

2ej. 107

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



ESTUDIO FITOQUIMICO DE Rapanea guianensis Aubl

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

MARTHA INES RODRIGUEZ RIQUELME

MEXICO, D. F.

1987



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.

I N D I C E

	Página
LISTA DE TABLAS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	vi
LISTA DE ESQUEMAS -----	viii
LISTA DE ESPECTROS -----	ix
LISTA DE ABREVIACIONES -----	x
INTRODUCCION -----	
1.1 Generalidades acerca de la <u>Rapanea guianensis</u> Aubl. -	1
1.2 Generalidades de hidroxibenzoquinonas -----	4
OBJETIVO GENERAL -----	13
OBJETIVOS PARTICULARES -----	13
PARTE EXPERIMENTAL -----	15
1. Estudio Fitoquímico -----	15
1.1 Materiales y Métodos -----	15
1.1.1 Material Vegetal -----	15
1.1.2 Métodos de extracción -----	15

	Página
1.1.3 Aislamiento y purificación del Producto I (mezcla de quinonas: embelina, <u>1</u> , rapanona, <u>2</u> , y 2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona, <u>6</u> ,) -----	15
1.1.4 Análisis Cromatográficos -----	17
1.1.5 Caracterización del Producto I -----	17
a) Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	17
b) Preparación de derivados -----	19
b.1) Obtención de los derivados metilados, <u>2a</u> , <u>1a</u> , y <u>6a</u> , (Producto II) -----	19
b.2) Obtención de los derivados acetilados, <u>1b</u> , <u>2b</u> , <u>6b</u> , (Producto III) -----	19
b.3) Formación del derivado dimérico, <u>2c</u> , -----	20
b.4) Oxidación del Producto I con H ₂ O ₂ en medio alcalino -----	20
2. Estudio Microbiológico -----	21
2.1 Ensayo biológico del extracto de éter de petróleo y Producto I -----	21
2.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria para el extracto de éter de petróleo y Producto I -----	24
2.1.3 Evaluación de la actividad antibiótica del extrac-	

	Página
to de éter de petróleo y del Producto I por el método de penicilindro -----	24
2.1.4 Determinación de la concentración crítica del Producto I -----	24
RESULTADOS Y DISCUSION	25
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFIA	49
APENDICE	55

LISTA DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Hidroxibenzoquinonas aisladas de varias especies pertenecientes a la familia Myrsinaceae -----	2
TABLA 2. Reacciones coloridas observadas para las alquilhidroxibenzoquinonas -----	5
TABLA 3. Absorción en el Ultravioleta-visible de 1,4-benzoquinonas -----	8
TABLA 4. Comportamiento Cromatográfico del Producto I ----	26
TABLA 5. Constantes físicas y espectroscópicas del Producto I -----	27
TABLA 6. Constantes físicas y espectroscópicas de los derivados del Producto I -----	29
TABLA 7. Resultados obtenidos del ensayo microbiológico realizado para el extracto de éter de petróleo ----	39
TABLA 8. Resultados obtenidos del ensayo microbiológico del Producto I -----	41

	Página
TABLA 9. Actividad antimicrobiana del extracto de éter de petróleo de <i>Rapanea guianensis</i> determinada por el método del Penicilindro -----	42
TABLA 10. Actividad antimicrobiana del Producto I (Método del penicilindro) -----	43
TABLA 11. Valores del halo de inhibición graficados para obtener la concentración mínima inhibitoria -----	43
TABLA 12. Determinación de la concentración crítica para el Producto I -----	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Estructuras de algunas hidroxibenzoquinonas de la familia Myrsinaceae -----	3
FIGURA 2. Espectro de absorción electrónica de dihidroxibenzoquinonas -----	7
FIGURA 3. Fragmentaciones típicas de una benzoquinona simple -----	10
FIGURA 4. Fragmentación básica de las hidroxibenzoquinonas --	11
FIGURA 5. Derivados de rapanona, <u>2</u> , -----	30
FIGURA 6. Derivados de embelina, <u>1</u> , -----	31
FIGURA 7. Derivados de la 2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona, <u>6</u> , -----	32
FIGURA 8. Fragmentación básica de la rapanona -----	34
FIGURA 9. Cromatografía de gases de los ésteres metílicos obtenidos de la oxidación y metilación del Producto I -----	35

Página

- FIGURA 10. Patrón de absorción en el I.R. en la zona comprendida entre 998 y 927 cm^{-1} para la embelina, la rapanona, mezclas de ambas y para el Producto I ----- 37
- FIGURA 11. Concentración mínima efectiva del Producto I --- 44

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
ESQUEMA 1. Extracción de la corteza de <u>Rapanea guianensis</u> Aubl. con éter de petróleo y etanol -----	16
ESQUEMA 2. Obtención del Producto I del extracto etanólico co -----	18
ESQUEMA 3. Ensayo microbiológico para bacterias y levaduras -----	23

LISTA DE ESPECTROS

	Página
E-1. Espectro I.R. del Producto I -----	56
E-2. Espectro U.V. del Producto I -----	57
E-3. Espectro RMN ¹ H del Producto I -----	58
E-4. Espectro de Masas del Producto I -----	59
E-5. Espectro de RMN ¹ H de éster metílico, <u>2a</u> , -----	60
E-6. Espectro de RMN ¹ H del diacetato, <u>2b</u> , -----	61
E-7. Espectro de RMN ¹ H del derivado dimérico, <u>2c</u> -----	62
E-8. Espectro de masas del compuesto, <u>2d</u> ,-----	63
E-9. Espectro de masas del compuesto, <u>1c</u> , -----	64
E-10. Espectro de masas del compuesto, <u>6c</u> -----	65

LISTA DE ABREVIACIONES

- CDCl₃: Cloroformo deuterado
D₂O: Agua deuterada
DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EMIE: Espectro de masas obtenido por impacto electrónico
EMIQ: Espectro de masas obtenido por ionización química
Fig: Figura
Hz: Hertz
IE: Impacto electrónico
IQ: Ionización química
IR: Infrarrojo
MHZ: Mega Hertz
PF: Punto de fusión
Piridina-d-5: Piridina pentadeuterada
ppm: Partes por millón
RMN¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s: singulete
spht: Relación de flujo
t: triplete
TLwi: Temperatura inicial
TMS: Tetrametilsilano
UV: Ultravioleta

1. Introducción.

1.1 Generalidades acerca de la Rapanea guianensis Aubl.

La Rapanea guianensis es una planta de la familia Myrsinaceae que se encuentra distribuida en tierras cálidas americanas. Recibe los nombres comunes de camaguillo, chagualito, panela y cucharo (Pérez Arbeláez, 1947; Martínez, 1979). Este último nombre deriva del empleo de la planta para la manufactura de cucharas. Su madera de grano fino es ideal, no solo para la talla de utensilios sino también para construcciones aéreas debido a la gran resistencia que presenta al ataque de insectos. Por otra parte, esta planta también tiene uso en la medicina popular como un eficiente antiséptico (Pérez Arbeláez, 1975).

Taxonómicamente el género Rapanea se encuentra estrechamente relacionado con los géneros Embelina, Myrsine, Ardisia y Maesa (Lowrence, 1951) (Hegnawer, 1969).

Desde el punto de vista fitoquímico no se ha descrito ningún trabajo previo para la Rapanea guianensis; sin embargo, varias especies de la familia Myrsinaceae, incluyendo otras especies de Rapanea, han sido investigadas químicamente y la mayoría de estos trabajos describen el aislamiento e identificación de alquilhidroxibenzoquinonas como principales metabolitos secundarios presentes en estas especies. Ejemplos representativos de estas quinonas y sus fuentes naturales se señalan en la Tabla 1 y sus estructuras se ilustran en la Figura 1.

Tabla 1. Hidroxibenzoquinonas aisladas de varias especies pertenecientes a la familia Myrsinaceae.

QUINONA	FUENTE NATURAL	ESTRUCTURA FIGURA 1	REFERENCIA
Rapanona	<u>Bladhia japónica</u> Thunb	2	Hiramoto, et. al., 1939
	<u>Bladhia quinquegona</u> (glume) Nakai		Ogawa, 1965
	<u>Bladhia steboldii</u> (Miq) Nakai		
	<u>Rapanea maximowczii</u> Koidz		
	<u>Rapanea nerifolia</u> Mez		
	<u>Rapanea pulchra</u> Gilg		Wilkinson, 1961
	<u>Ardisia macrocarpa</u> wall		Murty, 1965; Rao, 1975
	<u>Aeaiceras corniculatum</u> Blanco		Hensens, et. al., 1965
Embelina	<u>Embellia kilimands charica</u> Gelg	1	Merian, et. al., 1948
	<u>Embellia barbeyana</u> Mez		Paris, 1950
	<u>Embellia robusta</u> Roxb		Krishna, et. al., 1943
	<u>Embellia ribes</u> Burm		Rao CH, et. al., 1961
	<u>Myrsine africana</u> L		Merian, et. al., 1948
	<u>Myrsine capitella</u> wall		Krishna, et. al., 1936
	<u>Myrsine semiserrata</u> wall		
	<u>Rapanea neurophylla</u> Mez		Merian, et. al., 1948
	<u>Rapanea pulchra</u> Gilg		Wilkinson, 1948
	<u>Rapanea umbellata</u>		Bauer, et. al., 1973
	<u>Ardisia japónica</u> (Hornsted) Blume	Huang, et. al., 1981	
Maesoquinona	<u>Maesa japónica</u> (Thunb) Moritzi	3	Ogawa, 1965
	<u>Maesa formosana</u>		Chen, 1976
	<u>Maesa indica</u>		Desai, 1975
Vilangina	<u>Embellia ribes</u> Burm	5	Rao, et. al., 1961
Bogatina	<u>Maesa macrophylla</u> wall	4	Chandrasekhar, et. al., 1970
2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona	<u>Ardisia macrocarpa</u> wall	6	Rao, 1975

1.2 Generalidades de hidroxibenzoquinonas.

Las alquilhidroxibenzoquinonas son sólidos anaranjados, amarillo-naranja o rojos-naranja. Muy solubles en disolventes poco polares como hexano, benceno y éter de petróleo. Sus puntos de fusión varían entre 120-155°C, y cabe destacar que son metabolitos resultantes de la ruta del acetato malonato.

Para su aislamiento, se pueden emplear disolventes, como éter, benceno y otros similares, utilizando los métodos clásicos de extracción. Generalmente se extraen en conjunto con grasas y otras sustancias de baja polaridad. Para su fraccionamiento y separación se ha empleado cromatografía en capa fina y/o en columna, utilizando como adsorbentes fosfato de calcio (CaHPO_4), óxido de calcio (CaO), óxido de silicio (SiO_2) y sílica gel impregnada de una solución acuosa al 3% de ácido oxálico. Como las hidroxibenzoquinonas son vinílogos de los ácidos carboxílicos, pueden ser separadas también, mediante el uso de soluciones acuosas de bicarbonato de sodio (Robinson, 1983; Harbone, 1984).

Es de hacer notar que las alquilhidroxibenzoquinonas con cadenas laterales de largo, semejante, no son separables por métodos analíticos comunes y por lo tanto siempre son obtenidas de sus fuentes naturales bajo la forma de mezclas. Las cantidades relativas de los constituyentes de dichas mezclas varían de un material vegetal a otro y en algunos casos solo un producto es obtenido. Afortunadamente se cuenta con métodos analíticos que permiten determinar, no solo la existencia de mezclas, sino también la proporción de sus constitu-

yentes. Cabe destacar también que los componentes de las mezclas tienen el mismo comportamiento cromatográfico en c.c.d. (Thomson, 1971).

Las alquilhidroxibenzoquinonas reaccionan con múltiples reactivos, originando productos coloreados. La mayoría de estas reacciones están basadas en las propiedades redox de estas quinonas. Muchas de ellas se utilizan como métodos de identificación preliminar y otras constituyen la base de algunos de los agentes cromogénicos empleados para la visualización de este tipo de compuestos. Algunas de estas reacciones se indican en la Tabla 2.

Tabla 2

Reacciones coloridas observadas para las alquilhidroxibenzoquinonas.

REACTIVO	COLORACION OBSERVADA	REFERENCIA
-Cianoacetato de etilo y amoníaco	azul-violeta	Legradi, 1970
-Solución etanólica al 2% de p-nitrofenilacetoni-trilo y NaOH 0.1N	azul-violeta	Legradi, 1970
-Leuco azul de metileno	azul	Linn, <u>et. al.</u> , 1959
-Nitrato de circonio en solución ácida	rojo-violeta	Feigl, 1966
-NaOH concentrado	rojo-púrpura	Robinson, 1983
-Acido sulfúrico concentrado	rojo-púrpura	Robinson, 1983

Los colores característicos de las hidroxibenzoquinonas en soluciones alcalinas varían según la posición de los grupos hidroxilo en la molécula. Así por ejemplo, en el caso de las 2-hidroxibenzoquinonas se observa una coloración roja, con las 2,3-dihidroxibenzoquinonas una coloración púrpura-azulada, y con las 2,5-dihidroxibenzoquinonas un color rojo-azulado (Thomson, 1971).

El espectro de U.V. de la benzoquinona se caracteriza por una absorción intensa cerca de 240 nm (E_{max} 26,000), una banda media, cerca de 285 nm (E_{max} ~ 300) y varias absorciones débiles en la región visible (Figura 2) (Tabla 3). La introducción de sustituyentes produce modificaciones características en las absorciones a 240 y 285 nm. En la Tabla 3 se resumen los máximos de absorción al U.V. para una serie de benzoquinonas con diferentes sustituyentes y patrones de sustitución (Morton, 1965).

El espectro de I.R. de las benzoquinonas presenta absorciones intensas alrededor de 1669 cm^{-1} y entre $1620\text{-}1590\text{ cm}^{-1}$, atribuibles a los carbonilos de la dicetona conjugada y a las vibraciones C=C, respectivamente. En el caso de las 2,5 y 2,6-dihidroxiquinonas, en las cuales el carbonilo se encuentra quelatado con grupos hidroxilo-

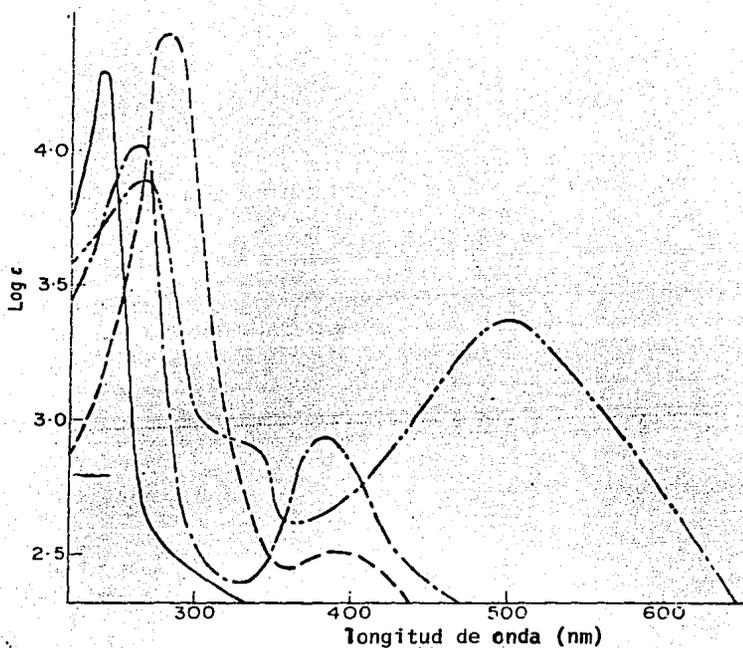


Figura 2. Espectro de absorción electrónica (en EtOH) de 1,4-benzoquinona (-); 2,5-(dihidroxi-1,4-benzoquinona (----); 2-hidroxi-5-metil-1,4-benzoquinona (·-·-·-·); 2-hidroxi-5metil-1,4-benzoquinona (EtOH/HO) (·-·-·-·).

Tabla 3. Absorción en el ultravioleta-visible de 1,4-benzoquinonas.

Quinona	$\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ nm (log ϵ)		
base	246(4.42)	288(2.50)	439(1.35)
	242(4.26)	285(sh)(2.6)	434(1.26)
2-Metil	249(4.33)	315(2.80)	436(1.38)
2-Etil	248(4.30)	318(2.95)	437(1.53)
2,3-Dimetil	250(4.26)	337(3.05)	425(1.55)
2,5-Dimetil	254(4.37)	316(2.42)	430(1.43)
2,6-Dimetil	255(4.29)	319(2.54)	429(1.45)
Tetrametil	262(4.30)	342(2.34)	430(1.5)
Metoxi	254(4.26)	357(3.21)	
2,3-dimetoxi-	254(4.17)	398(3.17)	
2,5-dimetoxi-	278(4.37)	370(2.48)	
2,6-dimetoxi	287(4.38)	377(2.78)	
Hidroxi	256(4.14)	369(3.07)	
2,5-dihidroxi	279(4.35)	393(2.43)	
	286(sh)(4.34)		
2 - hidroxi-3-metil	255(4.17)	396(3.10)	
2 - metoxi-3-metil	254(4.12)	374(3.73)	
2 - hidroxi-6-metil	268(4.21)	380(2.87)	
2 - hidroxi,3,5,6-trimetil	272(4.29)	409(2.65)	
3,6-dihidroxitimoquinona	293(4.31)	435(2.36)	

lo, la banda a 1669 cm^{-1} se encuentra desplazada a 1646 y 1660 cm^{-1} respectivamente (Brown, 1962). Por otra parte las alquilhidroxibenzoquinonas que poseen uno de los protones anulares aislados, usualmente presentan una absorción intensa o media entre 910 y 880 cm^{-1} , en tanto que si hay dos protones anulares en carbonos adyacentes, se observa una absorción fuerte entre 840 y 805 cm^{-1} . Finalmente en relación a las características de los espectros de I.R. de las alquilhidroxibenzoquinonas, es de hacer notar que el patrón de las absorciones observadas entre $900-1000\text{ cm}^{-1}$ ha sido de utilidad en algunos casos, para determinar si estos compuestos se encuentran en forma pura o en mezclas (Yates, et. al., 1959).

Los espectros de RMN^1H de alquilbenzoquinonas hidroxiladas presentan las señales características para los protones del sistema insaturado entre $\delta 6.40$ y $\delta 6.50$. Además se observan las señales características para los protones de la cadena alquímica lateral. (Norris, 1966).

En general en el espectro de masas de las benzoquinonas aparecen picos correspondientes a la pérdida de una o dos moléculas de monóxido de carbono (Proceso A), la pérdida de una molécula de

acetileno o su derivado más sustituido (Proceso B) y a la ruptura de la molécula en dos partes iguales (Proceso C) (Budzikiewiez, *et. al.*, 1967). Los procesos antes mencionados se ilustran en la Figura 3.

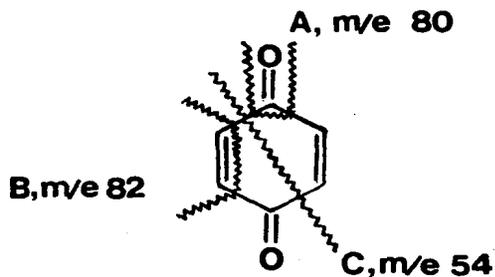


Figura 3. Fragmentación del compuesto base de benzoquinonas.

En el caso particular de las hidroxibenzoquinonas las fragmentaciones básicas se ven modificadas como se ilustra en la Figura 4 (Bowie, *et. al.*, 1966).

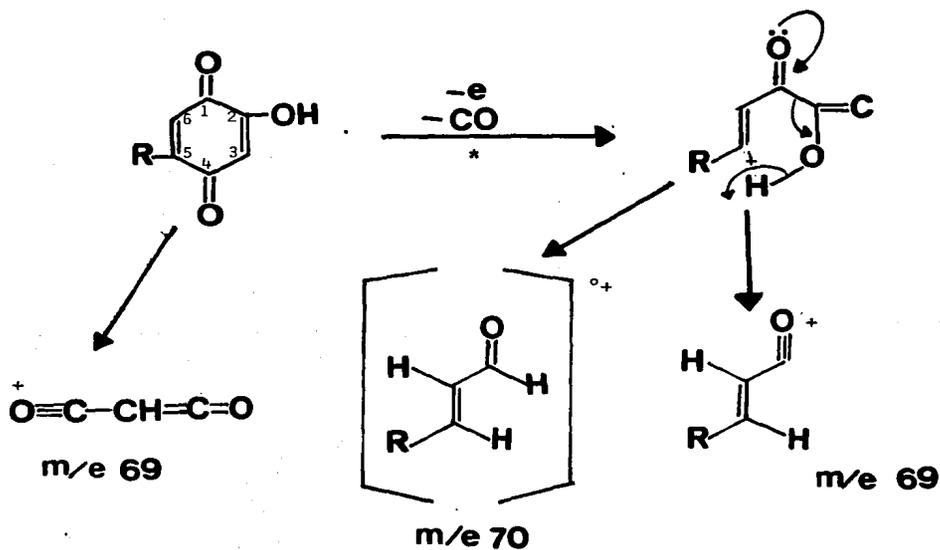


Figura 4. Fragmentación básica de las hidroxibenzoquinonas.

Muchas hidroxibenzoquinonas son de importancia farmacológica y biológica, y quizás de estos compuestos el más investigado ha sido la embelina 1. Esta quinona es el principio activo de muchas plantas usadas en medicina popular y el ejemplo más importante lo constituye la Embelina ribes Burm, de amplio uso en la India por sus propiedades antihelmínticas. Por mucho tiempo la embelina se utilizó oficialmente como agente terapéutico para el tratamiento de las parasitosis por Taenia solium (Thomson, 1971). Más recientemente se ha comprobado que la embelina posee además otras propiedades farmacológicas y biológicas, destacándose sus efectos anticonceptivos (Prakasch, 1980; Prakash, 1981; Krishnaswamy, 1980; Bhargava, 1984; Bhargava, 1985), analgésicos (Atal, 1984), antialimentarios (Charder, 1985), fungicidas (Rao, 1984) e inhibitorios del crecimiento vegetal (Sinha, et. al., 1981).

En relación a sus propiedades anticonceptivas, varias investigaciones han permitido establecer que la administración oral de embelina, inhibe eficientemente el proceso de implantación (Bhargava, 1984; Bhargava, 1985; Prakash, 1980; Prakash, 1981). Así mismo, reduce considerablemente la cantidad y la motilidad de los espermatozoides, así como el peso de los testículos en ratas (Seth, 1982). Con respecto a sus efectos analgésicos, su acción es comparable a la morfina, en cuanto a eficacia se refiere, y carece de los efectos narcóticos de aquella (Atal, 1984).

1. OBJETIVO GENERAL.

1.1 Realizar el estudio microbiológico y fitoquímico preliminar de la Rapanea guianensis considerando:

- a) El amplio uso como antiséptico y la resistencia al ataque por insectos y microorganismos que ofrecen las viviendas construidas de la madera de esta planta.
- b) Que muchas especies relacionadas contienen metabolitos secundarios de importancia biológica.

2. OBJETIVOS PARTICULARES.

2.1 Realizar un estudio bibliográfico, recopilando la información botánica, etnobotánica, química y farmacológica de la especie vegetal objeto de estudio.

2.2 Preparar los extractos vegetales de éter de petróleo y EtOH, mediante métodos convencionales, llevando a cabo las operaciones preliminares propias a la preparación de los mismos.

2.3 Fraccionar los extractos mediante métodos adecuados.

2.4 Aislar y purificar al menos un componente de alguna de las fracciones.

2.5 Identificar y caracterizar por métodos químicos y espectroscópicos las sustancias aisladas.

2.6 Diseñar y efectuar el estudio microbiológico del extracto de éter de petróleo, así como de los componentes aislados de él, para corroborar la actividad biológica que se le atribuye a esta planta.

2.7 Determinar la concentración crítica de los compuestos utilizando el método del penicilindro.

Parte Experimental

1. ESTUDIO FITOQUIMICO.

1.1 Materiales y Métodos.

1.1.1 Material Vegetal.

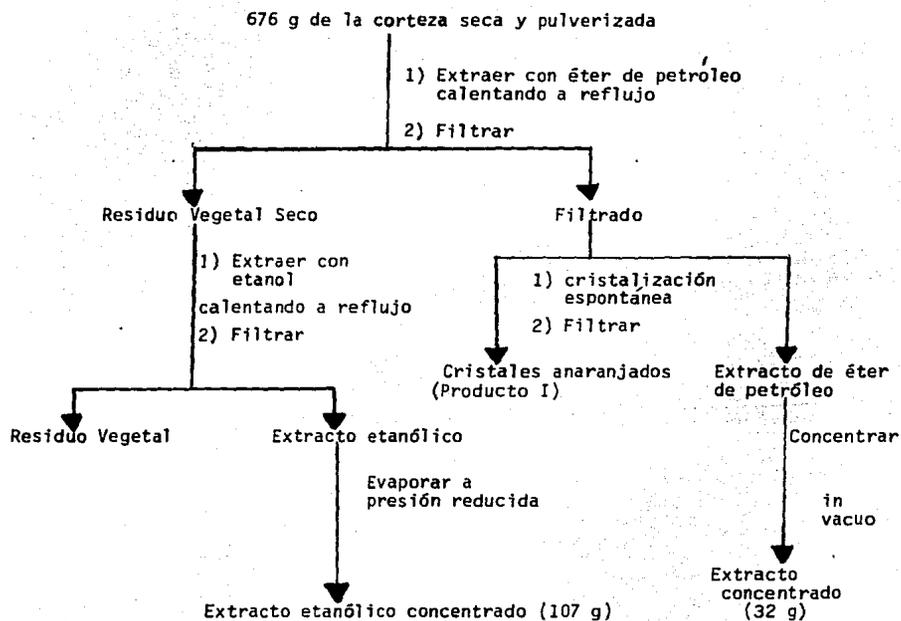
El material vegetal se colectó el 13 de agosto de 1985, en la vereda Bóchica alta, municipio de Fusagasuga, Departamento de Cundinamarca Colombia. La planta fué clasificada en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia y un ejemplar reposa en el Herbario Colombiano con el voucher No. 31785 COL.

1.1.2 Método de extracción.

676 g de la corteza seca y finamente pulverizada se extrajeron según el procedimiento indicado en el Esquema 1, primero con éter de petróleo hirviendo a reflujo y posteriormente con etanol, calentando también a reflujo.

1.1.3 Aislamiento y purificación del producto I (mezcla de quinonas: embelina, 1, rapanona, 2, y 2,5-dihidroxido-3-pentadecil-1,4-benzoquinona, 6).

Del filtrado de éter de petróleo, se obtuvo el producto I, como unos cristales en forma de agujas de color anaranjado. Este compuesto presentó un punto de fusión de 130-132 y del cuál se obtuvieron 2.8221 g (Esquema 1).



Esquema 1. Extracción de la corteza de Rapanea guianensis con éter de petróleo y etanol.

Del extracto etanólico se tomaron 41 g para efectuar una partición, agua-acetato de etilo, agua-cloroformo y agua-benceno. Los sistemas de disolventes para la extracción fueron seleccionados de acuerdo a la literatura (Domínguez, 1973) (Ogawa, 1968). Del proceso de partición con acetato de etilo indicado en el Esquema 2, se obtuvo un residuo al evaporar el disolvente, mientras que con los otros dos disolventes fué poco significativo el residuo.

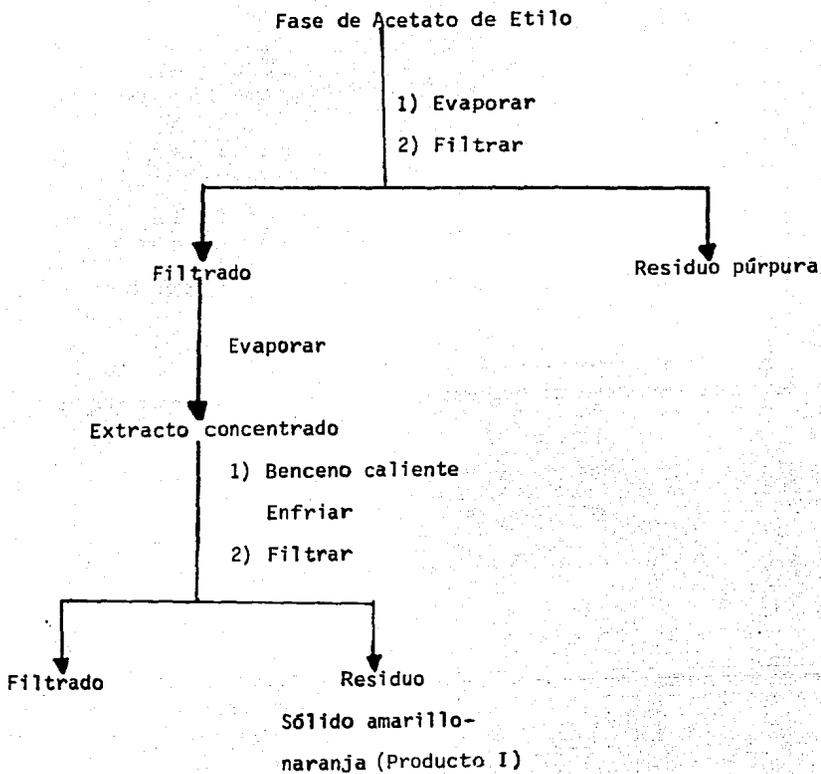
El filtrado de acetato de etilo obtenido, se evaporó a sequedad, separándose un residuo de color naranja-café, al cuál se le adicionó benceno caliente, como se señala en el Esquema 2. De la solución bencénica, al enfriar, precipitó un sólido amarillo-naranja que fundió a 130-132°C y del cuál se obtuvieron 0.3 g, adicionales del producto I. El rendimiento total fué 0.53% en base seca.

1.1.4 Análisis Cromatográficos.

Para realizar los análisis cromatográficos en capa fina se utilizaron diversos eluyentes (AcOEt-MeOH 7:3, AcOEt-EtOH 1:1, AcOEt-MeOH-H₂O 77:13:10, AcOEt-EtOH-H₂O 50:30:20, CHCl₃-Ac. acético 9:1, Benceno-CHCl₃-AcOEt-Ac. acético 5:5:3:1, Benceno-AcOEt 9:1, Benceno), sulfato cérico amónico como agente cromogénico y placas de vidrio cubiertas de gel de sílice impregnadas o no con ácido oxálico.

1.1.5 Caracterización del producto I.

a) Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.



Esquema 2. Obtención del Producto I del extracto etanólico.

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fischer-Jhones y no están corregidos. Los espectros de I.R. fueron registrados en un instrumento Nicolet FT-IR5X de un solo haz, en pastillas de KBr o en solución de cloroformo por el señor Alejandro Correa de la Compañía Negromex, S.A. Los espectros de RMN^1H se determinaron en un espectrómetro FT-80 Varian utilizando como disolvente CDCl_3 y/o DMSO-d_6 y como referencia interna TMS. Los espectros U.V. se obtuvieron en un espectrómetro de doble Hz Hitachi 220S.

La cromatografía de gases se realizó en un instrumento C.G./R.M. Hewlett Packard Mod. 5890. Condiciones: columna Metil Silicón (Quim. Unida). 0.53 mm \varnothing I 5 μ . 20 mt C. Relación spht 80:1. Temp. 150°C a 275°C con 10°C/min. TLwi=2 min. Gas helio.

Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi Perkin Elmer RMU60 en el Instituto de Química de la U.N.A.M.

b) Preparación de derivados.

b.1) Obtención de los derivados metilados, 2a, 1a, y 6a (Producto II).

A 45 mg del Producto I en 10 ml de éter etílico, se adicionó un exceso de solución etérea de diazometano. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 18 hr. Al cabo del tiempo señalado se obtuvieron 40 mg de un compuesto de color amarillo claro, (Producto II) en forma de agujas finas idénticas en todos sus aspectos, que funde entre 43-46°C.

b.2) Obtención de los derivados acetilados, 1b, 2b, 6b (Producto III),

Método. A 100 mg de Producto I se agregaron 2 ml de anhídrido acético y dos gotas de H_2SO_4 concentrado. La solución se hirvió a reflujo durante algunos minutos. El derivado acetilado fué separado con agua de hielo y extraído con éter etílico obteniéndose 30 mg de polvo amarillo (Producto III) y fundió a 48-50°C.

b.3) Formación del derivado dimérico, 2c.

Se tomaron 100 mg del producto I y se disolvieron en 3 ml de ácido acético caliente. A la solución anterior se le adicionaron 0.6 ml de formaldehído (Rao, 1962). Formándose de inmediato 31 mg de un sólido de color amarillo-naranja, 2c, que fué recristalizado de dioxano. El producto obtenido se descompone a 220°C.

b.4) Oxidación del Producto I con H_2O_2 en medio alcalino.

A una solución de Producto I (50 mg) en KOH 1N, se adicionaron 4 ml de H_2O_2 bajo calentamiento suave en baño maría. Después de 3 horas, la mezcla de reacción fué acidificada y extraída con éter. La fase etérea se secó sobre Na_2SO_4 anh. Al evaporar el disolvente se obtuvo un producto semisólido, que fué metilado con CH_2N_2 . (Producto IV: 2d, 1c, 6c).

2. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Paralelamente al estudio fitoquímico, se diseñó y efectuó una prueba biológica al extracto de éter de petróleo y al Producto I para constatar si las propiedades antibióticas y desinfectantes que se le atribuyen a esta planta (Pérez Arbelaez, 1975) tienen un fundamento científico. Para tal efecto se realizó un estudio microbiológico que incluyó utilizar como microorganismos de prueba un grupo de bacterias Gram (+) y un grupo de bacterias Gram (-), una levadura y un Bacilo ácido-Resistente, presentados en las listas siguientes:

Bacterias Gram (-)

Proteus vulgaris

Klebsiella pneumoniae

Bordetella bronchiseptica

Escherichia coli (ATCC-10536)

Salmonella typhi

Pseudomonas aeruginosa (ATCC-15442)

Serratia marcescens

Bacterias Gram (+)

Streptococcus fecalis

Streptococcus pneumoniae

Staphylococcus epidermidis

Staphylococcus aureus (ATCC-6538)

Bacillus cereus

Bacillus anthracis

Levadura: *Candida albicans* (ATCC-10231); Bacilo ácido resistente:

Micobacteria typhi.

2.1 Ensayo Microbiológico para el extracto de petróleo y Producto I.

Todos los microorganismos de prueba fueron sembrados en tubos inclinados con AST como medio de cultivo y mantenidos durante 48 h. Posteriormente se procedió a hacer una resiembra en caldo nutritivo.

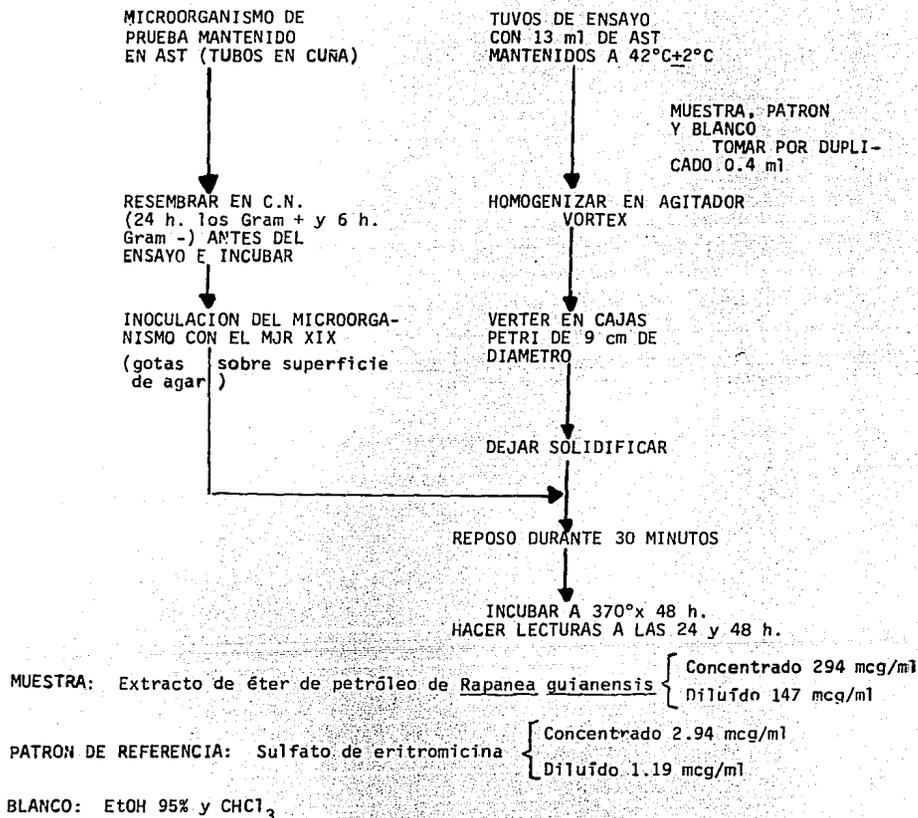
La incubación se realizó a 37°C durante 6 h. para las bacterias Gram (-) y 24 h. para bacterias Gram (+). Esto se efectuó con el propósito de obtener un cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento, el cual sería usado en la inoculación con gotas sobre superficie de agar estandarizado MJR XIX (Sanabria, 1985).

Por otro lado, a diferentes tubos de ensayo que contenían 13 ml de AST licuados y mantenidos a $42^{\circ} \pm 2^{\circ}C$, se les adicionaron 0-4 ml de las muestras, del patrón y del blanco respectivamente. Este proceso se realizó por duplicado. Mediante agitación con vortex estas mezclas fueron homogenizadas e inmediatamente vertidas en cajas petri de 9 cm de diámetro, dejando solidificar el medio. A este AST adicionado y solidificado se le procedió a inocularse el microorganismo por el método de inoculación con gotas sobre la superficie de agar estandarizado, referido con anterioridad.

El medio inoculado se dejó reposar por 30 minutos y enseguida fue sometido a incubación a una temperatura de 37° realizando lecturas a las 24 y 48 hr.

El proceso del ensayo microbiológico se presenta en el Esquema 3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Una vez aislado el Producto I presente en el extracto de éter de petróleo se procedió a realizar las mismas evaluaciones microbiológicas que para el extracto, la única variante fue realizar concentraciones de 15 mcg/ml y 7 mcg/ml del Producto I.



Esquema 3. Ensayo microbiológico para bacterias y levaduras.

2.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Colateralmente se efectuó la determinación de la concentración mínima inhibitoria siguiendo la misma técnica, pero adicionando 0.4, 0.3, 0.2 y 0.1 ml de muestra del extracto diluido y del Producto I.

2.1.3 Evaluación de la actividad antibiótica del extracto de éter de petróleo y Producto I.

También se llevó a cabo la evaluación de la actividad antibiótica del extracto de éter de petróleo por el método de pinicilindro en cajas de agar de acuerdo a la técnica convencional (Clark, et. al., 1981). En este caso se utilizaron como microorganismos de prueba Candida albicans y Aspergillus niger. Las concentraciones utilizadas del extracto de éter de petróleo son las siguientes: A = 9.85 mg/ml, B = 0.985 mg/ml y C = 0.0985 mg/ml y se utilizaron 0.2 ml de cada dilución. En todos los casos las pruebas se realizaron, por duplicado y como patrón se empleo sulfato de eritromicina (40 mcg/ml).

Asimismo se efectuó el análisis de pinicilindro para valorar la actividad antibiótica del Producto I usando los mismos organismos de prueba: Candida albicans y Aspergillus niger y las mismas concentraciones A = 9.85 mg/ml; B = 0.985 mg/ml y C = 0.0985 mg/ml.

2.1.4 Determinación de la concentración crítica para el Producto I.

Se determinó la concentración crítica (N) realizando ensayos del microorganismo frente a 3 concentraciones del Producto I A = 9980 mcg/ml, B = 998 mcg/ml y C = 99.8 mcg/ml bajo las mismas condiciones de densidad del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación. De acuerdo a lo establecido por Hufford para esta prueba (Hufford et. al., 1975).

Resultados y Discusión.

Identificación de rapanona y quinonas relacionadas.

Del extracto de éter de petróleo y del extracto etanólico de la corteza de Rapanea quianensis, se obtuvo una mezcla de sustancias de naturaleza quinoide (Producto I), cuyo componente principal fué identificado como rapanona, 2. La caracterización de los componentes se hizo en base a métodos químicos y espectroscópicos. Conjuntamente se realizó la evaluación microbiológica del extracto de éter de petróleo, y de los compuestos aislados, encontrándose que presentan una gran actividad antibiótica.

La mezcla (Producto I) constituida fundamentalmente por rapanona se obtuvo como agujas cristalinas de color amarillo-naranja con pf. 130-132°C, soluble en benceno, cloroformo y en solución de carbonato de sodio. El comportamiento cromatográfico de este producto se resume en la Tabla 4 y en todos los casos donde hubo corrimiento se observó como una mancha homogénea, indicando a priori la presencia de un solo compuesto.

Las constantes físicas y espectroscópicas del Producto I se encuentran en la Tabla 5.

Su espectro de I.R. (Espectro 1) mostró bandas de absorción para grupos hidroxilo (3309 cm^{-1}) carbonilo de dicetona conjugada (1614 cm^{-1}), metilos y metilenos ($2920, 2849$ y 1464 cm^{-1}).

Los máximos de absorción en el U.V. (Espectro 2), la coloración

Tabla 4. Comportamiento Cromatográfico del Producto I.

Sistema de eluyentes	Composición	Proporción	Soporte	Agente revelador	Rf	Comportamiento cromatográfico	Referencia
I	AcOEt-MeOH	7:3	Gel de sílice GF 254 de Merck	Sulfato cérico amónico	-	No hubo corrimiento	-
II	AcOEt-EtOH	1:1	"	"	-	"	-
III	AcOEt-MeOH-H ₂ O	77:13:10	"	"	-	"	Stahl Egon, 1969
IV	AcOEt-EtOH-H ₂ O	50:30:20	"	"	0.05	Mancha amarillo-naranja	-
V	CHCl ₃ -AC. ACETICO	9:1	"	"	0.05	"	-
VI	BENCENO-CHCl ₃ AcOEt-AC. ACETICO	5:5:3:1	"	"	0.88	"	Domínguez, 1973 Ogawa H, 1968
VII	BENCENO-AcOEt	9:1	"	"	0.8	"	"
VIII	BENCENO		"	"	0.75	"	"

observada al tratar el producto con alcali, la solubilidad en benceno, y la información del espectro de I.R., sugirieron que el Producto I era de naturaleza hidroxibenzoquinoides.

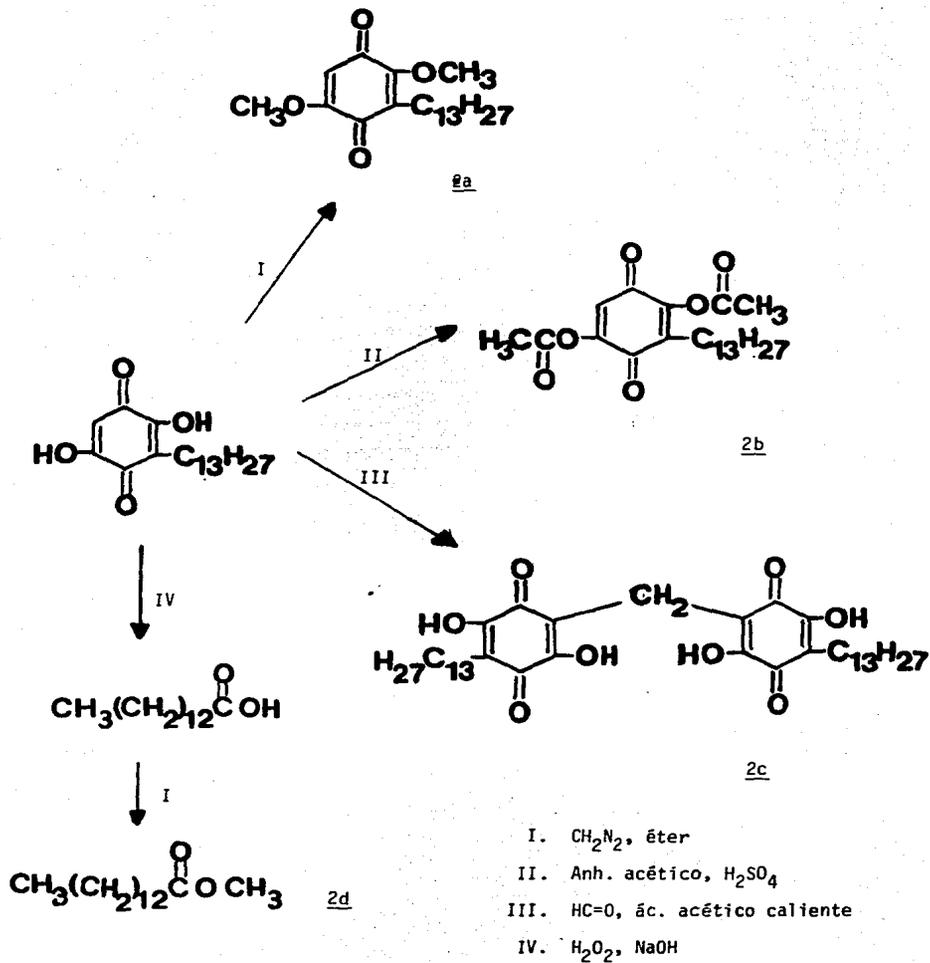
La obtención de los derivados diacetilado, III, y dimetilado, II, confirmaron que el Producto, I, era dihidroxilado, más específicamente 2,5-dihidroxilado, de acuerdo a los máximos de absorción observados en el U.V. (Espectro 2). Las constantes espectroscópicas de los derivados se resumen en la Tabla 6 y sus estructuras se señalan en las Figuras 5, 6 y 7.

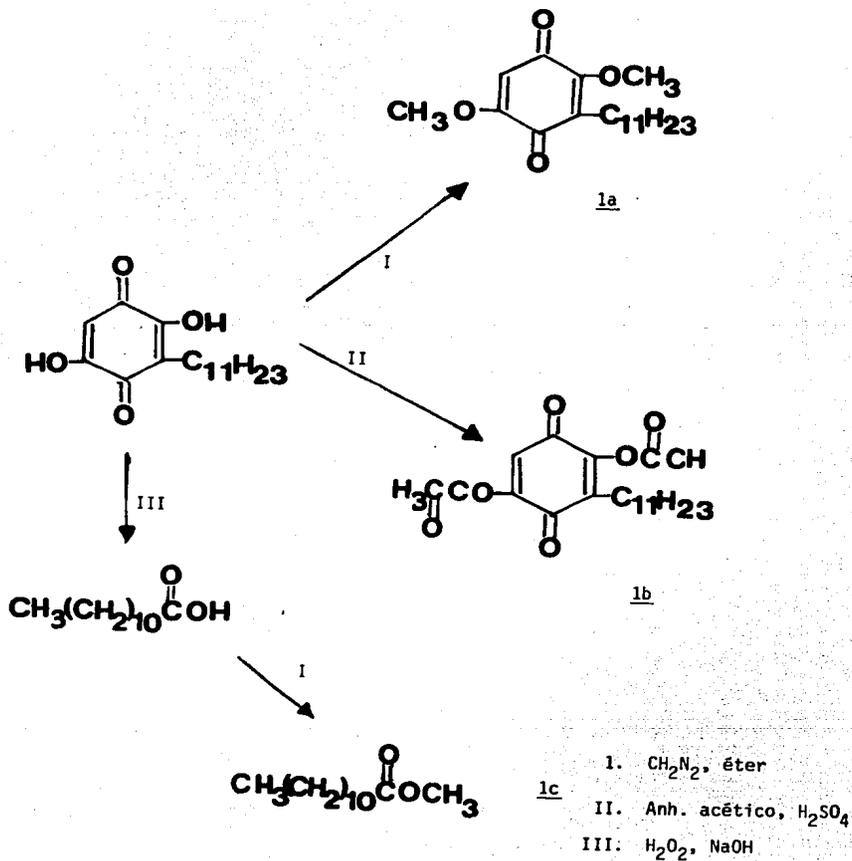
El espectro de RMN^1H (Espectro 3) sustentó aun más esta proposición, indicando además que el Producto, I, era una alquil 2,5-dihidroxibenzoquinona del tipo de embelina, ya que, presentó las siguientes características:

- 1) Un singulete a 11 ppm que integraba para dos protones atribuibles a dos grupos hidroxilos quelatados.
- 2) Una señal a 5.6 ppm asignable a un protón olefínico y que confirmaba que el anillo quinoides estaba trisustituido.
- 3) Un triplete a 2.3 ppm, correspondiente al metileno de la cadena alifática; unida a la estructura quinoides.
- 4) Un singulete muy intenso a 1.4 ppm que integraba aproximadamente para veintidos protones, correspondientes a los metilenos intermedios de la cadena alifática.
- 5) Finalmente, se observó un triplete a 0.8 ppm correspondiente al metilo terminal de la cadena lateral de una alquilhidroxibenzoquinona.

Tabla 6. Constantes físicas y espectroscópicas de los derivados del producto I (Productos II y III).

Derivado	pf	RMN ¹ H (80MHz CDCl ₃ , ppm)	Espectro
Metilado			
<u>2a, 1a, 6a</u> (Producto II)	43-46°C	5.65(s, 1H, H-6), 3.8(2S, 6H, CH ₃ -O), 2.3(t, 2H, -CH ₂ -), 1.20 (s, 22H, -CH ₂ -), 0.8 (t, 3H, -CH ₃)	5
Acetilado			
<u>2b, 1b, 6b</u> (Producto III)	48-50°C	6.4(s, 1H, H-6), 2.3(t, 2H, -CH ₂ -), 2.3 (s, 6H, $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{C}-\text{O} \end{matrix}$), 1.25(s, -22H, -CH ₂ -), 0.8 (t, 3H, -CH ₃)	6

Figura 5. Derivados de rapanona, 2.

Figura 6. Derivados de embelina, 1.

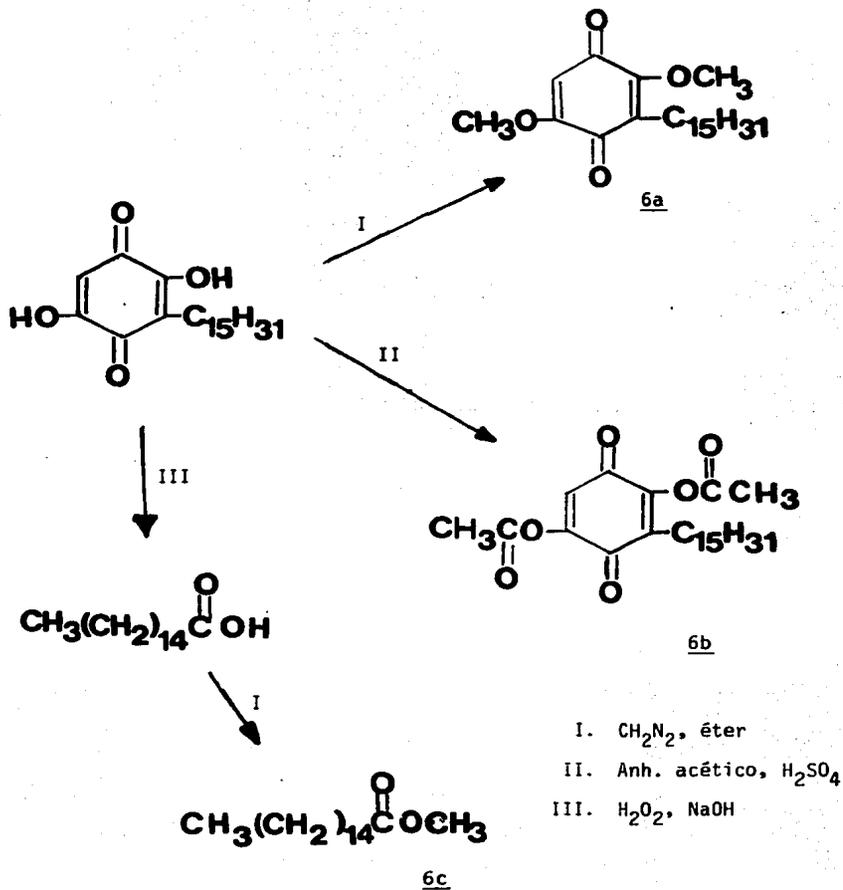


Figura 7. Derivados de 2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona, 6.

El espectro de masas (Espectro 4), mostró un intenso ión molecular a m/z 322, pero también se observaron iones moleculares, aunque considerablemente muchos menos intensos, a m/z 294 y m/z 350. Estos iones se correspondían perfectamente con las fórmulas moleculares $C_{19}H_{30}O_4$, $C_{17}H_{26}O_4$ y $C_{21}H_{34}O_4$ respectivamente. También se observaron iones a m/z 168, 155, 154, 142, 71 y 69. Esta información permitió concluir entonces que el Producto I estaba constituido por una mezcla de 3 quinonas.

El fragmento a m/z 154 y que corresponde a la ruptura β de la cadena alifática permitió establecer que los largos de la cadena de los 3 constituyentes eran C_{13} , C_{11} y C_{15} .

Los otros iones mencionados eran característicos de una alquil hidroxibenzoquinona y, el patrón de fragmentación se ilustra en la Figura 8.

Las longitudes de las cadenas laterales fueron confirmadas mediante la obtención de los ésteres metílicos de los ácidos correspondientes, luego de una oxidación del Producto I con H_2O_2 en medio alcalino y posterior metilación con diazometano de los ácidos resultantes. Los ésteres metílicos 1c, 2d, 6c, fueron separados mediante cromatografía de gases y caracterizados por espectrometría de masas. El cromatograma de la mezcla de los ésteres se ilustra en la Figura 9. Como se puede observar el principal componente de la mezcla es el compuesto que presenta un tiempo de retención de 8.371 min. y que corresponde al éster metílico del ácido mirfístico

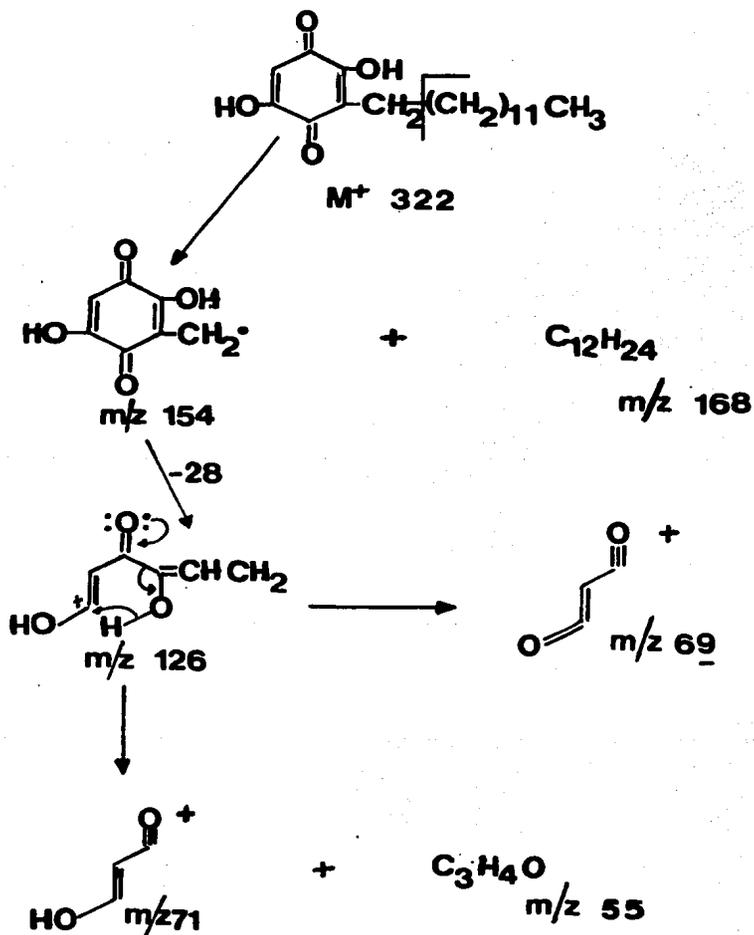


Figura 8. Fragmentación básica de rapanona.

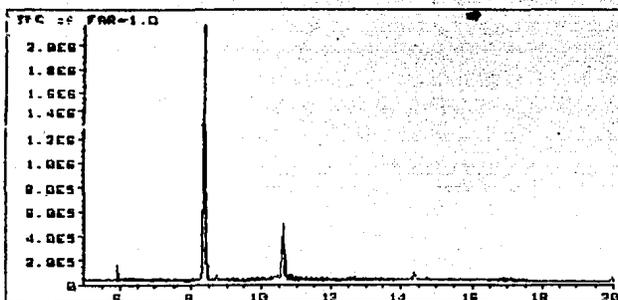


Figura 9. Cromatograma de gases de los ésteres metílicos, 2d, 1c y 6c, obtenidos de la oxidación y metilación del Producto I.

$(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_3)$. Por lo tanto la quinona que se encuentra casi exclusivamente en el Producto I es la rapanona. Los otros dos ésteres metílicos detectados fueron los de los ácidos laúrico.

$(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_3)$ (tr=5.939) y palmítico $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_3)$ (tr=10.612). La presencia de estos dos últimos en la mezcla de ésteres es congruente con la existencia, también, de la embelina y la 2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona, en el Producto I. (Espectros de masas 8, 9 y 10).

Consistente con los resultados del análisis por CG-EM de la mezcla de los ésteres metílicos de los ácidos (según los cuales la rapanona era la quinona mayoritaria), fué el patrón de absorción observado en el I.R. de la zona comprendida entre 998 y 927 cm^{-1} . En la Figura 10 se ilustra el patrón de absorción característico para la rapanona, embelina y mezclas de ambas (Ogawa, 1968), así como también del Producto I. Como se puede observar el de este último es muy similar al que se observa cuando la rapanona se obtiene como un producto puro.

Una evidencia adicional acerca de la naturaleza alquilhidroxibenzoquinoides del Producto I lo constituye el hecho de que el tratar con formaldehído y ácido acético caliente, se obtuvo un producto de naturaleza dirética, (ver Figura 5) (Rao, 1962), cuyo espectro de RMN¹H (Espectro 7) presentó las siguientes características.

- 1) Un singulete a 8.1 ppm que integraba para cuatro protones correspondientes a los cuatro grupos hidroxilo en la molécula.
- 2) Un singulete a 4.2 ppm que integraba para dos protones, atribuibles a un metileno unido a dos unidades quinoides.

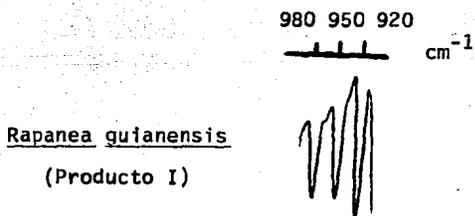
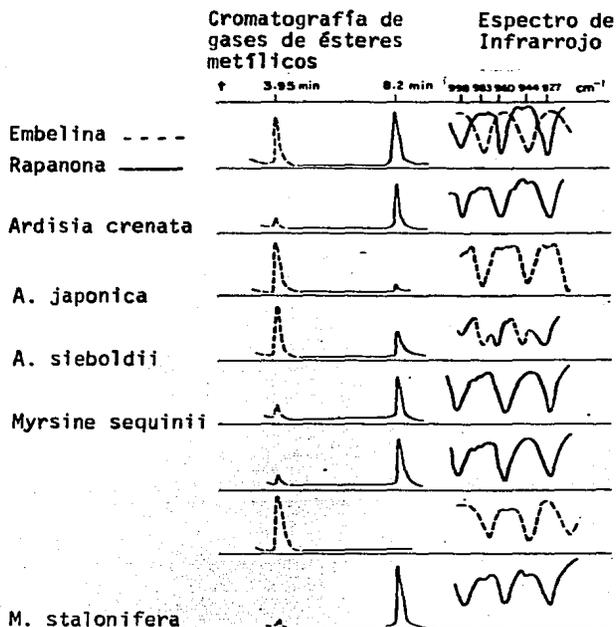


Figura 10. Patrón de absorción en el I.R. en la zona comprendida entre 998 y 927 cm^{-1} para la embelina, la rapanona, mezcla de ambas y para el Producto I.

- 3) Un triplete a 2.6 ppm que integraba para cuatro protones, asignable a dos metilos α a la estructura benzoquinoides.
- 4) Un singlete muy intenso que integraba para 44 protones a 1.4 ppm que corresponde a 22 metilenos de la cadena alifática.
- 5) Finalmente a 0.8 ppm un triplete para seis protones, correspondientes a dos metilos terminales de una cadena lateral alifática.

Muy posiblemente este derivado corresponde fundamentalmente al dímero de la rapanona. Al igual que las especies relacionadas, el estudio químico de esta planta permitió el aislamiento y caracterización de una mezcla de quinonas, constituido principalmente por rapanona. Como ya se mencionó en la Introducción, generalmente, la rapanona y sus congéneres se encuentran en sus fuentes naturales bajo la forma de mezclas y la abundancia relativa de los constituyentes de las mismas, varía de una especie a otra. Sin embargo, en el caso de esta planta, la rapanona, se obtuvo como la quinona mayoritaria.

En cuanto al ensayo microbiológico del extracto de éter de petróleo y del Producto I se pudo observar en la Tabla 7 que el extracto de éter de petróleo resultó activo, a las 24 y 48 h, a concentraciones de 294 mcg/ml contra todos los microorganismos empleados para el ensayo. Cabe señalar el hecho de que la única excepción fue E. coli, donde a las 24 h, hubo una reducción del crecimiento, sin embargo a las 48 h., el crecimiento fue normal.

Cuando se utilizó el extracto diluido (147 mcg/ml) a las 24 y 48 horas presentaron crecimiento. K. pneumoniae, E. coli, P. aeru-

Tabla 7. Resultados obtenidos del ensayo microbiológico realizado para el extracto de éter de petróleo.

MUESTRA	Gram (-)											Gram (+)				
	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sarcina lutea</i>	<i>Streptococcus fecalis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Candida albicans</i> ; levadura	<i>Brucella</i> sp	<i>Microbacteria typhi</i> Ac. resistente
ST BLANCO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
EtOH 95%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CHCl ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Eritromicina	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
CONC*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
**	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DILUIDO*	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
**	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CONVENCIONES

* lectura a las 24 h.
** lectura a las 48 h.

+ inhibición total del crecimiento
+ reducción del crecimiento
- crecimiento

gínosa y S. marcescens. Todas ellas microorganismos Gram (-). La inhibición total del crecimiento se presentó en todos los microorganismos Gram (+), la levadura y los bacilos ácido resistentes, lo cual indica que este extracto es especialmente activo contra este tipo de microorganismos.

Al efectuar el ensayo con el Producto I se utilizaron concentraciones de 15 mcg/ml y 7 mcg/ml, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8 y como se puede observar son coherentes con los obtenidos para el extracto total, la única diferencia es la concentración utilizada del producto aislado.

Con el objeto de corroborar estos resultados se efectuó el ensayo microbiológico utilizando el método de penicilindro.

Del extracto de éter de petróleo se emplearon concentraciones que oscilaban entre 9.85 mg/ml y 0.0985 mg/ml. Se usaron como microorganismos de prueba. C. albicans y A. niger. El halo de inhibición que se obtuvo es sensiblemente igual al conseguido por el sulfato de eritromicina y una concentración de 40 mcg/ml (Tabla 9). Para el caso del producto I se efectuó la prueba a concentraciones de 15 y 7 mcg/ml encontrando una inhibición de crecimiento muy significativa (Tabla 10).

Para encontrar la concentración mínima inhibitoria del Producto I se empleó el método de penicilindro, realizando con sulfato de eritromicina (40 mcg/ml) como patrón positivo y 3 concentraciones diferentes del Producto I A = 9980 mcg/ml, B = 998 mcg/ml y C = 99.8 mcg/ml).

Se efectuaron siete lecturas para cada concentración y la media aritmética de los siete valores encontrados para cada una de ellas, se utilizó para elaborar la gráfica $\ln C$ vs χ^2 (donde χ^2 = cuadrado de la distancia entre el depósito y el borde y $\ln C$ = logaritmo de la concentración aplicada). En la Tabla 11 se indican los valores graficados.

Al graficar los datos obtenidos (Figura 11) se puede observar que la correlación que se obtiene es aceptable (0.9797) con una pendiente $m = 0.2455$ y un intercepto de 1.9489, lo cual corresponde a una concentración crítica de 7.0213 mcg/ml.

Tabla 9. Actividad antimicrobiana del extracto de éter de petróleo de Rapanea guianensis por el método de penicilindro.

Compuesto	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
	<u>Candida albicans</u>	<u>Aspergillus niger</u>
Sulfato de eritromicina (40 mcg/ml)	7	9
Extracto de éter de petróleo		
A = 9.85 mg/ml	6	8
B = 0.985 mg/ml	4	5
C = 0.0985 mg/ml	3	4

Tabla 10. Actividad antimicrobiana del producto I (Método del penicilindro).

Compuesto	Diámetro del halo de inhibición (mm)	
	<u>Candida albicans</u>	<u>Aspergillus niger</u>
Sultado de eritromicina (40 mcg/ml)	8	9
Producto I		
A = 15 mcg/ml	7	6
B = 7 mcg/ml	5	4

Tabla 11. Valores del halo de inhibición graficados para obtener la concentración mínima inhibitoria.

χ^2	Concentracion (C) mcg/ml	$\ln C$
A = 30.25	9980	9.208
B = 18.06	998	6.706
C = 12.25	99.8	4.603

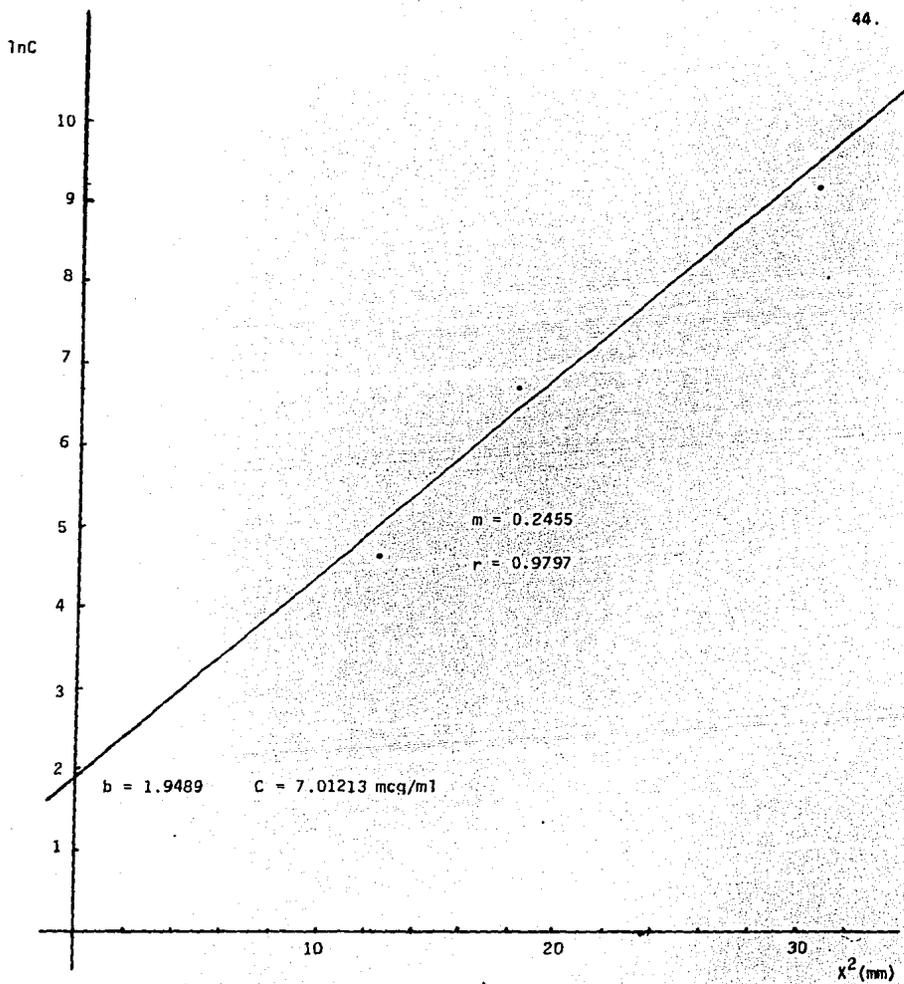


Figura 11. Concentración mínima efectiva del Producto 1.

Por lo que se refiere a la concentración crítica (N) ,este ensayo se efectuó para el Producto I utilizando como microorganismos de prueba Candida albicans y Aspergillus niger probando inicialmente a concentraciones de 100 mg/ml y procediendo a realizar diluciones, hasta obtener la concentración crítica en la cual se inhibía el crecimiento después de 24 y 48 horas de incubación. En este caso también se utilizó sulfato de eritromicina como patrón positivo. Los resultados obtenidos por duplicado para el Producto I se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración crítica (N) para el Producto I

<u>Candida albicans</u>			<u>Aspergillus niger</u>		
A	B	C	A	B	C
10N	5N	4N	7.5N	3N	-
11N	5N	4N	7N	2N	-

A = 9.85 mg/ml; B = 980 mcg/ml; C = 98 mcg/ml

De los resultados obtenidos para la concentración crítica se puede concluir que el Producto I tiene una buena actividad y hasta la última dilución que se hizo (98 mcg/ml) mostraba inhibición del crecimiento bacteriano. Es de hacer notar que la concentración usada

es importante, ya que la mayoría de los antibióticos clínicamente úti les son activos en los ensayos de resistencia en un nivel de por lo menos 10 mcg/ml. Asimismo una sustancia pura que no sea activa de menos a una concentración de 100 mcg/ml no parece ser un serio candidato para estudios clínicos, a menos de que presente actividad frente a microorganismos muy resistentes o que presente una toxicidad muy baja al compararlo con otros antibióticos.

Es muy importante la acción sobre bacilos esporulados, porque sus esporas son formas de resistencia por tanto son más difíciles de exterminar.

Conclusiones

1. El estudio fitoquímico del extracto de éter de petróleo de la Rapanea guianensis puso de manifiesto la presencia de una mezcla de compuestos de tipo alquilhidroxibenzoquinoides. El componente mayoritario de la mezcla es la 2,5-dihidroxi-3-tridecil-1,4-benzoquinona (rapanona) acompañada de pequeñas cantidades de la 2,5-dihidroxi-3-undecil-1,4-benzoquinona (embelina) y la 2,5-dihidroxi-3-pentadecil-1,4-benzoquinona.

2. En el ensayo microbiológico se pudo evaluar la actividad bactericida del extracto de éter de petróleo de R. guianensis que resultó sumamente activo contra bacterias del tipo Gram (-) así como contra hongos y levaduras.

Cuando se probó la mezcla de quinonas se pudo constatar esta actividad a concentraciones inferiores por tratarse de un producto aislado y cristalizado.

La concentración mínima inhibitoria para este producto fue de 7.0213 mcg/ml lo que lo hace susceptible de ser considerado como un buen agente bactericida. La presencia de este producto es tan alto rendimiento en la madera permitiría explicar, en cierta forma, las actividades que se le atribuyen a la planta en medicina tradicional.

Recomendaciones.

1. Continuar con el estudio del extracto metanólico para tratar de aislar los compuestos presentes en esas fracciones tan polares.
2. Con el objetivo de complementar los datos obtenidos del análisis microbiológico, sería conveniente efectuar las pruebas de toxicidad conducentes al producto obtenido.
3. La realización de pruebas farmacológicas de la rapanona que permitiesen poner de manifiesto su actividad anticonceptiva, informada ya en la literatura para la embelina.
4. Estudiar especies mexicanas similares.

Bibliografía ,

- Atal, C.K., Siddiqui, M.A., Zutsh, Ushai; Amla, V., Johri, R.K., Rao, P.G., Kours (1984). J. Ethnopharmacol; 11 (3); 309-17.
- Asano, M.K., Yamaguti (1940), J. Pharm. Soc. Japan; 60; 105. (En C.A. 34, 5069⁷ y 6591² 1940).
- Asano, M.K., Yamaguti (1940), J. Pharm. Soc. Japan; 60; 585. (En C.A. 34, 5069⁷ y 6591² 1940)
- Baver, L.; Brasile Silva, G.A., Assis, Ruecker G., (1973), Phytochemistry; 12 (5); 1192.
- Blatt, A.H. (1943), Organic Synthesis; 34; Edit. John Wiley and Sons London.
- Backer, H. Ziffer y Carney E. (1963). Spectrochim. Acta; 19; 1871.
- Beynon, J.H. and Williams, A.E. (1960), Appl. Spectroscopy 14, 156.
- Bhargava, S.K. y Dixit, V.P., (1985), Plant Med. Phytother.; 19 (1); 29.
- Bhargava, S.K., Dixit, V.P. y Khanna, P., (1984), Fitoterapia, 55 (5); 302.
- Bowie, J.H., Camero, D.W., Giles, R.G.F. and Williams, D.H. (1966). J. Chem. Soc. (B), 335.
- Brown, T.L. (1962). Spectrochim. Acta; 18; 1065.

- Budzikiewics, H., Djerassi, C. y Williams, D.H. (1967), "Mass Spectrometry of Organic Compounds". Holden-Day, San Francisco.
- Chandrasekhar, C., Prabhu, K.R., Venkateswarlu (1970), Phytochemistry; 9; 415-417.
- Chander, Harish., Ahmed, S.M. (1985), Insect Sci Its Appl.; 6 (2); 217-20 (a través de C.A. 103 103689F 1985).
- Chen, Russel R.L., Koo, Wen-Yah (1973), Tai-wan Yao Hsueh Tsachich; 25 (1-2); 22-5 (a través de C.A. 84 79632r 1976).
- Clark, A.M., El-Feraly, F.S. y Wen-Shyongli (1980), J. Pharm. Sci., 10 (8), 951.
- Cronquist Arthur (1969), "Introducción a la Botánica", Compañía Editorial Continental, S.A. México, D.F.
- Desaf, H.K., Gawad, D.H., Govindachari, T.R., Joshi, B.S., Kamat, V.N., Parthasarathy, P.C., Ramachandran, K.S., Shanbhag, M.N., Sidhaye, A.R., Viswanathan, N. (1975), Indian J. Chem., 13 (1), 97-8 (a través de C.A. 82 152147j (1975)).
- Domínguez X.A. (1973), "Métodos de Investigación Fitoquímica" Edit. Limusa 161-174. México, D.F.
- Feigl, F. y Anger, V. (1966), "Spot test in Organic Analysis" 7ª Edic., English Edit. Elsevier, Amsterdam.

- Fieser, L.F., Chamberlin, E.M. (1948), J. Am. Chem. Soc.; 70; 71-75
- Harborne J.B., (1967), *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, A.P., London.
- Harborne J.B. y Mabry T.J. Ed. (1982). *The flavonoids. Advances in Research*, Chapman and Hall; London, N.Y.
- Hiramoto, M., (1939), Yakugaki Zasshi; 59; 665. (En C.A., 33, 8588⁵ 1939).
- Hiramoto, M., (1939), Yakugaki Zasshi; 62; 460-464. (En C.A., 33, 8588⁵ 1939).
- Hufford, C.D., Funderburk, M.J. y Robertson, L.W. (1975), J. Pharm. Sci. 64 (5); 789.
- Huang, Bu-Han; Chen, WenSen, Huya; Qiu, Chen-Bo; Zhang, Wei-Jie; Liang, Bai-Ling; (1981). Yao Hsueh Hsueh Pao; 16 (1); 27-30 (a través de C.A. 95 175623U (1981)).
- Krishna, S., Varma, B.S. (1943), Chem. Abs.; 37; 3878.
- Krishna Swamy, Mohana, Purushothaman, K.K. (1980). Indian J. Exp. Biol.; 18 (11); 1359-60 (a través del C.A. 94, 41875y 1981).
- Lawrence George H.M. (1951), "Taxonomy of Vascular Plants", The MacMillan Company 656-658. United States of America.

- Legradi, L. (1970), Analyst; 95; 590.
- Linn, B.O., Page, A.C., Wong, E.L., Gale, P.H., Shunk, C.H. y Folkers, K. (1959). J. Amer. Chem. Soc.; 81; 4007.
- Martínez Maximino. (1979). "Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas". Fondo de Cultura Económica 1165. México, D.F.
- Merian, R., Schitter, E. (1948), Helv. Chim. Acta; 31; 2237.
- Mitcher, M.R. (1972), Lloydia; 35; 157-165.
- Morton, R.A. (1965), "Biochemistry of Quinonas". Academic Press, New York.
- Murthy V.K., Rao, T.V.P., Venkateswarlu, V. (1965), Tetrahedron; 21; 1445-1447.
- Norris, R.K. y Sternhell, S. (1966). Austral. J. Chem.; 19; 617. (A través del C.A., 65, 4876f 1966).
- Ogawa, H., Natori, S. (1968) Phytochemistry; 7; 773-782.
- Ogawa, H., Natori, S. (1965), Chem. Pharm. Bull; 13; 510-511.
- Paranjapé, A.S. y Gokhale (1932), Arch. Intern. Pharmacodyn.; 42; 212.
- Paris, R., Rabenoro, C. (1950), Ann. Pharm. Franc.; 8; 830. (A través del C.A.; 44; 10265h 1950).

- P. Font Quer (1969), "Botánica Pintoresca". Ed. Ramón Sopena, S.A., Barcelona.
- Pérez Arbelaez Enrique (1942), "Plantas Útiles de Colombia", Contraloría General de la República de Bogotá. Medellín.
- Pérez Arbelaez Enrique (1975), "Plantas Medicinales y Venenosas de Colombia", Hernando Salazar, Edit. Medellín.
- Prakash, Anand O. (1983), Comp. Physiol. Ecol.; 8 (4); 271-5.
- Prakash, Anand O. (1981), Plant. Med.; 41 (3); 259-66.
- Prakash, Anand O., Varshney, M.D. (1980), J. Sci. Res. Plant Med.; 1 (3-4); 32-5.
- Rao, T.V., Padmanabha (1975), Curr. Sci. 44 (1), 11.
- Rao, M.S., Kumar, R.A. Shok, Rao Rajeshwar, Raja, K. Raghava, Reddy, S. (1984), Indian J. Chem. Sect. B; 23 B(5); 483-5 (a través de C.A. 101 211046m (1984)).
- Rao, CH.B., Venkateswarlu, V. (1961), J. Org. Chem.; 26; 4529.
- Rao, CH.B., Venkateswarlu, V. (1962), Tetrahedron; 18; 951.
- Rao, CH.B., Venkateswarlu, V. (1962), Tetrahedron; 18; 361-364.

- Robinson, T. "The Organic Constituents of higher Plants", University Press, 1983.
- Sanabria, Antonio Mantilla, J.R. (1985), Revista Colombiana Ciencias Farmacéuticas; 14 (2); 25-33.
- Seth, S.D., Johri Neera, Sundaram, K.R. (1982), Indian J. Pharmacol; 14 (2); 207-11 (a través de C.A. 100 115158h 1984).
- Shriner, R.L., Fuson, R.C. y Curtin, D. (1980), "Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos", Limusa, México.
- Sinha, N.C., Gupta, R.K., Patil, B.D., (1981), Sci. Cult.; 47 (5); 188.
- Thomson, R.H. (1971), "Naturally Occurring Quinones", 2a. Ed. Butterworths, Londres 21-83, 93-197.
- Wat, CHI-KIT, Tse, Aida, Bandoni, R.J. y Towers GHN (1968), Phytochemistry; 7; 2177-2179.
- Wilkinson, S. (1961), Plant Med.; 9; 121.
- Yates, P., Ardao, M.I. y Fieser, L.F. (1956), J. Amer. Chem. Soc.; 78; 650.

A P E N D I C E