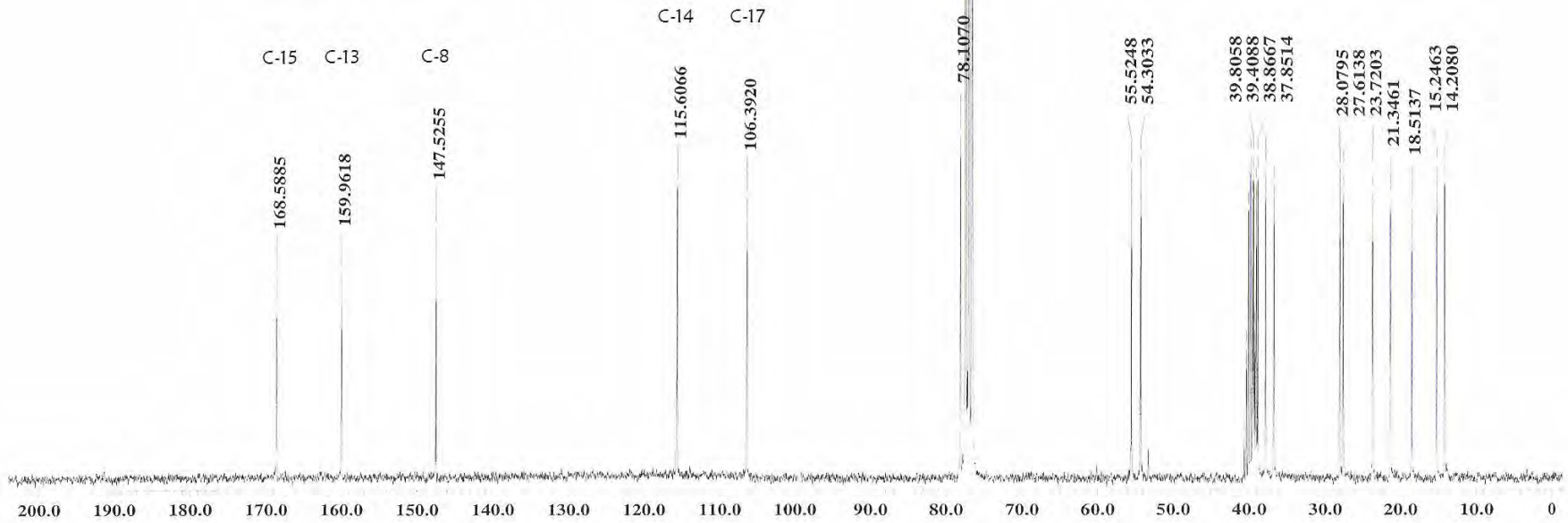
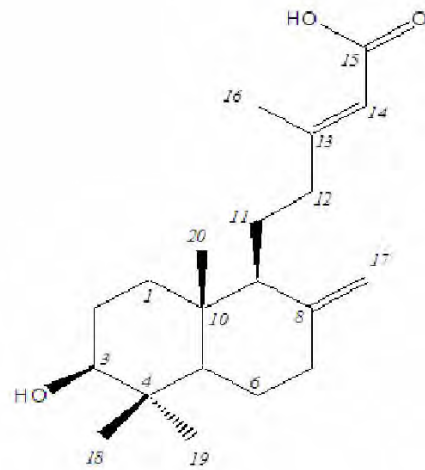
ESPECTRO 1



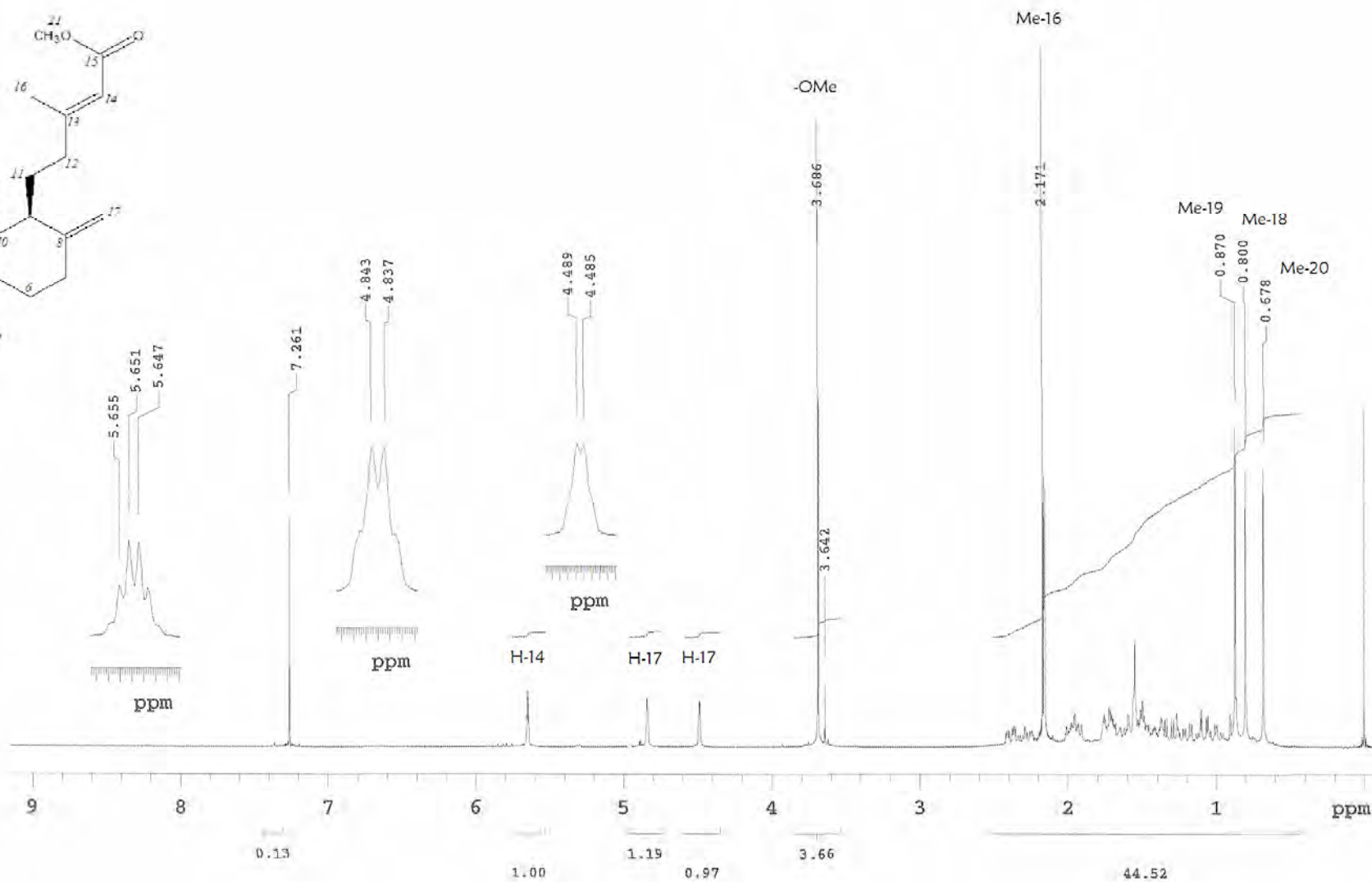
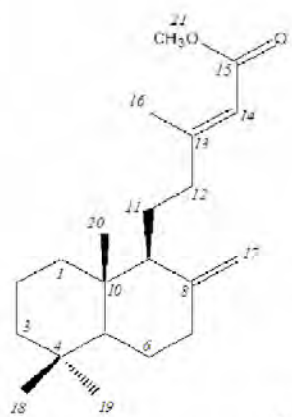
ESPECTRO 2



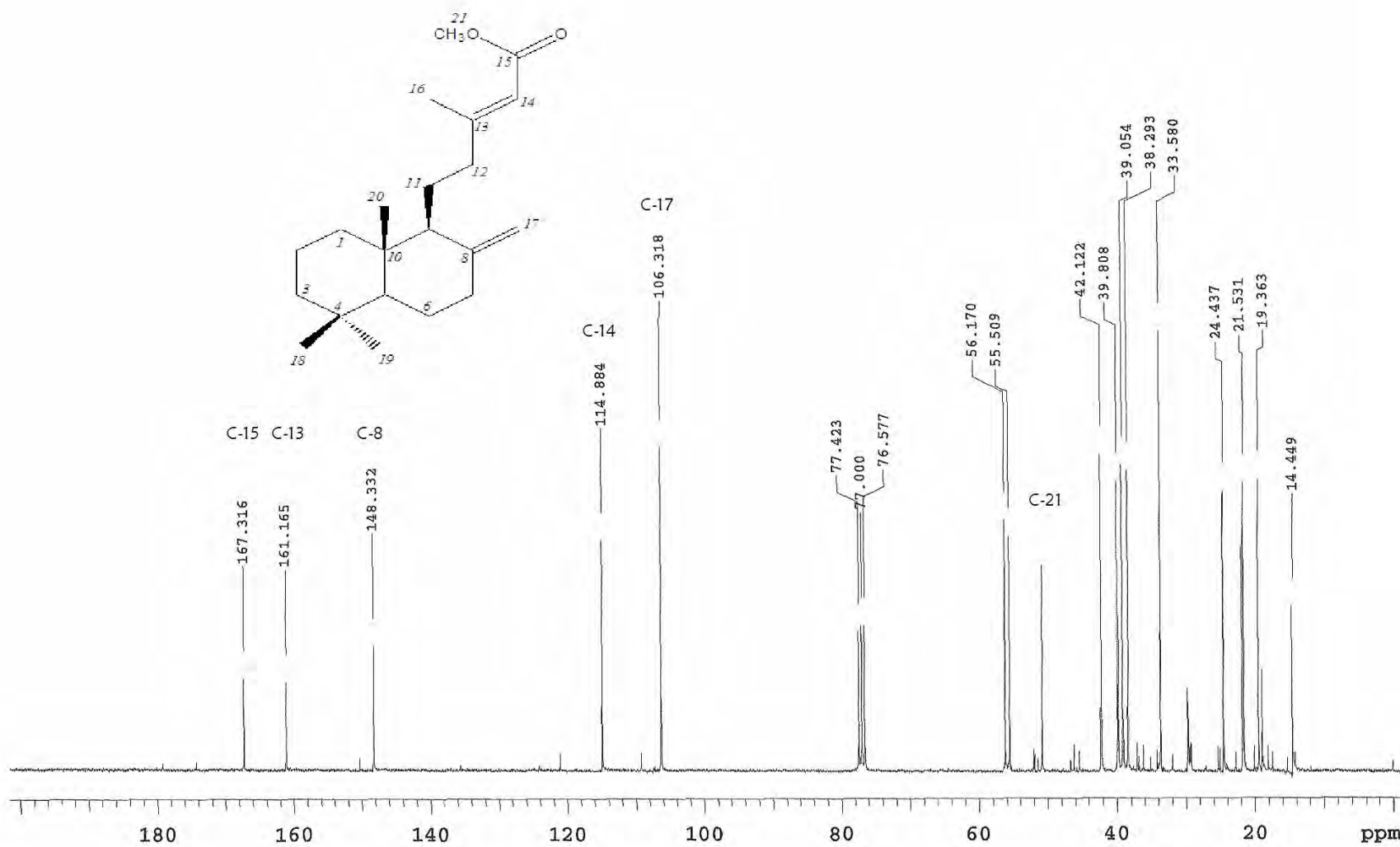
ESPECTRO 3



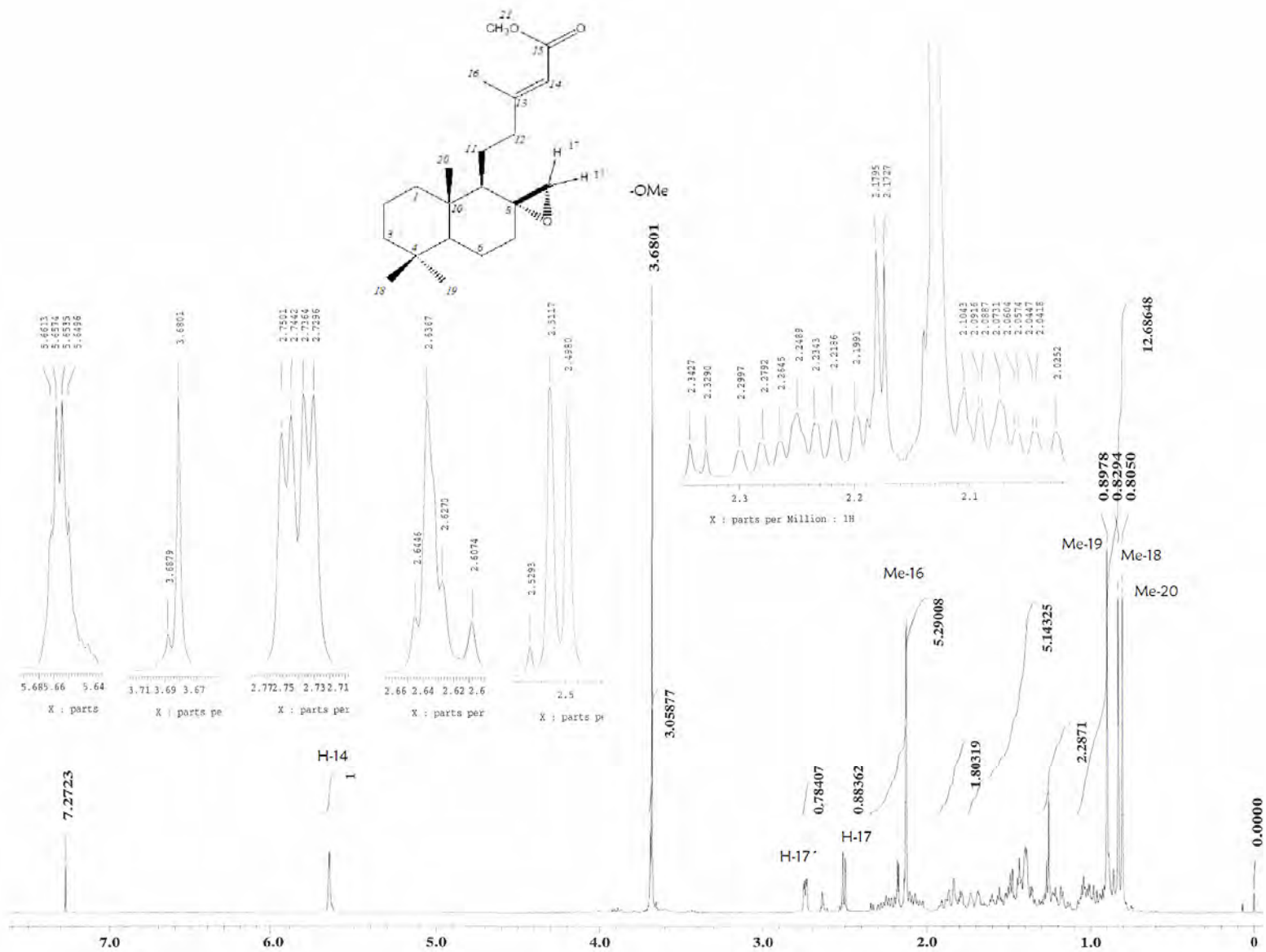
ESPECTRO 4



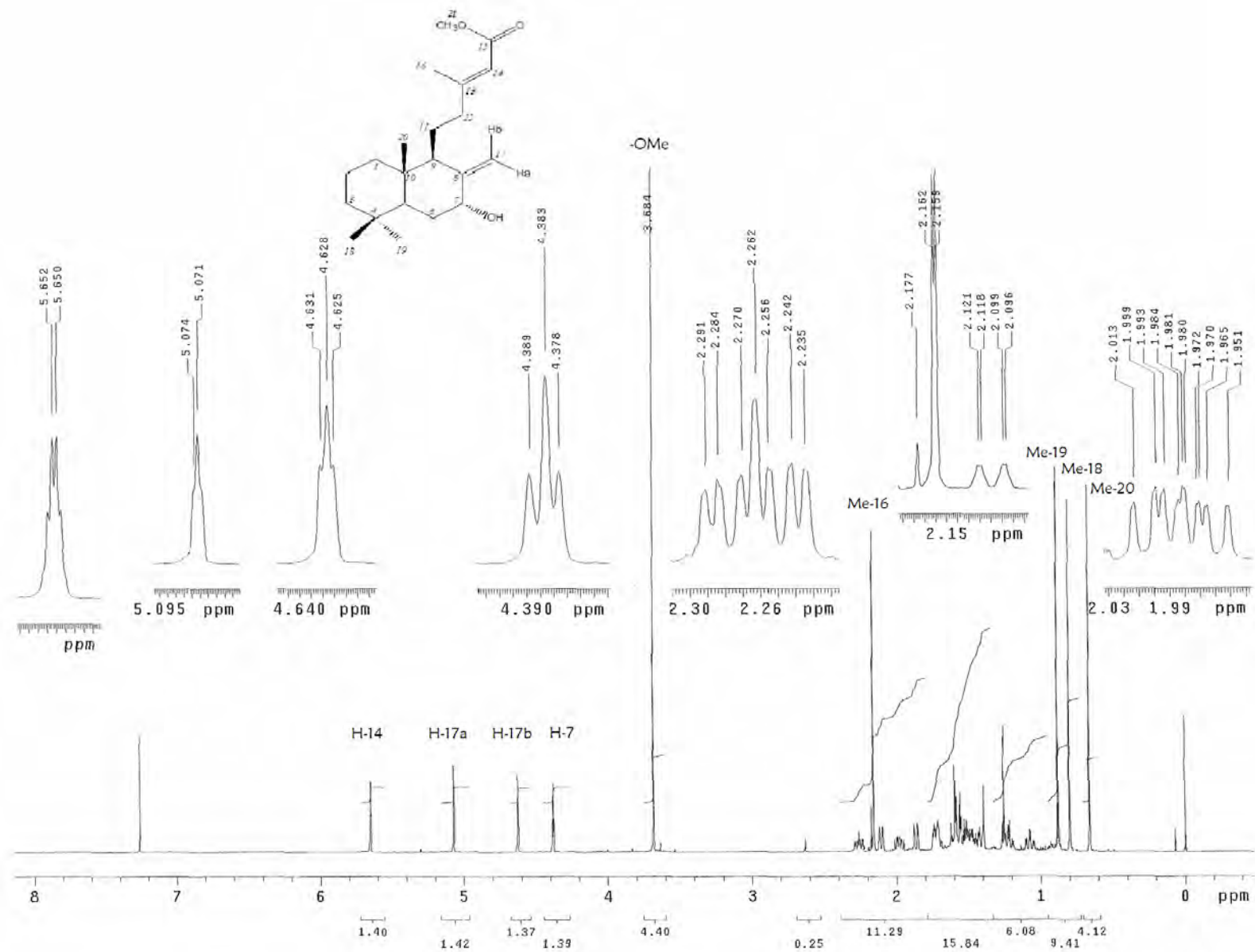
ESPECTRO 5



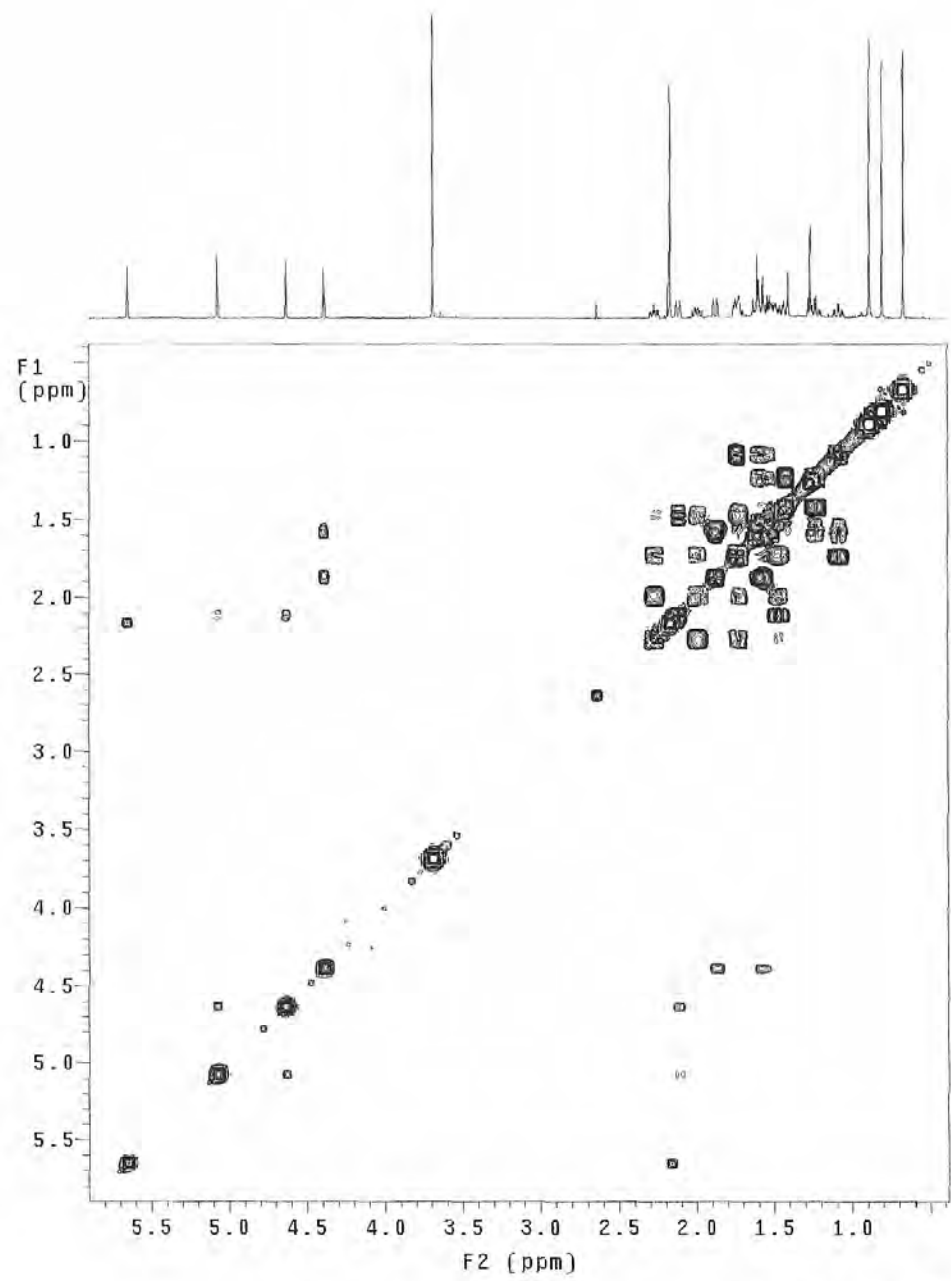
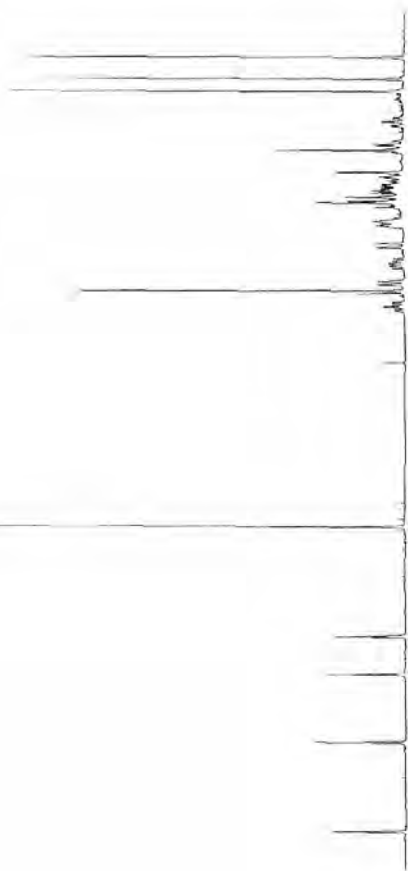
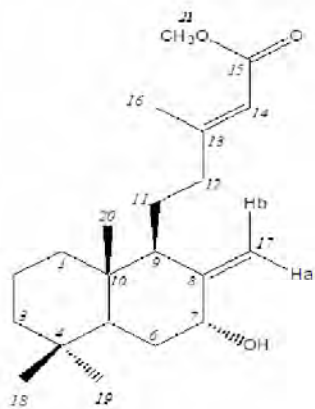
ESPECTRO 6



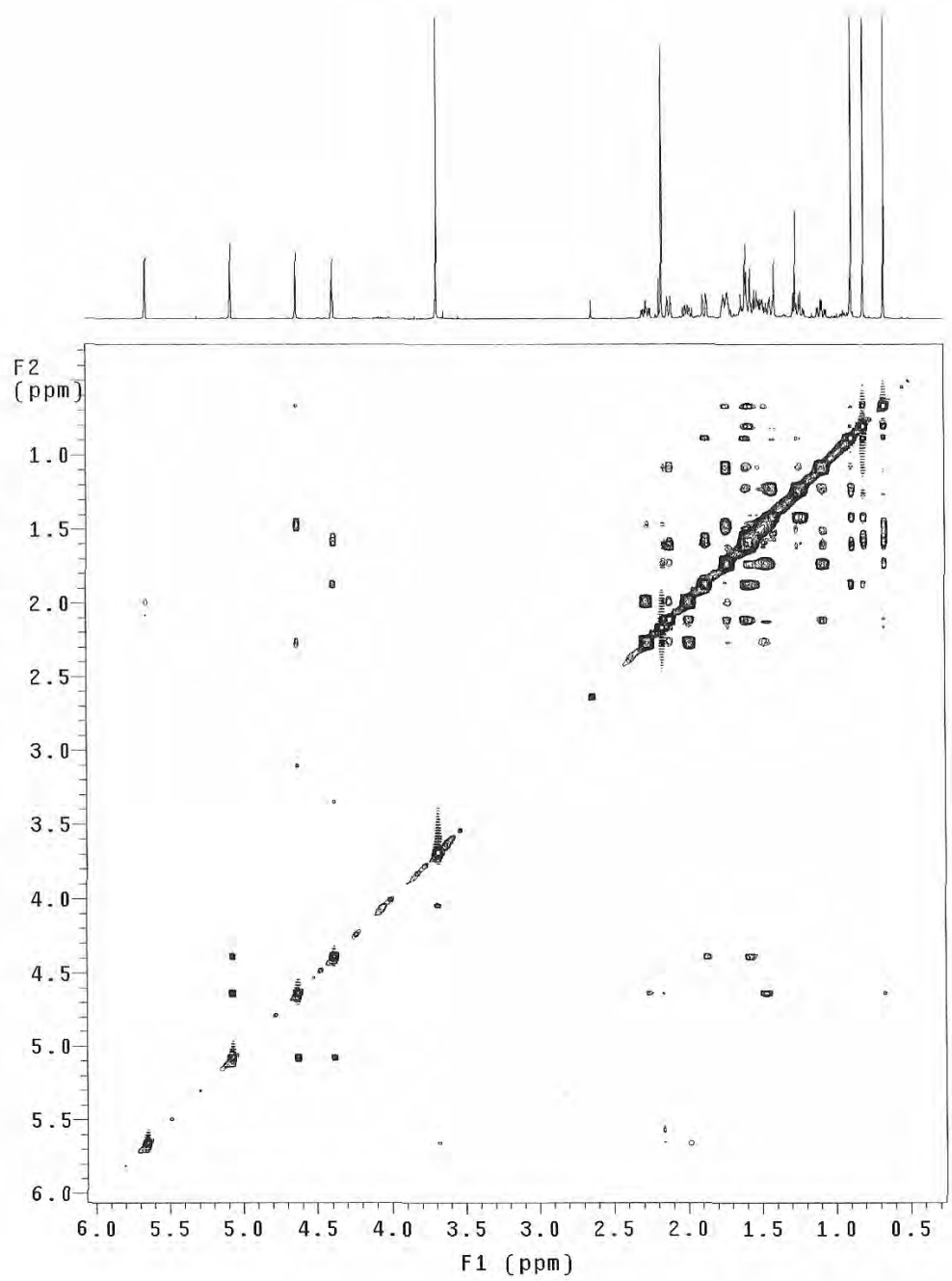
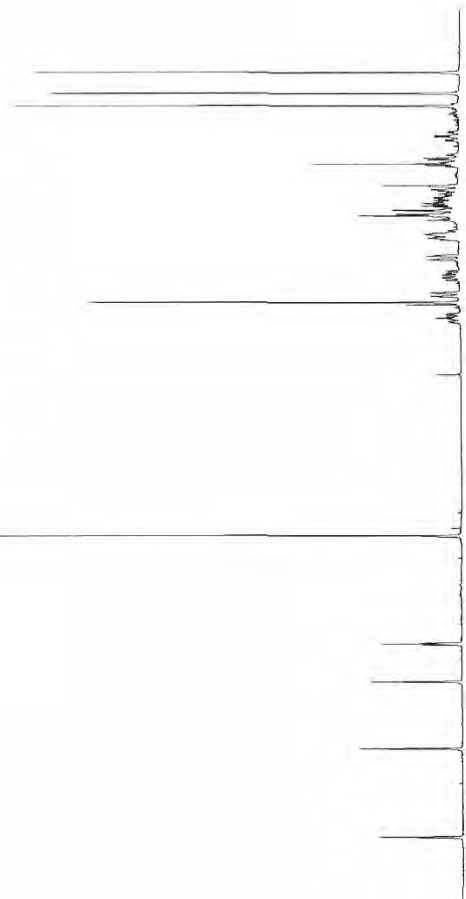
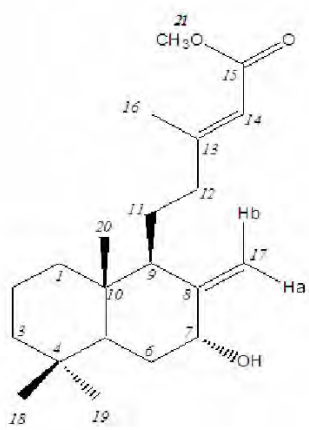
ESPECTRO 7

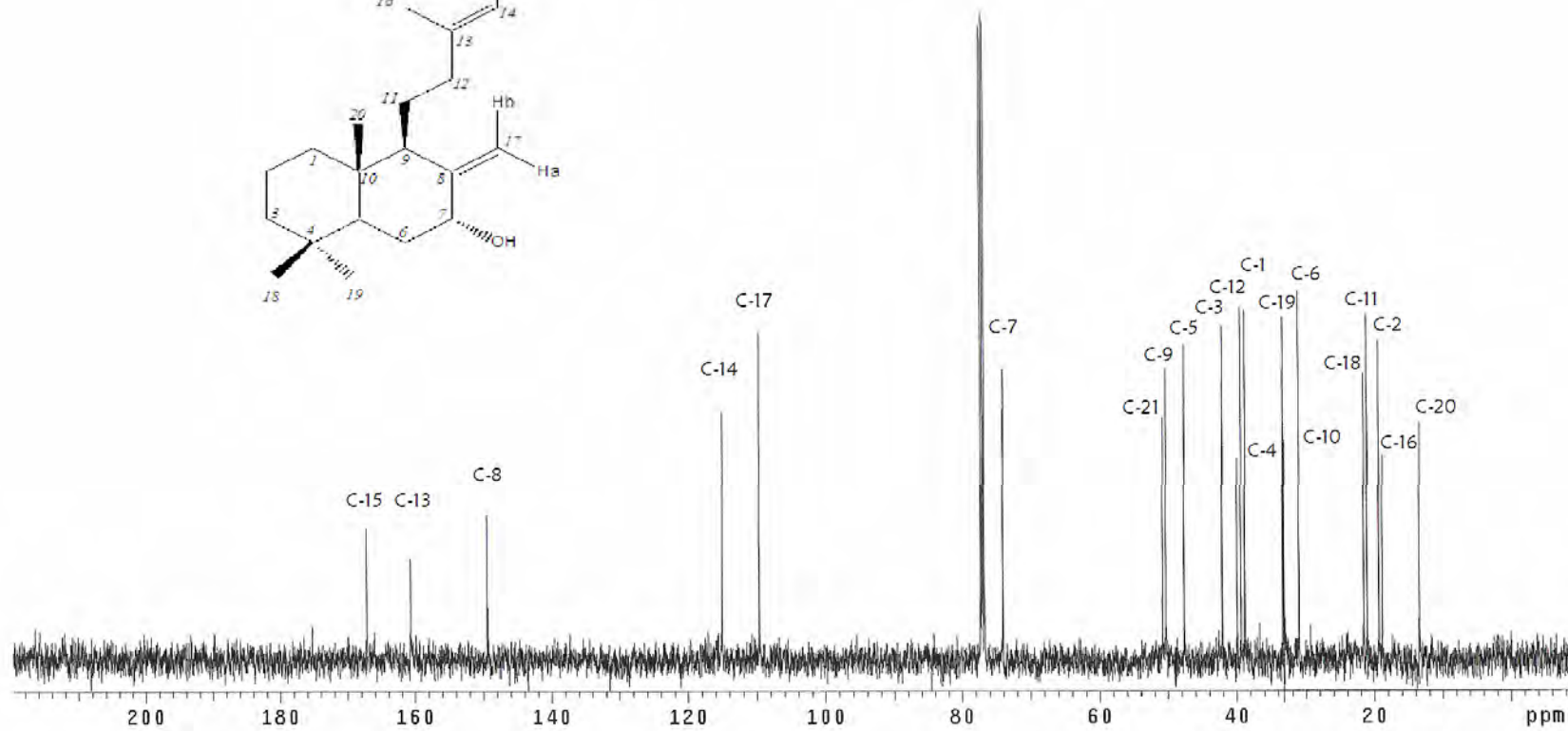
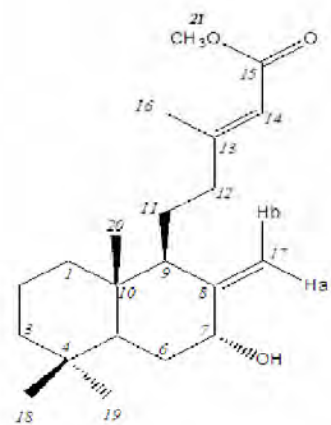


ESPECTRO 8

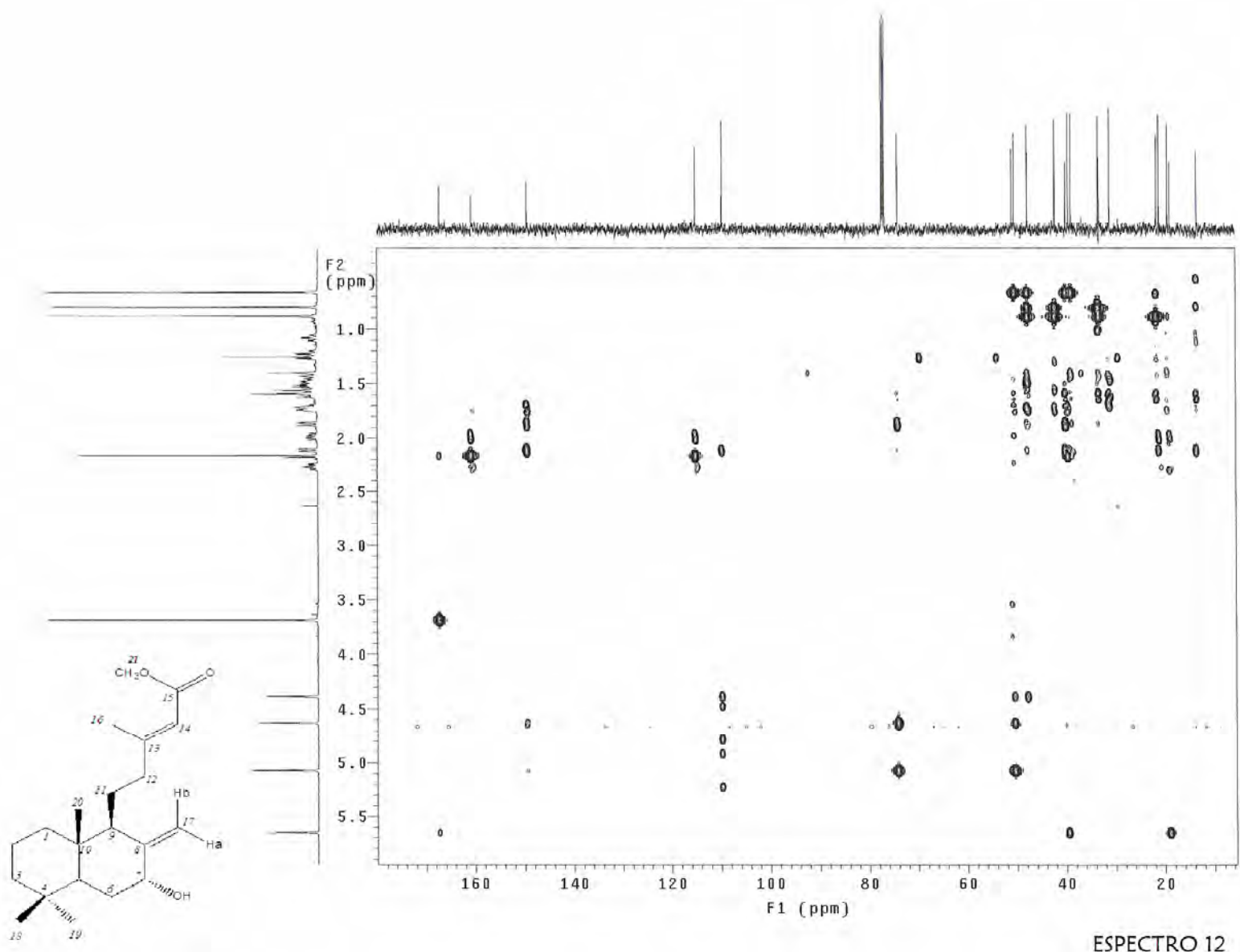


ESPECTRO 9

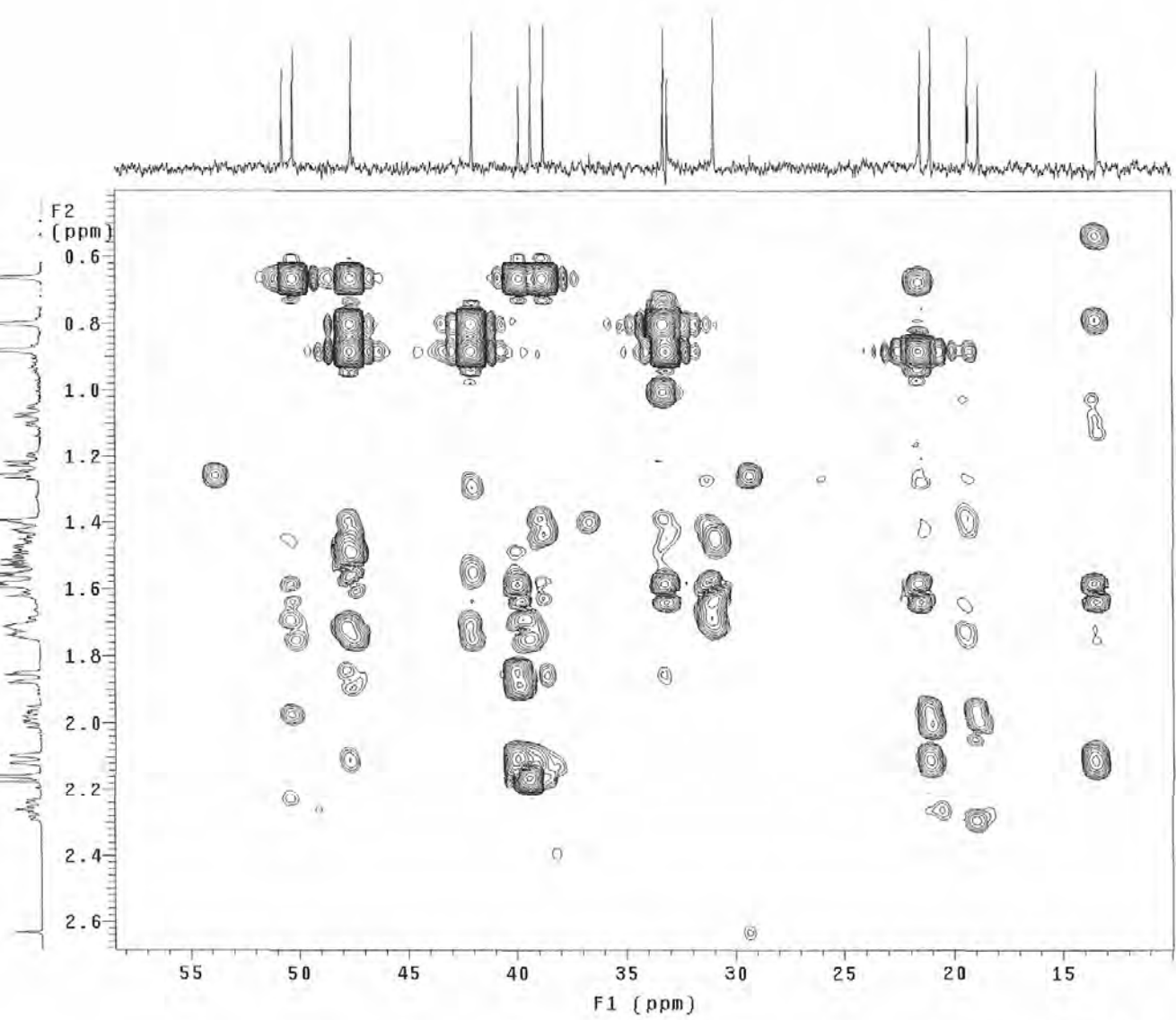
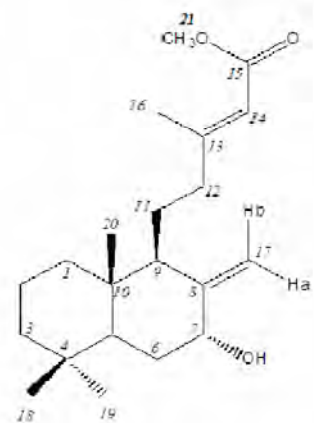




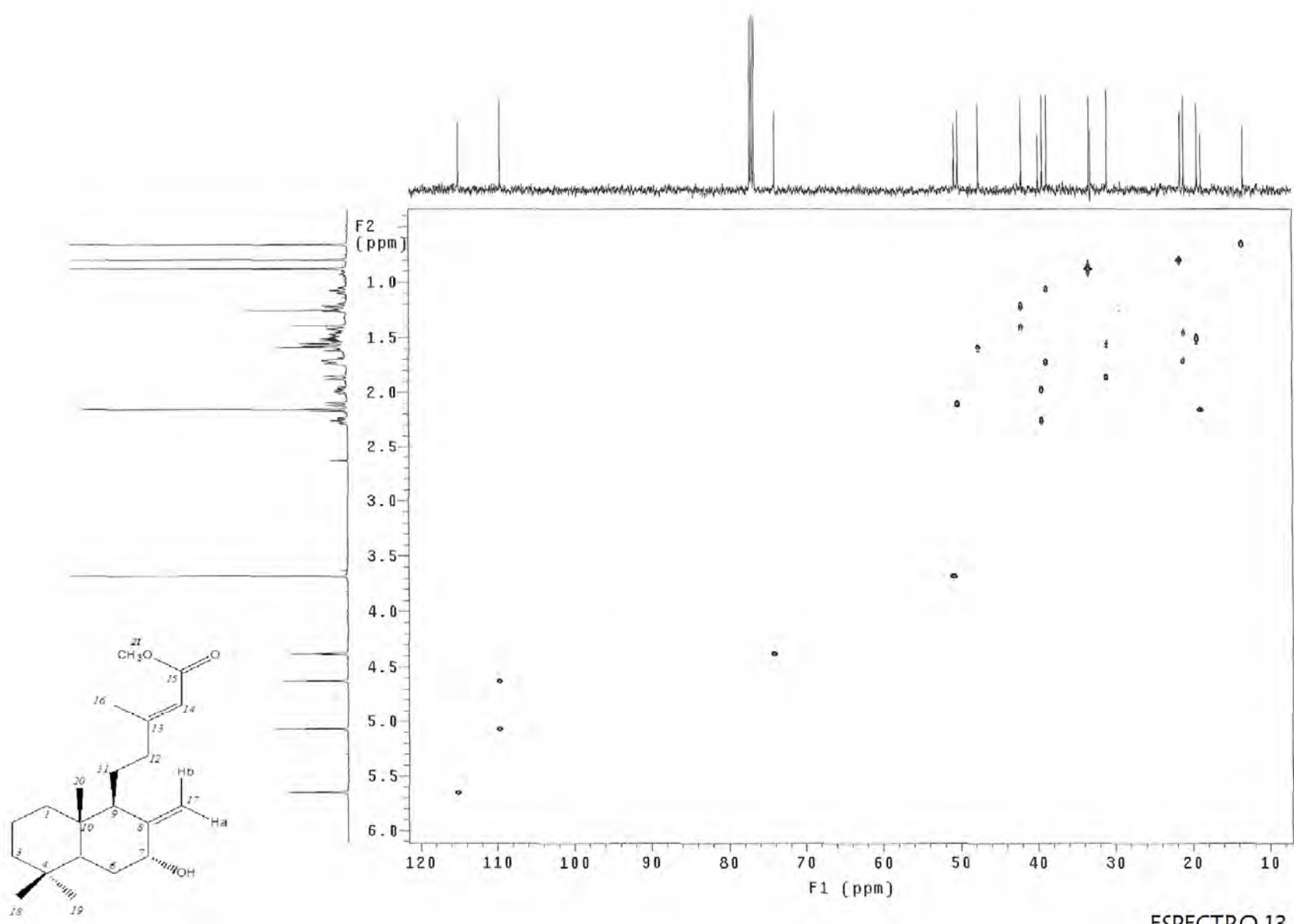
ESPECTRO 11



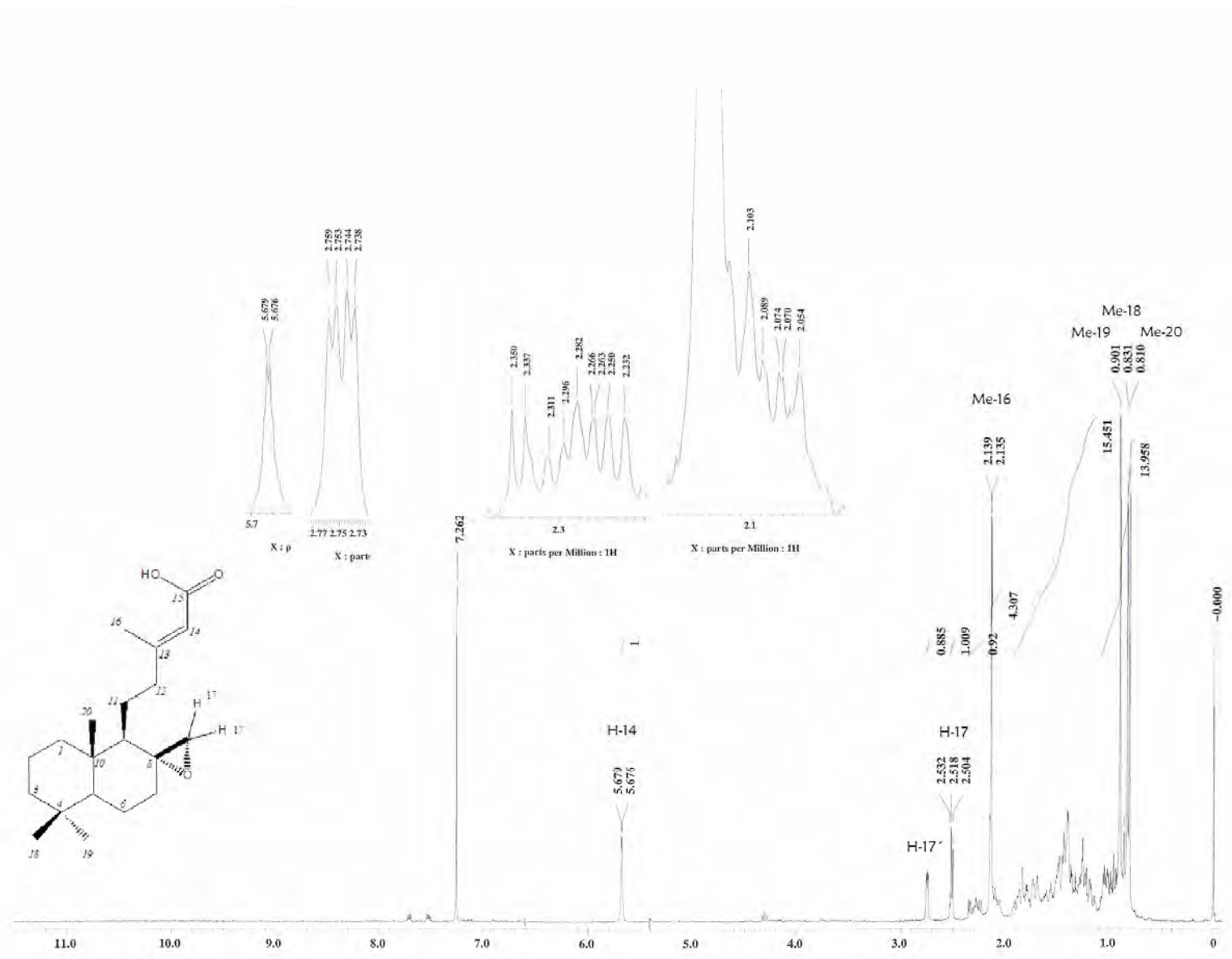
ESPECTRO 12



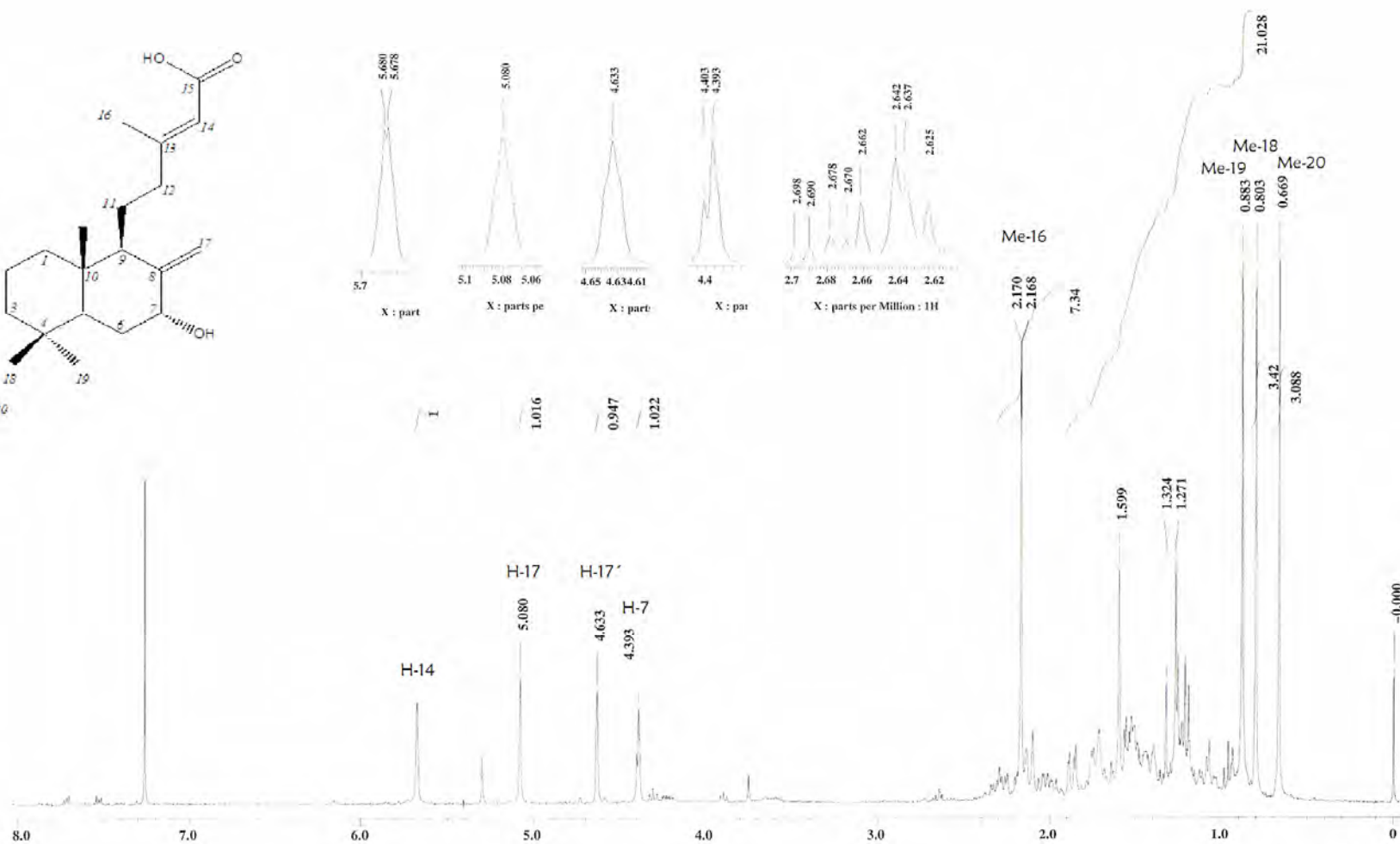
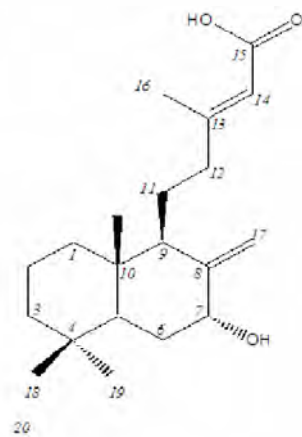
ESPECTRO 12A



ESPECTRO 13



ESPECTRO 14



ESPECTRO 15

Antifeedant Activity of Anticopalic Acid Isolated from *Vitex hemsleyi*

Clarisa Villegas Gómez, Mariano Martínez-Vázquez*, and Baldomero Esquivel

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Cd. Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Fax: +52 56 16 22 03.

E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **64c**, 502–508 (2009); received March 4/April 1, 2009

The known labdane-type diterpenoids anticopalic acid (**1**) and 3 β -hydroxyanticopalic acid (**2**) were isolated from extracts of the aerial parts of *Vitex hemsleyi* Briq. (Labiatae). The acid **1** showed an antifeedant, dose-dependent activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). To our knowledge this is the first report on the antifeedant activity of a labdane-type diterpene against *S. frugiperda*.

Key words: *Vitex hemsleyi*, Antifeedant Activity, Anticopalic Acid, *Spodoptera frugiperda*

Introduction

The genus *Vitex* (Labiatae) includes approximately 250 species which grow principally within tropical and subtropical regions (Harley *et al.*, 2004; Walsingham and Atkins, 2006).

Several species of this genus have been studied by means of their putative biological properties. For instance, previous studies showed that some extracts of *Vitex* species possess activities such as antihypertensive (Ladeji *et al.*, 1996), cytotoxic (Díaz *et al.*, 2003), anti-inflammatory (Dharmasiri *et al.*, 2003), bactericide (Kawazoe *et al.*, 2001), antiallergic (Shin *et al.*, 2000), fungicide (Sathiaoorthy *et al.*, 2007), and antiviral (Woradulayapinij *et al.*, 2005), as well as cause dermatological problems (Azhar-ul-Haq *et al.*, 2006). They are also used to treat the premenstrual syndrome (Webster *et al.*, 2006).

It is well known that a considerable number of species, besides their popular use as medicine in many countries, possess insecticidal activities; such is the case for some *Vitex* species. For example, it has been observed that *V. hemsleyi* is not attacked by insects in its habitat (Dirzo and Carrasco, 2002). In addition extracts from both *V. trifolia* and *V. negundo* showed insecticidal activities. Even more, *V. trifolia* was active against *Aedes aegypti* (Tawatsin *et al.*, 2006), while *V. negundo* was active against *Sitotroga cerealella* (Krishnarajah *et al.*, 1985).

Conversely, it is recognized that diterpenes, sesquiterpenes and procenes, among other secondary

metabolites, are responsible for the antifeedant and insecticidal activities shown by several plants. It is worth noting that numerous groups of diterpenoids with antifeedant properties are clerodanes, isolated mainly from plants of the Labiatae family. Clerodin, ajugarins and jodrellin A are the best known members of this group (Paruch *et al.*, 2001). Furthermore, epoxy derivatives of clerodane-type diterpenes such as 6-acetylteucjaponin showed antifeedant activity against *Tenebrio* spp., *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera littoralis*, supporting a similar neuroreceptor-mediated taste regulation for these insects (González-Coloma *et al.*, 2005). On the other hand, studies on diterpene-type labdanes as antifeedant agents are scarce. For instance, 8(20),13-ent-labdadien-16,15-olide-19-oic acid isolated from *Eupatorium bunii-folium* H et A showed antifeedant activity against *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera:Tenebrionidae) in a non-choice test (Cifuentes *et al.*, 2002). The antifeedant activity of *trans*-communic acid against *Spodoptera litura* at 20 μ g/disk doses has also been reported; however, at 2 μ g/disk it reversed its activity. The reason for this change is ambiguous and it is still under study (Fukushima *et al.*, 2001).

As a contribution to the chemistry and biological knowledge of *Vitex* species, now we wish to report the isolation of anticopalic acid (**1**) and 3 β -hydroxyanticopalic acid (**2**) among other secondary metabolites from *Vitex hemsleyi*. The evaluation of **1** and **2** as antifeedant agents is also

reported. It is worth to note that this is the first report on the antifeedant activity of labdane-type diterpenes against *Spodoptera frugiperda*.

Material and Methods

Plant material

Vitex hemsleyi Briq. (Labiatae) leaves were collected at Morelos, México. A voucher specimen (24979) was deposited at the herbarium of Centro de Educación Ambiental de la Sierra de Huautla, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

General experimental procedures

The melting points were determined in a Mel Temp II apparatus in open capillary tubes and are uncorrected. The optical rotations were measured at room temperature using a Perkin-Elmer 343 polarimeter (concentration in g/100 mL). The IR spectra were recorded using a FT-IR Bruker Tensor 27 spectrophotometer. The NMR spectra were determined on a Varian Unity 300 or Jeol Eclipse 300 NMR spectrometer, the chemical shifts (δ) are reported in ppm and J values in Hz. Mass spectra were obtained with a Jeol JMS-SX 102A or JMS-AX 505 HA mass spectrometer. The identification and purity of compounds were monitored by TLC on silica gel. Flash chromatography was performed using silica gel 200–400 mesh.

Extraction and isolation

Dried and finely powdered leaves of *V. hemsleyi* (620 g) were extracted for 72 h with methanol (15 L) at room temperature. Elimination of the solvent by distillation at reduced pressure afforded a crude extract (76.5 g). The extract was dissolved in a mixture of methanol and water and extracted with hexane and dichloromethane successively. Elimination of the solvents by distillation at reduced pressure afforded the hexane (33.3 g) and the dichloromethane (2.4 g) extracts, respectively. Evaporation of the methanol/water mixture at reduced pressure afforded a polar extract.

Results of evaluation of the antifeedant activity showed that only the hexane and dichloromethane extract were active. In order to find the probable active compounds, these extracts were submitted to a chromatographic analysis and the secondary

metabolites isolated were determined by spectroscopic methods.

The hexane extract was subjected to column chromatography on silica gel and eluted with hexane/AcOEt mixtures of increasing polarity, which yielded anticopalic acid (**1**) (3 g), 2-methyloctacosane (**3**) (42.3 mg), dehydroabietic acid methyl ester (**4**) (52 mg), 3 β -acetoxy-20(29)-lupene (**5**) (15.6 mg), β -sitosterol (**6**) (96 mg), gardenin D (**7**) (3.0 mg), and gardenin B (**8**) (82.5 mg) (Fig. 1).

Chromatography of the dichloromethane extract on silica gel gave a mixture of 4-hydroxybenzaldehyde and vanillin (**9**) (5.4 mg) and 3 β -hydroxyanticopalic acid (**2**) (638.6 mg) (Fig. 1).

Because the literature spectral data of anticopalic acid (**1**) and 3 β -hydroxyanticopalic acid (**2**) are not complete we now report their ^{13}C NMR and MS data.

Anticopalic acid (**1**): Colourless oil. – $[\alpha]_{\text{D}} = +44.3^{\circ}$ (c 10, CHCl_3). – ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.68 (s , 3, 20-H), 0.80 (s , 3, 18-H), 0.87 (s , 3, 19-H), 2.17 (d , 3, J = 1.2 Hz, 16-H), 4.48 (br s , 1, 17'-H), 4.85 (br s , 1, 17-H), 5.67 (qd , 1, J = 1.2 Hz, H-14). – ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.5 (C-20), 19.2 (C-18), 19.3 (C-16), 19.4 (C-2), 21.5 (C-11), 21.7 (C-19), 24.4 (C-6), 38.3 (C-7), 39.1 (C-1), 40.1 (C-3 and C-10), 42.1 (C-12), 55.5 (C-5), 56.1 (C-9), 114.7 (C-14), 148.3 (C-8), 164.1 (C-13), 171.9 (C-15). – IR (film): $\nu_{\text{max}} = 3072, 1687, 1636, 886\text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 304$ [M^+] (27.5), 289 (78.5), 205 (45.0), 177 (42.7), 137 (100), 123 (63.0), 109 (62.0), 81 (72.0), 69 (42.0).

3 β -Hydroxyanticopalic acid (**2**): White amorphous solid; m.p. 140 $^{\circ}\text{C}$. – $[\alpha]_{\text{D}} = +29.4^{\circ}$ (c 0.85, CH_3OH). – ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , DMSO-d_6): δ = 0.68 (s , 3, 20-H), 0.76 (s , 3, 18-H), 0.99 (s , 3, 19-H), 2.14 (d , 3, J = 1.17 Hz, 16-H), 3.23 (dd , 1, J = 11.43, 4.71 Hz, 3-H), 4.51 (br s , 1, 17'-H), 4.85 (br s , 1, 17-H), 5.64 (qd , 1, J = 1.17 Hz, 14-H). – ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 - DMSO-d_6): δ = 14.2 (C-20), 15.2 (C-18), 18.5 (C-16), 21.3 (C-11), 23.7 (C-6), 27.6 (C-2), 28.1 (C-19), 36.8 (C-1), 37.8 (C-7), 39.3 (C-4), 39.4 (C-10), 40.1 (C-12), 54.3 (C-5), 55.5 (C-9), 78.1 (C-3), 106.4 (C-17), 115.6 (C-14), 147.5 (C-8), 159.9 (C-13), 168.6 (C-15). – IR (nujol): $\nu_{\text{max}} = 3353, 3072, 1693, 1651, 894\text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 320$ [M^+] (12.5), 302 (40.1), 287 (40.2), 203 (37.1), 175 (21.0), 135 (100), 107

(40.2). – HREIMS: $m/z = 320.2349 [M^+]$; calcd. for $C_{20}H_{32}O_3$, 320.2351.

Esterification of **1**

The synthesis of anticopalic acid methyl ester (**10**) was carried out according to Arndt *et al.* (1946). Therefore, 20 mL of a solution of diazomethane in diethyl ether were added to a diethyl ether solution of anticopalic acid (1 g) at 5 °C. The mixture was left for 1 h, and the progress of the reaction was monitored by TLC. When the reaction was completed, the solvent was evaporated under low pressure, and the residue was purified on silica gel using a mixture of hexane and ethyl acetate (60:40) as eluent to give anticopalic acid methyl ester (**10**) in 78.2% yield.

Anticopalic acid methyl ester (10): Colourless oil. – $[\alpha]_D^{25} = +25^\circ$ (CH₃OH). – ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.68$ (s, 3, 20-H), 0.80 (s, 3, 18-H), 0.87 (s, 3, 19-H), 2.17 (d, 3, $J = 1.2$ Hz, 16-H), 4.49 (br s, 1, 17'-H), 4.84 (br s, 1, 17-H), 5.65 (qd, 1, $J = 1.2$ Hz, 14-H), 3.69 (s, 3, -OCH₃). – ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.4$ (C-20), 18.9 (C-16), 21.7 (C-18), 33.6 (C-19), 50.6 (C-21), 106.3 (C-17), 114.9 (C-14), 148.3 (C-8), 161.2 (C-13), 167.3 (C-15). – IR (film): $\nu_{\max} = 1720, 1647, 888 \text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 319 [M+1]$ (58.0), 303 (93.1), 287 (33.5), 205 (55.5), 137 (100), 114 (95.0), 95 (77.2).

Epoxidation of **10**

A dry solution of *m*-chloroperbenzoic acid (108.3 mg) in dichloromethane (10 mL) was added dropwise to a cooled (0 °C) and stirred solution of **10** (200 mg) in dichloromethane (10 mL). The mixture was stirred for 24 h at room temperature. The reaction was monitored by TLC. When the reaction was completed, the solvent was evaporated under reduced pressure at room temperature, and the crude compound was purified on silica gel using a mixture of hexane and ethyl acetate (90:10) as eluent to give 8,17 β -epoxyanticopalic acid methyl ester (**11**) in 85.7% yield.

8,17 β -Epoxyanticopalic acid methyl ester (11): Colourless oil. – ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.80$ (s, 1, 20-H), 0.89 (s, 1, 19-H), 0.82 (s, 1, 18-H), 2.12 (d, 3, $J = 1.7$ Hz, 16-H), 2.50 (d, 1, $J = 4.11$ Hz, 17-H), 2.74 (dd, 1, $J = 4.11, 1.7$ Hz, 17'-H), 3.68 (s, 3, -OCH₃), 5.65 (qd, 1, $J = 1.7$ Hz, 14-H). – IR (film): $\nu_{\max} = 1719, 1647, 1224 \text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 334 [M^+]$ (5.0), 289 (15.0), 205 (27.0), 177

(53.5), 109 (70.0), 95 (98.0), 69 (100), 41 (86.5), 28 (59.0).

Oxidation of **10**

The oxidation of **10** was accomplished according to the method described by Umbreit and Sharpless (1977). 16.3 mg (0.05 mol) of SeO₂ were dissolved in 1 mL of dichloromethane. The solution was stirred, and 65 μ L (0.2 mol) of *tert*-butylhydroperoxide were added to the solution. The mixture was stirred for 30 min at 5 °C, and then 30.4 mg (0.1 mol) of **10**, previously dissolved in 1 mL of dichloromethane, were added. The mixture was stirred for 48 h at 25 °C. Finally, the solution was evaporated *in vacuo* and the reaction mixture was purified by column chromatography to give 7 α -hydroxyanticopalic acid methyl ester (**12**) in 54.8% yield.

7 α -Hydroxyanticopalic acid methyl ester (12): Colourless oil. – ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.66$ (s, 1, 20-H), 0.80 (s, 1, 18-H), 0.88 (s, 1, 19-H), 2.10 (br dd, 1, $J = 1.5, 11.0$ Hz, 9-H), 2.16 (d, 3, $J = 1.5$ Hz, 16-H), 3.68 (s, 3, -OCH₃), 4.38 (ddd, 1, $J = 3.0, 5.5$ Hz, 7-H), 4.62 (br t, 1, 17_b-H), 5.07 (br t, 1, 17_a-H), 5.65 (qd, 1, $J = 1.0$ Hz, 14-H). – ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 38.7$ (C-1), 19.3 (C-2), 42.0 (C-3), 39.8 (C-4), 47.6 (C-5), 30.9 (C-6), 74.0 (C-7), 149.4 (C-8), 50.2 (C-9), 33.1 (C-10), 21.0 (C-11), 39.3 (C-12), 160.7 (C-13), 115.0 (C-14), 167.2 (C-15), 18.8 (C-16), 109.6 (C-17), 21.5 (C-18), 33.2 (C-19), 13.4 (C-20), 50.7 (C-21). – IR (film): $\nu_{\max} = 3471, 1719, 1647, 862 \text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 334 [M^+]$ (5.0), 317 (5.0), 221 (29.0), 203 (40.0), 123 (100), 114 (66.5), 82 (83.0), 55 (49.0), 41 (38.5).

8,17 β -Epoxyanticopalic acid (**13**)

The epoxide derivative of anticopalic acid was obtained following the same procedure used for the synthesis of compound **11**.

8,17 β -Epoxyanticopalic acid (13): Colourless oil. – ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.81$ (s, 1, 20-H), 0.83 (s, 1, 18-H), 0.90 (s, 1, 19-H), 2.13 (d, 3, $J = 1.2$ Hz, 16-H), 2.50 (d, 1, $J = 4.2$ Hz, 17-H), 2.75 (dd, 1, $J = 4.5, 1.8$ Hz, 17'-H), 5.67 (qd, 1, $J = 0.9$ Hz, 14-H). – IR (film): $\nu_{\max} = 2945, 1689, 1253, 838 \text{ cm}^{-1}$. – EIMS: $m/z = 320 [M^+]$ (4.0), 302 (15.0), 275 (28.0), 205 (45.0), 177 (54.5), 149 (67.5), 137 (96.0), 95 (98.0), 69 (100), 55 (63.0), 41 (68.5).

7 α -Hydroxyanticopalic acid (14)

The oxide derivative of anticopalic acid was obtained following the same procedure used for the synthesis of compound **12**.

7 α -Hydroxyanticopalic acid (14): Colourless oil. – $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.66 (s, 1, 20-H), 0.80 (s, 1, 18-H), 0.88 (s, 1, 19-H), 2.16 (d, 3, J = 0.6 Hz, 16-H), 4.39 (t, 1, 7-H), 4.63 (br s, 1, 17'-H), 5.08 (br s, 1, 17-H), 6.68 (d, 1, J = 0.6 Hz, 14-H). – IR (film): ν_{max} = 3345, 3078, 1691, 1642, 868 cm^{-1} . – EIMS: m/z = 320 [M^+] (3.0), 302 (14.0), 287 (17.5), 221 (27.0), 203 (35.0), 149 (75.0), 123 (100), 109 (32.5), 82 (52.0), 69 (48.5).

Insect rearing

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae) larvae were reared on artificial diet (Céspedes *et al.*, 2000) at $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$, >70% relative humidity, with a photoperiod of 16 h:8 h light:dark in a growth chamber.

Insect bioassay

The bioassay was conducted by a choice method (choice feeding assay). These experiments were conducted with sixth-instar (L-6) *S. frugiperda* larvae. *Spinaceae oleraceae* leaf disks were treated on the upper surface with 10 μL of the test compound. Two treated and two control disks were placed on five agar-coated Petri dishes with two insects (*S. frugiperda*), which were allowed to feed under the conditions described above (Mazoir *et al.*, 2008). Each experiment was repeated three times. Feeding was terminated after the consumption of 75% of the control or treated disk. Feeding inhibition (FI) was calculated as $\% \text{FI} = [1 - (\text{T}/\text{C})] \cdot 100$, where T and C are the consumption of treated and control leaf disks, respectively (Reina *et al.*, 2001). Compounds with an FI value >50% were tested in a dose-response experiment to calculate their relative potency (EC_{50} values, the effective dose for 50% of feeding inhibition); this was determined from linear regression analysis (% FI on log dose).

Results and Discussion

The chromatographic analyses of the hexane and dichloromethane extracts of aerial parts of *V. hemsleyi* led to the isolation of anticopalic acid (**1**) and 3 β -hydroxyanticopalic acid (**2**), respec-

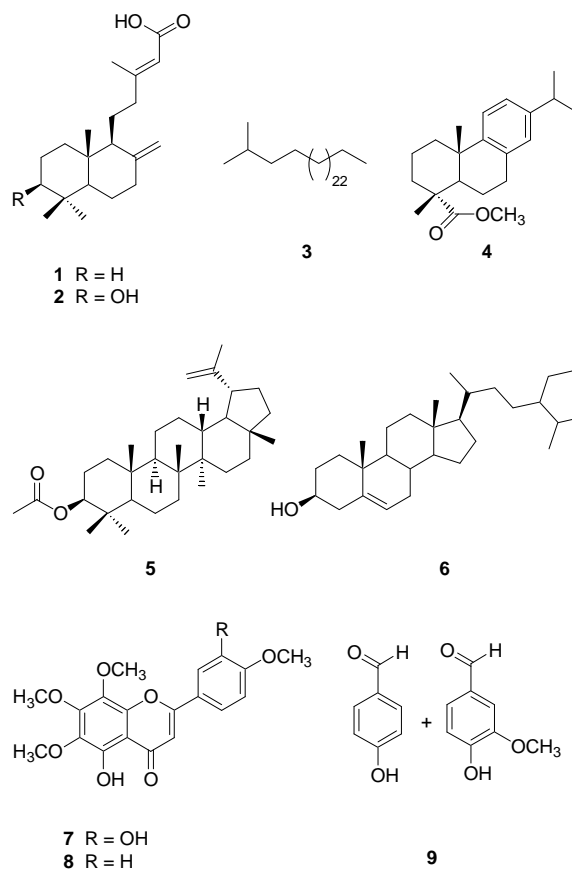


Fig. 1. Chemical structures of the secondary metabolites isolated from extracts of *Vitex hemsleyi*.

tively (Fig. 1). Curiously **1** and **2** have been previously isolated from *Pinus monticola* and *P. strobus* (Pinaceae) (Zinkel and Spalding, 1972; Zinkel and Magee, 1987). Since there is no taxonomic relationship between the genera *Vitex* and *Pinus*, the presence of **1** and **2** in both genera constitutes a chemical coincidence (Seaman, 1982).

Previous studies showed that the presence of diverse functional groups like epoxy, halohydrin, furanyl, or hydroxy groups is a common structural feature for a number of bioactive molecules (Gebbinck *et al.*, 2002). Taking this into account and in order to establish a structure-activity relationship, we decided to synthesize some derivatives (Fig. 2), by chemical means, of the active anticopalic acid (**1**) and evaluate their antifeedant activity.

The conversions were focused mainly on the positions 7, 8–17 and 15 by several reactions.

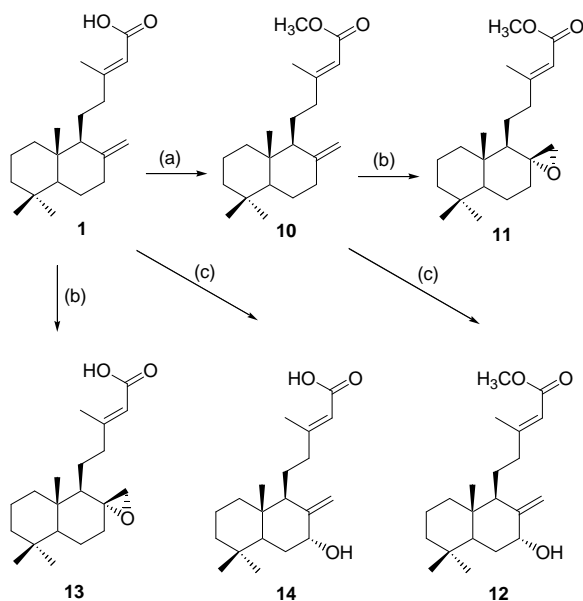


Fig. 2. Scheme of the synthesis of anticopalic acid derivatives. (a) Diazomethane, diethyl ether. (b) *m*-Chloroperbenzoic acid, CH_2Cl_2 . (c) SeO_2 , *tert*-butylhydroperoxide, CH_2Cl_2 .

The experimental conditions to obtain the derivatives **10–14** from **1** are outlined in Fig. 2.

Treatment of **1** with diazomethane in diethyl ether afforded the expected anticopalic acid methyl ester (**10**). This compound was previously isolated from *Agathis lanceolata* resin (Manh *et al.*, 1983), *Pinus strobus* (Zinkel and Magee, 1987), and *Trachylobium verrucosum* resin (Hugel *et al.*, 1996). The physical and spectroscopic data of **10** were consistent with those previously reported.

Treatment of **10** with *m*-chloroperbenzoic acid in dichloromethane gave 8,17 β -epoxyanticopalic acid methyl ester (**11**). This transformation was easily confirmed by the inspection of the ^1H NMR spectrum of **11**, where the lack of the signals assigned to the protons of an exocyclic double bond and the presence of protons of an epoxy group as a doublet at δ 2.50 ($J = 4.11$ Hz) and an AB system at δ 2.74 ($J = 4.11, 1.7$ Hz), respectively, are worth to be noted. The rest of the signals of the ^1H NMR spectrum, as well as the MS spectrum, are in full agreement with the proposed structure (see Materials and Methods).

The reaction of **10** with selenium dioxide and *tert*-butylhydroperoxide in dichloromethane gave 7 α -hydroxyanticopalic acid methyl ester (**12**). The

Table I. Antifeedant effects (% FI \pm S.E.) of compounds **1**, **2** and **10–14** against *S. frugiperda* larvae.

Compound	% FI ^a
1	81.70 \pm 2.8 ^{a, b}
2	3.53 \pm 7.3
10	-11.57 \pm 8.8
11	19.04 \pm 2.0
12	29.68 \pm 8.0
13	5.23 \pm 2.4
14	-3.22 \pm 3.7

^a % FI = $[1 - (T/C)] \cdot 100$, where T and C are the consumed leaf area of treated and control leaf disks, respectively, represented as mean values \pm standard error.

^b EC_{50} = 90.6 (83.6, 98.1). Effective antifeedant dose (EC_{50}) and 95% confidence limits (lower, upper).

* $p < 0.05$, Wilcoxon paired-rank test (Moreno-Osorio *et al.*, 2008).

^1H NMR spectrum of **12** showed the presence of a hydroxy group in C-7 position (Fig. 2) [δ 4.38 (*ddd*, $J = 3.0, 5.5$ Hz)], as well as a proton in C-9 position [δ 2.10 (*br dd*, $J = 1.5$ Hz)]. The ^{13}C NMR spectrum of **12** showed the C-7 and C-9 carbon atoms at δ 74.0 and 50.2 ppm, respectively. These structural features were confirmed by the assistance of COSY, NOESY, HMBC and HMQC experiments.

The derivatives **13** and **14** were obtained from **1** following the same procedures used to obtain **11** and **12** from anticopalic acid methyl ester (**10**). The spectroscopic data of **13** and **14** were in full agreement with their proposed structures (see Materials and Methods).

Taking into account, that some clerodanes and labdane diterpenoids possess strong antifeedant activity (Gebbinck *et al.*, 2002), we decided to evaluate the antifeedant activity of **1** and **2**. The results showed that **1** is more active than **2** (Table I), since the only difference between **1** and **2** is the presence of a β -orientated hydroxy group at C-3 in the later; the absence of this moiety at C-3 is important to increase the activity.

None of the derivatives tested were more active than **1** (Table I). These results, also, indicated that slight changes in the chemical structure of **1** decrease the activity. For example, anticopalic acid methyl ester (**10**) was inactive, although its epoxide **11** and 7 α -hydroxyanticopalic acid methyl ester (**12**) showed a moderate activity. The inclusion of an epoxy group at C-8/C-17, like in **13** or

a 7 α -hydroxy moiety, like in **14** in **1** accomplished the increase of the activity of the derivatives.

None of the derivatives **10**–**14** were more active than the original diterpene **1**, which showed an excellent antifeedant activity (IC₅₀ = 90.6 ppm) against *S. frugiperda* indicating its potential use as antifeedant agent. It is worth to note, that this is the first report on a labdane-type diterpene active against *S. frugiperda*, as well as the first phytochemical study on *Vitex hemsleyi*.

Acknowledgements

C. V. G. appreciates the scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for her doctoral studies at Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. We are also grateful to Ms. Laura Patricia Lina García, UAEM, for technical assistance.

- Arndt F., Noller C. R., and Bergsteinsson I. (1946), Diazomethane. Organic Syntheses. Collective Vol. II. John Wiley & Sons, New York, pp. 165–167.
- Azhar-ul-Haq, Malik A., Khan M. T. H., Anwar-ul-Haq, Khan S. B., Ahmad A., and Choudhary M. I. (2006), Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn. and their structure-activity relationship. *Phytomedicine* **13**, 255–260.
- Céspedes C. L., Calderón J. S., Lina L., and Aranda E. (2000), Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1903–1908.
- Cifuentes D. A., Borkowski E. J., Sosa M. E., Gianello J. C., Giordano O. S., and Tonn C. E. (2002), Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. *Phytochemistry* **61**, 899–905.
- Dharmasiri M. G., Jayakody J. R. A. C., Galhena G., Liyanaje S. S. P., and Ratnasooriya W. D. (2003), Anti-inflammatory and analgesic activities of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. *J. Ethnopharmacol.* **87**, 199–206.
- Díaz F., Chávez D., Lee D., Mi Q., Chai H., Tan G. T., Kardono L. B. S., Riswan S., Fairchild C. R., Wild R., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Pezzuto J. M., and Kinghorn D. (2003), Cytotoxic flavone analogs of vitexicarpin, a constituent of the leaves of *Vitex negundo*. *J. Nat. Prod.* **66**, 865–867.
- Dirzo R. and Carrasco V. (2002), Variación interespecífica en la Herbivoría en Plantas de Fenología Contrastante en la Selva Baja de Huautla. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., p. 36.
- Fukushima J.-I., Yatagai M., and Ohira T. (2001), Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtuse*. *J. Wood Sci.* **48**, 326–330.
- Gebbinck E. A. K., Jansen B. J. M., and de Groot A. (2002), Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. *Phytochemistry* **61**, 737–770.
- González-Coloma A., Guadano A., Tonn C. E., and Sosa M. (2005), Antifeedant/insecticidal terpenes from Asteraceae and Labiatae species native to Argentinean semiarid lands. *Z. Naturforsch.* **60c**, 855–861.
- Harley R. M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P. D., Conn B., Grayer R., Harley M. M., Kok R., de Kretovskaja T., Morales A., Paton A. J., Ryding O., and Upson T. (2004), Labiatae. In: The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. VII (Kadereit J. W., ed.). Springer, Berlin, pp. 167–275.
- Hugel G., Oehlschlager A. C., and Ourisson G. (1996), The structure and stereochemistry of diterpenes from *Trachylobium verrucosum*. *Tetrahedron Suppl.* **8** Part I, 203–216.
- Kawazoe K., Yutani A., Tamemoto K., Yuasa S., Shibata H., Higuti T., and Takaishi Y. (2001), Phenyl-naphthalene compounds from the subterranean part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* **64**, 588–591.
- Krishnarajah S. R., Ganesalingam V. K., and Senanayake U. M. (1985), Repellency and toxicity of some plant oils and their terpene components to *Sitotroga cerealella* (Olivier) (Lepidoptera:Gelechiidae). *Trop. Sci.* **25**, 249–252.
- Ladeji O., Okoye Z. S. C., and Uddoh F. (1996), Effects of *Vitex doniana* stem bark extract on blood pressure. *Phytother. Res.* **10**, 245–247.
- Manh D. D. K., Bastard J., and Fétizon M. (1983), Plantes de Nouvelle-Calédonie. LXXVII. Diterpènes d'*Agathis lanceolata*. *J. Nat. Prod.* **46**, 262–273.
- Mazoir N., Benharref A., Bailén M., Reina M., and González-Coloma A. (2008), Bioactive triterpene derivatives from latex of two *Euphorbia* species. *Phytochemistry* **69**, 1328–1338.
- Moreno-Osorio L., Cortés M., Armstrong V., Bailén M., and González-Coloma A. (2008), Antifeedant activity of some polygodial derivatives. *Z. Naturforsch.* **63c**, 215–220.
- Paruch E., Katedra C., Akad R., and Wroclaw P. (2001), Natural and synthetic insect antifeedants. Part II. *Wiad. Chem.* **55**, 119–149.
- Reina M., González-Coloma A., Gutiérrez C., Cabrera R., Rodríguez M. L., Fajardo V., and Villarroel L. (2001), Defensive chemistry of *Senecio miser* Hook. *J. Nat. Prod.* **64**, 6–11.
- Sathiaoorthy B., Gupta P., Kumar M., Chaturvedi A. K., Shukla P. K., and Maurya R. (2007), New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 239–242.
- Seaman F. C. (1982), Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* **48**, 121–537.
- Shin T.-Y., Kim S.-H., Lim J.-P., Suh E.-S., Jeong H.-J., Kim B.-D., Park E.-J., Hwang W.-J., Rye D.-G., Baek

- S.-H., An N.-H., and Kim H.-M. (2000), Effect of *Vitex rotundifolia* on immediate-type allergic reaction. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 443–450.
- Tawatsin A., Asavadachanukorn P., Thavara U., Wong-sinkongman P., Bansidhi J., Boonruad T., Chavalit-tumrong P., Soonthornchareonnon N., Komalamisra N., and Mulla M. S. (2006), Repellency of essential oils extracted from plants in Thailand against four mosquito vectors (Diptera:Culicidae) and oviposition deterrent effects against *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **37**, 915–931.
- Umbreit M. A. and Sharpless K. B. (1977), Allylic oxidation of olefins by catalytic and stoichiometric selenium dioxide with *tert*-butylhydroperoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5526–5528.
- Walsingham L. and Atkins S. (2006), A new species of *Vitex* (Labiatae) from Tanzania. *Kew Bull.* **61**, 615–617.
- Webster D. E., Lu J., Chen S.-N., Farnsworth N. R., and Wang Z. J. (2006), Activation of the μ -opiate receptor by *Vitex agnus-castus* methanol extracts: Implication for its use in PMS. *J. Ethnopharmacol.* **106**, 216–221.
- Woradulayapinij W., Soonthornchareonnon N., and Wiwat C. (2005), *In vitro* HIV tape 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. *J. Ethnopharmacol.* **101**, 84–89.
- Zinkel D. F. and Spalding B. P. (1972), Anticopalic acid in *Pinus strobus* and *P. monticola*. *Phytochemistry* **11**, 425–426.
- Zinkel D. F. and Magee T. V. (1987), Diterpene resin acids from the needle oleoresin of *Pinus strobus*. *Phytochemistry* **26**, 769–774.