

00573  
Zej  
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE TRES RUBIACEAS

USADAS EN MEDICINA TRADICIONAL:

Randia echinocarpa, Exostema mexicanum y

Simira mexicana

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

P R E S E N T A :  
(QUIMICA ORGANICA)

CARLOS ALBOR CALDERON

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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 está 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.

## A B S T R A C T

As part of a systematic chemical Research on Mexican plants used in Traditional Medicine, *Randia echinocarpa*, *Excoecaria mexicana* and *Simira mexicana*, were investigated.

Four triterpene acids (quinovic 52, oxoquinovic 53, oleonolic 35 and ursolic 36 acids), mannitol,  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -D - gluco-  $\beta$ - sitosterol were isolated from the methanolic extract of the fruit of *R. echinocarpa*.

Bioassay directed fractionation of the methanolic extract of *E. mexicana* led to the isolation of two bioactive compounds which were characterized as cucurbitacin - F - 25 - acetate 68 and cucurbitacin F 69. Both components exhibited antitumoral and antipaludic properties.

Finally, the alkaloidal fraction of the methanolic extract of the stem bark of *S. mexicana* yielded harmaline 20 and strictosamide 71. The former was toxic to *A. salina* and displayed antimalarial activity.

# I N D I C E

	página
Lista de Tablas . . . . .	i
Lista de Figuras . . . . .	iii
Lista de Esquemas . . . . .	v
Lista de Espectros . . . . .	vi
Lista de Abreviaturas . . . . .	viii
 R E S U M E N . . . . .	 ix
 I N T R O D U C C I O N . . . . .	 3
1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA RUBIACEAE . . . . .	3
1.1 Taxonomía . . . . .	3
1.2 Metabolitos secundarios de la familia Rubiaceae . . . . .	4
1.2.1 Terpenoides de la familia Rubiaceae . . . . .	4
1.2.2 Alcaloides de la familia Rubiaceae . . . . .	5
1.2.2.1 Alcaloides derivados de la secologanina . . . . .	6
1.2.2.2 Alcaloides que no derivan de la secologanina . . . . .	13
1.2.3 Neoflavonoides del tipo 4-fenil cumarina de la familia Rubiaceae . . . . .	15
1.3 Actividad biológica de algunos metabolitos de la familia Rubiaceae . . . . .	15
 O B J E T I V O S . . . . .	 20
1 Objetivos Generales . . . . .	20
2 Objetivos Especificos . . . . .	21

## CAPÍTULO I

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RANDIA ECHINOCARPA . . . . .	23
1.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GÉNERO RANDIA . . . . .	23
1.2 ASPECTOS ETNOBOTÁNICOS DE LA RANDIA ECHINOCARPA . . . . .	31
1.3 PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	35
1.3.1 Material vegetal . . . . .	35
1.3.2 Métodos de extracción y fraccionamiento . . . . .	35
1.3.3 Aislamiento y purificación de los compuestos . . . . .	37
1.3.3.1 Aislamiento de D-manitol <u>51</u> . . . . .	37
1.3.3.2 Aislamiento de $\beta$ -sitosterol <u>44</u> . . . . .	37
1.3.3.3 Aislamiento de los ácidos quinólvico <u>52</u> y oxo quinólvico <u>53</u> . . . . .	38
1.3.3.4 Aislamiento de los ácidos ursólico <u>36</u> y olean nólico <u>35</u> . . . . .	39
1.3.3.5 Aislamiento del $\beta$ -D-gluco- $\beta$ -sitosterol <u>54</u> . . . . .	40
1.3.4 Caracterización de los compuestos aislados . . . . .	40
1.3.4.1 Determinación de las constantes físicas y es pectroscópicas . . . . .	40
1.3.4.2 Preparación de derivados . . . . .	41
1.4 RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	42
1.4.1 Identificación del manitol <u>51</u> . . . . .	43
1.4.2 Identificación del $\beta$ -sitosterol <u>44</u> . . . . .	43
1.4.3 Identificación de los ácidos quinólvico <u>52</u> y oxo quinólvico <u>53</u> . . . . .	44
1.4.4 Identificación del ácido oleanólico <u>35</u> y del ácido ursólico <u>36</u> . . . . .	53

	página
1.4.5 Identificación del $\beta$ -D-glucosido- $\beta$ -sitosterol <u>54</u> .	60
1.4.6 Evaluación biológica del fido quinóico <u>52</u> .	60
1.5 CONCLUSIONES . . . . .	69

## C A P Í T U L O   I I .

COMPUESTOS CITOTÓXICOS DE LA EXOSTEMA MEXICANUM. . . . .	71
2.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO EXOSTEMA . . . . .	71
2.2 GENERALIDADES ACERCA DE LA EXOSTEMA MEXICANUM. . . . .	76
2.3 PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	77
2.3.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> . . . . .	77
2.3.1.1 Preparación de las muestras . . . . .	77
2.3.1.2 Bioensayo . . . . .	77
2.3.2 Material vegetal . . . . .	78
2.3.3 Métodos de extracción y fraccionamiento. . . . .	78
2.3.4 Aislamiento y purificación de los compuestos . . . . .	82
2.3.4.1 Aislamiento del D-manitol <u>51</u> . . . . .	82
2.3.4.2 Aislamiento del $\beta$ -sitosterol <u>44</u> . . . . .	82
2.3.4.3 Aislamiento de la 25-acetil cucurbitacina F <u>68</u> . . . . .	82
2.3.4.4 Aislamiento del $\beta$ -D-glucosido- $\beta$ -sitosterol <u>54</u> . . . . .	82
2.3.4.5 Aislamiento de la cucurbitacina F <u>69</u> . . . . .	82
2.3.4.6 Aislamiento de la 25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina F <u>70</u> . . . . .	83
2.3.4.7 Aislamiento de la 5-O- $\beta$ -D-glucosil-3',4'-di hidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58</u> . . . . .	84

	página
2.3.5 Caracterización de los compuestos aislados . . .	84
2.3.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas de los constituyentes. . . .	84
2.3.5.2 Preparación de derivados. . . . .	84
2.4 RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	85
2.4.1 Identificación de la 25-acetil cucurbitacina F <u>68</u> . . . . .	90
2.4.2 Identificación de la cucurbitacina F <u>69</u> . . . .	100
2.4.3 Identificación de la 25-acetil-2-β-D-glucopi- ranosil cucurbitacina F <u>70</u> . . . . .	103
2.4.4 Identificación de la 5-D-β-D-glucopiranosil- -3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58</u> . .	106
2.5 CONCLUSIONES . . . . .	121

## C A P I T U L O III

ALCALOIDES DE LA SIMIRA MEXICANA . . . . .	123
3.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO SIMIRA . . . .	123
3.2 ASPECTOS GENERALES DE LA SIMIRA MEXICANA . . . .	123
3.3 PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	124
3.3.1 Material vegetal . . . . .	124
3.3.2 Detección preliminar de alcaloides . . . . .	124
3.3.3 Método de extracción . . . . .	125
3.3.4 Fraccionamiento del extracto metabólico. . . .	125
3.3.5 Separación y purificación de los alcaloides. . .	125
3.3.5.1 Separación del hermano <u>20</u> de la fracción al- caloides I . . . . .	125

	página
3.3.5.2 Separación de la estrictosamida <u>71</u> . . . . .	128
3.3.6 Separación del $\beta$ -sitosterol <u>44</u> y de su derivado $\beta$ -D-glucosídico <u>54</u> . . . . .	129
3.3.7 Caracterización de los compuestos aislados . . .	130
3.3.7.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas de los constituyentes. . . .	130
3.3.7.2 Preparación de derivados. . . . .	130
3.3.8 Evaluación biológica de los alcaloides aislados	132
3.4 RESULTADOS Y DISCUSION . . . . .	133
3.4.1 Caracterización del harsano <u>20</u> . . . . .	133
3.4.2 Identificación de la estrictosamida <u>71</u> en su forma acetilada. . . . .	141
3.4.3 Resultados de la actividad biológica del harsa- no <u>20</u> y la tetra acetil estrictosamida <u>71a</u> . . .	153
3.5 CONCLUSIONES . . . . .	154
B I B L I O G R A F I A . . . . .	156



## L I S T A D E T A B L A S

		página
Tabla 1	Familia Rubiaceae <i>Genus</i> Vercourt . . . . .	2
Tabla 2	Algunos géneros representativos de la familia Rubiaceae . . . . .	3
Tabla 3	Metabolitos de Rubiaceae con actividad biológica. . . . .	17
Tabla 4	Usos en la medicina popular del fruto de algunas especies del género <i>Randia</i> . . . . .	24
Tabla 5	Perfil fitoquímico del género <i>Randia</i> . . . . .	25
Tabla 6	Rendimiento de los metabolitos aislados de <i>Randia echinocarpa</i> . . . . .	43
Tabla 7	Constantes físicas y espectroscópicas del quinovato de dimetilo <u>52a</u> y oxoquinovato de dimetilo <u>53a</u> . . . . .	46
Tabla 8	Constantes físicas y espectroscópicas para la mezcla de ácidos ursólico <u>36</u> y oleanólico <u>35</u> . . . . .	57
Tabla 9	Constantes físicas y espectroscópicas de la bromolactona oleanólica y el ester metílico del ácido oleanólico . . . . .	62
Tabla 10	Constantes físicas y espectroscópicas del ácido ursólico <u>36</u> y su derivado acetilado metilado <u>36b</u> . . . . .	63
Tabla 11	Prueba de citotoxicidad ED <sub>50</sub> (µg/ml) de el ácido quinóico <u>32</u> . . . . .	68
Tabla 12	Perfil fitoquímico del género <i>Exostema</i> . . . . .	72
Tabla 13	Resumen del fraccionamiento biodirigido del extracto de acetato de etilo de <i>Exostema mexicanum</i> . . . . .	81

	página
Tabla 14 Resultados de la toxicidad, expresados en porcentaje de mortalidad para la <i>Asteria salina</i> , del fraccionamiento de la corteza de la <i>E. mexicana</i> , . . . . .	86
Tabla 15 Rendimiento de los metabolitos aislados de <i>Exostema mexicanum</i> , . . . . .	89
Tabla 16 ED <sub>50</sub> (µg/ml) en varios sistemas de tumores de los compuestos tóxicos para <i>A. salina</i> , aislados de la <i>E. mexicana</i> . . . . .	89
Tabla 17 IC <sub>50</sub> (µg/ml) de los compuestos tóxicos de la <i>Exostema mexicanum</i> . . . . .	90
Tabla 18 Constantes físicas y espectroscópicas de la 25-acetil cucurbitacina <u>68</u> y su derivado acetilado <u>68a</u> , . . . . .	91
Tabla 19 Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina <u>69</u> y su derivado tri-acetilado <u>69a</u> . . . . .	101
Tabla 20 Constantes físicas y espectroscópicas de la 25-acetil-2-β-D-glucopiranosil cucurbitacina <u>70</u> y su derivado acetilado <u>70a</u> . . . . .	107
Tabla 21 Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58b</u> y la 5-O-β-D-glucosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58</u> . . . . .	112
Tabla 22 Constantes físicas y espectroscópicas del harmano <u>20</u> , . . . . .	134
Tabla 23 Constantes físicas y espectroscópicas de la tetra acetil estrictosamida <u>71a</u> , . . . . .	142
Tabla 24 ED <sub>50</sub> (µg/ml) del compuesto citotóxico de <i>Sida mexicana</i> . . . . .	154

## L I S T A D E F I G U R A S

	página
Figura 1 Estructuras de la secologanina, triptasi- na, estrictosidina y triptófano . . . . .	7
Figura 2 Esqueletos básicos de vincosano, corinan- to y valesiacotsmano . . . . .	8
Figura 3 Estructura de la dopamina y desacetil iso ipécósido . . . . .	9
Figura 4 Biosíntesis de la camptotecina <u>7</u> . . . . .	9
Figura 5 Biosíntesis de la quinina <u>8</u> . . . . .	10
Figura 6 Estructura base de alcaloides $\beta$ -carbolfi- cos . . . . .	12
Figura 7 Biosíntesis de la chimomantina <u>9</u> y la ca- licantina <u>10</u> . . . . .	13
Figura 8 Estructura de diversos alcaloides aislados de Rubiaceae . . . . .	14
Figura 9 Estructura general de una 4-fenil cusarina . . . . .	15
Figura 10 Estructura de algunos metabolitos de la familia Rubiaceae con actividad biológica . . . . .	16
Figura 11 Estructura de los metabolitos del género Randia . . . . .	26
Figura 12 Separación de los ácidos quinóvico y oxo- quinóvico . . . . .	45
Figura 13 Patrón de fragmentación tipo Retro-Diels- -Alder del quinovato de dimetilo <u>52a</u> . . . . .	49
Figura 14 Patrón de fragmentación del oxoquinovato de dimetilo <u>53a</u> . . . . .	52
Figura 15 Correlación química del quinovato de dim- tilo <u>52a</u> y oxoquinovato de dimetilo <u>53a</u> . . . . .	55

	página
Figura 16 Separación de los ácidos ursólico y olea- nólico, . . . . .	61
Figura 17 Estructura de los metabolitos del género Exosfema, . . . . .	74
Figura 18 Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la 25-acetil cucurbitacina <u>68</u> , .92	.92
Figura 19 Estructura parcial de la cadena lateral del compuesto <u>68</u> , . . . . .	.95
Figura 20 Ampliación de la región del espectro de RMNP donde absorben los protones gemina- les de ester del compuesto <u>68a</u> , . . . . .	.99
Figura 21 Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la cucurbitacina <u>69</u> . . . . .	104
Figura 22 Patrón de fragmentación del hermano <u>20</u> , . . .	137
Figura 23 Fragmentos importantes en el espectro de masas de la tetra acetil estrictosamida <u>71a</u> , 14b	146
Figura 24 Datos de RMN <sup>13</sup> C de la parte quinolizido- na de la tetra acetil estrictosamida, tetra acetil vincosamida y del producto aislado de <i>Simia mexicana</i> , . . . . .	152

## L I S T A D E E S Q U E M A S

		Página
Esquema 1	Obtención de los extractos a partir del fruto de la <i>Randia echinocarpa</i> y fraccionamiento preliminar del extracto metanólico.....	36
Esquema 2	Obtención de los extractos a partir de la corteza de tallos de la <i>Exospha mexicana</i> y - fraccionamiento preliminar del extracto metanólico .....	79
Esquema 3	Método de extracción de la corteza de la <i>Schinus molle</i> mexicana .....	126
Esquema 4	Fraccionamiento del extracto metanólico de la <i>Schinus molle mexicana</i> .....	127

## LISTA DE ESPECTROS

		página
Espectro 1.	Espectro de RMNP del quinovato de dimetilo <u>52a</u> . . . . .	48
Espectro 2	Espectro de RMNP del ácido acetil quinóvico <u>52b</u> . . . . .	51
Espectro 3	Espectro de RMNP del oxoquinovato de dimetilo <u>53b</u> . . . . .	54
Espectro 4	Espectro de IR de la mezcla de ácidos oleanólico <u>35</u> y ursólico <u>36</u> . . . . .	58
Espectro 5	Espectro de RMNP de la mezcla de ácidos oleanólico <u>35</u> y ursólico <u>36</u> . . . . .	59
Espectro 6	Espectro de RMNP de la bromolactona oleanólica <u>35a</u> . . . . .	64
Espectro 7	Espectro de RMNP del oleanolato de metilo <u>35c</u> . . . . .	65
Espectro 8	Espectro de RMNP del ácido ursólico <u>36</u> . . . . .	66
Espectro 9	Espectro de RMNP del acetil ursolato de metilo <u>36b</u> . . . . .	67
Espectro 10	Espectro de RMNP de la 25-acetil cucurbitacina F <u>68</u> . . . . .	94
Espectro 11	Espectro de RMNP del derivado acetilado de la 25-acetil cucurbitacina F <u>68a</u> . . . . .	97
Espectro 12	Espectro de RMNP de la cucurbitacina F <u>69</u> . . . . .	102
Espectro 13	Espectro de RMNP del derivado acetilado de la cucurbitacina F <u>69a</u> . . . . .	105
Espectro 14	Espectro de IR de la 25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina F <u>70</u> . . . . .	109

	página
Espectro 15	Espectro de RMNP compuesto <u>70</u> . . . . . 110
Espectro 16	Espectro de RMNP del derivado acetilado de la 25-acetil-2-β-D-glucopiranosil cucurbitacina <u>70a</u> . . . . . 111
Espectro 17	Espectro de UV de 5,3',4'-trihidroxí- -7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58b</u> . . . . . 114
Espectro 18	Espectro de IR del compuesto <u>58b</u> . . . . . 115
Espectro 19	Espectro de RMNP del compuesto <u>58b</u> . . . . . 116
Espectro 20	Espectro de UV de la 5-O-β-D-glucopira- nosil-3',4'-dihidroxí-7-metoxi-4-fenil cumarina <u>58</u> . . . . . 117
Espectro 21	Espectro de IR del compuesto <u>58</u> . . . . . 118
Espectro 22	Espectro de RMNP del compuesto <u>58</u> . . . . . 119
Espectro 23	Espectro de masas del hermano <u>20</u> . . . . . 135
Espectro 24	Espectro de IR del hermano <u>20</u> . . . . . 136
Espectro 25	Espectro de UV del hermano <u>20</u> . . . . . 139
Espectro 26	Espectro de RMNP del hermano <u>20</u> . . . . . 140
Espectro 27	Espectro de masas de la tetra acetil estricosamida <u>71a</u> . . . . . 144
Espectro 28	Espectro de IR del compuesto <u>71a</u> . . . . . 147
Espectro 29	Espectro de UV del compuesto <u>71a</u> . . . . . 148
Espectro 30	Espectro de RMNP del compuesto <u>71a</u> . . . . . 149
Espectro 31	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto <u>71a</u> . . . . . 151

## LISTA DE ABREVIATURAS

IR	Infrarojo
UV	Ultravioleta
EM	Espectro de masas
RMNP	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
CCD	Cromatografía en capa delgada
A. E.	Análisis elemental
p.f.	Punto de fusión
F. M.	Fórmula molecular
P. M.	Peso molecular
$[\alpha]$	Rotación óptica
$\delta$	Desplazamiento químico
J	Constante de acoplamiento
s	Singlete
d	Doblete
dd	Doble de dobles
t	Triplete
m	Multiplete
ppm	Partes por millón
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
$\mu$ g	Microgramos



## RESUMEN

Como parte de un estudio sistemático sobre plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional se realizó el estudio químico de la *Randia echinocarpa*, la *Exostema mexicanum* y la *Schinus molle* mexicana, especies pertenecientes a la familia Rubiaceae.

Del extracto metanólico del fruto de *R. echinocarpa*, se aislaron y caracterizaron el polialcohol manitol 51, el  $\beta$ -sitosterol 44, el  $\beta$ -gluco- $\beta$ -sitosterol 54, y cuatro ácidos triterpénicos (ácidos quinóvico 52, exoquinóvico 53, oleanólico 35 y ursólico 36).

El fraccionamiento del extracto metanólico de la corteza de la *E. mexicanum* dirigido mediante la determinación de la toxicidad para *Aedes sollicitans* permitió el aislamiento de dos sustancias bioactivas. Estas fueron caracterizadas como la 25-acetil cucurbitacina F 68 y la cucurbitacina F 69. Ambos compuestos también resultaron bioactivos como agentes antitumorales y antipalúdicos. La moderada actividad antimálica encontrada podría explicar el uso popular de la planta.

De las fracciones alcaloideas obtenidas mediante una partición ácido-base del extracto metanólico de la corteza de

la *Sidaea mexicana* se aislaron y caracterizaron dos alcaloides, el hermano 20 y la estrictosamida 71.

El hermano 20 resultó tóxico para la *Artemia salina* y fue evaluado también como agente potencial antitumoral y antipalúdico. La moderada actividad antimalárica encontrada podría explicar el uso popular de la planta.

## I N T R O D U C C I O N

## I. GENERALIDADES DE LA FAMILIA RUBIACEAE

## I.1. Taxonomía

La gran familia Rubiaceae incluye de 6 000 a 7 000 especies agrupadas en aproximadamente 500 géneros; las especies son tropicales pero se han adaptado a otros ambientes (Willis, 1973).

A la fecha se han propuesto varias clasificaciones de la familia. Primero, en 1891 Schuman la dividió en dos subfamilias: Cinchonoideae y Coffeoidae (Rubioidae), y cada una comprendía 21 tribus. Subsecuentemente, Verdcourt en 1958, la agrupó en tres subfamilias: Rubioidae (con 17 tribus), Cinchonoideae (con 11 tribus) y Guettardoideae (con una tribu). Más tarde, en 1966, Bremekamp reagrupó la familia en ocho subfamilias: Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioidae, Urophilloideae, Pometoideae, Gleasonnoideae, Guettardoideae e Hillebrandioidae. Finalmente en 1976 Verdcourt hizo algunas modificaciones a su clasificación inicial. Esta última clasificación es la más aceptada por los taxónomos modernos. En las Tablas 1 y 2 se resume la clasificación propuesta por Verdcourt.

Tabla 1 Familia Rubiaceae según Verdcourt (Verdcourt 1958, 1976).

SUBFAMILIA	TRIBU
Cinchonoideae	Naucleaceae, Cinchoneae <sup>1</sup> , Cephalanthaceae, Virentariaceae, Rodeletiaceae <sup>1</sup> , Mussaendaceae, Heinsieae, Catesbaeeae, Gardenieae, Coffeaceae, Retiniphyllaceae, Altberteae, Vanguerieae, Chiacocceae
Rubioidaeae	Psychotriaceae, Coussareae, Morindeae, Triainolopideae, Shradereae, Urophyllaceae, Craterispermeae <sup>2</sup> , Knoxiaceae <sup>2</sup> , Paderiaceae, Argostemmateae, Ophiorrhizeae <sup>2</sup> , Hamelieae, Cruckshanksiaceae, Hedryotideae, Anthospermeae, Spernacocceae, Rubieae
Guettardoideae	Guscuardeae
Hillioideae	Helleae
Henriquezieae	Henriquezieae

Tabla 2 Algunos géneros representativos de la familia Rubiaceae (Verdcourt, 1958, 1976).

TRIBU	GENERO SUBFAMILIA CINCHONOIDEAE
Naucleaceae	<i>Nauclea</i> , <i>Adina</i> , <i>Anthocephalus</i>
Cinchoneae	<i>Uncaria</i> , <i>Capixona</i> , <i>Exostenma</i> , <i>Costarea</i> , <i>Remijia</i> , <i>Mytragyna</i> , <i>Cinchona</i> , <i>Corynanthe</i> , <i>Cigarrilla</i> <i>Coutaportia</i>
Rondeletiaceae	<i>Rondeletia</i> , <i>Hintonia</i> , <i>Pogonopus</i> , <i>Simia</i>
Mussaendeae	<i>Isertia</i>
Gardeniaceae	<i>Gardenia</i> , <i>Genipa</i> , <i>Randia</i>
Coffeaceae	<i>Coffea</i>
	SUBFAMILIA-RUBIAIDEAE
Psychotriaceae	<i>Psychotria</i> , <i>Cephaelis</i>
Morindeae	<i>Morinda</i>
Urophyllaeae	<i>Urophyllum</i>
Hedyototideae	<i>Bouvardia</i> , <i>Hedyotis</i> , <i>Oldenlandia</i>
Spermacoceae	<i>Borneria</i>
Rubiaceae	<i>Rubia</i> , <i>Galium</i>
	SUBFAMILIA-GUETTARDOIDEAE
Guettardeae	<i>Guettarda</i>

## 1.2. Metabolitos secundarios de la familia Rubiaceae.

Una gran diversidad de metabolitos secundarios han sido descritos en la familia Rubiaceae, éstos incluyen: Terpenoides (Sticher, 1976; Bock *et. al.*, 1976; Dacroix, 1975 Koike *et. al.*, 1980; Hegnauer, 1973; Pant *et. al.*, 1979; Das *et. al.*, 1983; Reguero, 1987; Aimi *et. al.*, 1988, *inter alia*), antraquinonas e antraquinoles (Adesogau, 1973), naftalenos, compuestos aromáticos simples, cromonas, cumarinas simples, taninos, xantinas, esteroides (Hegnauer, 1973) flavonoides (Willson *et. al.*), neoflavonoides (Monacho *et. al.*, 1984; Aquino *et. al.*, 1988; Mata *et. al.*, 1987, 1988c, *inter alia*) y alcaloides (Hemingway *et. al.*, 1980; Parry *et. al.*, 1978; Fujii *et. al.*, 1983; Zalscaín *et. al.*, 1982; López *et. al.*, 1988, *inter alia*).

A continuación se hará una revisión de los metabolitos que se encuentran con mayor frecuencia en la familia como lo son algunos terpenoides, varios tipos de alcaloides y neo flavonoides del tipo 4-fenil-cumarinas.

### 1.2.1. Terpenoides de la familia Rubiaceae.

Los terpenoides de la familia Rubiaceae incluyen mono-terpenoides, di-terpenoides y triterpenoides.

Los monoterpenoides comprenden principalmente compues-

tos del tipo iridoide (Endo y Taguchi, 1973; Takeda *et. al.*, 1975, 1976, 1977; Inouye *et. al.*, 1968, 1970, 1974; Guarnacia *et. al.*, 1972; Baillieul *et. al.*, 1977; Djerassi *et. al.*, 1961; Tallent, 1964), y sus derivados biogénéticos conocidos como secoiridoide (Bock *et. al.*, 1976).

Los diterpenoides de la familia son de los tipos kaureno-filocladeno (Ducroix *et. al.*, 1975), y dolabradieno (Koi ke *et. al.*, 1981).

En relación a los triterpenoides se han aislado y caracterizado principalmente compuestos pentacíclicos de las siguientes categorías: oleanano (Hegnauer 1973; Reddy *et. al.*, 1975, 1977; Chatterjee *et. al.*, 1979; Sahu *et. al.*, 1974), ursano (Hegnauer, 1973; Adeoye y Waigh, 1983; Horath *et. al.*, 1978), lupano (Hegnauer, 1973; Das *et. al.*, (1971), y friedelano (Hegnauer, 1973), recientemente se han encontrado triterpenoides tetracíclicos de tipos cucurbitano (Reguero *et. al.*, 1987) y triterpenoides modificados del tipo meliacinas (Ahmed *et. al.*, 1978) y hopano (Aimi *et. al.*, (1981).

#### 1.2.2. Alcaloides de la familia Rubiaceae.

Desde el punto de vista biogénético los alcaloides de la familia Rubiaceae se pueden agrupar en dos grandes categorías. El primer grupo comprende todos aquellos alcaloides biogénicamente derivados de un aminoácido aromático y la

secologanina 1. El segundo abarca todos los demás alcaloides en cuya formación no participa la secologanina.

#### 1.2.2.1. Alcaloides derivados de la secologanina.

Los alcaloides derivados de la secologanina a su vez se clasifican en: indol-iridoide (tipo D, C, V), isoquinolínicos y quinolínicos.

La mayoría de los alcaloides caracterizados de la familia Rubiaceae pertenece al primer tipo y son biosintetizados a partir de la secologanina 1, la cual se condensa con la triptamina 2, para dar estrictosidina 3, el precursor de la mayoría de los alcaloides indol-iridoide. Algunos alcaloides indólicos que contienen un grupo carboxilo adyacente al Nb se sintetizan directamente a partir del triptófano 4, en lugar de la triptamina. En la Figura 1 se indica las estructuras de la secologanina, de la estrictosidina, de la triptamina y del triptófano.

La estrictosidina, puede sufrir numerosas modificaciones para originar varios tipos de alcaloides indólicos. En el caso particular de la familia Rubiaceae, esta suida, da origen a los alcaloides que poseen como esqueletos básicos al vincosano (Brown y Charalambides, 1973, 1974a, 1975a; Brown y Row, 1967; Merlini y Nacini, 1968; Brown y Waramba, 1978; Fousset, *et. al.*, 1971, 1974; Levesque *et. al.*, 1974; Brown

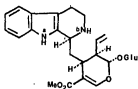




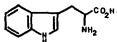
1 SECOLOGANINA



2 TRIPTAMINA



3 ESTRICTOSIDINA



4 TRIPTÓFANO

Figura 1 Estructuras de la secologanina, triptamina, estrictosidina y triptófano.

y Chaple, 1976a; Murray *et. al.*, 1972; Mc Clean *et. al.*, 1976), corinanto (Goutarel *et. al.*, 1977; Johns *et. al.*, Brown y Duckworth, 1976; Hussen *et. al.*, 1977, Hesse, 1964, 1968; Manake, 1965; Raffauf, 1970; Holker *et. al.*, 1964; Zarambo *et. al.*, 1974), y valesiacotanano (Brown *et. al.*, 1977; Hottellier *et. al.*, 1977; Blackstock y Brown, 1971; Blackstock *et. al.*, 1971; Brown y Blackstock, 1972), los esqueletos antes mencionados, se ilustran en la Figura 2.

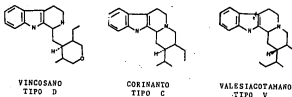


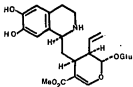
Figura 2 Esqueletos básicos de vincosano, corinanto y valesiacotanano.

El segundo grupo, los isoquinolínicos, se forman a partir de la dopamina 3 (en lugar de triptamina) la cual al condensarse con la secologamina 1 da origen al desacetil isoipeccáido 6, este último compuesto es el precursor general de este tipo de alcaloides en la familia (Openshaw, 1970; Brauchli, 1964). En la Figura 3 se muestra la estructura de la dopamina y la del desacetil isoipeccáido.

Finalmente, el grupo de los quinolínicos (Talur et al., 1976; Hutchinson et al., 1974; Salomon, 1970), son también sintetizados a partir de la estrictosidina 3. A manera de ejemplo, en las Figuras 4 y 5 se ilustran resumidamente la biosíntesis de la camptotecina 7 y de la quinina 8, respectivamente.



5 DOPAMINA



6 DESACETIL ISOIPECOSIDO

Figura 3 Estructura de la dopamina y la del desacetil isoipecosido.

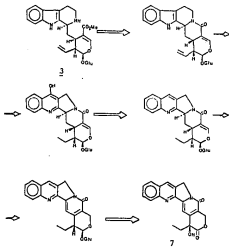


Figura 4 Biosíntesis de la camptotecina (Brown *et. al.*, 1977; Battersby and Hall, 1969).

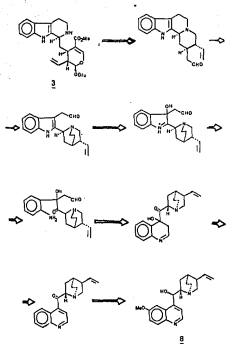


Figura 5 Biosíntesis de la quinina (Brom *et al.*, 1977; Batterby and Hall, 1969).

#### 1.2.2.2. Alcaloides que no derivan de la secologanina.

Como ya se mencionó previamente existen otros grupos de alcaloides en la familia Rubiaceae que biogénicamente no derivan de la secologanina. Estos comprenden los siguientes subgrupos: indólicos simples (Jossang *et. al.*, 1977a, b; Fousset *et. al.*, 1973, 1977),  $\beta$ -carbolínicos (McLean y Murray, 1970; Corothie y Nakano, 1969; Phillipson y Heningway, 1975; Paris *et. al.*, 1957; Jordaan *et. al.*, 1968; Fousset *et. al.*, 1974, 1977), polindoleninas (Fridrichson *et. al.*, 1967; Woo-Ming y Stuart, 1975; Nakano y Martin, 1976; Parry y Smith, 1978), purinas (Raffauf, 1970; Hegnauer, 1973), peptídicos (Hegnauer, 1973), y piridínicos (Schlitter and Spitaler, 1978).

Los alcaloides indólicos simples se biosintetizan a partir del aminoácido triptófano 4.

Los alcaloides  $\beta$ -carbolínicos presentan como estructura base un sistema tricíclico de tipo pirido (3,4-b) indol y generalmente son sustituidos en la posición 1. La naturaleza del sustituyente es variable y dependerá del precursor que se combine con el triptófano para originar el anillo  $\beta$ -carbolínico. En la Figura 6 se indica la estructura base de estos alcaloides. La parte indólica del sistema tricíclico deriva del triptófano (O'Donovan y Kenneally 1967; Gröger, 1969; Cordell



Figura 6 Estructura base de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos.

1974) y los restantes carbonos del piruvato, acetato u otros compuestos (Stolle y Gröger 1968).

El siguiente grupo de alcaloides, el de las poliindoleminas, son biosintetizadas a partir de dos o más unidades de triptamina 2 o sus derivados los cuales se polimerizan posiblemente vía radicales libres (Cordell, 1981). A manera de ejemplo en la Figura 7 se ilustra la biosíntesis de la chimonantina 9 y calicantina 10.

Con respecto a las purinas, de las semillas del café (*Coffea arabica* L.) se han obtenido tres importantes alcaloides: la cafeína 11, la teofilina 12 y la teobromina 13.

En relación a los alcaloides pirídínicos son pocos los descritos en la familia. Algunos como la Schumannneofitina 14 se biosintetizan a partir del ácido nicotínico. En otros como la coelobillardina 15 (López et. al., 1988) son biosintetizados a partir de la loganina.

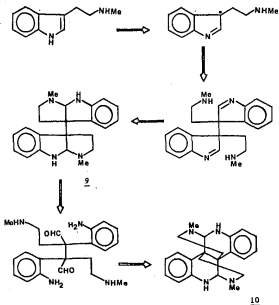


Figura 7 Biosíntesis de la chinomantina 9 y calicantina 10.

Finalmente entre los alcaloides peptídicos se encuentra la bouvardina 16 (Zalacain *et. al.*, 1982) ilustrada, junto con los alcaloides purínicos y piridínicos, en la Figura 8.



11 CAFEINA



12 TEOPILINA



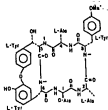
13 TEOBROMINA



14 SCHUMMANEPLITINA



15 COLOBILLARDINA



16 BOUWARDINA

Figura 8 Estructura de diversos alcaloides aislados de Rubiaceae.



1.2.3. Neoflavonoides del tipo 4-fenil cumarina de la familia Rubiaceae.

Las 4-fenil cumarinas son compuestos aromáticos cuya estructura general se encuentra a continuación en la Figura 9.

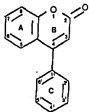


Figura 9 Estructura general de una 4-fenil cumarina.

De la familia Rubiaceae se han aislado hasta ahora dieciocho 4-fenil cumarinas y éstas están restringidas a los géneros *Coulatia*, *Exostema* y *Hintonia*. (Dele Monache *et. al.*, 1983, 1984, 1985; Mata *et. al.*, 1987, 1988; Reher *et. al.*, 1983; Reher y Krauss, 1984; Sánchez Viesca *et. al.*, 1967, 1969; Mukerjee *et. al.*, 1968; Aquino *et. al.*, 1988).

1.3. Actividad biológica de algunos metabolitos de la familia Rubiaceae.

Desde el punto de vista medicinal; muchas especies de

la familia Rubiaceae son de gran importancia. Muchas de ellas constituyen fuentes primordiales de numerosos alcaloides de importancia terapéutica, entre los que destacan la quinina 8, la quinidina 17, la cinetina 18, la teofilina 12, la cafeína 11 y la camptotecina 7. Asimismo de otras especies de esta familia se han aislado muchos compuestos farmacológicamente activos entre los que resaltan la yohimbina 21, harnano 20, genipósido 24 y ácido genípico 25. En la Tabla 3 se resumen algunos compuestos con actividad biológica aislados de la familia Rubiaceae.

Es importante señalar que la mayoría de estos compuestos indicados en la tabla han sido aislados de plantas que gozaban de reputación folklórica como agentes medicinales; igual que esas plantas, existen muchas Rubiaceae usadas popularmente en diversas regiones del mundo y que aún no han sido investigadas desde el punto de vista químico y/o farmacológico. En el caso particular de México la información acerca de plantas de uso popular es abundante y plantea interesantes investigaciones. Más aún si se considera que la medicina tradicional en México constituye una parte primordial de su cultura y ha jugado un papel importante en salvaguardar la salud de la nación.

Entre las numerosas plantas mexicanas usadas en medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades,

Tabla 3 Algunos metabolitos de Rubiaceae con actividad biológica.

COMPUESTO	No. de ESTRUCTURA	ACTIVIDAD		REFERENCIA
		TERAPEUTICA	FARMACOLOGICA	
Quinina	<u>8</u>		Antimalárico Anestésico local	Boit, 1961
Quinidina	<u>17</u>	Previene ciertos arritmias cardíacas	Antifibrilante	
Emetina	<u>18</u>	Antitumoral	Antiamibiano Emético	Fujii <i>et. al.</i> , 1983
Harmalina	<u>19</u>	Actividad psicomimética en hombres		Brimblecombe, 1973 a
Harnano	<u>20</u>	Hipotensor		Fuentes y Longo, 1971
Yohimbina	<u>21</u>	Hipotensor		Lang <i>et. al.</i> , 1966
Camptotecina	<u>7</u>	Antitumoral		Talur, 1976
Bouvardina	<u>16</u>	Antitumoral		Zalacain, 1982
Rondeletina	<u>22</u>	Antitumoral		Koike, 1980
Pananesina	<u>23</u>	Antitumoral		Koike, 1980
Genipósido	<u>24</u>	Laxante		Sticher, 1976
Acido Genípico	<u>25</u>	Antimicrobiano		Sticher, 1976

Las estructuras de estos compuestos se encuentran en la Figura 10.



25 Ac. GENIPICO



24 GENIPOSIDO



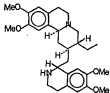
22 RONDELETINA



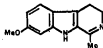
23 PARAHESINA



20 HARMANO



18 EMETINA



19 HARMALINA



21 YOHIMBINA



17 QUINIDINA

Figura 10 Estructura de algunos metabolitos de la familia Rubiaceae con actividad biológica.

y que potencialmente podrían ser fuente de nuevos principios activos, se encuentran numerosas Rubiáceas, tres de las cuales son el objetivo fundamental del presente trabajo.

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVOS GENERALES

Considerando lo antes expuesto y como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en medicina tradicional, cuyos objetivos principales son contribuir al conocimiento de la composición química y obtener en lo posible compuestos bioactivos de la flora medicinal mexicana, se consideró conveniente el estudio fitoquímico de tres Rubiacées medicinales. Las especies seleccionadas fueron las siguientes: *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño, *Excoecaria mexicana* A-Gray y *Sida mexicana* (Bullock) Steyerm. Es importante señalar que hasta la fecha ninguna de estas plantas había sido objeto de estudios químicos o biológicos.

Para el logro de los objetivos se contempló el uso de dos estrategias generales para la investigación de las plantas medicinales, es decir, el estudio fitoquímico convencional, seguido de evaluaciones biológicas de los compuestos aislados ó el estudio fitoquímico dirigido mediante un ensayo biológico. En el caso del segundo procedimiento se escogió un ensayo simple, utilizando un crustáceo marino, *Artemia salina* Leach. Este bioensayo consiste en determinar la toxicidad de los compuestos y extractos vegetales para este organismo (Meyer et al., 1982).

## 2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.1 Recopilar la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de las especies vegetales objeto de estudio.
- 2.2 Efectuar las operaciones preliminares propias a la preparación de extractos vegetales para cada una de las plantas a ser estudiadas.
- 2.3 Preparar los extractos vegetales de acuerdo a la metodología convencional.
- 2.4 Fraccionar los extractos mediante los métodos adecuados.
- 2.5 Separar y purificar los constituyentes de las diferentes fracciones.
- 2.6 Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos las sustancias.
- 2.7 Determinar la toxicidad para *Araçmía salina* de los extractos, fracciones y constituyentes obtenidos en los puntos 2.2, 2.3, y 2.5 respectivamente. Este objetivo se llevará a cabo en el caso de efectuar el estudio fitoquímico biodirigido. En caso de seguir el otro método mencionado en los objetivos generales solo se hará esta evaluación, una vez aislados los compuestos en forma pura.

- 2.8 Correlacionar los resultados obtenidos con la información previamente descrita en la literatura, en cuanto a:
- 2.8.1 Composición química de las especies estudiadas.
  - 2.8.2 Actividad biológica de las sustancias aisladas y su posible relación con las propiedades medicinales de la planta.
- 2.9 Proporcionar las sustancias aisladas para su evaluación biológica, en otros renglones diferentes a los especificados en el punto 2.7.



## CAPÍTULO I

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RANDIA ECHINOCARPA

## 1.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO RANDIA

El género *Randia* está constituido aproximadamente por unas 300 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las especies pueden ser arbustos pequeños o grandes árboles. En México se reconocen 33 especies, 26 de las cuales son endémicas (Standley, 1926, 1934).

Algunas plantas del género tienen importancia en la medicina popular de México y otras partes del mundo, ya que son utilizadas para aliviar múltiples enfermedades. En la Tabla 4 se señalan algunas de estas especies, indicándose sus usos medicinales.

Desde el punto de vista fitoquímico han sido investigadas varias especies de *Randia*. En la Tabla 5 se resumen las investigaciones químicas que hasta la fecha se han realizado sobre este género, indicándose los diferentes tipos de metabolitos secundarios, ejemplos de los mismos y sus fuentes naturales.

Tabla 4. Usos en la medicina popular del fruto de algunas especies del género *Randia*.

ESPECIE	USO MEDICINAL	REFERENCIA
<i>Randia dumetorum</i>	Calmante nervioso	Krishna, 1981
	Antispasmodico	Krishna, 1931
<i>Randia dumetorum</i>	Provocar aborto	Chopra, 1953
	Fuerte emético	Chopra, 1956
	Diarrea, disenteria y bronquitis	Kirtikar, 1933
<i>Randia uliginosa</i>	Disenteria	Kirtikar, 1933
<i>Randia echinocarpa</i>	Enfermedades del ri ñón.	Martínez, 1969
<i>Randia mexicana</i>	Antimalárico	Martínez, 1969
<i>Randia laciniata</i>	Bronquitis	Martínez, 1969
<i>Randia cinerea</i>	Afecciones renales	
	y diarrea	Martínez, 1969
<i>Randia guatemalensis</i>	Afecciones del riñón	Rodríguez, 1980
<i>Randia Ruiziana</i>	Sedante nervioso	Davioud y
		Bailleul, 1988

Tabla 5. Perfil fitoquímico del Género *Randia*

TIPO DE METABOLITO	Nº. DEL COMPUESTO Y NOMBRE	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
a) IRIIDOIDE (Monoterpenoide)	<u>26</u> 10-Cafeoil desacetil defilóxido	<i>Randia formosa</i>	Sainty et al., 1982
	<u>27</u> Peretósido	<i>Randia formosa</i>	Sainty et al., 1982
		<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982
		<i>Randia formosa</i>	Sainty et al., 1982
	<u>28</u> Gardenósido	<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982
		<i>Randia nuziana</i>	Davioud y Bailleul, 1988
		<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982
	<u>29</u> 10-dehidro gardenósido	<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982
	<u>30</u> Dímero del 10-dehidro gardenósido	<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982
	<u>31</u> Acido desacetil asperulosídico	<i>Randia formosa</i>	Sainty et al., 1962
<i>Randia canthioides</i>		Uesato et al., 1982	
<i>Randia nuziana</i>		Davioud y Bailleul, 1988	
<u>32</u> Ester metílico del ácido desacetil asperulosídico	<i>Randia canthioides</i>	Uesato et al., 1982	
	<i>Randia nuziana</i>	Davioud y Bailleul, 1988	

Las estructuras correspondientes se ilustran en la Figura 11.

Tabla 5. Perfil fitoquímico del Género *Randia*. (Continuación).

TIPO DE METABOLITO	No. DEL COMPUESTO Y NOMBRE	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
a) IRIDOIDE (Monoterpenoide)	<u>33</u> Glicona del ester metílico del ácido desacetil asperulosídico	<i>Randia canthioides</i>	Uesatoet <i>et al.</i> , 1982
	<u>34</u> Randiosido	<i>Randia canthioides</i>	Uesatoet <i>et al.</i> , 1982
b) TRITERPENOIDE	<u>35</u> Acido oleanólico	<i>Randia dumatorium</i>	Murty <i>et al.</i> , 1989
		<i>Randia dumatorium</i>	Krishna <i>et al.</i> , 1981
	<u>36</u> Acido ursólico	<i>Randia dumatorium</i>	Krishna <i>et al.</i> , 1981
	<u>37</u> 1 ceto-3 $\alpha$ -hidroxi oleanano	<i>Randia dumatorium</i>	Murty <i>et al.</i> , 1989
	<u>38</u> Acido 3 $\beta$ -hidroxi ursólico	<i>Randia siamensis</i>	Woo <i>et al.</i> , 1984
	<u>39</u> Acido 3 $\alpha$ -L-arabinosil oleanólico	<i>Randia siamensis</i>	Lipikanon, 1983
	<u>40</u> Acido (1-3) $\beta$ -D-galactopiranosil oleanólico	<i>Randia dumatorium</i>	Saharia y seshadri, 1980
<u>41</u> Acido mesembriantemoidigénico	<i>Randia siamensis</i>	Woo <i>et al.</i> , 1984	

Tabla 5. Perfil fitoquímico del Género *Randia* (continuación)

TIPO DE METABOLITO	No. DE COMPUESTO Y NOMBRE	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
b) TRITERPENOIDES	<u>42</u> $\alpha$ -amirina	<i>Randia dumetorum</i>	Krishna et. al., 1981
		<i>Randia dumetorum</i>	Murty et. al., 1989
	<u>43</u> $\beta$ -amirina	<i>Randia dumetorum</i>	Murty et. al., 1989
c) ESTEROLES	<u>44</u> $\beta$ Sitosterol	<i>Randia dumetorum</i>	Krishna et. al., 1981
		<i>Randia dumetorum</i>	Murty et. al., 1989
	<u>45</u> Campesterol	<i>Randia siamensis</i>	Lapikanon, 1983
d) CUMARINAS	<u>46</u> Escopoletina	<i>Randia nilotica</i>	Bashir et. al., 1986
	<u>47</u> Isoscopoletina	<i>Randia nilotica</i>	Bashir et. al., 1986
	<u>48</u> Escopolina	<i>Randia nilotica</i>	Bashir et. al., 1986
	<u>49</u> Umbeliferona	<i>Randia nilotica</i>	Bashir et. al., 1986
e) AROMATICOS SIMPLER TIPO C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	<u>50</u> Acido siringico	<i>Randia nilotica</i>	Bashir et. al., 1986
f) POLIALCOHOL	<u>51</u> D-manitol	<i>Randia dumetorum</i>	Krishna et. al., 1981
		<i>Randia uliginosa</i>	Kumar, 1965
		<i>Randia siamensis</i>	Lapikanon, 1983

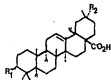
a) IRIDOIDES (monoterpenoides)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
<u>26</u>	α-OH	Cafeoil oxí	COOMe	<u>28</u>	OH	CH <sub>2</sub> -OH	<u>31</u>
<u>27</u>	β-OH	OH	COOMe	<u>29</u>	OH	CHO	
<u>31</u>	δ-OH	OH	COOH	<u>30</u>	OH	monómero	
<u>32</u>	α-OH	OH	COOMe	<u>34</u>	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = O		

Figura 11. Estructura de los metabolitos del Género *Randia*

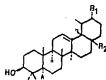
b) TRITERPENOIDES



	$R_1$	$R_2$
<u>35</u>	$\beta$ -OH	$CH_3$
<u>39</u>	$\alpha$ -L-arabinosil	$CH_3$
<u>40</u>	$\beta$ -D-galactopiranosil	$CH_3$
<u>41</u>	$\beta$ -OH	$CH_2$ -OH



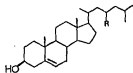
	$R_1$	$R_2$	$R_3$
<u>37</u>	$\alpha$ -OH	$R_2 = R_3 = O$	
<u>43</u>	$\beta$ -OH	$R_2 = R_3 = H$	



	$R_1$	$R_2$
<u>36</u>	$CH_3$	$COOH$
<u>38</u>	$CH_2OH$	$COOH$
<u>42</u>	$CH_3$	$CH_3$

Figura 11. Estructura de los metabolitos del Género *Randia* (continuación)

c) ESTEROLES



44 R = CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-

45 R = CH<sub>3</sub>

e) AROMATICO SIMPLE



50

d) CUMARINAS



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<u>46</u>	OH	OMe
<u>47</u>	OMe	OH
<u>48</u>	OGlu	OMe
<u>49</u>	OH	H

f) POLIALCOHOL



51

Figura 11. Estructura de los metabolitos del Género *Randia* (continuación).



## 1.2 ASPECTOS ETNOBOTANICOS DE LA RANDIA ECHINOCARPA

La *Randia echinocarpa* es una de las especies del género, endémica en México. Su distribución comprende principalmente el sur de Sonora, el suroeste de Chihuahua, parte central de Guerrero y Suroeste de Puebla. Crece desde el nivel del mar hasta los 1700 m de altitud. Sus sinónimos incluyen: *Bassiacantha echinocarpa* (Sessé et Mocino ex. D. C.) Bullock, *Solana echinocarpa* (Sessé et Mocino ex. D. C.) D. Dietr., y *Genipa echinocarpa* (Sessé et Mocino ex. D. C.) A. Gray. (Bye, 1988).

Los nombres comunes de la planta varían de acuerdo con la región geográfica y los grupos étnicos de dichas regiones.. En la parte central de México (estados de Guerrero, México, Michoacán, Morelos, Puebla y Distrito Federal) generalmente es llamada "granjel", mientras que al fruto de la planta se le conoce como "bola de granjel" o "cabeza de negro" (Baytelman, 1979; Galí, 1984; Martínez, 1969; Martínez, 1969 b; Ortiz, 1986; Santamaría, 1978; Soto, 1987).

El nombre "granjeno chino" parece estar limitado a Michoacán (Soto, 1987); "chacua" y sus variantes "chacual", "schacua", "shacua", "shacua" (Martínez, 1979 a; Matuda en Martínez, 1979 c; Santamaría, 1978; Soto, 1987), es probablemente derivado del nombre tarasco "xacua" (Reko en Martínez, 1979 a; Santamaría, 1978; Soto, 1987) el cual es utilizado en

los estados de Guerrero, México y Michoacán.

En el noroeste de México (Chihuahua, Sinaloa y Sonora), la planta es comunmente denominada con los nombres de "papache" o "papachi" (Benett y Zning, 1935; Gentry, 1942; Gray, 1986; Marestrias *et al.*, 1982; Martínez, 1969; Pennington, 1963; Standley, 1976). En Sinaloa también se le conoce como "papache picudo" (González Ortega en Martínez, 1979 c; Martínez, 1969; Standley, 1926). Es de hacer notar que con el nombre de "papache" se puede designar popularmente a otras especies de *Randia* (Martínez, 1979 c) y las variantes Tarahumaya de este nombre incluyen: "apatco" (Benett y Zning, 1935), "apachi" y "apache" (Marestrias *et al.*, 1982).

En Morelos y Guerrero se usa el nombre náhuatl "tecoloza pol" y sus variantes "cuahuixcoloctli", "tecolochapo", "tecoloche" y "tecolosapo" (Martínez, 1979 c; Ortiz, 1986; Soto, 1987). Los indios warihuo del oeste de Chihuahua y sus vecinos de Sonora usan el nombre de "josocola" (Gentry en Martínez, 1979). Otros nombres locales aplicables a *Randia cckino* cada uno son poco conocidos y restringidos únicamente a las poblaciones que hacen uso de esta planta medicinal. Por ejemplo los tarahumaras de Chihuahua usan los nombres "barari", "kohakori", "kajakori", "kakawari" y "kákware" (Brambila, 1976; Pennington, 1963) y en los estados de México y Michoacán se le conoce como "cirian chino" (Martínez, 1979 c). Por último

cabe mencionar que las ramas perpendiculares del "granjel" han dado origen a "crucecillo chino" y "crucecillo", nombres como se le conoce en los estados de Guerrero, Michoacán y Morelos (Soto, 1987).

Popularmente la corteza, el fruto y las hojas de la *Ran*  
*día echinocarpa*, se emplean medicinalmente para infinidad de propósitos. En la parte central de México, el fruto crudo y entero se usa para el tratamiento de la tos, en Chihuahua se dice que el fruto es un potente acidificante estomacal (Branbilla, 1976) y en todo México las hojas y el fruto crudo o en forma de té son consumidos para el tratamiento de la diabetes así como también para tratar la diarrea (Cali, 1984; Martínez, 1969; Martínez, 1979 a,b ).

Antiguos informes mencionan, también, el consumo de el fruto para el tratamiento de la malaria (Standley, 1926). Una bebida parecida al chocolate, preparada de la pulpa del fruto y del cirión (*Crescentia alata* Kunth) es tomada para aliviar contusiones internas (Soto, 1987). "Nervios", una enfermedad cultural asociada con el sistema nervioso, es tratada en Morelos con una decocción del fruto (Ortiz, 1986). En Michoacán enfermedades tales como "pasmos en el pecho", bronquitis, resfriados severos o fuertes enfriamientos, son tratados con la ingestión de una decocción del fruto junto con la fruta del cirión (Soto, 1987). Un vino que contiene las semillas de la

planta es tomada durante 9 días para el tratamiento de enfermedades pulmonares. También se ha descrito que el cáncer intestinal y estomacal puede ser tratado con *Randia echinocarpa* (Martínez, 1969). La infusión del fruto es tomada como "agua de uso" para males circulatorios. Sin embargo, la planta se emplea comunmente para el alivio de varias enfermedades renales; para el tratamiento de estas enfermedades se prepara una infusión a base del fruto y se consume 3 veces al día, o bien como "agua de uso" hasta observar mejoría (Savtelman, 1979; Martínez, 1969; Ortiz, 1986; Soto, 1987). El fruto también puede ser preparado en una infusión mezclado con varias plantas, como el "cabello de elote" el fruto del "cuautote" (*Passiflora edulis* D.C.) y las hojas de otras plantas no identificadas (Ortiz, 1986).

Por último, es importante señalar que comercialmente se venden diuréticos basados en mezclas de hierbas que incluyen "granjel", ejemplos de los mismos son: el "riñosa" y la "tizna uva".

### 1.3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 1.3.1 MATERIAL VEGETAL

La planta [fruto] fue recolectada en Axochiapan, Morelos, México, en octubre de 1986 y fue identificada por el Dr. Robert Bye, del Jardín Botánico Exterior, Instituto de Biología, UNAM. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional, en una colección Etnobotánica (Voucher DL 15192).

#### 1.3.2 METODOS DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR

El material vegetal seco fue pulverizado y se extrajo con metanol. Posteriormente se efectuó una partición del extracto metanólico con acetato de etilo y agua. La capa orgánica resultante fue secada con sulfato de sodio anhidro y concentrada a sequedad según el procedimiento descrito en el Esquema 1.

El extracto de acetato de etilo (110 g) se fraccionó preliminarmente mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (1.5 Kg de sílice gel G 60 Merck 70-230 mallas); el proceso de elución se efectuó con cloroformo, acetato de etilo y metanol en diferentes proporciones. Se recogieron mil fracciones de 350 ml cada una; cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares.



- 
- 1/ Cantidad de material vegetal 3 kg.
  - 2/ Extracción vía maceración (3 veces por período de 2 días cada vez, 9 l hexano).
  - 3/ Extracción vía maceración (3 veces por período de 2 días cada vez, 8 l metanol).
  - 4/ Cantidad total del extracto metanólico 400g.
  - 5/ Cantidad total del extracto de acetato de etilo 110g.

ESQUEMA 1. Obtención de los extractos a partir del fruto de la *Randia echinocarpa* y fraccionamiento preliminar del extracto metanólico.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF 254 Merck). Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado y para lograr el desarrollo del color era necesario calentar por 2 minutos a 110°C.

Como fase móvil se utilizaron varios sistemas de disolventes: hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-acetato de etilo, cloroformo-metanol, en diversas proporciones.

### 1.3.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS

#### 1.3.3.1 Aislamiento de D-manitol 51

Del extracto metanólico concentrado precipitó espontáneamente un compuesto amorfo, el cual fue purificado por sucesivas recristalizaciones con metanol, al cabo del proceso se obtuvieron 7.5 g de un compuesto cristalino de p.f. 166-168°C.

#### 1.3.3.2 Aislamiento de $\beta$ -sitosterol 44

De las fracciones 48-64 de la columna original, eluidas con cloroformo, se obtuvieron 150 mg de un compuesto cromatográficamente homogéneo y de p.f. 137°C.

1.3.3.3. Aislamiento de los ácidos quinóvico 52  
y oxoquinóvico 53

De las fracciones 250- 312 eluidas con  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  (7.5:2.5), precipitó un polvo blanco (4 g) de p.f. mayor de  $280^\circ\text{C}$ , insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos habituales. El análisis cromatográfico de este sólido indicó que consistía en una mezcla de dos constituyentes; la resolución en sus componentes individuales, se realizó al tratar 1 g de la mezcla con un exceso de  $\text{CH}_2\text{N}_2$  y el crudo de la reacción fue sometido a una cromatografía preparativa en capa delgada utilizando  $\text{CHCl}_3$ -hexano (9:1) como fase móvil. Al término de este proceso de separación se obtuvieron 600 mg de quinovato de dimetilo 52a de p.f.  $170-171^\circ\text{C}$  y 250 mg de oxoquinovato de dimetilo 53a de p.f.  $145^\circ\text{C}$ .

El ácido quinóvico también fue separado como su derivado acetilado 52b. Se tomaron 100 mg de la mezcla y se trataron con anhídrido acético en piridina, posteriormente el compuesto acetilado fue separado por filtración, lavado y secado *in vacuo*, obteniéndose 70 mg del ácido acetil quinóvico 52b de p.f.  $220-222^\circ\text{C}$



1,3,3.4 Aislamiento de los ácidos ursólico 36 y oleanólico 35

Las aguas madres de las fracciones 250-312, luego de separar los ácidos quinóico y oxoquinóico, fueron recromatografiadas en una columna sobre gel de sílice (162 g), la elución se llevó a cabo con hexano, incrementándose gradualmente, la polaridad con cloroformo.

De las fracciones 34-285 de esta columna eluidas con hexano- $\text{CHCl}_3$  (2:8) se obtuvieron 2.1 g. de un polvo de p.f.  $250^\circ\text{C}$ , el cual también resultó estar constituido por una mezcla de ácidos triterpénicos. Para resolver la mezcla se decidió transformar al  $\Delta^{12}$  - oleaneno presente en su correspondiente bromolactona (Radzan *et al.*, 1982; Lewis *et al.*, 1983). Así, un gramo de la mezcla se trató con una solución de 50 mg de bromo en 16 ml de metanol. La mezcla de reacción se dejó por un tiempo de 2 horas con agitación magnética y calentando en baño maría, al cabo de ese tiempo el crudo de reacción se trasladó a un recipiente que contenía agua fría dando lugar a la formación de un precipitado. Al analizar el sólido obtenido (1.1 g) mediante CCD se observaron dos compuestos, los cuales fueron separados por cromatografía en columna de gel de sílice, desactivada al 10% con  $\text{H}_2\text{O}$ . La elución se realizó con mezcla de hexano- $\text{CHCl}_3$  (5:5),  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (8:2) y AcOEt 100% y se recogieron un total de 122 fracciones de 25 ml cada una.

De las fracciones 35-66 se obtuvieron 0.35 g de la 12-bromo-13,28 lactona oleagosa 35a en forma de agujas cristalinas de p.f. 225°C y de las fracciones 110-117 se obtuvieron 0.2 g del ácido ursólico 36 de p.f. 278-279°C. Por último 300 ml. de la lactona 35a se sometieron a reflujo con 7.5 ml de ácido acético y 1.8 g de Zn. durante 3 horas. La mezcla de la reacción se filtró y al filtrado se añadió hielo para producir un sólido blanco (170 mg) que fue recolectado por filtración y lavado con agua. El precipitado fue purificado por cromatografía y el producto obtenido fue posteriormente esterificado con diazometano. El sólido cristalino resultante del proceso de metilación se recrystalizó sucesivamente con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH para obtener 90 mg del oleato de metilo 35c de p.f. 198-200°C.

#### 1.3.3.5 Aislamiento del $\beta$ -D- gluco-8- sitosterol 54

De las fracciones 444-466 de la columna original, eluidas con  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  (1:1) se obtuvieron 30 mg de un polvo cristalino de p.f. 280°C

#### 1.3.4 CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

En general, la caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante métodos químicos y espectroscópicos.

##### 1.3.4.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin Elmer modelo 549 B. Los espectros de masas fueron obtenidos en un - - aparato Hitachi - Perkin Elmer RMU-6D. Los espectros de RMNP se determinaron en un espectrómetro Varian FT-80 ; se utilizó TMS como referencia interna y utilizando como disolvente:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  y piridina- $\text{d}_5$ .

#### 1.3.4.2. Preparación de derivados.

a) Acetilación: Para formar los derivados acetilados - de los productos aislados se empleó 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó por 12 horas a temperatura ambiente. Cuando en el medio de la reacción se formaron productos sólidos, éstos se separaron por filtración y posteriormente se lavaron con éter etílico; en los otros casos se procesó la reacción de la manera habitual.

b) Metilación: Para obtener los derivados metilados de los productos aislados se utilizó una solución etérea de - - diazometano. Por cada 100 mg de producto a metilar se utilizó 20 ml de una solución acuosa de hidróxido de potasio al 50%, 20 ml de éter etílico y 2 g de N-nitroso-N-metil urea. En todos los casos el producto a metilar se disolvió en 10 ml de etanol o en 10 ml de éter y la mezcla se dejó reaccio

nar a temperatura ambiente durante 12 horas.

c) Oxidación del quinovato de dimetilo 52a a oxoquinovato de dimetilo 53a, 100 mg de quinovato de dimetilo aislado se disolvieron en 1 ml de piridina y se le adicionaron 100 mg de trióxido de cromo, la mezcla de reacción se dejó con agitación por espacio de 3 horas a 0°C y posteriormente 12 horas a temperatura ambiente. Del crudo de la reacción se extrajo el producto orgánico con acetato de etilo. Después de lavados sucesivos con agua y ácido clorhídrico diluido, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró al vacío. Como resultado de este proceso se obtuvieron 25 mg de oxoquinovato de dimetilo.

#### 1.4 RESULTADOS Y DISCUSION

El extracto metanólico del fruto de *Ranđla echinocarpa*, después de haber separado el polialcohol manitol 51, fue fraccionado a grosso modo mediante una partición acetato de etilo-agua. De la fase orgánica resultante de este proceso, luego de cromatografías sucesivas en columna o en capa delgada sobre gel de sílice se obtuvieron 6 metabolitos secundarios de origen mevalónico: dos esteroides comunes ( $\beta$ -sitosterol 44 y  $\beta$ -D-glucositosterol 54), y cuatro ácidos triterpénicos (ácido quinóico 52, oxoquinóico 53, ursólico 36 y oleanólico 35). El rendimiento de estos compuestos se indica en la Tabla 6. A continuación se discute muy brevemente

te la identificación de cada uno de los metabolitos aislados.

Tabla 6 Rendimiento de los metabolitos aislados de *Randia echinocarpa*

COMPUESTO	RENDIMIENTO
<u>51</u>	7.5 g (0.25%)
<u>44</u>	150 mg (0.005%)
<u>54</u>	30 mg (0.001%)
<u>52a</u>	600 mg (0.020%)
<u>53a</u>	250 mg (0.008%)
<u>36</u>	200 mg (0.006%)
<u>35</u>	170 mg (0.005%)

#### 1.4.1 IDENTIFICACION DE MANITOL 51

El polvo blanco que precipitó espontáneamente del extracto metanólico fue caracterizado como manitol por comparación con muestra auténtica adquirida comercialmente siguiendo la metodología convencional.

#### 1.4.2 IDENTIFICACION DE $\beta$ -SITOSTEROL 44

El compuesto cromatográficamente homogéneo de las fracciones 48-64 fue caracterizado como  $\beta$ -sitosterol por comparación, también, con una muestra original.

1.4.3 IDENTIFICACION DE LOS ACIDOS QUINOVICO 52  
Y OXOQUINOVICO 53

Tal como se especificó en la parte experimental a pesar de los diferentes intentos realizados, no fue posible separar mediante métodos cromatográficos la mezcla de ácidos tri-terpénicos presentes en las fracciones 250-312. En consecuencia se procedió a resolver la mezcla mediante los dos caminos alternativos ilustrados en la Figura 12. Una vez separados los derivados, estos fueron caracterizados como el quinovato de dimetilo 52a, ácido acetil quinóvico 52b y el oxoquinovato de dimetilo 53a. En la Tabla 7 se indican las constantes físicas y espectroscópicas de estos compuestos. Los criterios que permitieron la identificación de los derivados de los ácidos quinóvico y oxoquinóvico se resumen a continuación:

- a) Identificación del ácido quinóvico 52 bajo la forma de su ester dimetílico 52a y de su derivado acetilado 52b

El espectro de masas del ester dimetílico 52a (Tabla 6) presentó un ión molecular a  $m/z$  514, el cual corresponde a una fórmula molecular de  $C_{32}H_{50}O_5$ ; otros picos importantes se observaron a  $m/z$  306, 208 y 207 (pico base), estos fragmentos son característicos de ácidos triterpénicos del tipo  $\Delta^{12}$ -ursenos (Budzikiewicz et al., 1963; Ogunkoya, 1981) los cuales resultan de una ruptura de tipo Retro-Diels-Alder, como se indica en la Figura 13.

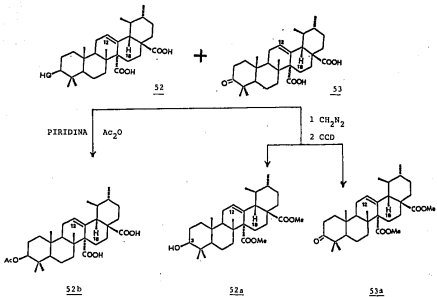


Figura 12. Separación de los ácidos quínico y oxoquínico.

Tabla 7. Constantes físicas y espectroscópicas del quinovato de dimetilo 52a, ácido acetil quinóvico 52b y oxoquinovato de dimetilo 53a.

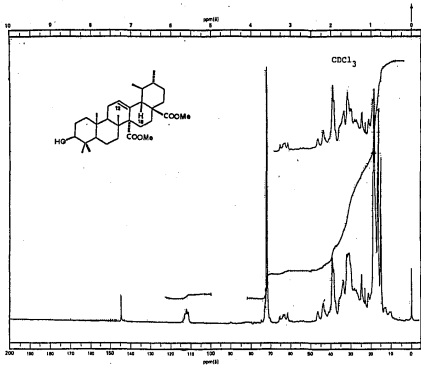
No. DE COMPUESTO	52 <sub>a</sub>	52 <sub>b</sub>	53a
FM	C <sub>32</sub> H <sub>50</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub>
PF (°C)	170-171	220-222	144-145
IR <sub>MAX</sub> <sup>cm</sup> -1	3651, 1720	3450, 1720	1720, 1690
EMIE m/z (%)	514 (8.2, M <sup>+</sup> ), 496 (2), 484 (1.3), 274 (87.8), 207 (100), 55 (88.8)	528 (12, M <sup>+</sup> ), 485 (2.5), 464 (2.3), 471 (1.2), 470 (5.1), 135 (35), 69 (36.1), 190 (46), 43 (100)	512 (27.4, M <sup>+</sup> ), 453 (57.5), 306 (23.5), 274 (45), 262 (18), 247 (35), 215 (46), 105 (33), 41 (100), 91 (50.4)



El espectro de RMNP (Espectro 1) permitió verificar inequívocamente que el compuesto 52a era el ester dimetílico de un triterpenol con el esqueleto básico del tipo  $\Delta^{12}$ -urseno (Cheung *et al.*, 1969) ya que se observaron señales para:

1. Seis metilos entre  $\delta$  0,75 y 0,95 .
2. Un protón metínico a  $\delta$  2,24 (d, J=10 Hz) y un protón vinílico a  $\delta$  5,62 (t) asignables a H-18 y H-12 del esqueleto básico de un  $\Delta^{12}$ -urseno.
3. Un protón geminal de un alcohol secundario a  $\delta$  3,18 (J=10 y 6 Hz).
4. Dos grupos metoxilo a  $\delta$  3,61 y 3,62, ambas resonancias se observaban como singletes intensos.

Una vez establecido el esqueleto básico del compuesto y con el conocimiento de que el compuesto original debía tener dos funciones carboxílicas y un grupo carbinólico secundario, sólo restaba por asignar la disposición y estereoquímica de estos grupos. En ese sentido la función alcohólica secundaria se ubicó en la posición 3 con base en consideraciones de tipo biogénicas y la estereoquímica de este grupo hidroxilo debía ser  $\beta$  de acuerdo con el patrón de acoplamiento observado. Por otra parte, el análisis detallado del espectro de masas indicaba que las funciones carboxílicas se encontraban en los anillos D y E debido a la presencia de el fragmento 306 (Figura 13); además el fragmento 208 verificó



Espectro 1

E-1 Espectro de RMNP del quinato de dimetilo 52a

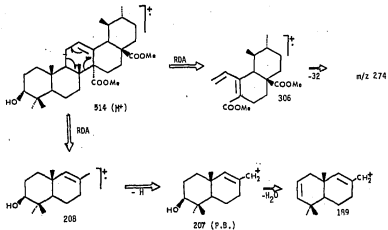


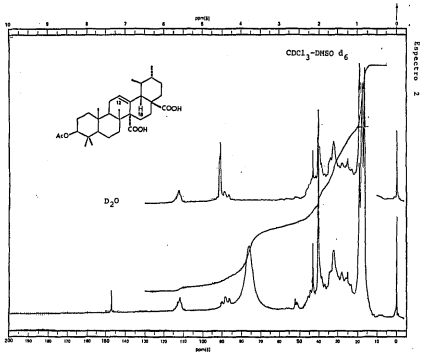
Figura 13. Patrón de fragmentación tipo Retro-Diels-Alder del quinovato de dimetilo 52a.

que la función carbinólica se encontraba en los anillos A y B.

Las características espectroscópicas y espectrométricas del derivado acetilado 52b (Tabla 7) eran muy similares a las del ester dimetílico 52a. En el caso del espectro de RMNP (Espectro 2) las diferencias más importantes son las siguientes: la ausencia de las señales para los metoxilo y el protón geminal a la función hidroxílica secundaria. En lugar de ésta última, se observó la señal correspondiente al protón geminal del ester a  $\delta$  4.42 (dd). Finalmente se observó también en este espectro el singulete que integraba, para tres protones a  $\delta$  2.03 asignable al acetato de la función carbinólica secundaria. Las características físicas y espectroscópicas de el derivado metilado del ácido quinóico corresponden con las ya descritas en la literatura (Adeoye y Waigh, 1983).

b) Identificación del ácido oxoquinóico 53 bajo la forma de su ester dimetílico 53a

Los parámetros espectrométricos y espectroscópicos del ester dimetílico 53a, fueron similares a los del compuesto 52a (Tabla 7). En el caso del ester dimetílico 53a el espectro de masas presentó un ión molecular, que se observó a  $m/z$  512 y por lo tanto presentaba dos unidades de masa menos que el compuesto 52a. El patrón de fragmentación, como se ilustra en la Figura 14 fue análogo al 52a. El espectro de



E-2 Espectro de RMNP del ácido acetil quinóvico 52b

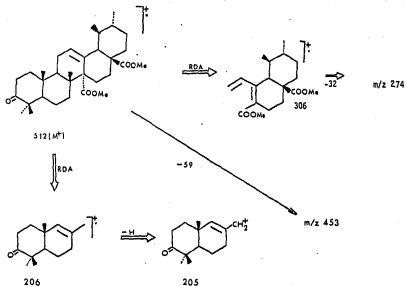


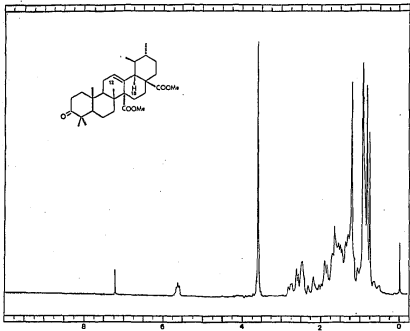
Figura 14 Patrón de fragmentación del oxoquinovato de dimetilo 53a.

RMNP (Espectro 3) también fue muy parecido al de ester 52a, difiriendo fundamentalmente en la ausencia de la señal correspondiente al protón geminal de la función hidroxilada y a la presencia de un multiplete a  $\delta$  2.6, consistente con un metileno  $\alpha$  al grupo ceto en C-3. Tanto las diferencias como similitudes observadas permitieron sugerir que esta sustancia 53a corresponde al derivado oxidado en la posición C-3 del ester metílico del ácido quinóvico 52a; para confirmar esta propuesta los dos compuestos se correlacionaron químicamente, oxidando el quinovato de dimetilo 52a, mediante el reactivo de Collins. El producto de la reacción resultó ser idéntico al ester metílico del producto previamente aislado 53a (Figura 15).

#### 1.4.4 IDENTIFICACION DEL ACIDO OLEANOLICO 35 Y DEL ACIDO URSOLICO 36

De las fracciones 250-312 de la columna original, e-luidas con  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt(3:1) se obtuvieron 1.188 g de un sólido blanquecino de p.f. 230-235°C. Las constantes físicas y espectroscópicas de este polvo se resumen en la Tabla 8.

El análisis cromatográfico de este precipitado sugirió que posiblemente, consistía en una mezcla de dos constituyentes, ya que al revelar las cromatoplasmas eluidas en diferentes sistemas, se observaba una mancha alargada. El análisis espectroscópico global confirmó que efectivamente el



Espectro 3

E-3 Espectro de RMNP del oxoquinovato de dimetilo 53b



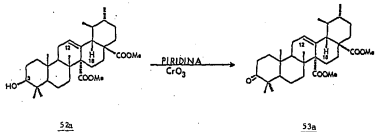


Figura 15. Correlación química del quinovato de dimetilo 52a y oxoquinovato de dimetilo 53a.

sólido amorfo estaba constituido por una mezcla de ácidos triterpénicos de los tipos  $\Delta^{13}$ -oleaneno y  $\Delta^{12}$ -urseno, de acuerdo con las siguientes observaciones:

a) El espectro de IR (Espectro 4) presentó bandas de absorción a  $3600-2500\text{ cm}^{-1}$  (OH de ácido carboxílico),  $1693\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de ácido).

b) El espectro de masas (Tabla 8) presentó un íon molecular a  $m/z$  456 ( $C_{30}H_{48}O_3$ ) y un pico base a  $m/z$  248. Este último fragmento es característico de triterpenos pentacíclicos del tipo  $\Delta^{12}$ -oleanenos y  $\Delta^{12}$ -ursenos y resulta de una ruptura del tipo Retro-Diels-Alder (Ogunkoya, 1981).

c) El espectro de RMNP (Espectro 5) presentó señales para:

1. Un protón vinílico a  $\delta$  5.25
2. Un protón geminal a un hidroxilo secundario a  $\delta$  3.17 (n).
3. Dos protones alílicos, uno de ellos aparecía como dd ( $J=10, 0.6\text{ Hz}$ ) a  $\delta$  2.85; y el otro como un d ( $J=10\text{ Hz}$ ) a  $\delta$  2.25. El primero es característico del núcleo H-18 de un oleaneno y el segundo del correspondiente protón en un urseno (Cheung y Williams, 1969; Cheung y Yan, 1972). Esta información fue quizás la más importante para determinar la presencia de una mezcla isomérica en el producto

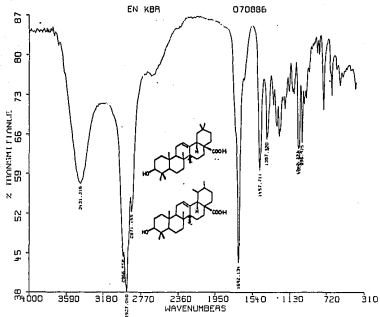
to aislado.

4. Varios metilos en la zona comprendida entre  $\delta$  0.75  
-1.25

Tabla 8 Constantes físicas y espectroscópicas para la  
mezcla de ácidos ursólico 36 y oleanólico 35

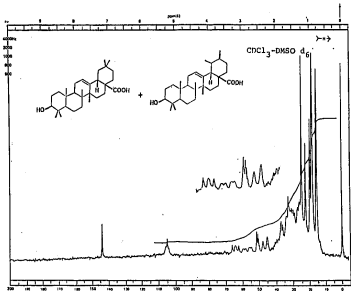
p.f. (°C)	230-233'
IR $\nu_{\text{max}}$ KBr $\text{cm}^{-1}$	1600-2500, 1693, 1457, 1387.
EMIE m/z (X)	456 (3.4), 249 (21.5), 248 (100) 234 (3.1), 207 (24), 203 (59.9), 189 (13), 136 (19).
RMNP (80 MHz $\text{CDCl}_3$ -DMSO; $\delta$ )	0.75 (s, 3H), 0.9 (s, 6H), 1.0 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.25 (s, 6H), 2.25 (d, J=10 Hz, H-18), 2.85 (dd, J=10, 6 Hz, H-18), 3.2 (dd, 1H, H-3), 5.25 (t, 1H, H-12).

Para resolver la mezcla en sus componentes individua  
les se decidió utilizar la secuencia desarrollada por Lewis  
y Tucker (1983), tal y como se indicó en la sección experimen  
tal. Esta metodología (Figura 16) consiste en la generación  
de la bromolactona derivada del ácido oleanólico 35a, la cual  
resulta perfectamente diferenciable en su comportamiento cro



E-4 Espectro de IR de la mezcla de ácidos oleanólico 35 y ursólico 36.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro 5

E-5 Espectro de RMNP de la mezcla de ácidos oleanólico 35 y ursólico 36.

matográfico al ácido ursólico 36. El tratamiento con Zn en medio ácido de la bromolactona 35a regeneró el ácido libre. La caracterización de los derivados 35a y 35b se realizó por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los previamente descritos en la literatura para la bromolactona oleandílica y su derivado acetilado (Razdan *et al.*, 1982).

El producto natural 35 fue caracterizado como el ácido oleandílico bajo la forma de su ester metílico 35c mediante la comparación con una muestra auténtica. De la misma manera el ácido ursólico 36 se identificó por comparación con una muestra original del ácido libre 36, y su acetil metil derivado 36b. Las reacciones que permitieron la separación de el ácido oleandílico y del ácido ursólico se resumen en la Figura 16 y las constantes físicas y espectroscópicas de los productos naturales y sus derivados sintetizados se indican en las Tablas 9 y 10.

#### 1.4.5 IDENTIFICACION DEL $\beta$ -D-GLUCO- $\beta$ -SITOSTEROL 54

El polvo obtenido de las fracciones 444-466 de la columna original, eluidas con  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  (1:1), era de naturaleza glucosídica en virtud de que la prueba realizada con el Reactivo de Molish fue positiva. Efectivamente, la hidrólisis ácida con  $\text{HCl}$  1N, permitió obtener la aglicona que correspondía en sus características físicas y espectroscópicas con el compuesto 44. Al mismo tiempo se detectó mediante CCD la --

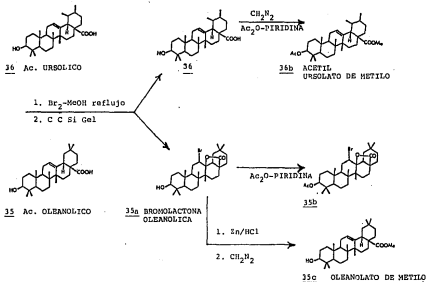


Figura 16. Separación de los ácidos Ursólico y Oleanólico.

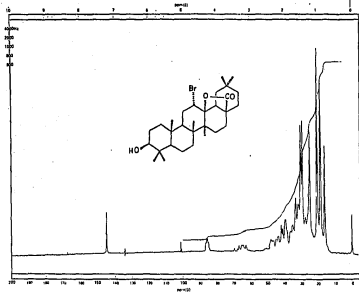
Tabla 9 . Constantes físicas y espectroscópicas de bromolactona oleanólica y del éster metílico del ácido oleanólico.

	<u>35a</u>	<u>35b</u>
p.f.	225°C	198-200°C
I.R. $\frac{\text{KBr}}{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$	3330, 2930, 2860, 1770, 1460, 1380, 1310, 1255, 1240, 1215, 1165, 1135, 1105, 1075, 1025, 925, 905, 875	3461, 3436, 3084, 3361, 2928, 2859, 1727, 1640, 1462, 1385, 1200, 1190, 1163, 1032, 996
EMIE $m/z$ (%)	536 (1.4 $M^+$ ), 535, (0.7), 534 (1.5), 207 (100), 203 (48.9), 81.2 (50.5), 43 (67.7)	470 ( $M^+C_{31}H_{50}O_3$ ), 117, 455 (M-15, 1.35), 411 (M-59, 5.0), 410 (M-60, 4.3), 262 (M- 208), 207 (16.2), 203 (100), 189 (26), 133 (25)
PMNP 80MSz, $\text{CDCl}_3$ -DMSO (ppm)	0.74 (s, 3H, H-26), 0.90 (s, 6H, H-24, H-25), 1.0 (s, 3H, H-23), 1.23 (s, 3H, H-27), 1.45 (s, 3H, H-29), 3.3 (m, 1H), 1.50 (s, 3H, H-30), 4.30 (m, 1H, H-128)   E-6	0.75 (s, 3H, H-26), 0.8 (s, 3H, H-24), 0.9 (s, 6H, H-25, H-29), 1.0 (s, 3H, H-30), 1.15 (s, 3H, H-23), 1.25 (s, 3H, H-27), 2.85 (dd, 1H, H-8), 3.2 (dd, 1H, H-3), 5.25 (t, 3H, H-12)  E-7



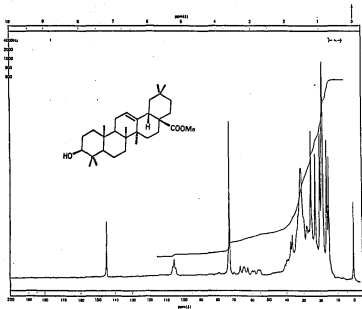
Tabla 10. Constantes físicas y espectroscópicas del ácido ursólico 36 y su derivado acetilado metilado 36b

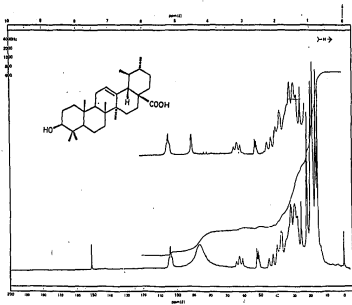
	<u>36</u>	<u>36b</u>
p.f.		
I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}} \text{ cm}^{-1}$	3417, 3156, 2966, 2927, 2871, 1692, 1457, 1387, 1286, 1239, 1030, 996	2990, 2950, 2880, 1742, 1738, 1465, 1380, 1250
EMIR $\pi/a$ (%)	456 ( $\text{M}^+$ , 1.9), 447 (0.2), 248 (100, 207 (21.1), 203, (28.8), 133 (32.8)	512 ( $\text{M}^+$ , 1.2), 498 452 (3), 262 (92.7), (68), 133 (33.5) 43
RMN <sup>1</sup> 80MHz, $\text{CDCl}_3$ -DMSO	0.7 (s, 3H, H-26), 0.3 (s, 6H, H-29), H-24), 0.91 (s, 3H, H-25), 0.90 (s, 6H, H-23), 1.1 (s, 3H, H-27), 2.25 (d, J=10Hz, 1H, H-18), 3.2 (dd, J=10, 7Hz, 1H, H-3), 4.3 (sa, 1H, OH), 5.20 (t, 1H, H-12).  E-8	0.75 (s, 3H, H-26), 0.85 (s, 6H, H-29, H-24), 0.90 (s, 3H, H-25), 0.95 (s, 3H, H-23), 1.07 (s, 3H, H-27), 2.04 (s, 3H, $\text{CH}_3$ -C=O), 2.20 (d, J=11Hz, 1H, H-18), 3.58 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 4.45 (dd, J=10, 7Hz, 1H, H-3), 5.23 (t, 1H, H-12)  E-9



Espectro 6

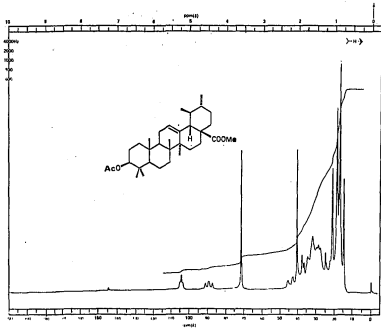
E-6 Espectro de RMNP de la bronolactona oleanónica 35a.

E-7 Espectro de RMN<sup>1</sup> del oleannolato de metilo 35c



Espectro 3

E-8 Espectro de RMNP del ácido uránico 3b



E-9 Espectro de RMNP del acetil ursolato de metilo 16b.

$\beta$ -D-Glucosa como el único carbohidrato presente en el producto de hidrólisis. La comparación directa del derivado acetilado de este compuesto con muestra auténticas permitió corroborar la identidad del compuesto aislado como el  $\beta$ -D-Glucosidosterol.

#### 1.4.6 EVALUACION BIOLOGICA DEL ACIDO QUINOVICO 52

El ácido quinóvico 52 se evaluó biológicamente midiendo su toxicidad para Attemia salina y determinando su citotoxicidad en diferentes sistemas de tumores humanos. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 11. Estas evaluaciones se efectuaron en la Universidad de Purdue, en el Tumor - Cell Cultur Center.

Tabla 11 Prueba de citotoxicidad  $ED_{50}$  (ug/ml) para el ácido quinóvico.

SISTEMA DE TUMOR EN HUMANO			RESULTADO DE LA EVALUACION
A	549	(Pulmón)	5.71
MCF	7	(Pecho)	80.7
H-T	29	(Colon)	4.63

## 1.5 CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan del presente capítulo son las siguientes:

- 1.5.1 El estudio fitoquímico del extracto acetato de etilo de la fruta seca de *Randia echinocarpa* permitió el aislamiento e identificación de dos esteroides comunes, cuatro ácidos triterpénicos y el polialcohol manitol. Los esteroides obtenidos fueron el  $\beta$ -sitosterol 44 y el  $\beta$ -glucositosterol 54 en tanto que los ácidos triterpénicos fueron caracterizados como ácidos quinóvico 52, oxoquinóvico 53, ursólico 36 y oleanólico 35.
- 1.5.2 Los metabolitos aislados e identificados de la *Randia echinocarpa* concuerdan perfectamente con el perfil químico de la familia a la cual pertenece. Es de hacer notar que es la primera vez que se describe la presencia de los ácidos quinóvico 52 y oxoquinóvico 53 en el género.
- 1.5.3 A priori se podría suponer que la presencia del manitol en esta planta esté relacionada con el uso popular de la misma en el tratamiento de enfermedades renales. Sin embargo, cabe mencionar que terapéuticamente el manitol se administra por vía intravenosa, debido a su pobre absorción a nivel del tracto gastroin

testinal. Si bien es cierto que el manitol se encuentra en la infusión que se prepara popularmente a partir del "granjel" su absorción sería muy limitada y por lo tanto, la presencia de este polialcohol en el "granjel" no explica su uso popular de acuerdo al modelo alopatético establecido.

- 1.5.4. Sería recomendable evaluar los ácidos quinóvico 52 y oxo-quinóvico 53 como posibles agentes potenciales para el tratamiento de cálculos renales.
- 1.5.5. El ácido quinóvico 52 fue evaluado biológicamente -- midiendo la toxicidad para *Artemia salina* y la citotoxicidad en diferentes sistemas de tumores. En el primer ensayo se determinó que la dosis letal ( $LC_{50}$ ) fue mayor de 1000 ppm. En el segundo caso se emplearon tres diferentes sistemas de tumores humanos: Pulmonar, de pecho y de colon. Los valores de  $ED_{50}$  encontrados fueron, 5.71, 80.7 y 4.63 ppm, respectivamente. Como se puede apreciar los mejores resultados se obtuvieron con el tumor de colon. Muy posiblemente esta actividad se encuentre relacionada con el uso popular del fruto para el tratamiento del cáncer intestinal.



## CAPÍTULO II

## COMPUESTOS CITOTÓXICOS DE LA EXOSTEMA MEXICANUM

## 2.1. GENERALIDADES ACERCA DEL GÉNERO EXOSTEMA.

El género *Exostema* está constituido aproximadamente por 26 especies. El mayor número de ellas se encuentran distribuidas en las Indias Occidentales, Sudamérica y México (Stanley, 1975). Según algunos taxonomistas modernos este género es artificial y requiere de una profunda revisión taxonómica (Aiello, 1979). En México se conocen tres especies: La *Exostema caribaeum*, la *Exostema coulteri* y la *Exostema mexicanum*.

Hasta la fecha sólo se han investigado dos especies la *E. caribaeum* y la *E. coulteri*. De la primera se han aislado e identificado varias fenil cumarinas (Sánchez Viesca, 1969; Mata et al., 1987, 1988), compuestos aromáticos simples y el polialcohol manitol (Krebs y Griensiger, 1960). De la *E. coulteri*, se aislaron y caracterizaron triterpenos pentacíclicos con esqueletos oleanano, ursano y lupano, así como fitoesteroles (Mata et al., 1988).

En la Tabla 12 se resumen las investigaciones químicas, que se han realizado sobre el género *Exostema*, indicándose los diferentes tipos de metabolitos secundarios, ejemplos de los mismos y sus fuentes naturales.

Tabla 12. Perfil fitoquímico del Género *Exostema*

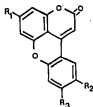
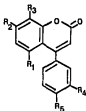
FUENTE NATURAL <i>Exostema caribaeum</i> <sup>1</sup> y <i>Exostema coultteri</i> <sup>2</sup>		
TIPO DE METABOLITO	No. DEL COMPUESTO Y NOMBRE	REFERENCIA
a) 4-FENIL CUMARINAS	<u>55</u> 5,7,4'-trimetoxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	Mata et. al., 1988c
	<u>56</u> Exostemina <sup>1</sup>	Sánchez V. 1969
	<u>57</u> 5-O-β-D-galactosil-7-metoxi-3',4' <u>di</u> hidroxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	Mata et. al., 1987
	<u>58</u> 5-O-β-D-glucosil-3'-4' dihidroxi-7 metoxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	Mata et al., 1988c
	<u>59</u> 5-O-[6'-acetil-β-D-galactosil]-3',4' <u>di</u> hidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	" "
	<u>60</u> 5-O-β-D-galactosil-7-4' <u>di</u> metoxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	" "
	<u>61</u> 4',5'-dihidroxi-7-metoxi-5, 2'-oxido cumarina <sup>1</sup>	" "
	<u>62</u> 7,4',5'-trihidroxi-4-fenil-5, 2'-oxido cumarina <sup>1</sup>	" "
	<u>63</u> 5'-hidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil-5, 2'-oxido cumarina <sup>1</sup>	" "

Tabla 12. Perfil fitoquímico del Género *Exostema* (continuación)

FUENTE NATURAL: <i>Exostema catibacum</i> <sup>1</sup> y <i>Exostema coultteri</i> <sup>2</sup>		
TIPO DE METABOLITO	No. DEL COMPUESTO Y NOMBRE	REFERENCIA
a) 4-FENIL CUMARINAS	<u>64</u> 3',5-dihidroxi-7,4'-dimetoxi-4-fenil cumarina <sup>1</sup>	Mata et. al., 1988c
b) TRITERPENOIDES	<u>35</u> Acido oleanólico <sup>2</sup>	Mata et. al., 1988a
	<u>36</u> Acido ursólico <sup>2</sup>	" "
	<u>65</u> Acido rotundico <sup>2</sup>	" "
	<u>66</u> Betulinato de metilo <sup>2</sup>	" "
c) ESTEROLES	<u>44</u> $\beta$ -sitosterol <sup>1, 2</sup>	Mata et al., 1988a,b
	<u>54</u> $\beta$ -D-glucositosterol <sup>2</sup>	Mata et al., 1988a
d) AROMATICOS SIMPLES	<u>67</u> Anisaldehído <sup>1</sup>	Mata et al., 1988c

\* Las estructuras se ilustran en la Figura 17.

a) 4-PENIL CUMARINAS

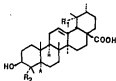


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<u>55</u>	OMe	OMe	H	H	OMe
<u>56</u>	OMe	OMe	OH	H	OMe
<u>57</u>	β-D-galactosil	OMe	H	OH	OH
<u>58</u>	β-D-glucosil	OMe	H	OH	OH
<u>59</u>	6 <sup>o</sup> -acetil- β-D-galactosil	OMe	H	OH	OH
<u>60</u>	β-D-glucosil	OMe	H	H	OMe
<u>64</u>	OH	OMe	H	OH	OMe

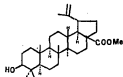
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<u>61</u>	OMe	OH	OH
<u>62</u>	OH	OH	OH
<u>63</u>	OMe	OH	OMe

Figura 17. Estructura de los metabolitos del género *Excoecaria*

b) TRITERPENOIDES

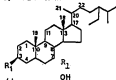


	$R_1$	$R_2$
<u>36</u>	H	CH <sub>3</sub>
<u>65</u>	OH	CH <sub>2</sub> OH



66

c) ESTEROLES



<u>44</u>	OH
<u>54</u>	OGlu

d) AROMATICOS SIMPLES



67

Figura 17. Estructura de los metabolitos del Género *Exostema*

## 2.2. GENERALIDADES ACERCA DE LA EXOSTEMA MEXICANUM

La *E. mexicanum* es una planta de la familia Rubiaceae (subfamilia Cinchonoidae) endémica de México y se encuentra principalmente distribuida en los Estados de Veracruz y San Luis Potosí. Esta especie se conoce comunmente con los nombres de "quina", quina blanca", "melena de león" y "saabac-ché". En la medicina popular de México, al igual que la especie relacionada *E. calibazum*, se emplea para el tratamiento de la malaria y el dengue y ambos comparten la particularidad de poseer la corteza y las hojas extremadamente amargas (Aicello, 1979; Martínez del Campo, 1960; Standley, 1975).

Dentro del marco general de los objetivos establecidos para esta tesis se investigó la *E. mexicanum* con miras a la obtención, fundamentalmente, de compuestos bioactivos que pudiesen justificar el uso de esta planta en la medicina tradicional. Para ello, el estudio químico fue dirigido mediante el empleo del ensayo biológico simple (Meyer *et al.*, 1982) mencionado en los objetivos.

## 2.3 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.3.1. DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PARA EL CRUSTACEO

#### *Artemia Salina*

##### 2.3.1.1. Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones, y/o extractos) se preparan disolviendo 20 mg del material en 2 ml de un disolvente apropiado (solución original). Posteriormente se transfieren a tres viales en forma independiente 500, 50 y 5  $\mu$ l de la solución original. Como las pruebas se hacen por triplicado se requerirá de un total de 9 viales (tres con una concentración de 1000  $\mu$ g/ml, tres con una concentración de 100  $\mu$ g/ml y los últimos tres con una concentración de 10  $\mu$ g/ml. Por último, se evapora el disolvente de las soluciones al vacío.

##### 2.3.1.2. Bioensayo.

Después de haber desarrollado durante 48 horas los crustáceos en un medio salino artificial, se transfieren 10 individuos a cada uno de los viales, conteniendo la muestra a evaluar más 5 ml de agua salada. 24 horas más tarde se registran el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentaje de mortalidad de los crustáceos o calculando la concentración letal media ( $LC_{50}$ ). En el caso de los extractos y fracciones los resultados se expresan en la primera forma, en tanto que para los compues

tos puros activos se expresan en terminos de la segunda - -  
(ppm)

### 2.3.2. MATERIAL VEGETAL

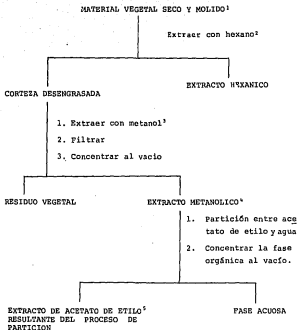
La planta (corteza del tallo) fue recolectada en Abasco  
lo del Valle, Municipio de Playa San Vicente, Estado de - -  
Veracruz, México, en julio de 1987. (Voucher: BS-189).

### 2.3.3. METODOS DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR.

El material vegetal (2.13 Kg) se dejó secar a tempera-  
tura ambiente y se cortó en trozos pequeños, posteriormente  
se pulverizó en un molino de cuchillos modelo Wiley 4. Este  
material se extrajo con metanol a temperatura ambiente. Post-  
eriormente, el residuo vegetal se decantó y el disolvente  
se concentró a sequedad, obteniéndose un residuo de 400 g ;  
50 mg de este extracto se evaluaron biológicamente de acuer-  
do a la técnica especificada en la sección 2.3.1. Una vez -  
comprobada la actividad biológica del extracto original, se  
realizó una partición del mismo entre acetato de etilo y --  
agua. La fase orgánica resultante se procesó como se especi-  
fica en el esquema 2. Asimismo 50 mg de este extracto fue--  
ron evaluados de igual forma que el extracto metanólico - -  
original.

El total del extracto orgánico (80 g ) activo se cromatografió sobre una columna preparativa de gel de sílice - -  
(1.3 kg sílice gel 60 Merck) 70-230 mallas). El proceso de





- 1/ Cantidad de material vegetal 2.1 kg
- 2/ Extracción vía maceración
- 3/ Extracción vía maceración
- 4/ Cantidad total de extracto metanólico 400 g.
- 5/ Cantidad total de extracto de acetato de etilo 80g .

Esquema 2. Obtención de los extractos a partir de la corteza de tallos de la *Exospha mexicana* y fraccionamiento preliminar del extracto metanólico.

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

elución se inició con una mezcla de hexano-cloroformo en -- una proporción de 1:1, aumentándose la polaridad hasta llegar a cloroformo; posteriormente, se adicionó al cloroformo cantidades crecientes de metanol hasta llegar a cloroformo-metanol 80:20. Se recogieron un total de 539 fracciones de 300 ml cada una. Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo la misma metodología descrita en el Capítulo I.

Cada una de las fracciones combinadas fue evaluada biológicamente, utilizando la prueba de toxicidad antes mencionada. En la Tabla 13 se resumen los sistemas de eluyentes -- empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y los resultados obtenidos de la determinación de la toxicidad.

Tabla 13 *Resumen del fraccionamiento biodirigido del extracto de acetato de etilo de *Exoascus mexicanus**

ELUYENTE	PROPORCION	No. DE FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	RESULTADOS DEL BIOENSAYO
Hexano-cloroformo	50:50	1-18	1-18	Inactiva
Hexano-cloroformo	40:60	19-143	19-45	Inactiva
			46-69	Inactiva
			70-143	Inactiva
Hexano-cloroformo	35-65	144-156	144-156	Inactiva
Hexano-cloroformo	25-75	157-208	157-208	Inactiva
Cloroformo	100%	209-318	209-318	Inactiva
Cloroformo-metanol	99:1	319-382	319-356	Inactiva
			357-802	Inactiva
Cloroformo-metanol	97:3	383-410	383-390	Inactiva
	95:5	411-435	391-430	Activa
Cloroformo-metanol	90:10	436-516	431-443	Activa
			444-500	Inactiva
Cloroformo-metanol	80:20	517-539	501-539	Inactiva

## 2.3.4. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS COMPUESTOS.

### 2.3.4.1. Aislamiento de D-manitol 51

Del extracto metanólico concentrado precipitaron 3 g de un sólido blanco de p.f. 167°C.

### 2.3.4.2. Aislamiento de $\beta$ -Sitosterol 44

De las fracciones 46-69, eulida con hexano-cloroformo (40:60) se obtuvieron 50 mg de un compuesto de p.f. 137°C.

### 2.3.4.3. Aislamiento de la 25-acetil cucurbitacina F 68

De las fracciones 391-430 de la columna original se -- obtuvo por cristalización fraccionada con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 8:2 un polvo blanco de p.f. 226-228°C y que resultó activo en el - bioensayo.

### 2.3.4.4. Aislamiento del $\beta$ -D-Gluco- $\beta$ -Sitosterol 54

De las fracciones 437-451 precipitó en forma espontánea 40 mg de un sólido amorfo que luego de sucesivas recristalizaciones con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (8.2) originó un material cristalino de p.f. 253-255°C.

### 2.3.4.5. Aislamiento de la cucurbitacina F 69

Después de la separación del  $\beta$ -D-gluco-sitosterol se y nieron las fracciones 431-443 y se evaporaron a sequedad. El residuo (3.48 g), fue evaluado biológicamente resultando ac tivo. Este se disolvió en metanol y se filtró por carbón

activado. El filtrado fue posteriormente concentrado a sequedad obteniéndose 2.6 g de un material color ámbar, el cual fue recromatografiado en una columna empacada con 53 g de gel de sílice. El eluyente empleado fue una mezcla de acetato de etilo-metanol-agua en una proporción de 80:1:3 respectivamente. De las fracciones 2-4 de esta columna se obtuvieron 300 mg de un polvo blanco de p.f. 240-242°C. Al igual que en el caso anterior, este compuesto resultó tóxico para la *Attemia salina*.

#### 2.3.4.6 Aislamiento de la 25-acetil-2-β-D-glucopiranosil cucurbitacina F 70

Las fracciones 444-500 (9.4 g) de la columna (Tabla 13) fueron recromatografiadas sobre 120 g de gel de sílice usando como eluyente acetato de etilo-metanol-agua (10:1:3). Se recogieron alícuotas de 15 ml, en las primeras doce fracciones se obtuvieron 6 g de una mezcla de menor complejidad que la inicial. Esta mezcla (6 g) fue recromatografiada sobre 60 g de gel de sílice, utilizando en esta ocasión como eluyente cloroformo con cantidades crecientes de metanol; se tomaron alícuotas de 10 ml. De las fracciones 245-250, eluidas con cloroformo-metanol (95:5), se obtuvieron 50 mg de un compuesto blanco y cristalino de p.f. 122-127°C.

2.3.4.7. Aislamiento de la 5-O- $\beta$ -D-Glucosil-3', 4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina 58

De las fracciones 501-539 de la columna original (Tabla 13) se obtuvieron 600 mg de un polvo amarillo paja de - p.f. 237-238°C.

2.3.5. CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.

2.3.5.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas de los constituyentes.

Los aparatos para obtener las constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados fueron los mismos que se utilizaron en el estudio de *R. echinoscapa* y sus características se dieron en el Capítulo I en la sección - - 1.3.4.1.

2.3.5.2. Preparación de derivados.

La metodología empleada para preparar los derivados metilados y acetilados se describió en el Capítulo I sección 1.3.4.2.

A continuación se resumen los compuestos que fueron acetilados, así como la cantidad y punto de fusión de los compuestos obtenidos.

COMPUESTO	CANTIDAD DEL COMPUESTO	COMPUESTO ACETILADO	CANTIDAD DEL PRODUCTO ACETILADO	PUNTO DE FUSION (°C)
<u>68</u>	100 mg	<u>68a</u>	105 mg	130-132
<u>54</u>	25 mg	<u>54a</u>	20 mg	138-141
<u>69</u>	100 mg	<u>69a</u>	87 mg	140-142
<u>70</u>	20 mg	<u>70a</u>	10 mg	107-110

#### 2.4 RESULTADOS Y DISCUSION

Con la finalidad de obtener compuestos bioactivos de la *E. mexicana*, el fraccionamiento del extracto acetónico de la corteza de la planta, obtenido según se indicó en la parte experimental, fue dirigido mediante un ensayo biológico simple. Este ensayo, como ya se señaló, consistió en determinar la toxicidad de compuestos puros, extractos o fracciones de esta planta para la *Asteria salina*. La selección de este ensayo se realizó considerando, por una parte, su fácil implementación, y por otra, que la actividad de un amplio grupo de compuestos activos conocidos se traduce en toxicidad para el crustáceo (Meyer *et. al.*, 1982).

Como se indica en la Tabla 14 al evaluar el extracto acetónico de la *E. mexicana* resultó muy activo. Al exponer las larvas del crustáceo *A. salina*, en un estado de desarrollo de 48 horas a concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm del extracto original, se encontró un porcentaje de mortalidad de los animales de 0, 22 y 74% respectivamente. Estos valo-

Tabla 14. Resultados de la toxicidad, expresados en porcentaje de mortalidad para la *Artemia salina*, del fraccionamiento de la corteza de la *Etostema mexicana*.

F R A C C I O N	PORCENTAJE DE MORTALIDAD		
	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	1000 $\mu$ g/ml
Extracto metanólico original	0	22	74
Extracto de acetato de etilo, resultante de la partición del extracto metanólico.	0	34	80
391-430 de la columna original (Tabla 13).	23	100	100
431-440 de la columna original (Tabla 13).	24	100	100



res indudablemente indicaron la alta toxicidad del extracto metanólico. Posteriormente, la actividad se concentró en la fase orgánica producto de la partición AcOEt-H<sub>2</sub>O, encontrándose en este caso un porcentaje de mortalidad de 0,34 y 80% en las concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm respectivamente. A continuación, el extracto de AcOEt activo, se fraccionó por medio de cromatografía en columna sobre gel de sílice. Las fracciones resultantes combinadas, fueron también evaluadas y sólo dos de ellas resultaron activas, como era de esperarse, la toxicidad para estas se incrementó. Los porcentajes de mortalidad obtenidos para las fracciones activas se incluyen en la Tabla 14.

Al realizar el análisis cromatográfico en capa delgada de la primera fracción activa que correspondía a los elutos 391-430, se observó que tenía un compuesto mayoritario, por lo que se intentó su separación por cristalización fraccionada. Al disolver la fracción en una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (8:2) cristalizó espontáneamente un producto de p.f. 226-228°C, homogéneo cromatográficamente. La evaluación biológica de este producto indicó que era el responsable de la actividad mostrada para esta fracción. La dosis letal media (LC<sub>50</sub>) calculada para este producto fue de 17.3 ppm. Este metabolito se caracterizó como la 25-acetil cucurbitacina P 68 y su elucidación será descrita posteriormente.

La segunda fracción activa, de mayor polaridad, también

contenia un compuesto mayoritario, sin embargo, dada la mayor complejidad de la fracción se decidió resolverla mediante una cromatografía en columna. Como resultado de este proceso, se aisló un polvo cristalino de p.f. 240-242°C. Este producto resultó ser activo y la dosis letal media ( $LD_{50}$ ), fue igual a 16 ppm. La caracterización de este compuesto como la cucurbitacina F 69 será discutida en la siguiente sección.

De las otras fracciones no activas de la columna (ver Tabla 13) se aislaron también los siguientes compuestos: el  $\beta$ -sitosterol 44, el  $\beta$ -D-glucosido- $\beta$ -sitosterol 54, la 25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina F 70 y la 5-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-3,4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina 58. Asimismo del extracto metanólico inicial precipitó espontáneamente el polialcohol manitol 51. En la Tabla 15 se resume la totalidad de los compuestos aislados y caracterizados de la *E. mexicanum*; incluyendo además sus rendimientos. Cabe hacer notar que la glucocucurbitacina y la glucocumarina no fueron tóxicos para *A. salina* a ninguna de las concentraciones evaluadas, es decir, a 10, 100 y 1000 ppm. Los compuestos que resultaron ser tóxicos para *Artemia salina* (la 25-acetil cucurbitacina F y la cucurbitacina F) fueron evaluados como posibles agentes citotóxicos en diferentes sistemas de células tumorales. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 16.

Tabla 15 Rendimiento de los metabolitos aislados de *Exosphaera mexicana*

COMPUESTO	RENDIMIENTO
<u>51</u>	3.0 g (0.14%)
<u>44</u>	50 mg (0.002%)
<u>54</u>	40 mg (0.001%)
<u>68</u>	620 mg (0.029%)
<u>69</u>	300 mg (0.014%)
<u>58</u>	600 mg (0.028%)
<u>70</u>	50 mg (0.002%)

Tabla 16 ED<sub>50</sub> (µg/ml) en varios sistemas de tumores de los compuestos tóxicos para *A. salina*, aislados de la *Exosphaera mexicana*

Prueba de citotoxicidad en tumores		
SISTEMA DE TUMOR EN HUMANO	25-ACETIL CUCURBITACINA F	CUCURBITACINA F
A 549 (pulmón)	$< 10^{-2}$	$3.44 \times 10^{-1}$
MCF 7 (pecho)	$3.14 \times 10^{-2}$	$5.23 \times 10^{-1}$
HT 29 (intestino)	$< 10^{-2}$	$3.27 \times 10^{-1}$

Asimismo, las cucurbitacinas antes mencionadas fueron evaluadas *in vitro* como posibles agentes antitumorales por la Dra. M O'Neill de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Londres.

El ensayo empleado consistió en medir la inhibición de la toma de hipoxantina radioactiva por parte del *Plasmodium falciparum* utilizando como patrón el difosfato de dicloroquina (O'Neill *et al.*, 1982). Los resultados obtenidos expresados en concentración media inhibitoria ( $IC_{50}$ ) se mencionan en la Tabla 17.

Tabla 17.  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) de los compuestos tóxicos de la *Exostema mexicanum*

AGENTES ANTIMALARICOS	
COMPUESTO	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Cucurbitacina F	7.8-31
Cucurbitacina F-25 acetato	0.8-3.1
Difosfato de cloroquina	0.078

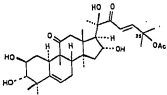
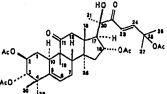
En general, la caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante los métodos usados en el estudio de la *Randia echinocarpa*.

#### 2.4.1 IDENTIFICACION DE LA 25-ACETIL CUCURBITACINA F 68

El polvo activo de las fracciones 391-430 cuyas características físicas y espectroscópicas se reúnen en la Tabla 18 fue identificado como la 25-acetil cucurbitacina F con base en las siguientes evidencias:

- a) El espectro de masas (Tabla 18) presentó un ión no

Tabla 18. Constantes físicas y espectroscópicas de la 25-acetil cucurbitacina **68** y su derivado acetilado **68a**.

		<b>68</b>
		<b>68</b>
		226-228°C
	<p>p.f. 226-228°C</p> <p>IR <math>\frac{\text{KBr}}{\text{maR}}</math> <math>\text{cm}^{-1}</math> 3220, 2980, 2932, 1725, 1690, 1650, 1450, 1371, 1262, 1190, 1125, 1055, 1030</p> <p>EMIE 500 (M-60, 1.2), 482 (0.8), 457 (0.7), 405 (1.3), 387 (12), 369 (11), 113 (18.4), 112 (13), 111.1 (19.1), 96.1 (100), 43.1 (38.1)</p> <p>m/z (%) [Figura 18]</p>	
	<p>RMN<sup>1</sup>H (90MHz, CDCl<sub>3</sub>, <math>\delta</math>) 0.99 (s, 3H, H-18), 1.04 (s, 3H, H-30), 1.08 (s, 3H, H-29), 1.21 (s, 3H, H-28), 1.24 (s, 3H, H-21), 1.40 (s, 3H, H-19), 1.56 (s, 3H, H-27), 1.94 (s, 3H, H-Ac), 1.97 (s, 3H, H-Ac), 2.02 (s, 3H, H-Ac), 2.04 (s, 3H, H-Ac), 2.5-2.75 (m), 3.20 (d, 1H, J=14Hz, H-12), 4.24 (s, 1H, OH), 4.66 (d, 1H, J=10Hz, H-3), 4.93 (dd, 1H, J=10.5Hz, H-2), 5.15 (t, J=7Hz, H-16), 5.73 (m, 1H, H-6), 6.43 (d, J=15Hz, H-23), 7.14 (d, 1H, J=15Hz, H-24)</p> <p>EMIE 627 (M-60 + 1, 11), 567 (50), 507 (81.4), 447 (100), 133 (56.4)</p> <p>m/z (%)</p>	

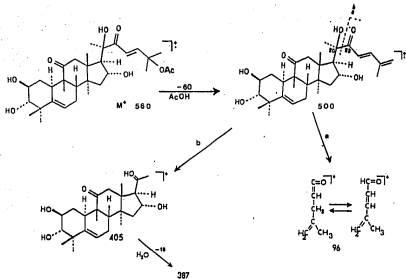
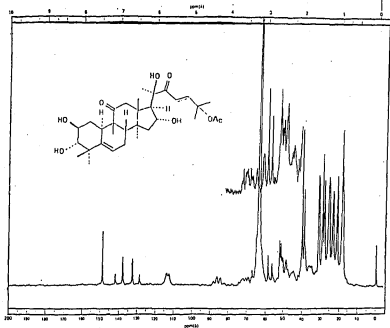


Figura 16. Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la 25-acetil cucurbitacina F 68

lecular a  $m/z$  560 correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{32}H_{48}O_8$ ; otros picos importantes se observaron a  $m/z$  500, 405, 387, 369, y 96 (pico base).

b) El espectro de RMNP (Espectro 10) presentó el perfil tipo de un cucurbitano con una cadena lateral que contiene una cetona  $\alpha, \beta$  insaturada (Fransworth *et al.*, 1985; Lavie y Gletter, 1971). Las características importantes del espectro son las siguientes:

1. A campo alto se observaron señales para ocho metilos a  $\delta$  0.95, 1.05, 1.2, 1.3, 1.45, 1.50, 1.65, y 1.67.
2. A  $\delta$  2.05 una señal simple que integró para tres protones, asignable al metilo de un acetato.
3. A  $\delta$  2.88 se observó un doblete ( $J=7$  Hz) característico para el H-17 de la estructura tipo.
4. Centrado a  $\delta$  4.25 se encontraba un multiplete que integró para tres protones, asignables a funciones carbinólicas secundarias.
5. A  $\delta$  5.7 se observó el multiplete para un protón vinílico trisustituido.
6. Finalmente la presencia del sistema A B [ $\delta$  6.5 (d,  $J=15$  Hz) y  $\delta$  7.0 (d,  $J=15$  Hz)] característico para la doble ligadura  $\alpha\beta$  conjugada de la cadena lateral.



Espectro 10

E- 10 Espectro de RMNP de la 25-acetil cucurbitacina F 68



Cabe hacer notar que la ausencia en el espectro de protones geminales a una función acetoxilo permitió inferir a priori que el acetato presente en la molécula era terciario.

c). El análisis detallado del EM sustentó, de manera adicional, la naturaleza triterpénica del tipo cucurbitano para este compuesto. La información más relevante fue la siguiente:

1. La presencia del ión a  $m/z$  96 ( $C_6H_8O$ , pico base) que resulta de la ruptura del enlace  $C_{20}-C_{22}$ , con la migración simultánea del protón del grupo hidroxilo en C-20, y la pérdida del sustituyente en C-25 (Figura 18). Este fragmento, característico de cucurbitacinas que presentan doble ligadura en C-23, resulta de gran utilidad para determinar finalmente la estructura de la cadena lateral. Por lo tanto, en este caso, correspondería a la estructura parcial que se ilustra en la Figura 19.

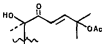
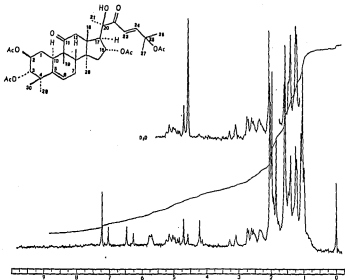


Figura 19 Estructura parcial de la cadena lateral del compuesto 68

2. El ión a  $m/z$  405  $[(M^+ - 155), C_{24}H_{37}O_5]$ , el cual resulta también de la ruptura entre el enlace  $C_{20}-C_{22}$ , pero sin la transferencia del hidrógeno, permitió concluir que en C-25 se encontraba el acetato terciario y en C-20 un grupo hidroxilo. La ubicación del acetato confirmaba de manera inequívoca la información proporcionada por el espectro de RMNP en relación a la ausencia de un protón geminal a una función acetoxilo. Por otra parte, la pérdida consecutiva de moléculas de agua a partir del ión  $m/z$  405 para originar los fragmentos de  $m/z$  387 ( $C_{24}H_{35}O_4$ ) y el 369 ( $C_{24}H_{35}O_3$ ), es característico de los espectros de masas de las cucurbitacinas trihidroxiladas en la parte tetracíclica de la molécula (Kupchan *et al.*, 1970 y Audier, 1966).

Por tratamiento con anhídrido acético y piridina se obtuvo un derivado tetra acetilado 68a cuyas constantes físicas y espectroscópicas se especifican en la Tabla 18. La obtención de este derivado confirmó la presencia de tres funciones carbinólicas secundarias.

Las características más importantes del espectro de RMNP de 68a (Espectro 11), similares con las observadas para el producto natural, fueron las siguientes:

E-11 Espectro de RMNP del derivado acetilado de la 25-acetil cucurbitacina P 68a

1. La presencia de tres señales adicionales para metilo de acetato a  $\delta$  1.94, 1.97 y 2.02 .
2. En la zona donde resuenan los protones geminales a las funciones acetoxilo se observaron claramente tres señales a  $\delta$  4.66 (d, J=10 Hz) 4.93 (d, - J=10 y 6 Hz) y 5.15 (t, J=7 Hz).

El análisis del patrón de acoplamiento de las resonancias a  $\delta$  4.66 y 4.93 permitió concluir que dos de los protones geminales a las funciones acetoxilo se encontraban mutuamente acoplados, y por lo tanto, eran vecinales. Las únicas posiciones factibles para la ubicación de estos protones eran los núcleos C-2 y C-3, con una estereoquímica  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. Esta región del espectro se ilustra en la Figura 20. Por comparación con modelos adecuados, el triplete a  $\delta$  5.15 fue fácilmente asignable al protón H-16. La presencia en el espectro de cuatro señales para metilo de acetato y tan solo tres protones geminales a un grupo ester indicaba, en congruencia con los resultados de masas, que uno de los acetatos era terciario. Asimismo, el singulete a  $\delta$  4.24 intercambiable con D<sub>2</sub>O confirmaba la asignación del hidroxilo terciario en C-20.

Resumiendo, el compuesto representaba un triterpene con esqueleto de cucurbitano con una cadena lateral insaturada en C-23, un grupo acetato en C-25, una doble ligadura entre

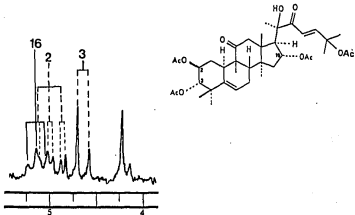


Figura 20 Ampliación de la región del Espectro de RMNP donde absorben los protones geminales de ester del compuesto 68a

C-5 y C-6, un grupo ceto en C-11 y con tres funciones carbonílicas secundarias, una en la posición 16 y las restantes en C-2 y C-3. Por lo tanto la estructura del primer metabolito activo aislado de la *Exostema mexicanum*, se podía establecer como la 25-acetil cucurbitacina F.

#### 2.4.2 IDENTIFICACION DE LA CUCURBITACINA F 69

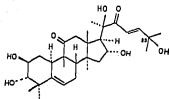
El polvo blanco activo que se obtuvo de la recromatografía de las fracciones 431-443 de la columna original (ver sección experimental), fue caracterizado como la cucurbitacina F. Su estructura, así como los parámetros físicos y espectroscópicos empleados para su identificación se incluyen en la Tabla 19.

De manera general el perfil de los espectros de IR, RMNP y masas, obtenidas para este compuesto y su derivado acetilado, fueron similares a los correspondientes al compuesto 68 y su derivado acetilado previamente discutidos.

El análisis detallado de los espectros de masas y RMNP permitió concluir que este compuesto presentaba una función hidroxílica en la posición 25, en lugar del grupo acetoxilo. Las principales diferencias observadas en relación a los dos compuestos mencionados fueron las siguientes:

a) El espectro de RMNP del compuesto 69 (Espectro 12) no presentó señal en la zona donde resuenan los grupos meti

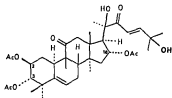
Tabla 19. Constantes físicas y espectroscópicas de la cucurbitacina P 69 y su deriva do triacetilado 69a.



69

P. F. 240-242°C

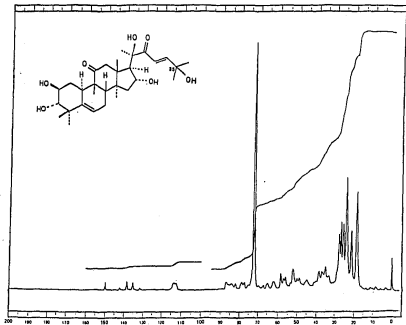
I R  $\nu$   $\text{KBr}$   $\text{cm}^{-1}$  3400, 2980, 1690, 1625  
1460, 1370, 1280, 1215  
1055, 1025.



69a

P. F. 140-142°C

I R  $\nu$   $\text{KBr}$   $\text{cm}^{-1}$  3430, 2975, 1740,  
1690, 1369, 1250,  
1127.



Espectro 12

E-12 Espectro de RMNP de la cucurbitacina F 69



lo de acetatos.

b) En el espectro de masas de 69 (Figura 21) el ión molecular se observó a  $m/z$  518 con un fragmento a  $m/z$  500 ( $M^+ - 18$ ), el cual resultaba de la pérdida de  $H_2O$ . En cambio, en el espectro de masas de 68 (Figura 18) el ión molecular se observó a  $m/z$  560, con un fragmento a  $m/z$  500 ( $M^+ - 60$ ) el cual resultaba de la pérdida del grupo  $AcOH$ .

Por otra parte, el tratamiento de 69 con anhídrido acético y piridina permitió obtener el derivado triacetilado 69a cuyas características físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 19.

El análisis del espectro de RMNP de 69a (Espectro 13) confirmó la presencia de tres funciones carbonílicas secundarias y la presencia de dos hidroxilos de tipo terciario.

Las evidencias analizadas anteriormente permitieron identificar la compuesto 69 como la cucurbitacina F.

#### 2.4.3 IDENTIFICACION DE LA 25-ACETIL-2-8-D-GLUCOPIRANOSIL CUCURBITACINA F 70

De la cromatografía de las fracciones 444-500 de la columna original se aislaron 50 mg de una sustancia glicosídica, su fórmula molecular se estableció como  $C_{38}H_{58}O_{13}$  y

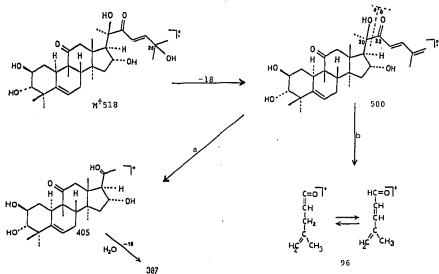
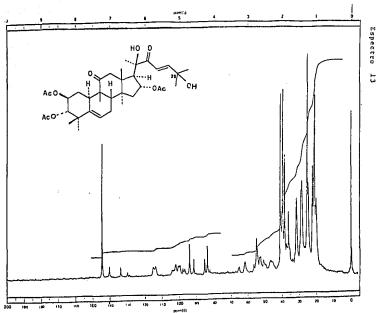


Figura 21. Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la cucurbitacina F 69



E-13 Espectro deRMN del derivado acetilado de la cucurbitacina P 69a

sus características físicas y espectroscópicas se resumen en la Tabla 20.

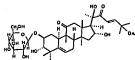
La solubilidad de 70 en disolventes de alta polaridad, así como el resultado positivo de la prueba de Molish sugirieron su naturaleza glicosídica. La hidrólisis enzimática de una pequeña cantidad del producto natural con  $\beta$ -glucosidasa, confirmó lo anterior ya que al analizar cromatográficamente los productos de la reacción, se detectó a la glucosa como único azúcar presente y a una sustancia de menor polaridad que la materia prima, la cual resultó idéntica en todos sus aspectos a la 25-acetil cucurbitacina F 68. La comparación del glucósido 70 y su derivado hepta acetilado 70a con muestras auténticas de 25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina F permitió caracterizarlo inequívocamente.

Este glucósido fue recientemente aislado por primera vez de la *Cigarrilla mexicana* (Nata et al., 1988b)

#### 2.4.4 IDENTIFICACION DE LA 5-O- $\beta$ -D-GLUCO PIRANOSIL- -3',4'-DIHIDROXI-7-METOXI-4-FENIL CUMARINA 58

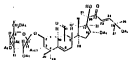
De las fracciones 501-539 de la columna original, cristalizó en forma espontánea un compuesto de color amarillo pajá. Su fórmula molecular se estableció como  $C_{12}H_{22}O_{11}$  mediante un análisis elemental. Las constantes físicas y espectroscópicas del mismo y su estructura se muestran en la Tabla 21.

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 25-acetil-2- $\beta$ -glucopiranosil-cucurbitacina F 70 y su derivado acetilado 70a.



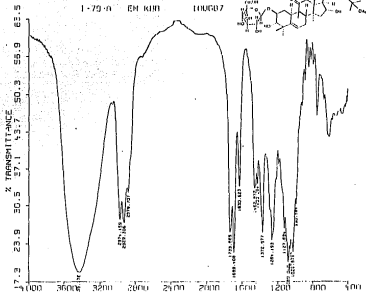
	<u>70</u>
p. f.	122-127°C
A. E.	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	+ 5.5 (MeOH)
IR KBr max cm <sup>-1</sup>	3438, 2974, 2929, 2879, 1733, 1689, 1630, 1462, 1372, 1264, 1127, 1080
[E-14]	1058, 1024, 990
RMNP (80MHz, Py-d <sub>5</sub> , $\delta$ ) [E-15]	0.99 (s, 3H, Me-), 1.06 (s, 3H, Me-), 1.12 (s, 3H, Me-), 1.30 (s, 3H, Me-), 1.38 (s, 3H, Me-), 1.46 (s, 6H, Me-), 1.52 (s, 3H, Me-), 1.88 (s, 3H, Ac-), 2.67 (d, J=12Hz, 1H, H-12), 2.70 (d, J=7Hz, 1H, H-17), 3.04 (d, J=12Hz, 1H, H-12), 3.23 (m, 2H, H-6), 3.43-5.25 (m), 5.62 (m, 1H, H-6), 6.80 (d, J=16Hz, 1H, H-23), 7.15 (d, J=16Hz, 1H, H-24).

Tabla 20. Constantes físicas y espectroscópicas de la 25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina **70** y su derivado acetilado **70a**. (Continuación).

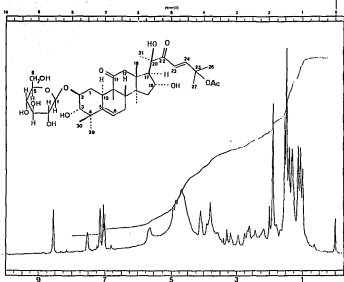


70a

p. f.	107-110°C
IR <sup>KBr</sup> cm <sup>-1</sup> max	3452, 2976, 2939, 1742, 1695, 1630, 1433, 1371, 1241, 1176, 1129, 1040, 983
RMNP 80MHz, CDCl <sub>3</sub> , $\delta$ [E-16]	0.97 (s, 6H, H-18 y H-30), 1.09 (s, 3H, H-29), 1.20 (s, 3H, H-28), 1.25 (s, 3H, H-21), 1.39 (s, 3H, H-19), 1.55 (s, 6H, H-26 y H-27), 1.84 (s, 3H, H-Ac), 1.95 (s, 3H, H-Ac), 2.03 (s, 3H, H, Ac), 2.67 (d, J=7Hz, 1H, H-17), 2.65 (d, 1H, J=14Hz, H-12 ), 3.20 (d, J=14Hz, 1H, H-12 ), 4.20 (m, 2H, H-6'), 4.60 (d, J=7Hz, H-1'), 4.61 (d, J=10Hz, 1H, H-3), 5.67 (m, 1H, H-6), 6.35 (d, J=16Hz, 1H, H-23), 7.12 (d, J=16Hz, 1H, H-24), 2.00 (s, 6H), 2.10 (s, 3H), 2.11 (s, 3H).



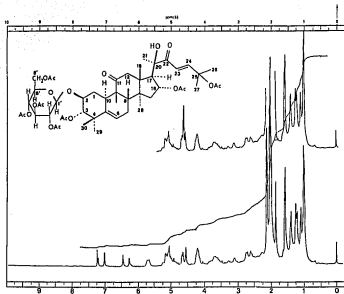
E-14 Espectro de IR de la 25-acetil-2-β-D-glucopiranosil cucurbitacina V 70



Espectro 15

E-15 Espectro de RMNP del compuesto 70

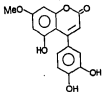




Espectro 16

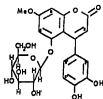
E-16 Espectro de RMN del derivado acetilado de la 25- acetil-2-D-glucopiranoil cucurbitacina F 70s

Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxí-7-metoxi-4-fenilcumarina 58b y 5-O- $\beta$ -D-glucosil-3', 4'-dihidroxí-7-metoxi-4-fenilcumarina 58.



	<u>58b</u>
P.M.	300
P.F.	138-140°C
EMIE m/z (%)	300 (M <sup>+</sup> , 100), 272(98), 257 (22.9), 127(5), 69(10)
UV $\lambda$ <sup>MeOH</sup> <sub>max</sub> nm	218, 260, 330 [E-17]
IR $\nu$ <sup>KBr</sup> <sub>max</sub>	3400, 3186, 1665, 1626, 1589, 1434, 1379, 1345, 1294, 1202, [E-18] 1155, 1087
RMNP (60MHz, CDCl <sub>3</sub> )	6.79 (d, J=8Hz, 1H H-5'), 6.77 [E-19] (d J=3Hz 1H H-2'), 6.62 (dd J=8.3Hz H-6'), 6.37 (d J=3Hz 1H H-8), 6.24 (d J=3Hz H-6), 5.78 (s 1H H-3), 3.84 (s 3H OCH <sub>3</sub> )

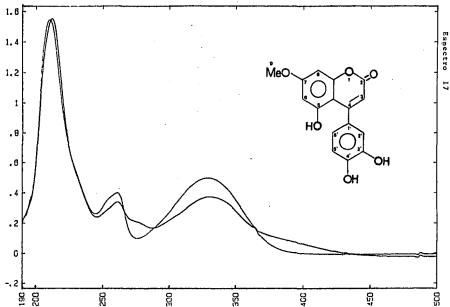
Tabla 21. Constantes físicas y espectroscópicas de la 5,3',4'-trihidroxí-7-metoxi-4-fenilcumarina 58b y 5-O- $\beta$ -D-glucosil-3',4'-dihidroxí-7-metoxi-4-fenilcumarina 58. (Continuación).



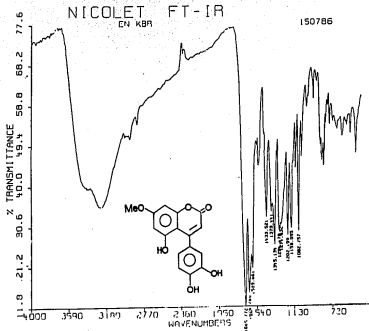
58

P. M.	462
P. F.	237-238°C
U V $\nu$ MeOH nm max	218, 259, 329 [E-20]
I R $\nu$ KBr max $\text{cm}^{-1}$	3500, 2900, 1700, 1618, 1430, 1360, 1340, 1310, 1230, 1160, [E-21] 1090, 1080, 1090.
RMNP ( $\text{CDCl}_3$ -DMSO- $d_6$ , $\delta$ )	6.82 (d J=8 1H H-5'), 6.82 (d J=3 1H H-2'), [E-22] 6.65 (dd J=8.3H <sub>2</sub> H-6'), 6.61 (d J=3 H-8), 6.56 (d J=3 1H H-6), 5.87 (s 1H H-3), 4.70 (d J=8 1H H-1*), 4.60- 3.10 (m), 3.85 (s, 3H OCH <sub>3</sub> )

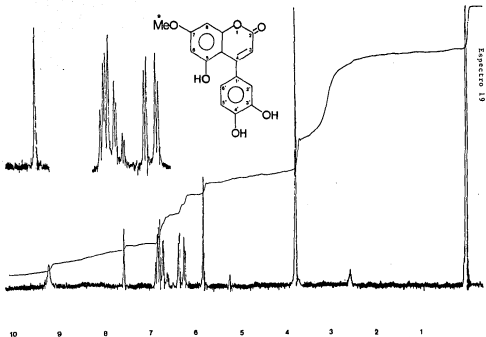
ABSORBANCE



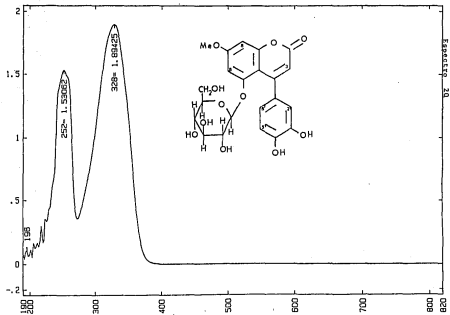
E-17 Espectro de UV de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenil  
 couarina 54b



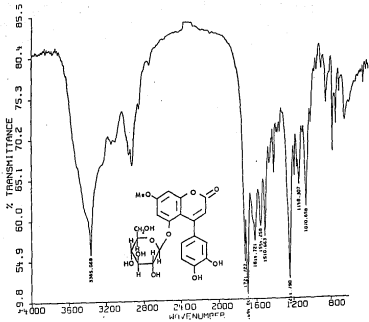
E-18 Espectro de IR del compuesto 58b



E-19 Espectro de RMNP del compuesto 58b



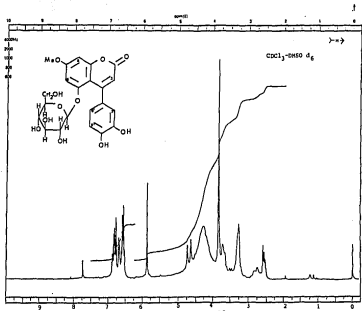
E-20 Espectro de UV de 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-6-fenil couarina 50b



Espectro 21

E-21 Espectro de IR del compuesto 58





E-22 Espectro de RMNP del compuesto 58

Espectro 22

Este sólido fue altamente soluble en disolventes polares y reaccionó positivamente con el reactivo de Molish. Por hidrólisis enzimática con una  $\beta$ -glucosidasa originó glucosa y la aglicona 58b. El producto natural y su aglicona fueron caracterizados como la 5-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina 58 y la 5,3',4'-trihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina 58b, respectivamente, por comparación con muestras auténticas previamente obtenidas de la especie relacionada, *Excoecaria caribaeum* (Mata et al., 1988c)

## 2.5 CONCLUSIONES

2.5.1 El fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de la corteza de la *Ecastema mexicana* dirigido mediante la determinación de la toxicidad para la *Arenaria salina* permitió el aislamiento de dos sustancias bioactivas. Estas fueron caracterizadas como la 25-acetil cucurbitacina 68 y la cucurbitacina 69, ambas resultaron bioactivas como sustancias antitumorales y antipalúdicas. En relación a la actividad antitumoral *in vitro*, es un hecho bien conocido que este tipo de compuestos son altamente citotóxicos (Lavic y Glotter, 1971). Sin embargo, la moderada actividad antipalúdica encontrada resulta sin precedentes. Este resultado podría explicar el uso popular de la planta, y sería pertinente realizar estudios más detallados a fin de determinar si existe alguna relación entre la citotoxicidad y la actividad antimalárica encontrada.

2.5.2 De las fracciones inactivas de este mismo extracto se aislaron y caracterizaron dos esteroides ( $\beta$ -sitosterol 44 y  $\beta$ -gluco- $\beta$ -sitosterol 54), una glucocucurbitacina (25-acetil-2- $\beta$ -D-glucopiranosil cucurbitacina 70), una 4-fenil cumarina (5- $\beta$ -D- $\beta$ -glucopiranosil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil cumarina 58) y el polialcohol manitol 51.

2.5.3 Este estudio constituye el primer reporte del aislamiento de cucurbitacinas en el género *Exostema*. Como se indicó anteriormente, los metabolitos aislados en estudios fitoquímicos previos en este género representaban tan solo fenil cumarinas y triterpenos pentacíclicos. Es también importante señalar que en otras especies relacionadas no se habían encontrado la coexistencia de cucurbitacinas y 4-fenil cumarinas; por el contrario ambos tipos de metabolitos eran mutuamente excluyentes. Asimismo, cabe mencionar que el presente estudio representa la tercera ocasión en que se describe la presencia de cucurbitacinas en un miembro de la familia Rubiaceae y, tal como se había pronosticado, este tipo de constituyentes parecen ser los metabolitos secundarios comunes en todas aquellas especies relacionadas con el género *Hintonia* que poseen cortezas amargas.

2.5.4 Este estudio representa una contribución adicional a la investigación fitoquímica de las especies mexicanas de el género *Exostema*.

## CAPITULO III

## ALCALOIDES DE LA SIMIRA MEXICANA

## 3.1 GENERALIDADES ACERCA DEL GENERO SIMIRA

El género *Simira* está constituido aproximadamente por unas 35 especies, las cuales se distribuyen desde México hasta Sudamérica (Willis, 1980). Algunas especies de este género tienen un amplio uso en la medicina popular de estas regiones del mundo. Así, por ejemplo, las cortezas de *Simira maxonii* Standley y *Simira Vitidiflora* Schumann son usadas por los nativos de Costa Rica y Brasil, para disminuir las fiebres palúdicas (Uphof, 1986). Desde el punto de vista fitoquímico ninguna de las especies del género han sido investigadas.

## 3.2 ASPECTOS GENERALES DE LA SIMIRA MEXICANA

*Simira mexicana* (Bullock) Steyermark (*Sichingia mexicana* Bullock), comúnmente llamada "quina roja", se encuentra distribuida en las regiones cálidas del suroeste de México, y no debe ser confundida con la "quina roja" (*Alexis* Sp; Betulaceae) de las montañas frías de México.

Su corteza roja, de sabor ligeramente amargo, es usada en México para enriquecer el tejido sanguíneo y para disminuir las fiebres. Una decocción preparada a partir de la cor

toza de la planta y otras hierbas, es tomada diariamente para aliviar las venas varicosas, los problemas de circulación la artritis y los dolores de huesos. También la infusión de la corteza sola o con otras "quinas" (*Hinckleya* Sp y *Exostemma* Sp) es empleada para curar el dengue y la malaria.

### 3.3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.3.1 Material vegetal

La corteza de la planta fue recolectada en Jolalpan, Puebla, México, en mayo de 1987. Una muestra de referencia fue depositada en el Herbario Nacional en una colección etnobotánica (Voucher: R. Bye y E. Linares 13517).

#### 3.3.2 Detección preliminar de alcaloides.

La determinación de alcaloides se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Harborne (Harborne, 1984). Como reactivos de prueba se emplearon las soluciones de Dragendorff y de Mayer. Para efectuar ambas pruebas se disolvió una pequeña cantidad del extracto orgánico en metanol; la solución resultante se acidificó con HCl 1N y finalmente se le agregó cada uno de los reactivos. En ambos casos se utilizó un blanco y un patrón adecuado para confirmar la veracidad de las reacciones.

### 3.3.3 Método de extracción

El material vegetal (2,7 kg) se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se pulverizó en un molino tipo Wiley 4. El material seco y pulverizado se extrajo con metanol y luego de eliminar el disolvente se obtuvieron 357 g de extracto. El proceso se resume en el Esquema 3.

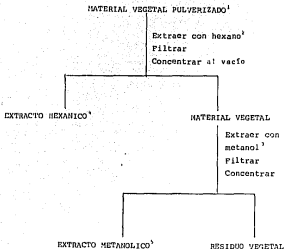
### 3.3.4 Fraccionamiento del extracto metanólico

El extracto metanólico se fraccionó siguiendo un proceso de partición ácido-base, tal como se resume en el Esquema 4.

### 3.3.5 Separación y purificación de los alcaloides

#### 3.3.5.1 Separación del hermano 20 de la fracción alcaloides I

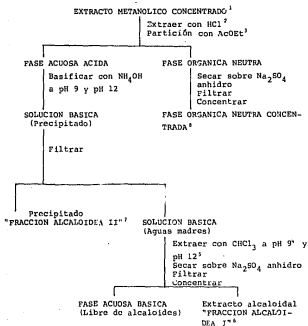
El total de la fracción alcaloides I (28 g) se cromatografió en columna, utilizando como adsorbente alúmina básica (1.1 Kg). El proceso de elución se efectuó con hexano, cloroformo y metanol en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 250 fracciones de 100 ml cada una, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas con gel de sílice. Como agente cromógeno se utilizó



- 1/ Cantidad de material vegetal 2.7kg
- 2/ Extracción vía maceración (2 veces por periodo de 2 días cada vez, 6l hexano).
- 3/ Extracción vía maceración (3 veces por periodo de 2 días cada vez, 5l metanol)
- 4/ Cantidad de extracto hexánico, 22.6g
- 5/ Cantidad de extracto metanólico, 357g

Esquema 3 Método de extracción de la corteza de la *Sida mexicana*.





- 1/ Cantidad de extracto 357g
- 2/ 300ml de HCl IN
- 3/ 8 extracciones con 300ml c/u de AcOEt
- 4/ 12 extracciones con 500 ml c/u de CHCl<sub>3</sub>
- 5/ 15 extracciones con 500ml c/u de CHCl<sub>3</sub>
- 6/ Cantidad de extracto 28g
- 7/ Cantidad de precipitado 27g
- 8/ Cantidad de extracto 21g

Esquema 4 Fraccionamiento del extracto metanólico de la *Sida mexicana*

el reactivo de Dragendorff. Como fase móvil se utilizaron varios sistemas de disolventes: hexano, cloroformo, acetato de etilo, metanol y acetona en diferentes proporciones.

De las fracciones 30-45 de esta columna eluidas con hexano-cloroformo (25:75), precipitó espontáneamente un polvo café el cual originó, luego de sucesivas recristalizaciones con cloroformo, 156 mg de un producto cristalino de p.f. 235-238°C.

#### 3.3.5.2 Separación de la estrictosamida 71

El análisis cromatográfico de la fracción alcaloidea II indicó que contenía dos o más alcaloides. Para resolver la mezcla se realizaron diferentes intentos por medios cromatográficos. Sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por lo tanto, se decidió acetilar los componentes presentes y, para ello, 2 g de la mezcla se trataron con anhídrido acético y piridina, obteniéndose 900 mg de la mezcla acetilada. De acuerdo con los análisis cromatográficos realizados en diferentes sistemas de eluyentes (hexano-cloroformo, hexano-acetato de etilo) se observó que la mezcla estaba constituida por tres productos. A fin de lograr la separación de los mismos, se realizó una cromatografía en columna, y para ello, los 900 mg del producto acetilado se adsorbieron en 47 g de gel de sílice. La elución se efectuó con hexano-cloroformo y hexano-acetato de etilo, en diferen

tes proporciones. Se obtuvieron 120 fracciones de 10 ml cada una. De las fracciones 67-71 eluidas con hexano-acetato de etilo (70:30) se obtuvieron 91,3 mg de tetraacetil estric tosamida 71a.

3.3.b Separación del  $\beta$ -sitosterol 44 y de su derivado  $\beta$ -D-glucosídico 54

La fase orgánica neutra (21 g) del Esquema 4 se fraccionó mediante una cromatografía en columna, utilizando como adsorbente 141 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, cloroformo y acetato de etilo, en diferentes proporciones. Se recogieron 350 fracciones de 50 ml cada una.

De las fracciones 108-117 eluidas con hexano-cloroformo (70:30), se obtuvieron 63 mg de un sólido blanco de p.f. 137°C que posteriormente fue identificado como  $\beta$ -sitosterol 44.

De las fracciones 313-330 eluidas con acetato de etilo se obtuvieron 75,5 mg de un sólido blanco de p.f. 280°C que luego fue identificado como el  $\beta$ -D-glucosido- $\beta$ -sitosterol 54.

### 3.3.7 Caracterización de los compuestos aislados

#### 3.3.7.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas de los constituyentes

Además de los aparatos utilizados para la *Randia echinocarpa* (Capítulo I sección 1.3.4.1), se utilizaron los siguientes aparatos:

Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrómetro Perkin Elmer modelo 202; los espectros de RMN<sup>13</sup>C se determinaron en un espectrómetro PT 80 Varian; la actividad óptica se determinó en un polarímetro Perkin Elmer modelo 241.

#### 3.3.7.2 Preparación de derivados

##### 3.3.7.2.1 Acetilación de la fracción alcaloidea II

La fracción alcaloidea II se acetiló de acuerdo a la metodología convencional, según se describió en el Capítulo I sección 1.3.4.2.

##### 3.3.7.2.2 Hidrólisis ácida de la tetra acetil estrictonamida 71a

Para efectuar la hidrólisis ácida del compuesto 71a se disolvieron 20 mg del compuesto en 40 ml de ácido clorhídrico 2N y la mezcla de reacción hirvió a reflujo durante 3 hr. Al término de la hidrólisis se verificó mediante CCD la presencia de la glucosa.

3.3.7.2.3. Desacetilación selectiva de la tetraacetil estrictosamida 71a

Para efectuar la desacetilación del compuesto 71a (Battersby *et al.*, 1969) se disolvieron 30 mg del compuesto en 0.5 ml de metanol, posteriormente se adicionaron 200 mg de hidróxido de bario disueltos en 3 ml de agua; la mezcla se agitó por espacio de 16 horas. Al término de la reacción, el residuo fue pasado por una resina ácida de intercambio iónico y eluido con agua. El producto ácido se basificó con hidróxido de amonio hasta pH 9. La solución básica se extrajo con dos porciones de 25 ml de acetato de etilo; la fase orgánica resultante se lavó con dos porciones de agua destilada (10 ml cada una) y luego de secar sobre sulfato de sodio anhidro se concentró *in vacuo*. Al cabo del proceso se obtuvieron 4 mg de un producto amarillo, el cual correspondía al glucósido, estrictosamida 71.

3.3.7.2.4 Hidrólisis enzimática del glucósido, estrictosamida 71

3 mg del glucósido 71 se disolvieron en 0.5 ml de agua destilada, a esta solución se adicionó 3 mg de  $\beta$ -glucosidasa (Sigma, tipo II). La mezcla de hidrólisis se incubó a 36°C durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, se identificó a la  $\beta$ -D-glucosa como el único componente en el producto de hidrólisis mediante métodos cromatográficos.

### 3.3.8 Evaluación biológica de los alcaloides aislados

La toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* del hermano 20 y la tetra acetil estriictosmida 71a fue determinada como se especificó en el Capítulo anterior.

La evaluación del hermano 20 como agente antimalárico, fue realizada por la Dra. M. J. O'Neill de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Londres.

### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSION

Como la prueba preliminar para detectar alcaloides en una pequeña cantidad del material vegetal objeto de estudio resultó positiva, se decidió realizar el estudio de la planta utilizando la metodología convencional para el aislamiento de alcaloides, de acuerdo al Esquema 4. Este procedimiento permitió el aislamiento del harmeno 20 y la estrictosamina 71, en la forma de su derivado acetilado 71a.

#### 3.4.1 Caracterización del harmeno 20

El producto obtenido de las fracciones 30-45 eluidas con hexano-cloroformo (25:75) provenientes de la fracción alcaloidea I, presentó las características físicas y espectroscópicas que se resumen en la Tabla 22. El compuesto reaccionó positivamente con los reactivos analíticos para la identificación de alcaloides. El análisis detallado de sus parámetros espectroscópicos y espectrométricos permitió caracterizarlo como el harmeno 20, un alcaloide de naturaleza  $\beta$ -carbinólica.

Los aspectos más sobresalientes del análisis fueron los siguientes:

El espectro de masas (Espectro 23) fue relativamente simple, observándose el ión molecular (pico base) a  $m/z$  182 congruente con la fórmula molecular  $C_{12}H_{10}N_2$  establecida por

Tabla 22. Constantes físicas y espectroscópicas del Harnano 20.



A.E. C<sub>79.09%</sub> H<sub>5.53%</sub> N<sub>15.38%</sub>

P.M. 182

F.H. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>

p.f. 235-238°C

Fluorescencia

I.R. KBr cm<sup>-1</sup>  
 max 3450 (-NH), 3100, 2990, 2800, 1640 (-C=N-Aromático)  
 1585, 1520, 1470, 1335, 1245, 750

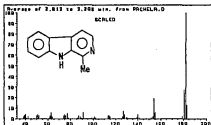
U.V. λ CHCl<sub>3</sub> nm  
 max 256, 291, 336, 347

E.M. m/z 182 (M<sup>+</sup>, Pico base), 181, 154, 127

RMNP ppm 2.81 (s, 3H), 7.3 (m, 3H), 7.78 (d, J=5Hz, 1H),  
 8.07 (d, J=7Hz, 1H), 8.33 (d, J=5Hz, 1H), 8.58 ancho, (1H)



## Espectro 23



Average of 2.813 to 3.206 min. from RACHELA.D  
CA-11-21A DEPTO. FARMACIA

m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.	m/z	abund.
38.00	2	74.00	3	100.00	1	139.00	1
39.00	3	75.00	4	101.00	2	140.00	4
40.00	4	76.00	3	102.00	1	141.00	1
41.00	1	77.00	5	113.00	3	152.00	1
42.00	2	78.00	1	114.00	3	153.00	2
50.00	3	86.00	1	115.00	2	154.00	19
51.00	4	87.00	3	126.00	2	155.00	6
52.00	3	90.00	2	127.00	7	179.00	2
61.00	1	95.00	1	128.00	4	181.00	27
62.00	3	98.00	1	129.00	1	182.00	100
63.00	6	91.00	6	130.00	1	183.00	13
64.00	2	99.00	1				

análisis elemental; otros picos se observaron a  $m/z$  181 ( $M^+ - H$ ),  $m/z$  154 y 127 que corresponden a pérdidas consecutivas de dos moléculas de HCN. Este patrón de fragmentación se ilustra en la Figura 22.

Los espectros de IR (Espectro 24) y de UV (Espectro 25) indicaron claramente el carácter aromático del compuesto; en el primero, se observaron bandas prominentes a  $3450\text{ cm}^{-1}$  ( $-NH$ ) y a  $1640\text{ cm}^{-1}$  ( $-C=N$ -aromático) y en el segundo, bandas con máximo de absorción a 258, 291, 336 y 347 m $\mu$ ; cabe hacer notar que estas últimas son características para alcaloides indólicos del tipo  $\beta$ -carbelina (Joshi *et al.*, 1977).

El espectro de RMNP (Espectro 26) confirmó la naturaleza indólica del tipo  $\beta$ -carbolínico del compuesto ya que presentó las siguientes señales:

1. A  $\delta$  2.81 se observó un singulete que integraba para tres protones, atribuible a un grupo metilo sobre anillo aromático heterocíclico.
2. Centrado a  $\delta$  7.3 se encontraba un multiplete, el cual integraba para tres protones aromáticos asignables en base a modelos apropiados a H-6, H-7 y H-8 del núcleo base.
3. A campo bajo se observó un sistema AB [ $\delta$  7.78 (d),

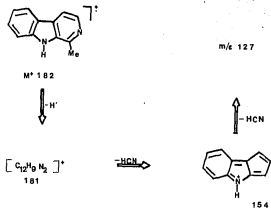
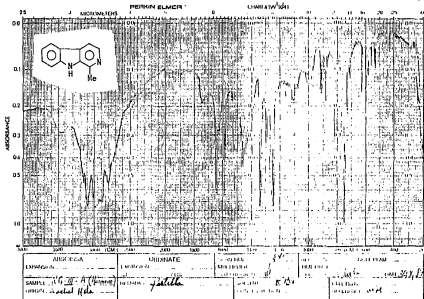
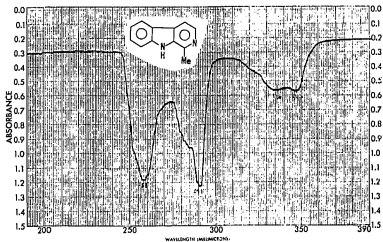


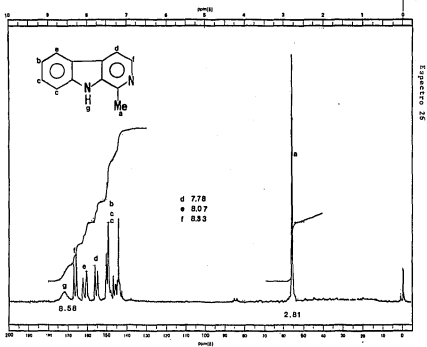
Figura 22. Patrón de fragmentación del Harmano 20



Espectro 24

E-24 Espectro de IR del hermano 20

E-25 Espectro de UV del Harnano 20



R-2b Espectro de RMNP del harnano 20

$J=5$  y  $\delta$  8,33 (d)  $J=5$  Hz] los cuales corresponden a H-4 y H-3 del esqueleto base, respectivamente.

4. A  $\delta$  8,07,  $J=7$  Hz se observó un doblete asignable a H-5.
5. Por último, a  $\delta$  8,58 se encontraba una señal ancha correspondiente al protón amino indólico del núcleo  $\beta$ -carbólico.

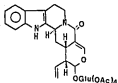
### 3.4.2 Identificación de la estrictosamida 71 en su forma acetilada

El compuesto acetilado obtenido de las fracciones 67-71 eluidas con hexano-acetato de etilo (70:30) y provenientes de la fracción alcaloidea II acetilada, presentó las características físicas y espectroscópicas que se resumen en la Tabla 23.

El análisis detallado de los parámetros espectroscópicos y espectrométricos del derivado acetilado, permitieron caracterizarlo como la tetra acetil estrictosamida 71a. Las características más relevantes se detallan a continuación:

a) El espectro de masas (Espectro 27), obtenido por ionización química, mostró el ión molecular (M+1) a  $m/z$  667, congruente con la fórmula molecular  $C_{34}H_{38}O_{12}N_2$ , establecida por análisis elemental. La presencia del pico base a  $m/z$  331 ( $C_{14}H_{19}O_9$ ) en el espectro, es atribuible al ión oxonio

Tabla 23. Constantes físicas y espectroscópicas de la tetra acetil estrictosanida



A.E. C<sub>61.2%</sub> H<sub>5.3%</sub> N<sub>4.2%</sub>

P.F. 666

F.M. C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>O<sub>12</sub>N<sub>2</sub>

$[\alpha]_D^{25}$  -76.7 (CHCl<sub>3</sub>)

P.F. (°C) 95-97

I.R. $\text{KBr}$ $\text{cm}^{-1}$ max	3390 (N-H), 2925, 1750 (-CO- Ester), 1660 (-CO-lactama), 1600, 1430, 1370, 1220, 900, 830, 750
U.V. $\lambda$ $\text{CHCl}_3$ nm max	262, 275, 375
E.M. m/z	666 (M <sup>+</sup> ), 513, 347, 335, 331 (Pico base), 319, 271, 229, 169, 129, 111, 109, 99, 86, 79, 66
RMNP ppm	1.85 (s, 3H), 1.97 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 4.15 (t, 1H), 4.7-5.5 (m), 7.0-7.5 (m), 8.1 (s ancho, 1H)



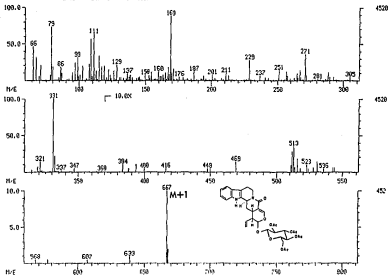
Tabla 23. Constantes físicas y espectroscópicas de la tetra acetil estrictosamida.

RMN <sup>13</sup> C ppm	
	133.1 (s, C-2), 53.61 (d, C-3), 43.85 (t, C-5)
	19.18 (t, C-6), 108.74 (s, C-7), 127.67 (s, C-8)
	118.05 (d, C-9), 119.8 (d, C-10), 122.19 (d, C-11)
	111.44 (d, C-12), 136.42 (s, C-13), 26.57 (t, C-14)
	24.12 (d, C-15), 110.57 (s, C-16), 164.87 (s, C-17)
	120.59 (t, C-18), 132.35 (d, C-19), 42.92 (c, C-20)
	95.09 (d, C-21), 147 (d, C-22)

MASS SPECTRUM  
 10/07/00 13:23:00 \* 1:55  
 SAMPLE: CAL131B  
 #2 TO #44 SUMMED - #45 X1.00

DATA: RPLCAL131B #23  
 CAL: C10788 #2

BASE P/E: 331  
 EIC: E2208,



Espectro 77

E-27 Espectro de masas de la tetra acetil estriatosamida

(Figura 23), demostró la naturaleza glucosídica del compuesto (Brown y Row, 1967). Por otra parte, la desacetilación selectiva del alcaloide, seguida de una hidrólisis enzimática con  $\beta$ -D-glucosidasa permitió comprobar que el azúcar correspondía a la  $\beta$ -D-glucosa.

b) El espectro de IR (Espectro 28) mostró bandas prominentes a  $3390\text{ cm}^{-1}$  (-NH),  $1750\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de éster) y a  $1660\text{ cm}^{-1}$  (carbonilo de lactama).

c) El espectro de UV (Espectro 29) mostró máximos de absorción característicos para núcleo indólico en 262, 275 y 375 nm.

d) El espectro de RMNP (Espectro 30) no fue muy informativo, sin embargo observaron las siguientes señales:

1. Cuatro singuletes a  $\delta$  1.85, 1.97, 2.03 y 2.05 ppm asignables a metilo de acetato y congruentes con la presencia de una unidad de glucosa en la molécula.
2. Un triplete a  $\delta$  4.15 (J=7 Hz) característico de el protón H-6 de la  $\beta$ -D-glucosa.
3. Dos multipletes, uno centrado a  $\delta$  5.1 y el otro a  $\delta$  7.25 ppm.
4. Una señal ancha a  $\delta$  8.1 ppm asignable a la funcionalidad -NH.

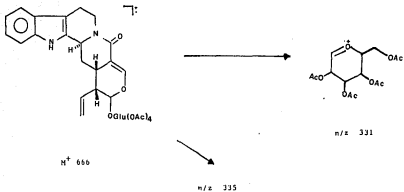
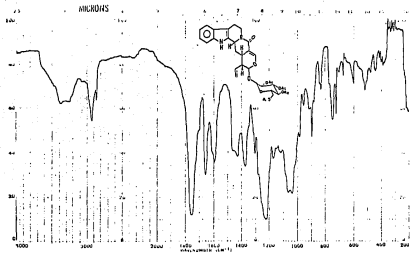
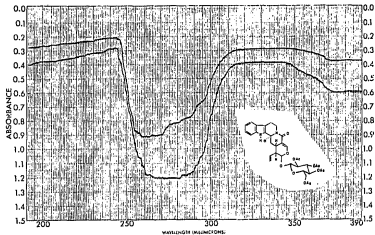
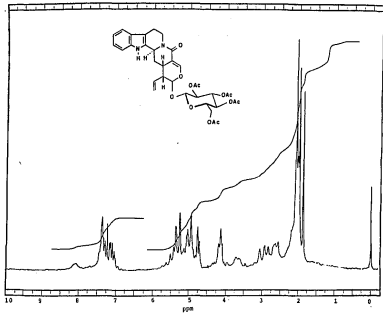


Figura 23 Fragmentos más importantes en el espectro de masas de la tetra acetil strictosomida 71u.

E- 28 Espectro de IR del compuesto 71a

E-29 Espectro de UV del compuesto 71a



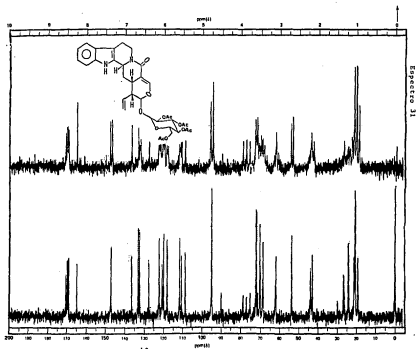
Espectro 30

E-30 Espectro de RMN del compuesto 71a

La comparación de los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 31) con los descritos en la literatura para varios alcaloides del tipo indol iridoide (Sheriha, G., y Rapoport, 1976), permitió establecer que el compuesto era un gluco alcaloide con un núcleo de valesiacotamano. El espectro presentó señales para 34 carbonos: doce de las cuales se encontraban en la zona de los aromáticos, siete en la región donde resuenan los carbonos unidos a oxígeno, cinco en la región de los carbonilos y los demás en la zona alifática. De los aromáticos, ocho de ellos a  $\delta$  133.1, 108.7, 127.6, 118, 119.8, 122.1, 111.4 y 136 ppm correspondían al núcleo indólico; el singulete y el doblete a  $\delta$  110.5 y 147 respectivamente, fueron asignables a los carbonos de la doble ligadura entre C-16 y C-22; finalmente las señales a  $\delta$  120.5 (t) y 132.2 (d) correspondían a los núcleos C-18 y C-19 del esqueleto tipo.

De las resonancias observadas en la región de los carbonilos, la correspondiente a  $\delta$  164.87 (s) fue fácilmente asignable al carbonilo de una lactama, mientras que las otras correspondieron a cuatro grupos acetato. De los siete carbonos no vinílicos unidos a oxígeno, seis correspondieron a la porción glucosídica, y el séptimo al carbono 21, a través del cual debía establecerse el enlace glucosídico. Las señales restantes correspondían a la porción quinolizidona de la molécula, las cuales se encuentran en la Tabla 23 y la Figura 24.





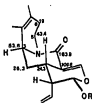
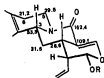
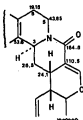
**H-3 $\alpha$  CIS C/D****H-3 $\beta$  TRANS C/D****PRODUCTO NATURAL**

Figura 24 Datos de RMN<sup>13</sup>C de la parte quinolizidona de la tetra acetil estrictosamida, tetra acetil vincosamida y del producto aislado de *Sida* mexicana.

La porción quinolizidona de núcleos valesiacotanos puede existir en la naturaleza en dos conformaciones. La *cis* en la cual el H-3 se encuentra  $\alpha$  orientado, y la *trans* en la que el H-3 está  $\beta$  orientado. Para definir la conformación de este anillo en el alcaloide obtenido en este estudio, la magnitud de los desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  fueron de gran utilidad. En la Figura 24 se comparan los desplazamientos químicos de una *cis* y una *trans* quinolizidona. Y claramente se puede apreciar que los correspondientes en el producto aislado concuerdan con la *cis* quinolizidona.

Cabe hacer notar que los desplazamientos a campos más altos observados para los núcleos C-5 y C-15 en el caso del isómero *trans* se deben a un efecto del tipo  $\gamma$  gauche.

#### 3.4.3 Resultados de la actividad biológica del hermano 20 y de la tetra acetil estrictosanida 71a

La toxicidad de ambos alcaloides para *Aedes salina* se determinó, y solo el hermano resultó activo. La  $\text{LC}_{50}$  para este último fue de 25 ppm. Este resultado motivó la evaluación *in vitro* de este compuesto como posible agente antiplásmico, encontrándose una actividad moderada; el valor de inhibición  $\text{IC}_{50}$  de la toma de hipoxantina radiactiva por parte del *Plasmodium falciparum* fue de 0.97 ppm. Asimismo,

el compuesto fue evaluado en los mismos sistemas de tumores en los que fueron evaluadas las cucurbitacinas, y los resultados se resumen en la Tabla 24.

Tabla 24 ED<sub>50</sub> (ug/ml) del compuesto citotóxico de *Símila mexicana*

SISTEMA DE TUMOR EN HUMANO		RESULTADO DE LA EVALUACION DEL HARMANO <u>20</u>
A 549	(Pulmón)	5.40
NCF 7	(Pecho)	12.1
WT 29	(Colon)	1.83

### 3.5 CONCLUSIONES

3.5.1 De las fracciones alcaloideas obtenidas, mediante una partición ácido-base del extracto metanólico de la corteza de la *Símila mexicana*, fue posible obtener un alcaloide del tipo 5-carbolina, caracterizado como el harmano 20 y el valesiacotanano estrictosamida 71.

3.5.2 El harmano 20 resultó citotóxico y fue evaluado como agente antitumoral y antimalárico. La actividad antitumoral del compuesto fue poco significativa, sin embargo, la moderada actividad antimalárica (IC<sub>50</sub>=0.97 ppm) resulta sin precedentes. Este resultado podría explicar el uso popular de la planta.

3.5.3 Del extracto orgánico neutro se aislaron los esteroides  $\beta$ -sitosterol 44 y su  $\beta$ -D-glucósido 54.

3.5.4 Los compuestos aislados y caracterizados de la *Símla mexicana* concuerdan perfectamente con el perfil químico de la familia Rubiaceae. Aunque resulta importante señalar que al presente estudio representa una contribución inicial a la investigación fitoquímica de las especies del género *Símla*.

## B I B L I O G R A F I A

- Adeoye, A. y Waigh, R. (1983) PHYTOCHEMISTRY 22, 975.
- Adesogau, E. K. (1973) TETRAEDRON, 29, 4089.
- Ahmed, F. R. Angi S. y Tallis, A.C. (1978) CAN J. CHEM., 56, 1020.
- Aiello, A.A. (1979) JOURNAL OF THE ARNOLD ARBORETUM, 60, 38.
- Aimi, N., Yanaguchi, K. y Iitaka, Y. (1981) TETRAEDRON, 37, 963.
- Ansary, A. y Khan, L. H. (1981) JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH, 3, 133.
- Aquino, R., D'Agostino, M., De Simone, F. y Pizza, C. (1988) PHYTOCHEMISTRY, 27, 1827.
- Audier, H.E. y Das, B.C. (1966) TETRAEDRON LETTERS, 20, 2205.
- Bailleul, F., Delaveau, P., Rabaron, M., Plat, M. y Koch, H. (1977) PHYTOCHEMISTRY, 16, 723.
- Bashir, A. K. Ross, M. S. P. y Turner, T.D. (1981) FITOTERAPIA, 52, 273.
- Battersby, A.R. y Hall, E. S. (1969) CHEM. COMMUN., 793
- Battersby, A. R., Hall, E.S. y Southgate, R. (1969) J. CHEM. SOC. (C), 721.
- Baytelman, B. (1979) Etnobotánica en el Estado de Morelo, Cuernavaca, Mor.: Instituto Nacional de Antropología e Historia Centro Regional Morelos Guerrero.

- Bennet, W. C. y Zning, R. M. (1935) The Tarahumara. An Indian Tribe of Northern Mexico. Chicago, Il., University of Chicago, Press.
- Biffu, T., Stefenson, R. (1978) J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. I., 360.
- Blackstock, W. P. y Brown, R. T. (1971) TETRAHEDRON LETTERS, 3727.
- Blackstock, W. P., Brown, R. T. y Lee, G. K. (1971) J. C. S. CHEM. COMMUN., 910.
- Bock, K., Jensen, S. R. y Nieben, B. J. (1976) ACTA CHEM. SCAND. B., 30, 743.
- Boit, H. G. (1961) "Ergebnisse der Alkaloid Chemie bis 1960", Akademie Verlag, Berlin, p. 370.
- Brambila, D. (1979) Diccionario Raramari-Castellano (Tarahumar), México, D. P.: Buena Prensa, A. C.
- Brauchli, P. (1964) J. AM. CHEM. SOC., 86, 1895.
- Brimblecombe, R. W. (1973 a) In "Advances in Drug Research" (A. B. Simonds Ed.) VII, 170. Academic Press, London and New York.
- Brown, R. T. and Blackstock, W. P. (1972) TETRAHEDRON LETTERS, 1629.
- Brown, R. T. y Chapple, C. L. (1976 a) TETRAHEDRON LETTERS, 1629.
- Brown, R. T., Chapple, C. L. y Lashford, A. G. (1977 a) PHYTOCHEMISTRY, 16, 1619.

- Brown, R. T. y Charalambides, A. A. (1973) *J. C. S. CHEM. COMMUN.*, 765.
- Brown, R. T. y Charalambides, A. A. (1974 a) *J. C. S. CHEM. COMMUN.*, 553.
- Brown, R. T. y Charalambides, A. A. (1975 a) *EXPERIMENTIA*, 31, 505.
- Brown, R. T. y Duckworth, D. M. (1976) *J. C. S. CHEM. COMMUN.* 530.
- Brown, R. T., Leonard, J. y Sleigh, S. K. (1977) *J. C. S. CHEM. COMMUN.*, 636.
- Brown, R. T. y Row, L. R. (1967) *CHEM. COMM.*, 453.
- Brown, R. T. y Waramba, B. P. M. (1978) *PHYTOCHEMISTRY*, 17, 1686.
- Brossi, A., Teitel, S. y Parry, C. V. (1971) In "The Alkaloids, Chemistry and Physiology", R. H. F. Manske Ed., Academic Press, New York, London.
- Budzikiewicz, H., Wilson, J. M. y Djerassi, C. (1963) *J. AM. CHEM. SOC.*, 85, 3688.
- Chatterjee, T. K., Basak, A., Barua, A. K., Mukherjee, K. y Roy, L. N. (1979) *TRANS. BOSE RES. INST. CALCUTA*, 85.
- Cheung, H. T. y Williamson, D. G. (1969) *TETRAHEDRON*, 25, 119.
- Cheung, H. T. y Yan, T. C. (1972) *AUST. J. CHEM.*, 25, 2003.



- Chopra, R. N. y Nayer, S. L. (1956) "Glosary of Indian Medicinal Plants" CSIR, New Delhi.
- Cordell, G. A. (1974) LLOYDIA, 37, 219.
- Cordell, G. A. (1981) "Introduction to Alkaloids", A Biogenetic Approach (A Wiley Interscience Pub.).
- Corothic, E. y Nakano, T. (1969) ACTA PHARM. SUEC., 6, 419.
- Das, S. C. (1971) CHEM. IND., 1531.
- Das, M. C. y Mahato, S. B. (1983) PHYTOCHEMISTRY, 22, 1071.
- Davioud, E. y Bailleul, P. (1988, PLANTA MEDICA, 54, 87.
- Delle Monache, G. D., Botta, B., Monache, F. D. y Botta, M. (1983) PHYTOCHEMISTRY, 24, 1355.
- Delle Monache, G. D., Botta, B., Neto, A. D., y Alves de Lima, R. (1983) PHYTOCHEMISTRY, 22, 1657.
- Desai, H. K., Gawad, D. H., Govindacharifi, T. R., Joshi, S. B., Kanat, V. N., Modi, J. D. Parthasarathy, P. C., Patankar, S. A., Sidhaye, A. R. y Vinwanathan, N. (1971) INDIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, 9, 611.
- Djerassi, C., Nakano, T., James, A. N., Zalkow, L. H., Eisenbraun, E. J. y Shooley, J. N. (1961) J. URG. CHEM., 26, 1192.
- Ducroix, A. (1975) CAFE, CACO, THEU, 19, 57.
- Endo, T. y Taguchi, H. (1973) CHEN, PHARM, BULL., 21, 2684.

- Fransworth, N. R., Che, C., Fang, X., Proebe, C. H. y Kinghorn, A. D. (1985) *J. NAT. PROD.*, 48, 429.
- Friedrichson, J., Mackay, M. F. y Mathieson, A. Mc L. (1967) *TETRAHEDRON LETTERS*, 3521.
- Fuentes, J. A. y Longo, V. G. (1971) *NEUROPHARMACOLOGV*, 10, 15.
- Fuji, T. y Ohba, H. (1983) "The Alkaloids" 22, Ed. por A. Brossi. Academic Press, New York.
- Gali, H., 1984, *Las Hierbas del Indio*. I. México. D.F.: Gómez Gómez Hnos. Editores S. de R. L.
- Gentry, H. S. (1942) *Río Mayo Plants*. Washington, D. C. Carnegie Institution of Washington. Publication 527.
- Coutarel, R., Melchio, J., Bouquet, A. y Pais, M. (1979) *TETRAHEDRON LETTERS*, 315.
- Gray, A. (1886) *Contribution to American Botany... 2. Sertum Chihuahuense*. *PROC. AMER. ACAD.* 21: 378-409.
- Gröger, D. (1969) In "Biosynthese des Alkaloide", Mothes, K. y Shute, H. R., eds., 459 D. V. W. Berlin.
- Guarnaccia, R., Madyastha, E., Tegmeyer A., y Coscia, C. J. (1972) *TETRAHEDRON LETTERS*, 50, 5125.
- Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry, H. (1975) "The Flavonoids", 801-805, Chapman y Hall, London.
- Harborne, J. B. (1984) "phytochemical Methods", Chapman y Hall, London, 2a Ed.
- Hegnauer, R. (1973) *CHEMATAXONOMIC DER PFLANZEN*, 6, 130.

- Hemingway, S. R., Houghton, P. J., Phillipson, J. D. y Shellard, E. J. (1975) PHYTOCHEMISTRY, 14, 557.
- Herath, W. H., Sutlanbawa, M. U. S. y Wannigana, G. P. (1978) PHYTOCHEMISTRY, 17, 1979.
- Hesse, M. (1964) "Indol-alkaloide in Tabellen", Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hesse, M. (1968) "Indol-alkaloide in Tabellen-Erganzungswerk", Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Holker, J. S. E., Ross, W. J. Whalley, W. B. y Raffauf, R. R. (1964) PHYTOCHEMISTRY, 3, 361.
- Hotellier, P., Delaveau, P. y Pousset, J. L. (1977) PLANTES MEDICINALES ET PHYTOTHERAPIE, 11, 106.
- Hui, W. H. y Ho, C. T. (1968) AUSTRALIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, 21, 347.
- Husson, H. P., Kan-Fan, C., Sévenet, Y. y Vidal, J. P. (1977) TETRAHEDRON LETTERS, 1889.
- Hutchinson, C. R., Heckendorf, H. H., Daddona, P. E., Hagama, E. y Wenkert, E. (1974) J. AN. CHEM. SOC., 96 3609.
- Inouye, H., Saito, S. y Shingu, T. (1970) TETRAHEDRON LETTERS, 41, 3581.
- Inouye, H., Inouye, S., Shimokawa, N. y Okigawa, M. (1968) TETRAHEDRON LETTERS, 683.
- Inouye, H., Takeda, Y. y Nishinura, H. (1974) PHYTOCHEMISTRY, 13, 2219.

- Jordaan, A., Du Plessis, L. M. y Joynt, V. P. (1968)  
J. S. AFR. CHEM. INST., 21, 22.
- Johi, B. S., Kamet, V. N. y Gawad, D. H. (1977)  
HETEROCYCLES, 7, 193.
- Joshi, K. C., Singh, P. y Taneja, S. (1981)  
JOURNAL OF THE INDIAN CHEMICAL SOCIETY, 58, 825.
- Johns, S. R., Lambertson, S. A. y Stounis, A. A. (1970)  
AUST. J. CHEM., 23, 1285.
- Jossang, A., Jacquemin, H., Pousset, J. L., Cavé, A.,  
Bamal, M. y Riche, C. (1977 a) TETRAHEDRON LETTERS, 1219.
- Jossang, A., Pousset, J. L., Jacquemin, H. y Cavé, A.  
(1977 b) TETRAHEDRON LETTERS, 4317.
- Kirtikar, K. R. y Basu, B. D. (1933)  
INDIAN MEDICINAL PLANTS, 1, 1272.
- Koike, K., Cordell, G. A., Preer, A. A., Gilmore, C. J.  
y Sim, G. (1980) TETRAHEDRON, 36, 1167.
- Krebs y Griensinger (1970) ARZNEIMITTEL FORSCH, 10, 31.
- Krishna, C. J., Singh, P. y Taneja, S. (1981)  
JOURNAL INDIAN CHEMICAL SOC., 58, 825.
- Kumar, M. (1985) CURRENT SCIENCE, 39, 505.
- Kupchan, S. M., Smith, R. M., Aynehchi, Y. y Maruyama,  
M. (1970) J. ORG. CHEM., 35, 2891.
- Lang, W. J., Korol, B., Brown, M. L. y Gershon, S.  
(1966) MED. PHARMACOL. EXP., 15, 24.
- Lapikeanon, P., Tovivich, P., Woo, W. S. y Choi, J. S.  
(1983) ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH, 6, 29.

- Lavié, D. y Glotter, E. (1971) PROGRESS IN THE CHEMISTRY OF ORGANIC NATURAL PRODUCTS, 21, 307.
- Levesque, J., Poussset, J. L. y Cavé, A. (1974) C. R. ACAD. SCI. PARIS, SERIES C, 279, 1053.
- Lewis, K. G. y Tucker, D. J. (1983) AUST. J. CHEM., 36, 2297.
- López, J. L. y Poussset, J. (1988) JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS, 51, 829.
- McLean, S. y Murray, D. G. (1970) CAN. J. CHEM., 48, 867.
- McLean, S., Dmitrienko, G. I. y Szokolcai, A. (1976) CAN. J. CHEM., 54, 1262.
- Manske, R. H. F. (1965) In "The Alkaloids, Chemistry and Physiology", R. H. F. Manske, Ed. 8, 693, Academic Press, New York, London
- Mares Trias, A. (With D. Burgess, R. Bye), 1982, Ralanuli Nu'tugala Go'ane (Comida de los Tarahumaras), Chihuahua, Chih.: Don Burgess.
- Martínez del Campo (1960) J. AN. INST. NED. MEXICO 8, 332.
- Martínez, M. (1969) Las Plantas Medicinales de México México, D. F.: Ediciones Botas.
- Martínez, M. (1979 a) Las Rubiaceas, in M. Martínez y E. Matuda, Flora del Estado de México. Tmo II, pp. 80-90. México, D. F. Biblioteca Enciclopédica del Estado de México.

- Martínez, M. (1979b) Flora Medicinal. in M. Martínez y E. Matuda. Flora del Estado de México. Tomo III, pp. 349-401. México, D. F.: Biblioteca Enciclopedia del Estado de México.
- Martínez, M. (1979c) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas, México, D. F.: Fondo de la Cultura Económica.
- Mata, R., Calzada, F., García, M. R. y Reguero, M. T. (1987) J. NAT. PROD., 50, 86b.
- Mata, R., Castro, E., Correa, A. y Pereda, R. (1988a) REV. LATINOAMER. QUIM., 19, 85.
- Mata, R., Rios, L., Canacho, M. R., Reguero, M. T. y Lorence, D. (1988b) PHYTOCHEMISTRY, 27, 1987.
- Mata, R., García, M. R. y Calzada, F. (1988c) J. NAT. PROD, 51, 851.
- Merlini, L. y Nacini, G. (1968) GAZZ. CHIM. ITAL., 98, 974.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobser, L. B. Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. (1982) PLANTA MEDICA, 45, 31.
- Monache, G. D., Botta y Alves de Lima (1984) PHYTOCHEMISTRY, 23, 1813.
- Mukerjee, S. K., Saroja, T. y Seshadri, T. R. (1968) TETRAHEDRON, 24, 6527.
- Murray, D. G. Szokolcai, A. y McLean, S. (1972) CAN. J. CHEM., 50, 1486.

- Murty, Y. L. N., Jairan, M. A. y Sree, A. (1989) *PHYTOCHEMISTRY*, 28, 276.
- Nakano, I. y Martin, A. (1976) *PLANTA MEDICA*, 30, 186.
- O'Donovan, D. G. y Kennesally, M. P. (1967) *J. CHEM. SOC. C.*, 1103.
- Ogenkova, L. (1981) *PHYTOCHEMISTRY*, 20, 121.
- O'Neill, M. J., Bray, D. H., Boardman, P., Phillipson, J. D. y Warhurst, D. C. (1985) *PLANTA MEDICA*, 394.
- O'Neill, M. J., Bray, D. H., Boardman, P., Chan, K. L., Phillipson, J. D., Warhurst, D. C., y Peters, W. (1987) *J. NAT. PROD.*, 50, 41.
- Openshaw H. T. (1970) In "Chemistry of the Alkaloids", S. W. Peiletier. Ed., Van Nostrand Reinhold, New York.
- Ortíz Sánchez, A. (1986) Contribución al conocimiento de las Plantas Medicinales de Xoxocotia, Morelos. Cuernavaca, Mor., Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tesis (biólogo). 66 p.
- Pant, P. y Rastogi, R. P. (1979) *PHYTOCHEMISTRY*, 18, 1095.
- Paris, R. R., Fercheron, F., Mainil, J. y Goutarel, R. (1957) *BULL. SOC. CHIM. FR.*, 780.
- Parry, K. P. y Smith, G. F. (1978) *J. CHEM. SOC. PERKIN I*, 1671.
- Pennington, C. W. (1963) *The Tarahumar of Mexico. Their Environment and Material Culture*. Salt Lake City, U. T.: University of Utah Press.

- Phillipson, J. D. y Hemingway, S. R. (1975) *PHYTOCHEMISTRY*, 14, 1855.
- Pousset, J. L., Bouquet, A., Cavé, A. y Paris, R. R. (1971) *C. A. ACAD. SCI. PARIS, SERIES C.*, 272, 665.
- Pousset, J. L., Karharo, J., Maynard, G., Monseur, X., Cavé, A. y Goutarel, R. (1973) *PHYTOCHEMISTRY*, 12, 2308.
- Pousset, J. L., Levesque, J., Cavé, A., Picot, P., Potier, P. y Paris, R. R. (1974) *PLANTES MEDICINALES ET PHYTOTHERAPIS*, 1, 51.
- Pousset, J. L., Cavé, A., Chiaroni, A. y Riche, C. (1977) *J. C. S. CHEM. COMMUN.*, 261.
- Raffaui, R. R. (1970) "A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containing Plants", Wiley Interscience, New York, London.
- Razdan, T. K., Kachroo, U., Merkar, S., Koul, G. L. y Dhar, K. L. (1982) *PHYTOCHEMISTRY*, 21, 409.
- Reddy, G. C. S., Ayengar, K. N. N. y Rangswami, S. (1975) *INDIAN J. CHEM.*, 13, 749.
- Reddy, G. C. S., Rangswami, S. y Sunder, S. (1977) *PLANTA MEDICA*, 32, 206.
- Reguero, M. T., Mata, R. y Delgado, G. (1987) *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 50, 315.
- Reher, G., Krauss, L. J., Sinwell, V. y Koning, W. A. (1983) *PHYTOCHEMISTRY*, 22, 1524.
- Reher, G. y Krauss, L. J. (1984) *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 47, 172.



- Sainty, D., Delaveau, P., Baillet, F. y Moretti, C. (1982) *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 45, 676.
- Saharia, G. S. y Seshadri, V. (1980) *INDIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, 3, 6.
- Sahu, N. P., Mahato, S. B., Banerjee, N. Chakravarti, R. N. (1976) *INDIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*, 12, 284.
- Sánchez Viesca, F., Díaz, E., Chávez, G. (1967) *CIENCIA*, XXV, 135.
- Sánchez Viesca, F. (1969) *PHYTOCHEMISTRY*, 4, 1821.
- Santamaría, F. J. (1978) *Diccionario de Mexicanismos México, D. F.: Editorial Porrúa, S. A.*
- Saxena, H. (1975) *LLOYDIA*, 31, 346.
- Schlitter, E. y Spitaler, U. (1978) *TETRAHEDRON LETTERS*, 2911.
- Sheriha, G. y Rapoport, H. (1976) *PHYTOCHEMISTRY*, 15, 305.
- Shreve, F., y Wiggins, J. L. (1964) *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford, CA: Stanford University Press.*
- Solonon, W. (1970) In "Chemistry of the Alkaloids", S. W. Pelletier, ed., *Vom Nostrand Reinhold, New York, Cincinnati, Toronto, Melbourne.*
- Soto Núñez, José Carmen (1987) *Las plantas medicinales y su uso tradicional en la Cuenca del Rfo Balsas, Estado de Michoacán y Cuerrero, México. México, D. F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias, Depto. de Biología (Tesis Licenciatura) 231 p.*

- Standley, P. C. (1926) Trees and Shrubs of Mexico (Bignoniaceae Asteraceae). Contribution from the United States National Herbarium 23 (5): 1374.
- Standley, P. C. (1934) NORTH AMERICAN FLORA, 32, 160.
- Standley, W. (1975) "Flora de Guatemala", Field Museum of Natural History, 24, 69.
- Sticher, O. (1976) "New Natural Products and Plant Drugs with pharmacological Biological or Therapeutical Activity", Ed. H. Wagner y D. Wolff, Springer Verlag, Berlin, p. 153.
- Stolle, K. y Gröger, D. (1968) ARCH. PHARM., 301, 561
- Takeda, Y., Nishimura, H. and Inouye, H. (1975) PHYTOCHEMISTRY, 14, 2647.
- Takeda, Y., Nishimura, H. and Inouye, H. (1976) CHEM. PHARM. BULL., 24, 1216.
- Takeda, Y., Nishimura, H. and Inouye, H. (1977) PHYTOCHEMISTRY, 16, 1401.
- Tallent, W. H. (1964) TETRAHEDRON, 20, 1781.
- Talor, S., Nelson, J. D., Delong, D. C. y Swoboda, G. H. (1976) LLOYDIA, 39, 261.
- Uesato, S., Ali, E., Nishimura, H., Kawamura, I. e Inouye, H. (1982) PHYTOCHEMISTRY, 21, 353.
- Uphof, J. C Th. (1986) "Dictionary of Economic Plants", New York, N. Y., Stechert-Hafner Service Agency, Inc. Verlag Von J. Cröner.
- Verdcourt, B. (1958) BULL DU JARD. BOT. DE L' ETAT, BRUXELLES, 28, 209.

- Verdcourt, B. (1976) In "Flora of Tropical East Africa", R. M. Polhill, ed., Rubiaceae, Part 1 pp. 1-414.
- Von Reis, S. y Lipp, F. J., 1982, New Plant Sources for Drugs and Foods from the New York Botanical Garden Herbarium. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Weiner, I. M. y Mudge, C. E., Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism, in the Pharmacological Basis of Therapeutics, (Ed. Goodman. A., Goodman, L., Rall, T. and Murad, F.), 7th. Edit., Mc Millan Publishing Company, N. Y., 1985, pp. 887-890.
- Willis, J. C. (1971) "A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns" (3th. Ed., revised by H. K. Air y Shaw) Cambridge University Press.
- Willis, J. C. (1980) "A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns", New York, N. Y., Cambridge University Press.
- Wilson, R (1984) N. Z. J. BOT., 22, 195.
- Woo-Ming, P. E. y Stuart, K. L. (1975) PHYTOCHEMISTRY, 14, 2529.
- Woo, W. S., Choi, J. S. y Tovivich, P. (1984) ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH, 7, 57.
- Zalacain, M., Zaera, E., Vázquez, D. y Jiménez, A. (1982) FEBS LETTERS, 148, 95.
- Zarembo, J. E., Douglas, B., Valenta, J. y Weisbach, J. A. (1974) J. PHARM. SCI., 63, 1407.