

00570

3

Dej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ALQUILCATECOLES DE *Metopium brownii*
(JACQ.) URBAN ANACARDIACEAE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA-FARMACEUTICA)
P R E S E N T A
Q.F.B. JOSE FAUSTO RIVERO CRUZ



MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

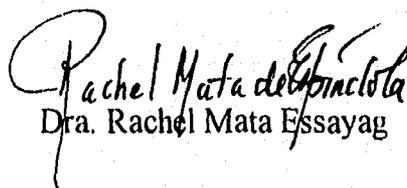
JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Alfredo Ortega H.
Vocal	Dra. Ana Luisa Anaya L.
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer Suplente	M. en C. Isabel Aguilar Laurents
Segundo Suplente	M. en C. Alicia Hernández Campos

Sitio donde se desarrolló el tema:

L-6, Unidad de Investigación de Plantas Medicinales de la Facultad de Química y el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor


Dra. Rachel Mata Essayag

Sustentante

Rivero Cruz José Fausto
Q.F.B. José Fausto Rivero Cruz

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre.

A mi madre:

Porque todo lo que tengo y cuanto soy te lo debo a ti, no me resta más que agradecerte tanto amor, cariño, apoyo y comprensión.

A mis hermanas Isabel del Carmen y Blanca Estela por todo el cariño, comprensión y apoyo a lo largo de mi vida.

A mis tías Anatalia y Ma. Juana por su cariño, apoyo incondicional y por su constantes palabras de aliento para seguir adelante.

Con profundo respeto y admiración Dra. Rachel Mata por haberme dedicado todo este tiempo, por sus enseñanzas, su ejemplo de tenacidad y de constante superación.

A José Luis, mi mejor amigo, por todos los años de amistad y apoyo.

A los Sres. Virginia Miranda de Trejo y Martín Trejo B. por todo el cariño y el apoyo que me han brindado durante los momentos difíciles de mi vida.

A Claudia, Rocío, Martín y Pedro Trejo por ser grandes amigos y haberme permitido compartir con ustedes grandes momentos.

A Julia por todos los buenos momentos que me has dado, por tu cariño y apoyo.

A Begoña por sus palabras de aliento.

A Daniel Chávez por sus consejos y ayuda desinteresada.

A Rebeca, Alicia, Gabriela, María Paz, Guadalupe, Edna, Gladys, Patricia, Samuel, Alejandro Z. y Aída por su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio 6 y Lab. 124 por su apoyo.

Finalmente agradezco a la Universidad Autónoma de México, en particular a la Facultad de Química y a todos sus profesores, por sus enseñanzas.

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ESPECTROS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
AGRACEDIMIENTOS	VII

I. INTRODUCCION

		Página
I.1	Antecedentes sobre el <i>Metopium brownei</i>	1
I.2	Generalidades sobre los 3-alquilcatecoles (urusioles) y los 4- alquilcatecoles (titsioles)	6
I.3	Actividad biológica de los 3-alquilcatecoles	9

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2.1	Objetivos primordiales	22
	Objetivos particulares	22

III. PARTE EXPERIMENTAL

1.	Material vegetal	23
2.	Ensayos biológicos	23

2.2 Determinación de la actividad antifúngica	24
3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados	24
4. Preparación de los derivados de los alquilcatecoles	24
4.1 Procedimiento para la sililación	24
4.2 Procedimiento para la metilación	25
4.3 Preparación de los derivados acetilados	25
4.4 Preparación de los derivados epoxidados	25
5. Análisis por cromatografía en capa delgada	26
6. Análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	27
6.1 Condiciones instrumentales	27
7. Separación por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).....	27
8. Estudio fitoquímico de la corteza de <i>M. brownei</i>	28
8.1 Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar	28
8.2 Caracterización de los alquilcatecoles	30
8.2.1 Aislamiento y caracterización de los compuestos 37, 23 y 21 bajo la forma de sus derivados acetilados	30
8.2.2 Aislamiento y caracterización de los compuestos 37 y 21 bajo la forma de sus derivados metilados	31
8.3 Obtención del β -sitosterol (38)	33
8.4 Obtención de la sacarosa (39)	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	34
4.1 Análisis cuantitativo de los alquilcatecoles de la corteza de <i>M.</i> <i>brownei</i>	34
4.2 Evaluaciones biológicas preliminares	38
4.3 Aislamiento de los principios activos de la corteza de <i>M. brownei</i>	41

4.4 Caracterización de los principios activos 3-(10'Z, 13'E pentadecadienil)catecol (37), 3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21) y 3-pentadecenilcatecol (23)	46
4.4.1 Identificación del 3-(10'Z, 13'E- pentadecadienil)catecol (37) bajo la forma de sus derivados diacetilado (37a) y dimetilados (37m)	46
4.4.2 Identificación del 3-(10'Z-pentadecadienil)catecol (21) bajo la forma de sus derivados diacetilado (21a) y dimetilado (21m)	54
4.4.2 Identificación del 3-pentadecilcatecol (23) bajo la forma de su derivado diacetilado	60
4.5 Evaluación antifúngica de los derivados acetilados y metilados de la mezcla de 3-alkilcatecoles presentes en la fracción CF-II	60
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES	65
VI. BIBLIOGRAFIA	67
SECCION DE ESPECTROS	72

RESUMEN

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto de la corteza fresca del árbol *Metopium brownei* (Jacq.) Urban utilizando como bioensayos la determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach ($CL_{50} = 123.93 \mu\text{g/ml}$) y la evaluación del efecto sobre el crecimiento radial de las especies de hongos fitopatógenos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum* permitió el aislamiento y la caracterización de tres compuestos del tipo 3-alquilocatecol. Los productos aislados se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos como el 3-pentadecilocatecol (23), 3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21) y el 3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37). El último catecol constituye un nuevo producto natural.

La mezcla de los alquilocatecoles demostró una actividad significativa sobre el crecimiento radial de las especies de hongos fitopatógenos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum*. La inhibición del crecimiento radial inducida por la mezcla de los 3-alquilocatecoles sobre los dos hongos de prueba fue muy similar a la demostrada por el fungicida comercial captán utilizado como un control positivo.

Los resultados de esta investigación indican que *Metopium brownei*, al igual que otros miembros de la familia Anacardiaceae, contiene alérgenos del tipo 3-alquilocatecol. De tal forma que su empleo en la medicina popular constituye un riesgo considerable para la salud de los usuarios de esta especie en el sureste de México, donde la planta es particularmente abundante.

ABSTRACT

GC-MS has been used to analyze and characterize the mixture of *bis*-trimethylsilyl derivatives of 3-*n*-alk(en)ylcatechols (urushiol) from the stem bark of *Metopium brownei* (Anacardiaceae). According to the analysis the urushiol sample consisted largely of 3-*n*-pentadec(en)ylcatechols (99.11%), while the homologues *n*-C₁₇ substituted catechols were present in trace levels (0.89%).

The acetone extract from the stem bark demonstrates a significant antifungal activity against *Fusarium oxysporum* and *Helminthosporium longirostratum*. The extract also displayed significant toxicity to brine shrimp, the LC₅₀ was 123.93 µg/ml. Bioactivity guided fractionation of the active extract led to isolation of a mixture composed by three *n*-C₁₅-alkyl(en)yl catechols.

The catechol mixture exhibited a noted fungitoxic activity against both target fungi and was also toxic to *A. salina* (LC₅₀ = 89.13 µg/ml). The fungitoxic activity of the mixture was comparable to that induced by captan a commercial fungicide.

HPLC separation of the methylated catechol active mixture allowed the isolation and identification of **21** and **37** as their methyl ether derivatives. On the other hand, preparative TLC argentation chromatography of the acetylated mixture led to the isolation of **21**, **23** and **37** as their acetyl derivatives. The compounds were characterized by spectroscopic and spectrometric analyses.

The methylated and acetylated mixtures devoid the fungitoxic and larvicide effects of the underivatized mixture, suggesting that the catechol portion is an important structural feature for activity.

The results of this investigation indicate that *Metopium brownei*, as the members of the Anacardiaceae family, contains 3-alkylcatechols type of allergens. Therefore, its use in the popular medicine constitutes a considerable hazard to the health of users in Southeastern Mexico, where this species is particularly widespread.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Flavonoides detectados mediante cromatografía en papel en las especies <i>Metopium brownei</i> y <i>Metopium toxiferum</i>	4
Cuadro 2 Metabolitos secundarios de aislados e identificados de las hojas y la madera de <i>Metopium brownei</i>	6
Cuadro 3 Resumen de los alquilcatecoles aislados en la familia Anacardiaceae a la fecha	11
Cuadro 4 Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina	26
Cuadro 5 Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina	26
Cuadro 6 Resumen del fraccionamiento cromatográfico en columna de la fase clorofórmica del extracto de la corteza de <i>Metopium brownei</i>	30
Cuadro 7 Resumen de la cromatografía en columna de los derivados acetilados de la fracción CF-II	31
Cuadro 8 Resumen de la cromatografía en columna de la fracción CF-II metilada	32
Cuadro 8a Resumen de la purificación de los compuestos mayoritarios de la fracción CF-IIM-2 utilizando HPLC	32
Cuadro 9 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	52
Cuadro 10 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37m)	53
Cuadro 11 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecadienil)catecol (21a)	58
Cuadro 12 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecadienil)catecol (21a)	59
Cuadro 13 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a)	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 <i>Metopium brownei</i> (Jacq.) Urban (Anacardiaceae)	3
Figura 2 Proceso de extracción de la corteza de <i>Metopium brownei</i>	28
Figura 3 Patrón de fragmentación propuesto para los derivados sililados de los alquilatecoles	35
Figura 3a Análisis mediante cromatografía de gases del extracto acetónico de la corteza fresca de <i>M. brownei</i> .	37
Figura 4 Análisis mediante cromatografía de líquidos de la fracción CF-II metilada	45
Figura 5 Espectro COSY del 1,2-diacetil-3-(10' <i>Z</i> , 13' <i>E</i> -pentadecadienil)catecol	47
Figura 6 Espectro COSY del 1,2-dimetóxi-3-(10' <i>Z</i> , 13' <i>E</i> -pentadecadienil)benceno	48
Figura 7 Espectro HETCOR del 1,2-diacetil-3-(10' <i>Z</i> , 13' <i>E</i> -pentadecadienil)catecol	49
Figura 8 Espectro COSY del 1,2-diacetil-3-(10' <i>Z</i> -pentadecenil)catecol	55
Figura 9 Espectro HETCOR del 1,2-diacetil-3-(10' <i>Z</i> -pentadecenil)catecol	
Figura 10 Patrón de fragmentación propuesto para el derivado monoepoxidado de 21a	56
Figura 11 Comparación de los desplazamientos químicos de los metilenos alílicos del producto 21 con los decritos previamente para monoolefinas con configuración <i>Z</i> (I) y <i>E</i> (J)	57

LISTA DE ESPECTROS

		Página
Espectro 1	Espectro de masas del derivado trimetilsililado del pentadecilcatecol con una cadena lateral saturada	72
Espectro 2	Espectro de masas del derivado trimetilsililado del pentadecilcatecol con una cadena lateral monoinsaturada	73
Espectro 3	Espectro de masas del derivado trimetilsililado del pentadecilcatecol con una cadena lateral di-insaturada	74
Espectro 4	Espectro de masas del derivado trimetilsililado del heptadecilcatecol con una cadena lateral saturada	75
Espectro 5	Espectro de masas del derivado trimetilsililado del heptadecilcatecol con una cadena lateral monoinsaturada	76
Espectro 6	Espectro de RMN ¹ H de la fracción activa CF-II	77
Espectro 7	EMIE del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	78
Espectro 8	Espectro de IR del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	79
Espectro 9	Espectro de UV 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	80
Espectro 10	EMIE del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37m)	81
Espectro 11	RMN ¹ H del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	82
Espectro 12	RMN ¹ H del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37m)	83
Espectro 12a	RMN ¹ H del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37m)	84
Espectro 13	RMN ¹³ C del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	85
Espectro 14	DEPT del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)	86
Espectro 15	RMN ¹³ C del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37m)	87
Espectro 16	DEPT del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37m)	88
Espectro 17	EMIE del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)	89
Espectro 18	Espectro de IR del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)	90

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 19	EMIE del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)	91
Espectro 20	RMN ¹ H del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)	92
Espectro 21	RMN ¹ H del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)	93
Espectro 22	RMN ¹³ C del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)	94
Espectro 23	RMN ¹³ C del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)	95
Espectro 24	DEPT del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)	96
Espectro 25	DEPT 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)	97
Espectro 26	EMIE del derivado monoepoxidado 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21a)	98
Espectro 27	RMN ¹ H del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a)	99
Espectro 28	RMN ¹³ C del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a)	100

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
AgNO₃	Nitrato de plata
Benceno-d₆	Benceno deuterado
°C	Grados centígrados
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a un sistema de espectrometría de masas
CHCl₃	Cloroformo
CL₅₀	Concentración letal media
COSY	Correlación homonuclear bidimensional
d	Doblete
dd	Doblete dobleteado
δ	Desplazamiento químico
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
g	Gramos
HETCOR	Correlación heteronuclear bidimensional
Hex	Hexano
Hz	Hertz
Int rel	Intensidad relativa
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
m	multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
mL	Mililitro
m/z	Relación masa-carga
µg	Microgramo
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono
s	Singulete
sa	Singulete ancho
TMS	Tetra-metil-silano

AGRADECIMIENTOS

De manera especial, expreso mi agradecimiento a la Dra Rachel Mata Essayag de la Facultad de Química de la UNAM, por su invaluable dirección en el presente trabajo.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico.) IN203394 y CONACYT (Convenio No.400313-S-2576PM).

A la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular, por sugerir el estudio de la especie *Metopium brownei*, proporcionar e identificar el material vegetal y por sus valiosos comentarios que mejoraron el presente estudio.

A la Bióloga Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular por la realización de los ensayos biológicos conducentes a la determinación de la actividad antifúngica de los extractos y compuestos.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q. F. B. Rocio Patiño del laboratorio de Espectroscopía IR del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

Al I.Q. Luis Velasco y Q. Javier Pérez del laboratorio de Espectrometría de masas del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de Masas.

A la M. en C. Carmen Márquez Alonso del Instituto de Química por su asesoría para la separación de los compuestos mediante HPLC.

De manera muy especial agradezco a los miembros del jurado revisor sus valiosos comentarios que mejoraron la versión final de esta tesis.

A los prestadores de Servicio Social del Laboratorio 6 del Instituto de Química por su valiosa colaboración durante la realización del trabajo experimental del presente trabajo.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Químicas (Química-Farmacéutica)

I. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes sobre *Metopium brownei*.

Metopium brownei (Jacq.) Urban [Sin: *Rhus metopium* L., *Terebinthus brownei* Jacq.] (Standley, 1939), es un árbol (Figura 1) perteneciente a la familia Anacardiaceae (Tribu Roideae). Se le conoce con los nombres comunes de "chechen", "kabal chechen", "box chechem" y madera negra venenosa (Cabrera, 1938; Martínez, 1989). Desde el punto de vista medicinal se le atribuyen propiedades antirreumáticas, sedantes y diaforéticas (Cabrera *et al.*, 1992). También se le considera efectivo para el tratamiento de la viruela, el sarampión y la erisipela (Martínez, 1989). Cabrera y colaboradores (1992) en su libro "Imágenes de la Flora Quintanarroense" hacen una descripción botánica detallada de la planta.

Quizás la característica más distintiva de este árbol es su resina cáustica, la cual se oscurece al contacto con el aire y produce afecciones dérmicas y respiratorias. Cabe destacar también que la bella madera de esta planta es altamente apreciada para la fabricación de chapa, duela, piso y lambrin. Sin embargo, las afecciones dérmicas y respiratorias producidas en los aserraderos y fábricas de muebles por la resina cáustica, constituyen un impedimento para su industrialización (Cabrera *et al.*, 1992). La especie se distribuye exclusivamente en la vertiente del Golfo de México, de Veracruz a Quintana Roo, en donde es muy abundante, habitando las selvas alta y mediana subperennifolias y mediana subcaducifolia, codominando los estratos superiores; en suelos someros con buen drenaje, es común encontrarle asociada a tintales y manglares. Siendo muy resistente al fuego, crece en manchones puros favorecidos por las quemadas (Cabrera *et al.*, 1992).

Además de *Metopium brownei* el género incluye la especie *Metopium toxiferum*. La madera de ambas especies ha sido investigada desde el punto de vista químico como parte de un estudio quimiotaxonomico de varias especies de la familia Anacardiaceae. La

investigación permitió determinar la presencia de ocho flavonoides (1-8) en *Metopium brownei* y de cinco flavonoides (1,3 y 6-8) en *Metopium toxiferum* (Young, 1975; 1979). El contenido de flavonoides de la madera de las especies de *Metopium* se determinó mediante un análisis cualitativo mediante cromatografía en papel y en ninguno de los casos se aislaron los compuestos detectados cromatográficamente (Young, 1975; 1979). En el Cuadro 1 se ilustran las estructuras de los flavonoides detectados en la madera de las dos especies de *Metopium*.

Recientemente, el estudio fitoquímico convencional del extracto CHCl₃-MeOH (1:1) de las hojas y ramas de *M. brownei* permitió el aislamiento y la caracterización del ácido masticadionónico bajo la forma de su éster metílico (11a) (Cuadro 2). El producto natural (11) no demostró toxicidad contra el crustáceo *A. salina*, ni demostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* (Rivero, 1994).

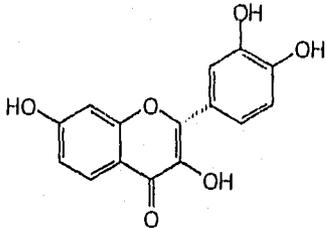
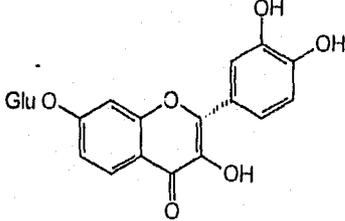
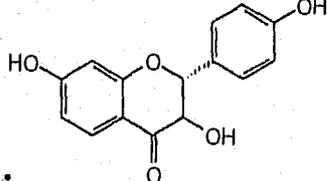
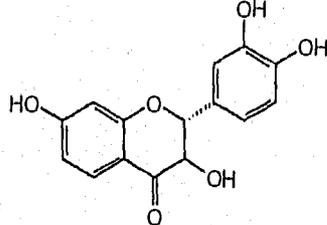
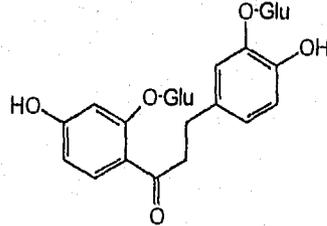
Por otro lado, el estudio fitoquímico biodirigido del extracto CHCl₃-MeOH (1:1) de la madera utilizando como bioensayos la determinación de la toxicidad contra el crustáceo *A. salina* y el efecto inhibitorio del crecimiento radial de tres hongos fitopatógenos permitió el aislamiento de dos flavonoides. Estos fueron caracterizados por métodos químicos y espectroscópicos como la dihidroquercetina (9) y el eriodictiol (10). La dihidroquercetina (9) constituyó el principio bioactivo mayoritario y demostró una actividad antifúngica significativa contra *Pythium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Alternaria* sp. El eriodictiol (10) fue el responsable del efecto larvicida en contra del crustáceo *A. salina* demostrado por el extracto total de la madera de *M. brownei* (Rivero, 1994).

Por último, el análisis del extracto hexánico de la corteza de *M. brownei* mediante cromatografía de gases acoplada a un sistema de espectrometría de masas (CG-EM) permitió la detección de una mezcla de 3-alquilateoles (Rivero, 1994).

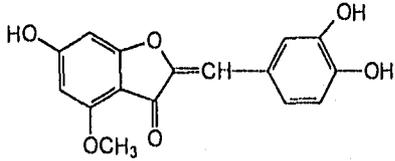
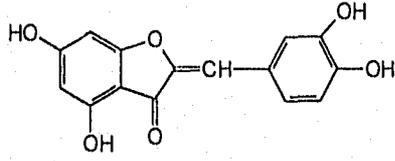
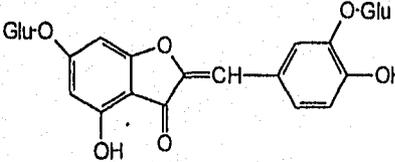


Figura 1. *Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae).

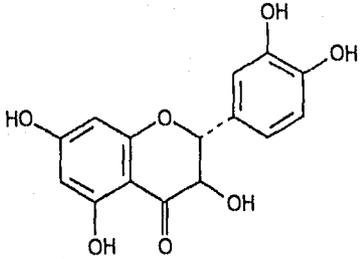
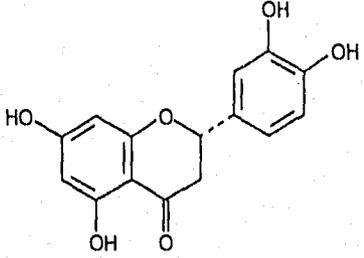
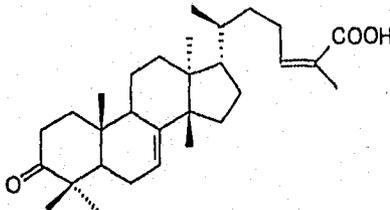
CUADRO 1. Flavonoides detectados mediante cromatografía en papel en las especies *Metopium brownii* y *Metopium toxiferum*.

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	Fisetina (1)	Young, 1975; 1979
	Glucofisetina (2)	Young, 1975; 1979
	3, 4', 7-trihidroxi-flavanona (3)	Young, 1975; 1979
	Fustina (4)	Young, 1975; 1979
	2', 3-O-β-diglucofisetina (5)	Young, 1975; 1979

CUADRO 1. Flavonoides detectados mediante cromatografía en papel en las especies *Metopium brownei* y *Metopium toxiferum* (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	Rengasina (6)	Young, 1975; 1979
	Sulfuretina (7)	Young, 1975; 1979
	3', 6-O- β -diglucosulfuretina (8)	Young, 1975; 1979

CUADRO 2. Metabolitos secundarios aislados e identificados de las hojas y madera de la especie *Metopium brownei*.

ESTRUCTURA	COMPUESTO	REFERENCIA
	dihidroquercetina (9)	Rivero, 1994
	eriodictiol (10)	Rivero, 1994
	ácido masticadienónico (11)	Rivero, 1994

1.2 Generalidades sobre los 3-alkilcatecoles (urusioles) y los 4-alkilcatecoles (titsioles).

Los 3-alkilcatecoles (urusioles) y 4-alkilcatecoles (titsioles) son metabolitos secundarios del tipo C_6-C_{11} , caracterizados por la presencia de un núcleo catecólico y de una cadena lateral lipofílica de 15 ó 17 átomos de carbono ubicada en la posición 3 ó 4 del

anillo aromático (Tyman, 1979 y 1991). Su distribución en el reino vegetal se encuentra restringida a algunas especies de la familia Anacardiaceae. Como se puede apreciar en las estructuras del Cuadro 3, las cadenas laterales pueden ser saturadas o insaturadas.

En el caso de las cadenas de 15 átomos de carbono la doble ligadura en las cadenas monoinsaturadas se puede encontrar en C-8 (18) o C-10 (19) con una configuración Z. En las cadenas di-insaturadas las dobles ligaduras se ubican en C-8 (16) y C-11 (17). Por último, en las cadenas triinsaturadas las insaturaciones se encuentran en C-8, C-11 y C-13 (14) o en C-8, C-11 y C-14 (15). La configuración de las dobles ligaduras en las cadenas que contienen más de una insaturación es variable (Tyman, 1979 y 1991).

Las cadenas laterales de 17 átomos al igual que las de 15 átomos de carbono pueden ser saturadas o presentar una, dos o tres insaturaciones. En las cadenas monoinsaturadas la doble ligadura está presente en C-10 (26) ó C-11 (27), con una configuración Z. En las cadenas con dos insaturaciones las dobles ligaduras se encuentran en C-8 y C-11 (25) o C-10 y C-13 (24) y en ambos casos la configuración es Z. En las cadenas tri-insaturadas las dobles ligaduras generalmente se localizan en C-10, C-13 y C-15 (22) o C-10, C-13 y C-16 (23) y la configuración de las mismas es variable. En el Cuadro 3 se resumen las estructuras de los 3-alkilcatecoles y los 4-alkilcatecoles naturales descritos a la fecha, sus nombres químicos y sus fuentes naturales. Merecen un comentario especial los compuestos 30-33 los cuales presentan un residuo fenildecil o fenildodecil en las posiciones 3 o 4 del núcleo catecólico, en lugar de la cadena alquímica o alquénica observada para los compuestos 9-29.

Los alkilcatecoles se encuentran presentes en la savia, las hojas, la madera y la corteza de las especies que los biosintetizan (Tyman, 1979 y 1991) y son los principales constituyentes de la laca, obtenida en los países asiáticos, de la savia de varios tipos de árboles y que ha sido utilizada por varios miles de años como un excelente material de recubrimiento (Du *et al.*, 1984a; 1984b). En Japón la savia del árbol *Rhus vernicifera* se ha extraído sistemáticamente desde el siglo VI y también fue usada en China durante la

dinastía Chou de 1122 a 249 A.C. La savia es de color blanco-amarillento y por exposición al aire se torna primero amarillo-café y por último adquiere una coloración negra. La savia es utilizada para el recubrimiento de superficies de madera y metálicas una vez que se le remueven las "impurezas" y el agua (Du *et al.*, 1984a; Tyman, 1979; 1991; *inter alia*). En Corea y China se utiliza la savia de la planta *Rhus succedanea*, en Burma y Tailandia la de *Melanoxrea usitate* (Du *et al.*, 1984a y 1986).

Para obtener los alquilatecoles a partir de sus fuentes naturales, el material vegetal se extrae generalmente con acetona. Posteriormente se separan de otros constituyentes por cromatografía en columna. Este proceso conduce al aislamiento de mezclas de 3-alquilatecoles o 4-alquilatecoles los cuales se resuelven en sus componentes individuales mediante cromatografía de gases o HPLC. (Tyman, 1979, 1991; Yamauchi *et al.*, 1981; Du *et al.*, 1984a; 1984b y 1986).

Muy a menudo, antes de separar los constituyentes individuales presentes en las mezclas, los grupos fenóles se derivatizan mediante la formación de ésteres (acetatos) o éteres (metil o trimetilsilil éteres). De esta manera, se evita la posibilidad de oxidación y se simplifica el proceso de aislamiento. La separación de los derivados se realiza también por HPLC y cromatografía líquida de gases. Recientemente, Yamauchi y colaboradores lograron separar los componentes del urusiol utilizando columnas de fase inversa (Tyman, 1979; 1991; Ma, 1980; Yamauchi *et al.*, 1981; Du *et al.*; 1984a; 1984b y 1986)

La identificación de los compuestos puros y sus derivados se ha realizado mediante métodos espectroscópicos (IR, UV, RMN¹H, RMN¹³C y EM) y por síntesis (Tyman, 1979; 1991; Jefferson *et al.*, 1986).

Los alquilatecoles se biosintetizan por la ruta acetato-malonato a partir de un ácido graso de cadena larga (unidad de iniciación) y de la malonil coenzima A (unidad de extensión) (Tyman, 1979; 1991; Gross *et al.*, 1975; Du *et al.*, 1986).

Los alquilatecoles se han sintetizado para confirmar la estructura molecular de los productos naturales y para realizar estudios de correlación entre la estructura química y la

actividad alérgica demostrada por este grupo de compuestos. Los métodos de síntesis utilizados, incluyen la reducción catalítica de compuestos derivados del acetileno y la reacción de derivados de fenil-litio con fosfinas en una reacción de tipo Wittig. Las dos estrategias se utilizan para la preparación de compuestos de cadena insaturada, los cuales son de utilidad en estudios de desensibilización. En este último caso, cabe destacar que resulta más sencilla la síntesis de los compuestos poliinsaturados que la separación a nivel preparativo a partir de sus fuentes naturales (Jefferson, 1984; Tyman, 1979 y 1991).

1.3 Actividad biológica de los 3-alkilcatecoles.

Los 3-alkilcatecoles (urusioles), los 4-alkilcatecoles (titsioles) y los alquilresorcinoles son los alérgenos por contacto responsables de las severas dermatitis inducidas por varias especies de la familia Anacardiaceae, entre las que destacan las siguientes: cinco especies del género *Toxicodendron* (*T. radicans*, *T. rydbergii*, *T. toxicarium*, *T. diversilobum* y *T. vernix*), *Rhus vernicifera*, *Metopium toxiferum* y varias especies de los géneros *Semecarpus*, *Holigarna*, *Gluta*, *Smodigium* y *Melanorrhoea*. (Tyler *et al.*, 1970; Gross *et al.*, 1975; Evans, 1991; Tyman, 1991 y Rodríguez, 1992).

Los urusioles al contacto con la piel de humanos y animales producen una dermatitis por contacto tardía (DCT) (Gross *et al.*, 1975; Rodríguez, 1992). Numerosos casos de DCT se han descrito en carpinteros y empleados de aserraderos que trabajan con las maderas de árboles tropicales. De acuerdo con estadísticas recientes el 50% de la población de los Estados Unidos de América es sensible a este tipo de compuestos y se presume que en los países en vías de desarrollo un alto porcentaje de personas expuestas a especies de la familia *Anacardiaceae* también son sensibles a estos compuestos (Byers *et al.*, 1979; Tyman, 1991; Rodríguez, 1992).

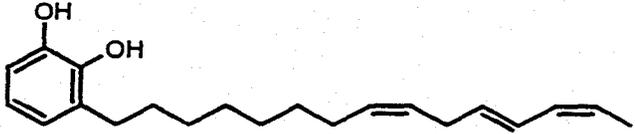
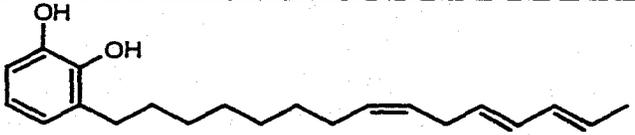
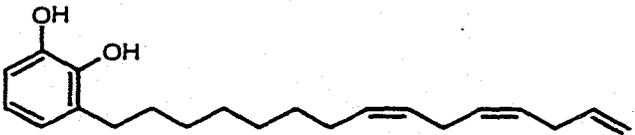
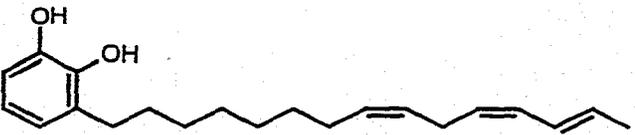
La DCT es el resultado de una reacción entre una molécula de bajo peso molecular (hapteno) y una proteína presente en la piel. Esta combinación entre la proteína de la piel y

el producto de la planta resulta en una nueva estructura molecular la cual no puede ser reconocida por el sistema inmune del organismo animal. El sistema inmune siempre va a reaccionar tratando de eliminar esta nueva estructura. Las reacciones de defensa inducen inflamación, comezón y enrojecimiento, los cuales son síntomas que se asocian a la dermatitis por contacto tardía (DCT) (Rodríguez, 1992). La dermatitis inducida por los urusioles y titsioles es mínima en la primera exposición, pero en exposiciones subsecuentes y como resultado de la prolongada interacción entre los linfocitos del sistema inmune y los alquilatecoles se produce la formación de vesículas llenas de pus y lesiones eritematosas en el sitio de exposición, reacciones que caracterizan a una severa respuesta alérgica ya que aparecen de 24 a 48 horas después de la exposición. El hecho de que las reacciones por DCT requieran de la mediación del sistema inmune se hace evidente por el retardo (12-72 h) para la aparición de los síntomas. Este retardo de las reacciones que caracterizan a la dermatitis por contacto tardía, contrasta con las reacciones inmediatas de los compuestos irritantes los cuales no requieren ser "procesados" por el sistema inmune. La reactividad aparece 2 semanas después de la primera exposición y persiste por un período de 6 a 8 semanas (Byers *et al.*, 1979; Dunn *et al.*, 1982; Rodríguez, 1992). Los alquilresoreinoles son los sensibilizadores menos potentes, sin embargo ellos causan problemas de reactividad cruzada en personas sensibilizadas con alquilatecoles (Rodríguez, 1992, Tyman, 1991).

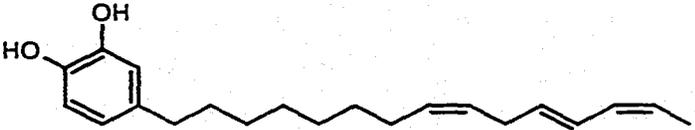
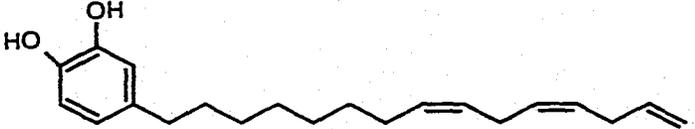
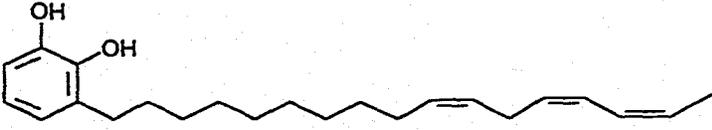
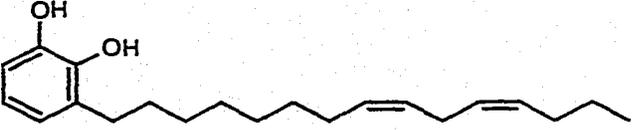
Los compuestos químicos que causan la DCT se caracterizan por ser relativamente pequeños (bajo peso molecular), lipofílicos (solubles en grasas o lípidos) y extremadamente reactivos. Las dos últimas características permiten la fácil penetración en la piel y una fácil combinación con las proteínas de la piel, respectivamente.

Kittel en 1858 sugirió que el alérgeno del zumaque (*Rhus toxicodendron*) era una mezcla de alcaloides volátiles, pero en 1915, Majima demostró que el principio tóxico era el urusiol, el cual consistía en una mezcla de compuestos de naturaleza catecólica con una cadena hidrocarbonada en la posición tres del anillo aromático. Esta hipótesis fue confirmada años después por Sunthaker y Dawson (Yamauchi *et al.*, 1981).

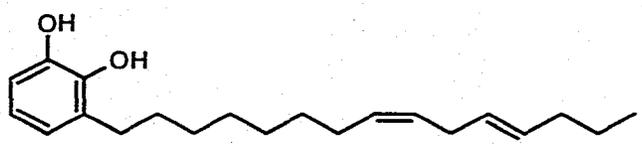
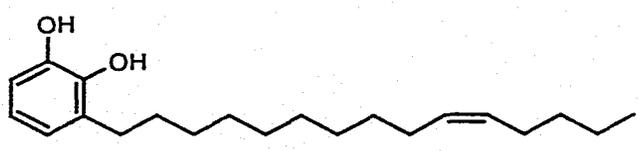
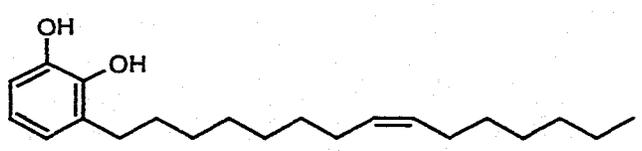
CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha.

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-(8'Z, 11'E, 13'Z-pentadecatrienil)catecol (12)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Du <i>et al.</i>, 1984a</p>
	<p>3-(8'Z, 11'E, 13'E-pentadecatrienil)catecol (13)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Tyman, 1991</p>
	<p>3-(8'Z, 11'Z, 14'-pentadecatrienil)catecol. (14)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Du <i>et al.</i>, 1984a; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980</p>
	<p>3-(8'Z, 11'Z, 13'E-pentadecatrienil)catecol (15)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>, 1984a</p>

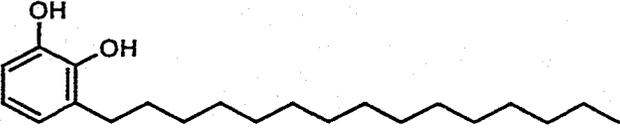
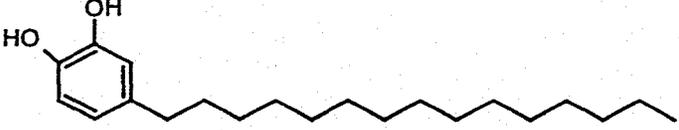
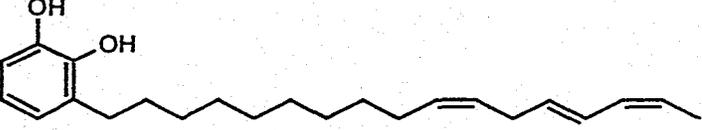
CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>4-(8'Z, 11'E, 13'Z-pentadecatrienil)catecol (16)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>, 1980</p>
	<p>4-(8'Z, 11'Z, 14'-pentadecatrienil)catecol (17)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Du <i>et al.</i>, 1984a</p>
	<p>3-(10'Z, 13'Z, 15'Z-heptadecatrienil)catecol (18)</p> <p><i>Semecarpus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1991</p>
	<p>3-(8'Z, 11'Z-pentadecadienil)catecol (19)</p> <p>Rengol</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p> <p><i>Semecarpus heterophylla</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980</p>

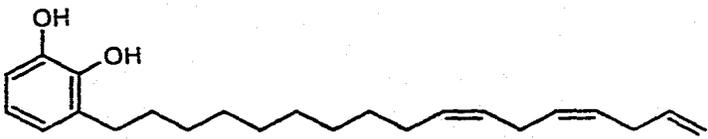
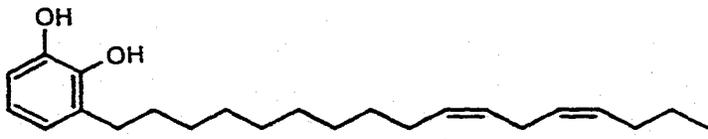
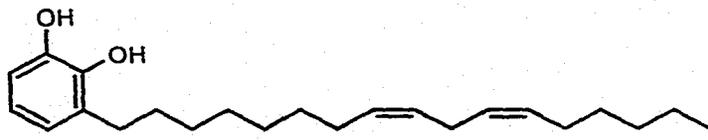
CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-(8'Z, 11'E-pentadecadienil)catecol (20)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Tyman, 1991.</p>
	<p>3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21)</p> <p>Glutarengol</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p> <p><i>Gluta renghas</i></p>	<p>Yamauchi <i>et al.</i>, 1980</p>
	<p>3-(8'Z-pentadecenil)catecol (22)</p> <p><i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Du <i>et al.</i>, 1984a; Jefferson, <i>et al.</i>, 1986</p>

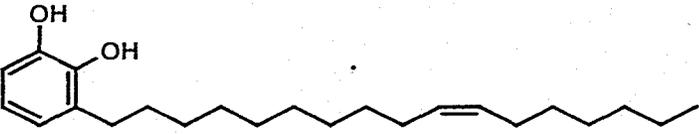
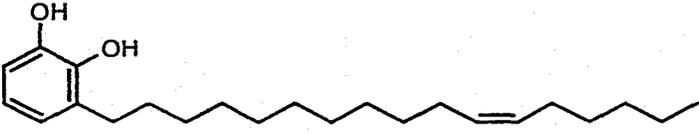
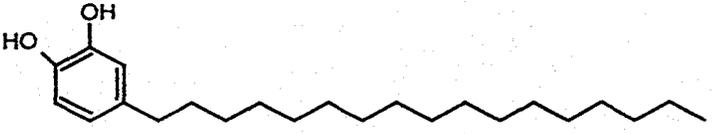
CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-pentadecilcatecol (23) <i>Rhus vernicifera</i></p>	<p>Tyman, 1979; 1991; Yamauchi <i>et al.</i>, 1980; Du <i>et al.</i>, 1984a; Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>4-pentadecilcatecol Titsiol (24) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986; Tyman, 1991</p>
	<p>3-(10'Z, 13'E, 15'Z-heptadecatrienil)catecol (25) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>, 1984a</p>

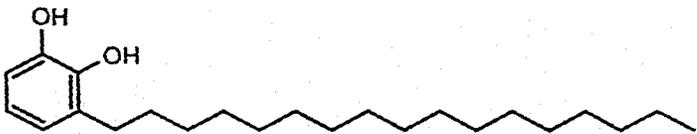
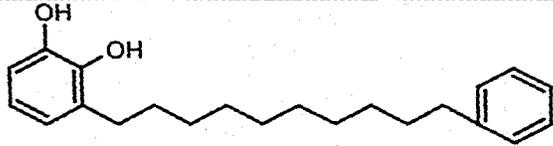
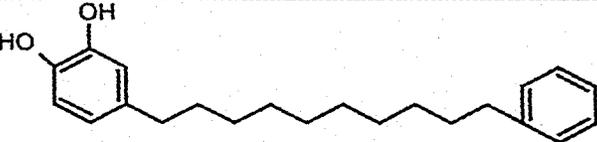
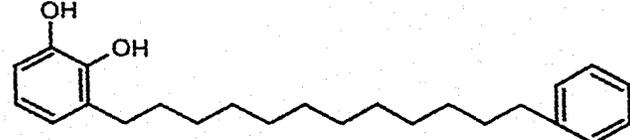
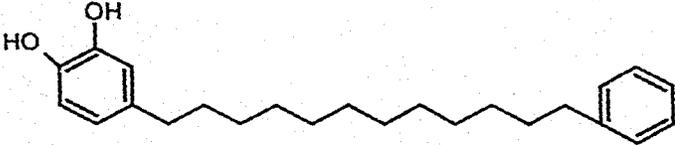
CUADRO 3. Resumen de los alquilatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-(10'Z, 13'Z, 16'-heptadecatrienyl)catecol (26)</p> <p><i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>, 1984a</p>
	<p>3-(10'Z, 13'Z-heptadecadienyl)catecol (27)</p> <p><i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>3-(8'Z, 11'Z-heptadecadienyl)catecol (28)</p> <p><i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>, 1984a</p>

CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-(10'Z-heptadecenil)catecol (29) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Du <i>et al.</i>,1984a</p>
	<p>3-(11'Z-heptadecenil)catecol (30) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>,1986</p>
	<p>4-heptadecilcatecol (31) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>,1986</p>

CUADRO 3. Resumen de los alquilcatecoles de la familia Anacardiaceae aislados a la fecha (continuación).

ESTRUCTURA	COMPUESTO Y FUENTE NATURAL	REFERENCIA
	<p>3-heptadecilcatecol (32) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>3-(10'-fenildecil)catecol (33) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>4-(10'-fenildecil)catecol (34) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>3-(12'-fenildodecil)catecol (35) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>
	<p>4-(12'-fenildodecil)catecol (36) <i>Melanorrhoea usitata</i></p>	<p>Jefferson <i>et al.</i>, 1986</p>

Las cadenas hidrocarbonadas son las responsables del carácter hidrofóbico de estos haptenos, los cuales se consideran como los agentes más lipofílicos causantes de dermatitis. Como consecuencia de este carácter lipofílico los alquifenoles tienden a acumularse en las membranas celulares. Se ha sugerido que se forma un enlace covalente entre el anillo del catecol y una molécula acarreadora. Así, las moléculas del catecol pueden disolverse en las membranas lipídicas y autooxidarse para generar una *o*-quinona electrofílica que puede alquilar a los grupos funcionales nucleofílicos de los biopolímeros. La propuesta anterior se basa en el hecho de que al bloquear la posibilidad para generar una *o*-quinona, disminuye la actividad inmunológica *in vivo* (Byers *et al.*, 1979; Dunn *et al.*, 1982). Sin embargo, otros estudios indican que los alquilatecoles son altamente solubles en las membranas biológicas, pero no se unen covalentemente a ellas ya que el compuesto se remueve de las mismas por medio de lavados con DMSO.

Estudios en cobayos han demostrado que tanto la porción catecólica, como la cadena lateral, son los requisitos estructurales necesarios para la respuesta inmunológica. También se ha encontrado que en los humanos la respuesta contra el urusiol y el títisil se incrementa con el grado de insaturación de las cadenas laterales. Los compuestos insaturados son 10 veces más activos que los saturados. En cobayos el largo de la cadena así como la naturaleza de los sustituyentes del anillo tienen también influencia en la actividad inmunológica (Byers *et al.*, 1979).

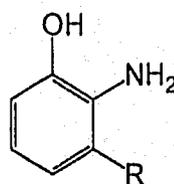
En cobayos la tolerancia a los alquilatecoles se ha inducido mediante inyecciones subcutáneas de pentadecilcatecol en aceite mineral o por la administración oral del compuesto previo a la sensibilización. La hiposensibilización regularmente se obtiene por medio de la administración de extractos de plantas, aunque requiere de grandes dosis y de meses o años de tratamiento. Cabe hacer notar que la sensibilidad se recupera rápidamente cuando el tratamiento se suspende. El descubrimiento que la inyección intravenosa de muchos sensibilizadores de la piel u otros compuestos estrechamente relacionados previene

la subsecuente sensibilización al compuesto, sugiere que la tolerancia resulta de la unión del hapteno a algunos componentes celulares.

Se ha demostrado que compuestos del tipo de la *orto*-hidroxilaminas (a) y (b) poseen una reactividad cruzada con los alquilcatecoles provenientes de la madera venenosa y de la hiedra venenosa a una dosis de 10 µg/mL. Esta reacción es específica, ya que estos compuestos no presentaron una actividad irritante *per se* cuando se probaron en cobayos que no habían sido sensibilizados. El hecho de que este tipo de compuestos presenten una reactividad cruzada con los alquilcatecoles, sugiere que grupos funcionales oxidables en lugar de dos hidroxilos libres, son suficientes para que exista la reactividad cruzada, además ambos grupos oxidables deben encontrarse en posición *orto*. Este requerimiento estructural parece más importante que la posición de la cadena lateral. La reactividad cruzada de este tipo de compuestos se puede explicar por su capacidad de oxidarse a estructuras de tipo quinona con susceptibilidad de sufrir un ataque nucleofílico en las posiciones 5 ó 6 del anillo por los grupos nucleofílicos de las proteínas (Dunn *et al.*, 1982; ElSohly *et al.*, 1986; Rodríguez, 1992).



(a)



(b)

Recientemente se han sintetizado varias series de compuestos con diferentes sustituyentes en el anillo aromático con la finalidad de encontrar análogos que produzcan tolerancia a la dermatitis por contacto. Así, se ha encontrado que los compuestos con sustituyentes en la posición 6 del anillo aromático producen tolerancia y tienen poco poder irritante y sensibilizador (Elsohly *et al.*, 1986).

Recientes estudios *in vitro* revelan que los alquilcatecoles pueden fragmentar el DNA en presencia de una catálisis metálica. Cualquier modificación en el DNA puede resultar en un daño irreversible a la maquinaria genética de la célula y puede producir, como consecuencia, cáncer de piel. Al parecer el radical semiquinona puede romper los enlaces entre el azúcar y el fosfato en la molécula de DNA (Rodríguez, 1992).

La capacidad para causar un daño al DNA no es una característica distintiva de todos los alergenicos por contacto, ya que se ha demostrado experimentalmente que otros compuestos como los poliacetilenos no midifican al DNA (Rodríguez, 1992).

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Como se indicó en la sección de antecedentes la especie medicinal *M. browni* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae) produce graves dermatitis asociadas con la aparición de ampollas acuosas que se extienden por toda la piel. En un estudio anterior, se demostró mediante un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas que el extracto hexánico de la corteza de *M. browni* contenía dos series de alquilcatecoles, la primera presenta una cadena lateral de 15 átomos de carbono y la segunda una cadena lateral de 17 átomos de carbono. En esa oportunidad no se aislaron los constituyentes correspondientes, sin embargo, se pudo demostrar que las afecciones dérmicas producidas por esta Anacardiaceae eran debidas a la presencia de los urusioles.

Con base en estos antecedentes el presente trabajo tiene como **objetivo primordial, cuantificar, aislar y elucidar la estructura molecular de los alérgenos presentes en *M. browni*, mismos que constituyen un considerable riesgo para los usuarios de esta planta como especie maderera y medicinal en algunos estados del sur de la República Mexicana, principalmente en Quintana Roo, Veracruz, Campeche y Yucatán.** El análisis de los extractos naturales que ocasionan dermatitis por contacto tardía, así como el conocimiento de las estructuras de los alérgenos permite el desarrollo de preparados que ayuden al diagnóstico y proporcionen un tratamiento profiláctico para el padecimiento alérgico. En muchos de los casos, inclusive, se puede lograr la desensibilización de tal forma que en exposiciones posteriores a estos productos se evite el desencadenamiento de los síntomas alérgicos (Rodríguez *et al*, 1992).

De manera adicional, y como parte de un proyecto de investigación de naturaleza interdisciplinaria cuyo objetivo fundamental es la obtención de principios bioactivos de interés medicinal y agroquímico, a partir de especies selectas de la flora medicinal mexicana (Jiménez *et al.*, 1996; Castañeda *et al.*, 1992; Calera *et al.*, 1995, *inter alia*), el presente estudio pretende también establecer el **potencial fungicida del extracto y de los productos derivados de la corteza de *Metopium browni*, contra las especies de hongos fitopatógenos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum*, con la finalidad de obtener productos naturales de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes fungicidas de interés en la industria agroquímica.** Este objetivo es de

particular interés debido a que el extracto y los fitoquímicos de la madera de *Metopium brownei*, demostraron propiedades antifúngicas contra las especies de hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp. Es importante hacer notar que la búsqueda de agentes naturales efectivos contra *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium* sp. esta plenamente justificada ya que estos hongos fitopatógenos producen severos daños y pérdidas en cultivos de productos de gran importancia económica. Por otro lado, la utilización de productos naturales tiene la ventaja de producir un menor daño al medio ambiente.

Por último, se pretende establecer el potencial larvicida del extracto y los compuestos aislados contra el crustáceo *Artemia salina* considerando que este bioensayo es un buen indicador de actividades biológicas más complejas (e.g. citotoxicidad) que pueden ser estudiadas en investigaciones posteriores y que escapan de los objetivos particulares de la presente propuesta de investigación.

2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- A) Cuantificar el contenido de alquilatecoles presentes en el extracto fresco de la corteza de *M. brownei* mediante un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los correspondientes derivados sililados.
- B) Determinar la actividad antifúngica y larvicida del extracto obtenido de la corteza fresca de *M. brownei*, utilizando como bioensayos la inhibición del crecimiento radial de dos especies de hongos fitopatógenos y la toxicidad para *A. salina*.
- C) Preparar el extracto total de acuerdo a las técnicas fitoquímicas convencionales.
- D) Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto mediante técnicas cromatográficas y/o de partición.
- F) Separar y purificar los constituyentes bioactivos mediante métodos cromatográficos.
- G) Elucidar las estructuras de los constituyentes aislados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- H) Realizar la evaluación biológica de los compuestos aislados mediante la utilización de los mismos bioensayos indicados en el inciso B.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL.

La colecta del material vegetal (corteza) utilizado en el presente estudio fue realizada en el municipio de Tulum, Estado de Quintana Roo en el mes de noviembre de 1995 por la Dra. Ana Luisa Anaya (Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Una muestra de herbario fue depositada en el Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM (Voucher, Anaya 95-1).

2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

2.1 DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PARA EL CRUSTACEO *Artemia salina* Leach.

a) Preparación de las muestras.

Las muestras a evaluar (extractos, fracciones o compuestos puros), se prepararon disolviendo 20 mg del material en 2 mL del disolvente apropiado. Posteriormente, se transfirieron a tres viales en forma independiente y por triplicado 500, 50 y 5 μ L de la solución original, se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se aforó cada vial a 5 mL utilizando agua salada, obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 μ g/mL, respectivamente (Anderson *et al.*, 1991).

b) Procedimientos para el bioensayo.

Después de incubar los huevecillos del crustáceo en agua salada a 25 °C y durante 48 horas, se transfirieron 10 larvas a cada uno de los viales conteniendo la muestra a evaluar. Transcurridas 24 horas se registró el número de organismos sobrevivientes: los resultados se procesaron por medio de un análisis probit (Liebermann, 1993) para calcular la concentración letal media (CL₅₀).

2.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.

La actividad antifúngica de los extractos y las mezclas de los alquilatecoles se determinó sobre *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium longirostratum* utilizando un método de dilución en agar, mediante la metodología previamente descrita (Calera *et al*, 1995; Castañeda *et al*, 1992), y las concentraciones de prueba fueron de 50, 100 y 200 µg/mL para el extracto y de 50, 100, 150, 200, 250, 500 y 700 µg/mL en el caso de la mezcla de alquilatecoles. Se utilizó como control positivo el fungicida comercial captán y las concentraciones de prueba fueron 50, 100, 150, 200, 250, 500 y 700 µg/mL.

3. DETERMINACION DE LAS CONSTANTES FISICAS, ESPECTROSCOPICAS Y ESPECTROMETRICAS DE LOS PRODUCTOS NATURALES Y SUS DERIVADOS.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer modelo 599.

Los espectros de RMN de 300 MHz se registraron en los aparatos Varian VXR-3005 y Varian UNITY 300, para el caso de los espectros de 500 MHz, se registraron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, utilizando como disolventes benceno deuterado o cloroformo deuterado y como referencia interna TMS. Los espectros de masas de los compuestos puros, se realizaron en un espectrómetro de masas modelo Jeol JMS-AX505HA y los espectros de ultravioleta se registraron en un espectrofotómetro SHIMADZU UV160U (UV-Visible Recording Spectrophotometer).

4. PREPARACION DE LOS DERIVADOS QUIMICOS DE LOS ALQUILATECOLES.

4.1 PROCEDIMIENTO PARA LA SILILACION.

La sililación de los compuestos se realizó mediante el tratamiento de 1.0 mg de la muestra con 0.1 mL de reactivo de SIGMA-SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexadimetilsilano-piridina (1:3:9), a temperatura ambiente por 30 minutos y bajo atmósfera de nitrógeno.

4.2 PROCEDIMIENTO PARA LA METILACION

Para obtener los derivados metilados de las fracciones y de los compuestos puros se utilizó una solución etérea de diazometano, preparada con hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 mL de agua) , 25 mL de metanol y 21.9 g de N-metil-N-nitroso-paratoluensulfonamida (Diazald, Aldrich) en 45 mL de éter etílico. Por cada 100 mg del producto a metilar se utilizaron 20 mL de una solución etérea de diazometano; el producto a metilar se disolvió en metanol, éter etílico o mezclas 1:1 de ambos disolventes. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas en algunos casos, o durante siete días, a 4°C en otros.

4.3 PREPARACION DE LOS DERIVADOS ACETILADOS.

Para obtener los derivados acetilados de las fracciones y de los compuestos puros se utilizaron 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético por cada 100 mg de la muestra. La mezcla de reacción se mantuvo por 48 horas a temperatura ambiente y al término de este tiempo los productos acetilados fueron procesados de acuerdo a la metodología previamente descrita en la literatura (Pavia, 1995; Shriner; *et al.*, 1980).

4.4 PREPARACION DE LOS DERIVADOS EPOXIDADOS.

Para la obtención de los derivados epoxidados se pesaron 5 mg del compuesto, se disolvieron en 5 mL de CH_2Cl_2 anhidro y, por último, se adicionaron a la mezcla anterior 5 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico. La reacción se dejó a temperatura ambiente con agitación por 24 horas; al término de este tiempo la mezcla de reacción se lavó sucesivamente con 5 mL de una solución de NaHCO_3 al 10% y 5 mL de agua destilada. El disolvente se eliminó a presión reducida, obteniéndose un residuo aceitoso de color amarillo oscuro.

5. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck), utilizando varios sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los agentes cromógenos y los sistemas de elución utilizados se resumen en los Cuadros 4 y 5, respectivamente. Para los análisis cualitativos se utilizaron placas con un espesor de 0.25 mm. Para la realización de las placas preparativas se utilizaron placas de 20 x 20 cm de 2 mm de espesor.

Cuadro 4. Sistemas de elución utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SISTEMA DE ELUCION	COMPOSICION	PROPORCION
I	Hexano-CHCl ₃	Diversas
II	CHCl ₃	100%
II	CHCl ₃ -MeOH	Diversas
IV	Benceno-CHCl ₃	Diversas
V	Benceno-Eter	Diversas
VI	Acetona-Agua	90-10

Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	COMPOSICION DEL AGENTE CROMOGENO	REFERENCIA
Sulfato Cérico*	12.0 g de sulfato cérico amoniacal 22.2 mL de H ₂ O 350.0 g de hielo picado	Stahl, 1969; Grinsberg, 1990; Lowery, <i>et al.</i> , 1993.
Acido sulfúrico 10% (v/v)*	10.0 mL de H ₂ SO ₄ 90.0 mL de agua	
FeCl ₃	1g de FeCl ₃ 99 mL de etanol	ElSohly <i>et al.</i> , 1982; Wannan, 1985

* Para el desarrollo de la coloración se calienta durante aproximadamente dos minutos a 110°C.

6. ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A ESPECROMETRIA DE MASAS

6.1 CONDICIONES INSTRUMENTALES

Los análisis mediante cromatografía de gases (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases HP acoplado a un espectrómetro de masas modelo Jeol JMS-AX505HA, mediante la inyección de 10 mL de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP. La identificación y cuantificación de los alquilcatecoles presentes en el extracto total de la corteza de *M. brownii*, se realizó mediante el análisis de sus derivados sililados, utilizando la cromatografía de gases-espectrometría de masas de acuerdo a los procedimientos descritos en la literatura. (ElSohly *et al.*, 1982). Se utilizó helio como gas acarreador a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm² y con un flujo de 2 mL/min. La temperatura del inyector se mantuvo en 260°C, la temperatura de la columna inicial fue de 150°C y se programó para alcanzar una temperatura de 260 °C con un calentamiento gradual de 10°C/min.

Para los registros de los espectros de masas se utilizaron como condiciones experimentales las siguientes: un voltaje de 70 eV para el impacto electrónico. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 33 a 630 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

7. SEPARACION POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION (HPLC).

La purificación de los compuestos, así como la verificación de la pureza de los compuestos se realizó utilizando un sistema de HPLC integrado por una bomba modelo marca WATERS 4000 (Preparative Chromatography System), un detector de UV modelo WATERS 486 (Tunable Absorbance Detector) y a una λ max de 207 nm. En el caso de las corridas analíticas se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ marca WATERS μ Bondapack C₁₈ (3.9 x 300 mm 10 μ m) y una fase móvil consistente en un sistema isocrático de acetonitrilo-agua-acido acético 80:20:2 con un flujo de 2.0 mL/min a presión de 1760 lb/pulg² durante 20 min. La concentración de las muestras de prueba correspondió a 5 mg/mL y se inyectaron alícuotas de 10 μ L de la solución.

Las condiciones instrumentales utilizadas para la purificación de los compuestos fueron las siguientes: una columna semipreparativa de fase reversa C₁₈ µBondapack (19 x 300 mm, 10 µm) . Se inyectaron alícuotas de 200 µL de las soluciones, con una concentración de 200 mg/mL

8. ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA CORTEZA DE *M. brownei*.

8.1 METODOS DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR.

El material vegetal fresco se fragmentó manualmente y se extrajo mediante un proceso de maceración con acetona pura (6 L) a temperatura ambiente, de acuerdo al procedimiento que se indica en el Figura 2.

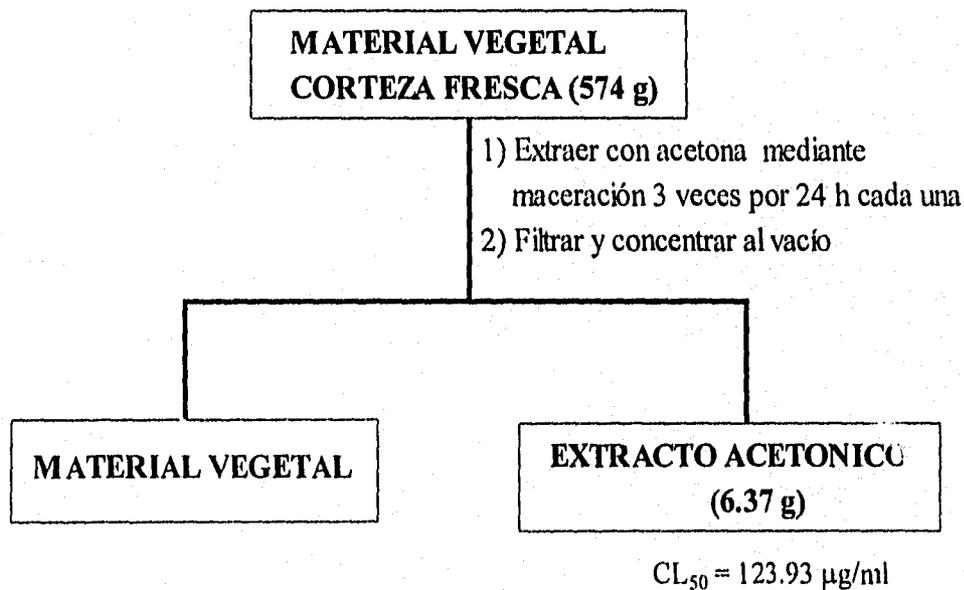


Figura 2. Proceso de extracción de la corteza fresca de *Metopium brownei*.

El extracto acetónico activo ($CL_{50} = 123.93 \mu\text{g/ml}$) de la corteza de *M. brownii* (6.37 g) se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición, entre cloroformo y agua, utilizando 250 mL de cada uno de los disolventes y repitiendo tres veces la operación. Después de eliminar el disolvente, la fracción orgánica generó 4.12 gramos de un residuo aceitoso color café oscuro y 2.25 g de la fracción acuosa. Las fracciones se evaluaron mediante el bioensayo de toxicidad para *Artemia salina*, y en el cual se obtuvo una concentración letal media de 110.9 $\mu\text{g/ml}$ y $>1000 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

La fracción orgánica se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía columna flash preparativa, utilizando como adsorbente 32 g de gel de sílice Baker (40 μm Baker Chromatography Packing). El proceso de elución se realizó utilizando como eluyentes hexano, cloroformo y metanol en diversas diversas proporciones y en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron un total de 60 fracciones de 50 mL cada una. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina y utilizando como agente cromógeno una solución de FeCl_3 al 1%. Las fracciones semejantes se combinaron para generar ocho fracciones secundarias. En el Cuadro 6 se resumen los sistemas de elución utilizados, el número de fracciones y las fracciones combinadas resultantes.

De nueva cuenta cada una de las fracciones secundarias se evaluaron contra *A. salina* obteniéndose una fracción activa (CF-II, Cuadro 6), con una toxicidad de 89.2 $\mu\text{g/ml}$.

La fracción activa CF-II (677 mg) se dividió en tres porciones. Una de ellas (250 mg) se disolvió en una mezcla de éter etílico-metanol (1:1) y se sometió a una reacción de metilación por tratamiento con diazometano. La reacción se llevó a cabo durante una semana a 4 °C; al cabo de este tiempo, se eliminó el disolvente obteniéndose 268 mg de la mezcla metilada. La segunda parte (250 mg), se acetiló por tratamiento con anhídrido acético y piridina, y luego de procesar la mezcla de la reacción de la forma convencional, se obtuvieron 200 mg de la mezcla acetilada.

Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento cromatográfico en columna de la fase clorofórmica del extracto de la corteza fresca de *M. brownii*.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE
Hexano-CHCl ₃	60-40	1-8	1-5	CF-I
	50-50	9-15	6-9	CF-II
	40-60	16-21	10-15	CF-III
	30-70	22-25	16-22	CF-IV
CHCl ₃	100	26-29	23-30	CF-V
	95-5	30-35		
	90-10	36-39	31-40	CF-VI
	85-15	40-45	41-46	CF-VII
CHCl ₃ -MeOH	80-20	46-51	47-60	CF-VIII
	50-50	52-60		

8.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS ALQUILCATECOLES.

8.2.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE 3-(10'Z, 13'E-PENTADECADIENIL)CATECOL (37), 3-(10'Z-PENTADECENIL)CATECOL (23) Y 3-PENTADECENILCATECOL (21) BAJO LA FORMA DE SUS DERIVADOS ACETILADOS.

Con la finalidad de separar los compuestos presentes en la fracción CF-II acetilada se procedió a realizar una cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente 23 g de gel de sílice Baker (Baker 40 μ m Chromatography Packing) impregnada con AgNO₃ al 15%. Se recogieron un total de 28 eluatos de 25 mL cada uno, utilizando fase móvil hexano-CHCl₃ 1:1, CHCl₃ y CHCl₃-MeOH 1:1. Cada una de las fracciones se analizó utilizando cromatografía en

capa fina, combinándose aquellas que eran similares. En el Cuadro 7 se resumen los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas.

Cuadro 7. Resumen de la cromatografía en columna de los derivados acetilados de la fracción CF-II (Cuadro 6).

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Hexano-CHCl ₃	50-50	1-13	1-9	CF-IIA-1
CHCl ₃	100	14-19	10-16	CF-IIA-2
CHCl ₃ -MeOH	50-50	20-28	17-28	CF-IIA-3

La fracción combinada CF-IIA-1 (99.8 mg) se recromatografió en una placa preparativa de gel de sílice impregnada con nitrato de plata al 20%, utilizando como sistema de elución éter de petróleo-éter etílico 1:1; la elución se realizó dos veces y el proceso permitió la obtención de tres bandas mayoritaria (factores de retención de 0.34, 0.55 y 0.78). De la banda con un R_f de 0.34 se obtuvieron 16.9 mg de un aceite amarillo claro, de la banda con factor de retención de 0.55 se obtuvieron 13.1 mg de un aceite cristalino y de la banda con un factor de retención de 0.78 se obtuvieron 5.1 mg de un acetite color amarillo obscuro

8.2.2 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS DERIVADOS METILADOS DEL 3-(10'Z, 13'E-PENTADECADIENIL)CATECOL (37) Y 3-(10'Z-PENTADECENIL)CATECOL (21).

Con la finalidad de aislar en forma individual los compuestos presentes en la porción CF-II metilada, se procedió a cromatografiar la mezcla en una columna abierta de gel de sílice Baker impregnada con AgNO₃ al 10%. Se recogieron un total de 42 fracciones de 25 mL cada una, utilizando como eluyentes hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina y se

combinaron aquellas que presentaban similitud cromatográfica. En el Cuadro 8 se resumen los sistemas de elución y las fracciones combinadas.

Cuadro 8. Resumen de la cromatografía en columna de la fracción CF-II metilada.

ELUYENTE	PROPORCION	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE
Hexano	100	1-12	1-10	CF-IIM-1
	95-5	13-20	11-20	CF-IIM-2
Hexano-AcOEt	90-10	21-25	21-33	CF-IIM-3
	85-15	26-29	34-40	CF-IIM-4
	50-50	30-35		
AcOEt	100	39-42	41-42	CF-IIM-5

La fracción combinada CF-IIM-2 estaba constituida principalmente por dos componentes (Cuadro 8) (162.5 mg). La purificación final de los compuestos se realizó mediante HPLC utilizando las condiciones descritas en la sección 7 de la parte experimental. El procedimiento repetido en sucesivas ocasiones, permitió la obtención de los compuestos 1,2 dimetóxi, 3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno (37) y 1,2 dimetóxi, 3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21). En el Cuadro 9 se resumen los resultados de la purificación de los compuestos 37 y 21, los tiempos de retención y los rendimientos para cada compuesto.

Cuadro 9. Resumen de la purificación de los compuestos mayoritarios de la fracción CF-IIM-2 utilizando HPLC.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCION (min)	APARIENCIA FISICA	RENDIMIENTO (mg)
a	8.99	aceite de color amarillo intenso	65.3
b	15.38	aceite de color amarillo	43.89

8.3 Obtención del β -sitosterol (38)

De la fracción secundaria inactiva CF-V cristalizaron espontáneamente 50 mg de un sólido cristalino de color blanco, el cual fue recrystalizado en metanol, obteniéndose 43 mg de un producto en forma de agujas con un punto de fusión de 133-135 °C, el cual fue identificado como el β -sitosterol (38) por comparación con una muestra auténtica.

8.4 Obtención de la sacarosa (39).

De la fracción primaria acuosa cristalizaron espontáneamente 1.380g de un sólido cristalino de color café claro, el cual fue purificado por sucesivas recrystalizaciones de metanol para generar 1.284 g de un compuesto cristalino con un punto de fusión de 165-168 °C (descomposición). El producto fue identificado por comparación con una muestra auténtica como la sacarosa (39).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 ANALISIS CUALITATIVO DE LOS ALQUILCATECOLES DE LA CORTEZA DE *Metopium brownei*.

Con la finalidad de cuantificar el contenido de alquilatecoles presentes en el extracto acetónico de la corteza de *M. brownei* se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a un sistema de espectrometría de masas (CG-EM) de una porción del extracto de la corteza fresca de la planta. Para ello, y de acuerdo a los procedimientos descritos en la literatura (Blau, 1993; ElSohly *et al.*, 1982, Gross *et al.*, 1975), el extracto se hizo reaccionar con el reactivo comercial SIGMA-SIL A, con la finalidad de formar los derivados sililados de los alquilatecoles presentes en el extracto.

Los resultados de este análisis indicaron que el extracto contenía tres alquilatecoles con una cadena lateral de 15 átomos de carbono y dos con una cadena lateral de 17 átomos de carbono (Tabla 1). Los primeros estaban presentes en un 99.15 % y los de cadena lateral de 17 átomos de carbono en un 0.85 %. Como se puede observar en la Tabla 1 los espectros de masas presentaron los fragmentos característicos para este tipo de compuestos en m/z de 267, 268 y 179, mismos que se generan de acuerdo al patrón de fragmentación indicado en la Figura 3 (Elsohly *et al.*, 1980 y 1982; Gross *et al.*, 1975). El cromatograma obtenido durante el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se muestra en la Figura 3a.

El análisis por CG-EM realizado en el presente trabajo evidenció de nueva cuenta la presencia de alquilatecoles en la corteza de *Metopium brownei*. El alquilatecol mayoritario contiene una cadena lateral de 15 átomos de carbono con dos insaturaciones. Este producto representa el 39.43 % de la mezcla. El otro compuesto presente en alta proporción fue el derivado con una cadena lateral monoinsaturada de 15 átomos de carbono (38.52 %). Los alquilatecoles con cadena lateral de 17 átomos de carbono incluyen uno con una cadena saturada (0.3 %) y otro con una cadena monoinsaturada (0.59 %). El total de alquilatecoles insaturados en la planta fue de 60.27%. Es importante hacer notar que la cantidad de alquilatecoles insaturados presentes es comparable a la encontrada en otras especies relacionadas que producen también severas dermatitis por contacto tardía (Gross *et al.*, 1975, ElSohly *et al.*, 1980; 1982 y 1986).

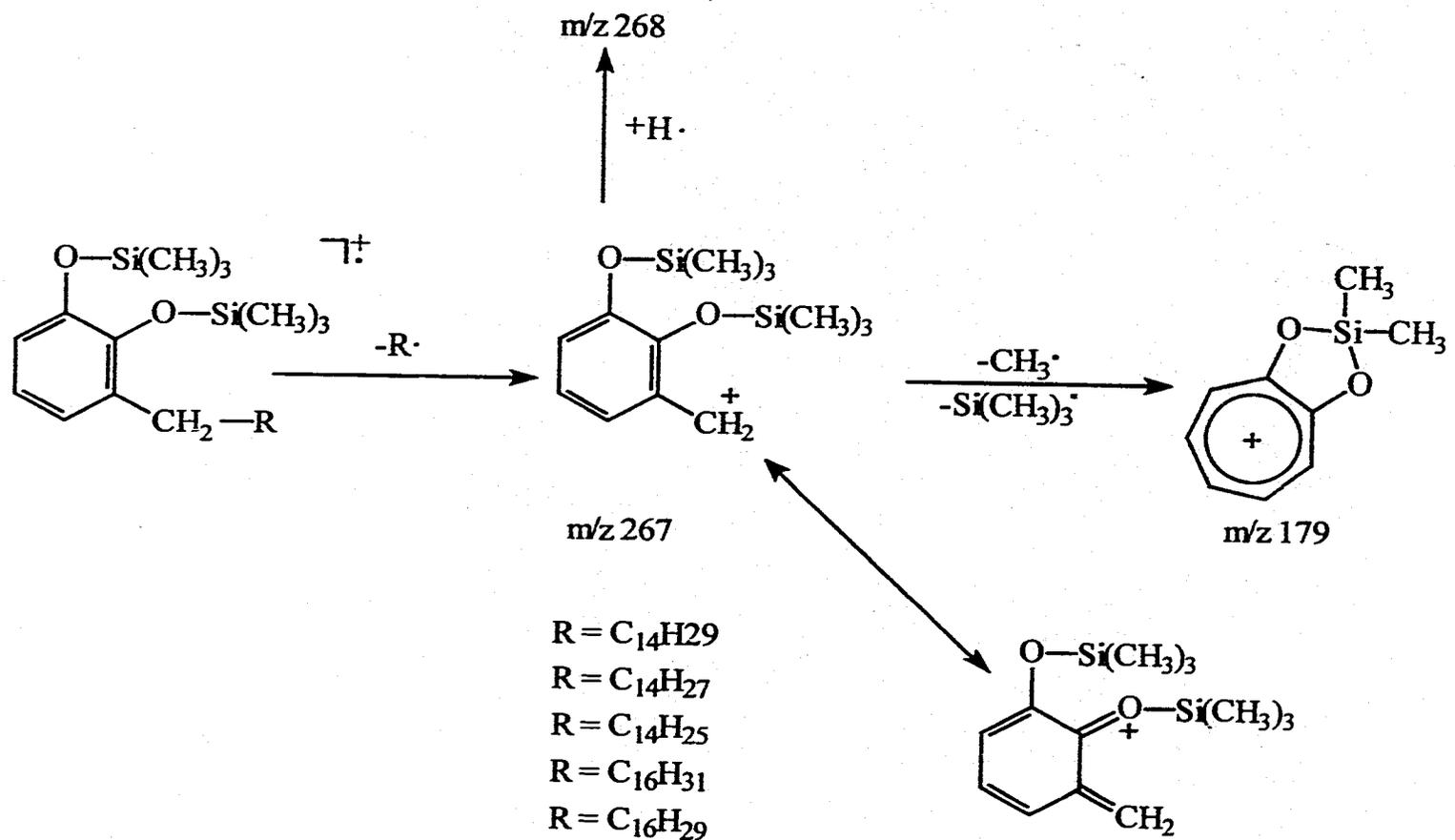


Figura 3. Patrón de fragmentación propuesto para los derivados sililados de los alquilatecoles (ElSohly *et al.*, 1980 y 1982).

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos del análisis por cromatografía de gases acoplado a un sistema de espectrometría de masas por impacto electrónico del extracto sililado de *M. brownii* (Figura 3).

NUMERO DE PICO	TIEMPO DE RETENCION (min)	EMIE	% 3-ALQUILCATECOLES EN LA MEZCLA	TIPO DE ALQUILCATECOL	ESPECTRO
1	24.23	[464 M ⁺ (48)], 449 (6), 269 (4), 268 (8), 179 (10) y 79 (100)	21.16	C-15 (saturado)	1
2	24.54	[462 M ⁺ (100)], 447 (25), 268 (17), 267 (20), 179(18),147 (5), 73 (95) y 52 (57)	38.52	C-15 (monoinsat.)	2
3	24.69	[460 M ⁺ (100)], 445 (10), 267 (12), 268 (4), 179 (8), 147 (12), 79 (100), 73 (50) y 52 (58)	39.43	C-15 (diinsat.)	3
4	26.22	[490 M ⁺ (42)], 475 (4), 355 (10) 268 (9), 267 (7), 179 (8) y 73 (64).	0.30	C-17 (saturado)	4
5	26.31	[488 M ⁺ (100)], 473 (10), 268 (11), 267 (12), 179 (12) y 73 (82).	0.59	C-17 (monoinsat.)	5

El rendimiento total de la mezcla de 3-alkilcatecoles calculado en base a planta húmeda fue de 1.2%.

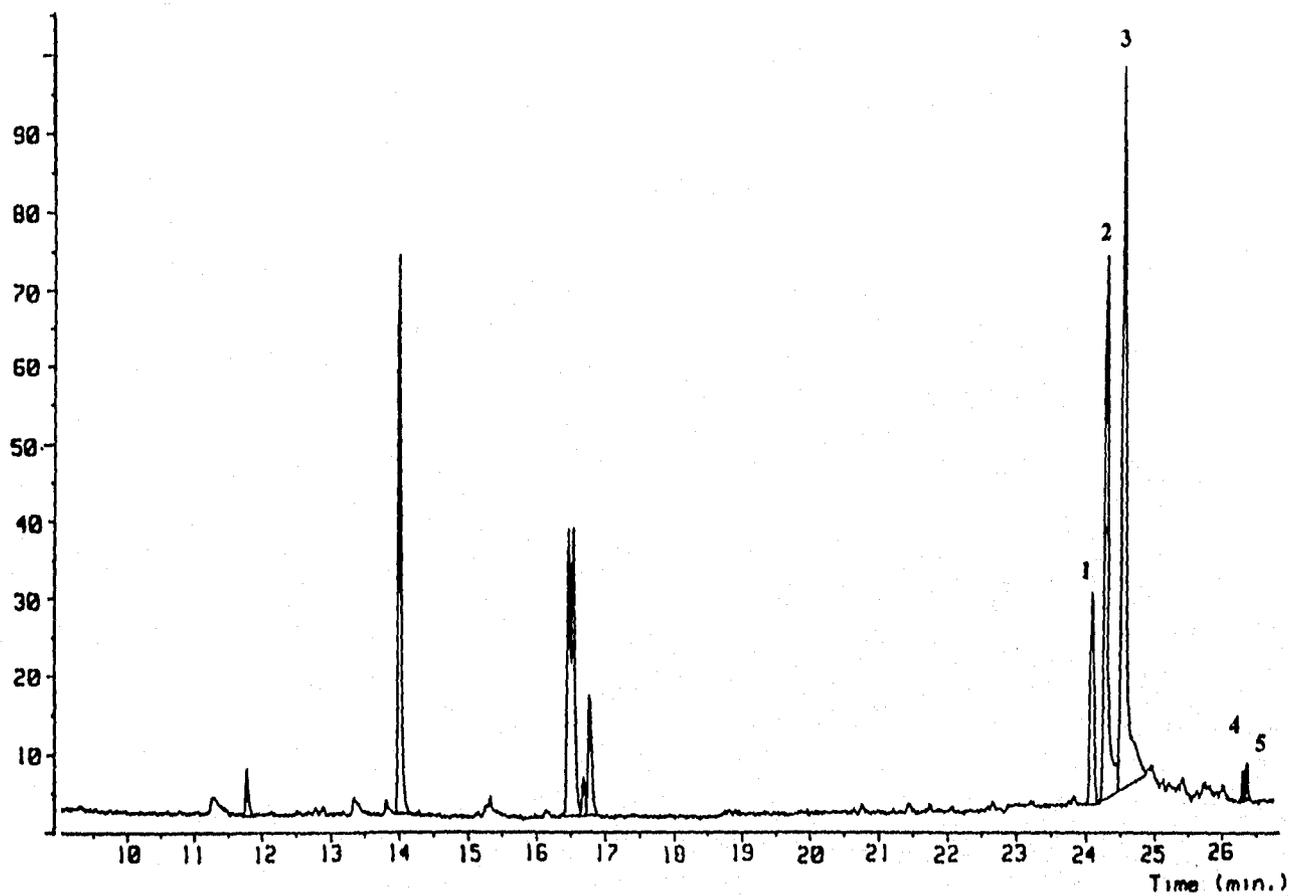


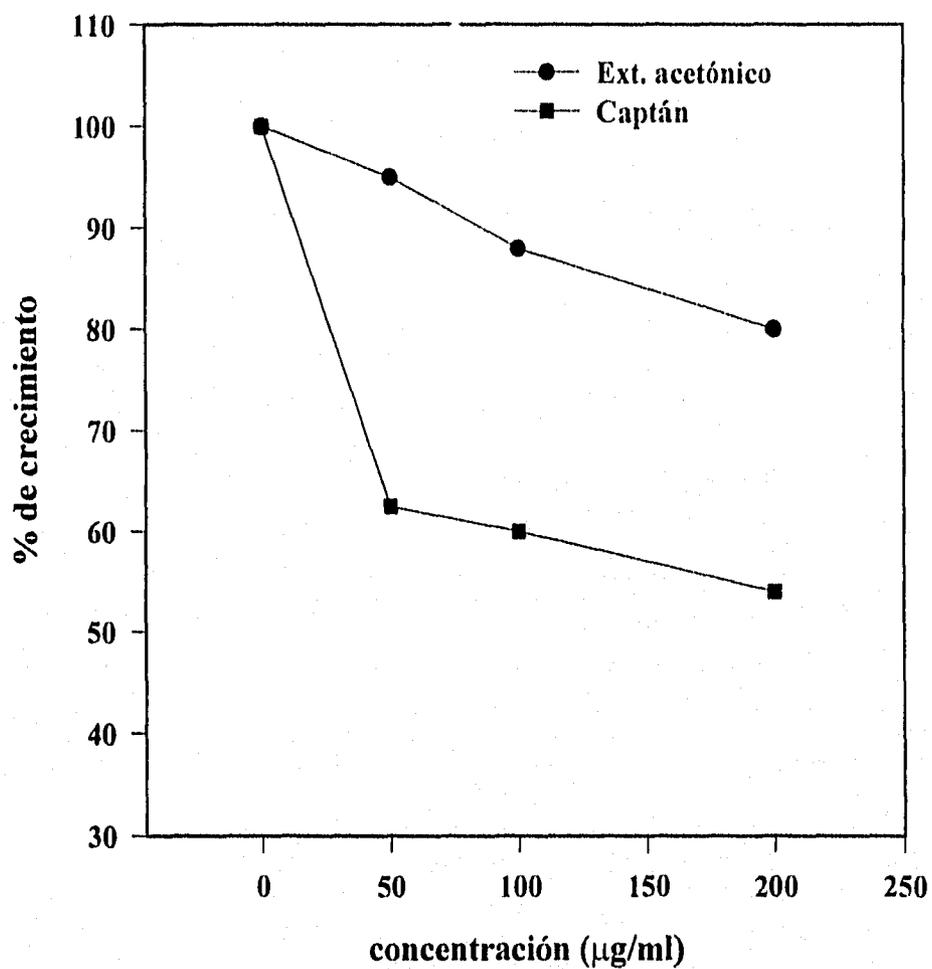
Figura 3a. Análisis mediante cromatografía de gases del extracto acetónico sililado de la corteza fresca de *M. brownii*. Asignación de picos: 1, C-15 saturado; 2, C-15 monoinsaturado; 3, C-15 di-insaturado; 4, C-17 saturado y 5, C-17 monoinsaturado. Condiciones cromatográficas: columna capilar PAS-1701-Tested Silicone HP; temperatura de la columna 150°C → 260°C a 10°C/min; gas acarreador, helio con una presión manométrica de 0.6 Kg/cm² y con un flujo de 2 mL/min.

4.2 EVALUACIONES BIOLÓGICAS PRELIMINARES

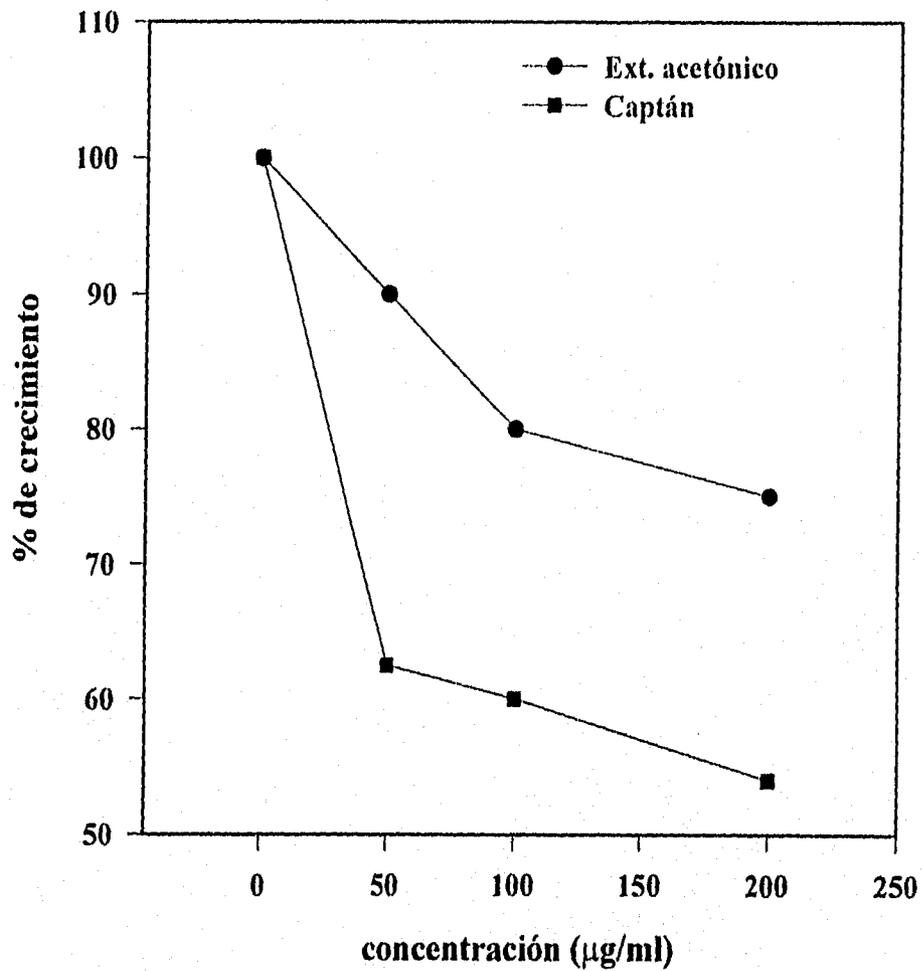
Con la finalidad de determinar el potencial fungicida del extracto acetónico de la corteza de *M. brownii* se evaluó su efecto sobre el crecimiento radial de los hongos fitopatógenos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum*. La selección de los hongos fitopatógenos se realizó considerando que los mismos ocasionan grandes pérdidas en cultivos de importancia económica (Aguirre, 1985). Para determinar la actividad antifúngica del extracto, se utilizó un método de dilución en agar siguiendo los procedimientos descritos en la literatura (Castañeda *et al.*, 1992). El extracto se evaluó a tres concentraciones (50, 100 y 200 µg/mL), utilizando como control positivo el fungicida comercial Captán. Los resultados de estas evaluaciones se indican en la Gráficas 1 y 2. Como se observa en las mismas el extracto inhibió de manera significativa el crecimiento de los hongos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum*. De manera adicional el extracto también demostró una toxicidad significativa sobre *Artemia salina*, ya que la concentración letal media (CL₅₀) encontrada fue de 123.93 µg/mL (Anderson *et al.*, 1991).

Con base en los resultados derivados de las evaluaciones biológicas preliminares (toxicidad para *A. salina* y el efecto sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos) es evidente que la especie *M. brownii* constituye una fuente potencial de principios larvicidas y antifúngicos. Es importante destacar que la selección de la acetona como disolvente de extracción se realizó con base en la toxicidad observada contra el crustáceo *A. salina*. La mejor actividad se encontró con el extracto acetónico. Los extractos hexánico y metanólico presentaron una CL₅₀ de 250 y 300 µg/mL, respectivamente.

Adicionalmente la acetona es el disolvente más adecuado para la extracción de compuestos del tipo alquilcatecol (ElSohly *et al.*, 1980 y 1982; Tyman, 1979 y 1991).



Gráfica 1. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones del extracto acetónico de *M. brownii*; como control positivo se utilizó el fungicida comercial Captán.



Gráfica 2. Inhibición del crecimiento radial de *Helminthosporium longirostratum* inducidas por el tratamiento a diferentes concentraciones del extracto acetónico de *M. brownii*, como control positivo se utilizó el fungicida comercial Captán.

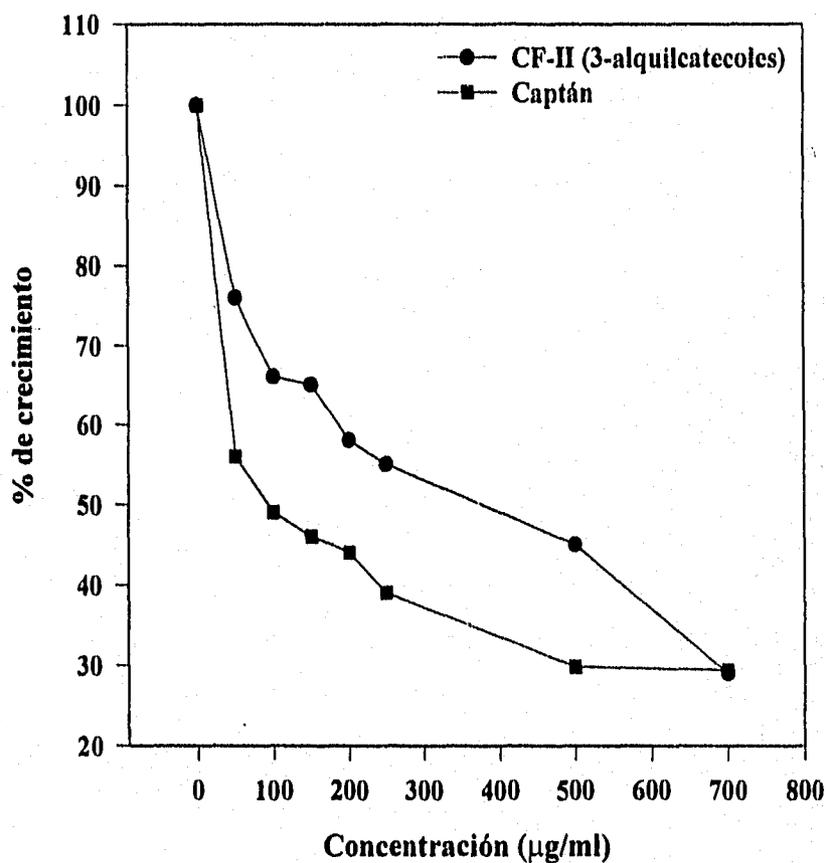
4.3 AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA CORTEZA DE *M. browni*.

Con la finalidad de aislar los principios activos detectados mediante los bioensayos de la determinación de la toxicidad para las larvas del crustáceo *A. salina* y de la inhibición del crecimiento radial de las especies de hongos fitopatógenos *Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum* y el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de gases (CG-EM), el extracto acetónico activo de la corteza de *M. browni* se fraccionó de manera preliminar mediante un proceso de partición entre cloroformo y agua. Como resultado de este proceso se obtuvieron dos fracciones primarias. Las dos fracciones se ensayaron biológicamente, utilizando de nueva cuenta la determinación de la toxicidad para *A. salina*. La actividad tóxica se concentró en la fracción orgánica ($CL_{50} = 110.19 \mu\text{g/mL}$), esta fracción además reaccionó positivamente con el reactivo de FeCl_3 . La fracción acuosa presentó una concentración letal media mayor a $1000 \mu\text{g/mL}$ y no presentó una reacción positiva con FeCl_3 . Para monitorear la actividad antifúngica, se utilizó un método bioautográfico (Hamburger *et al.*, 1987) y en este caso la actividad antifúngica se concentró principalmente en la fase orgánica, especialmente en la zona con factor de retención de 0.45 en un sistema de CHCl_3 -MeOH (95:5).

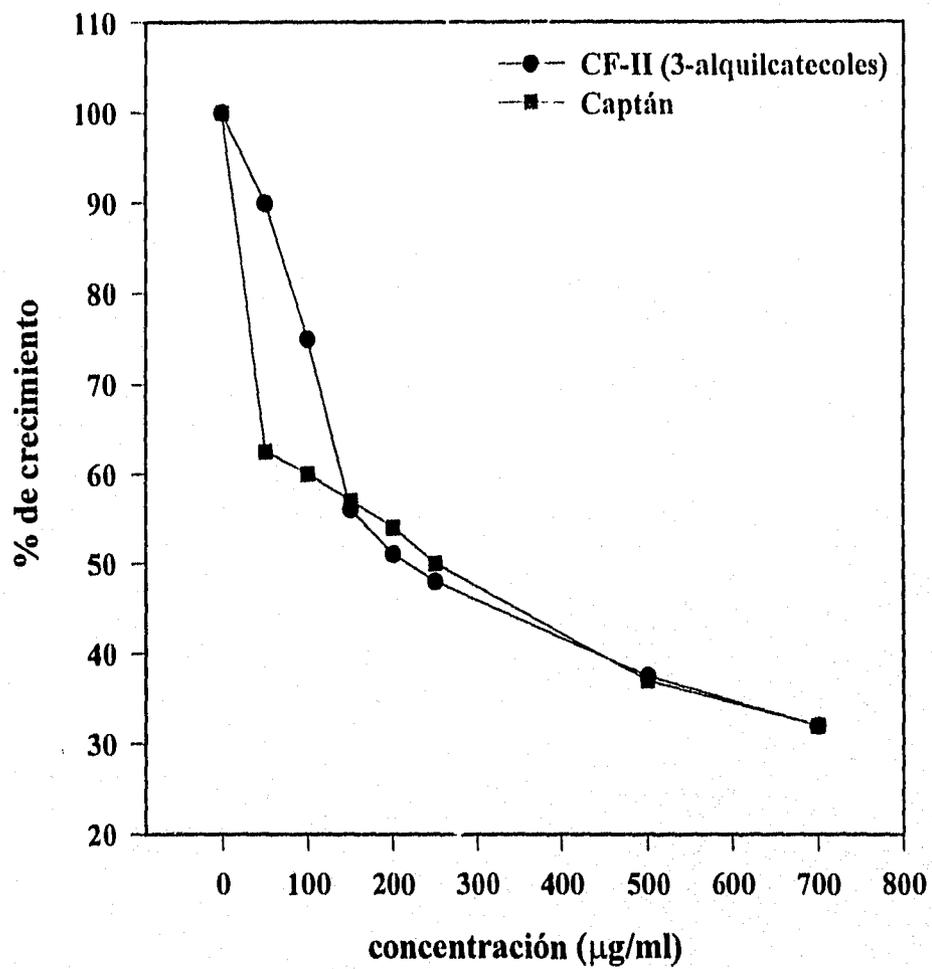
La fracción orgánica activa se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando como adsorbente gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de ocho fracciones secundarias (Cuadro 6, sección experimental). La fracción CF-II demostró una toxicidad para *A. salina* de $89.13 \mu\text{g/mL}$. Esta fracción también fue la única que demostró actividad antifúngica al realizar el ensayo bioautográfico. La evaluación mediante el método de dilución en agar demostró que esta fracción inhibía de manera significativa el crecimiento radial de las dos especies de hongos de prueba (Gráficas 3 y 4). Como se observa en las Gráficas 3 y 4, la fracción CF-II presentó una mayor actividad contra la especie *Helminthosporium longirostratum*, en tanto que la especie *Fusarium oxysporum* resultó menos sensible. La inhibición inducida por la fracción CF-II sobre el crecimiento radial de ambas especies de hongos fue muy similar a la demostrada por el fungicida comercial Captán, utilizado como control positivo en el presente diseño experimental.

La coloración azul desarrollada en los cromatogramas en capa delgada de la fracción CF-II reveladas con el reactivo de FeCl_3 confirmó la naturaleza fenólica de los compuestos presentes en esta fracción (Wannan, 1985). Con la finalidad de conocer si los fenoles presentes en la fracción activa CF-

II eran de tipo alquilatecol, se realizó un estudio preliminar mediante RMN¹H. El espectro de RMN¹H (Espectro 6) de la fracción activa CF-II utilizando como disolvente cloroformo deuterado indicó que los únicos constituyentes presentes eran de tipo alquilatecol. El espectro presentó señales en δ 0.89 (m), 1.30 (ma), 1.65 (ma), 2.05 (m), 2.3 (t), 2.6 (t), 5.2 (s) (intercambiable con agua deuterada), 5.35 (m) y 6.7 (s). La apariencia de multiplete no definido de la señal en δ 0.89 era congruente con la presencia de una mezcla de alquilatecoles en la fracción activa CF-II.



Gráfica 3. Inhibición del crecimiento radial del *Fusarium oxysporum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones tratadas con diferentes concentraciones de la mezcla de 3-alquilatecoles de la fracción CF-II. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.



Gráfica 4. Inhibición del crecimiento radial del *Helminthosporium longirostratum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones tratadas con diferentes concentraciones de la mezcla de 3-alkilcatecoles de la fracción CF-II. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.

De estos resultados obtenidos, se podía concluir que los principios fungicidas y larvicidas detectados mediante las evaluaciones preliminares, eran los alquilatecoles evidenciados mediante el análisis por CG-EM.

Con la finalidad de separar los alquilatecoles presentes en la fracción CF-II se plantearon dos estrategias. La primera consistió en tratar de separar los constituyentes individuales de la mezcla en forma libre, sin derivatizar, utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución. Sin embargo, este procedimiento no resultó exitoso debido a la alta susceptibilidad a la oxidación que se producía en los compuestos presentes en la fracción. Por lo tanto se procedió a implementar la segunda estrategia que consistió en la separación de los alquilatecoles bajo la forma de sus correspondientes derivados acetilados (por tratamiento con anhídrido acético y piridina) ó metilados (por tratamiento con una solución etérea de diazometano). Los detalles experimentales utilizados en cada caso se describen en la sección experimental.

La separación de los derivados acetilados se realizó mediante cromatografía en capa delgada utilizando la argentación del soporte. Este procedimiento permitió el aislamiento de tres compuestos mayoritarios bajo la forma de sus diacetil derivados. Los compuestos se identificaron como el 3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (**37**), con un rendimiento de 12.3 mg, el segundo como el 3-(10'*Z*, pentadecenil)catecol (**21**), obtenido con un rendimiento de 10.24 mg y el tercero como 3-pentadecilcatecol (**23**) con un rendimiento de 6.78 mg. El producto **37** constituye un nuevo producto natural.

Por otra parte, la fracción metilada CF-II se recromatografió en una columna de gel de sílice impregnada con nitrato de plata al 10% y como resultado de este proceso se obtuvieron cinco fracciones secundarias, siendo la fracción CF-II-2 metilada la que contenía la mezcla de 3-alquilatecoles. La purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en la fracción CF-II-2 metilada, se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) utilizando la metodología que se describe en la sección 7 de la parte experimental. Este proceso permitió la obtención de los alquilatecoles **37** y **21** como derivados dimetilados con tiempos de retención de 8.99 y 15.37 min, respectivamente. Esta estrategia representó una mejor opción ya que se obtuvieron mejores rendimientos que en el caso de la separación por cromatografía en capa delgada. En la Figura 4 se ilustra el cromatograma obtenido durante la separación de los compuestos de la fracción CF-II-2 metilada.

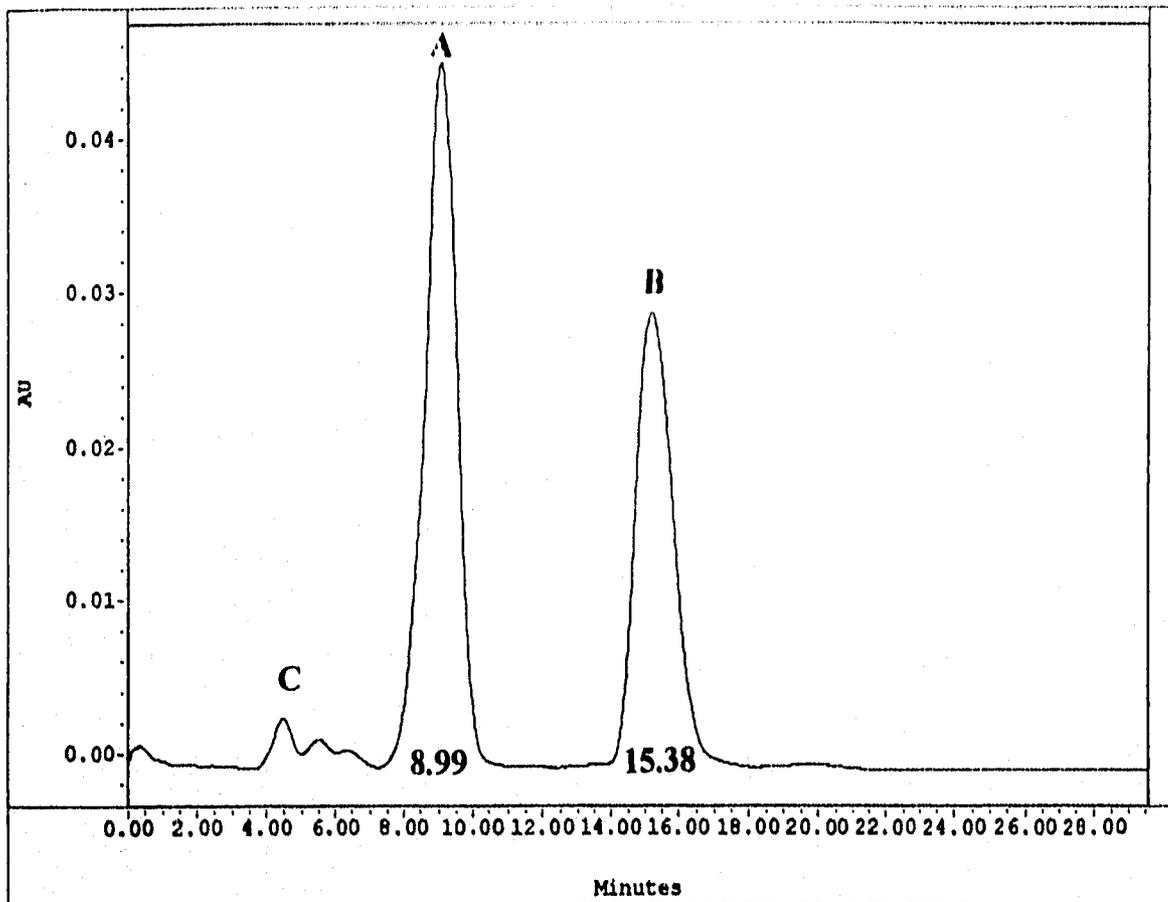


Figura 4. Análisis mediante cromatografía de líquidos de la fracción CF-II-2 metilada (Cuadro 6). Condiciones instrumentales: columna fase reversa μ Bondapak (Waters, 3.9 x 300, 10 μ m), fase móvil, acetonitrilo-agua-ácido acético (80:20:2), detector UV WATERS 486, concentración 5 mg/mL y se inyectaron alícuotas de 10 μ L. Asignación de picos: **A**, 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benceno (37m); **B**, 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*-pentadecenil)benceno (21m) y **C**, impurezas.

4.4 CARACTERIZACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS 3-(10'Z, 13'E-PENTADECADIENIL)CATECOL (37), 3-(10'Z-PENTADECENIL)CATECOL (21) Y 3-PENTADECENILCATECOL (23) BAJO LA FORMA DE LOS DERIVADOS DIACETILADOS Y DIMETILADOS.

En la presente sección se describirá en detalle la caracterización de los derivados diacetilados y dimetilados de los alquilocatecoles obtenidos en el presente estudio y se hace particular énfasis en el nuevo producto natural.

4.4.1 IDENTIFICACIÓN DEL 3-(10'Z, 13'E-PENTADECADIENIL)CATECOL BAJO LAS FORMA DE SUS DERIVADOS DIACETILADO (37a) Y DIMETILADO (37m).

El compuesto 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a) se aisló como un líquido aceitoso incoloro e inodoro. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 37a se describen en el Cuadro 9. Su fórmula molecular se estableció como $C_{25}H_{36}O_4$ mediante espectrometría de masas, la cual permitía seis insaturaciones (Espectro 7). El espectro de IR del compuesto (Espectro 8) presentó señales para grupo carbonilo de éster (1770 cm^{-1}) y señales para vibraciones carbono-hidrógeno ($2929\text{-}2856\text{ cm}^{-1}$). El espectro de UV presentó un máximo de absorción en 207 nm (Espectro 9). El derivado 1,2-dimetoxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecenil)benceno (37m) se aisló como un líquido de consistencia aceitosa de color amarillo claro, con un tiempo de retención de 8.99 min (Figura 4). Su fórmula molecular se estableció como $C_{23}H_{36}O_2$ mediante espectrometría de masas (Espectro 10). Las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto 37m se resumen en el Cuadro 10.

Los espectros de RMN^1H de los derivados 37m y 37a (Espectros 11 y 12) mostraron el perfil típico para compuestos de tipo alquilocatecol, (ElSohly *et al.*, 1982; Du *et al.*, 1986), presentando las siguientes señales diagnósticas:

a) Un sistema ABC para tres hidrógenos aromáticos de un benceno 1,2,3 trisustituido. En el caso del derivado acetilado (37a), este sistema se observó en δ 7.18 (dd, $J= 7.5$ y 7.5 Hz), δ 7.11 (dd, $J= 7.5$ y 1.8 Hz) y en δ 7.03 (dd, $J= 7.5$ y 1.8 Hz). En el derivado 37m (Espectro 11), el sistema se encontraba en δ 6.94 (dd, $J=7.9$ y 7.9 Hz, H-5), 6.74 (dd, $J= 7.9$ y 1.8 Hz, H-6) y 6.70 (dd, $J= 7.9$ y 1.8 Hz, H-4).

- c) Un multiplete para metileno en δ 2.80. Esta señal mostró una correlación con las señales para los protones vinílicos ubicadas en el rango de δ 5.34-5.45 en los espectros de correlación homonuclear (Figura 5 y Figura 6). Con base en su desplazamiento químico este multiplete era asignable a un metileno ubicado entre dos dobles ligaduras.
- d) Un triplete ($J=7.9$ Hz) característico para un metileno bencílico en δ 2.50.
- e) Una señal para un metileno vecino a una doble ligadura en δ 2.06. Esta señal mostró en el espectro de correlación homonuclear un pico cruzado con las señales para protones vinílicos.
- f) Un doblete ($J=3.5$ Hz) característico para un metilo sobre doble ligadura en δ 1.59. Esta señal mostraba en el espectro COSY una correlación con las señales de los hidrógenos vinílicos (Figuras 5 y 6).

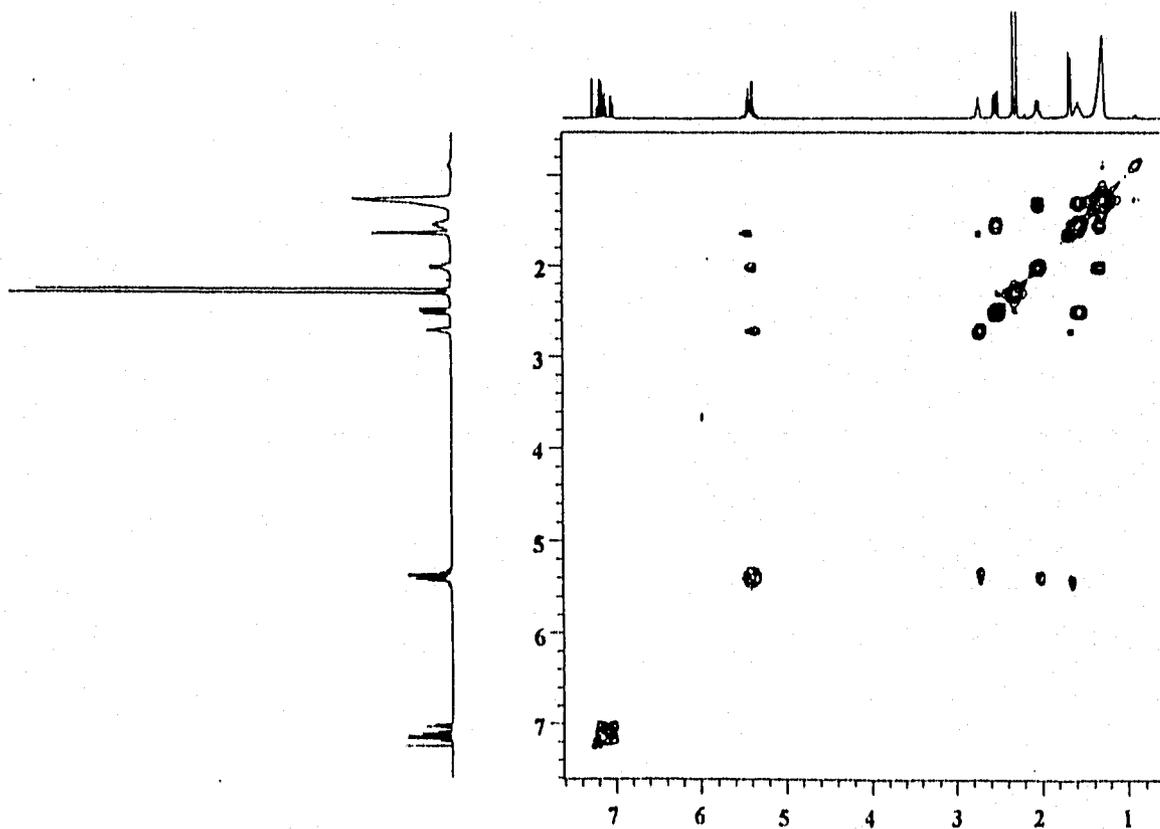


Figura 5. Espectro COSY del 1,2 diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol.

g) Dos multipletes anchos asignables a metilenos alifáticos en δ 1.27-1.52.

h) Por último en el caso del espectro de RMN¹H (Espectro 11) del derivado diacetilado (37a) se aprecian dos singuletes en δ 1.76 y δ 1.87 asignables a las dos señales para metilos de grupos acetato. En el caso del espectro de RMN¹H del derivado metilado (Espectro 12) se observa la presencia de dos singuletes en δ 3.85 y δ 3.81 característicos para grupos metoxilo unidos a anillo aromático. Cabe mencionar que todas estas señales se encontraban ausentes en la RMN¹H de la fracción CF-II sin derivatizar (Espectro 1).

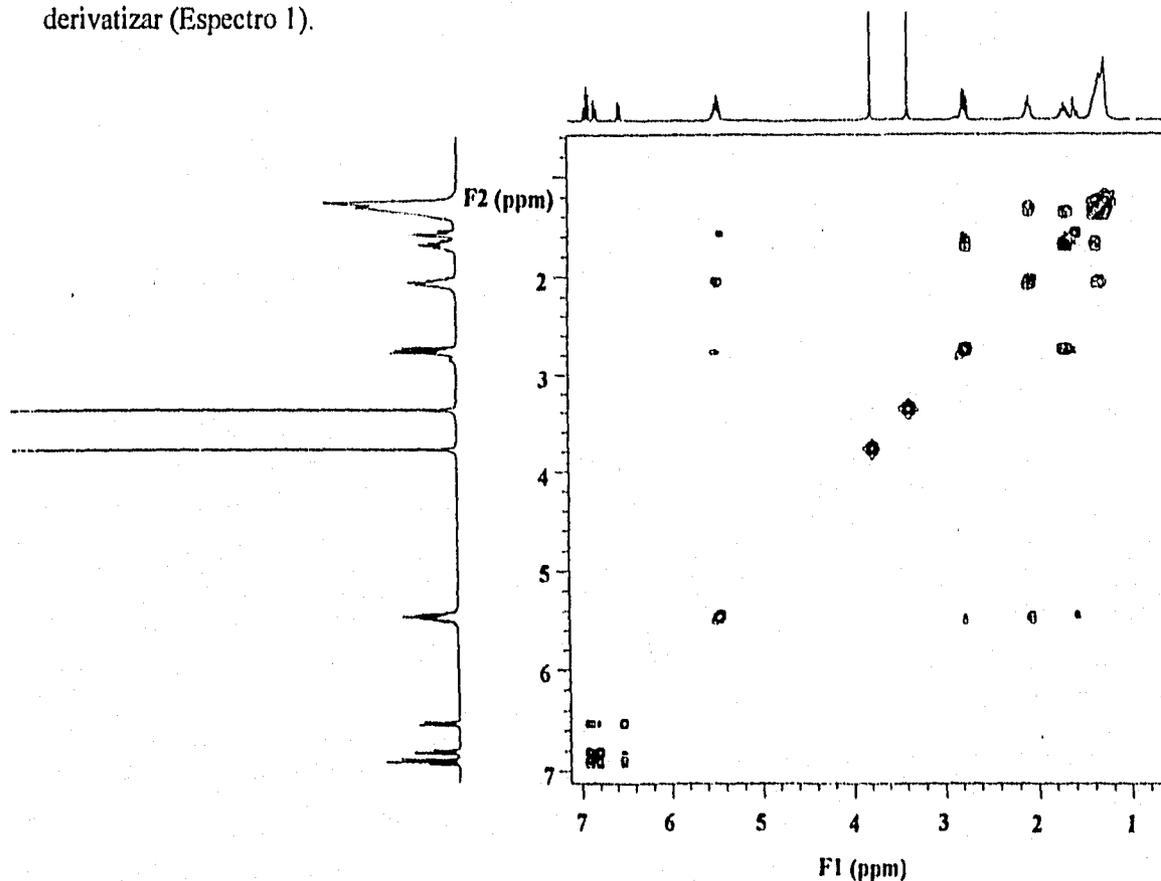


Figura 6. Espectro COSY del 1,2-dimetoxi-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)benceno.

Los espectros de RMN¹³C mostraron también las características de un 3-alkilcatecol (ElSohly *et al.*, 1982; Du *et al.*, 1986). En el caso del derivado acetilado (37a) el espectro de RMN¹³C (Espectro 13) mostró señales para 25 átomos de carbono, en congruencia con la fórmula molecular. El análisis detallado del espectro de RMN¹³C modalidad DEPT (Espectro 14) del compuesto acetilado, indicó claramente que las resonancias correspondían a tres metilos, diez metilenos, siete metinos y cinco

carbonos cuaternarios. De acuerdo con su desplazamiento químico, el metilo en δ 17.90 se encontraba sobre un carbono olefínico y las dos señales para metilos ubicadas en δ 20.32 y δ 20.69 se asignaron a los metilos de los grupos acetato. Las señales correspondientes a los grupos metileno en δ 27.08, 29.5, 29.79 y 30.43 se asignaron como sigue: la señal en δ 27.08 a un metileno vecino a dos dobles ligaduras (C-12') con base en su desplazamiento químico y en las interacciones mostradas en el espectro HETCOR (Figura 7); la señal en δ 29.5 a los metilenos alifáticos C-3', C-4', C-5', C-6', C-7' y C-8'; la señal en δ 29.79 a C-2' y la señal en δ 30.43 al metileno bencílico (C-1'). Las señales correspondientes a grupos metino en δ 120.79, 126.18 y 127.22 se asignaron a los carbonos aromáticos C-4, C-5 y C-6, respectivamente. Por otro lado los metinos en δ 125.07, 127.62, 129.62 y 130.42 correspondían a las dos dobles ligaduras (C-14, C-13, C-11 y C-10, respectivamente). Las señales correspondientes a carbonos cuaternarios en δ 136.73, 140.54 y 142.45 eran atribuibles a los carbonos C-3, C-1 y C-2, respectivamente. Por último, las señales en 168.20 y 168.36 se asignaron a los carbonilos de los dos grupos acetato.

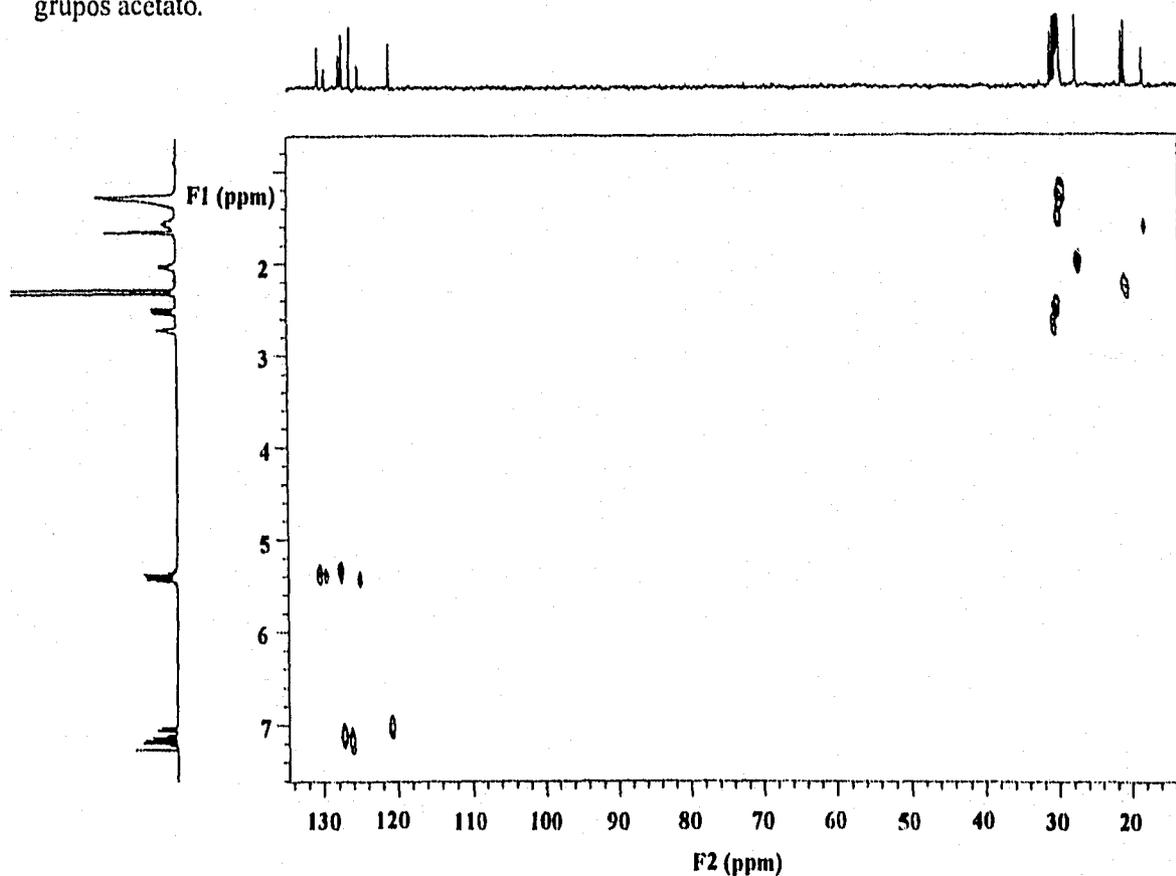
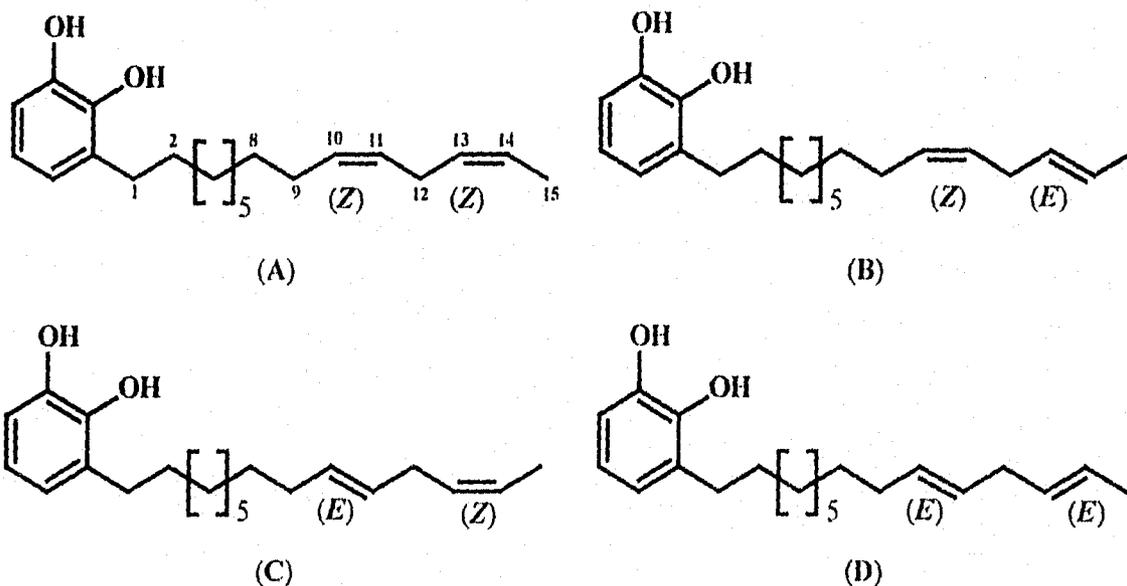


Figura 7. Espectro HETCOR del 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol.

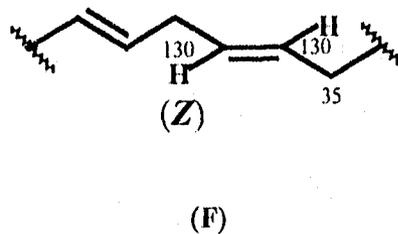
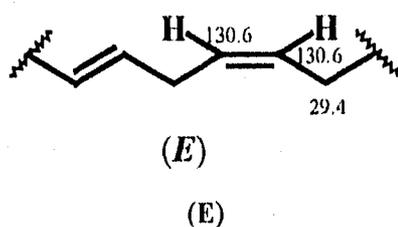
En el caso del derivado metilado del producto (37m). El espectro de RMN¹³C (Espectro 15) presentó señales para 23 átomos de carbono, y en lugar de las señales para los dos grupos acetato se observan las señales características de los dos grupos metilos de una función éter en δ 3.85 y δ 3.81. El resto de las señales, eran prácticamente idénticas a las del derivado acetilado (Espectro 16, 17 y Figura 8).

Los elementos estructurales evidenciados hasta el momento permitieron corroborar la presencia de un 3-alkilcatecol con una cadena lateral de 15 átomos de carbono con dos insaturaciones. Esta cadena lateral debería contener además un grupo metilo terminal sobre doble ligadura y dos insaturaciones separadas por un metileno. Con base en estas consideraciones era evidente que la estructura del producto natural acetilado podía corresponder con alguna de las posibilidades estructurales A-D que se indican a continuación:

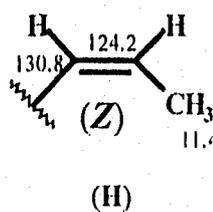
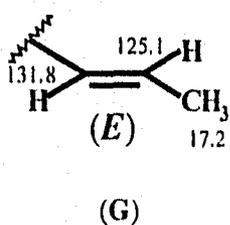


Para discriminar entre las cuatro posibilidades, se compararon los datos del desplazamiento químico de ¹³C de los metilenos alílicos del producto natural acetilado (37a) con los datos descritos en la literatura para metilenos alílicos de otros compuestos similares. Como se observa en las estructuras

parciales E y F los desplazamientos químicos para los metilenos alílicos varían dependiendo de la estereoquímica Z ó E del doble enlace (Breitmaier *et al.*, 1994; Dorman *et al.*, 1971, Fiedel, *et al.* 1963; *inter alia*). Este análisis comparativo permitió asignar la configuración de la doble ligadura entre C-10' y C-11' como Z.

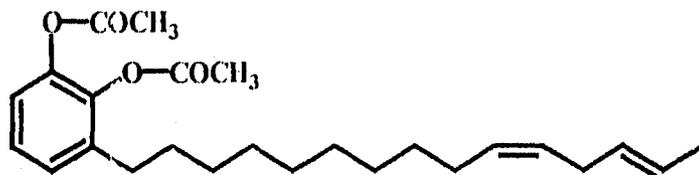


La asignación de la configuración de la doble ligadura ubicada en 13' y 14', se realizó siguiendo una estrategia similar. En este caso, se compararon los desplazamientos químicos del metilo sobre la doble ligadura y del metileno ubicado entre las dobles ligaduras (Fiedel, *et al.*, 1963 y Haan *et al.*, 1973). El desplazamiento químico de δ 17.4, observado para el metilo terminal, era congruente con una estereoquímica E por analogía con la estructura parcial G.



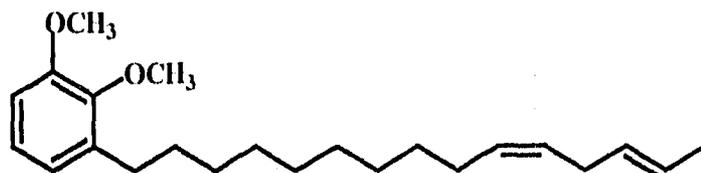
Con base en los resultados analizados anteriormente, la estructura del producto natural 37 se estableció como el 3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol. Es importante mencionar que este catecol constituye un nuevo producto natural.

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de 1,2-diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37a).



Fórmula molecular	C ₂₅ H ₃₆ O ₄
IRvmax (cm⁻¹) (Espectro 8)	2727, 2856, 1768, 1467 1713, 1172 y 1014
UV (λ, max) (Espectro 9)	207
RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm) (Espectro 11)	7.17 (dd, J=7.5 y 7.5 Hz, H-5), 7.11 (dd, J= 7.5 y 1.8 Hz, H-6), 7.03 (dd, J= 7.5 y 1.8 Hz, H-4), 5.4-5.35 (ma, H-10', H-11',H-13' y H-14'), 2.72 (m, H-12'), 2.51 (t, J= 7.9 Hz, H-1'), 2.31 (s, COCH ₃), 2.27 (s, COCH ₃), 2.02 (m, H-9'), 1.59 (d, J=3.5, H-15'), 1.53 (ma, H-2') y 1.22-1.37 (ma, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7' y H-8').
RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm) (Espectro 13)	168.3 (COCH ₃), 168.2 (COCH ₃), 142.4 (C-1), 140.5 (C-2), 136.7 (C-3), 130.42 (C-13'), 129.62 (C-11'), 127.5 (C-10'), 127.22 (C-4), 126.8 (C-5), 125.1 (C-14'), 120.8 (C-6), 30.43 (C-1'), 29.79 (C-2'), 29.48 (C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'y C-8'), 27.9 (C-12'), 27.1 (C-9'), 20.7 (COCH ₃), 20.32 (COCH ₃) y 17.9 (C-15')
EMIE M⁺ m/z (int./rel.) (Espectro 7)	M ⁺ [400 (8.2)], 382 (5), 357 (21), 316 (55), 264 (43), 263 (21), 236 (8), 189 (7), 163 (18), 149 (63), 136 (32), 123 (100), 109 (15), 95 (24), 81 (18), 43 (47) y 41 (12)

Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadeca-
dienil)benceno (**37m**).



Fórmula molecular	$C_{22}H_{36}O_4$
RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm) (Espectro 12)	6.94 (dd, J=7.9 y 7.9 Hz, H-5), 6.74 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-6), 6.70 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-4), 5.45-5.35 (ma, H-10', H-11',H-13' y H-14'), 3.85 (s, <u>OCH₃</u>), 3.81 (s, <u>OCH₃</u>), 2.72 (m, H-12'), 2.51 (t, J= 7.9 Hz, H-1'), 2.02 (m, H-9'), 1.59 (d, J=3.5, H-15'), 1.53 (ma, H-2') y 1.22-1.37 (ma, H-3', H-4', H-5', H-6', H-7' y H-8').
RMN¹H (Benceno- d₆, 300 MHz, ppm) (Espectro 12a)	6.9 (dd, J=7.9 y 7.9 Hz, H-5), 6.8 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-6), 6.53 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-4), 5.5-5.45 (ma, H-10', H-11',H-13' y H-14'), 3.76 (s, <u>OCH₃</u>), 3.35 (s, <u>OCH₃</u>), 2.80 (m, H-12'), 2.73 (t, J= 8 Hz, H-1'), 2.05 (m, H-9'), 1.68 (H-2'), 1.59 (d, J=4, H-15') y 1.23-1.39 (ma, H-3' y H-4'-H-8').
RMN¹³C (Benceno- d₆, 75 MHz, ppm) (Espectro 15)	149 (C-1), 148.14 (C-2), 136 (C-3), 130.7 (C-13' y C-14'), 130.2 (C-10' y C-11'), 123.69 (C-4), 122.4 (C-5), 110.9 (C-6), 60.2 (<u>OCH₃</u>), 55.32 (<u>OCH₃</u>), 30.8 (C-1'), 30.2 (C-2'), 30.0 (C-3' a C-8'), 27.49 (C-9'), 22.7 (C-12') y 17.9 (C-15').
EMIE M⁺ m/z (int./rel.) (Espectro 10)	M ⁺ [344 (55)], 313 (5), 276 (9), 262 (11), 248 (6), 191 (23), 164 (25), 151 (100), 136 (60) 165 (7), 121 (18), 95 (17), 91 (28), 81 (17), 67 (5), 55 (12) y 41 (9).

4.4.2 IDENTIFICACIÓN DEL 3-(10'Z-PENTADECENIL)CATECOL BAJO LAS FORMA DE SU DERIVADO DIACETILADO (21a) Y DE SU DERIVADO DIMETILADO (21m).

El diacetil derivado del 3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a) se aisló como un líquido aceitoso incoloro. Sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se resumen en el Cuadro 11. La fórmula molecular de 21a se estableció como $C_{25}H_{38}O_4$ mediante espectrometría de masas (Espectro 17), la cual permite cinco grados de insaturación, uno menos que para el compuesto 37a. El espectro de IR mostró señales características para grupo carbonilo de éster (1770 cm^{-1}) en y para vibraciones carbono hidrógeno (2929 cm^{-1}) (Espectro 18). El derivado metilado 21m se aisló como un líquido aceitoso de color amarillo claro. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno se resumen en el Cuadro 12.

Los espectros de los derivados del producto 21 fueron muy similares a los obtenidos para los derivados correspondientes del compuesto 37 y claramente indican que el producto natural era un 3-alkilcatecol con una cadena lateral de 15 átomos de carbono monoinsaturada. Las principales diferencias entre los espectros de RMN¹H de los derivados de 21 y 37 fueron las siguientes:

- 1) En lugar de la señal correspondiente para metilo sobre doble ligadura (δ 1.59) se observó un triplete centrado en δ 0.89 ($J=5.1$). Esta señal era asignable a un metilo terminal unido a un grupo metileno (Espectro 20 y Espectro 21).
- 2) En ninguno de los casos se observó la señal correspondiente a un metileno entre dos dobles ligaduras. En su lugar, ambos espectros presentaron una señal que integraba para cuatro hidrógenos, asignable a dos grupos metileno vecinos a una doble ligadura. En el compuesto 21a, esta señal se observó en δ 2.01 y en el caso del compuesto 21m se observó en δ 2.02.
- 3) La región olefinica era de menor complejidad e integraba sólo para dos hidrógenos.

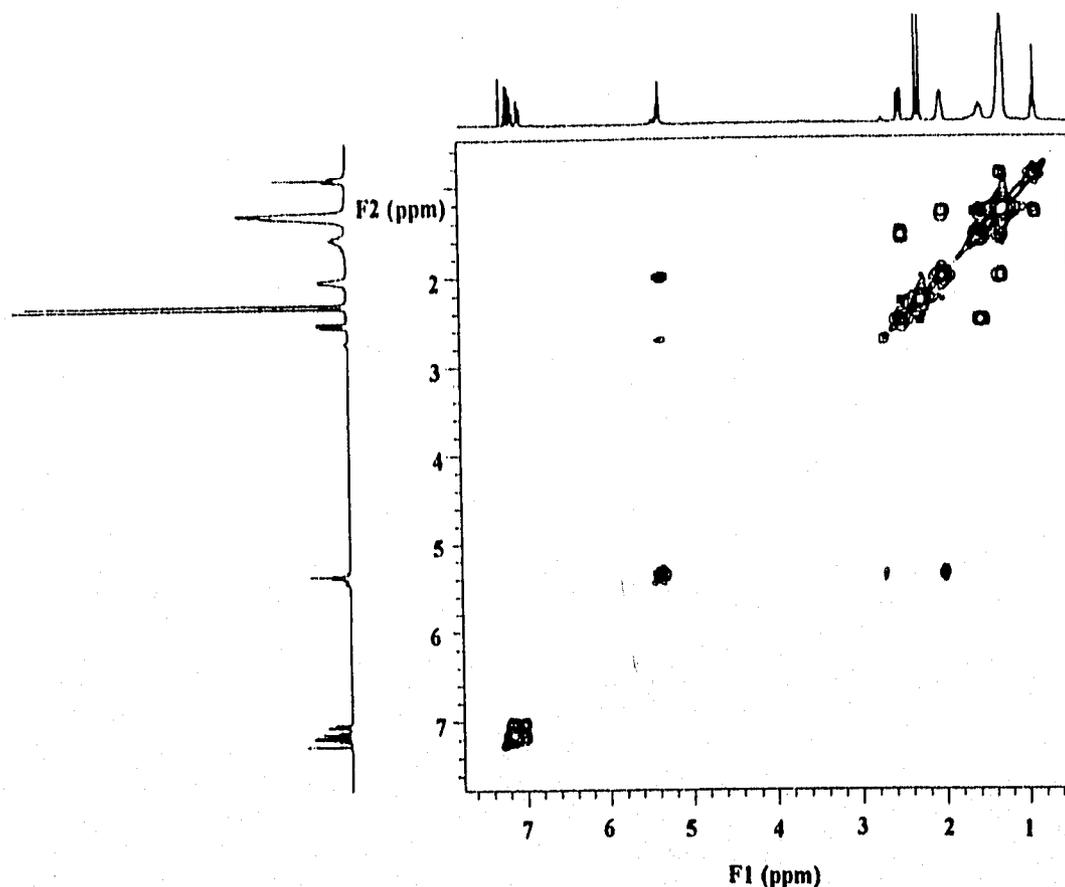


Figura 8. Espectro COSY del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol

Los espectros de RMN¹³C (Espectro 21 y Espectro 22) también resultaban similares a los de los productos 37a y 37m y en lugar de cuatro señales olefinicas se observaron sólo dos (Espectro 24, Figura 9 y Espectro 25).

Para determinar la posición de la doble ligadura, se decidió preparar el derivado monoepoxidado del compuesto 21a y analizar el patrón de fragmentación en el espectro de masas obtenido por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM). (Espectro 26). El derivado epoxidado presentó una fórmula molecular de C₂₃H₃₈O₅ y la presencia de fragmentos de m/z 43, 57, 85, 99 y 113 que eran congruentes con la posición de la doble ligadura en los carbonos 10' y 11'. En la Figura 10 se muestra el patrón de fragmentación propuesto para el derivado monoepoxidado del compuesto 21a.

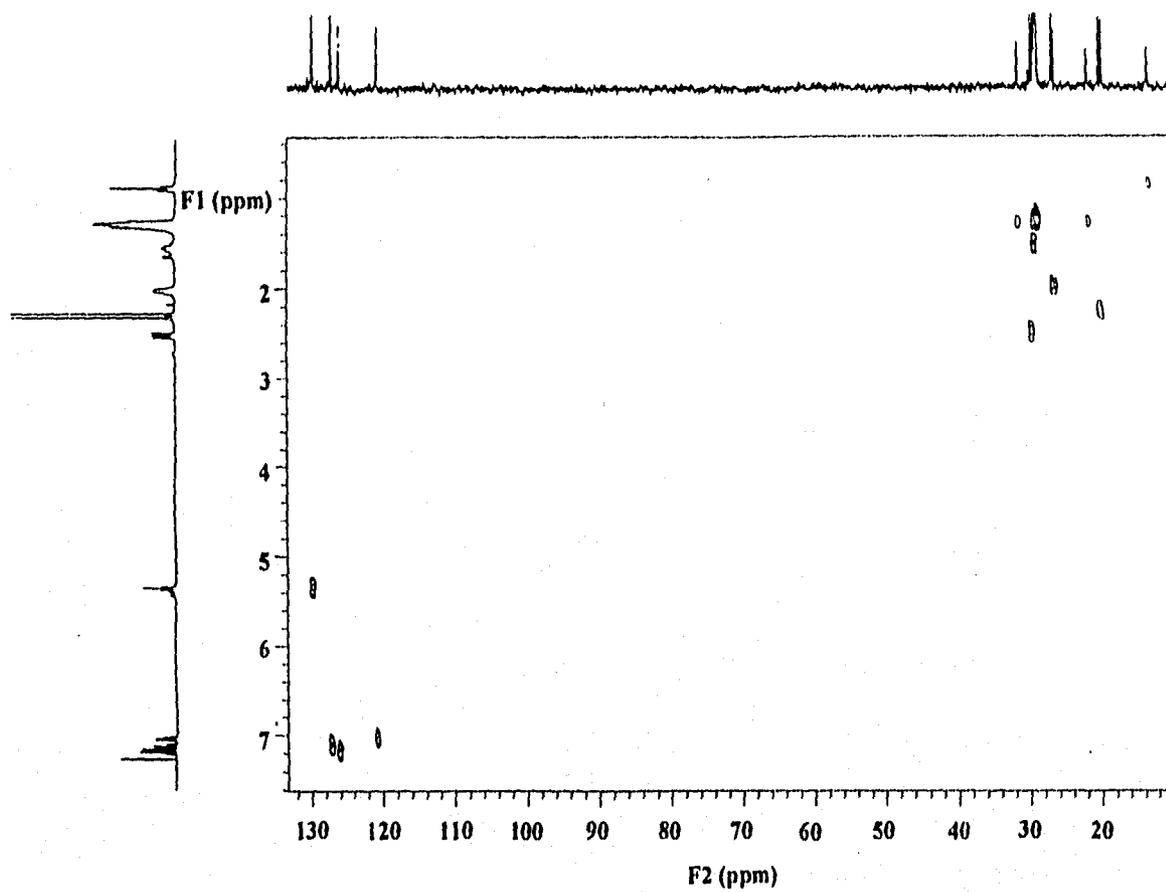


Figura 9. Espectro HETCOR del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catacol.

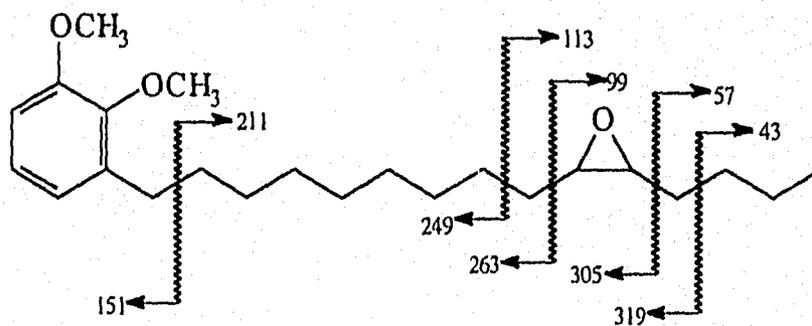
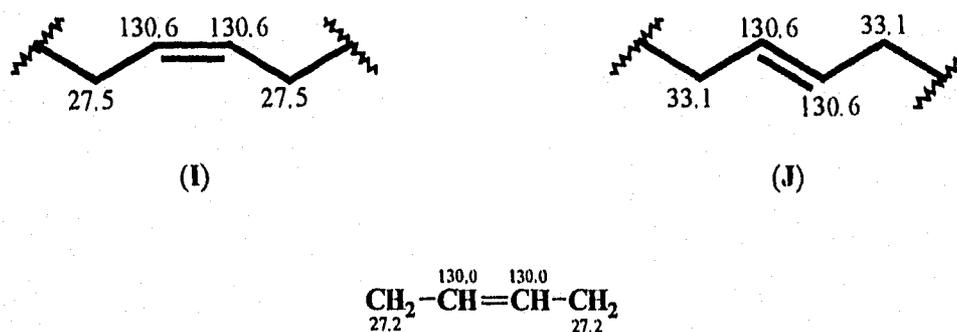


Figura 10. Patrón de fragmentación propuesto para el derivado monoepoxidado de 21a.

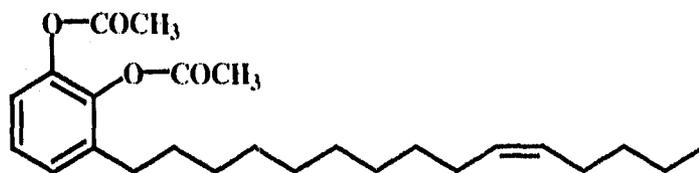
Para establecer la configuración de la doble ligadura, de nueva cuenta se compararon los desplazamientos químicos obtenidos en RMN¹³C para los metilenos alílicos de los derivados **21a** y **21m** (δ 27.2), con los desplazamientos químicos descritos en la literatura para metilenos alílicos de diferentes monoolefinas con configuraciones *Z* y *E* (Figura 11) (Breitmaier *et al.*, 1994; Dorman *et al.*, 1971, Fiedel, *et al.*, 1963; *inter alia*). Este análisis comparativo indicó que la doble ligadura encontrada en los derivados del compuesto **21** presentaba una configuración de tipo *Z*, como en el caso de la estructura parcial I (Breitmaier *et al.*, 1994). Con base en las evidencias estructurales presentadas se caracterizaron a los derivados preparados del compuesto **21** como sus correspondientes derivados diacetato y diéter metílico. El producto natural ha sido aislado previamente por Yamauchi y colaboradores (1980) de la especie relacionada *Rhus vernicifera*. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas encontradas en el presente trabajo eran congruentes con las descritas previamente para los derivados metilados y acetilados del compuesto **21**.



Estructura parcial de la región olefínica de **21**

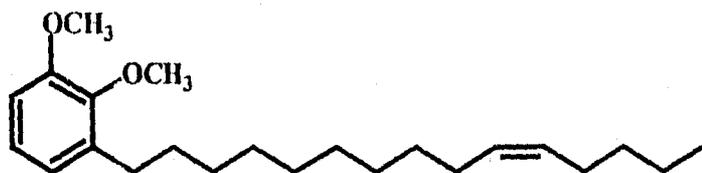
Figura 11. Comparación de los desplazamientos químicos RMN¹³C de los metilenos alílicos del producto **21** con los datos descritos previamente para monoolefinas con configuración *Z* (I) y *E* (J).

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a).



Fórmula molecular	$C_{25}H_{38}O_4$
IRvmax (cm⁻¹)	2929, 2856.7, 1770.6, 1468, 1371, 1161 y 1014.5
RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm) (Espectro 20)	7.18 (dd, J=7.5 y 7.5 Hz, H-5), 7.11 (dd, J= 7.5 y 1.8 Hz, H-6), 7.03 (dd, J= 7.5 y 1.8 Hz, H-4), 5.35 (t, J= 5.36, H-10' y H-11'), 2.59 (t, J= 7.9 Hz, H-1'), 2.31 (s, COCH ₃), 2.27 (s, COCH ₃), 2.02 (m, H-9' y H-12'), 1.56-1.3 (ma, H-2'-H-8', H-13'y H-14') y 0.89 (t, J= 5.1, H-15')
RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm) (Espectro 22)	168.1 (COCH ₃), 168.0 (COCH ₃), 142.2 (C-1), 140.2 (C-2), 136.0 (C-3), 130.0 (C-10' y C-11'), 127.30 (C-4), 126.20 (C-5), 120.72 (C-6), 30.97 (C-1'), 29.79 (C-2'), 28.48 (C-3'- C-8', C-13'y C-14'), 27.2 (C-9' y C-12'), 22.35 (C-14') y 14.0 (C-15')
EMIE M⁺ m/z (int./rel.) (Espectro 17)	M ⁺ [402 (5)], 360 (21), 319 (23), 318 (100), 264 (8), 149 (10), 136 (15), 123 (40), 95 (4), 69 (6) y 43 (15)

Cuadro 12. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de 1,2-dimetoxi-3-(10'*Z*-penta-decenil)benzeno (**21m**).

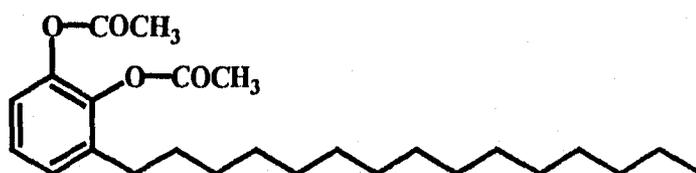


Fórmula molecular	$C_{22}H_{38}O_2$
RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm) (Espectro 21)	6.96 (dd, J=7.9 y 7.9 Hz, H-5), 6.68 (ma, H-4 y H-6), 5.35 (t, J= 5.5 Hz, H-10' y H-11'), 3.85 (s, OCH ₃), 3.81 (s, OCH ₃), 2.60 (t, J= 8.0, H-1'), 2.02 (m, H-9' y H-12'), 1.57 (m, H-2'), 1.24-1.31 (ma, H-3' a H-8', H-13'y H-14') y 0.89 (t, J= 5.1, H-15')
RMN¹H (Benceno-d₆, 300 MHz, ppm) (Espectro 21a)	6.9 (dd, J= 7.9 y 7.9 Hz, H-5), 6.80 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-6), 6.53 (dd, J= 7.9 y 1.8 Hz, H-4), 5.58 (t, J= 5.6, H-10' y H-11'), 3.76 (s, OCH ₃), 3.35 (s, OCH ₃), 2.7 (t, J= 7.9, H-1'), 2.02 (ma, H-9' y H-12'), 1.60 (m, H-2'), 1.27-1.40 (ma, H-3' - H-8' y H-13' y H-14') y 0.88 (t, J= 5.1 Hz, H-15')
RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm) (Espectro 23)	153.8 (C-1), 148.1 (C-2), 136.9 (C-3), 130.0 (C-10' y C-11'), 123.7 (C-4), 122.4 (C-5), 110.9 (C-6), 60.22 (OCH ₃), 55.34 (OCH ₃), 30.50 (C-1'), 30.0 (C-3' a C-8', C-13'y C-14'), 27.6 (C-9' y C-10') y 14.2 (C-15')
EMIE M⁺ m/z (int./rel.) (Espectro 19)	M ⁺ [346 (100)], 191 (5), 176 (7), 165 (7), 151 (75), 136 (50), 121 (15), 91 (20), 69 (5), 55 (13) y 41 (10).

4.4.3 IDENTIFICACIÓN DEL 3-PENTADILCATECOL BAJO LAS FORMA DE SU DERIVADO DIACETILADO (23a).

El compuesto 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a) se aisló como un líquido aceitoso de color amarillo claro. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del compuesto se resumen en el Cuadro 13. El compuesto 23 se caracterizó como el diacetil derivado del 3-pentadecilcatecol por comparación de sus constantes espectroscópicas con las descritas previamente (Yamauchi, *et al.*, 1982).

Cuadro 13. Constantes espectroscópicas del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a).

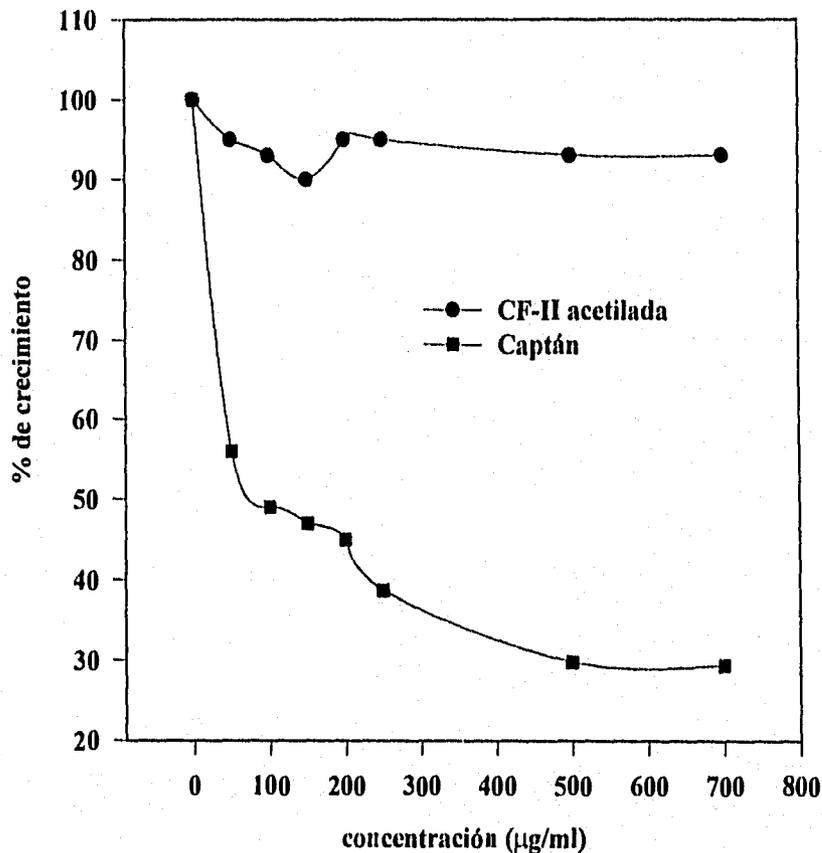


RMN¹H (CDCl₃, 300 MHz, ppm) (Espectro 23)	7.18 (dd, J=7.5 y 7.5 Hz, H-5), 7.11 (dd, 7.5 y 1.8, H-6), 7.03 (dd, J=7.5 y 1.8, H-4), 2.59 (t, J= 7.9, H-1'), 2.31 (s, COCH ₃), 2.27 (COCH ₃), 1.56-1.31 (ma, H-2' - H-14') y 0.89 (t, J= 5.1, H-15').
RMN¹³C (CDCl₃, 75 MHz, ppm) (Espectro 24)	168.2 (COCH ₃), 168.0 (COCH ₃), 142.2 (C-1), 140.5 (C-2), (C-3), 127.30 (C-4), 126.2 (C-5), 120.7 (C-6), 30.42 (C-1'), (C-2'), 29.48 (C-3'-C-14'), 20.7 (COCH ₃), 20.32 (COCH ₃) y (C-15').

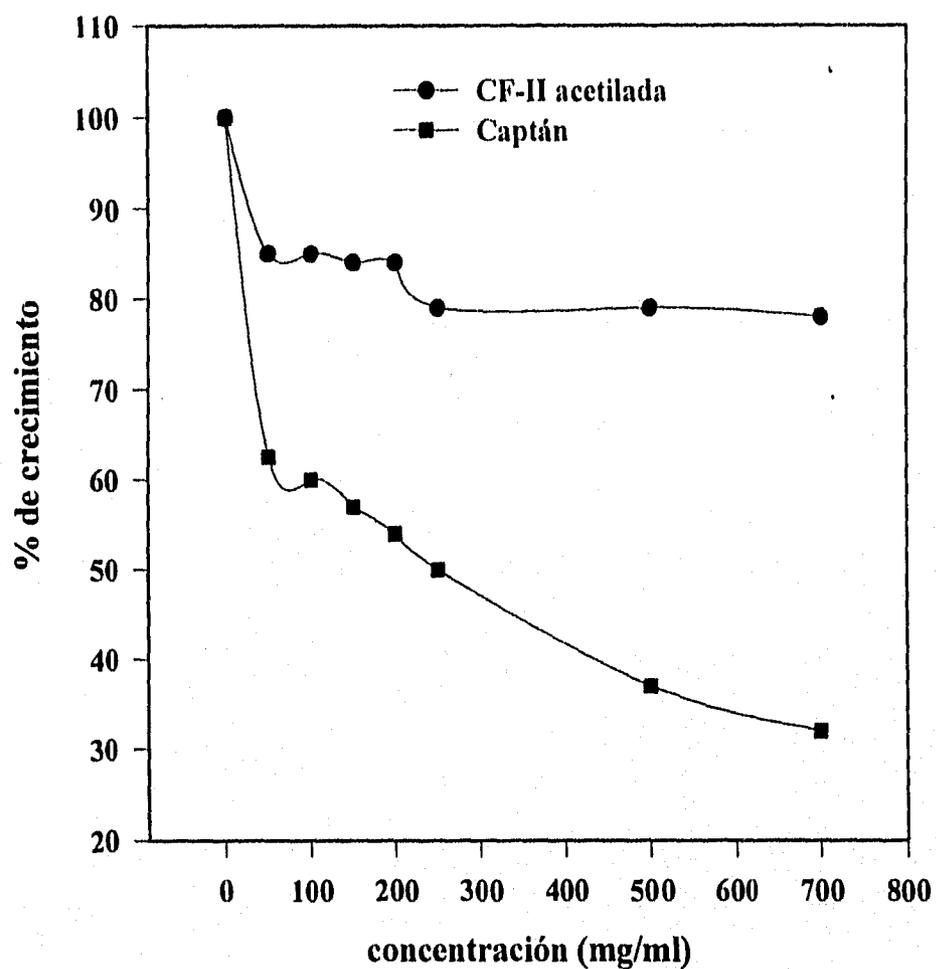
4.5 EVALUACION ANTIFUNGICA DE LA MEZCLA DE 3-ALQUILCATECOLES PRESENTES EN LA FRACCION CF-II.

Con la finalidad de establecer si la mezcla de los derivados acetilados o metilados de los 3-alquilmcatecoles presentes en la fracción CF-II presentaba también propiedades antifúngicas y larvicidas se decidió evaluar su toxicidad para *A. salina* y su efecto sobre el crecimiento radial de dos especies de

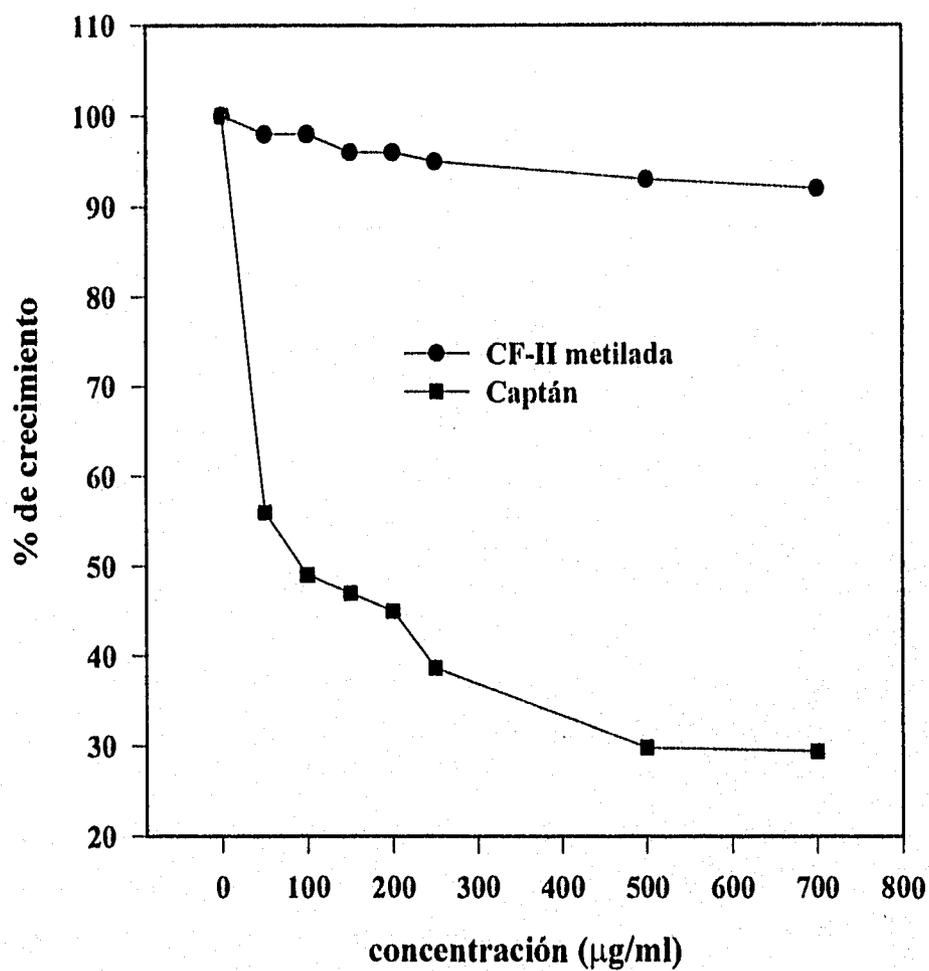
hongos fitopatógenos (*Helminthosporium longirostratum* y *Fusarium oxysporum*). En el caso del bioensayo de la determinación de la toxicidad para *A. salina* ninguna, de las mezclas derivatizadas mostró toxicidad para las larvas del crustáceo, ya que la concentración letal media (CL₅₀) fue mayor a 1000 µg/mL (Anderson *et al.*, 1991). Con respecto a la actividad antifúngica, como se puede apreciar en las gráficas 5,6, 7 y 8 la actividad fue nula en ambos casos. Estas observaciones indican que al igual que para el desencadenamiento de la actividad alergénica, estos productos requieren de la presencia de la función catecólica libre para mediar las actividades antifúngicas y larvicidas.



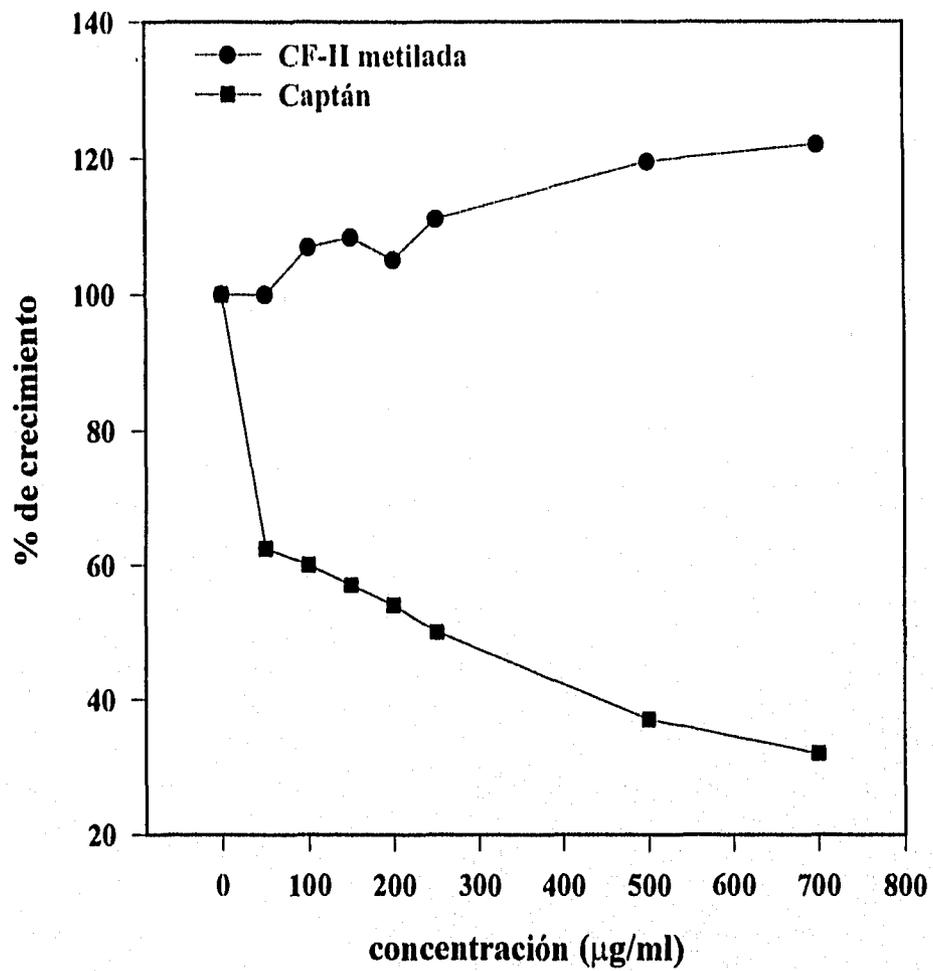
Gráfica 5. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones de la fracción CF-II acetilada. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.



Gráfica 6. Inhibición del crecimiento radial de *Helminthosporium longirostratum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones de la fracción CF-II acetilada. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.



Gráfica 7. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones de la fracción CF-II metilada. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.



Gráfica 8. Inhibición del crecimiento radial de *Helminthosporium longirostratum* inducido por el tratamiento a diferentes concentraciones de la fracción CF-II metilada. El fungicida comercial Captán se utilizó como control positivo.

V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

El análisis por cromatografía de gases acoplada a un sistema de espectrometría de masas del extracto acetónico de la corteza fresca de *Metopium brownei*, permitió la detección y cuantificación de cinco compuestos de tipo alquilcatecol, tres de ellos con una cadena lateral de 15 átomos de carbono y los dos restantes con una cadena de 17 átomos de carbono. Posteriormente el estudio fitoquímico biodirigido del extracto acetónico de la corteza fresca, mediante la determinación de la toxicidad para *A. salina* y la evaluación del efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium longirostratum*, permitió el aislamiento y caracterización de tres compuestos del tipo 3-alquilcatecol con cadena lateral de 15 átomos de carbono. Estos productos se caracterizaron por métodos espectroscópicos y espectrométricos como el 3-pentadecilcatecol (23), el 3-(10'*Z*-pentadecenil)catecol (21) y el 3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37). El producto 37 constituye un nuevo producto natural.

El extracto acetónico de la corteza de *Metopium brownei*, demostró un efecto inhibitorio significativo del crecimiento radial de las especies de hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium longirostratum*. De manera adicional, el extracto presentó una toxicidad notable para el crustáceo *Artemia salina* Leach con una concentración letal media (CL₅₀) de 123.93 µg/mL. Estos resultados permitieron establecer la potencialidad de la especie como una fuente de principios fungicidas y larvicidas.

Los compuestos del tipo 3-alquilcatecol (CF-II) aislados, son los responsables de las afecciones dérmicas y respiratorias producidas por *Metopium brownei*. Por lo tanto, el uso de la especie en la medicina tradicional, constituye un considerable riesgo para los usuarios en el sureste de México, donde es muy abundante y ampliamente utilizada con fines medicinales.

La mezcla de 3-alquilcatecoles (CF-II) demostró una actividad significativa sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* y *Helminthosporium longirostratum*. Sin embargo, la inhibición del crecimiento radial observado fue mayor para la especie *Helminthosporium longirostratum*.

La inhibición del crecimiento radial inducida por los 3-alquilcatecoles para ambas especies, fue muy similar a la observada para el fungicida comercial Captán, utilizado como control positivo.

El efecto fungicida demostrado por el extracto y la fracción de alquilcatecoles puede ser de beneficio para la especie productora (*M. brownii*) como un mecanismo de defensa. Sin embargo, este efecto fungicida no es potencialmente útil para el desarrollo de productos de uso comercial debido a las propiedades alergénicas de los alquilcatecoles.

El bionsayo de la determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* demostró ser un procedimiento eficiente para la detección de alergenos del tipo 3-alquilcatecol.

VI. BIBLIOGRAFIA

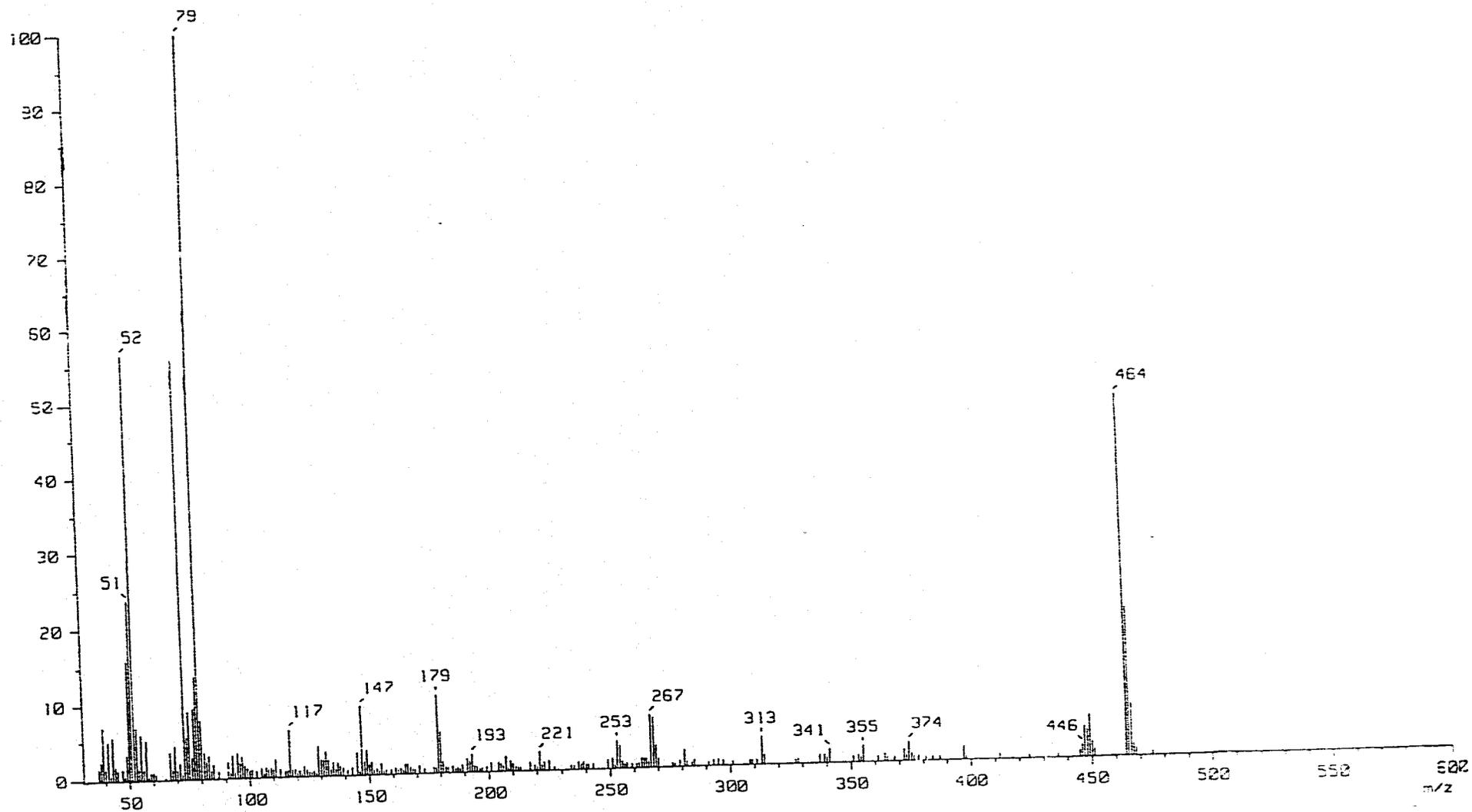
1. Anderson, J. E., Goetz, C. M., MacLaughlin, J. y Suffness, M. (1991). A blind comparasion of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as tumor prescreens, *Phytochemical Analysis*, **2**, 107-111.
2. Blau, K. y Halket, J. (editores), (1993). *Handbook of derivatives for chromatography*, 2nd. ed., John Wiley & Sons, pags. 52-57.
3. Breitmaier, E., Voeter, W. (1994). *¹³C NMR spectroscopy of organic compounds. High resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry*, 3rd ed., VCH, pag 194-198.
4. Byers, S. B., Epstein, W. y Castagnoli, N. (1979). *In vitro* studies of poison oak immunity. *In vitro* reaction of human lymphocytes to urushiol, *J. Clinical Investigation*, **64**, 1437-1448.
5. Cabrera, A. L. (1938). Revisión de las Anacardiaceas austroamericanas, *Revista Museo de la Plata*, **11**, 3-64.
6. Cabrera, C. E. (1992). *Imágenes de la flora quintanarroense*, Centro de Investigación de Quintana Roo A. C., pags. 12-17, 20-27 y 130.
7. Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Anaya, A. L., Lotina-Hennsen, B. y Mata, R. (1995). Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*, *Phytochemistry*, **40** (2), 419-425.
8. Castañeda, P., García, M. R., Hernández-Bautista, B., Torres, B. A., Anaya, A. L. y Mata, R. (1992), Effects of some compounds isolated from *Celaenodendron mexicanum* Standl (Euphorbiaceae) on seeds and phytophatogenic fungi, *Journal of Chemical Ecology*, **7**(18), 1025-1037.
9. Courerus, P. A., Clague, A. D. H. y Dongen, J. P. C. M. (1976). ¹³C chemical shifts of some model olefins, *Organic Magnetic Resonance*, **8**, 426-431.

10. Dorman, D. E., Jautelat, M. y Roberts, J. D. (1971). Carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy, quantitative correlations of the carbon chemical shifts of acyclic alkenes, *Journal Organic Chemistry*, **36**(19), 2757-2766.
11. Du, Y. Oshima, R., Yamauchi, Y., Kumanotani, S. y Miyakosh, T. (1986). Long chain phenols from Burmese lac tree *Melanhorrea usitate*, *Phytochemistry*, **25**(9), 2211-2218.
12. Du, Y. y Oshima, R. (1984). Reversed phase liquid chromatographic separation and identification of constituents of urushiol in the sap of the lac tree, *Rhus vernicifera*; *J. of Chromatography*, **284**, 463-473.
13. Du, Y., Oshima, R., Yamauchi, Y., Iwatsuki, H. y Kumanotani, S. (1984a). High performance liquid chromatography, Analysis of urushiol of the lac tree, *Rhus vernicifera*, without derivatization; *J. Chromatography*, **295**, 179-186.
14. Du, Y., Oshima, R., Yamauchi, Y., Kumanotani, J. U y Miyakosh, T. (1986). Long chain phenols from Burmese lac tree *Melanorrhoea usitate*, *J. of Chromatography*, **25**(9), 2211-2218.
15. Dunn, Y. S., Liberato, D. J., Dennick, R. G., Castagnoli, N. y Byers, V. S. (1982). A murine model system for contact sensitization to poison oak or ivy urushiol components, *Cellular Immunology*, **68**, 377-388.
16. ElSohly, M. A. y Adawadkar, P. D. (1982). Separation and characterization of poison ivy and poison oak urushiol components, *J. Natural Products*, **45** (5), 532-538.
17. ElSohly, M. A. y Turner, C. E. (1980). GLC analysis of poison ivy and poison oak components in vegetable oil preparations, *J. of Pharmaceutical Sciences*, **69**, 587-589.
18. ElSohly, M. A., Adawadkar, P. D., Benigni, D. A., Watson, E. S. y Little, Jr. T. L. (1986). Analogues of poison ivy urushiol. Synthesis and biological activity of disubstituted n-alkylbenzenes, *J. Medicinal Chemistry*, **29**, 606-611.

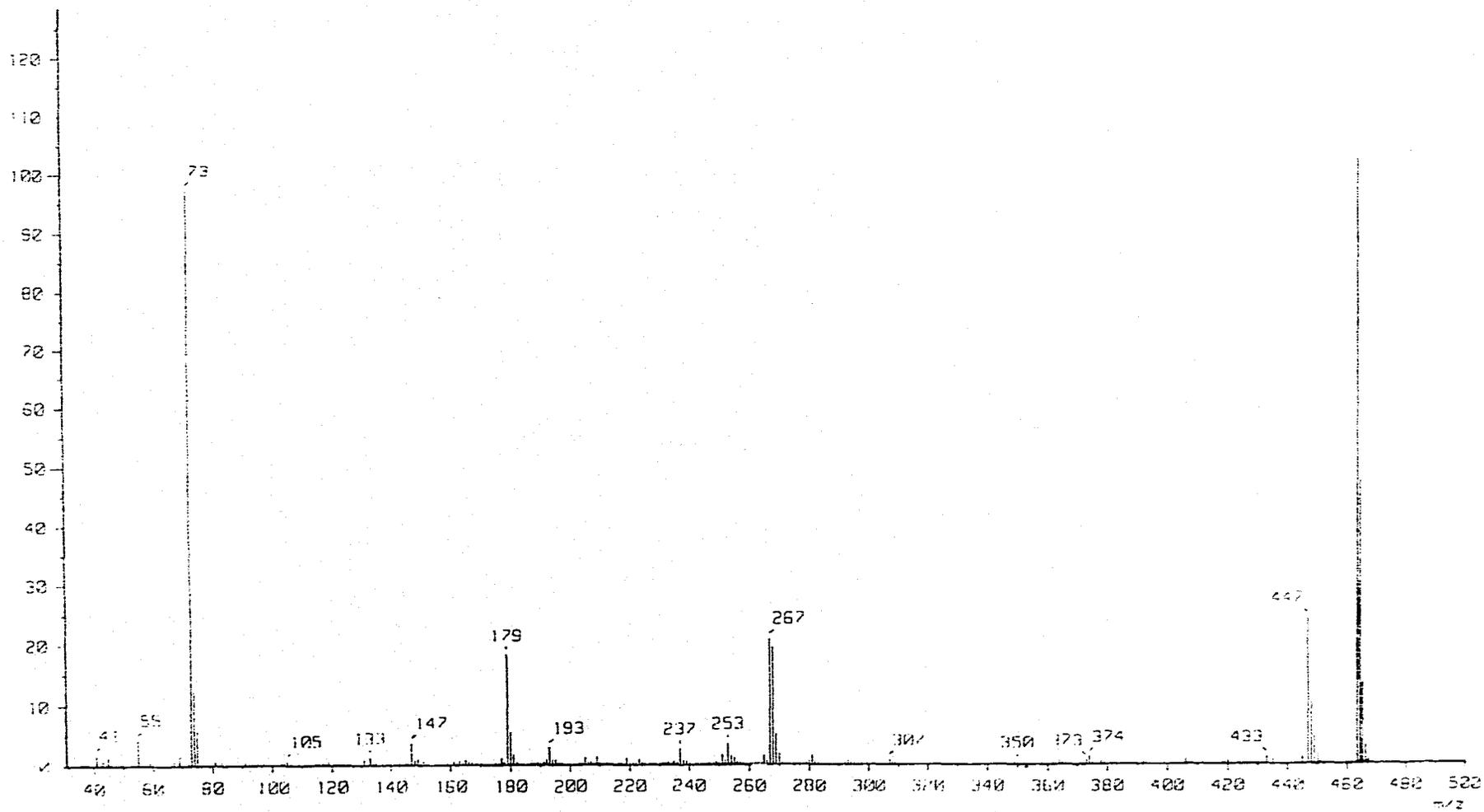
19. Evans, W. C. (1991). *Farmacognosia*, 13ava. edición, de Interamericana- MacGraw-Hill México.
20. Fiedel, R. A. y Retcofski, H. L. (1963). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of olefins and other hydrocarbons, *J. American Chem. Soc.*, **85**, 1300-1306.
21. Grinberg, Nelu (editor). (1991). Modern thin layer chromatography, Marcel Dekker (Chromatography Science Series), vol. **52**.
22. Gross, M. y Baer, H. (1975). Urushiols of poisonous Anacardiaceae, *Phytochemistry*, **14**, 2263-2266.
23. Haan, de J. W. y L. J. M., van de Ven (1973). Configurations and conformations in acyclic, unsaturated hydrocarbons. A ¹³C NMR study, *Organic Magnetic Resonance*, **5** (3), 147-153.
24. Hamburger, M. O. y Cordel, G. A. (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity, *J. Natural Products*, **50**, 19-22.
25. Jefferson, A. y Wangchareontrakul, S. (1985). Synthesis of urushiol derivatives by a Fries rearrangement, *Aust. J. Chem.*, **38**, 605-614.
26. Jefferson, A. y Wangchareontrakul, S. (1986). Long chain phenols urushiol, laccol, thitsiol and phenylalkylcatechol compounds in Burmese lac from *Melanorrhoea usitete*, *J. of Chromatography*, **367**, 145-154.
27. Jimenez, A. A., Mata, R., Lotina-Hanssen, B., Anaya, A. L. y Velasco, I. L. (1996). Effects of some compounds isolated from *Malmea depressa*, *J. Natural Products*, **59**, 202-204.
28. Lieberman, H. R. (1983). Estimating LD₅₀ using the probit technique: a basic computer program, *Drug and Chemical Toxicology*, **6**, 111-116.
29. Lowery, C. (1993). Reagent Chemicals. American Chemical Society specification, pag. 90-91.

30. Ma, Cheng-Yu y ElSohly M. A. y Baker, J.K. (1980). High performance liquid chromatographic separation of urushiol congeners in poison ivy and poison oak, *J. of Chromatography*, **200**, 163-169.
31. Pavia, D. L., Lapman, G. M., Kris, G. S. y Engel, R. (1995). *Organic laboratory techniques, a microscale approach* Ed. Saunder W. B. Saunders Co. Philadelphia, pag. 345.
32. Rivero, C. J. F. (1994) (TESIS). "Constituyentes bioactivos de *Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae).
33. Rodríguez, E. (1992). *Tropical plant contact allergens, Natural conference on enviromental hazards to the skin, Washington, D. C.*
34. Shriner, R. L., Fuson, R. C. y Curtin, D. Y. (1980). *Identificación sistemática de compuestos orgánicos*, Ed. Limusa.
35. Skopp, G., Pferkuch, H. J. y Schwenker, G. (1987). n-Alkilphenole aus *Schinus terebinthifolius* RADDI (Anacardiaceae), *Z. Naturforsch*, **42c**, 7-16.
36. Stahl, E. (1969). *Thin layer chromatography*, Academic Press Inc., pag 487.
37. Standely, P. C. (1939). *Trees and shrubs of Mexico, Washington Govt.*, pag.664.
38. Tyler, E. V., Claus, E. P. y Brady, L. R. (1970). *Pharmacognosy*, 6th ed., Lea and Febiger.
39. Tyman, J. H. P. (1979). Non isoprenoid long chain phenols, *J. Chem Society Rev.*, **8**, 499-537.
40. Tyman, J. H. P. (1991). The chemistry of non-isoprenoid phenolic lipids, *Studies in Natural Products Chemistry*, **9**, 313-349.
41. Tyman, J. H. P., Tychopoulos, V. y Cernelutt, B. A. (1981). Long chain phenols XXI. Quianritative analysis of the phenolic compounds in technical cashew nut-shell liquid chromatography, *J. Chromatography*, **213**, 287-300.

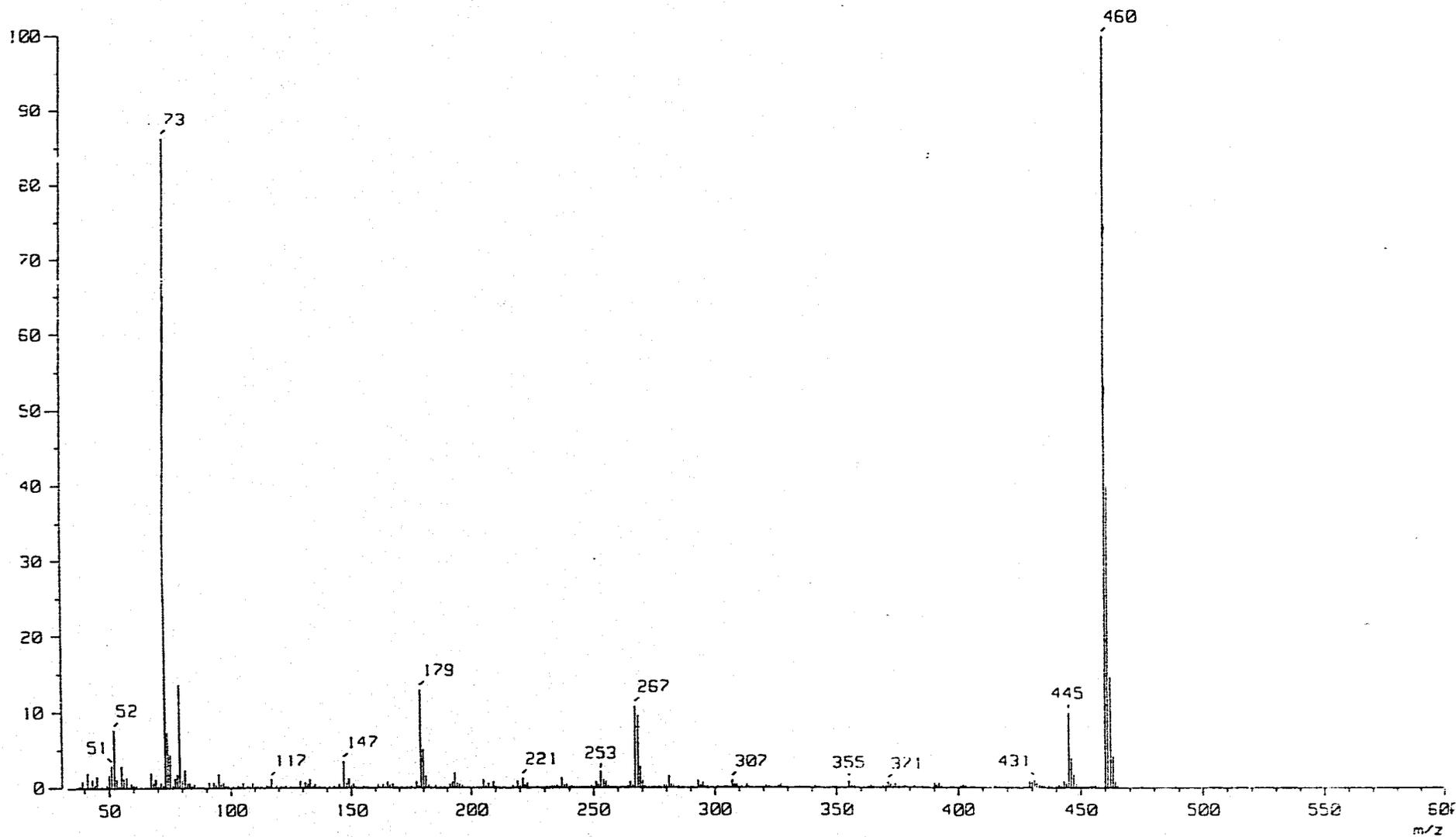
42. Wannan, B. S., Waterhouse, J. T., Gadek, P. A. y Quinn, C. J. (1985). Flavonoids and affinities of *Blenocarpia*, *Biochemical Systematic and Ecology*, **13**(2), 105-108.
43. Watson, S. E., Murphy, J. C., Wirth, P. W., El Sohly, M. A. y Skierkowski, P. (1981). Immunological studies of poisonous Anacardiaceae: production of tolerance in guinea pigs using 3-n-pentadecylcatechol-"modified" autologous blood cells, *J. of Pharmaceutical Sciences*, **70**, 785-789.
44. Yamauchi, Y., Murayami, T. y Kumanotani, J. (1980). Separation of urushiol diacetate on silver nitrate coated silica gel columns by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography*, **198**, 49-56.
45. Yamauchi, Y., Murayami, T. y Kumanotani, J. (1981). Separation of urushiol by high-performance liquid chromatography on an 8% octadecylsilane chemically bonded silica gel urushiol in the sap of lac tree japanese (*Rhus vernicifera*) and that in the japanese lac-making process, *J. of Chromatography*, **214**, 343-348.
46. Yamauchi, Y., Oshima, R., Kamanotani, J. (1982). Configuration of the olefinic bonds in the heterolefinic side chains of japanese lacquer urushiol separation and identification of components of dimethyl urushiol by means of reductive ozonolysis and high performance liquid chromatography, *J. of Chromatography*, **243**, 71-84
47. Young, D. A. (1975). Flavonoid biochemistry and phylogenetic relationships of *Julianaceae*, *Systematic Botany*, **7**, 149-102
48. Young, D. A. (1979). Heartwood flavonoids and the infrageneric relationships of *Rhus* (Anacardiaceae), *Amer. J. Bot.*, **66**, 502-510.



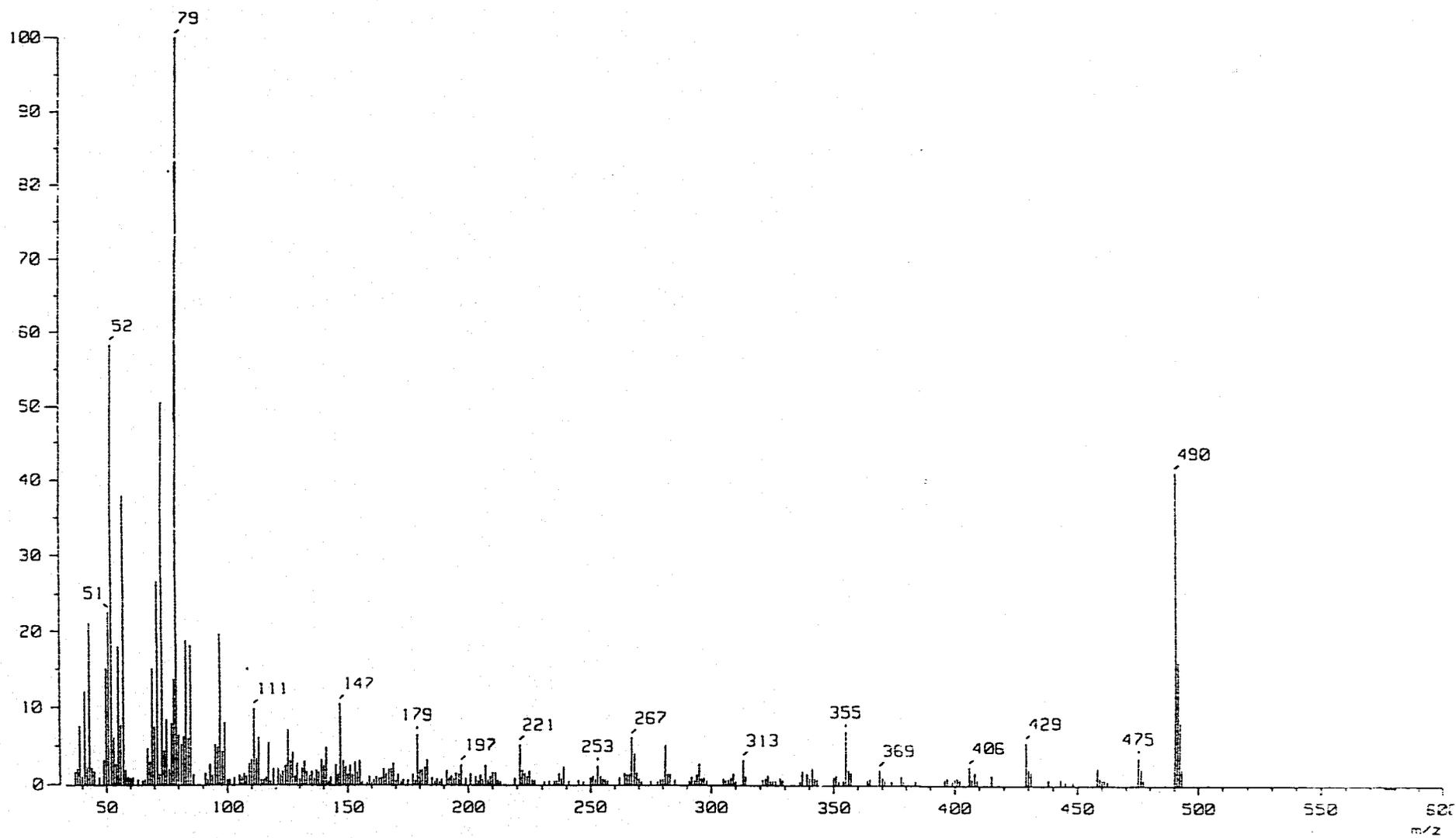
Espectro 1. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del pentadecilcatecol con una cadena lateral saturada



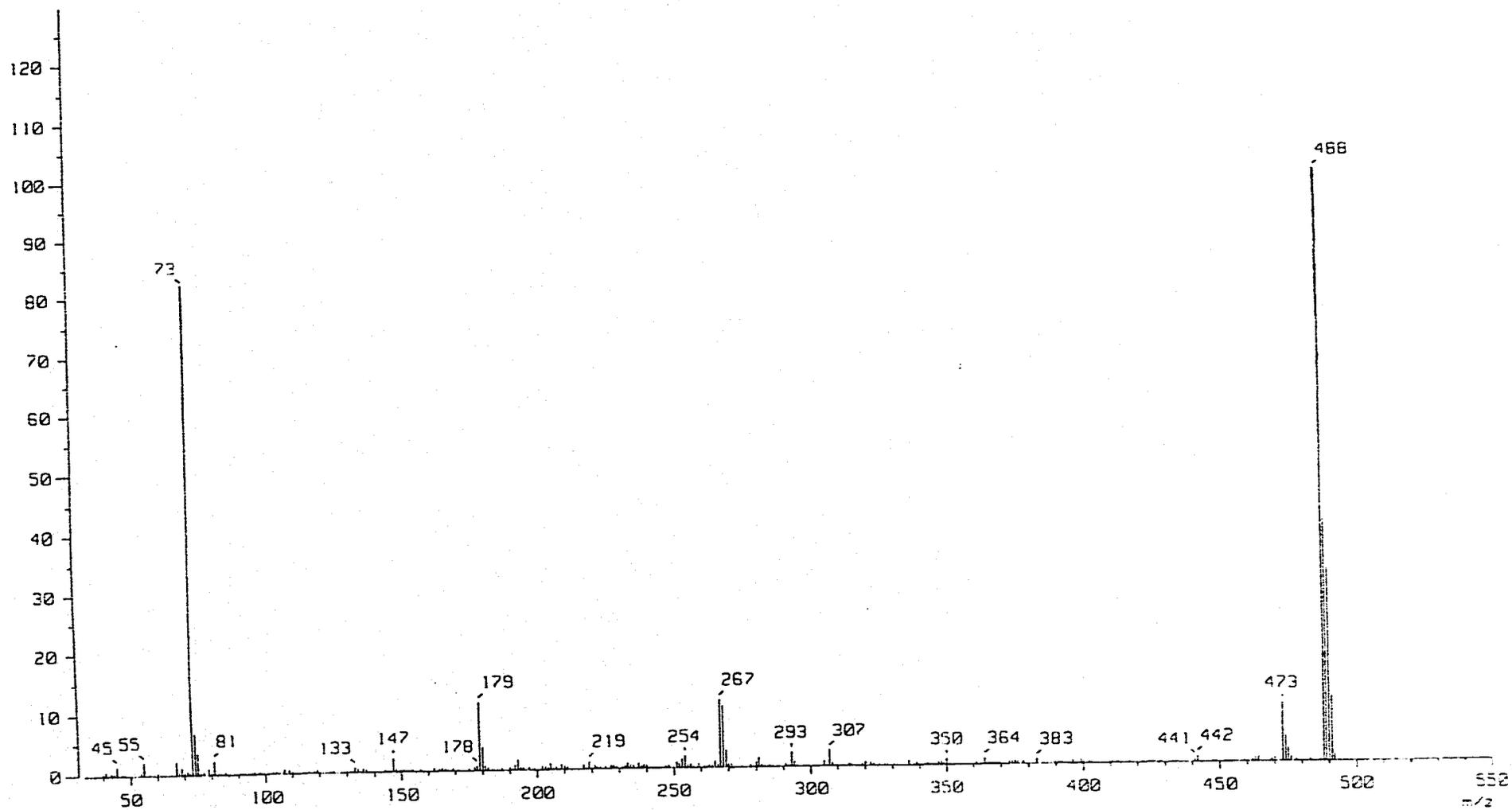
Espectro 2. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del del pentadecilcatecol con una cadena lateral monoinsaturada



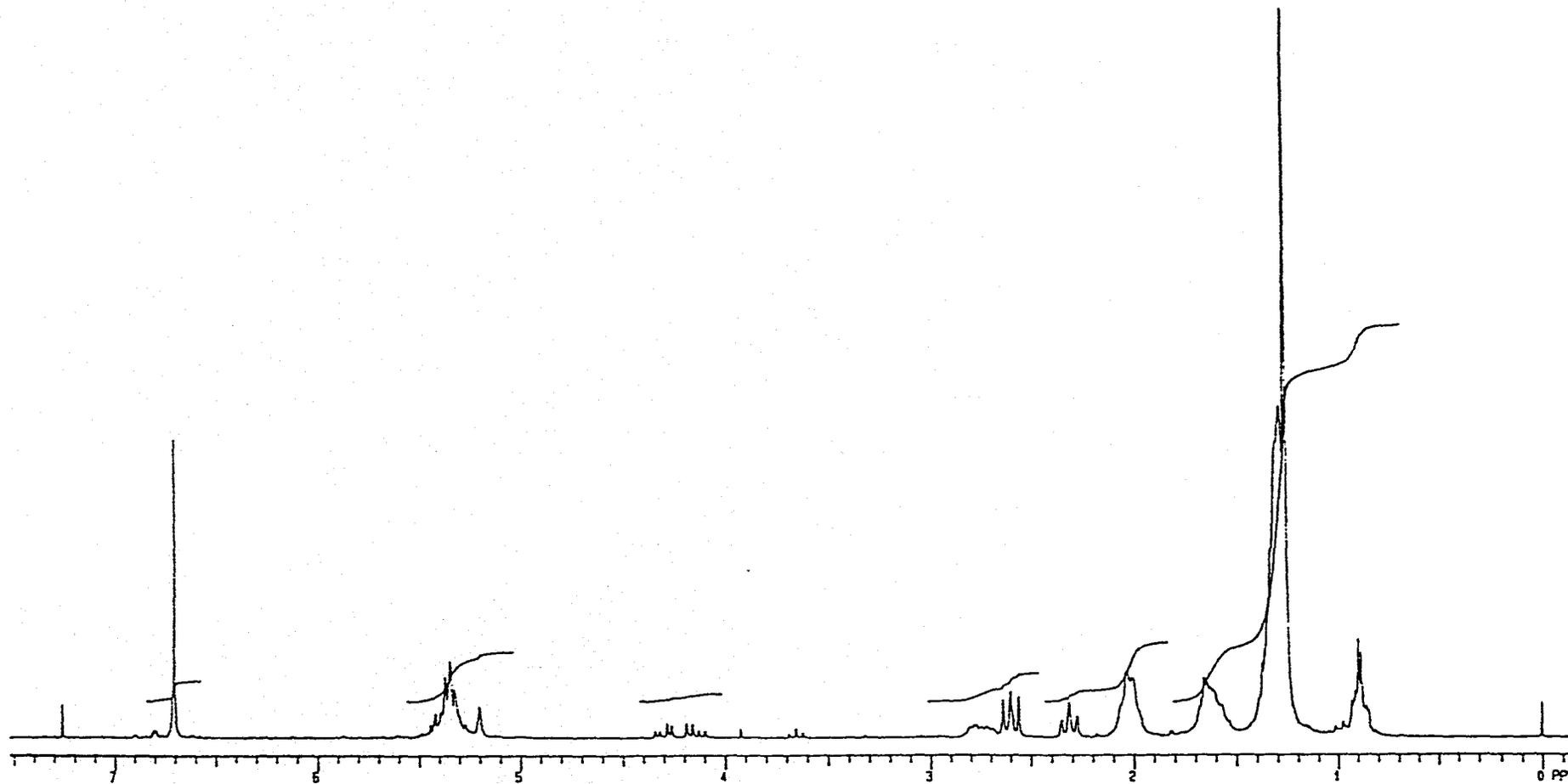
Espectro 3. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del del pentadecilcatecol con una cadena lateral di-insaturada



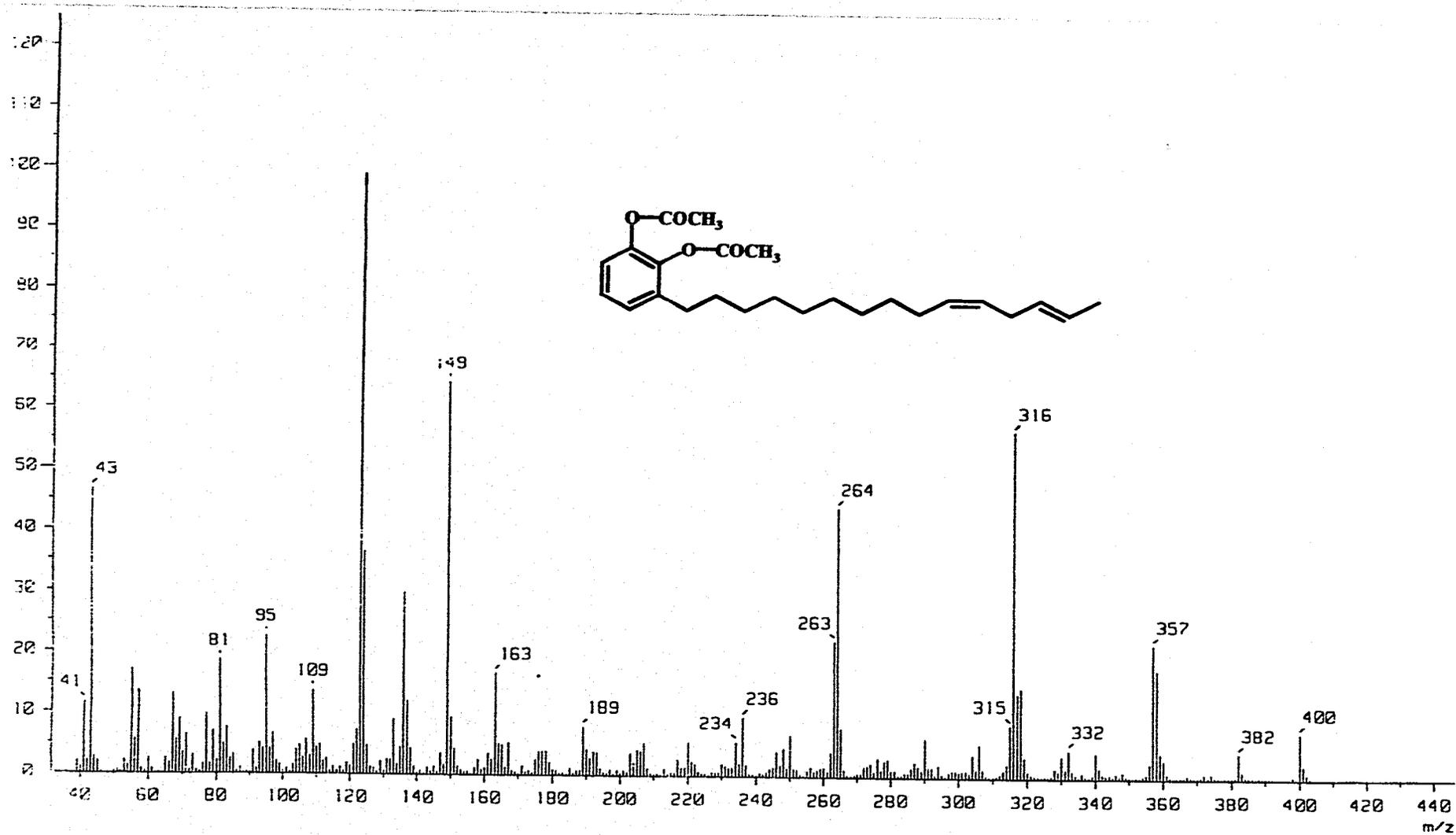
Espectro 4. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del heptadecilcatecol con una cadena lateral saturada



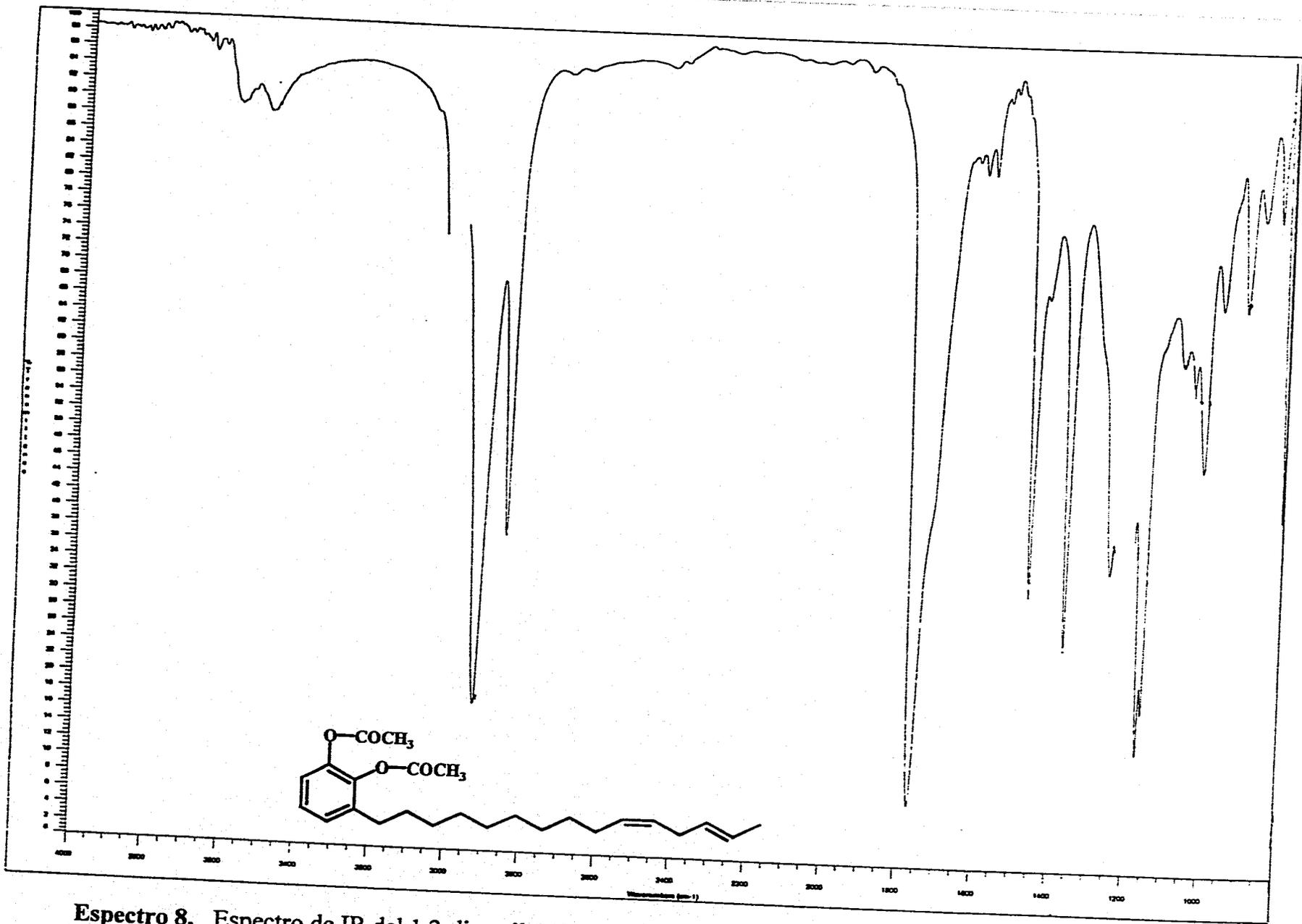
Espectro 5. Espectro de masas del derivado trimetilsililado del heptadecilcatecol con una cadena lateral monoinsaturada



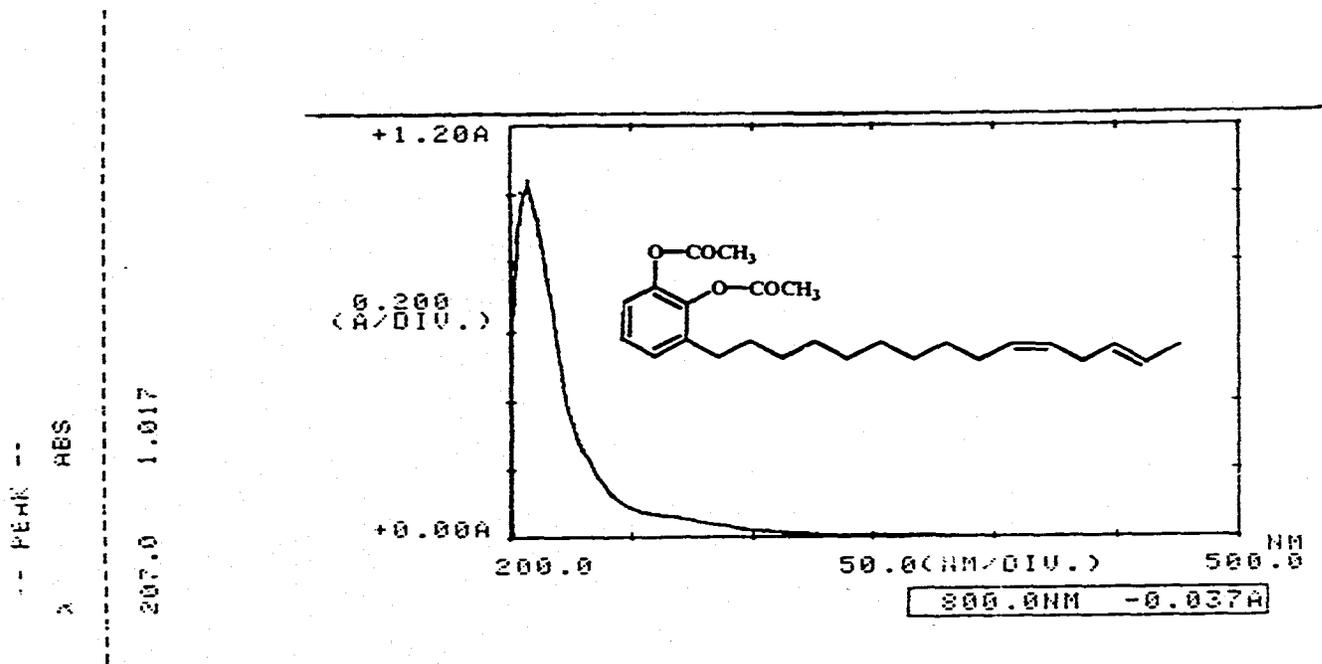
Espectro 6. Espectro de RMN¹H de la fracción activa CF-II



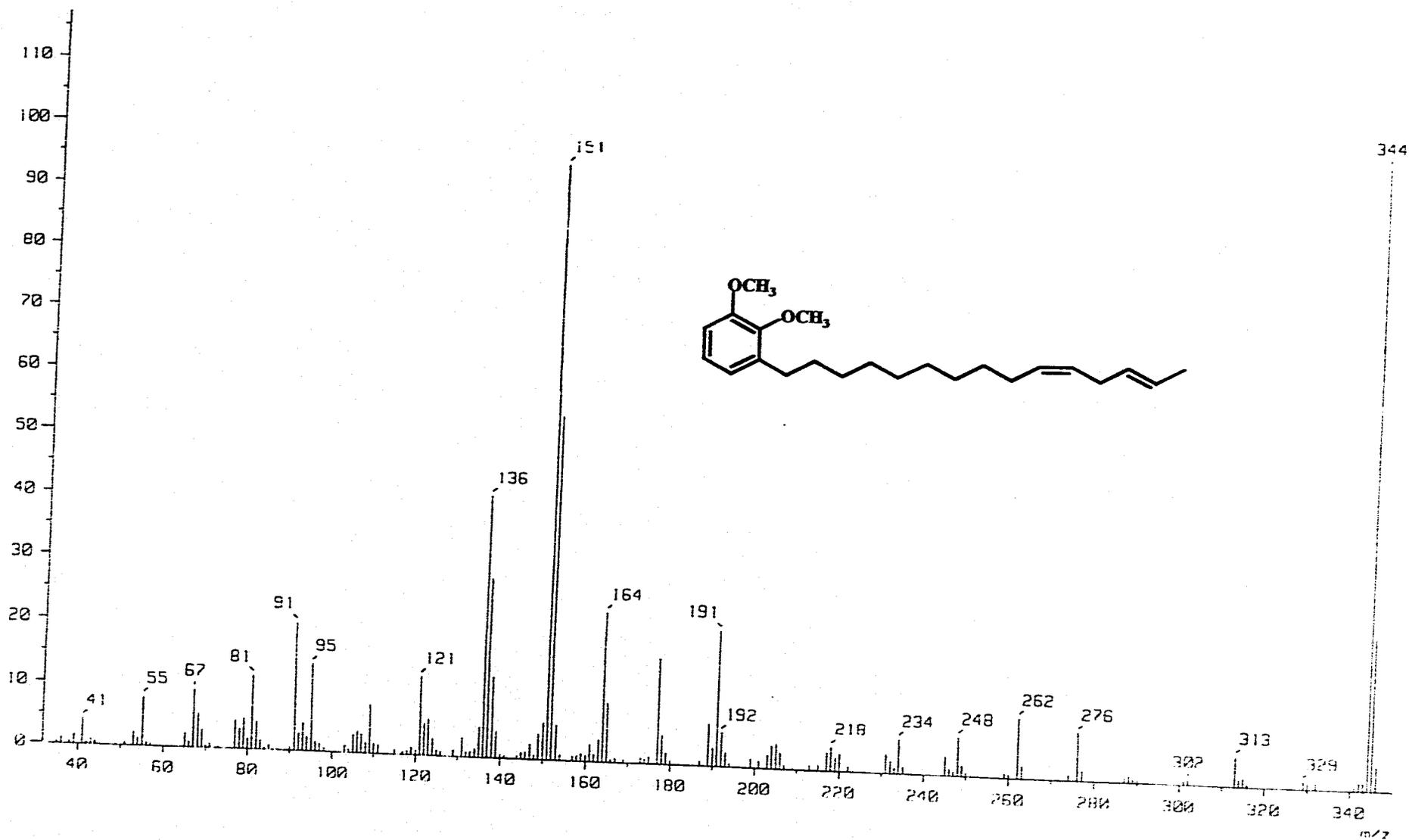
Espectro 7. EMIE del 1,2-diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37a)



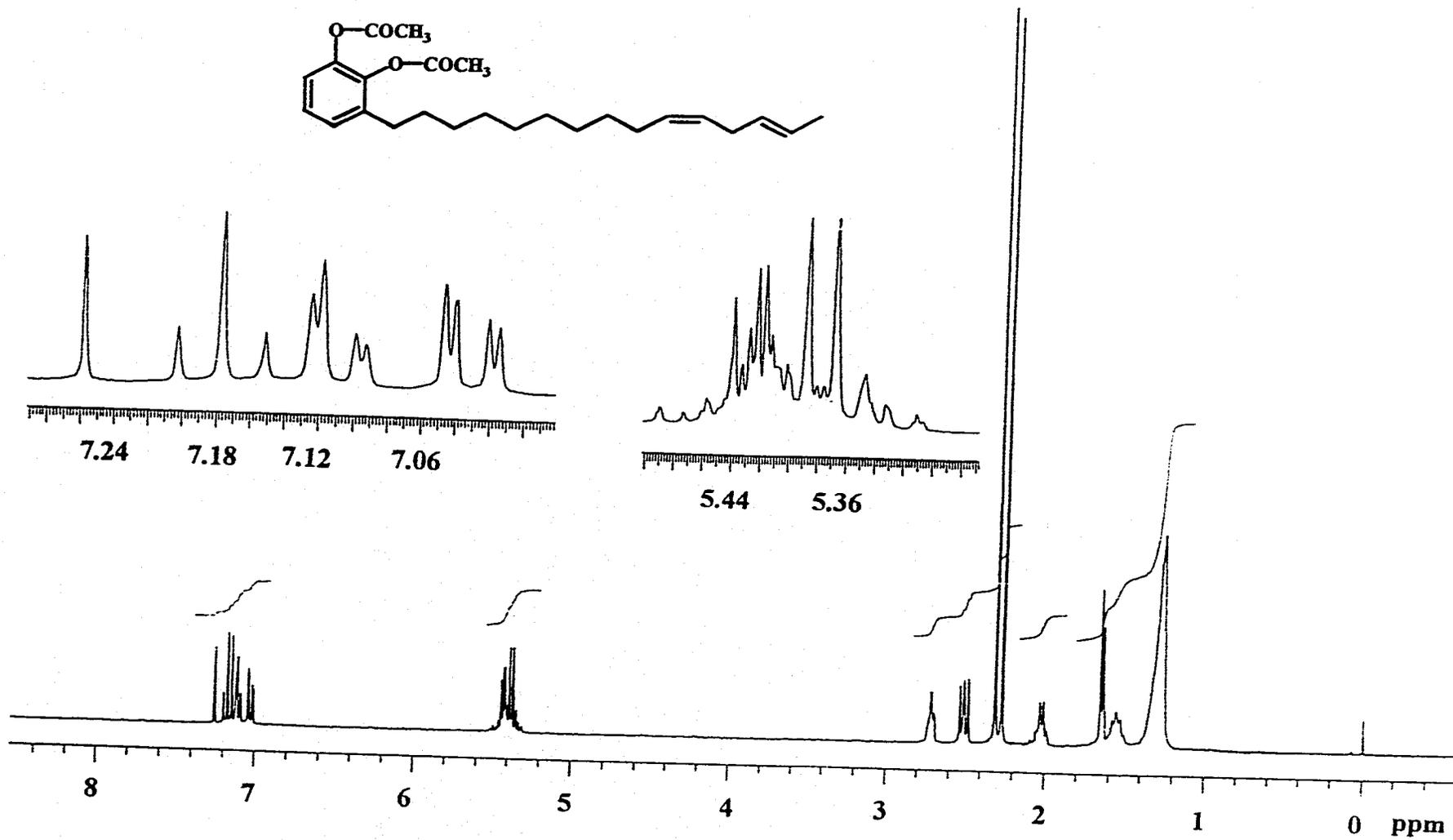
Espectro 8. Espectro de IR del 1,2-diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37a)



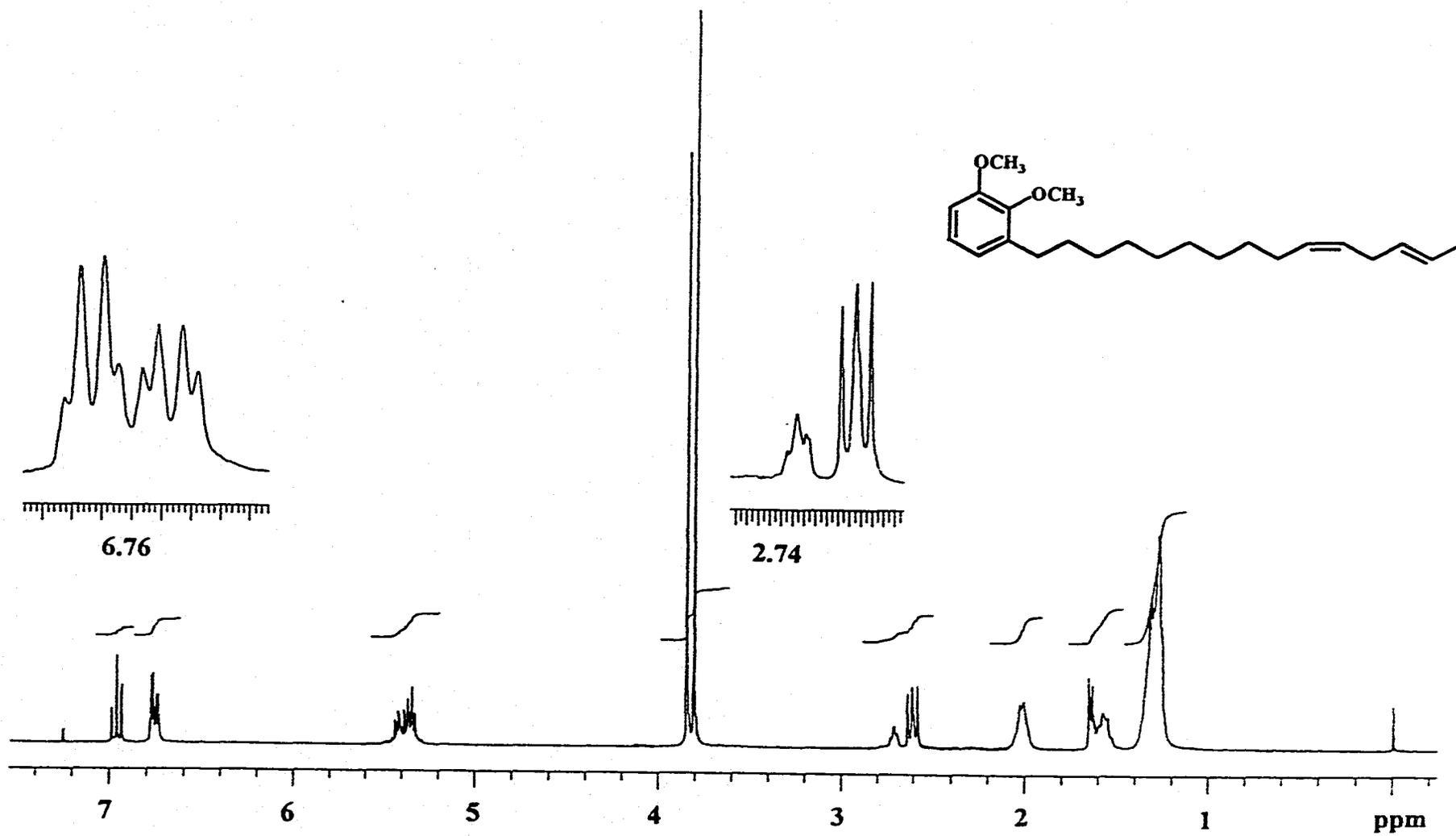
Espectro 9. Espectro de UV 1,2-diacetil-3-(10'Z, 13'E-pentadecadienil)catecol (37a)



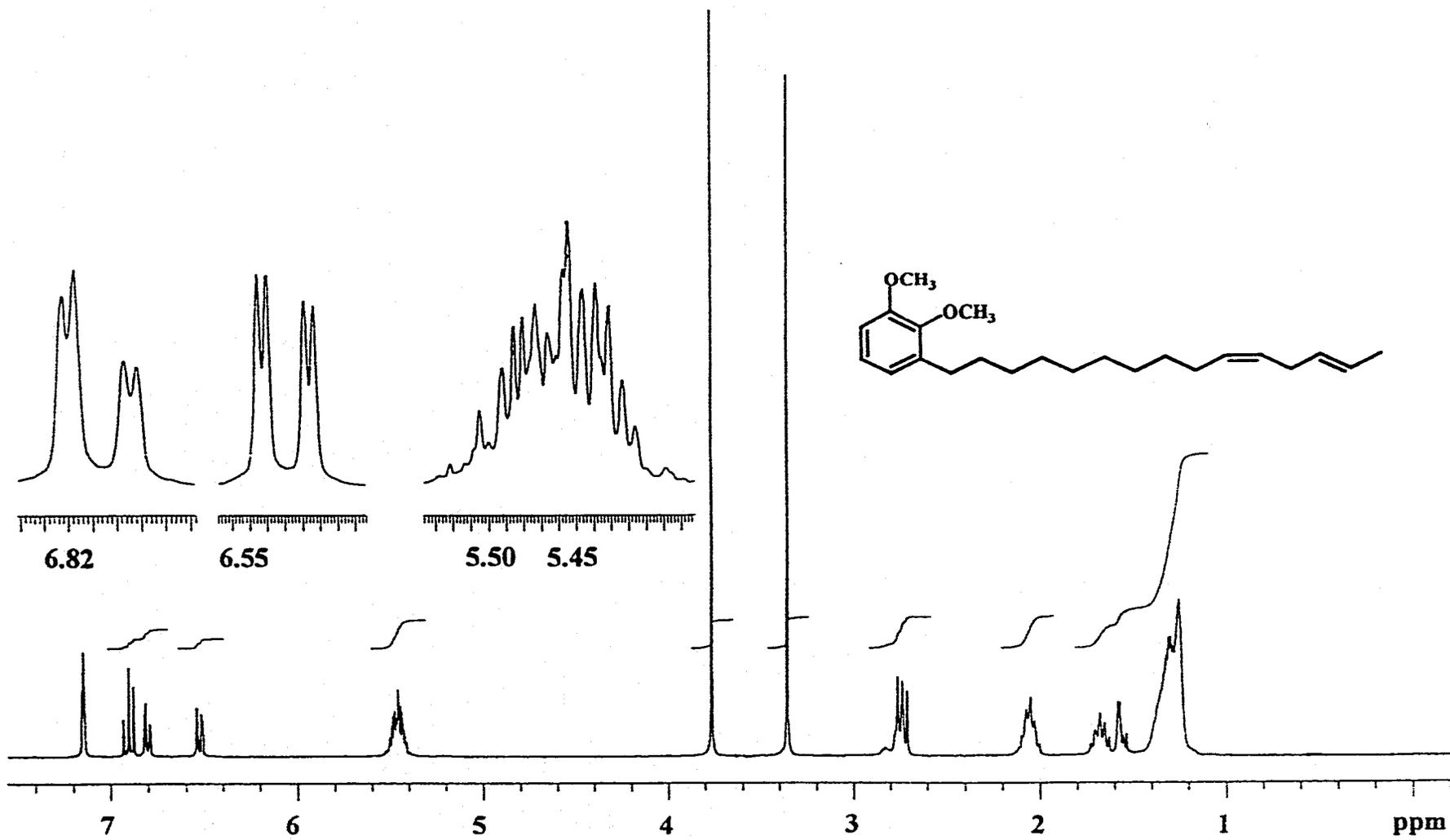
Espectro 10. EMIE del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benceno (37m)



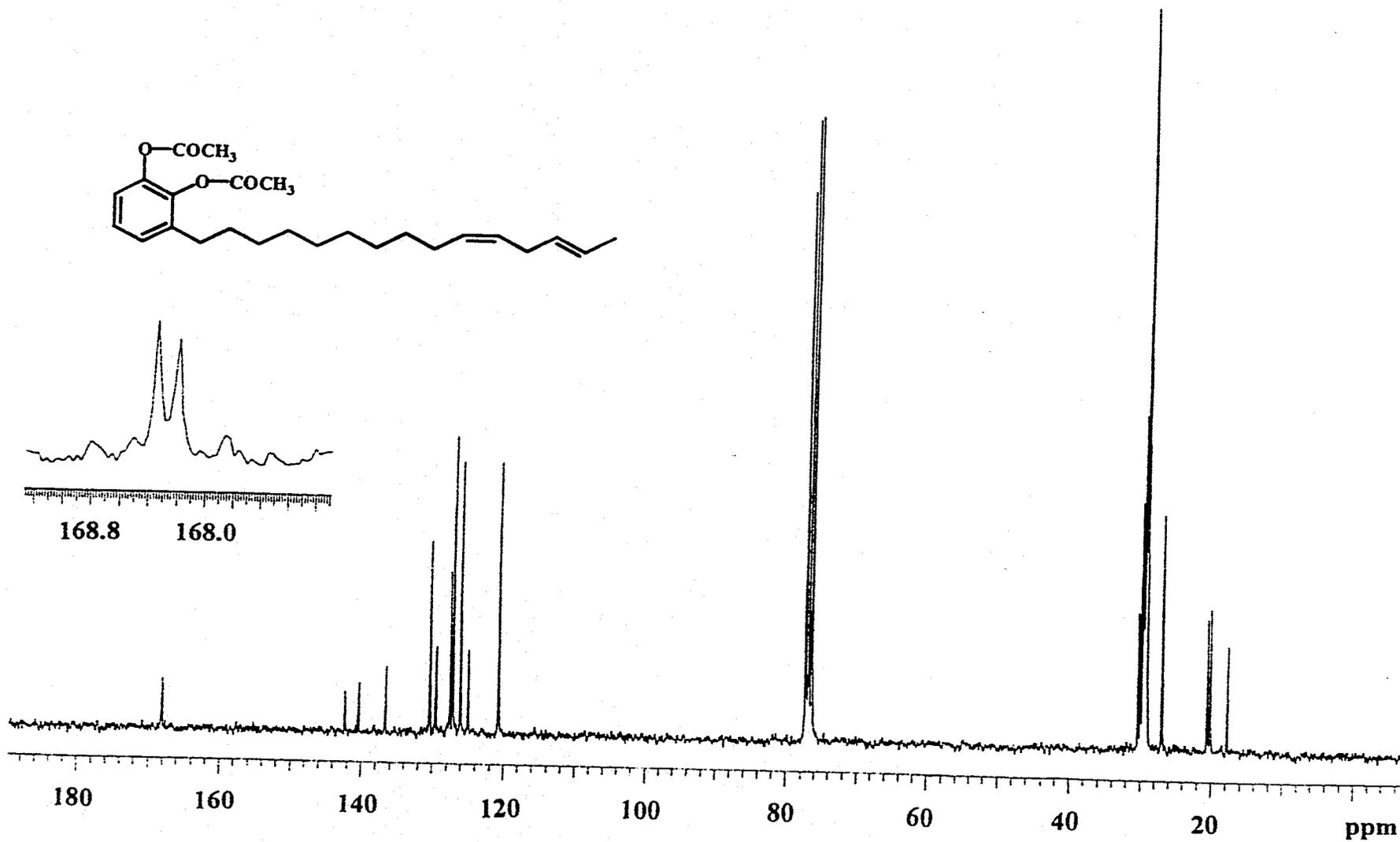
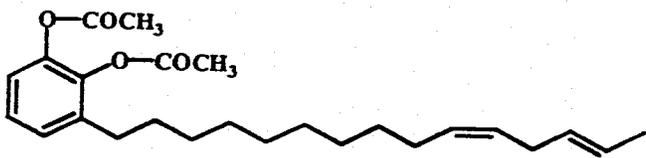
Espectro 11. RMN¹H del 1,2-diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37a)

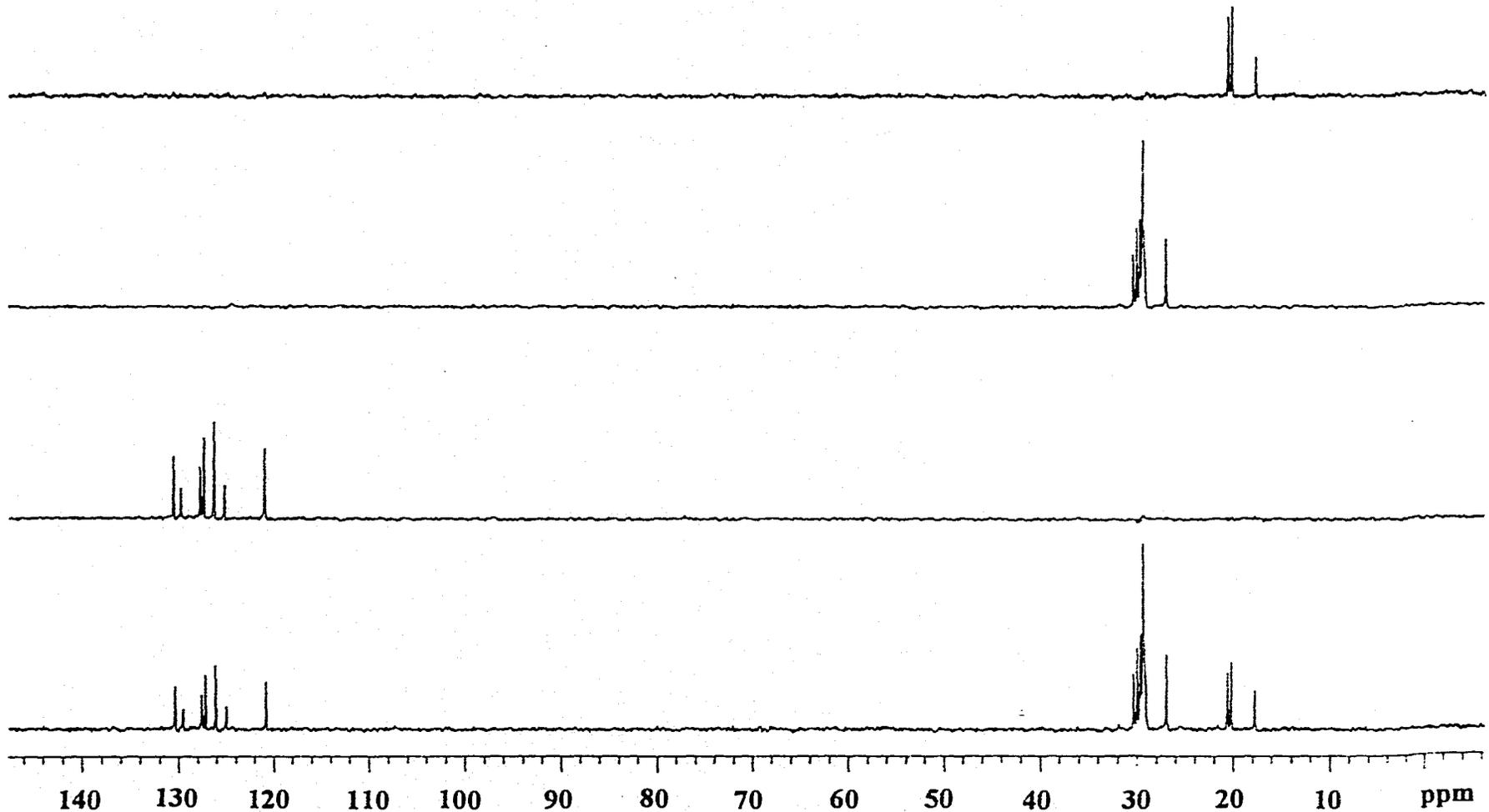


Espectro 12. RMN¹H del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benceno (37m)

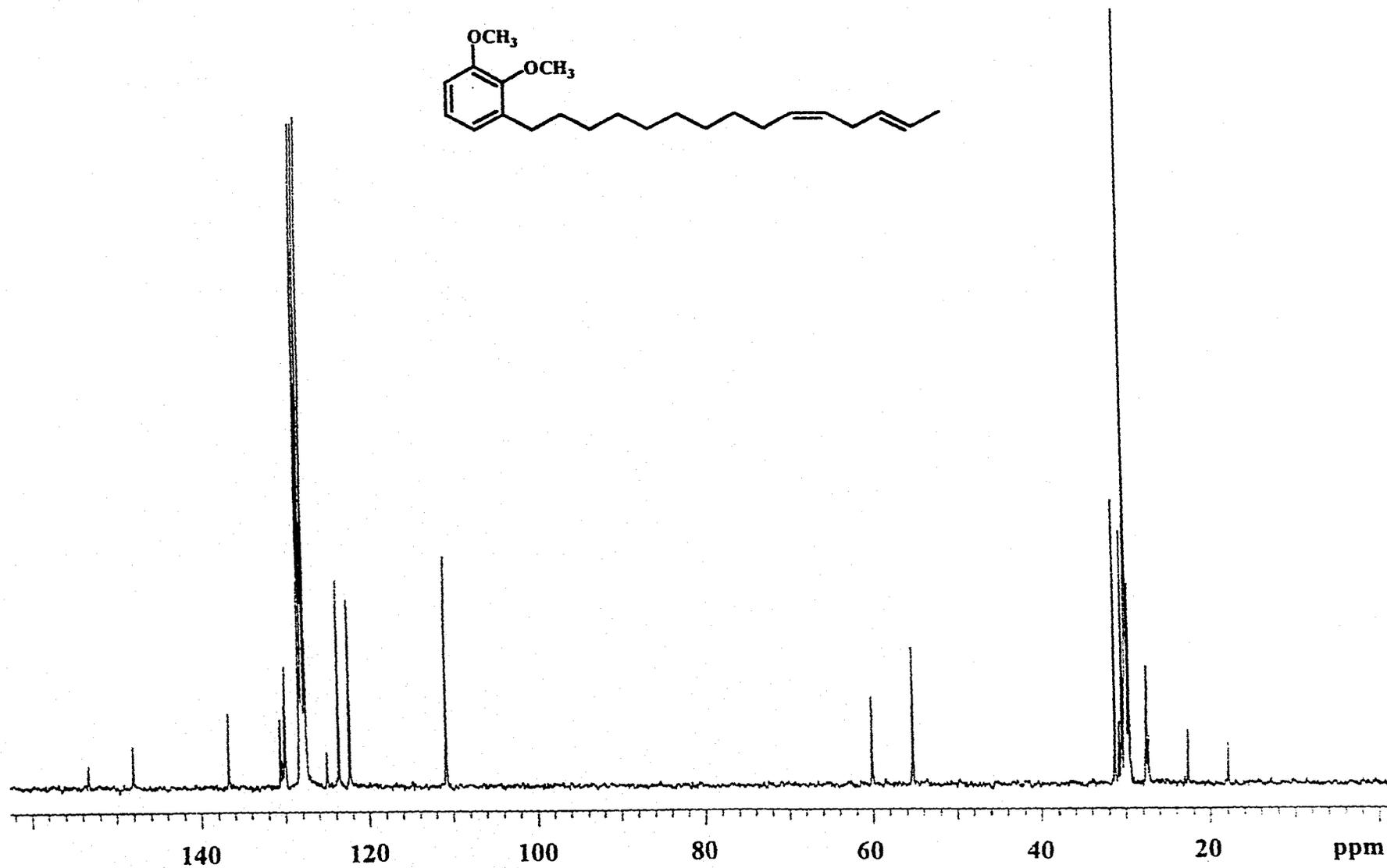


Espectro 12a. RMN¹H del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benzeno (37m)

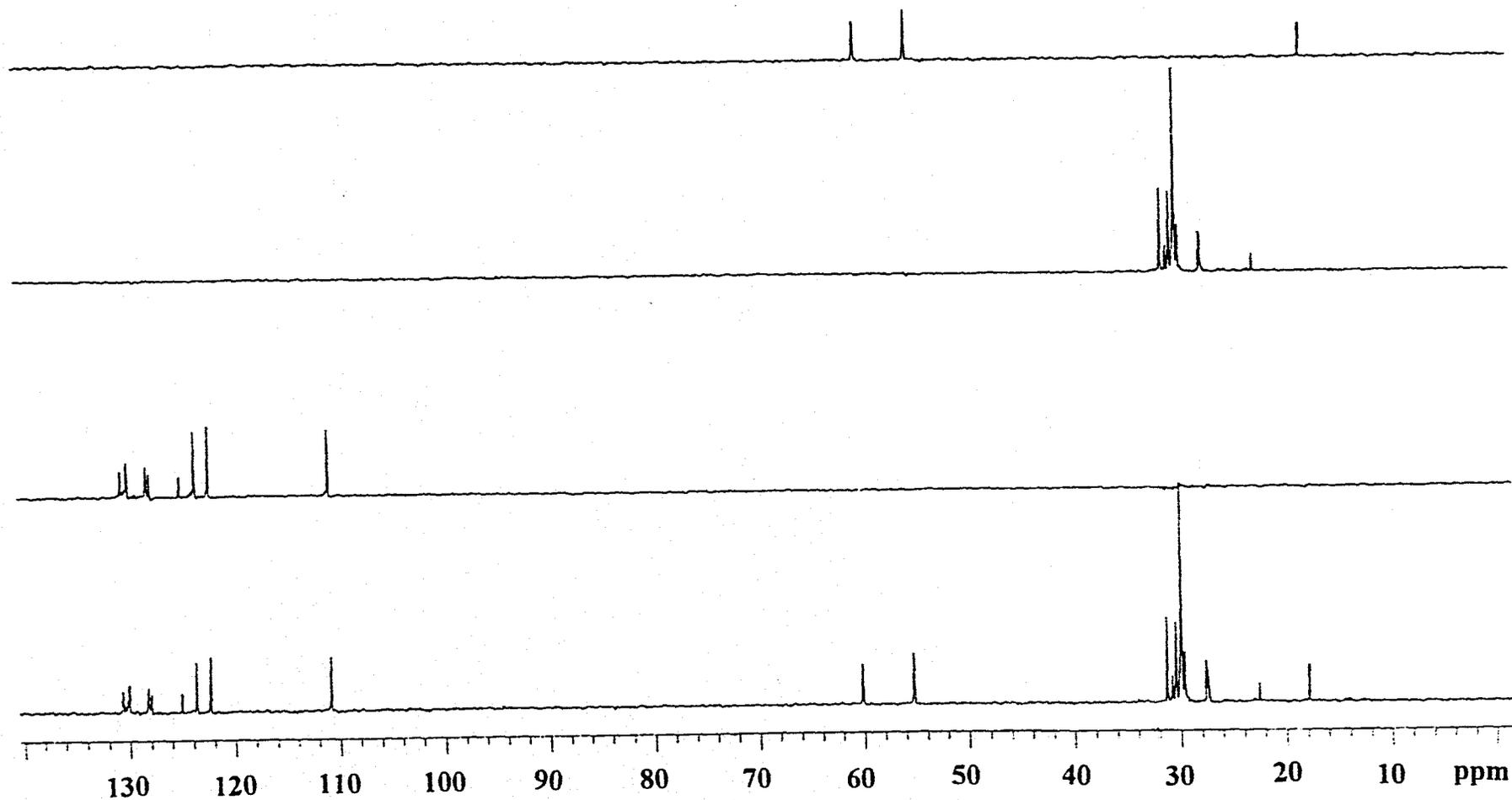
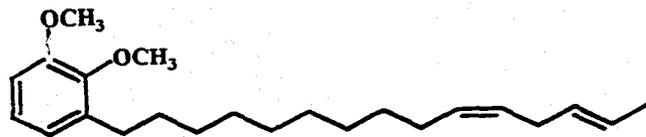




Espectro 14. DEPT del 1,2-diacetil-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)catecol (37a)

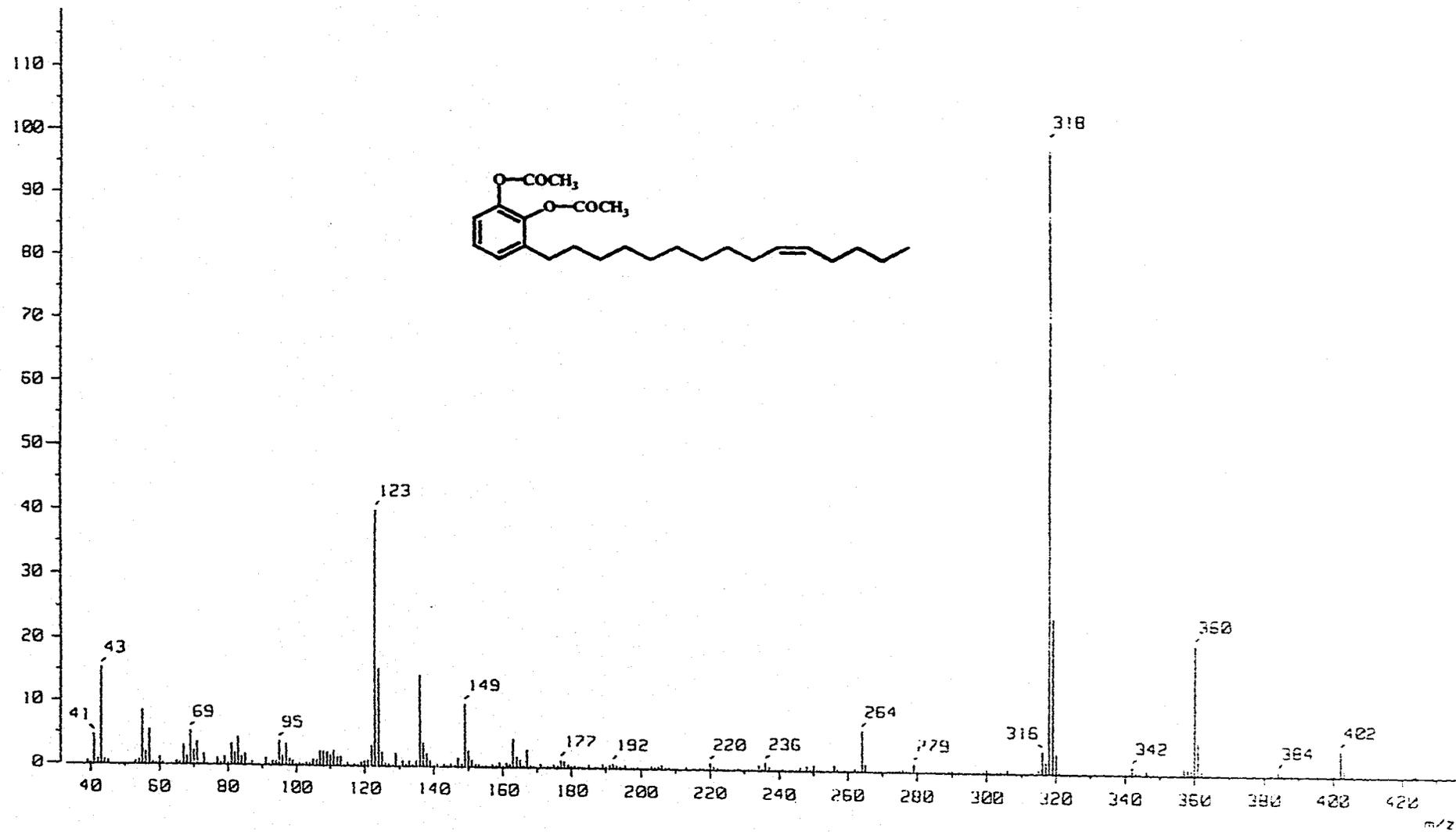


Espectro 15. RMN ^{13}C del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benceno (37m)

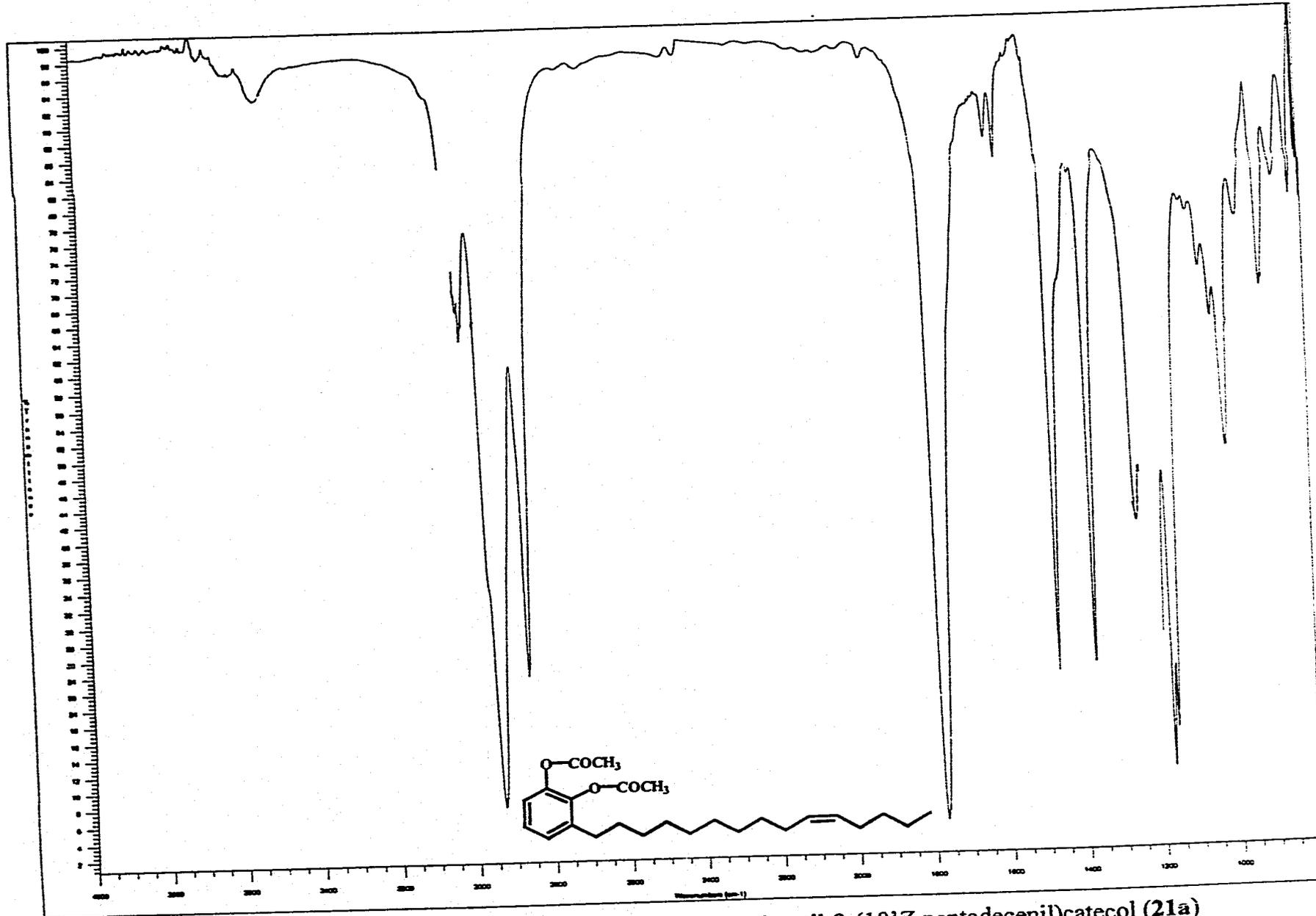


88

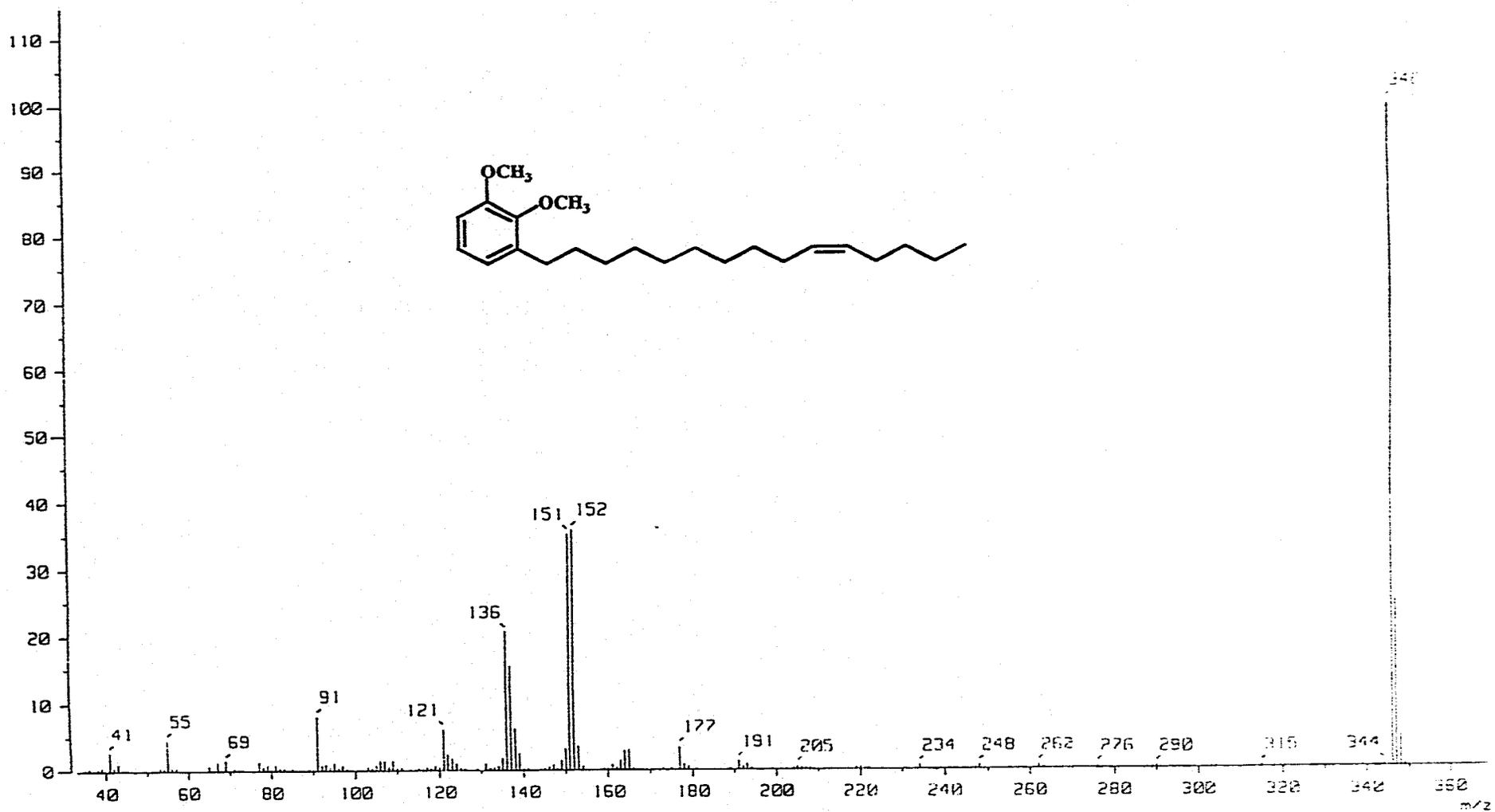
Espectro 16. DEPT del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*, 13'*E*-pentadecadienil)benzeno (37m)



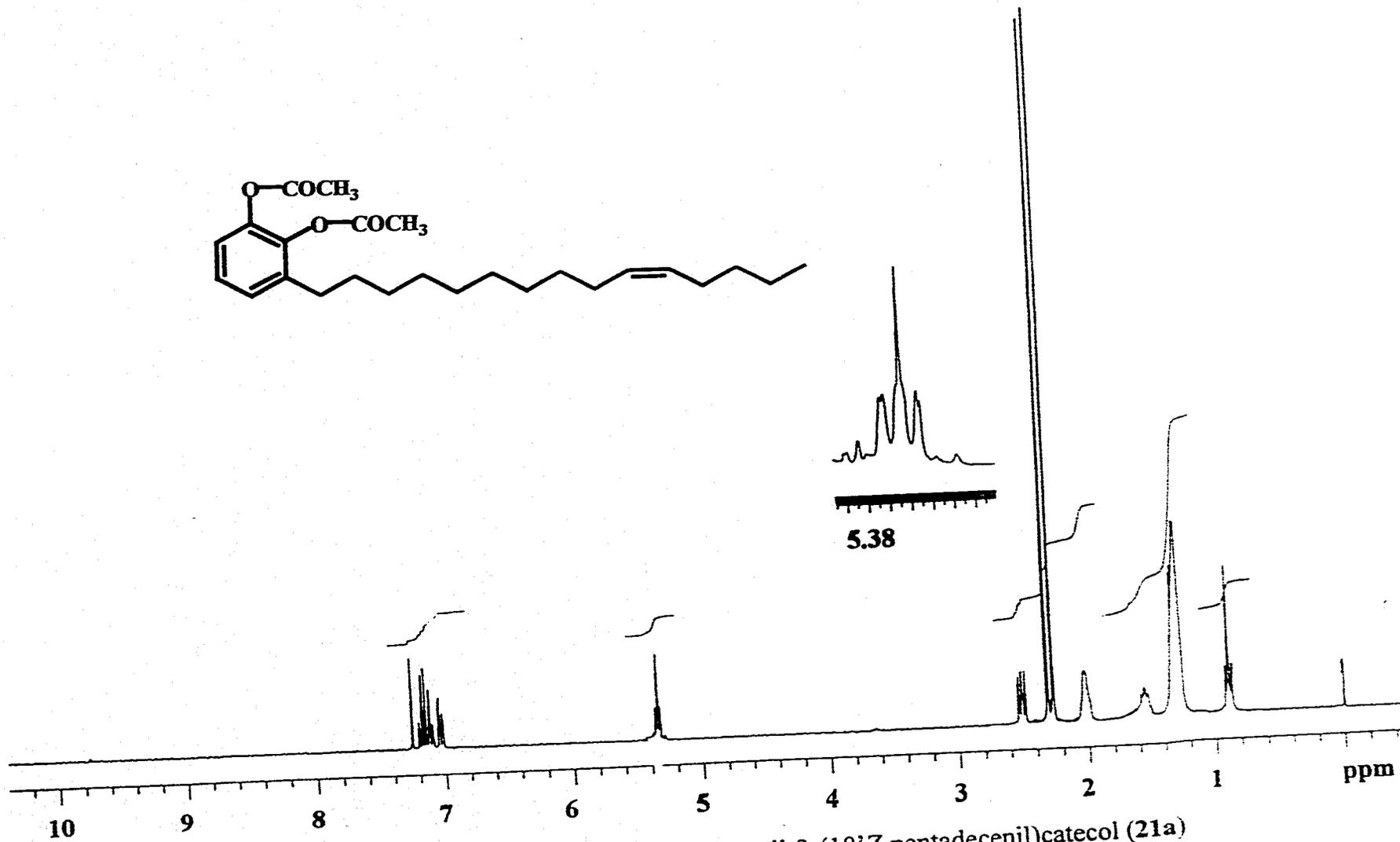
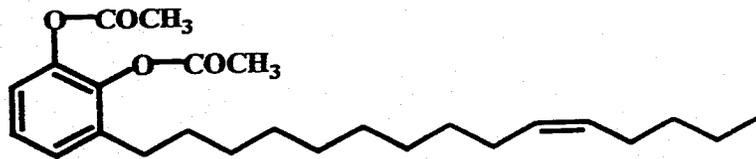
Espectro 17. EMIE del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)



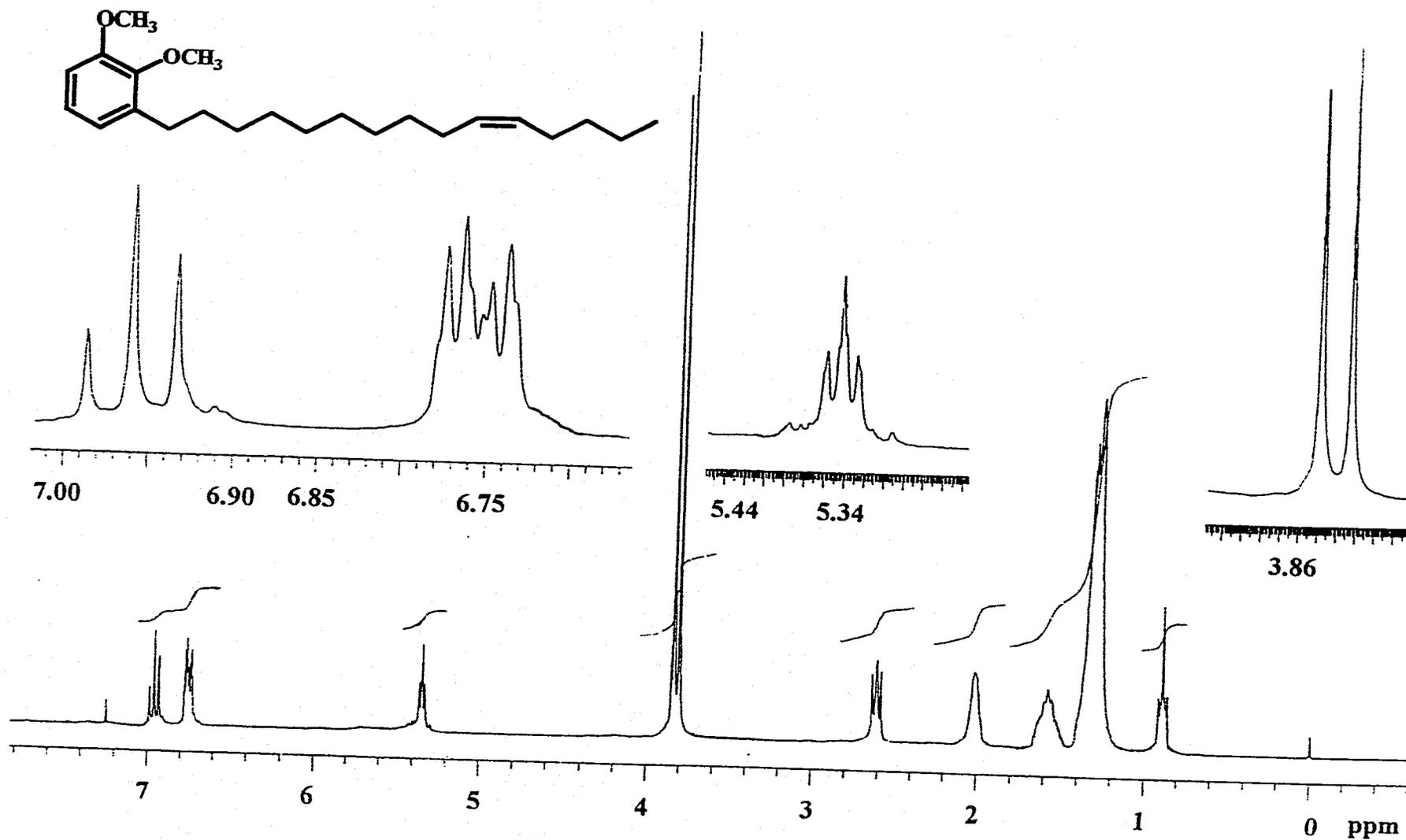
Espectro 18. Espectro de IR del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)



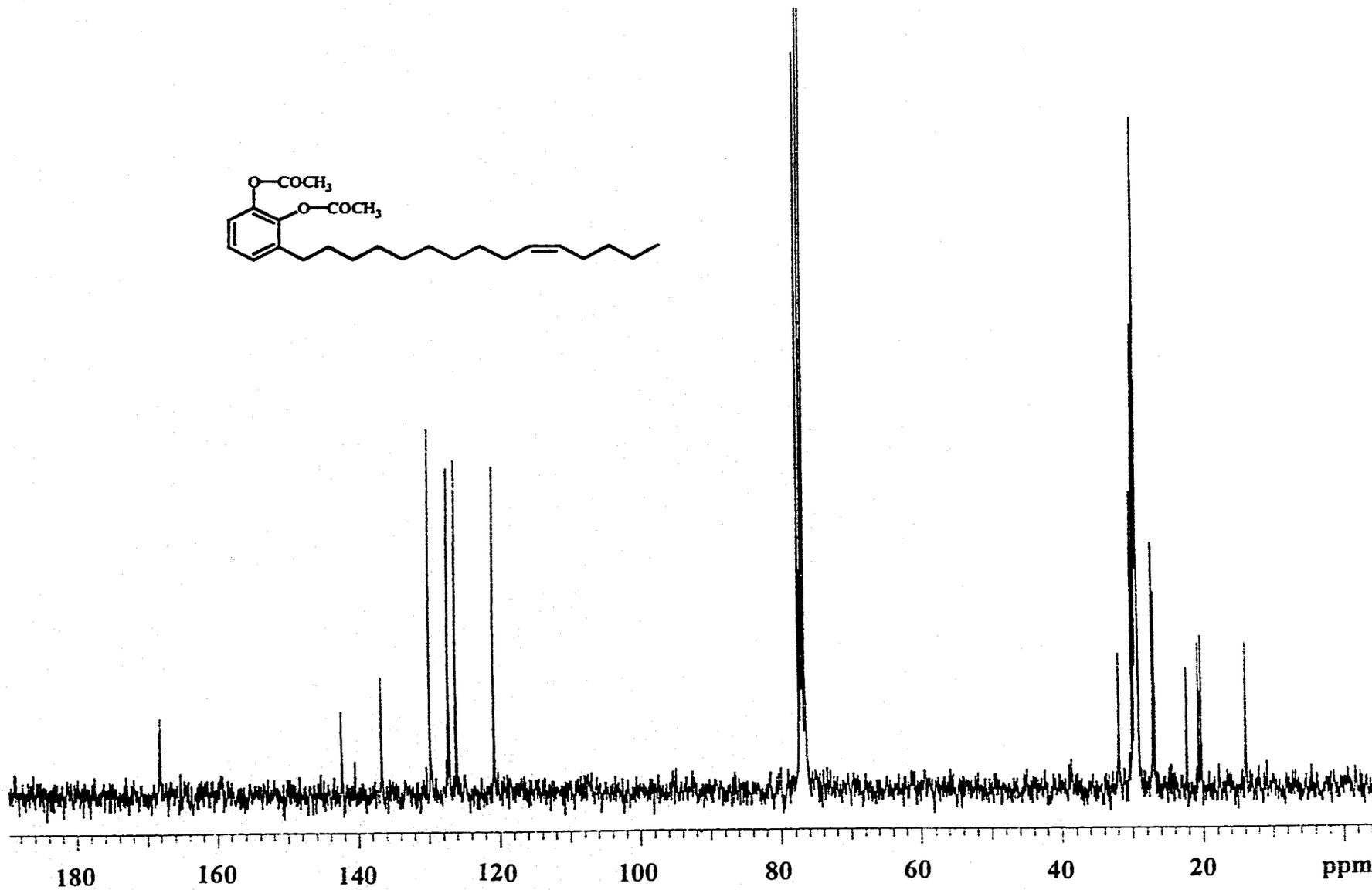
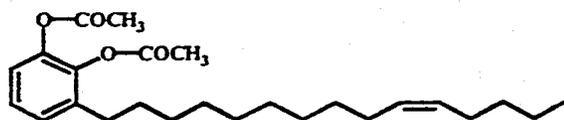
Espectro 19. EMIE del 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)



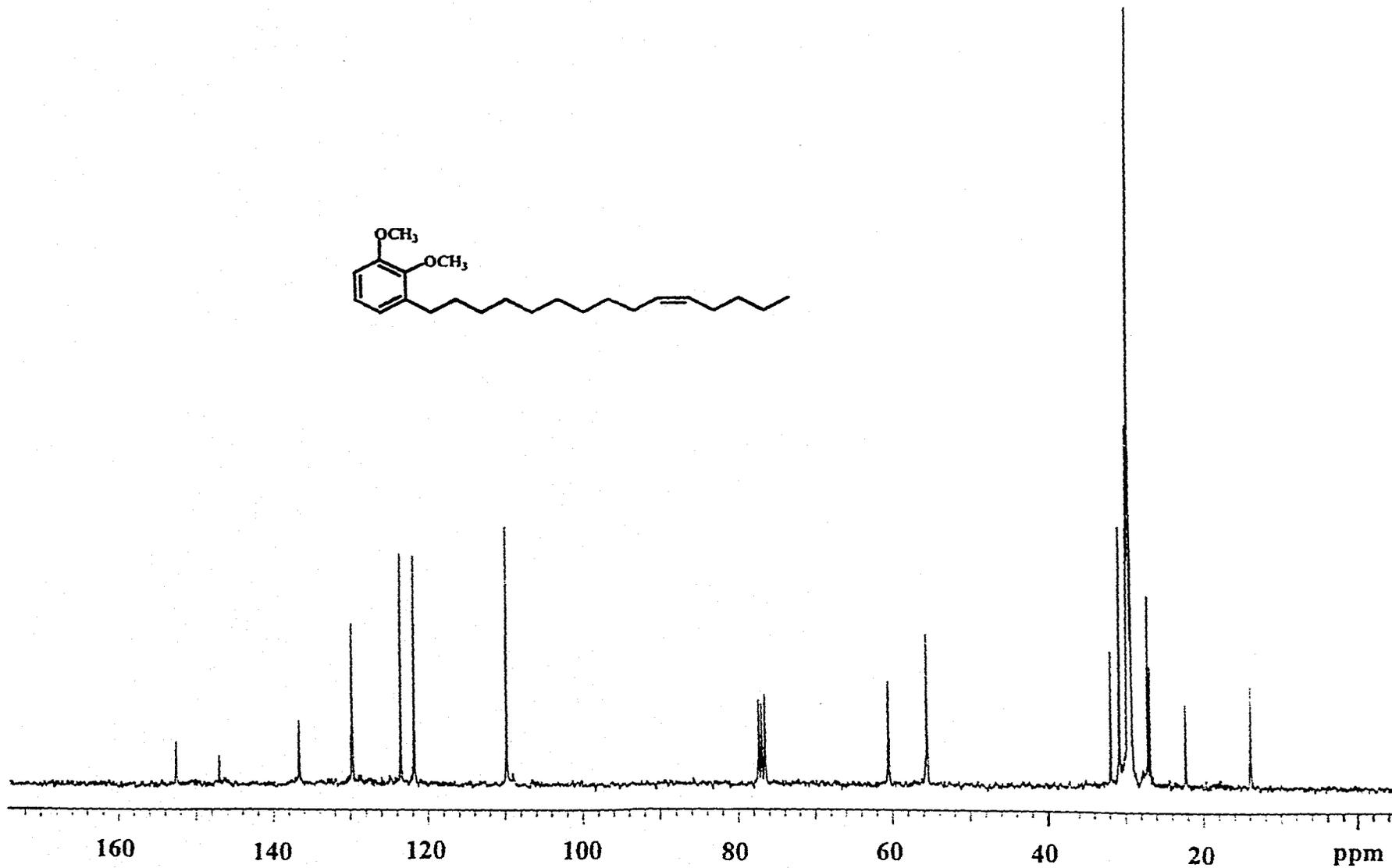
Espectro 20. RMN¹H del 1,2-diacetil-3-(10'-Z-pentadecenil)catecol (21a)

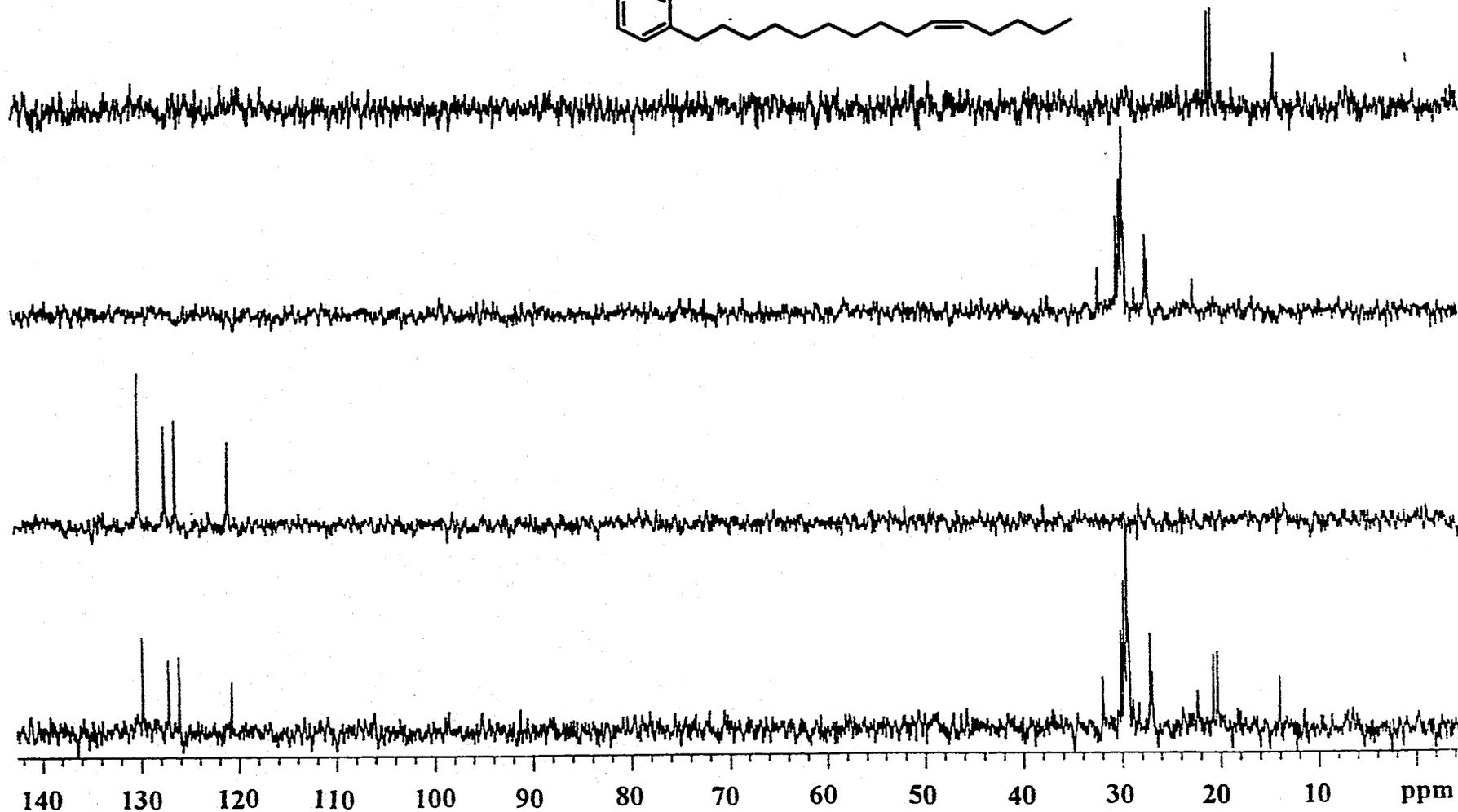
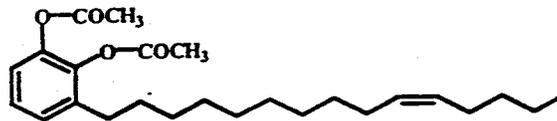


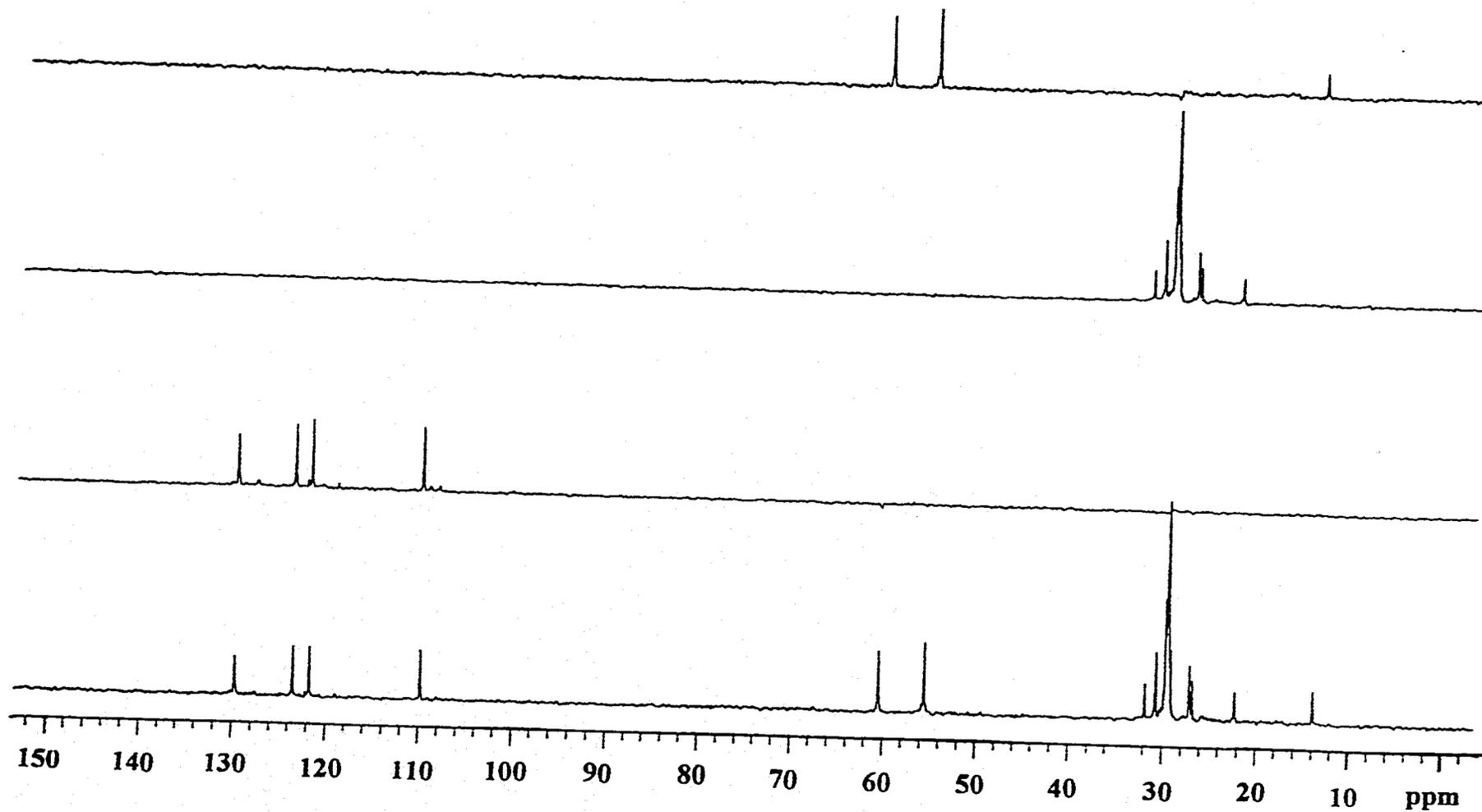
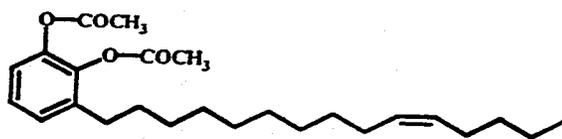
Espectro 21. RMN ^1H del 1,2-dimetóxi-3-(10'*Z*-pentadecenil)benceno (21m)



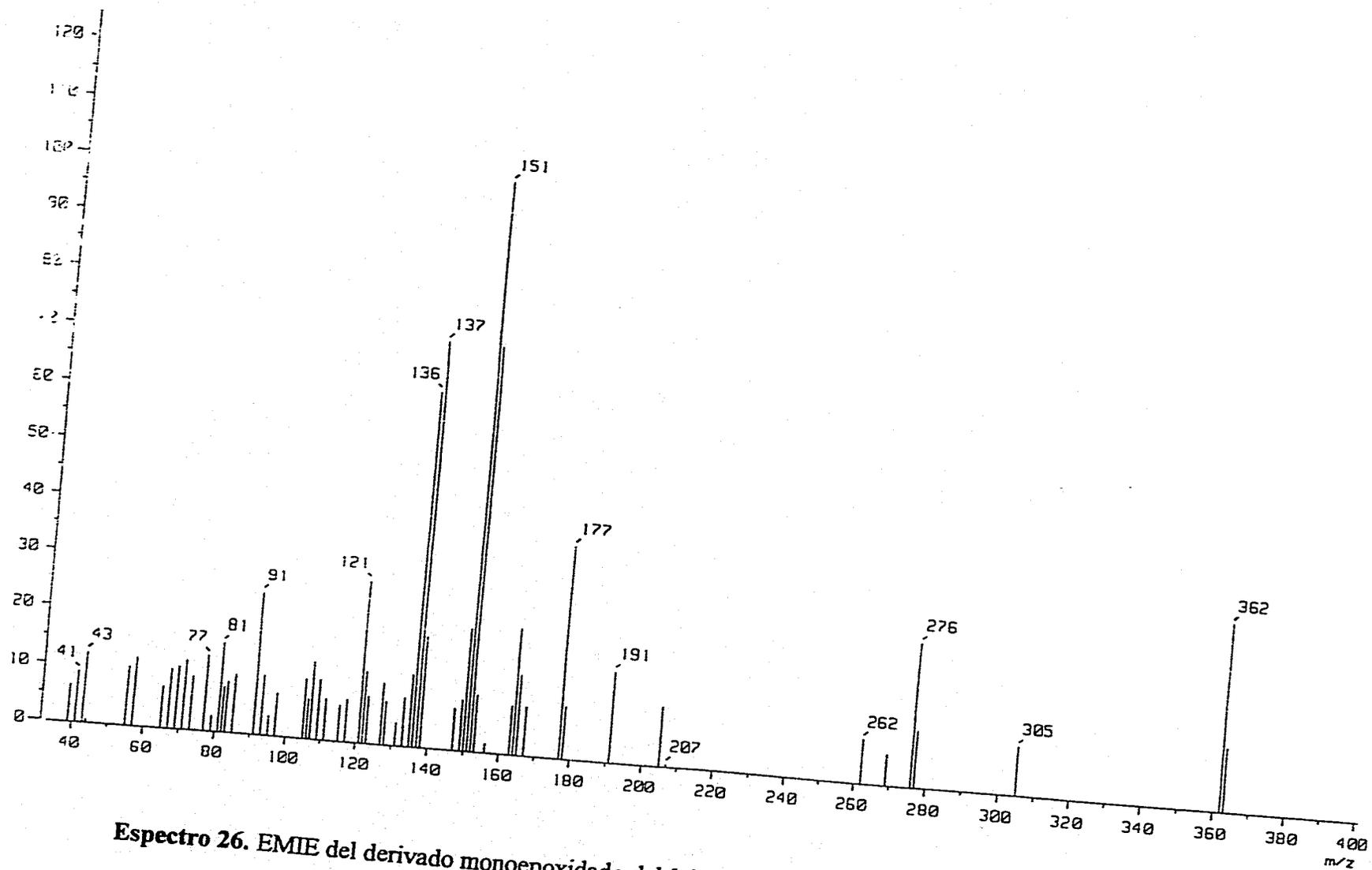
Espectro 22. RMN¹³C del 1,2-diacetil-3-(10'Z-pentadecenil)catecol (21a)



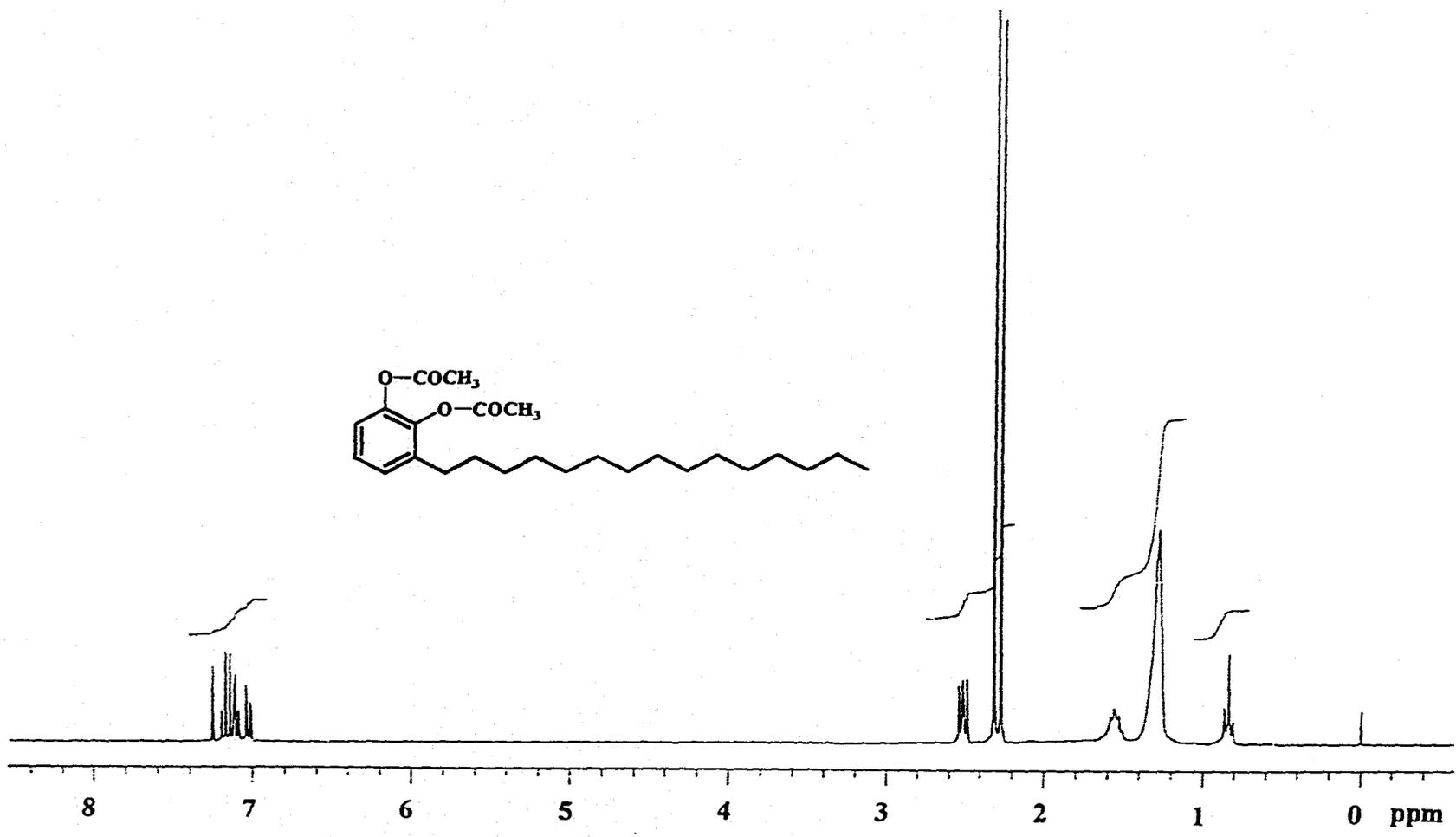




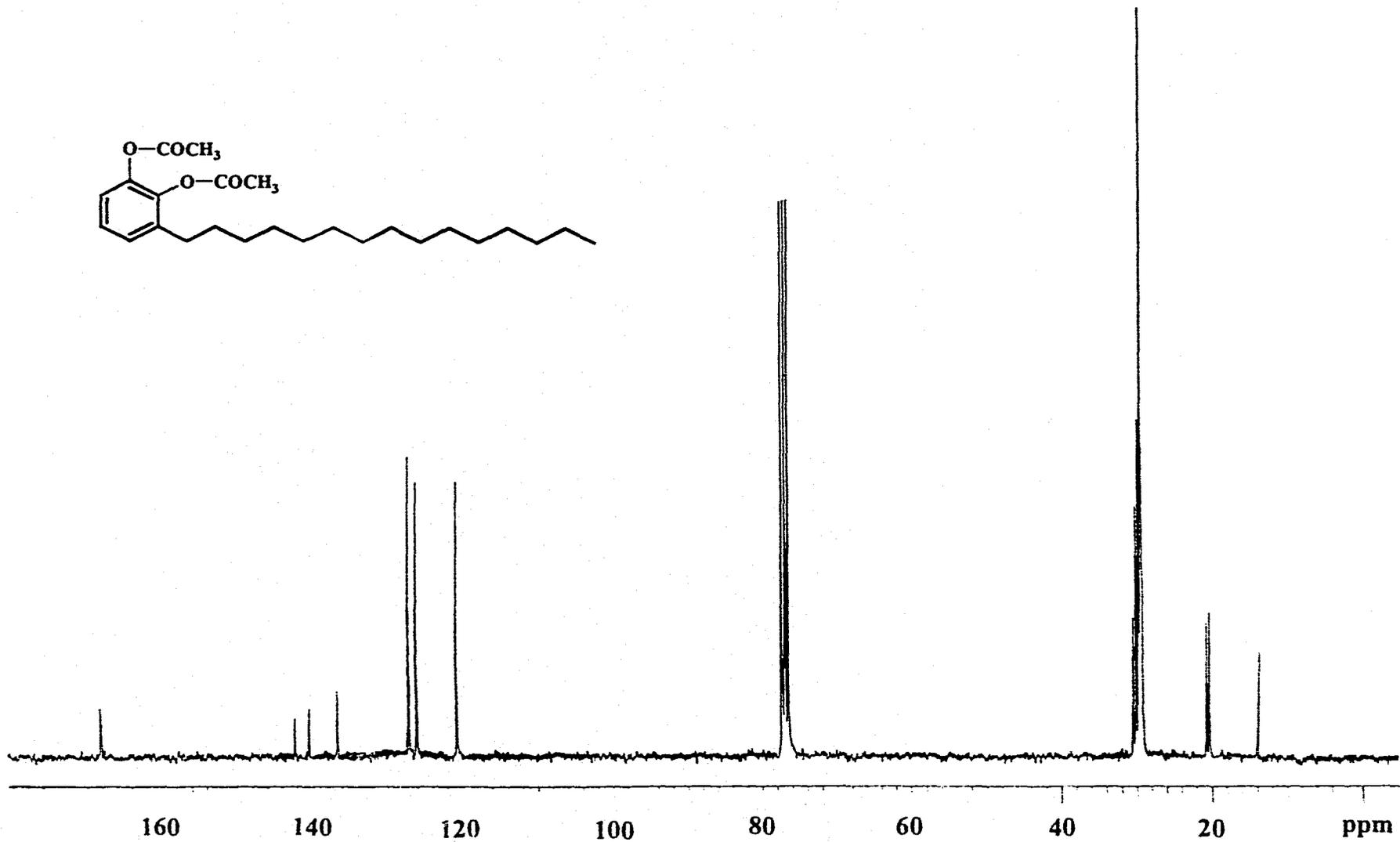
Espectro 25. DEPT 1,2-dimetóxi-3-(10'Z-pentadecenil)benceno (21m)



Espectro 26. EMIE del derivado monoepoxidado del 1,2-dimetóxi-3-(10'-Z-pentadecenil)benceno (21m).



Espectro 27. RMN¹H del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a)



Espectro 28. RMN¹³C del 1,2-diacetil-3-pentadecilcatecol (23a)