

00570

5
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS RAICES DE
Stauranthus perforatus LIEBM. (RUTACEAE)"

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. PERLA NOEMI SANCHEZ MONTEERRUBIO



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. ANA LUISA ANAYA

PRIMER VOCAL: M. EN C. ANGELA SOTELO LÓPEZ

SECRETARIO: DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

PRIMER SUPLENTE: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA

SEGUNDO SUPLENTE: DR. MARIO GONZÁLEZ DE LA PARRA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 6 DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PLANTAS
MEDICINALES; INSTITUTO DE QUÍMICA, Y LABORATORIO 124 CONJUNTO
E DEPARTAMENTO DE
FARMACIA, FACULTAD DE QUIMICA.

SUSTENTANTE: Q.F.B. PERLA NOEMI SÁNCHEZ MONTEERRUBIO

ASESOR:


DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

RESUMEN

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto CHCl_3 -MeOH (1:1) de las raíces de *Stauranthus perforatus* Liebm, utilizando como bioensayos la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* (CL_{50} = 5.1 $\mu\text{g/ml}$) y la evaluación del efecto sobre el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, permitió el aislamiento y caracterización de once metabolitos secundarios: un sesquiterpeno (4,5-epoxi- β -cariofileno) **1**, una amida (pelitorina **8**), dos lignanos (asarinina **4** y fargesina **10**), seis cumarinas [3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina **2**, chalepensina **3**, xantiletina **5**, 2'-isopropil-soraleno **6**, amirina **9**, y chalepina **11**] y el β -sitosterol **7**.

La xantiletina **5**, la amirina **9**, la chalepensina **3** y la chalepina **11** demostraron una actividad inhibidora significativa a 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. La pelitorina **8** demostró una actividad fitoinhibidora significativa a 100 $\mu\text{g/ml}$ en contra de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

La presencia de la amida pelitorina **8** en la planta podría estar relacionada con el efecto anestésico local que se le atribuye a las raíces de *S. perforatus* en la medicina tradicional.

La presencia de la pelitorina **8** y la asarinina **4** podría estar correlacionada con el efecto insecticida demostrado para las raíces de *S. perforatus*.

La chalepensina y la pelitorina demostraron un efecto citotóxico sobre la línea celular HT-29, (CE_{50} 3.47 $\mu\text{g/ml}$), (CE_{50} 3.53 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente, la pelitorina presentó también un efecto citotóxico moderado sobre los sistemas de tumores carcinoma de riñón A-498 (CE_{50} 3.88 $\mu\text{g/ml}$), y carcinoma de páncreas PACA-2 (CE_{50} 2.21 $\mu\text{g/ml}$).

ABSTRACT

The roots of *Stauranthus perforatus* were extracted with a mixture of CHCl_3 -MeOH (1:1). The resulting extract was toxic to brine shrimp ($\text{LC}_{50} = 5.1 \mu\text{g/ml}$); the extract also shows a phyto-growth-inhibitory activity against *Amaranthus hypochondriacus*, and exhibited moderate cytotoxicity against colon adenocarcinoma HT-29 ($\text{EC}_{50} = 18.77 \mu\text{g/ml}$).

Bioactivity-directed fractionation of the active extract resulted in the isolation and characterization of eleven secondary metabolites: a sesquiterpene (4,5-epoxy- β -caryophyllene **1**), an amide (pellitorine **8**), two lignans, (asarinin **4**, and fargesin **10**), six coumarins [3-(1,1-dimethylallyl)-xanthyletin **2**, chalepensisin **3**, xanthyletin **5**, 2'-isopropyl-psoralene **6**, ammirin **9**, and chalepin **11**] and β -sitosterol **7**. The structures of isolated compounds were elucidated by chemical and spectroscopic evidence.

Xanthyletin **5**, chalepensisin **3**, amirin **9** and chalepin **11** showed significant inhibition of the radicle elongation for *Amaranthus hypochondriacus*. Pellitorine **8** also showed a phyto-growth-inhibitory activity against *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Chalepensisin **3** and pellitorine **8** exhibited marginal cytotoxicity against three human cancer cell lines: colon adenocarcinoma HT-29, renal carcinoma A-498 y pancreatic carcinoma PACA-2.

The presence of pellitorine **8** could be related with the local anesthetic properties attributed to *S. perforatus* in traditional medicine.

On the other hand, the presence of pellitorine **8** and asarinin **4** might explain the insecticidal properties previously demonstrated for the root powder of *S. perforatus*.

The results of this investigation have demonstrated that *S. perforatus* contains phyto-growth-inhibitory, insecticidal and cytotoxic principles. These bioactive compounds could be useful for the development of pesticidal and antitumoral agents.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de ésta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: DGAPA (Dirección General de Asuntos de Personal Académico) IN203394 e IN206795. Dirección general de Estudios de Posgrado UNAM, (proyecto PADEP, FQ 5006) y CONACYT (Convenio No.400313-S-2576PM).

Al CONACYT por la beca otorgada, para realizar mis estudios de Maestría en Química Farmacéutica.

A la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular, por proponer el estudio de la especie *Stauranthus perforatus*, y por proporcionar e identificar el material vegetal.

A los miembros del jurado designado para la revisión del presente trabajo; cuyas aportaciones y comentarios mejoraron de manera importante la versión final de ésta tesis. De manera particular a la Dra. Ana Luisa Anaya y al Dr. Rogelio Pereda Miranda.

A la Bióloga Clara García con quien compartí el presente proyecto de investigación y quien tuvo a su cargo la realización de los ensayos biológicos preliminares de *Stauranthus perforatus*.

A la Bióloga Blanca Hernández del Instituto de Fisiología Celular, por el apoyo brindado para el procesamiento estadístico de los resultados de algunas de las evaluaciones conducentes a la determinación del potencial alelopático de los compuestos aislados de *S. perforatus*.

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Química Graciela Gutiérrez del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química (UNAM) , por el registro de los espectros de IR y rotación óptica.

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

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

Al Dr. Jerry Mc Laughlin de la Universidad de Purdue, Indiana, EEUU por proporcionar las facilidades para la realización de los ensayos de citotoxicidad.

A la Dra. Rachel Mata por su encomiable dedicación a la investigación y por su invaluable contribución a la formación de nuevas generaciones.

***Y la Paz de Dios que sobrepasa todo entendimiento, guardará vuestros
corazones y vuestro pensamiento en Cristo Jesús.***

DEDICATORIAS.

A mis padres: Guadalupe Monterrubio y José Sánchez por el amor, apoyo y comprensión que siempre me han brindado.

A mis hermanos y sobrinos: Yola, Carlos, Ruth, Elsa, Toña, Tania, Isabel, Mariela, Rubí, Mayra, Manuel, J. Carlos, Sandra, Carlota y J. Martín, con mucho afecto.

En especial a Juan Carlos por los momentos compartidos y su amistad.

A la Iglesia de Cristo, por sus invaluable enseñanzas.

A Perla Castañeda y Adelina Jiménez por su ayuda incondicional y su sincera amistad.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio 124: Sussi, Marthita, Tere, Daniel, Isabel, José Luis, Samuel, Fausto, Mirsa, Blanca, Claudina, Laura, Ma. Carmen, Leda, Lupita y Elizabeth, con el deseo de que logren alcanzar todas sus metas en la vida.

Mi profundo agradecimiento y admiración a la Dra. Rachel Mata por su acertada dirección y profesionalismo, así como por su gran calidad humana y apoyo personal durante la realización del presente trabajo.

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| Lista de abreviaturas | i |
| Lista de Cuadros | iii |
| Lista de Espectros | vi |
| Lista de Figuras | viii |
| Lista de Gráficas | ix |
| | |
| I. ANTECEDENTES | 1 |
| I.1 Antecedentes sobre la especie <i>Stauranthus perforatus</i> (Rutaceae). | 1 |
| I.2 Estudios biológicos realizados con la especie <i>Staurantus</i> <i>perforatus</i> . | 4 |
| II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS | 7 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL | 11 |
| 1. Material vegetal. | 11 |
| 2. Análisis cromatográficos. | 11 |
| 3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales. | 12 |
| 4. Ensayos Biológicos. | 13 |
| 4.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> . | 13 |
| 4.2 Determinación de la actividad fitoinhibidora por el método de caja Petri. | 13 |
| 4.3 Determinación de la actividad citotóxica. | 14 |
| 5. Extracción de las raíces de <i>Stauranthus perforatus</i> . | 15 |
| 6. Fraccionamiento biodirigido del extracto total. | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 7. Aislamiento y purificación de los compuestos de las fracciones activas. | 17 |
| 7.1 Obtención del 4,5-epoxi- β -cariofileno (1) de la fracción primaria I | 17 |
| 7.2 Aislamiento y purificación de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2), de la fracción primaria II. | 18 |
| 7.3 Obtención de la chalepsina (3), y de cantidades adicionales de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2) de la fracción primaria III. | 19 |
| 7.4 Aislamiento y purificación de la asarinina (4), la xantiletina (5), el 2'-isopropil-soraleno (6) y el β -sitosterol (7) de la fracción primaria V. | 19 |
| 7.5 Aislamiento y purificación de la pelitorina (8) y la amirina (9) de la fracción primaria VI. | 21 |
| 7.6 Aislamiento y purificación del lignano fargesina. (10) de la fracción primaria VII. | 22 |
| 7.7 Aislamiento y purificación de cantidades adicionales. de fargesina (10) y de chalepina (11) de la fracción primaria VIII. | 23 |
| 7.8 Aislamiento de cantidades adicionales de chalepina (11). | 23 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 24 |
| 1. Actividad citotóxica in vitro del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de <i>Stauranthus perforatus</i> . | 26 |
| 2. Determinación de la toxicidad para <i>A. salina</i> de las fracciones primarias del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de <i>Stauranthus perforatus</i> . | 27 |
| 3. Efecto fitotóxico de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de <i>Stauranthus perforatus</i> . | 28 |

| | |
|---|------------|
| V. CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS AISLADOS | 29 |
| 1. Identificación del 4,5-epoxi- β -cariofileno (1). | 32 |
| 2. Caracterización de las piranocumarinas xantiletina (5) y 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2). | 32 |
| 3. Caracterización de la chalepensina (3) y el 2'-isopropil-soraleno (6). | 38 |
| 4. Identificación de la amirina (9) y la chalepina (11). | 45 |
| 5. Caracterización de la amida pelitorina (8). | 52 |
| 6. Caracterización de la asarinina (4). | 55 |
| 7. Caracterización de la fargesina (10). | 60 |
| VI. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Stauranthus perforatus</i>. | 65 |
| 1. Determinación del efecto fitotóxico de los compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> , sobre <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 65 |
| 2. Determinación de la toxicidad de los compuestos obtenidos de <i>S. perforatus</i> contra <i>A. salina</i> . | 72 |
| 3. Actividad citotóxica de los metabolitos secundarios obtenidos de <i>S. perforatus</i> . | 75 |
| 4. Actividad insecticida relacionada a los compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> . | 76 |
| VII. CONCLUSIONES | 79 |
| VIII BIBLIOGRAFIA | 125 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| AcOEt: | acetato de etilo |
| CHCl ₃ : | cloroformo |
| MeOH: | metanol |
| d: | doblete |
| dd: | doblete dobleteado |
| ddd: | doblete de doblete de doblete |
| m: | multiplete |
| s: | singulete |
| dt: | doblete tripleteado |
| sa: | singulete ancho |
| J: | constante de acoplamiento |
| δ: | desplazamiento químico |
| Hz: | hertz |
| Mhz: | mega hertz |
| TMS: | tetrametilsilano |
| RMN- ¹ H: | resonancia magnética nuclear de hidrógeno |
| RMN- ¹³ C: | resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| CDCl ₃ : | cloroformo deuterado |
| IR: | infrarrojo |
| UV: | ultravioleta |
| HETCOR: | espectroscopia de correlación heteronuclear |
| COSY: | espectroscopia de correlación homonuclear |
| p.f.: | punto de fusión |

| | |
|--------------------|---|
| g: | gramos |
| mg: | miligramos |
| ml: | mililitros |
| °C: | grados centígrados |
| µl: | microlitros |
| m/z: | relación masa carga |
| Int. rel.: | intensidad relativa |
| EMIE: | espectrometría de masas por impacto electrónico |
| EMIQ: | espectrometría de masas por ionización química |
| EMFAB: | espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos |
| CL ₅₀ : | concentración letal media |
| DE ₅₀ : | dosis efectiva media |
| CE ₅₀ : | concentración efectiva media |
| 2,4-D: | ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| ppm: | partes por millón |
| N.D. | no determinado |
| DCPA: | éster dimetilico del ácido 2,3,5,6-tetracloro-1,4-bencendicarboxílico |
| A-498: | carcinoma de riñón |
| PC-3 | adenocarcinoma de próstata |
| PACA-2 | carcinoma de páncreas |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|---|--------|
| Cuadro 1. Efecto de los lixiviados acuosos de las raíces de <i>Stauranthus perforatus</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 4 |
| Cuadro 2. Efecto del extracto CHCl ₃ /MeOH (1:1) de las raíces de <i>Stauranthus perforatus</i> sobre el crecimiento radicular y la germinación de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 4 |
| Cuadro 3. Efecto de la raíz de <i>Stauranthus perforatus</i> sobre el índice de sobrevivencia de <i>Sitophylus zeamais</i> . | 6 |
| Cuadro 4. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina. | 11 |
| Cuadro 5. Sistemas de eluyentes empleados para los análisis cromatográficos en capa fina. | 12 |
| Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía de gel de sílice del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de <i>S. perforatus</i> . | 17 |
| Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción activa I. | 18 |
| Cuadro 8. Resumen de la cromatografía en columna de la fracción activa primaria II. | 18 |
| Cuadro 9. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria V. | 20 |
| Cuadro 10. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fracción VI. | 21 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 11. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción activa VII. | 22 |
| Cuadro 12. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fracción VIII del cuadro 6. | 23 |
| Cuadro 13. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto clorofórmico-metanólico (1:1) de <i>S. perforatus</i> . | 26 |
| Cuadro 14. Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> de las fracciones cromatográficas primarias del extracto clorofórmico- metanólico (1:1) de <i>S. perforatus</i> . | 27 |
| Cuadro 15. Efecto de las fracciones cromatográficas del extracto clorofórmico- metanólico (1:1) de <i>S. perforatus</i> , sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 28 |
| Cuadro 16. Rendimiento de los compuestos aislados de las raíces de <i>S. perforatus</i> . | 29 |
| Cuadro 17. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la xantiletina 5 y de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 33 |
| Cuadro 18. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H de las piranocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 34 |
| Cuadro 19. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹³ C de las piranocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 35 |
| Cuadro 20. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la chalepensina 3 y el 2'-isopropil-soraleno 6. | 39 |
| Cuadro 21. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H de las furanocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 41 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 22. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹³ C de las furanocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 42 |
| Cuadro 23. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la amirina 9 y la chalepina 11. | 46 |
| Cuadro 24. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H de las dihidrofuranocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 50 |
| Cuadro 25. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹³ C de las dihidrofuranocumarinas aisladas de <i>S. perforatus</i> . | 51 |
| Cuadro 26. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la pelitorina 8. | 53 |
| Cuadro 27. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la asarinina 4. | 56 |
| Cuadro 28. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la fargesina 11. | 61 |
| Cuadro 29. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹³ C de los lignanos aislados de <i>S. perforatus</i> . | 63 |
| Cuadro 30. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H de los lignanos aislados de <i>S. perforatus</i> . | 64 |
| Cuadro 31. Efecto de los compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 66 |
| Cuadro 32. Efecto de los compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> sobre <i>A. salina</i> . | 72 |
| Cuadro 33. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de algunos compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> . | 75 |

LISTA DE ESPECTROS

| | Página |
|--|--------|
| Espectro 1. Espectro de IR de la xantiletina 5. | 80 |
| Espectro 2. Espectro de IR de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 81 |
| Espectro 3. Espectro de masas de la xantiletina 5. | 82 |
| Espectro 4. Espectro de masas de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 83 |
| Espectro 5. Espectro de RMN- ¹ H de la xantiletina 5. | 84 |
| Espectro 6. Espectro de RMN- ¹³ C de la xantiletina 5. | 85 |
| Espectro 7. Espectro de RMN- ¹ H de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 86 |
| Espectro 8. Espectro de RMN- ¹³ C de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 87 |
| Espectro 9. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la xantiletina 5. | 88 |
| Espectro 10. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 89 |
| Espectro 11. Espectro de RMN-HETCOR de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2. | 90 |
| Espectro 12. Espectro de IR de la chalepsina 3. | 91 |
| Espectro 13. Espectro de IR del 2'-isopropil-soraleno 6. | 92 |
| Espectro 14. Espectro de masas de la chalepsina 3. | 93 |
| Espectro 15. Espectro de masas del 2'-isopropil-soraleno 6. | 94 |
| Espectro 16. Espectro de RMN- ¹ H de la chalepsina 3. | 95 |
| Espectro 17. Espectro de RMN- ¹³ C de la chalepsina 3. | 96 |
| Espectro 18. Espectro de RMN-HETCOR de la chalepsina 3. | 97 |
| Espectro 19. Espectro de RMN- ¹ H del 2'-isopropil-soraleno 6. | 98 |
| Espectro 20. Espectro de RMN- ¹³ C del 2'-isopropil-soraleno 6. | 99 |

| | |
|--|-----|
| Espectro 21. Espectro de RMN-HETCOR del 2'-isopropil-soraleno 6. | 100 |
| Espectro 22. Espectro de IR de la amirina 9. | 101 |
| Espectro 23. Espectro de IR de la chalepina 11. | 102 |
| Espectro 24. Espectro de masas de la amirina 9. | 103 |
| Espectro 25. Espectro de masas de la chalepina 11. | 104 |
| Espectro 26. Espectro de RMN- ¹ H de la de la amirina 9. | 105 |
| Espectro 27. Espectro de RMN- ¹³ C de la amirina 9. | 106 |
| Espectro 28. Espectro de RMN- ¹ H de la chalepina 11. | 107 |
| Espectro 29. Espectro de RMN- ¹³ C de la chalepina 11. | 108 |
| Espectro 30. Espectro de RMN-HETCOR de la amirina 9. | 109 |
| Espectro 31. Espectro de RMN-HETCOR de la chalepina 11. | 110 |
| Espectro 32. Espectro de IR de la pelitorina 8. | 111 |
| Espectro 33. Espectro de masas de la pelitorina 8. | 112 |
| Espectro 34. Espectro de RMN- ¹³ C de la pelitorina 8. | 113 |
| Espectro 35. Espectro de RMN- ¹ H de la pelitorina 8. | 114 |
| Espectro 36. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la pelitorina 8. | 115 |
| Espectro 37. Espectro de IR de la asarinina 9. | 116 |
| Espectro 38. Espectro de masas de la asarinina 9. | 117 |
| Espectro 39. Espectro de RMN- ¹³ C de la asarinina 9. | 118 |
| Espectro 40. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT de la asarinina 9. | 119 |
| Espectro 41. Espectro de RMN- ¹ H de la asarinina 9. | 120 |
| Espectro 42. Espectro de masas de la fargesina 10. | 121 |
| Espectro 43. Espectro de IR de la fargesina 10. | 122 |
| Espectro 44. Espectro de RMN- ¹ H de la fargesina 10. | 123 |
| Espectro 45. Espectro de RMN- ¹³ C de la fargesina 10. | 124 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Proceso de extracción de las raíces de <i>S. perforatus</i> . | 16 |
| Figura 2. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de <i>S. perforatus</i> . | 30 |
| Figura 3. Vista estereoscópica generada por rayos X de la xantiletina 5. | 37 |
| Figura 4. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional (2D-COSY) de la chalepentina 3. | 40 |
| Figura 5. Espectro de RMN- ¹ H. Experimento de doble resonancia del 2'-isopropil-soraleno 6. | 43 |
| Figura 6. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional (2D-COSY) de la amirina 9. | 47 |
| Figura 7. Espectroscopia bidimensional homonuclear (2D-COSY) de la chalepina 11. | 49 |
| Figura 8. Espectro de correlación homonuclear bidimensional (2D-COSY) de la pelitorina 8. | 54 |
| Figura 9. Datos de desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C y RMN- ¹ H de furofuranos del tipo sesamina. | 58 |
| Figura 10. Proyección estereoscópica generada por rayos X de la asarinina 4. | 59 |
| Figura 11. Desplazamientos químicos (δ) en RMN- ¹³ C, de C-1 y C-1' de los isómeros de la fargesina. | 62 |

LISTA DE GRAFICAS

| | Página |
|---|--------|
| Gráfica 1. Efecto de la raíz al 2% de <i>S. perforatus</i> . incorporada al suelo sobre el número de malezas. | 6 |
| Gráfica 2. Efecto de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> | 67 |
| Gráfica 3. Efecto de la chalepensina 3, la pelitorina 8 y la asarinina 4 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> a 100 µg/ml. | 67 |
| Gráfica 4. Efecto de la chalepensina 3, la pelitorina 8 y la asarinina 4 sobre el crecimiento radicular de <i>Echinochloa crusgalli</i> a 100 µg/ml. | 68 |
| Gráfica 5. Efecto de la xantiletina 5 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 68 |
| Gráfica 6. Efecto de la amirina 9 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 69 |
| Gráfica 7. Efecto de la chalepina 11 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 69 |
| Gráfica 8. Efecto de la fargesina 10 sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> . | 73 |

I. ANTECEDENTES.

I.1. Antecedentes sobre la especie *Stauranthus perforatus* (Rutaceae).

Stauranthus perforatus Liebm. (Rutaceae) es una especie medicinal que se distribuye en México, en la península de Yucatán (selvas medianas y bajas de la región) y en algunas localidades del estado de Veracruz (Engler, 1931). En Yucatán se le conoce comúnmente con el nombre Maya de "tankas-ché". Por su abundancia, los árboles de *S. perforatus* son elementos importantes en el estrato medio de las selvas. Las hojas y raíces de esta especie se emplean en la medicina popular yucateca para el tratamiento de dolores de cabeza, epilepsia y reumatismo. Las raíces se utilizan también como un anestésico local. (García, 1995).

Los individuos de esta especie son árboles o arbustos, con ramas pardorrojizas, hojas unifoliadas, con el ápice repentinamente acuminado, coriáceas y de color verde brillante, la venación del envés es plana o prominulosa; el eje foliar es delgado pero prominente, el haz está densamente glánduloso y su venación es prominulosa. Las hojas miden 6 a 9.5 cm de largo y 1.3 a 2.5 cm de ancho. Los peciolo son firmes, miden de 5 a 8 mm de largo y son subcilíndricos. Presenta pocas flores, en pequeños racimos o panículas terminales o axilares; pedicelos sólidos de 2 mm de largo; cáliz de 1.8 mm de ancho, los lóbulos son muy obtusos; ovario liso; fruto globoso, alrededor de 8 mm de diámetro; semillas globosas, de 7 mm de diámetro (García 1995). Además de *S. perforatus* éste género incluye a la especie *S. conzattii*. Filogenéticamente, *Stauranthus* se encuentra relacionado con los géneros *Amyris* y *Teclea*. (Engler, 1931).

Ninguna de las dos especies del género *Stauranthus* ha sido objeto de estudios químicos. Sin embargo, los numerosos estudios realizados sobre otras especies de la familia de las Rutaceas, han permitido el aislamiento y caracterización de una gran diversidad de metabolitos secundarios que incluyen las siguientes categorías de compuestos:

1. Alcaloides de los tipo: quinolina, isoquinolina, indol, imidazol, acridina, carbazol, oxazol, tiazol y feniletilaminas (Hegnauer, 1991; Waterman, 1986; Gomez y Gottlieb, 1980; Grundon, 1988; Gray, 1992; Wu, *et al.*, 1993; Paulini, *et al.*, 1989; Mester, 1983; Yang, *et al.*, 1987; Hostettmann, *et al.*, 1977; Koike y Ohmoto, 1989; Lontsi, *et al.*, 1985; Kong, *et al.*, 1985; Lumonadio y Vanhaelen 1984; Wu, 1991; Wu, *et al.*, 1991a; Wen-Shyong, *et al.*, 1991; Michael, 1991; Saxton 1991; Wu, *et al.*, 1995; Bentley, 1991; Muyard, *et al.*, 1991; Michael, 1992; Osborne y Warmsley, 1992; Al-yahya, *et al.*, 1992; Tinto, *et al.*, 1992; Chen, *et al.*, 1993; Wu y Chen, 1993; Bhattacharyya, *et al.*, 1993; Waterman, *et al.*, 1993a; Maier, *et al.*, 1993; Michael, 1993; Lewis, 1991; Bentley, 1993; Fournet, *et al.*, 1993; Reisch, *et al.*, 1994; Chen, *et al.*, 1994; Funayama, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1994d; Bhattacharyya, *et al.*, 1994; Couillerot, *et al.*, 1994; Ghosh, *et al.*, 1994; Chakraborty, *et al.*, 1995; Lavaud, *et al.*, 1995; Kumar, *et al.*, 1995; Waterman, *et al.*, 1995b; Ghosh, *et al.*, 1991; Waterman, *et al.*, 1992a; Chihiro Ito, *et al.*, 1992; Kumar, *et al.*, 1994; Ulubelen, *et al.*, 1994; Wu, 1994; Haji, *et al.*, 1994. *inter alia*).

2. Terpenoides diversos que incluyen, triterpenoides, limonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides y monoterpenoides (Ahmad, *et al.*, 1993; Byrne, *et al.*, 1991; Bennett, *et al.*, 1989; Hassanali, *et al.*, 1987; Quader, *et al.*, 1991; Connolly, 1994; Maier, 1983; Kumar, *et al.*, 1991; Fong, *et al.*, 1991; Ozaki, *et al.*, 1991; Champange, *et al.*, 1992; Miyake, *et al.*, 1992; Kishi, *et al.*, 1992; Fraga, 1992; Ley y Merrit, 1992; Berhow, *et al.*, 1994; Andrade, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1995a; Rios y Delgado 1992; Sánchez, *et al.*, 1991; Waterman, *et al.*, 1993c; Bowers, *et al.*, 1993; Waterman, *et al.*, 1995-c; *Inter alia*).

3. Cumarinas simples, hidroxycumarinas, furanocumarinas y piranocumarinas (Brown, 1981; Chen, *et al.*, 1995; Razdan, *et al.*, 1987; Gray, 1983; Gray, *et al.*, 1991; Rashid, *et al.*, 1992; Berenbaum, 1991; Arisawa, *et al.*, 1984; Joshi, *et al.*, 1991; Waterman, *et al.*, 1991; Masuda, *et al.*, 1992; Waterman, *et al.*, 1992; Waterman, *et al.*, 1992-a; Waterman, *et al.*, 1992-b; Muller, *et al.*, 1993; Joshi, *et al.*, 1993; Ulubelen, *et al.*, 1993; Waterman, *et al.*, 1993b; Boeykens, *et al.*, 1994; Wu, *et al.*, 1994a; Waterman, *et al.*, 1994a; Waterman, *et al.*, 1994-c; Gunatilaca, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1994-e; Sheng, *et al.*, 1995; Waterman, *et al.*, 1995; Waterman, *et al.*, 1992-c; Kumar, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1994-g; Waterman, *et al.*, 1994-f; Waterman, *et al.*, 1995-a. *inter alia*).

4. Flavonoides de los tipos flavonas, flavanonas, flavonoles y chalconas (Harborne, 1983; Wu, 1989; Kamiya, *et al.*, 1979; Maier, 1983; Elavumoottil, *et al.*, 1991; Del Río, *et al.*, 1992; Berhow, *et al.*, 1994; Saxena y Shrivastava, *et al.*, 1994; Rei-Sheu Hou, *et al.*, 1994; Bakhtiar, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1994b; Lichius, *et al.*, 1994; Mizuno, *et al.*, 1995; Waterman, *et al.*, 1992a; Shaw, *et al.*, 1991; Berhow, *et al.*, 1991; Waterman, *et al.*, 1993c; Arruda, *et al.*, 1994; Waterman, *et al.*, 1994; Wu, *et al.*, 1994; Wu, *et al.*, 1995; Waterman, *et al.*, 1994h. *inter alia*).

5. Lignanos y neolignanos (Ayres y Loike, 1990; Connolly, *et al.*, 1994; Ulubelen, *et al.*, 1995; Arruda, *et al.*, 1994; Sheen, *et al.*, 1994; Ulubelen, *et al.*, 1994. *inter alia*).

6. Amidas (Greger, *et al.*, 1993; Greger, *et al.*, 1993-a; Greger, *et al.*, 1994; Wu, *et al.*, 1995. *inter alia*).

7. Acetofenonas, cromonas y otros compuestos aromáticos simples (Razdan, *et al.*, 1987; Campos, *et al.*, 1987; Quader, *et al.*, 1991; Borges del Castillo, *et al.*, 1986; De Silva, *et al.*, 1991; Chou, *et al.*, 1992; Kithsiri, *et al.*, 1992; Waterman, *et al.*, 1993d; Wu, *et al.*, 1993; Ahmad, *et al.*, 1993; Lakshmichand, *et al.*, 1993; Lie-Chwen Lin, *et al.*, 1993; Stange, *et al.*, 1993; Jen, *et al.*, 1993; Ida, *et al.*, 1994; Grayer y Harborne, 1994; Waterman, *et al.*, 1994; Abaul, *et al.*, 1994; Chen, *et al.*, 1994; Desoky, *et al.*, 1995; Wu, *et al.*, 1995a. *inter alia*).

Cabe destacar que las cumarinas y en particular las furano y las piranocumarinas constituyen los metabolitos secundarios más representativos de las rutáceas.

1.2. Estudios biológicos realizados con la especie *Stauranthus perforatus*.

Los estudios biológicos realizados por García (1995) permitieron establecer el potencial alelopático e insecticida de las raíces de *S. perforatus*, ya que los lixiviados acuosos y el extracto CHCl₃/MeOH (1:1) de las raíces inhibieron de manera significativa el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Sin embargo, ninguno de los extractos inhibió la germinación de las semillas de prueba. En los Cuadros 1 y 2 se presentan los resultados derivados de dichos ensayos.

Cuadro 1. Efecto de los lixiviados acuosos de las raíces de *Stauranthus perforatus* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. (García, 1995).

| Tratamientos | <i>A. hypochondriacus</i> | | <i>E. crus-galli</i> | |
|--------------|---------------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | Germinación (%) | Crecimiento (mm) | Germinación (%) | Crecimiento (mm) |
| Control | 97.5 | 8.4 ± 0.65 | 85.0 | 24.8 ± 2.0 |
| Lixiv. 1% | 92.5 | 4.5* ± 0.65 | 95.0 | 19.9 ± 3.80 |
| Lixiv. 2% | 85.0 | 2.4* ± 0.30 | 87.5 | 18.6* ± 2.30 |

* Valores que difieren significativamente del control (Duncan, $\alpha = 0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

Cuadro 2.- Efecto del extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) de las raíces de *Stauranthus perforatus* sobre el crecimiento radicular y la germinación de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*. (García, 1995).

| Tratamientos | <i>A. hypochondriacus</i> | | <i>E. crus-galli</i> | |
|--------------|---------------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | Germinación (%) | Crecimiento (mm) | Germinación (%) | Crecimiento (mm) |
| Control | 92.5 | 9.8 ± 0.46 | 82.5 | 21.1 ± 2.5 |
| 50. ppm | 82.5 | 4.6* ± 1.50 | 82.5 | 16.3 ± 0.33 |
| 100. ppm | 77.5 | 4.4* ± 0.63 | 77.5 | 15.6 ± 1.30 |
| 200. ppm | 75.0 | 0.0* ± 0.00 | 75.0 | 13.6* ± 1.50 |

* Valores que difieren significativamente del control (Duncan, $\alpha = 0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

Por otra parte, se determinó el efecto de la descomposición de las raíces de *S. perforatus*, incorporadas en diferentes concentraciones al suelo de macetas, sobre el potencial florístico (García, 1995). La finalidad de este experimento es determinar si el potencial alelopático de *S. perforatus* se manifiesta cuando la planta se incorpora al suelo, influyendo sobre la germinación y el crecimiento de las especies que constituyen el potencial florístico del mismo.

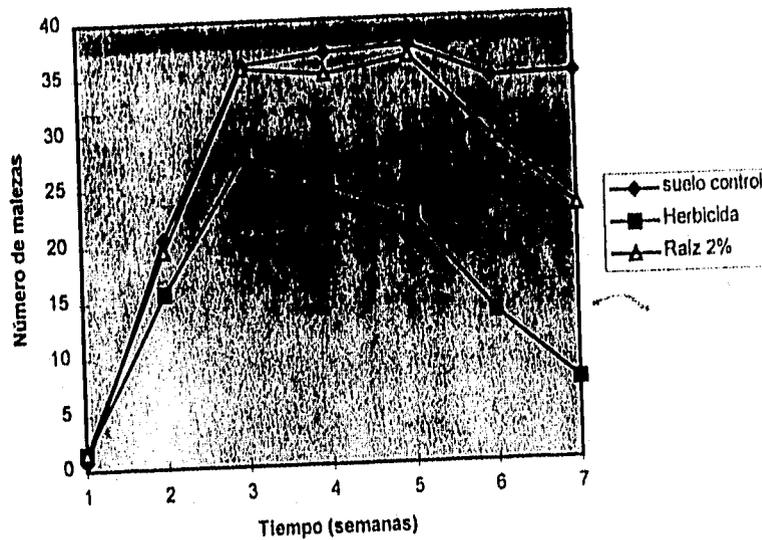
El experimento tuvo una duración de siete semanas y como se puede apreciar en la Gráfica 1 el tratamiento al 2% afecta el crecimiento de plantas nocivas a partir de la sexta semana.

Gráfica 1. Efecto de la raíz al 2% de *S. perforatus* incorporada al suelo sobre el número de malezas.

| Tiempo semanas | Número de malezas* | | |
|----------------|--------------------|-----------|---------|
| | suelo control | Herbicida | Raíz 2% |
| 1 | 0.75 | 1.5 | 1.5 |
| 2 | 20.5 | 15.7 | 19.5 |
| 3 | 36 | 27.7 | 35.7 |
| 4 | 37 | 25 | 35 |
| 5 | 37.5 | 22.2 | 36.5 |
| 6 | 34.5 | 13.5 | 29 |
| 7 | 34.7 | 7.25 | 22.7 |

*Valores promedio de cuatro repeticiones

Gráfica 1. Efecto de la raíz al 2% de *S. perforatus* incorporada al suelo sobre el número de malezas



Herbicida: DCPA

Por último, se observó que la raíz en polvo de *S. perforatus* espolvoreada sobre granos de maíz afectó el índice de sobrevivencia del insecto *Sithophylus zeamais* (gorgojo plaga de los granos almacenados). A partir de una concentración del 3% no hubo sobrevivencia del insecto.

Cuadro 3.- Efecto de la raíz de *Stauranthus perforatus* sobre el índice de sobrevivencia de *Sitophylus zeamais*. (García, 1995).

| Tratamientos | Índice de sobrevivencia* |
|--------------|--------------------------|
| Control | 100 |
| Raíz al 1% | 9 |
| Raíz al 2% | 4.5 |
| Raíz al 3% | 0.0 |
| Raíz al 4% | 0.0 |

* Valores promedio de cuatro repeticiones

II. JUSTIFICACION .

En la actualidad la herramienta más eficiente para combatir las plagas (insectos, malezas y microorganismos) que afectan a los cultivos económicamente importantes, son los plaguicidas sintéticos. Sin embargo, estos producen daños enormes al ecosistema debido a su toxicidad y a sus altos índices de persistencia, a menudo por más tiempo del requerido para ejercer su acción (Benner, 1993; Pillmoor, 1993; Rodgers, 1993). Por otra parte, estos agentes han inducido un alto número de especies resistentes. En consecuencia, el interés por la búsqueda de nuevos plaguicidas de origen vegetal se ha visto incrementado notablemente en los años recientes (Worsham, 1989; Anaya, 1987).

En este sentido, el reino vegetal constituye una fuente valiosísima para la búsqueda de nuevos agentes pesticidas, ya que es un hecho conocido que las plantas han evolucionado a lo largo de 400 millones de años y han desarrollado mecanismos de protección, incluyendo la biosíntesis de metabolitos secundarios (semioquímicos) que las protegen contra el ataque de insectos, malezas y otras plagas. Estos agentes semioquímicos pueden constituir la base o los prototipos estructurales para el desarrollo de nuevos pesticidas con un menor grado de toxicidad para el hombre y otros animales, biodegradables y con un mecanismo de acción más específico (Cremllyn, 1991; Benner, 1993; Pillmoor, 1993; Rodgers, 1993).

En la literatura contemporánea existen numerosos agentes plaguicidas (insecticidas y herbicidas) que se han derivado a partir de materias primas vegetales. En el caso de los insecticidas destacan las sustancias piretroides, la azadiractina, la nicotina y la rotenona, por tan sólo mencionar algunos (Champange *et al.*, 1992; Klocke *et al.*, 1989); en el caso de los herbicidas se pueden citar el cineol y uno de sus derivados semisintéticos, el cinmetilino el cual ha sido seleccionado como un candidato para su desarrollo como herbicida comercial por la compañía Du Pont (Worsham, 1989).

La biodiversidad en México ofrece un campo muy amplio para el descubrimiento de productos naturales útiles para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas, fungicidas e insecticidas selectivos. Por tal motivo, se inició un proyecto de naturaleza interdisciplinaria cuyo objetivo primordial es determinar el potencial alelopático de diversas especies de la flora mexicana con importancia ecológica y/o medicinal con el fin de obtener aleloquímicos susceptibles de utilizarse, particularmente, como agentes herbicidas y fungicidas para el control de malezas y hongos fitopatógenos.

En el marco de este proyecto, una de las especies vegetales seleccionadas como candidato apropiado para la obtención de agentes pesticidas, fue la rutácea *S. perforatus*. Como se indicó en la sección de antecedentes, el extracto clorformo-metanólico y la raíz en polvo de esta especie, demostraron propiedades inhibitoras del crecimiento vegetal e insecticidas.

Con la finalidad de continuar con el estudio de *S. perforatus* como una fuente potencial de agentes pesticidas, el presente estudio tiene como primer objetivo aislar y caracterizar los principios bioactivos responsables de las actividades inhibitora del crecimiento vegetal e insecticida.

En segundo termino, la presente investigación pretende deteminar el potencial citotóxico del extracto y de algunos de los compuestos aislados de *S. perforatus*, con la finalidad de desarrollar nuevos agentes antitumorales de origen vegetal. En este último sentido vale la pena indicar que la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos se encuentra ampliamente justificada debido a la eficacia relativamente moderada de algunos agentes quimioterapéuticos como una consecuencia de su alta toxicidad para los tejidos sanos de rápido desarrollo, la rápida proliferación de algunos tumores y, principalmente, debido a la inducción de resistencia en las células cancerosas (Pezzuto, 1993).

Cabe destacar que, las investigaciones sistemáticas conducentes a la búsqueda de nuevos agentes antitumorales o moléculas prototipo de origen natural, a partir de especies vegetales selectas han demostrado ser de gran importancia; ejemplos recientes de fármacos antitumorales obtenidos de fuentes vegetales son el taxol, los derivados de la camptotecina, la podofilotoxina, la vincristina y la vinblastina (Wani, *et al.*, 1971; Cragg, *et al.*, 1993; Horwitz, 1992; Young *et al.*, 1992; Ezell y Smith, 1991; Yang, *et al.*, 1985; Hsiang, *et al.*, 1985; Zhou, *et al.*, 1994; Ohnuma, *et al.*, 1992; Noble *et al.*, 1958); las fuentes naturales de la camptotecina, podofilotoxina y vincristina tienen al igual que *Stauranthus perforatus* la particularidad de ser especies de amplio uso en la medicina popular para el tratamiento de diversos padecimientos (Tang y Eisenbrand, 1992; Hamburguer, *et al.*, 1991). En este contexto cabe mencionar que la selección de especies vegetales de reconocido uso etnomédico para el descubrimiento de nuevos agentes antitumorales es hoy día un hecho bien establecido. Otros criterios de selección empleados han sido el quimiotaxonómico y el ecológico (Hostettman, 1991).

Para el cumplimiento de los objetivos generales planteados se consideraron pertinentes los siguientes objetivos específicos.

1. Preparar el extracto de la raíz de la planta mediante un proceso de maceración.
2. Realizar el fraccionamiento biodirigido del extracto total mediante procesos cromatográficos.
3. Separar y purificar los constituyentes de las fracciones activas mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas.
4. Caracterizar los compuestos activos aislados, mediante el empleo de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

5. Determinar el efecto fitotóxico de algunos de los compuestos aislados sobre las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.
6. Determinar la toxicidad del extracto, fracciones y compuestos puros contra el crustáceo *Artemia salina*.
7. Determinar el efecto citotóxico del extracto y compuestos puros sobre varias líneas celulares derivadas de tumores humanos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL.

Las raíces de *Stauranthus perforatus* se colectaron en el municipio de Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo en julio de 1993. Una muestra de referencia (voucher Anaya 93-1) se depositó en el Herbario Nacional (MEXU), del Instituto de Biología, UNAM. Las raíces se secaron a temperatura ambiente y se fragmentaron en un molino de cuchillas modelo T. Wiley 4.

2. ANALISIS CROMATOGRAFICOS

Los análisis cromatográficos en capa fina, se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales en placas de vidrio recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 GF254, Merck), utilizando varios sistemas de elución y dos agentes cromógenos. Los reactivos reveladores y los sistemas de eluyentes empleados se resumen en los Cuadros 4 y 5.

Para los análisis cualitativos en capa fina, se utilizaron placas con un espesor de 0.25 mm. Para la realización de las cromatografías preparativas se utilizaron placas de 20 x 20 cm de 0.25 mm y 2.0 mm de espesor; para efectuar las cromatografías en columna, se utilizó gel de sílice (Merck 60 gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230).

Cuadro 4. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

| REACTIVO | AGENTES CROMOGENOS (COMPOSICION) | REFERENCIA |
|------------------------------------|---|--------------|
| Sulfato cérico | 12 g de sulfato cérico 22.2ml de H ₂ SO ₄ concentrado 350 g de hielo picado | Joseph, 1980 |
| H ₂ SO ₄ 10% | 10 ml de H ₂ SO ₄ concentrado 90 ml de H ₂ O destilada | Joseph, 1980 |

* En todos los casos, para el desarrollo del color fue necesario calentar durante dos minutos a 110 °C aproximadamente.

Cuadro 5. Sistemas de eluyentes empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

| SIST. DE ELUYENTES | COMPOSICION | PROPORCION |
|--------------------|--------------------------|------------|
| A | Hexano/AcOEt | Diversas |
| B | Hexano/CHCl ₃ | Diversas |
| C | Benceno/AcOEt | Diversas |
| D | CHCl ₃ /MeOH | Diversas |
| E | CHCl ₃ /AcOEt | Diversas |
| F | AcOEt/MeOH | Diversas |

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

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no se encuentran corregidos.

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

La rotación óptica se midió en un polarímetro digital JASCO DIP 360. El registro de los espectros de IR y rotación óptica se realizó en el laboratorio de espectroscopía de la Facultad de Química de la UNAM.

Los espectros de masas se determinaron en un aparato Hewlet-Packard 5890, serie II.

Los espectros de RMN se registraron en un aparato Varian VXR-3005 utilizando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna TMS.

Los espectro de masas y RMN se determinaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Los análisis de difracción de rayos X se determinaron en un difractómetro Siems P4/PC.

4. ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

Preparación de las muestras: Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos) se preparan disolviendo 20 mg del material en 2 ml del disolvente apropiado. De ésta solución se transfieren 500, 50 y 5 μ l a tres viales; se deja evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío, cada concentración se prepara por triplicado.

Bioensayo: los huevecillos de *A. salina* se incuban en un medio salino artificial durante un período de 48 hrs. Al cabo de este tiempo se transfieren 10 larvas del crustáceo a cada uno de los frascos que contienen las muestras a evaluar y se afora a 5 ml con medio salino, teniendo una concentración final de 1000, 100 y 10 μ g/ml, respectivamente.

Los frascos se mantuvieron con iluminación durante 24 horas; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de crustáceos sobrevivientes, para calcular la CL_{50} o el porcentaje de mortalidad. En el primer caso, se utilizó el programa de análisis de probabilidad de Finney. Para que un extracto o fracción se considere activo la CL_{50} debe ser menor a 1000 μ g/ml y en el caso de un compuesto puro la CL_{50} debe ser menor a 200 μ g/ml (Anderson et al., 1991).

4.2 Determinación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal por el método de caja petri.

La determinación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal de los compuestos aislados se realizó midiendo el efecto sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Los bioensayos se realizaron en cajas de petri (Anaya *et al.*, 1990) de 10 cm de diámetro interno. Cada una de las muestras de prueba se disolvió en CHCl_3 o AcOEt , y se prepararon soluciones a tres concentraciones apropiadas, de cada una de las soluciones stock se tomaron 2 ml (de forma tal de obtener concentraciones finales de 5, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), cada una de estas soluciones se vertieron en cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se inició la germinación de 10 semillas de cada una de las dos especies vegetales de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 ml de agua destilada. El mismo procedimiento se utilizó para los controles que contenían únicamente disolvente; y para el control positivo, se utilizó el herbicida comercial 2,4-D (Sigma).

Las cajas de petri se mantuvieron en la oscuridad a 30°C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas después de 24 horas para *Amaranthus hypochondriacus* y 48 horas para *Echinochloa crusgalli*. En todos los casos se efectuaron cuatro repeticiones.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA ($p < 0.05$).

4.3 Determinación de la actividad citotóxica.

La determinación de la actividad citotóxica de los extractos y los compuestos puros se determinó sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549). Los resultados se expresan en concentraciones efectivas medias (DE_{50}).

Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a los protocolos previamente establecidos (Anderson *et al.*, 1991 y referencias ahí citadas), en el Cell Culture Laboratory, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, Estados Unidos de Norteamérica.

Los bioensayos se realizaron en cajas de petri (Anaya *et al.*, 1990) de 10 cm de diámetro interno. Cada una de las muestras de prueba se disolvió en CHCl_3 o AcOEt , y se prepararon soluciones a tres concentraciones apropiadas, de cada una de las soluciones stock se tomaron 2 ml (de forma tal de obtener concentraciones finales de 5, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), cada una de estas soluciones se vertieron en cajas de Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se inició la germinación de 10 semillas de cada una de las dos especies vegetales de prueba, humedeciendo el papel filtro con 3 ml de agua destilada. El mismo procedimiento se utilizó para los controles que contenían únicamente disolvente; y para el control positivo, se utilizó el herbicida comercial 2,4-D (Sigma).

Las cajas de petri se mantuvieron en la oscuridad a 30°C y la actividad fitotóxica se registró midiendo la longitud de las radículas después de 24 horas para *Amaranthus hypochondriacus* y 48 horas para *Echinochloa crusgalli*. En todos los casos se efectuaron cuatro repeticiones.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA ($p < 0.05$).

4.3 Determinación de la actividad citotóxica.

La determinación de la actividad citotóxica de los extractos y los compuestos puros se determinó sobre tres líneas celulares derivadas de tumores humanos: adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549). Los resultados se expresan en concentraciones efectivas medias (DE_{50}).

Las evaluaciones se realizaron de acuerdo a los protocolos previamente establecidos (Anderson *et al.*, 1991 y referencias ahí citadas), en el Cell Culture Laboratory, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, Estados Unidos de Norteamérica.

5. Extracción de las raíces de *Stauranthus perforatus*.

El material vegetal seco y molido (2.6347 Kg) se extrajo inicialmente por tres veces mediante un proceso de maceración con un volumen de 32 litros en total de una mezcla CHCl₃/MeOH 1:1, dejando entre cada extracción un período de cuatro días.

En la Figura 1 se resume el procedimiento empleado. Los tres extractos resultantes se combinaron, ya que demostraron una gran similitud en los análisis cromatográficos en capa delgada. Al término de la extracción, la solución resultante se concentró al vacío, obteniéndose un total de 232.80 g del extracto concentrado.

6. Fraccionamiento biodirigido del extracto total.

El extracto total (232.80 g) se fraccionó en una columna empacada con 1 Kg de gel de sílice, utilizando como eluyente inicial hexano. La polaridad del sistema se incrementó utilizando mezclas hexano/AcOEt, y posteriormente, AcOEt/MeOH. El volumen de los eluatos obtenidos fue de 1000 ml y se recogieron un total de 115 fracciones. La semejanza y homogeneidad de los constituyentes detectados mediante el análisis cromatográfico en capa fina, permitieron la combinación de cada uno de los eluatos en diez fracciones primarias. Cada una de las fracciones primarias obtenidas se ensayó biológicamente mediante la determinación de sus efectos larvicida sobre el crustáceo *Artemia salina* y de inhibición del crecimiento radicular sobre las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Las pruebas de fitotoxicidad de las fracciones primarias fueron realizadas por la Bióloga Clara García en el Laboratorio de Ecología Química, Instituto de Fisiología Celular (García, 1995).

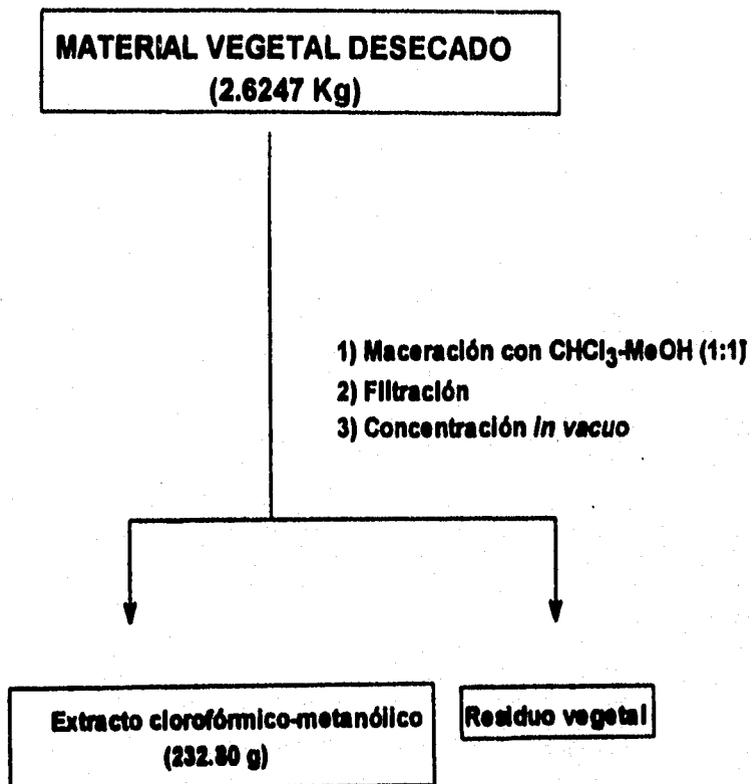


Figura 1. Extracción de la raíz de *Stauranthus perforatus*.

En el Cuadro 6, se resume el fraccionamiento mediante cromatografía de gel de sílice del extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) de *Stauranthus perforatus*.

| Eluyente | Proporción % | Fracción colect. | Fracciones combinadas | Clave | Peso (g) |
|------------|--------------|------------------|-----------------------|---------|----------|
| hexano | 100 | 1-23 | 1-25 | I* ♣ | 62.058 |
| hex/AcOEt | 95:5 | 24-36 | 26 | II* ♣ | 2.4003 |
| hex/AcOEt | 85:15 | 37-56 | 27-30 | III* ♣ | 3.9568 |
| hex/AcOEt | 75:25 | 57:68 | 31-36 | IV* ♣ | 1.6578 |
| hex/AcOEt | 65:35 | 69:80 | 37-42 | V* ♣ | 6.4335 |
| hex/AcOEt | 50:50 | 81-87 | 43-48 | VI* ♣ | 2.5844 |
| hex/AcOEt | 25-75 | 88-93 | 49-52 | VII* ♣ | 1.7509 |
| AcOEt | 100 | 94-101 | 53-59 | VIII* ♣ | 14.663 |
| AcOEt/MeOH | 50:50 | 102-110 | 60-78 | IX* ♣ | 6.3778 |
| MeOH | 100 | 111-115 | 79-115 | X | 96.837 |

*fracciones fitotóxicas

♣ fracciones tóxicas para *Artemia salina*

7. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS.

7.1 Obtención del 4,5-epoxi- β -cariofileno (1) de la fracción primaria

I.

La fracción activa primaria I (62.058) [Cuadro 6] se recromatografió en una columna abierta sobre 620.00 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevo a cabo con hexano, mezclas de hexano/AcOEt y AcOEt. Se obtuvieron un total de 153 fracciones de 500 ml cada una, cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. Este proceso cromatográfico se resume en el Cuadro 7. La fracción secundaria I-C generó un solo compuesto (149.10 mg) el cual se caracterizó como el 4,5-epoxi- β -cariofileno (0.00566% de rendimiento).

Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción activa I.

| ELUYENTE | PROPORCION % | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|--------------|--------------|------------|-----------------------|-------|
| hexano | 100 | 1-53 | 1-66 | I-A |
| hexano/AcOEt | 99:1 | 54-117 | 67-73 | I-B |
| hexano/AcOEt | 97:3 | 118-135 | 74-104 | I-C |
| hexano/AcOEt | 95:5 | 136-142 | 105-108 | I-D |
| hexano/AcOEt | 90:10 | 143-147 | 109-120 | I-E |
| hexano/AcOEt | 50:50 | 148-150 | 121-131 | I-F |
| AcOEt | 100 | 151-153 | 132-147 | I-G |
| | | | 148-153 | I-H |
| | | | | |

7.2 Aislamiento y purificación de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2), de la fracción primaria II.

La fracción activa II (2.4003 g) se fraccionó de manera secundaria mediante una cromatografía en columna empleando como adsorbente gel de sílice (96.06 g); el proceso de elución se llevo a cabo con hexano, hexano/AcOEt y AcOEt. Se recogieron 136 fracciones y se analizaron por cromatografía en capa fina, para combinar aquellas que presentaron características cromatográficas similares. Este proceso se resume en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Resumen de la cromatografía en columna de la fracción activa primaria II.

| ELUYENTE | PROPORCION | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|--------------|------------|------------|-----------------------|-------|
| hexano | 100 | 1-111 | 1-25 | II-A |
| | | | 26-27 | II-B |
| | | | 28-34 | II-C |
| | | | 35-79 | II-D |
| | | | 80-83 | II-E |
| hexano/AcOEt | 90:10 | 112-130 | 84-94 | II-F |
| | | | 95-103 | II-G |
| | | | 104-111 | II-H |
| | | | 112-116 | II-I |
| | | | 117-129 | II-J |
| AcOEt | 100 | 131-136 | 130-136 | II-K |

De la fracción II-D, cristalizó un sólido amarillo el cual se purificó mediante cromatografías sucesivas en capa delgada de gel de sílice, utilizando como agente eluyente (fase móvil) hexano/AcOEt 85:15. Como resultado de este proceso se obtuvieron 63.163 mg, de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (**2**).

7.3 Obtención de la chalepsina (3) y de cantidades adicionales de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2), de la fracción primaria III.

De la fracción primaria III (Cuadro 6), cristalizaron espontáneamente 1.9876 g del compuesto (**3**), p.f. 88-90°C. Este compuesto fue separado mediante filtración al vacío (0.0754% de rendimiento).

Sucesivas cromatografías en capa fina utilizando como sistema de elución hexano/AcOEt 85:15, de la fracción III, permitieron la obtención de cantidades adicionales del producto (**2**). La cantidad total obtenida de 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (**2**) fue de 66.468 mg (0.00492 % rendimiento en base a planta seca).

7.4 Aislamiento y purificación de la asarinina (4), la xantiletina (5), el 2'-isopropil-soraleno (6) y el β -sitosterol (7) de la fracción primaria V.

De la fracción primaria V (Cuadro 6), precipitó de manera espontánea un polvo cristalino de color blanco que después de sucesivas recristalizaciones con hexano y AcOEt generó 2.013 g de xantiletina (**5**), con un p.f.129-130 °C (0.0764 % de rendimiento).

De esta fracción, también precipitó la asarinina (**4**) como un sólido blanco cristalino (96.52 mg), p.f. 120.122°C (0.00366% de rendimiento).

Las aguas madres de la fracción V del Cuadro 6 se recromatografiaron sobre una columna de gel de sílice (61.53 g). El proceso de elución, se llevo a cabo con hexano, mezclas de hexano/CHCl₃, AcOEt y AcOEt/MeOH obteniéndose un total de 198 fracciones de 40 ml cada una, mismas que se cromatografiaron en capa fina y se unieron de acuerdo con sus características cromatográficas. Las condiciones de este proceso cromatográfico se resumen en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria V.

| ELUYENTE | PROPORCION | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|--------------------------|------------|------------|-----------------------|-------|
| hexano | 100 | 1-39 | 1-8 | V-A |
| hexano/CHCl ₃ | 99:1 | 40-47 | 9-58 | V-B |
| hexano/CHCl ₃ | 95:5 | 48-55 | 59-60 | V-C |
| hexano/CHCl ₃ | 90:10 | 57-141 | 61-65 | V-D |
| hexano/CHCl ₃ | 50:50 | 142-179 | 66-83 | V-E |
| hexano/AcOEt | 50:50 | 180-195 | 84-96 | V-F |
| AcOEt | 100 | 196 | 97-145 | V-G |
| AcOEt/MeOH | 50:50 | 197-198 | 146-180 | V-H |
| | | | 181-182 | V-I |
| | | | 183-185 | V-J |
| | | | 186-192 | V-K |
| | | | 193-196 | V-L |
| | | | 197-198 | V-M |

De la fracción V-G constituida por dos componentes mayoritarios, se obtuvo una mezcla de apariencia cristalina; los dos productos se separaron mediante sucesivas cromatografías en capa delgada, empleando como sistemas de elución benceno/AcOEt 99:1 y hexano/CHCl₃ 1:1. Como resultado del proceso de separación se obtuvieron 14.40 mg del producto (6), (0.000546 % de rendimiento), como un sólido cristalino de p.f. 125-130°C y, 16.44 mg de β-sitosterol (7).

7.5 Aislamiento y purificación de la pelitorina (8) y la amirina (9) de la fracción primaria VI.

La fracción VI del Cuadro 6 se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice (330.80 g) utilizando como fase móvil benceno, mezclas de benceno/AcOEt, AcOEt, y AcOEt/MeOH en diferentes proporciones; se obtuvieron fracciones de 75 ml cada una combinándose aquellas que presentaron homogeneidad cromatográfica. El Cuadro 10 resume este proceso cromatográfico.

El Cuadro 10. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fracción VI.

| ELUYENTE | PROPORCION % | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|---------------|--------------|------------|-----------------------|-------|
| benceno | 100 | 1-46 | 1-30 | VI-A |
| benceno/AcOEt | 99:1 | 47-75 | 31-62 | VI-B |
| benceno/AcOEt | 98:2 | 76-169 | 63-74 | VI-C |
| AcOEt | 100 | 170-173 | 75-153 | VI-D |
| AcOEt/MeOH | 50:50 | 174 | 154-167 | VI-E |
| | | | 168-172 | VI-F |
| | | | 173-174 | VI-G |

De la fracción VI-D precipitaron de manera espontánea 25.23 mg de la amirina (9) como un sólido blanco de p.f. 103-106 °C y $[\alpha]_D^{25} = +28.28^\circ$ (1, AcOEt). 0.000957% de rendimiento.

La cromatografía preparativa en capa fina de la fracción secundaria VI-4 permitió el aislamiento de 123.46 mg del compuesto (8). El sistema de elución empleado fue benceno/AcOEt 9:1 (0.004686 % de rendimiento en base a planta seca).

7.6 Aislamiento y purificación del lignano fargesina (10) de la fracción primaria VII.

1.7509 g de la fracción primaria VII (Cuadro 6) fueron recromatografiados sobre una columna abierta empacada con 73.9345 g de gel de sílice. El proceso de elución se llevó a cabo con benceno, benceno/AcOEt y AcOEt. Como resultado de este proceso cromatográfico se obtuvieron 105 fracciones de 25 ml cada una, combinándose aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar.

El Cuadro 11. resume este fraccionamiento secundario.

| ELUYENTE | PROPORCION | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|-------------------|------------|------------|-----------------------|-------|
| benceno | 100 | 1-77 | 1-11 | VII-A |
| benceno/AcO Et | 90:10 | 78-103 | 12-27 | VII-B |
| benceno/AcO Et | 50:50 | 104 | 28-29 | VII-C |
| AcOEt | 100 | 105 | 30-31 | VII-D |
| | | | 32-36 | VII-E |
| | | | 37-45 | VII-F |
| | | | 46-51 | VII-G |
| | | | 52-66 | VII-H |
| | | | 67-77 | VII-I |
| | | | 78-97 | VII-J |
| | | | 99-105 | VII-K |

Sucesivas cromatografías en capa fina de la fracción VII-E, utilizando como eluyentes hexano/AcOEt 85:15 condujeron al aislamiento de 13.273 mg de la fargesina (10) bajo la forma de un polvo blanco de p.f. 132-134 °C y $[\alpha]_D^{25} = -67.67^\circ$. (1, AcOEt).

7.7 Aislamiento y purificación de cantidades adicionales de fargesina (10) y chalepina (11) de la fracción primaria VIII.

El fraccionamiento secundario de la fracción VIII (Cuadro 6), 14.4170 g se realizó en una columna con gel de sílice (307.68 g), iniciándose la elución con hexano; posteriormente la polaridad se incrementó paulatinamente mediante la adición de AcOEt. El volumen de los eluatos fue de 125 ml aproximadamente. Este procedimiento permitió la obtención de las fracciones secundarias que se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Fraccionamiento mediante cromatografía en columna de la fracción VIII del Cuadro 6.

| ELUYENTE | PROPORCIÓN % | FRACCIONES | FRACCIONES COMBINADAS | CLAVE |
|--------------|--------------|------------|-----------------------|--------|
| hexano | 100 | 1-17 | 1-29 | VIII-A |
| hexano/AcOEt | 95:5 | 18-35 | 30-46 | VIII-B |
| hexano/AcOEt | 90:10 | 36-148 | 47-59 | VIII-C |
| hexano/AcOEt | 80:20 | 149-164 | 60-84 | VIII-D |
| hexano/AcOEt | 70:30 | 165-173 | 85-99 | VIII-E |
| hexano/AcOEt | 50:50 | 174-175 | 100-101 | VIII-F |
| AcOEt | 100 | 176 | 102-161 | VIII-G |
| | | | 162 | VIII-H |
| | | | 163-176 | VIII-I |

De la fracción VIII-D cristalizaron cantidades adicionales de fargesina (10). La cantidad total de este compuesto fue de 18.273 mg. (0.0006935 %).

Por último, sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice de la fracción secundaria VIII-G permitió el aislamiento de 2.7976 g de la chalepina (11). El sistema de disolventes empleado para la elución estuvo constituido por una mezcla de benceno/AcOEt 65:35.

7.8 Aislamiento de cantidades adicionales de chalepina (11)

De la fracción IX del Cuadro 6 precipitaron cantidades adicionales de chalepina (20 mg) del cual se obtuvo un rendimiento total de 0.1069 % con un p.f.116-118°C y un $[\alpha]_D = -63.46^\circ$, (1, AcOEt).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Para la obtención de los principios activos de *S. perforatus* se utilizó un procedimiento fitoquímico de tipo biodirigido. Esta estrategia ha demostrado ser la más eficiente para la obtención de compuestos bioactivos a partir de extractos naturales con propiedades biológicas demostradas (Hostettmann, 1991; Guisalberti, 1993). De manera general, este proceso incluye las siguientes etapas.

- a) Preselección del material vegetal de acuerdo a los criterios convencionales (quimiotaxonómico, etnobotánico, ecológico).
- b) Identificación taxónomica e investigación bibliográfica de la especie objeto de estudio.
- c) Operaciones preliminares a la preparación de extractos (deseccación, fragmentación, extracción en pequeña escala).
- d) Evaluaciones biológicas preliminares para la selección de los candidatos idóneos para la obtención de principios activos.
- e) Extracción en gran escala de las especies activas seleccionadas mediante la realización de las evaluaciones biológicas preliminares.
- f) Fraccionamiento biodirigido del extracto vegetal, monitoreando la actividad biológica con los ensayos apropiados.
- g) Separación y purificación de los constituyentes de las fracciones activas, mediante métodos cromatográficos.
- h) Determinación de la estructura molecular de los compuestos activos por métodos químicos y fisicoquímicos.
- i) Ensayos biológicos de los compuestos activos
- j) Preparación de derivados o análogos para la investigación de las relaciones estructura química-actividad biológica.
- k) Otros estudios.

En el presente estudio la preselección de *S. perforatus* se realizó de acuerdo a dos de los criterios más utilizados, el quimiotaxonómico y el etnobotánico. En relación al primero cabe destacar que la familia de las rutáceas ha demostrado, en múltiples ocasiones, ser una fuente valiosa de numerosos principios bioactivos de interés medicinal y agroquímico (Wu, *et al.*, 1993; Hosttelmann *et al.*, 1977; Waterman, 1993; Hegnauer, 1991; Mester, 1983; Gerzon y Svoboda, 1983; Paulini *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1987; Pezzuto *et al.*, 1984; Waterman, 1983; Hassanali *et al.*, 1987; Polonsky, 1983; Phillipson y O'Neill, 1987; Greger *et al.*, 1992). Por otra parte, la especie *S. perforatus* se utiliza en la medicina popular maya como agente medicinal, y en este sentido, vale la pena destacar, que las plantas medicinales utilizadas en la medicina popular de diversas regiones del mundo, han constituido el punto de partida para el aislamiento de un gran número de compuestos activos de importancia terapéutica y en la industria agroquímica (Colegate y Molyneux, 1993; Benner, 1993; Farnsworth, 1990; Prance, 1994; Downum y Waterman, 1993).

De manera adicional, el amplio espectro de actividades biológicas demostrado por los extractos totales de *S. perforatus* permitió la selección de este material vegetal para su análisis químico. En primer lugar, se determinó la potencialidad fitotóxica e insecticida mediante la realización de varios ensayos que incluyeron la determinación del potencial alelopático, utilizando como malezas de prueba *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli* (Cuadros 1 y 2), y el efecto sobre el índice de sobrevivencia del insecto *Sithophylus zeamais* (Cuadro 3). Así mismo, en el presente estudio, se determinó el efecto tóxico del extracto cloroformo-metanólico contra el crustáceo *Artemia. salina* Leach, obteniéndose un valor de concentración letal media CL_{50} de 5.1 $\mu\text{g/ml}$. Por último, se determinó la actividad citotóxica midiendo el efecto del extracto activo contra tres líneas celulares derivadas de tumores humanos.

Las líneas celulares utilizadas incluyeron: carcinoma de pulmón (A-549), carcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de colon (HT-29); como control positivo para estas pruebas se utilizó la adriamicina (Anderson *et al*; 1991). Los resultados derivados de estas evaluaciones se indican en el Cuadro 13 y se expresan en forma de dosis efectivas medias (DE₅₀). Los estudios previos (Anderson *et al*; 1991) de determinación de la potencialidad citotóxica contra estas tres líneas celulares, consideran como criterio de actividad aquellos valores de DE₅₀ < 20 µg/ml. En consecuencia, el extracto cloroformo-metanólico de *S. perforatus* demostró solamente un efecto citotóxico contra el adenocarcinoma de colon (HT-29).

Cuadro 13. Actividad citotóxica *in vitro* del extracto CHCl₃-MeOH (1:1) de *Stauranthus perforatus*.

| Muestra | Línea celular DE50 * (µg/ml) | | |
|-------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| | A-549 | MCF-7 | HT-29 |
| Extracto | 29.48 | 48.98 | 18.77 |
| Adriamicina | 3.22x10 ⁻² | 2.04x10 ⁻¹ | 4.2x10 ⁻² |

El conjunto de las evaluaciones preliminares realizadas por García, 1995, y las realizadas en la presente investigación, constituyeron la base para llevar a cabo la investigación fitoquímica de la especie *Stauranthus perforatus*, con la finalidad de obtener los principios activos responsables de los efectos biológicos demostrados y una vez realizadas las operaciones fitoquímicas preliminares, se preparó el extracto activo en gran escala.

Posteriormente, el extracto activo se fraccionó de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta; este procedimiento permitió la obtención de diez fracciones primarias, como se indicó en la parte experimental. Las fracciones resultantes fueron evaluadas mediante una serie de ensayos biológicos que incluyeron de nueva cuenta la determinación de la toxicidad para *A. salina* y el efecto sobre el crecimiento radicular de dos especies de malezas: *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Los resultados de dichas evaluaciones se indican en los Cuadros 14 y 15, respectivamente.

El ensayo contra *A. salina* se utilizó para monitorear de manera indirecta la actividad citotóxica, considerando que este ensayo se ha utilizado en múltiples ocasiones para predecir actividades biológicas más complejas, entre ellas la citotoxicidad (Anderson *et al.*, 1991; Sánchez *et al.*, 1994). En el presente estudio las fracciones tóxicas para *A. salina* incluyeron de la I a la IX (Cuadro 14). Todas estas fracciones presentaron una $CL_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$.

Cuadro 14 . Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* de las fracciones cromatográficas primarias del extracto $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) de *Stauranthus perforatus*.

| Fracción | I | II | III | IV | V |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | 29.157 | 2.5844 | 7.5240 | 7.1530 | 11.496 |

| Fracción | VI | VII | VIII | IX | X |
|--------------------------------|--------|--------|---------|---------|-------|
| CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | 2.5844 | 5.1817 | 30.4433 | 44.1745 | >1000 |

En el Cuadro 15 se presentan los resultados de los ensayos que permitieron evaluar la actividad inhibidora del crecimiento vegetal de las fracciones primarias, y en éste se puede apreciar que la germinación de ninguna de las malezas de prueba se ve afectada por el extracto de *S. perforatus* por otra parte las fracciones I-IX demostraron un efecto significativo sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*.

En el caso de *E. crusgalli* el crecimiento radicular se ve afectado únicamente por las fracciones VI y VII.

Cuadro 15. Efecto de las fracciones cromatográficas del extracto CHCl₃-MeOH (1:1) de *Stauranthus perforatus*, sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crus-galli*. (García, 1995).

| <i>A. hypochondriacus</i> | | | <i>E. crusgalli</i> | |
|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Fraciones (100 ppm) | Germinación (%) | Crecimiento (mm) | Germinación (%) | Crecimiento (mm) |
| Control | 77.5 | 6.7 ± .5 | 65.00 | 11.6± 2.06 |
| I | 85.0 | 4.22* ± .66 | 53.75 | 11.95 ±1.90 |
| II | 82.50 | 5.40* ± .54 | 77.50 | 12.80 ± 1.0 |
| Control | 86.25 | 10.50 ± .95 | 68.75 | 14.10 ±1.95 |
| III | 93.0 | 7.15* ± .76 | 55.00 | 11.95± 2.70 |
| IV | 72.50 | 3.30*± .33 | 51.20 | 13.87± 2.90 |
| V | 60.00 | 4.45*± .69 | 49.50 | 9.74 ± 1.70 |
| VI | 80.00 | 3.40*± .16 | 35.00 | 8.5* ± 2.30 |
| VII | 66.25 | 3.20*± .33 | 37.50 | 8.75* ±1.60 |
| VIII | 67.00 | 2.30*± .82 | 55.00 | 9.90 ± 3.20 |
| IX | 71.25 | 3.90*± .62 | 65.00 | 13.15± 3.00 |
| Control | 92.50 | 6.25 ± .80 | 57.50 | 13.82 ±2.10 |
| X | 92.50 | 6.03 ± .74 | 58.00 | 12.65± 2.04 |

* Valores que difieren significativamente del control (Duncan, $\alpha = 0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

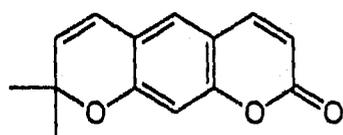
Diversos procedimientos cromatográficos de las fracciones activas I, II, III, V, VI, VII, VIII y IX obtenidas durante el fraccionamiento primario (Cuadro 6), permitieron el aislamiento de once metabolitos secundarios, que incluyen: seis cumarinas: la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2, la chalepensina 3, la xantiletina 5, la amirina 9, la chalepina 11, y el 2'-isopropil-soraleno 6; dos lignanos asarinina 4 y fargesina 10; una amida: la pelitorina 8; un sesquiterpenoide de tipo cariofilano: el 4,5-epoxi- β -cariofileno 1 y el β -sitosterol 7.

Los rendimientos de los compuestos aislados se indican en el Cuadro 16 y las estructuras moleculares en la Figura 2.

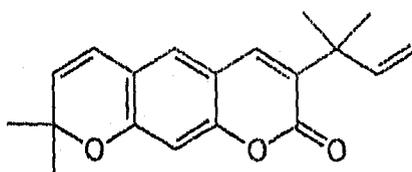
Cuadro 16. Rendimiento de los compuestos aislados de las raíces de *Stauranthus perforatus*.

| FRACCION PRIMARIA | COMPUESTO | RENDIMIENTO (% EN PESO SECO) |
|-------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| I | 4,5-epoxi- β -cariofileno (1) | 0.00566 |
| II, III | 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina (2) | 0.00492 |
| III | chalepensina (3) | 0.07540 |
| V | asarinina (4) | 0.00366 |
| V | xantiletina (5) | 0.07640 |
| V | 2'-isopropil-soraleno (6) | 0.000546 |
| V | β -sitosterol (7) | 0.000623 |
| VI | pelitorina (8) | 0.004686 |
| VI | amirina (9) | 0.00957 |
| VII | fargesina (10) | 0.000693 |
| VIII, IX | chalepina (11) | 0.1062 |

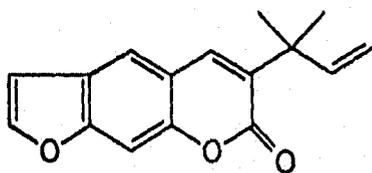
Figura 2. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de *Stauranthus perforatus*.



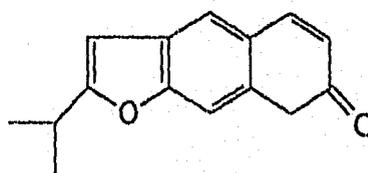
xantiletina 5



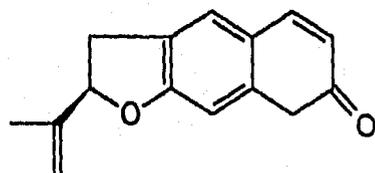
3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2



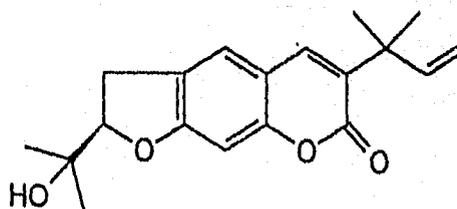
chalepentina 3



2'-isopropil-soraleno 6

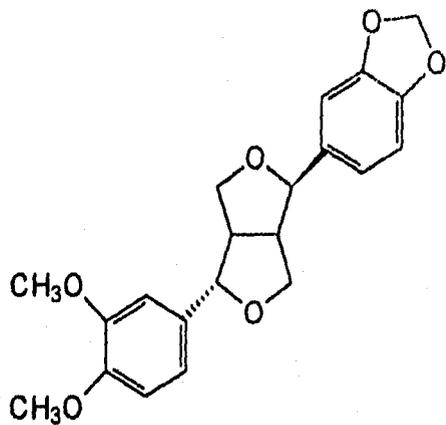


amirina 9

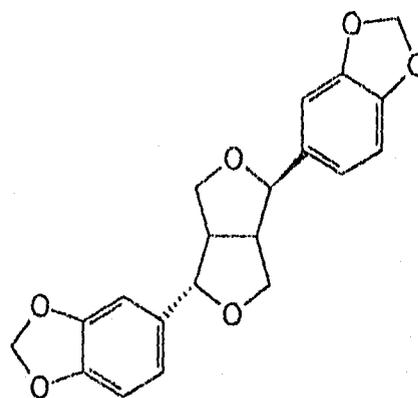


chalepina 11

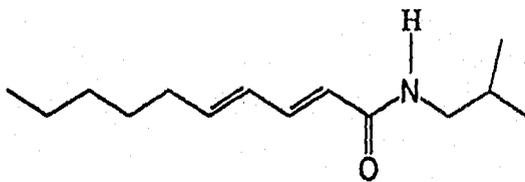
Figura 2. Estructuras moleculares de los compuestos aislados de *Stauranthus perforatus*.



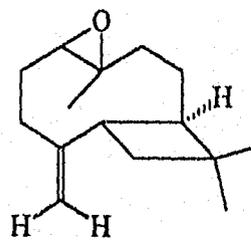
fargesina 10



asarinina 4



pelitorina 8



4,5-epoxi-β-cariofileno 1

La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. A continuación se discutirá de manera breve el análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos que permitieron proponer las estructuras de los compuestos aislados. Para facilitar el seguimiento de la discusión y la interpretación de las evidencias espectroscópicas, estas se realizarán por categoría de compuestos.

Identificación del 4,5-epoxi- β -cariofileno (1):

La caracterización de este compuesto se realizó por comparación con una muestra auténtica aislada previamente de la especie medicinal *Conyza filaginoides* (Acevedo y Estrada, 1995). Las constantes físicas y espectroscópicas resultaron idénticas a las de la muestra auténtica.

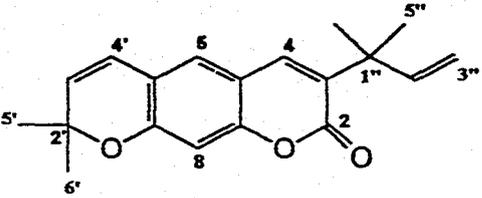
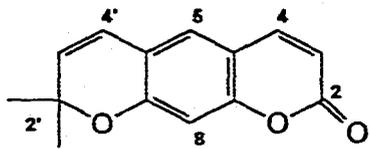
Caracterización de las piranocumarinas xantiletina (5) y 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2):

La xantiletina 5 y la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2, presentaron el núcleo estructural de una piranocumarina. Sus espectros de U.V. registraron absorciones intensas en λ_{max} 223, 347 y 304, 267 nm, respectivamente. (Cuadro 17). Los espectros de IR de las dos cumarinas presentaron como característica relevante, la absorción para el carbonilo de la porción α -pirona entre 1717-1730 cm^{-1} (Cuadro 17, Espectros 1 y 2).

La fórmula molecular de los productos se determinó por espectrometría de masas: el producto 5 presentó un ion molecular de 228 unidades de masas el cual permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$. La segunda piranocumarina 2 presentó un ion molecular de 296 u.m.a. y su fórmula se calculó como $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$.

Los espectros de RMN (Cuadros 18 y 19. Espectros 5, 6, 7 y 8) de las cumarinas 5 y 2 presentaron el perfil típico de una piranocumarina lineal (Brown, 1981).

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la xantiletina (5) y de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2).

| | | |
|----------------------------|---|---|
| |  <p>3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2</p> |  <p>xantiletina 5</p> |
| E.M.I.E., m/z (int. rel.): | (Espectro 4) 296 [M+ (37.60)], 281 (100), 282 (26.49), 253(5.98), 238 (8.55), 237 (6.84). | (Espectro 3) 229 (4.016), 228 [M+ (24.89)], 213 [M+ -15 (100)], 185 (20.08), 128 (6.83), 93(5.62), 69 (5.22), 57 (4.812), 43 (4.74), 41 (4.82). |
| IR ν_{\max} | (película) cm^{-1} : (Espectro 2) 3082, 3048, 1724, 1624, 1570. | (KBr) cm^{-1} : (Espectro 1) 3054, 2966, 1720, 1622, 1560, 1132 |
| U.V. λ_{\max} nm: | MeOH 304, 267. | MeOH 347, 223 |

Cuadro 18 . Valores para los desplazamientos químicos* (δ) en la ^1H -RMN de las piranocumarinas aisladas de *S. perforatus*. **

| Protones | Xantiletina 5 (Espectro 5) | 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2 (Espectro 7) |
|----------|-------------------------------|---|
| H-3 | 6.21 ^a | - |
| H-4 | 7.57 ^b | 7.46 ^h |
| H-5 | 7.03 ^h | 7.02 ^h |
| H-8 | 6.71 ^h | 6.69 ^h |
| H-3' | 5.68 ^c | 5.66 ^d |
| H-4' | 6.34 ^c | 6.33 ^d |
| H-5' | 1.47 ^h | 1.46 ^h |
| H-6' | 1.47 ^h | 1.46 ^h |
| H-2'' | - | 6.16 ^e |
| H-3'' | - | 5.10 ^f |
| H-3A'' | - | 5.05 ^g |
| H-4'' | - | 1.45 ^h |
| H-5'' | - | 1.45 ^h |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 300 MHz

Las constantes de acoplamiento se expresan en Hz y se indican entre parentesis.

a: d, (J=9.514); b: dd, (J=9.514, 0.6); c: d, (J=9.513); d: d, (J=9.75); e: dd, (J=10.57, 17.47); f: d, (J=10.57); g: d, (J=17.47); h: s.

Cuadro 19. Valores para los desplazamientos químicos* (δ) obtenidos de la ^{13}C -RMN de las piranocumarinas aisladas de *S. perforatus*. **

| Carbono | Xantiletina 5 (Espectro 6) | 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2 (Espectro 8) |
|---------|-------------------------------|---|
| C-2 | 161.10 | 159.92 |
| C-3 | 112.95 | 131.73 |
| C-4 | 143.26 | 137.59 |
| C-4a | 118.48 | 113.14 |
| C-5 | 124.73 | 124.61 |
| C-5 | 120.72 | 118.30 |
| C-7 | 156.80 | 155.70 |
| C-8 | 104.32 | 103.85 |
| C-8a | 155.39 | 154.60 |
| C-2' | 76.57 | 77.31 |
| C-3' | 131.16 | 130.95 |
| C-4' | 120.72 | 121.01 |
| C-5' | 28.53 | 28.22 |
| C-6' | 28.53 | 28.22 |
| C-1'' | - | 40.38 |
| C-2'' | - | 145.59 |
| C-3'' | - | 112.06 |
| C-4'' | - | 26.12 |
| C-5'' | - | 26.12 |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 75 MHz

En ambos casos, los espectros de RMN-¹H contenían un singulete en δ_H 1.45 correspondiente a los grupos metilos geminales en C-2' del núcleo pirano, el sistema AB característico de los hidrógenos H-3' (δ_H 5.68, d J=9.51 Hz en **5** y δ_H 5.66, d, J=9.75 Hz en **2**), y H-4' (δ_H 6.34, d, J=9.51 Hz en **5** y δ_H 6.33, d, J=9.75 Hz en **2**), así como las resonancias correspondientes a los hidrógenos H-5 ($\delta \approx 7.0$) y H-8 ($\delta \approx 6.7$) del núcleo cumarínico (Cuadro 18).

Las principales diferencias observadas entre los espectros de RMN-¹H de las dos piranocumarinas fueron las siguientes:

1. La xantiletina **5** presentó, además de las señales antes indicadas el sistema AB típico de los hidrógenos H-3 y H-4 de una cumarina en δ_H 6.21, (d, J= 9.51 Hz) y δ_H 7.57, (dd, J= 0.6, 9.51 Hz), respectivamente.
2. En el caso de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina **2**, en lugar del sistema AB se observaron las señales para un grupo 1,1-dimetilalilo. La porción olefínica de este grupo se presentaba como un sistema ABC [δ_H 6.164 dd, J= 10.5, 17.4 Hz (H-2''); δ_H 5.103, d, J= 10.65 Hz (H-3''); δ_H 5.056, d, J= 17.55 Hz (H-3'')], en tanto que los dos metilos sobre carbono cuaternario se observaron como dos singuletes en δ 1.46 y 1.45. La presencia de esta unidad en la molécula se confirmó mediante las resonancias en δ_c 40.38 (C-1''), 145.59 (C-2''), 112.06 (C-3''), 26.12 (C-4'' y C-5''), en el espectro de ¹³C-RMN (Cuadro 19, Espectro 7).

Las asignaciones de ¹³C-RMN de las dos piranocumarinas se realizaron mediante el análisis de los espectros DEPT y HETCOR (Espectros 9, 10 y 11). Con base en las evidencias espectroscópicas las piranocumarinas se identificaron como la xantiletina **5** y la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina **2**.

En el caso de la xantiletina, la estructura se confirmó mediante el análisis de difracción de Rayos X. La molécula esta constituida por tres anillos de seis miembros A B y C. Los anillos A y B son planos, y el anillo C presenta una conformación de bote torcido. En la Figura 3 se ilustra una representación estereoscópica del compuesto.

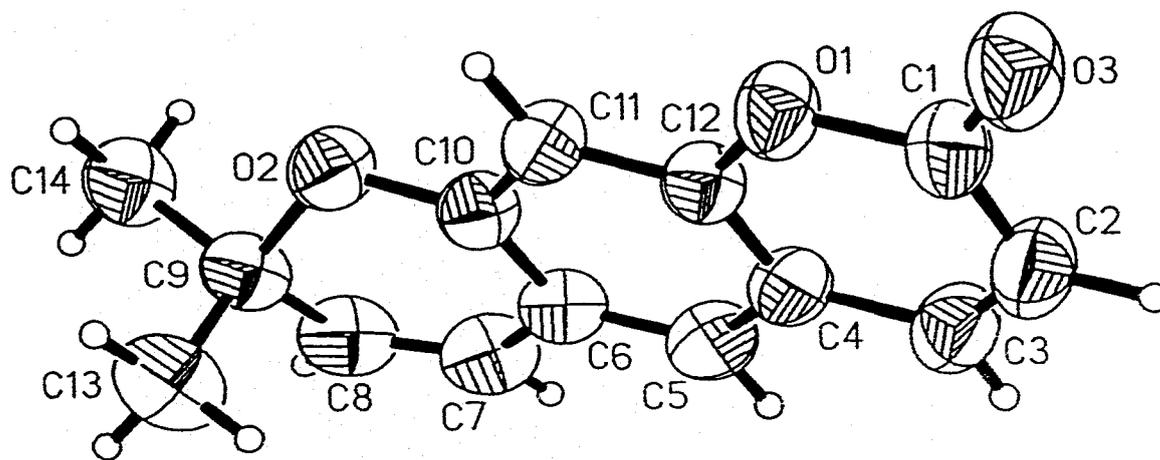


Figura 3. Proyección estereoscópica generada por rayos X de la xantiletina (5).

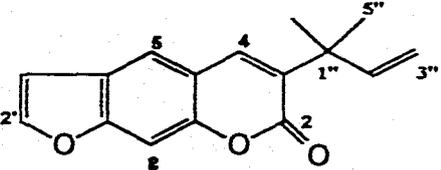
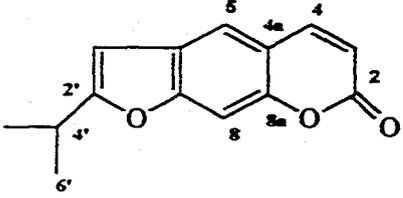
La xantiletina (Manzini, 1987) y la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (Macías, *et al.*, 1989) se han aislado previamente de otras rutáceas, y sus constantes físicas y espectroscópicas se encontraban en perfecta armonía con las descritas en la literatura. Por otra parte ambas cumarinas se han obtenido también por medio de síntesis (Waykole, 1979; Massanet 1988).

Caracterización de la chalepensina (3) y el 2'-isopropil-soraleno (6).

La fórmula molecular del compuesto 3 se determinó por espectrometría de masas como $C_{16}H_{14}O_3$. Los espectros de UV revelaron la presencia de un núcleo furanocumarina lineal (Brown, 1987), mostrando cuatro zonas de absorción 205-255 (log ϵ 4.0), 240-255 (log ϵ 4.06-4.45), 260-270 (log ϵ 4.18-4.26) y 290-328 nm (log ϵ 3.85-4.13). [Cuadro 20]. Su espectro de IR presentó, además de las bandas correspondientes a la porción α -pirona, absorciones características para el anillo de furano en el rango de 1613-1639 cm^{-1} , (Cuadro 20).

Sus espectros de RMN (Cuadros 21 y 22 Espectros 16 y 17) eran congruentes con el de una furanocumarina lineal sustituida con un grupo 1,1-dimetilalilio en C-3; las señales diagnósticas para el núcleo furano se observaron como un par de dobletes ($J_{2,3'} \approx 2.5$ Hz) en δ_H 7.66 (H-2') y δ_H 6.81 (H-3') en el espectro de RMN- 1H , mismos que correlacionaban en el espectro HETCOR (Espectro 18) con las señales en δ_c 138.26 y δ_c 106.28, respectivamente. La interacción de tipo W observada en el espectro de correlación bidimensional COSY (Figura 4) entre H-3' y H-8, confirmó de manera adicional la naturaleza de furanocumarina de este compuesto. Las restantes señales observadas en los espectros de RMN fueron muy similares a los de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina (2), y consistentes con la presencia del grupo 1,1-dimetilalilio en C-3. De acuerdo a estas evidencias espectroscópicas, este compuesto fue caracterizado como la chalepensina, y de nueva cuenta las características espectroscópicas se encontraban en armonía con las previamente descritas en la literatura fitoquímica. (Brooker, *et al.*, 1967; Kumar, *et al.*, 1995).

Cuadro 20. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la chalepensina (3) y del 2'-isopropil-soraleno (6).

| | | |
|--|--|---|
| |  <p style="text-align: center;">chalepensina 3</p> |  <p style="text-align: center;">2'-isopropil-soraleno (6).</p> |
| E.M.I.Q., m/z (int. rel.) | (Espectro 14) 255 (84.37), 254 [M+ (100)], 239 (26.56), 211 (10.15), 199(21.87). | E.M.I.E. (Espectro 15) 227 (100), 228 [M+ (93)], 213 (11.20), 185 (6), 43 (7). |
| IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} | (Espectro 12) 3050, 2968, 1722, 1630. | (Espectro13) 2970, 1720. |
| U.V. λ_{\max} MeOH, nm | 327, 291, 246, 241, 209 (log ϵ 3.98, 4.14, 4.45, 4.43, 4.41). | N.D. |

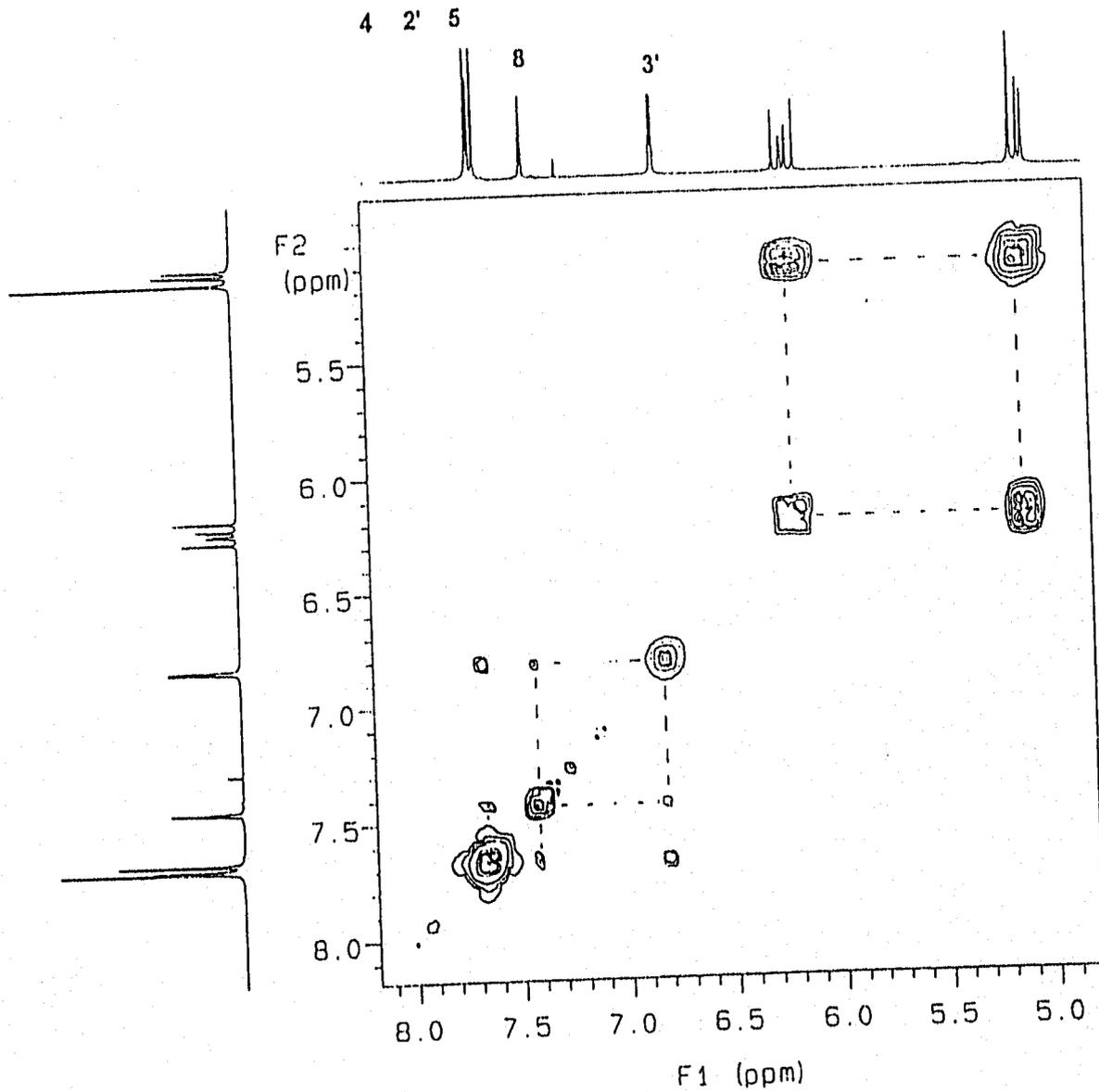


Figura 4. Espectro de RMN-¹H 2D-COSY de la chalepentina 3

Cuadro 21 . Valores para los desplazamientos químicos* (δ) en la ^1H -RMN de las furanocumarinas aisladas de *S. perforaturs*. **

| Protones | Chalepensina 3 (Espectro 16) | 2'-isopropil-soraleno 6 (Espectro 19) |
|----------|---------------------------------|--|
| H-3 | - | 6.35 ^g |
| H-4 | 7.67 ^a | 7.77 ^g |
| H-5 | 7.64 ^a | 7.53 ^a |
| H-8 | 7.42 ^a | 7.39 ^h |
| H-2' | 7.66 ^b | - |
| H-3' | 6.81 ^c | 6.39 ^j |
| H-4' | - | 3.09 ^j |
| H-5' | - | 1.36 ^k |
| H-6' | - | 1.36 ^k |
| H-2'' | 6.21 ^d | - |
| H-3'' | 5.14 ^e | - |
| H-3A'' | 5.09 ^f | - |
| H-4'' | 1.51 ^a | - |
| H-5'' | 1.51 ^a | - |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 300 MHz

Las constantes de acoplamiento se expresan en Hz y se indican entre parentesis.

a: s; b: d, (J=2.40); c: dd, (J=0.9, 2.40); d: dd, (J=6.15, 14.09); e: d, (J=14.09); f: dd, (J=1.05, 6.15); g: d, (J=9.6); h:sa; i: dd, (J=0.9, 1.2); j:m, (J=1.2, 6.9); k: d, (J=6.9).

Cuadro 22. Valores para los desplazamientos químicos* (δ) en ^{13}C -RMN de las furanocumarinas aisladas de *S. perforatus*. **

| Carbono | Chalepentina 3 (Espectro 17) | 2'-isopropil-soraleno 6 (Espectro 20) |
|---------|---------------------------------|--|
| C-2 | 159.83 | 161.32 |
| C-3 | 133.09 | 114.22 |
| C-4 | 146.54 | 144.24 |
| C-4a | 115.87 | 114.99 |
| C-5 | 119.47 | 118.61 |
| C-6 | 124.55 | 126.50 |
| C-7 | 155.79 | 156.37 |
| C-8 | 98.89 | 99.39 |
| C-8a | 151.28 | 151.57 |
| C-2' | 138.20 | 167.39 |
| C-3' | 106.28 | 99.39 |
| C-4' | - | 28.31 |
| C-5' | - | 20.71 |
| C-6' | - | 20.71 |
| C-1'' | 40.49 | - |
| C-2'' | 145.53 | - |
| C-3'' | 112.27 | - |
| C-4'' | 26.09 | - |
| C-5'' | 26.09 | - |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 75 MHz

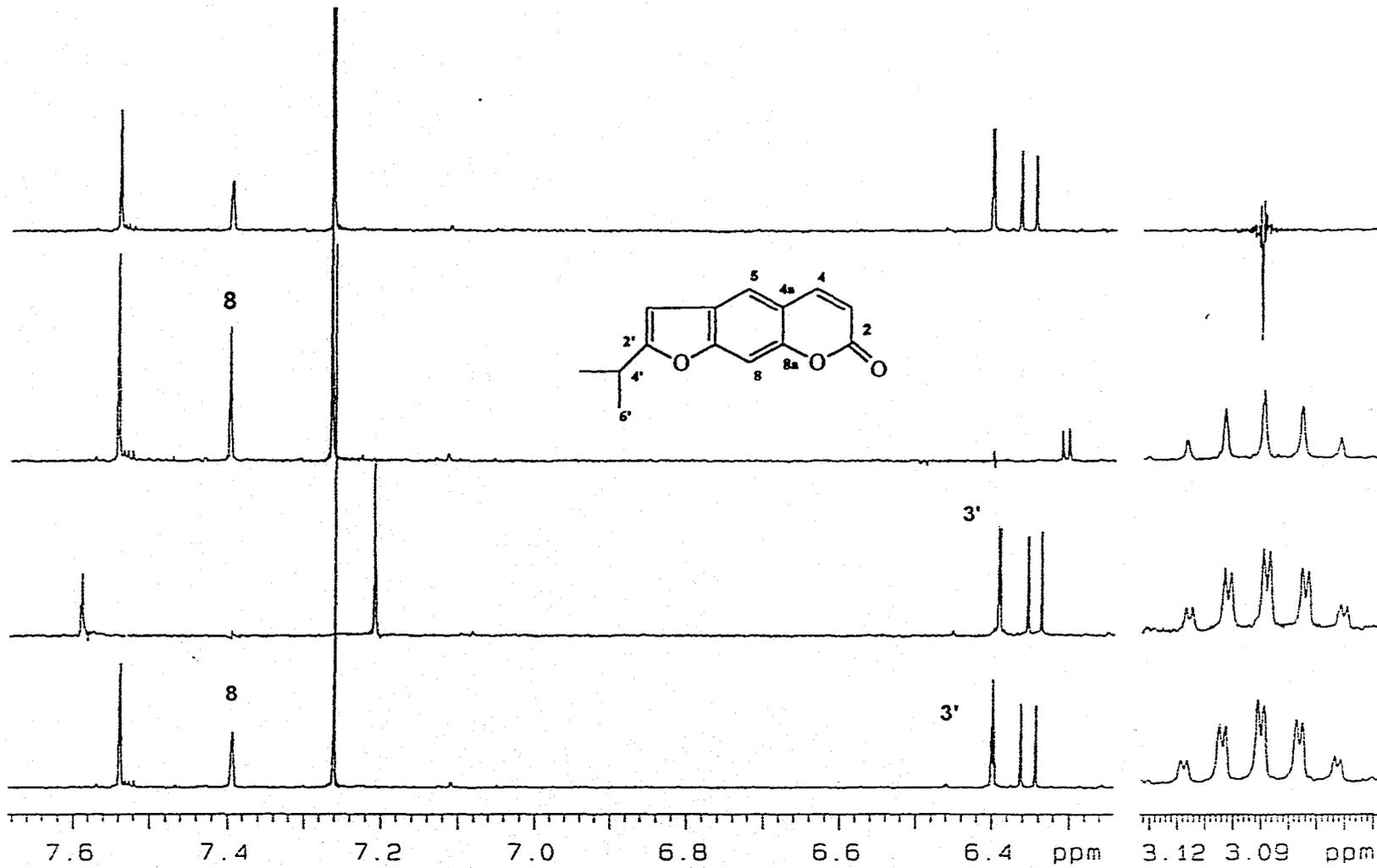


Figura 5. Experimento de doble resonancia del 2'-isopropil-soraleno 6

Al igual que la chalepentina los datos de RMN del producto **6** (Espectros 19 y 20) eran congruentes con el de una furanocumarina lineal (Cuadros 21 y 22). Sin embargo, a diferencia de la chalepentina las señales para el grupo 1,1-dimetilalilo y las correspondientes al sistema AB del anillo furano se encontraban ausentes. En lugar de estas los espectros presentaron las señales diagnósticas para los protones H-3 y H-4 de la porción α -pirona de una cumarina [δ_H 6.35 (d, $J=9.6$), δ_C 114.18 y δ_H 7.77 (d, $J=9.6$), δ_C 144.23 respectivamente] y para un grupo isopropilo.

La ausencia de las señales del sistema AB del anillo furano y la presencia de una señal en δ_H 6.398 ($J=0.9, 1.2$) para H-3' que presentaba un acoplamiento de tipo W con el protón H-8 (δ_H 7.39 sa) permitieron inferir que el grupo isopropilo se encontraba ubicado en la posición C-2' del núcleo furano. La interacción a larga distancia de tipo W entre los protones H-3' y H-8 se comprobó por experimentos de doble resonancia (Figura 5): al irradiar el protón en δ_H 7.39 (H-8) el doblete de doblete en δ_H 6.39 (H-3') se simplificó a un doblete. Así mismo al irradiar H-3' el singulete ancho correspondiente a H-8 se afinó considerablemente.

Las señales de los metilos del isopropilo se observaron en δ_H 1.36 como un doblete ($J=6.9$) que integraba para seis hidrógenos, ésta señal mostró una correlación con la absorción en δ_C 20.7 en el espectro HETCOR (Espectro 21). Por otro lado, la señal del metino del isopropilo se observó como un multiplete ($J= 0.9, 6.9$) en δ_H 3.09 mismo que correlacionaba en el espectro HETCOR (Espectro 21) con la señal δ_C 28.312 (C-4').

Con base en la evidencias presentadas el compuesto **6** se caracterizó como el 2'-isopropil-soraleno. Cabe destacar que éste metabolito secundario no se ha descrito previamente como producto natural, sin embargo, la deshidratación del producto natural marmesina ha permitido la obtención del producto **6** por un proceso de semisíntesis (Abu-Mustafa y Fayed, 1961; Chatterjee y Mitra, 1949).

Las características previamente descritas se encuentran en perfecta armonía con las encontradas en el presente trabajo. Las evidencias físicas y espectroscópicas del producto 6 permitieron proponer su estructura como la del 2'-isopropil-soraleno o anhidromarmesina.

Identificación de la amirina (9) y la chalepina (11).

La segunda serie de cumarinas aisladas de *S. perforatus*, fueron de tipo dihidrofurancumarinas. Las dos dihidrofurancumarinas se obtuvieron como sólidos cristalinos ópticamente activos (Cuadro 23).

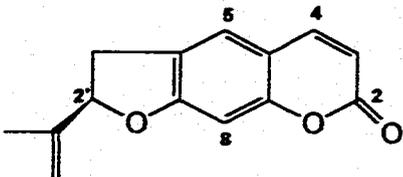
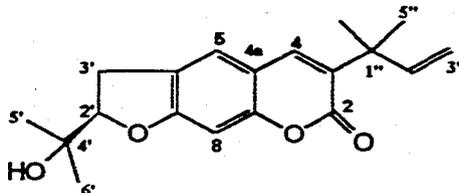
Sus espectros de U.V. indicaron la presencia de anillos cumarínicos al observarse absorciones en los rangos de λ_{max} : 216-226 (log ϵ 3.98-4.56), 243-251 (log ϵ 3.41-3.87), 255-261 (log ϵ 3.45-3.87) y 322-335 nm (log ϵ 4.14-4.19). (Brown, 1981).

En los espectros de IR la frecuencia de vibración del grupo α -pirona se encontraba de nueva cuenta en la región de 1700-1750 cm^{-1} (Cuadro 23 Espectros 22 y 23).

La fórmula molecular del producto 9, se determinó por espectrometría de masas como $C_{14}H_{12}O_3$. En el caso del compuesto 11 su fórmula molecular se estableció como $C_{16}H_{22}O_4$. (Cuadro 23).

Los espectros de RMN (Cuadros 24 y 25 Espectros 26, 27, 28 y 29) establecieron de manera inequívoca la naturaleza de dihidrofurancumarina lineal de ambos compuestos (Brown, 1981). La evidencia más importante fue la presencia en los espectros de RMN- 1H del sistema ABX que conforman los hidrógenos H-2' y H-3' de una dihidrofurancumarina sustituida en C-2' (Figura 6).

Cuadro 23. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la amirina (10) y de la chalepina (12)

| | | |
|---------------------------|---|---|
| |  <p style="text-align: center;">amirina 9</p> |  <p style="text-align: center;">chalepina 11</p> |
| E.M.I.E., m/z (int. rel.) | (Espectro 24) 228 [M^+ (84.48)], 229 (15.52), 213 (100), 200 (10.34), 185(35.34), 128 (12.93). | E.M. FAB m/z (int. rel.):(Espectro 25), 315 [M^+ +1(100)], 314[M^+ (85)], 299 (15), 255 (13). |
| IR ν_{max} cm^{-1} | (película), (Espectro 22) 3076, 2920, 1736, 1626. | IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Espectro 23) 3380, 3084, 1714, 1626. |
| U.V. λ_{max} nm | MeOH, 248, 260, 302 (log ϵ = 3.55, 3.65, 4.17) | EtOH, 270, 334 (log ϵ = 3.27, 4.25) |

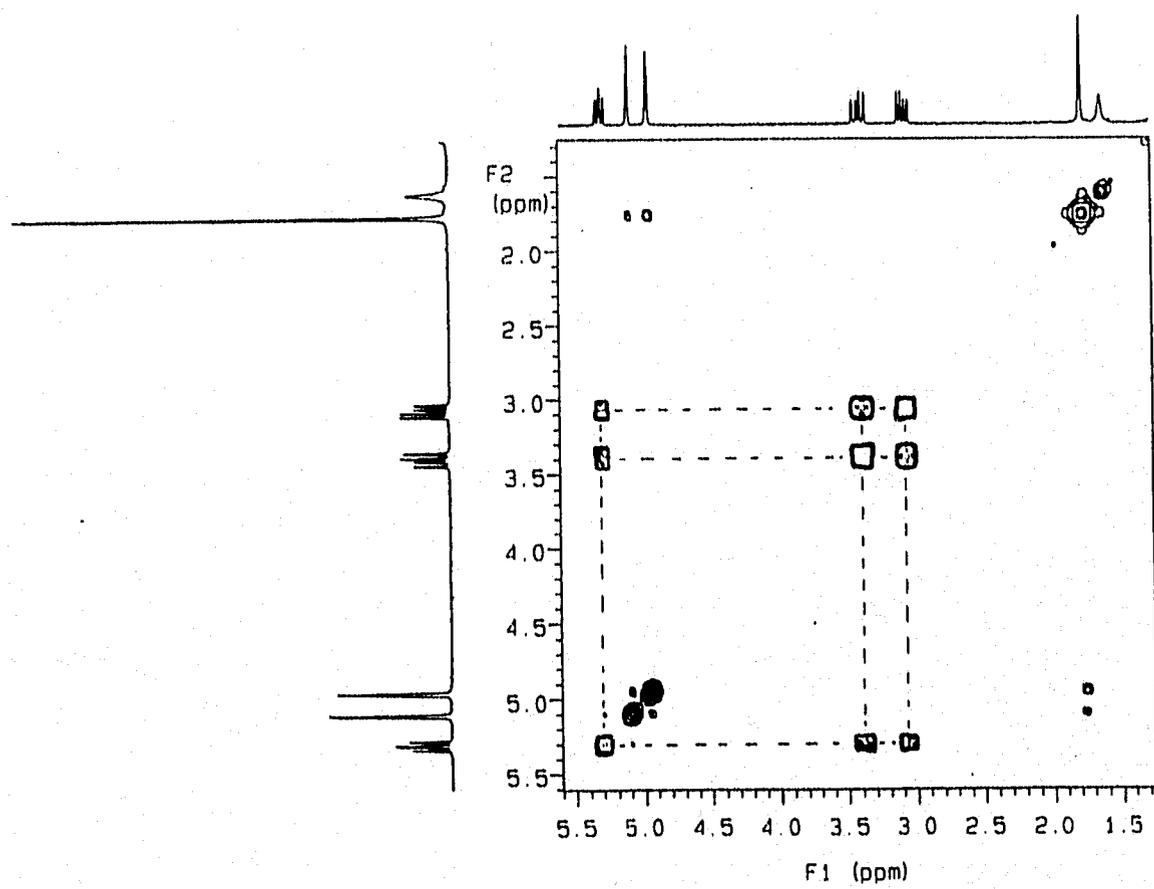


Figura 6. Espectro COSY ^1H - ^1H de la amirina 9

En el caso de la cumarina **9** las señales correspondientes se observaron como un doblete de doblete ($J = 8.4, 8.7$ Hz) en δ_H 5.305, y dos dobletes de dobletes de dobletes en δ_H 3.07, ($J = 1.2, 7.8, 15.9$ Hz, H-3 α) y δ_H 3.397, ($J = 0.825, 9.525, 15.825$ Hz, H-3' β), mismas que correlacionaban en el espectro HETCOR con el metino en δ_C 87.50 y el metileno en δ_C 33.45, respectivamente (Espectro 30).

Para la cumarina **11** las resonancias de los hidrógenos del dihidrofurano se observaron en δ 4.71 [dd, $J = 8.7, 9.0$, (H-2')] y en δ 3.19 (m, H-3' α , H-3' β); estas señales correlacionaban el HETCOR (Espectro 31) con las resonancias en δ_C 90.87 y δ_C 29.57, respectivamente.

Los espectros de RMN también evidenciaron la naturaleza del sustituyente en C-2'. Así, en el caso del producto **9** la presencia en el espectro de RMN- 1H (Espectro 26) del doblete de doblete ($J = 0.9, 1.2$ Hz) en δ_H 1.77, asignable a un metilo sobre doble ligadura, y de dos señales vinílicas en δ_H 5.1035, (dd, $J = 0.6, 1.2$ Hz, H-6') y δ 4.96, (dd, $J = 0.6, 1.2$ Hz, H-6'), eran compatibles con un grupo isopropilideno como sustituyente en C-2'. La presencia en el espectro de RMN- ^{13}C de las señales en δ_C 17.05 (C-6'), δ_C 112.87 (C-5') y δ_C 145.59 confirmaron de manera adicional la naturaleza de este sustituyente.

En lugar de las resonancias antes mencionadas, los espectros del compuesto **11** mostraron señales para una función carbinólica terciaria (δ_C 71.64) y para dos metilos sobre un centro cuaternario (δ_C 24.12; δ_H 1.22 y 1.35), consistentes con un grupo isopropanol en C-2'.

Las señales de los núcleos aromáticos en C-5 y C-8 fueron similares en ambos compuestos (Cuadro 25).

Por último, el espectro del producto **9**, al igual que la xantiletina **5** presentó el sistema AB típico de los hidrógenos H-3 (δ 6.21, d, $J = 9.45$) y H-4 (δ 7.59, d, $J = 9.45$) del núcleo cumarina.

En el caso de la cumarina **11** las resonancias observadas para la porción α -pirona fueron muy similares a las de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina, sugiriendo que este compuesto presentaba también un sustituyente 1,1-dimetilalilo en C-3 [en δ_H 5.05 (H-3''), 5.09 (H-3'') y 6.16 (H-2'') y δ_H 1.46 (H-4'') y (H-5''); estas señales correlacionaron en el espectro HETCOR (Espectro 31) con las señales en δ_C 137.99 (C-2''), 112 (C-3''), 25.97 (C-4''), 26.07 (C-5''), respectivamente]. El H-4 del producto **11** también correlacionó con H-5 en el espectro COSY (Figura 7) demostrando inequívocamente la disposición en C-3 del sustituyente de origen mevalónico.

Con base en estas evidencias, las dihidrofurancumarinas **9** y **11** se caracterizaron como la (+)amirina (Bohlmann, 1975; Abu-Mustafa, 1975; Ishii, e Ishikawa, 1978) y la (-)chalepina (Brooker, *et al.*, 1967; Pozzi, 1967; Kumar, *et al.*, 1995;) respectivamente. Las propiedades físicas, y las constantes espectroscópicas y espectrométricas correspondieron con las previamente descritas.

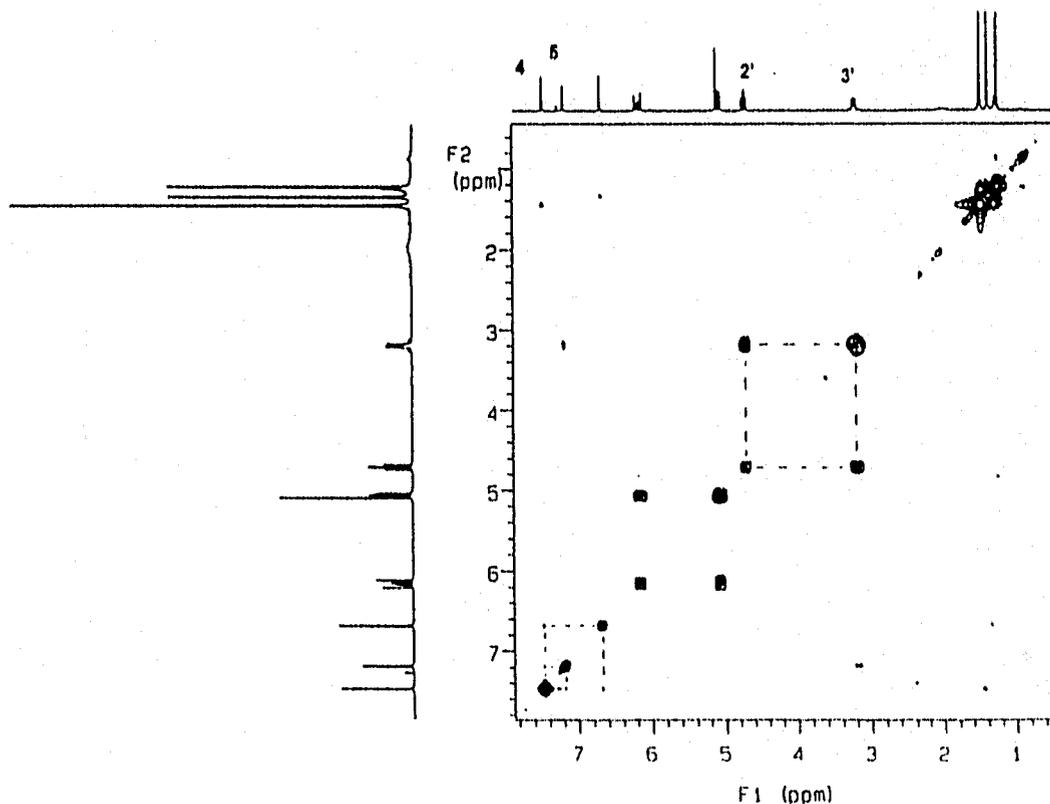


Figura 7. Espectro de RMN- ^1H bidimensional de la chalepina **11**

Cuadro 24. Valores para los desplazamientos químicos* (δ) obtenidos en la RMN- ^1H para los protones con núcleo estructural de dihidrofurancumarina aisladas de *S. perforatus*. **

| Protones | Amirina 9 (Espectro 26) | Chalepina 11 (Espectro 28) |
|----------|---------------------------------------|-------------------------------|
| H-3 | 6.21 ^a | - |
| H-4 | 7.59 ^a | 7.47 ^l |
| H-5 | 7.22 ^b | 7.18 ^l |
| H-8 | 6.76 ^l | 6.68 ^l |
| H-2' | 5.30 ^e | 4.71 ^g |
| H-3' | 3.07 ^d | 3.19 ^h |
| H-3A' | 3.40 ^e | 3.19 ^h |
| H-5' | 1.77 ^b | 1.22 ^l |
| H-6' | 5.10 ^l , 4.96 ^l | 1.35 ^l |
| H-2'' | - | 6.16 ^l |
| H-3'' | - | 5.05 ^l |
| H-3A'' | - | 5.09 ^k |
| H-4'' | - | 1.46 ^l |
| H-5'' | - | 1.46 ^l |
| OH | - | 1.93 |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 300 MHz

Las constantes de acoplamiento se expresan en Hz y se indican entre parentesis.

a: d, (J=9.45); b: dd, (J=1.2, 0.9); c: dd, (J=8.4, 8.7); d: ddd, (J=1.2, 7.8, 15.9); e: ddd, (J=0.82, 9.52, 15.82); f: dd, (J=0.6, 1.2); g: dd, (J=8.7, 9.0); h: m; i: d, (J=1.20); j: d, (J=17.55); k: d, (J=10.95); l: s.

Cuadro 25. Valores para los desplazamientos químicos* (δ) en ^{13}C -RMN de las dihidrofuranocumarinas aisladas de *S. perforatus*. **

| Carbono | Amirina 9 (Espectro 27) | Chalepina 11 (Espectro 29) |
|---------|----------------------------|-------------------------------|
| C-2 | 161.45 | 162.20 |
| C-3 | 112.18 | 130.85 |
| C-4 | 143.66 | 145.59 |
| C-4a | 142.94 | 113.11 |
| C-5 | 123.45 | 123.20 |
| C-6 | 124.50 | 124.52 |
| C-7 | 163.33 | 160.10 |
| C-8 | 97.96 | 97.05 |
| C-8a | 155.82 | 154.60 |
| C-2' | 87.50 | 90.87 |
| C-3' | 33.45 | 29.57 |
| C-4' | 145.59 | 71.65 |
| C-5' | 17.07 | 24.19 |
| C-6' | 112.87 | 24.19 |
| C-1'' | - | 40.25 |
| C-2'' | - | 137.98 |
| C-3'' | - | 112.00 |
| C-4'' | - | 25.98 |
| C-5'' | - | 26.07 |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl_3 , 75 MHz

Caracterización de la pelitorina (8).

Sucesivas cromatografías en columna y en capa delgada de las fracciones primarias VI (Cuadro 6), condujeron al aislamiento de la amida 8 como un aceite químicamente inestable. Sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se resumen en el Cuadro 26.

Su espectro de masas permitió establecer la fórmula molecular de $C_{14}H_{25}NO$, e inferir por la relación de masa-carga impar del ion molecular (M^+ 223) que la molécula contenía nitrógeno (Espectro 33).

El espectro IR presentó absorciones en 3300, 1658, 1628 cm^{-1} (Crombie 1955) asociadas con la presencia de una amida conjugada. Por otro lado, el máximo de absorción observado en el espectro de UV (λ_{max} 259 nm) indicó la existencia de un dieno conjugado a una función amida. (Cuadro 26).

Los espectros de RMN (Cuadro 26) confirmaron que el producto natural era una amida alifática conjugada. Así el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 34), evidenció la presencia de 13 resonancias, una de las cuales correspondía al grupo carbonilo de una amida conjugada en δ_c 166.39 ppm. De acuerdo al análisis del espectro DEPT (Espectro 36), las 12 señales restantes se asignaron a cuatro carbonos olefinicos conjugados (δ_c 121.84, 141.00, 128.18 y 142.90), cinco metilenos (δ_c 32.88, 28.47, 31.30, 22.45 y 46.90), un metino alifático (δ_c 28.61) y a tres metilos (δ_c 13.99 y 20.13). A fin de satisfacer el número de carbonos requeridos por la fórmula molecular, dos de estas señales debían ser coincidentes ya que en el espectro de RMN- 1H (Espectro 35), se evidenciaron claramente señales para tres grupos metilos en δ_H 0.94, 0.91 y 0.89, las dos primeras señales aparecían como doblete ($J=6.6$ Hz), en tanto que la última resonancia se observaba como un triplete ($J= 6.6$ Hz) y era consistente con la presencia de un grupo metilo terminal en la molécula.

El espectro de RMN- 1H (Espectro 35), presentó resonancias para cuatro hidrógenos olefinicos en δ_H 5.75 (d, $J=14.77$, H-2), δ_H 7.18 (dd, $J=14.85$ H-3), δ_H 6.09 (m, H-4 y H-5); un multiplete para un metino centrado en δ_H 1.8 y señales para varios grupos metilenos.

Caracterización de la pelitorina (8).

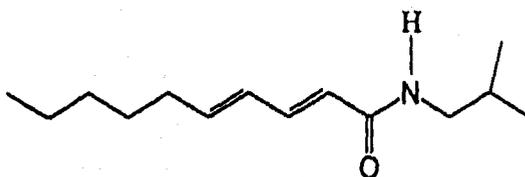
Sucesivas cromatografías en columna y en capa delgada de las fracciones primarias VI (Cuadro 6), condujeron al aislamiento de la amida 8 como un aceite químicamente inestable. Sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas se resumen en el Cuadro 26.

Su espectro de masas permitió establecer la fórmula molecular de $C_{14}H_{25}NO$, e inferir por la relación de masa-carga impar del ion molecular (M^+ 223) que la molécula contenía nitrógeno (Espectro 33).

El espectro IR presentó absorciones en 3300, 1658, 1628 cm^{-1} (Crombie 1955) asociadas con la presencia de una amida conjugada. Por otro lado, el máximo de absorción observado en el espectro de UV (λ_{max} 259 nm) indicó la existencia de un dieno conjugado a una función amida. (Cuadro 26).

Los espectros de RMN (Cuadro 26) confirmaron que el producto natural era una amida alifática conjugada. Así el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 34), evidenció la presencia de 13 resonancias, una de las cuales correspondía al grupo carbonilo de una amida conjugada en δ_c 166.39 ppm. De acuerdo al análisis del espectro DEPT (Espectro 36), las 12 señales restantes se asignaron a cuatro carbonos olefínicos conjugados (δ_c 121.84, 141.00, 128.18 y 142.90), cinco metilenos (δ_c 32.88, 28.47, 31.30, 22.45 y 46.90), un metino alifático (δ_c 28.61) y a tres metilos (δ_c 13.99 y 20.13). A fin de satisfacer el número de carbonos requeridos por la fórmula molecular, dos de estas señales debían ser coincidentes ya que en el espectro de RMN- 1H (Espectro 35), se evidenciaron claramente señales para tres grupos metilos en δ_H 0.94, 0.91 y 0.89, las dos primeras señales aparecían como doblete ($J=6.6$ Hz), en tanto que la última resonancia se observaba como un triplete ($J= 6.6$ Hz) y era consistente con la presencia de un grupo metilo terminal en la molécula.

El espectro de RMN- 1H (Espectro 35), presentó resonancias para cuatro hidrógenos olefínicos en δ_H 5.75 (d, $J=14.77$, H-2), δ_H 7.18 (dd, $J=14.85$ H-3), δ_H 6.09 (m, H-4 y H-5); un multiplete para un metino centrado en δ_H 1.8 y señales para varios grupos metilenos.

Cuadro 26. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la Pelitorina 8.

E.M.FAB, m/z (int. rel.): (Espectro 33)

224[M⁺ +1(100)], 156 (19.56), 74 (16.30), 57 (61.95), 43 (29.34), 41 (33.69), 29 (20.65)

IR ν_{\max} (película) cm^{-1} : (Espectro 32)

3300, 3080, 2954, 2928, 1658, 1628, 996.

UV λ_{\max} EtOH, nm : 259 ($\epsilon = 22500$)

RMN-¹³C, δ (CDCl₃): (Espectro 34)

166.39 (C-1), 121.84 (C-2), 141.00 (C-3), 128.18 (C-4), 142.90 (C-5), 32.88 (C-6), 28.47 (C-7), 31.30 (C-8), 22.45 (C-9), 13.99 (C-10), 46.90 (C-1'), 28.61 (C-2'), 20.13 (C-3').

RMN-¹H; δ (CDCl₃): (Espectro 35)

5.75, d, J= 14.775, (H-2); 7.188, dd, J= 14.775, 9.75, (H-3); 6.021-6.173, m, (H-4); 6.021-6.173, m, (H-5); 2.14, dt, J= 7.2, 13.5, (H-6); 1.2-1.4, m, (H-7, H-8, H-9); 3.165, t, J= 6.45 (H-1'); 1.845-1.75, m J=6.75, (H-2'); 0.92, d, J= 6.6, (H-3'); 0.886, s, (H-10), 5.863 (N-H).

De las resonancias correspondientes a los grupos metilenos, el triplete en 3.16 era fácilmente asignable al metileno vecinal al nitrógeno del grupo amida.

El estudio detallado del espectro bidimensional homonuclear COSY, permitió evidenciar a través de los cuadros de conectividades, los fragmentos que se ilustran en la figura 8.

Mediante la integración de las estructuras parciales indicadas (Figura 8) se logró determinar la estructura total del compuesto. El conjunto de propiedades físicas y espectroscópicas para este constituyente correspondieron con los datos descritos en la literatura para la pelitorina (Yasuda *et al.*, 1981, Mizutani, *et al.*, 1980).

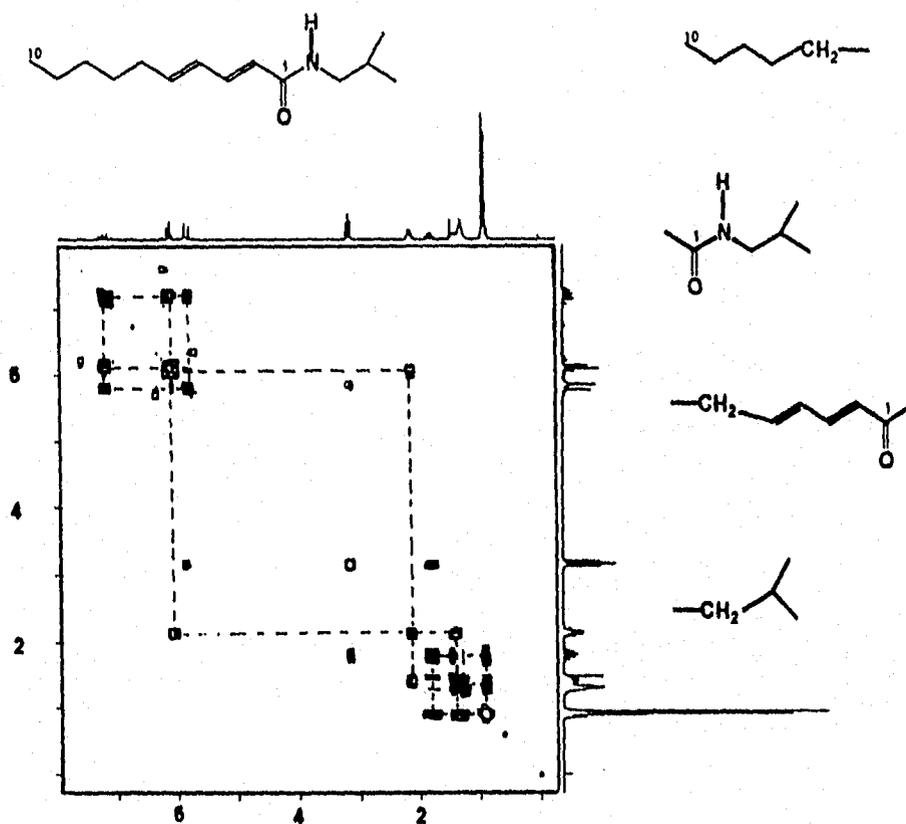


Figura 8. Espectro de RMN- ^1H 2D-COSY de la pelitorina 8

Caracterización de la asarinina. (4)

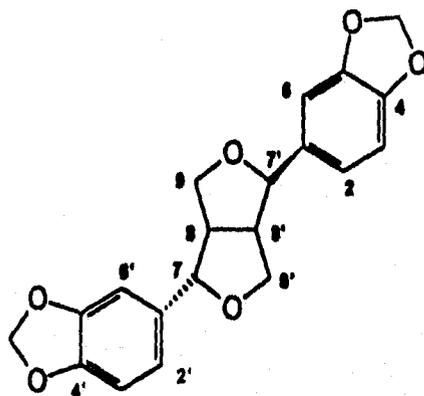
De la fracción V, obtenida durante el fraccionamiento primario, cristalizó un compuesto que fue caracterizado como la asarinina 4. Este producto se obtuvo como un polvo blanco cristalino y ópticamente activo. Sus espectros de IR y UV (236, 286 nm) (Cuadro 27) indicaron el carácter aromático del compuesto. Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas como $C_{20}H_{18}O_6$ (Espectro 38, Cuadro 27) y permitió calcular doce grados de insaturación.

El análisis detallado de los espectros de RMN (Cuadros 29 y 30), así como consideraciones de tipo quimiotaxónomico (Ayres y Loike, 1990), permitieron establecer que el producto natural era un lignano de tipo furofurano asimétricamente sustituido con dos grupos piperonilos en 7 y 7' (Ayres y Loike, 1990). Las observaciones más importantes que condujeron a esta conclusión se resumen a continuación.

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 39), presentó señales para veinte carbonos en armonía con la fórmula molecular calculada. Dos de estas señales eran fácilmente asignables a grupos metilendioxi, doce a carbonos aromáticos y seis a los carbonos de la porción furofurano. Para determinar la naturaleza de los carbonos en general se registró el espectro DEPT (Espectro 40) el cual presentó las resonancias típicas para los metinos 7, 8, 7' y 8' (δ_c 87.57, 54.61, 81.98, 50.12,) y los metilenos 9, 9' (δ_c 70.88, 69.62) de la porción furofurano.

Las señales de los grupos metilendioxi se observaron en δ_c 100.908 y 100.97; por último, se observaron señales para seis metinos aromáticos (δ_c 106.33, 146.48, 118.61, 106.49, 147.11, 119.50). La asignación de las señales anteriores eran consistentes con la presencia de seis carbonos aromáticos cuaternarios, cuatro de los cuales (δ_c 147.55, 108.73, 147.86) se encontraban unidos a los dos grupos metilendioxi.

Cuadro 27. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Asarinina 4



Asarinina 4

Formula molecular: $C_{20}H_{18}O_8$

$[\alpha]_D = -86^\circ$

p.f. 121-122 °C

E.M.I.E. m/z (int. rel): 354 [M+ (98)], 135 (48), 150 (32), 149 (100), 161 (38), 122 (20). [Espectro 38]

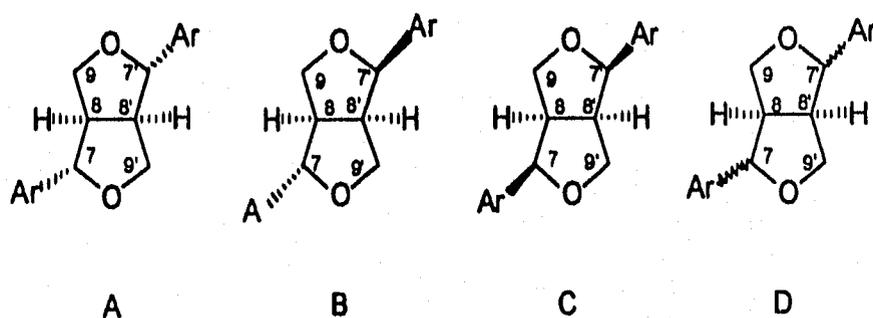
IR ν_{max} KBr, (cm⁻¹): 3100, 2866, 1858, 1722, 1620, 1488, 1370. (Espectro 37)

UV λ_{max} MeOH, nm: 236, 286

El espectro RMN-¹H (Espectro 41, Cuadro 30), también presentó similitud con los previamente descritos para los lignanos del tipo furofurano (Ayres y Loike, 1990) y confirmó la presencia de los dos grupos metilendioxi (δ_H 5.94, 5.95), seis hidrógenos aromáticos (δ_H 6.76-6.87) y las señales del núcleo furofurano (Figura 9). Con base en el análisis anterior la estructura del producto natural debía corresponder a cualquiera de los enantiómeros del isómero B [(+)-asarinina o (-)-asarinina] de la Figura 9. Las posibilidades A y C se descartaron con base en la no equivalencia de las señales de la porción furofurano, es decir entre 8 y 8' y 7 y 7'. En la Figura 9 se indican de manera comparativa los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN para el producto natural (posibilidad D) y los previamente descritos en la literatura para cualquiera de los enantiómeros de los compuestos A, B y C.

El valor negativo de la rotación óptica del producto natural permitió identificarlo como la (-)-asarinina. Este producto ha sido obtenido previamente de otras fuentes naturales. (Pelter y Ward, 1976). La determinación inequívoca de la estructura del producto 4, se realizó mediante un análisis de difracción de rayos X. En la figura 10 se muestra una proyección estereoscópica del producto natural. En la molécula, los sustituyentes en 7 y 7' se encuentran en una posición pseudo-ecuatorial y los anillos de cinco miembros de oxolano presentan una conformación de sobre ligeramente torcido.

Figura 9. Datos de desplazamientos químicos de RMN-¹³C y RMN-¹H de furofuranos del tipo sesamina . (Pelter y Ward, 1976).



Ar = piperonil

| | | | | |
|---------------|-----------------|--------------|------------------|--------------|
| H-7 | 4.75 (85.77) | 4.45 (87.53) | 4.90 (83.96) | 4.39 (87.57) |
| H-7' | | 4.85 (81.96) | | 4.82 (81.98) |
| H-8 | 3.15 (54.31) | 2.90 (54.44) | 3.15 (49.49) | 2.85 (54.61) |
| H-8' | | 3.30 (50.11) | | 3.30 (50.12) |
| H-9' β | 3.8-4.0 (71.72) | 3.35(70.92) | 3.3-3.65 (68.75) | 3.30 (69.62) |
| H-9 β | | 3.85 (69.64) | | 4.09 (70.89) |
| H-9' α | 4.2-4.4 (71.72) | 3.85 (70.92) | 3.65-4.0 (68.75) | 3.80 (69.62) |
| H-9 α | | 4.13(69.64) | | 3.80 (70.89) |

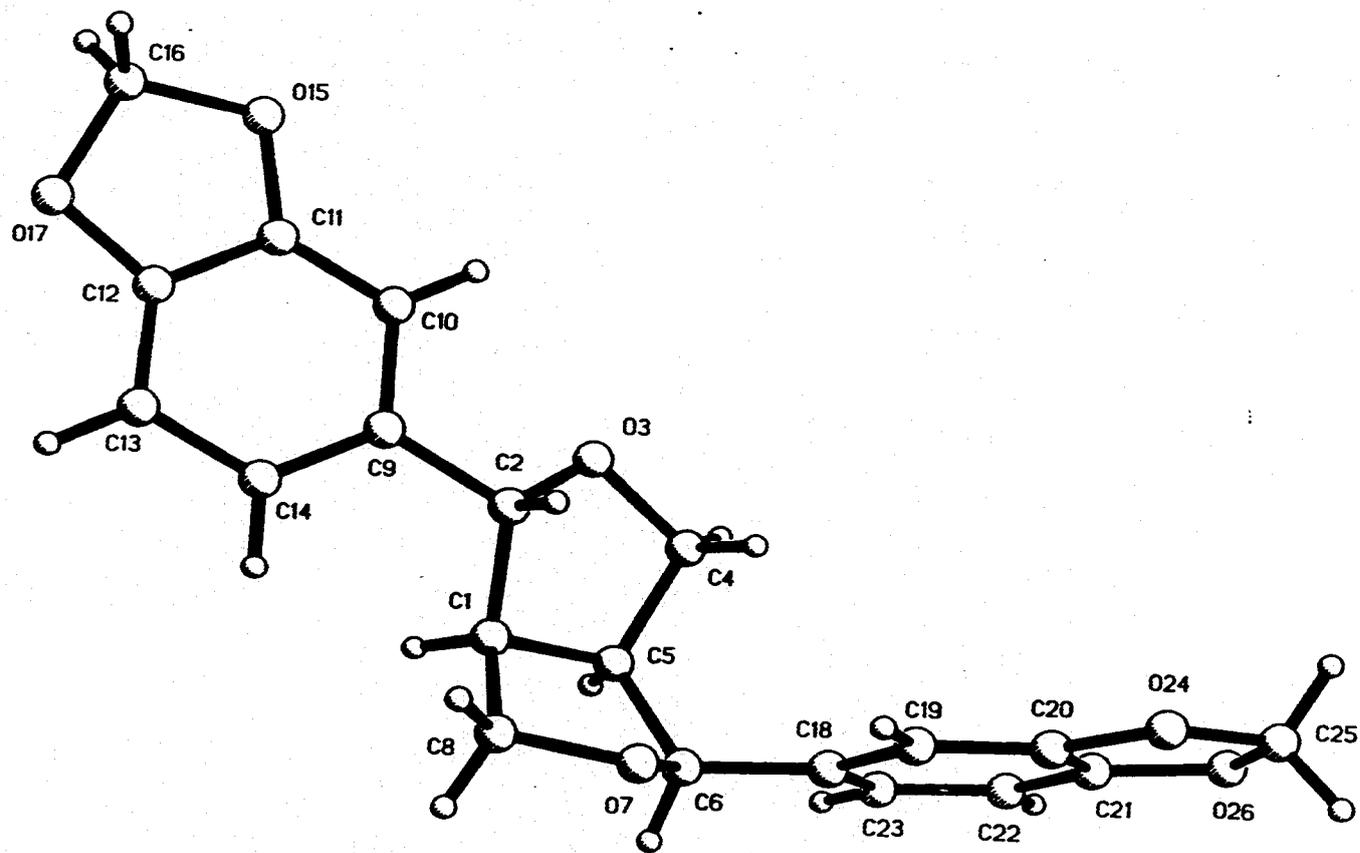


Figura 10. Proyección estereoscópica generada por rayos X de la asarinina (4).

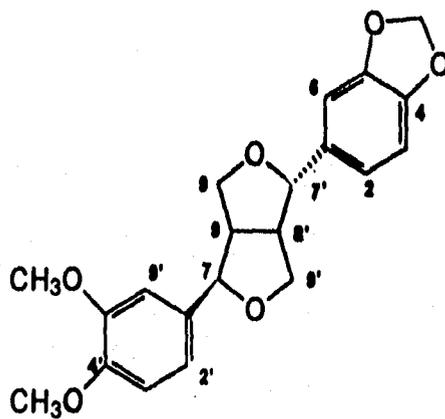
Caracterización de la fargesina (10).

El siguiente compuesto, también un lignano de tipo furofurano, se obtuvo como un sólido cristalino ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció como $C_{21}H_{22}O_6$, (Cuadro 28, Espectro 42), es decir, presentaba 16 unidades de masas más que el anterior.

El espectro de IR (Cuadro 28, Espectro 43) presentó bandas de absorción características para compuestos aromáticos, y la presencia de este núcleo aromático se corroboró también en los espectros de UV (282, 232, nm). (Cuadro 28).

Los espectros de RMN (Cuadros 29 y 30) fueron muy similares a los de la asarinina 4, y a continuación se describen las diferencias principales: el espectro de RMN- 1H (Espectro 44) presentaba una sola señal para un grupo metilendioxi (δ_H 5.95) y, en lugar de la señal para el segundo metilendioxi de la (-)-asarinina se observó una señal para dos metoxilos en δ_H 3.88. Estas observaciones sugerían que el segundo lignano era de tipo furofurano sustituido asimétricamente por un grupo piperoni y otro veratril. De nueva cuenta, la sustitución asimétrica era evidente por la falta de equivalencia de los hidrógenos H-7 y H-7' (δ_H 4.43, 4.83) y, H-8 y H-8' (δ_H 3.33, 2.87). En este caso; la diferencia estructural de los sustituyentes en 7 y 7', incrementaba el número de isómeros posibles de tres a cuatro. Los posibles isómeros se indican en la Figura 11. La comparación de los datos físicos y espectroscópicos con los previamente descritos en la literatura indicaron que el producto natural era la (-)-fargesina, (Pelter y Ward, *et al.*, 1976; Kakisawa, *et al.*, 1970; Kamikado, *et al.*, 1975; cuya estructura había sido previamente corroborada por rayos X, (Goswami *et al.*, 1991).

Cuadro 28. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Fargesina 11.



Fargesina 11

Formula molecular: $C_{21}H_{22}O_8$

$[\alpha]_D = +121^\circ$

p.f. 133-134 °C

E.M.I.E. m/z (int. rel): 370 [M^+ (100)], 135 (33), 150 (20), 149 (57), 177 (35)
[Espectro 42]

IR ν_{max} KBr, (cm⁻¹): 3100, 1590, 1505. (Espectro 43)

UV λ_{max} EtOH, nm: 282 ($\epsilon/1000$), 232 ($\epsilon/1000$)

ISOMEROS DE LA FARGESINA

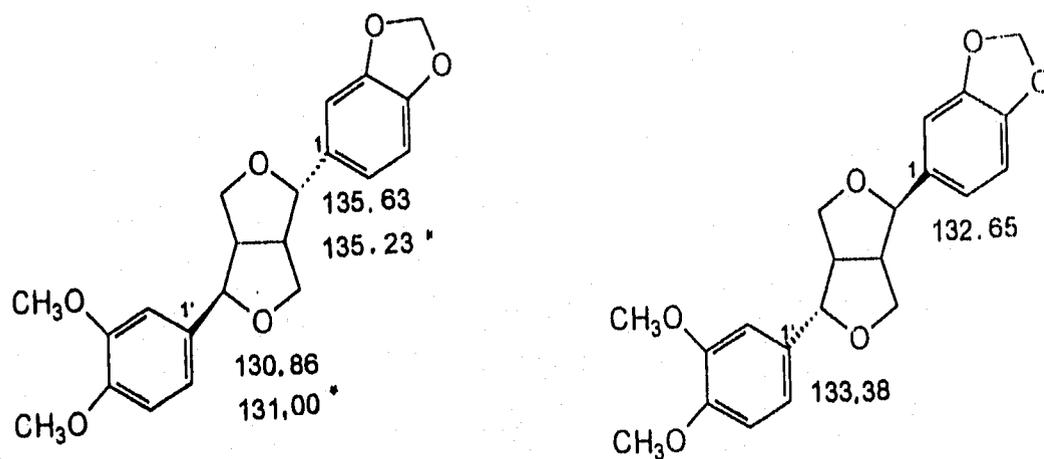


Figura 11. Valores de los desplazamientos químicos (δ) en RMN- ^{13}C de C-1 y C-1' de los isómeros de la fargesina (Pelter y Ward 1976)

* Valores experimentales de los desplazamientos químicos (δ) de la fargesina 11

Cuadro 29. Valores de los desplazamientos químicos* (δ) en la ^{13}C -RMN de los lignanos aislados de *S. perforatus*. (ppm).**

| Carbono | Asarinina 4 (Espectro 34) | Fargesina 11 (Espectro 39) |
|--------------------|------------------------------|-------------------------------|
| C-7 | 87.57 | 87.68 |
| C-7' | 81.98 | 82.06 |
| C-8 | 54.61 | 54.62 |
| C-8' | 50.12 | 50.18 |
| C-9 | 70.89 | 71.04 |
| C-9' | 69.62 | 69.74 |
| C-1 | 132.18 | 135.23 |
| C-1' | 135.06 | 131.00 |
| C-2 | 106.34 | 106.55 |
| C-2' | 108.49 | 108.15 |
| C-3 | 146.48 | 147.23 |
| C-3' | 147.11 | 147.99 |
| C-4 | 147.55 | 148.11 |
| C-4' | 147.86 | 148.94 |
| C-5 | 108.73 | 109.09 |
| C-5' | 108.73 | 111-15 |
| C-6 | 118.60 | 117.76 |
| C-6' | 119.50 | 119.55 |
| OCH ₂ O | 100.97 | 101.04 |
| OCH ₂ O | 100.90 | - |
| OCH ₃ | - | 55.94 |
| OCH ₃ | - | 55.94 |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl₃, 75 MHz

Cuadro 30. Valores para los desplazamientos obtenidos en la RMN-¹H de los lignanos del tipo de la sesamina aislados de *S. perforatus*. (ppm).**

| Protón | Asarinina 4 (Espectro 36) 300 MHz | Fargesina 11 (Espectro 40) 500 MHz |
|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| H-7 | 4.39 ^a | 4.43 ^b |
| H-7' | 4.82 ^c | 4.87 ^d |
| H-8 | 2.85 ^e | 2.88 ^h |
| H-8' | 3.30 ^h | 3.32 ^h |
| H-9 ^β | 3.30 ^h | 3.32 ^h |
| H-9 ^β | 3.80 ^h | 3.87 ^h |
| H-9' ^α | 3.80 ^h | 3.87 ^h |
| H-9 ^α | 4.09 ^f | 4.12 ^g |
| Aromaticos | 6.76-6.88 | 6.77-6.93 |
| O-CH ₂ -O | 5.94 ⁱ | 5.95 ⁱ |
| O-CH ₂ -O | 5.95 ⁱ | - |
| OCH ₃ | - | 3.88 ^j |

*desplazamientos químicos en ppm

**TMS, CDCl₃

a: d, J=7.2 Hz; b: d, J=7.0 Hz; c: d, J=5.4 Hz; d: d, J=5.5 Hz; e: dd, 7.5, 6.9 Hz; f: d, J=9.3 Hz; g: dd, J=9.5, 1.0 Hz; h: m; i: s

V. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Stauranthus perforatus*.

De acuerdo con el diseño experimental planteado en esta investigación, se realizaron una serie de ensayos biológicos, cuya finalidad fue la determinación del potencial herbicida y citotóxico de los compuestos aislados de *S. perforatus*.

V.1. Determinación del efecto fitotóxico de las cumarinas aisladas, sobre *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

En el presente inciso se describe la actividad fitotóxica de las cumarinas 2, 3, 5, 9 y 11, en un rango de concentraciones de 5 a 100 µg/ml (10^{-4} a 10^{-5} M) (Cuadro 31). Las cumarinas 5 y 3 fueron evaluadas por García (1995). Los resultados del efecto de las cumarinas sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, se ilustran en las gráficas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 y como se puede apreciar en estas, la chalepensina 3, la xantiletina 5, la amirina 9 y la chalepina 11, inhibieron de manera significativa el crecimiento de *A. hypochondriacus* a 100 µg/ml. A la concentración de 50 µg/ml, solo la chalepina demostró una actividad inhibitoria significativa. Por último, a la concentración de 5 ppm ninguna de las cumarinas demostró actividad. En las gráficas 2, 3, 4, y 5, se puede observar que la actividad fitoinhibidora fue proporcional a las concentraciones de prueba utilizadas en el bioensayo. En general, las cumarinas ensayadas no presentaron efectos inhibidores significativos sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli*, sin embargo, la amirina, 9 y la chalepina, 11, estimularon el crecimiento radicular de esta maleza a una concentración de 50 µg/ml. Con estos resultados se puede establecer el orden decreciente de actividad fitotóxica de las cumarinas evaluadas en este ensayo: xantiletina > chalepensina > chalepina > amirina > 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina.

Cuadro 31. Efecto de los compuestos aislados de *S. perforatus* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

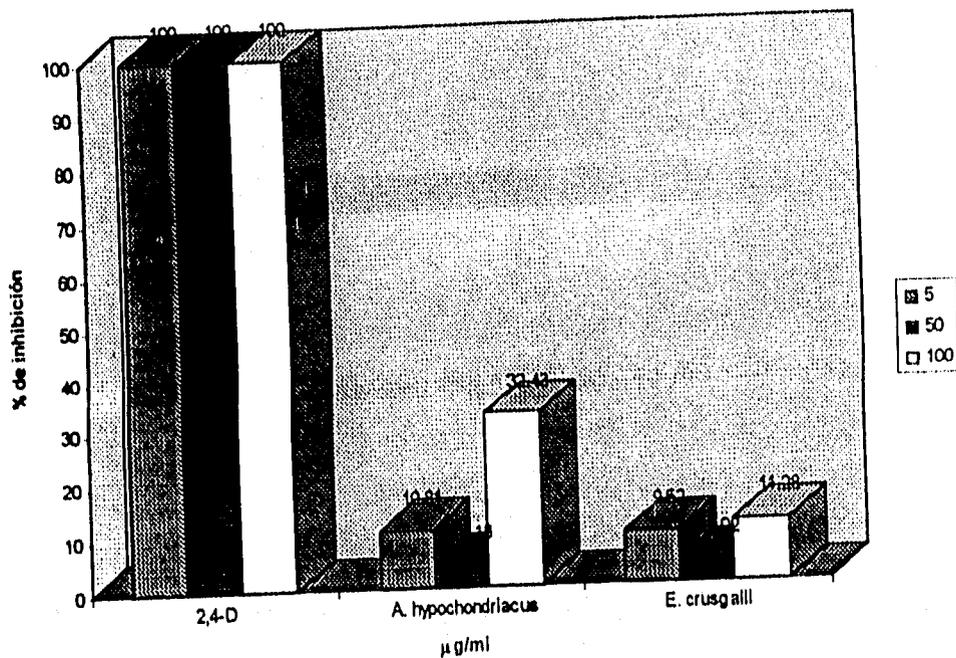
| | <i>A. hypochondriacus</i> | | | <i>E. crusgalli</i> | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------|--------------|---------------------|-------------|-------------|
| | crecimiento (mm) | | | crecimiento (mm) | | |
| | 5 µg/ml | 50 µg/ml | 100 µg/ml | 5 µg/ml | 50 µg/ml | 100 µg/ml |
| Control | 7.8 ± 0.61 | 7.8 ± 0.61 | 7.8 ± 0.61 | 15.2 ± 1.8 | 15.2 ± 1.8 | 15.2 ± 1.8 |
| xantiletina 5 | 5.81 ± 0.98 | 4.5 ± 1.56 | 0 ± 0.09* | - | - | 10.6 ± 2.1 |
| Control | 13.3 ± 1.3 | 13.3 ± 1.3 | 13.3 ± 1.3 | 13.3 ± 2.1 | 13.3 ± 2.1 | 13.3 ± 2.1 |
| asarinina 4 | - | - | 12.4 ± 1.9 | - | - | 11.9 ± 0.6 |
| chalepentina 3 | - | - | 2.92 ± 0.55* | - | - | 14.4 ± 1.97 |
| pelitorina 9 | - | - | 2.7 ± 0.7* | - | - | 7.4 ± 2.2* |
| Control | 3.67 ± 1.9 | 3.67 ± 1.9 | 3.67 ± 1.9 | 30.02 ± 2.2 | 30.02 ± 2.2 | 30.02 ± 2.2 |
| 3-(1,1-dimetilalil)- xantiletina 2 | 3.62 ± 1.7 | 3.90 ± 1.86 | 2.75 ± 1.52 | 28.7 ± 2.13 | 31.0 ± 1.84 | 25.13 ± 1.9 |
| fargesina 11 | 4.03 ± 2.2 | 3.60 ± 1.86 | 3.38 ± 1.81 | 23.25 ± 2.3 | 27.85 ± 2.2 | 25.13 ± 2.2 |
| Control | 9.82 ± 2.8 | 9.82 ± 2.8 | 9.82 ± 2.8 | 23.35 ± 2.7 | 23.35 ± 2.7 | 23.35 ± 2.7 |
| amirina 10 | 8.82 ± 1.65 | 7.47 ± 1.5 | 6.0 ± 1.7* | 20 ± 2.42 | 29.5 ± 1.89 | 14.38 ± 1.9 |
| chalepina 12 | 8.55 ± 2.1 | 5.88 ± 1.57* | 4.43 ± 1.34* | 21.63 ± 2.1 | 27.7 ± 1.97 | 20.67 ± 1.8 |

Control = AcOEt

*Valores que difieren significativamente del control (Duncan $\alpha = 0.05$). Cada cifra representa el promedio de cuatro repeticiones.

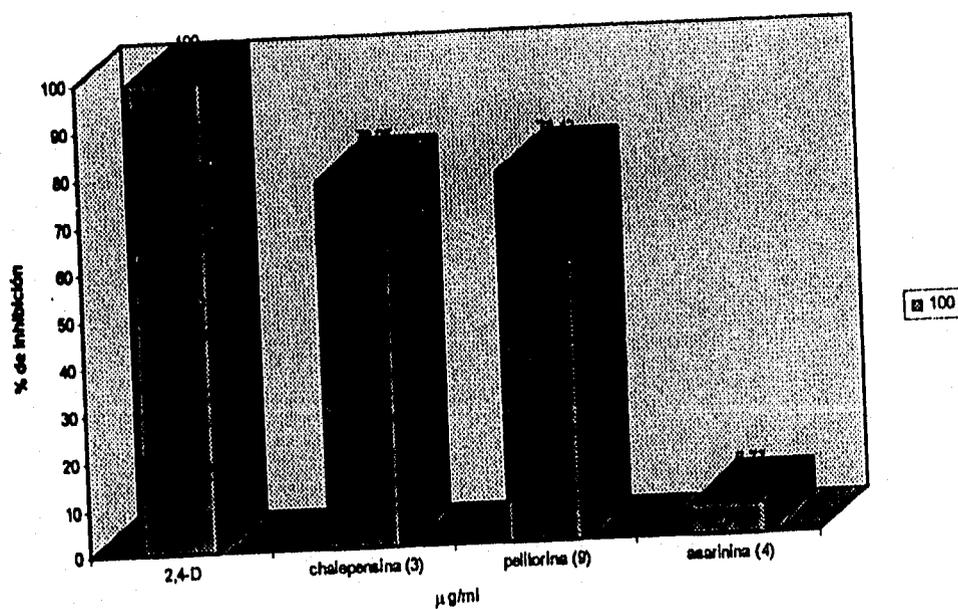
Gráfica 2

Efecto de la 3-(1',1'-dimetil- β)-xantiletina (2) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.



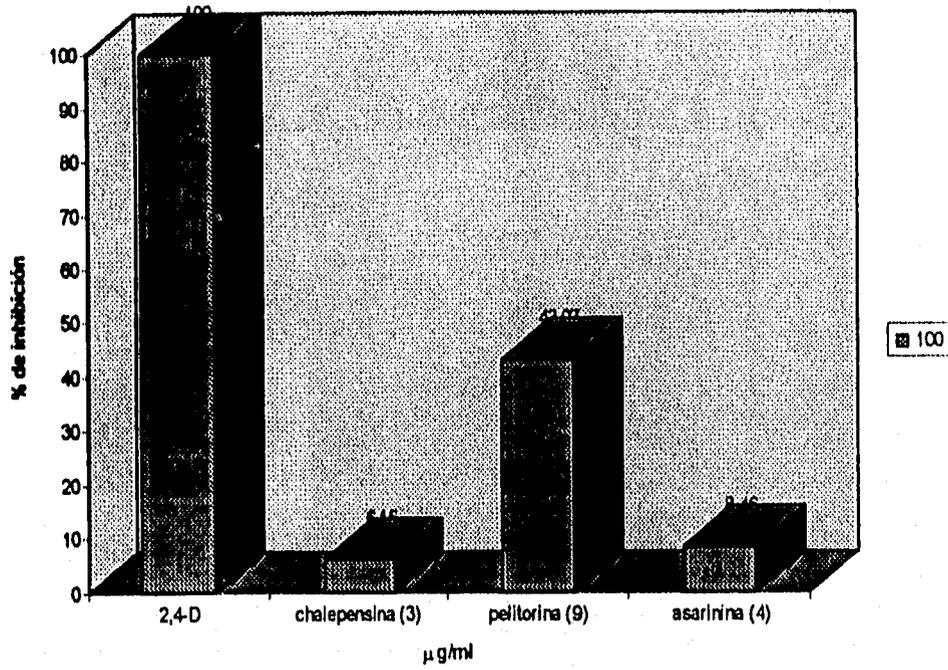
Gráfica 3

Efecto de la chalepensina (3), la pellitorina (8), y la asarinina (4) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* a 100 µg/ml (García, 1995).



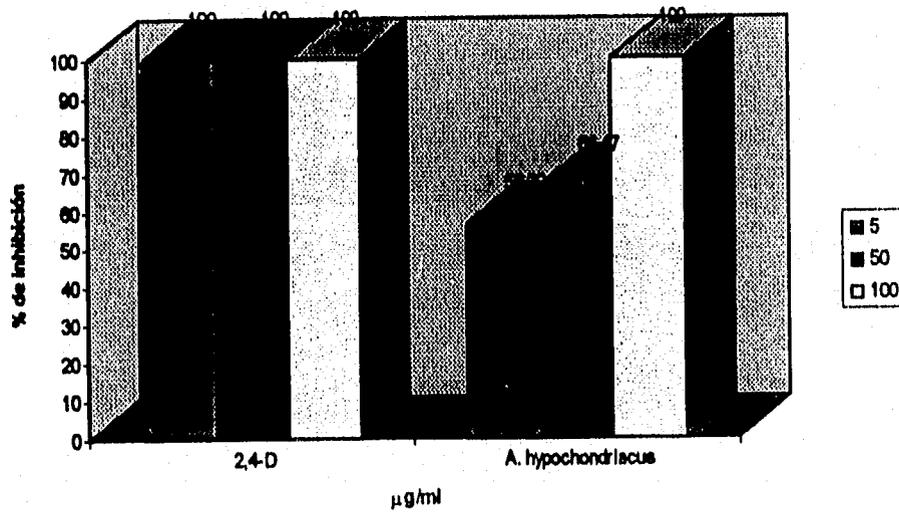
Gráfica 4

Efecto de la chalepensina (3), la pelitorina (8) y la asarinina (4) sobre el crecimiento radicular de *E. crusgalli* a 100µg/ml. (García, 1995).



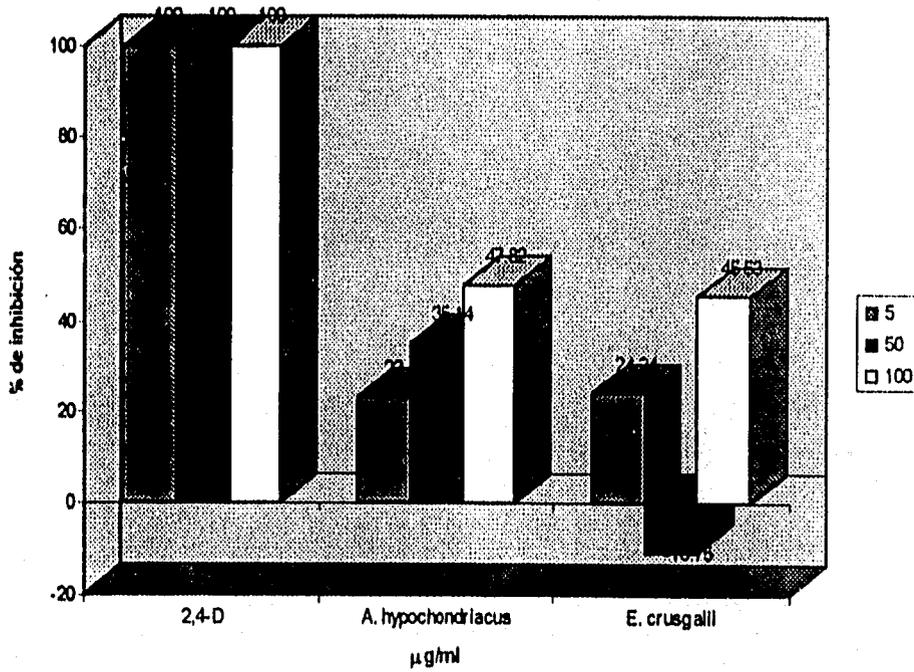
Gráfica 5

Efecto de la xantiletina (5) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*



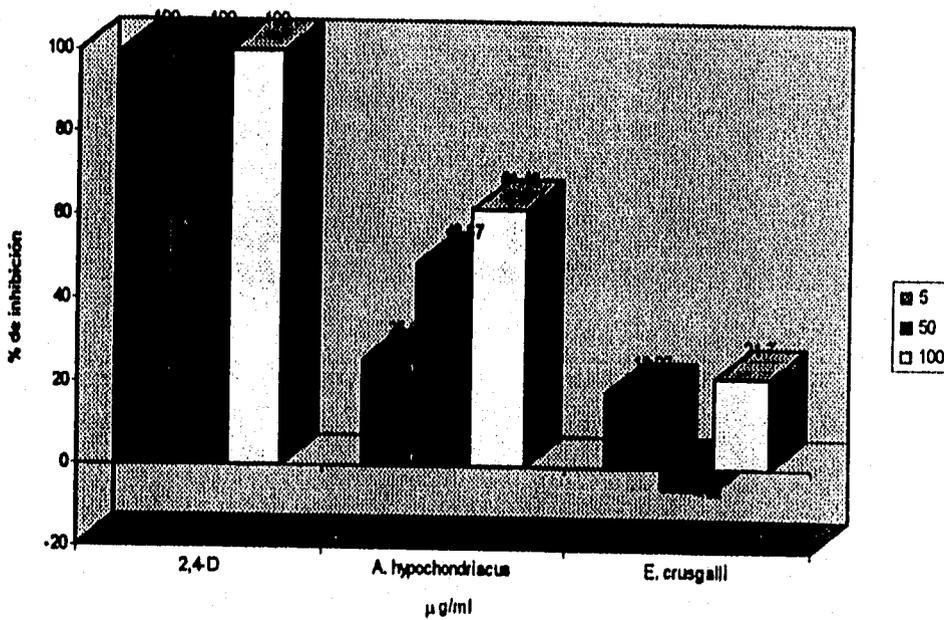
Gráfica 6

Efecto de la amirina (10) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*



Gráfica 7

Efecto de la chalepina (12) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*



Varias cumarinas han sido objeto de estudios previos en relación con algunas actividades biológicas de interés ecológico tales como la alelopática, el potencial insecticida y molusquicida (Rodighiero, 1954; Berenbaum, 1991, Zobel y Brown, 1995; Monache, 1989); la toxicidad para mamíferos (Soine, 1964; Feuer, 1974); la actividad antimicrobiana (Jurd, *et al.*, 1971; Martin *et al.*, 1966; Wu, *et al.*, 1972; Johnson, *et al.*, 1973; Beier y Oertli, 1983; Heath-Pagliuso, *et al.*, 1992; Ben-Yehoshua, *et al.*, 1992; Gottstein *et al.*, 1990), entre otras.

La actividad que presentan estos compuestos sobre la germinación y el crecimiento vegetal se ha investigado sobre diversas especies de plantas cultivadas y malezas. Varias cumarinas han demostrado un efecto estimulante o inhibidor sobre la germinación de semillas y el subsecuente desarrollo de la planta (Bennet y Bonner, 1953; Baskin *et al.*, 1967; Williams y Hoagland, 1982; Shimomura *et al.*, 1982; Bose, 1958; Brown, 1981; Macías, *et al.*, 1993). Así Macías y colaboradores (1993), demostraron el efecto de diez cumarinas en soluciones acuosas a concentraciones de 10^{-4} - 10^{-9} M sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Lactuca sativa*. Los ensayos se realizaron con: piranocumarinas (xantiletina, xantoxiletina, luvangetina, donatina y alloxantoxiletol), furanocumarinas (bergapteno, xanthotoxina e imperatorina) y cumarinas simples (5,7-dihidroxicumarina y 7,8-dihidroxicumarina). Con base en los resultados obtenidos, se realizó un estudio de relación estructura-actividad y se observó que la presencia de una función oxigenada en C-8 disminuye el efecto sobre la germinación en las furano- y piranocumarinas, mientras que los sustituyentes en C-5 no producen cambios significativos en la actividad.

El efecto de la inhibición de las furanocumarinas, sobre la germinación, a una concentración de 10^{-4} M es más pronunciado que el de las piranocumarinas y cumarinas simples.

Sin embargo, la actividad de las piranocumarinas xantiletina y luvangetina (-78% y -67%, respectivamente) es comparable al demostrado por el bergapteno y la xantotoxina (-87% y -82%) (Macías, *et al.*, 1993).

En la presente investigación, la xantiletina **5** a una concentración de 100 µg/ml (4×10^{-4} M) inhibió en un 100% el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*, siendo éste el compuesto de prueba que desarrolló el mayor potencial inhibitorio en este bioensayo.

También, las cumarinas han demostrado efectos promotores del crecimiento vegetal principalmente a bajas concentraciones. Así la escopoletina y la 4-hidroxycumarina, estimulan la germinación de *Striga asiática* (Brown, 1981). La imperatorina demostró una estimulación sobre el crecimiento radicular de *L. sativa* (Macías, *et al.*, 1993). De manera análoga, la amirina **9** y la chalepina **11** aisladas de *S. perforatus*, estimularon el crecimiento radicular de *E. crusgalli* a 50 µg/ml.

Por último, cabe mencionar que algunas cumarinas simples, furanocumarinas y piranocumarinas ejercen su actividad fitotóxica por inhibición del metabolismo en mitocondrias y/o en cloroplastos (Moreland, 1980). Recientemente; se demostró que la 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, actúa como un inhibidor de la transferencia de energía en cloroplastos aislados de espinaca (Calera *et al.*, 1995).

V.1.1. Efecto fitotóxico de la amida pelitorina (8) y los lignanos asarinina (4) y fargesina (10).

El efecto regulador del crecimiento vegetal de la amida pelitorina **8** y el lignano asarinina **4** fueron investigados por García (1995). Los resultados se ilustran en las gráficas 3 y 4 (Cuadro 31); y como se puede observar el compuesto **8** fue activo contra las dos malezas de prueba a una concentración de 100 µg/ml; siendo la especie más sensible *A. hypochondriacus*. La asarinina **4** no afectó de manera significativa el crecimiento radicular de ninguna de las malezas de prueba.

En el presente estudio se evaluó el efecto fitotóxico de la fargesina 10 (gráfica 8) (Cuadro 31) sobre *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*, y al igual que la asarinina éste lignano no afectó significativamente el crecimiento de dichas malezas a las concentraciones ensayadas.

Se ha visto que los lignanos juegan un papel importante en la regulación del crecimiento vegetal. En común con otros compuestos fenólicos, incluyendo al ácido cinámico y los ácidos orto y para-cumarínicos, la inhibición que ellos ejercen sobre la germinación de semillas, es el resultado de la interferencia que causan en el transporte de aminoácidos y la síntesis de proteínas (Van Sumere *et al.*, 1972).

Venkata y colaboradores(1979) estudiaron el efecto de furofuranos sobre la germinación de tres especies de semillas y encontraron que la fargesina (50-200 µg/ml) y la sesamina (50-200 µg/ml) retardan considerablemente la germinación del cacahuete y del pepino. La fargesina a 200 ppm reduce la germinación del cacahuete a 2% y a 50 ppm estimula en un 80% la germinación del arroz.

V.2 Determinación de la toxicidad de los compuestos obtenidos de *S. perforatus* contra el crustáceo *A. salina*.

Los resultados de la evaluación contra *A. salina* se presentan en el Cuadro 32. Como se puede observar en éste todos los compuestos fueron tóxicos contra el crustáceo con excepción de la cumarina xantiletina 5 (CL₅₀ =510.64 ppm) y los lignanos asarinina 4 (CL₅₀ > 1000 ppm) y fargesina 11 (CL₅₀ =315.49 ppm).

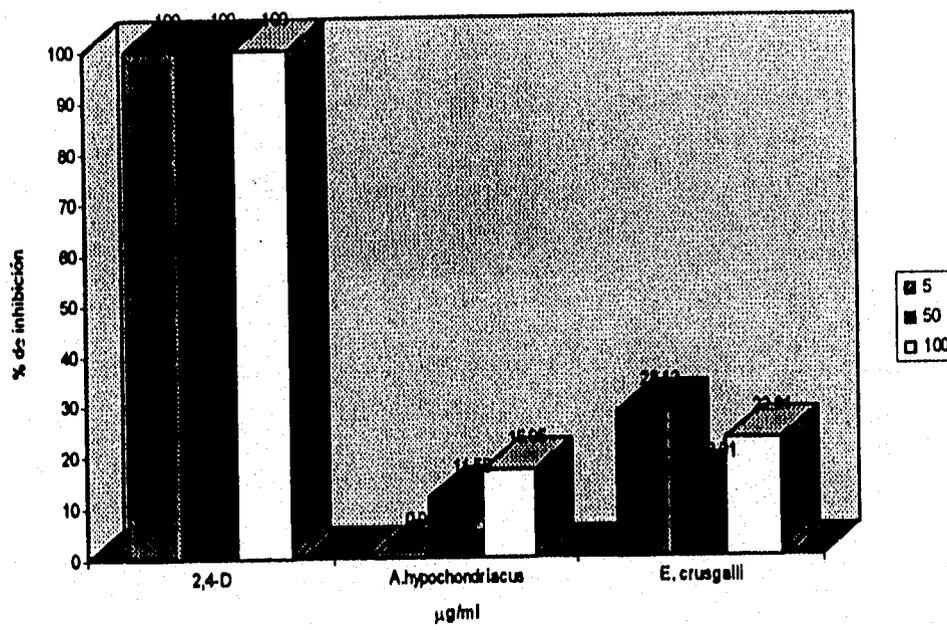
Cuadro 32. Efecto de los compuestos aislados de *S. perforatus* sobre *A. salina*.

| COMPUESTO | 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina 2 | Chalepensina 3 | Asarinina 4 | Xantiletina 5 |
|------------|-------------------------------------|----------------|-------------|---------------|
| CL50 µg/ml | 2.58 | 36.52 | >1000 | 510.64 |

| COMPUESTO | Pelitorina 8 | Amirina 9 | Fargesina 10 | Chalepina 11 |
|------------|--------------|-----------|--------------|--------------|
| CL50 µg/ml | 129.86 | 33.46 | 315.49 | 52.07 |

Gráfica 8

Efecto de la fargesina (11) sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*



Por otra parte, se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de algunos de los compuestos aislados en el presente estudio (Cuadro 33). En el caso de las cumarinas ensayadas, únicamente la chalepensina presentó una actividad citotóxica apreciable en contra de la línea celular HT-29; ya que el valor de la DE_{50} obtenido (3.47 $\mu\text{g/ml}$) fue menor de 4 $\mu\text{g/ml}$.

Ninguna de las cumarinas obtenidas en el estudio ha sido evaluada en contra de la líneas celulares indicadas en el Cuadro 33.

Previamente, González, y colaboradores (1977) describieron la actividad citostática de dieciséis cumarinas aisladas de varias especies de rutáceas, y realizaron un estudio acerca del mecanismo de acción y la relación estructura-actividad biológica de los compuestos ensayados.

Así mismo, Uwaifo (1984) realizó una serie de investigaciones relacionadas con la mutagenicidad de algunas cumarinas sobre seis cepas de *Salmonella typhimurium* (TA92, TA94, TA97, TA98, TA100, TA102). En este ensayo se evaluaron siete cumarinas: la imperatorina, la heraclenina, la xantotoxina, la marmesina, la chalepina, la oxipeucedanina y la esculina. De acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo cualitativo con las cepas de *S. typhimurium*, la imperatorina y la marmesina fueron las únicas cumarinas mutagénicas en todas las cepas probada con la excepción de TA94 y TA102. La chalepina mostró una actividad moderada sobre las cepas TA98 y TA100.

Se observó también que para la actividad mutagénica era importante la presencia de los dobles enlaces $\Delta 2',3'$ en el anillo de furano y $\Delta 4,3$ -en el anillo α -pirona, ya que estos enlaces están involucrados en la formación de enlaces covalentes con el ADN en la presencia de luz UV (Cole , 1971; Rodighiero *et al.*, 1970; Scott *et al.*, 1976; Song y Gordon, 1970 y Song, *et al.*, 1971).

La amida pelitorina 8 demostró también un efecto citotóxico moderado contra las líneas celulares HT-29, A-498 y PACA-2 (Cuadro 31).

Cabe hacer notar que este constituye el primer trabajo acerca de las propiedades fitotóxicas y citotóxicas del compuesto 8.

En relación a la actividad citotóxica de los lignanos (Cuadro 33), la asarinina 4 no presentó una actividad citotóxica significativa en las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Cuadro 33. Actividad citotóxica *in vitro* de algunos compuestos aislados de *S. perforatus*.

| COMPUESTO | LINEA CELULAR CE ₅₀ (µg/ml) | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| | A-549 | MCF-7 | HT-29 |
| chalepensina 3 | 7.71 | 5.67 | 3.47 |
| asarinina 4 | 21.17 | 71.00 | 70.83 |
| xantiletina 5 | 79.75 | 18.36 | 47.41 |
| pelitorina 8 | 16.27 | 9.29 | 3.53 |
| amirina 9 | 27.48 | 46.86 | 34.79 |
| 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina 2 | * | * | * |
| fargesina 10 | * | * | * |
| chalépina 11 | * | * | * |
| Adriamicina | 3.22x10 ⁻² | 2.04x10 ⁻¹ | 4.21x10 ⁻² |

| COMPUESTO | LINEA CELULAR CE ₅₀ (µg/ml) | | |
|-------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| | A-498 | PC-3 | PACA 2 |
| Chalepensina 3 | 9.47 | 17.78 | 5.20 |
| Asarinina 4 | 50.85 | 11.42 | 8.73 |
| Xantiletina 5 | 64.78 | 45.19 | 5.15 |
| Pelitorina 8 | 3.88 | 4.81 | 2.21 |
| Amirina 9 | 34.11 | 37.88 | 37.01 |
| 3-(1',1'-dimetilalil)-xantiletina 2 | * | * | * |
| fargesina 10 | * | * | * |
| chalépina 11 | * | * | * |
| Adriamicina | 3.48x10 ⁻² | 2.41x10 ⁻¹ | 1.20x10 ⁻² |

* en proceso de evaluación

De acuerdo a los estudios biológicos realizados por García (1995), las raíces de *S. perforatus* demostraron un efecto insecticida potencial al afectar el índice de sobrevivencia del insecto *Sitophylus zeamais*. Este efecto podría estar relacionado con la presencia de las cumarinas y de la pelitorina, aisladas en el presente estudio. El efecto insecticida de la pelitorina (Cremlyn 1991; Kubo et al., 1984; Candy et al., 1993) y el efecto inhibidor del crecimiento de insectos de numerosas furanocumarinas (Klocke, et al., 1989) se encuentra bien documentado en la literatura. También, se ha descrito que los lignanos de tipo furofurano con grupos metilendioxi pueden provocar un efecto sinérgico sobre ciertos insecticidas (Haller et al., 1942). La coexistencia de estos compuestos en *S. perforatus* podría explicar las propiedades insecticidas del polvo de la raíz.

La pelitorina y otras isobutilamidas han sido aisladas en múltiples ocasiones de plantas de la familia Compositae y Rutacea (Jacobson, et al., 1971; Oriowo, 1982). Entre las actividades biológicas demostradas por este tipo de compuestos destacan las propiedades anestésicas locales. Algunas de las isobutilamidas incluyendo la pelitorina presentan actividad tóxica y provocan la parálisis de insectos, especialmente cuando son aplicadas tópicamente a varias especies de coleópteros y dípteros (Su y Horvart, 1981; Miyakado, et al., 1979). Kubo y colaboradores (1984) investigaron el efecto de isobutilamidas naturales y sintéticas sobre insectos y caracoles. De los compuestos puros se obtuvo el valor de la dosis efectiva DE_{50} . Los compuestos fueron evaluados sobre cuatro especies de larvas de importancia agrícola *Pectinophora gossypiella*, *Heliothis virescens*, *H. zea* y *Spodoptera frugiperda* (Chan et al., 1978; Kubo y Klocke, 1983).

La amida pelitorina fue el compuesto más activo de las amidas aisladas especialmente en contra de *Pectinophora gossypiella*, mientras que el compuesto sintético más activo fue el isómero cis de la fagaramida. Kubo y colaboradores (1984) probaron también el efecto de las isobutilamidas en contra del mosquito *Culex pipiens* y el caracol *Biomphalaria glabratus*. La amida más tóxica en el bioensayo con el insecto *Culex pipiens* fue la pelitorina con un valor de $CL_{100} = 5 \mu\text{g/ml}$.

La pelitorina es además tóxica para *Tenebrio molitor* (Sandam y Boger, 1982). Trabajos previos con extractos de varias especies de plantas que contenían isobutilamidas, demostraron que los extractos fueron activos contra las larvas del mosquito (Jacobson y Crosby, 1971; Srivastava *et al.*, 1982). En otras investigaciones, algunas isobutilamidas alifáticas insaturadas han demostrado una actividad molusquicida en contra de *Physa occidentalis* (Johns *et al.*, 1982).

Los efectos insecticidas de las amidas indican que estos compuestos podrían tener una acción neurotóxica (Hatakoshi *et al.*, 1984; Hatakoshi *et al.*, 1985). Los potenciales espontáneos de 1 mV o menos se conocen como MEPSPs (potenciales postsinápticos excitadores) y se producen a través de las fibras inervadas multiterminales de los insectos. Las amidas del tipo de la pelitorina frecuentemente afectan la frecuencia de descarga y la amplitud de tales potenciales (Piek, 1985; Blade *et al.*, 1985).

Con relación a las cumarinas, las investigaciones de Zangerl y Berenbaum (1993), han demostrado inequívocamente la relevancia de ciertas cumarinas en el sistema de defensa de las plantas. En dicho trabajo, se describe que la mayoría de los individuos de la especie *Pastinaca sativa* que sufrieron de un ataque fuerte de larvas del insecto *Depressaria pastinacella* contenían concentraciones bajas de furanocumarinas en comparación con las plantas que no fueron atacadas.

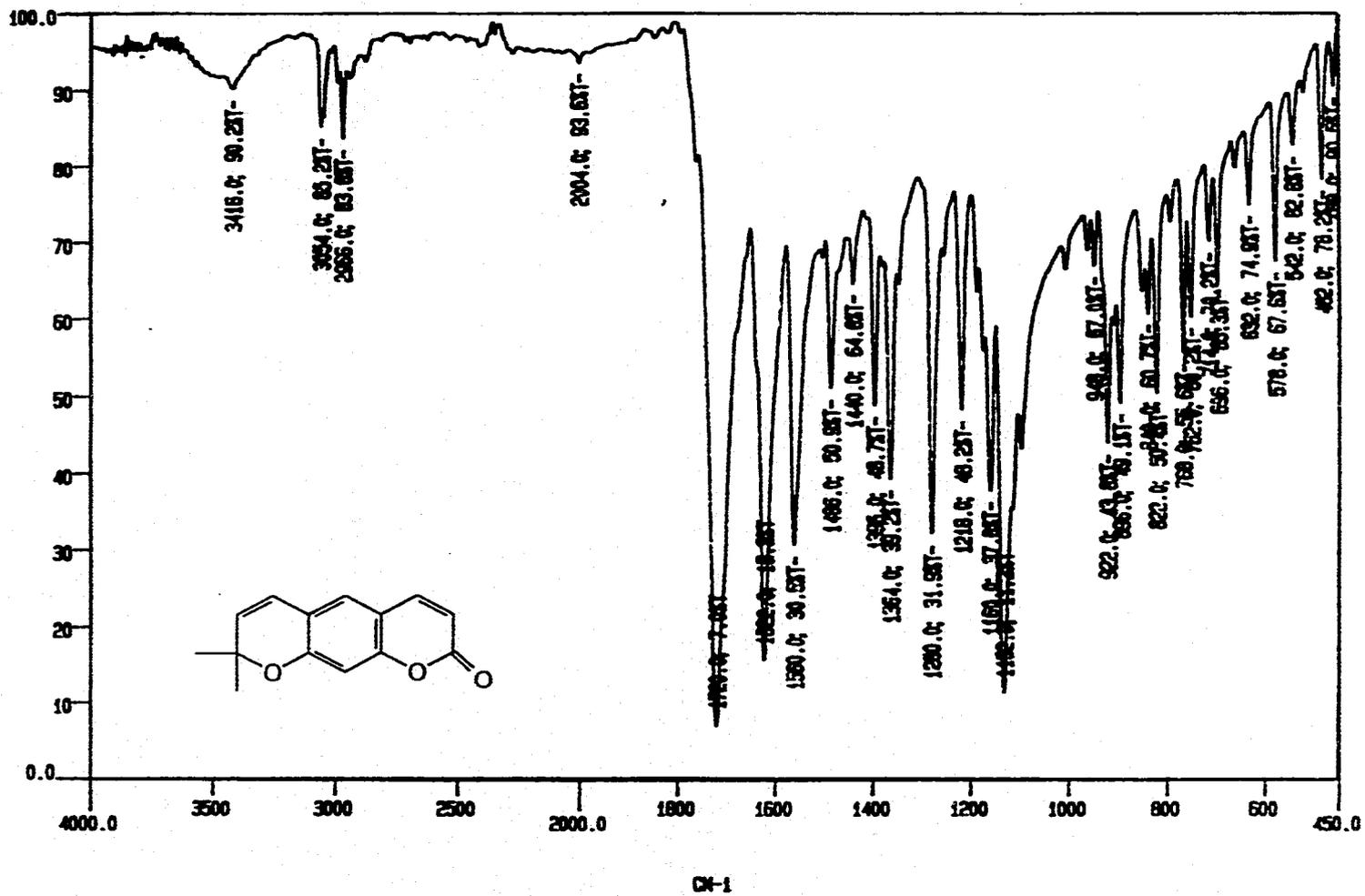
De manera adicional, numerosos estudios han permitido demostrar el efecto fagoinhibidor y tóxico de varias furanocumarinas, piranocumarinas y cumarinas simples para diversos insectos (incluyendo la xantotoxina, la isopimpinellina y el bergapteno) (Berenbaum, 1978, Escoubas *et al.*, 1992; Gebreyesus y Chapya, 1983; Klocke *et al.*, 1989; Luthria *et al.*, 1989; Muckensturm *et al.*, 1981; Yajima *et al.*, 1977; Yajima y Munakata, 1979; Johnson, *et al.*, 1973; Hadacek, *et al.*, 1994).

Las cumarinas presentan un amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas debido al hecho de que estos compuestos son parte importante del sistema de defensa en las plantas. El estudio de las cumarinas lineales, que son moléculas tricíclicas planas, ha sido de especial interés debido a su capacidad para intercalarse en las moléculas de ADN. Posteriormente, por un proceso de irradiación con luz UV, reaccionan con las bases pirimídicas para formar mono o biaductos, dependiendo del tipo de molécula (Towers, 1984). Las furanocumarinas tienen además la capacidad de reaccionar con proteínas (Cadet *et al.*, 1990). Los efectos tóxicos que se presentan después de la ingestión y el tratamiento con luz UV de furanocumarinas, tales como la xantotoxina están bien documentados (Amason *et al.*, 1992). En relación a estas aseveraciones, existen especies de insectos adaptados a las plantas que contienen furanocumarinas, ya que han desarrollado diversas estrategias tanto fisiológicas como de comportamiento contra fitoquímicos fotoactivos (Amason *et al.*, 1992).

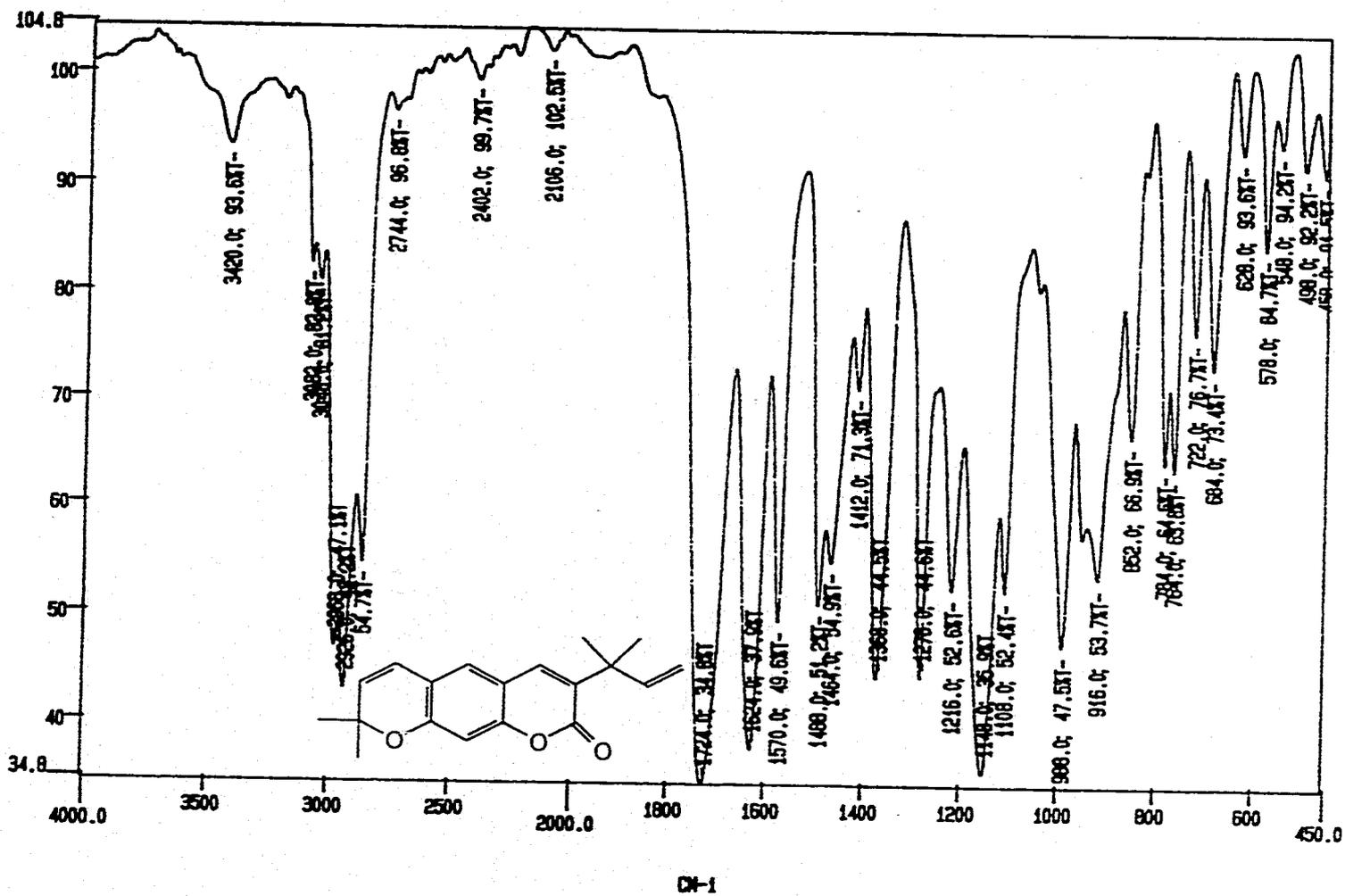
VI. RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto clorofórmico-metanólico de *Stauranthus perforatus*, utilizando como bioensayos la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* y el efecto sobre el crecimiento radicular de las malezas *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, permitió el aislamiento y caracterización de seis cumarinas (xantiletina 5, 2'-isopropil-soraleno 6, chalepensina 3, 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2, amirina 9 y chalepina 11), dos lignanos (asarinina 4 y fargesina 10), una amida (pelitorina 8) y de un sesquiterpeno (4,5-epoxi- β -cariofileno 1).
2. Las cumarinas amirina y chalepina evaluadas en el presente estudio demostraron una actividad inhibidora significativa a 100 $\mu\text{g/ml}$ sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. En un estudio paralelo al presente, García (1995) demostró que la pelitorina, la xantiletina, y la chalepensina inhibieron el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*. La pelitorina demostró una actividad inhibidora del crecimiento vegetal también en contra de *Echinochloa crusgalli*.
3. La chalepensina y la pelitorina demostraron un efecto citotóxico sobre la línea celular HT-29, la pelitorina presentó también un efecto citotóxico moderado sobre las líneas celulares A-498 y PACA-2.
4. La presencia de la amida pelitorina en la planta podría estar asociada con el efecto anestésico local que se le atribuye a las raíces de *S. perforatus* en la medicina popular.
5. La presencia de la pelitorina y la asarinina podría estar correlacionada con el efecto insecticida demostrado por las raíces de *S. perforatus*.
6. La especie *Stauranthus perforatus* es una fuente potencial de compuestos con propiedades insecticidas y reguladoras del crecimiento vegetal.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

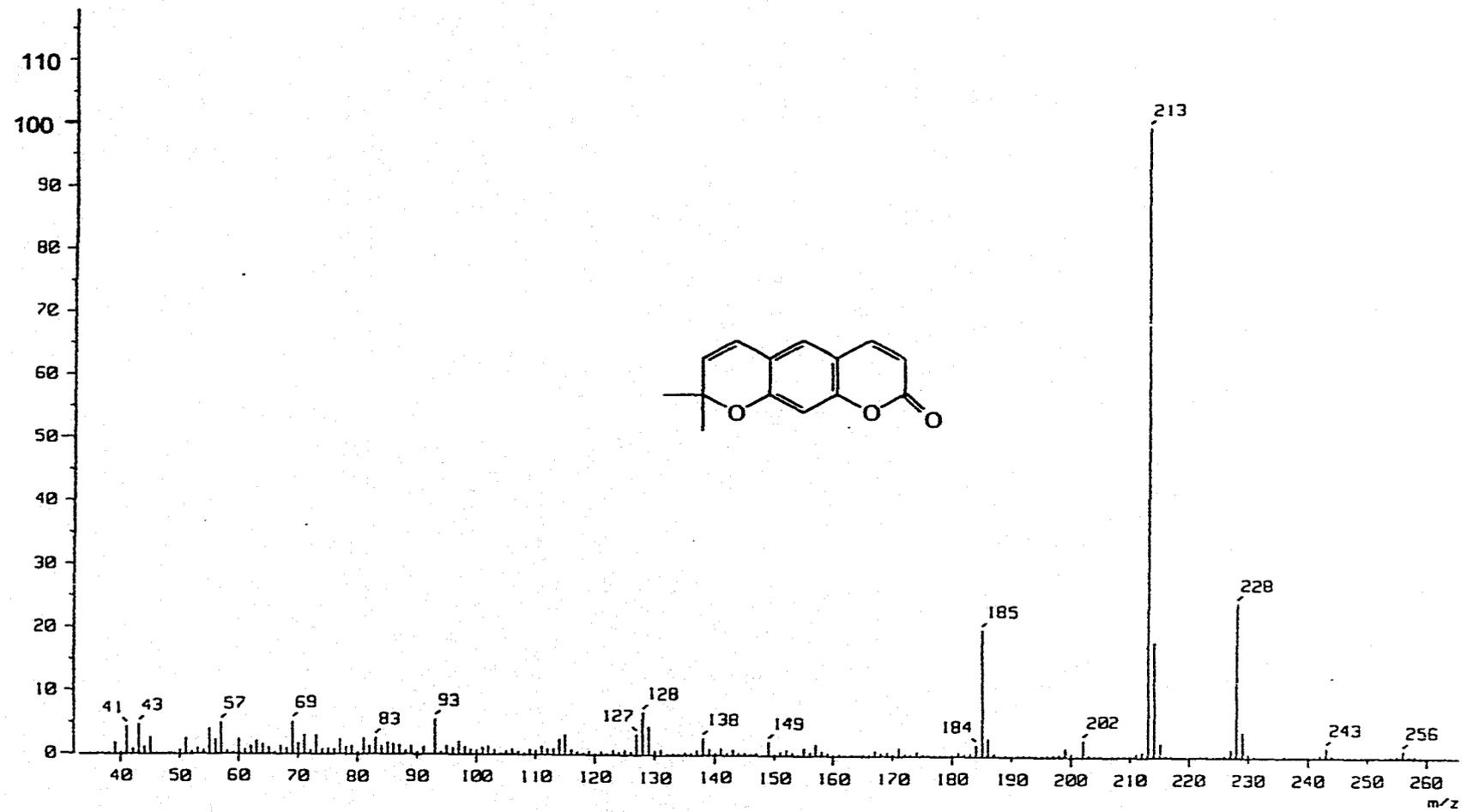


Espectro 1. Espectro de IR de la xantiletina 5.



Espectro 2. Espectro de IR de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.

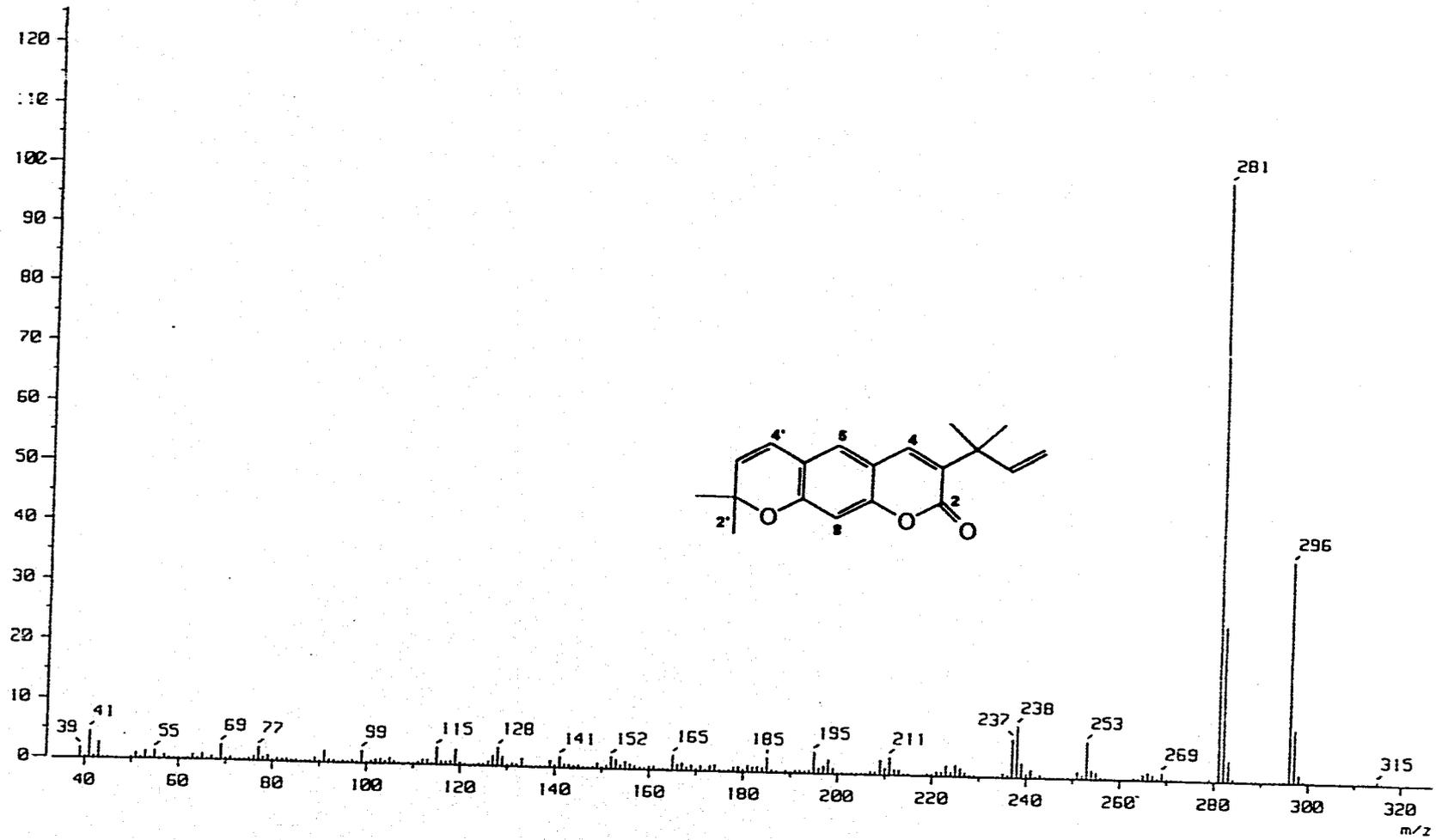
Ion Mode : EI+



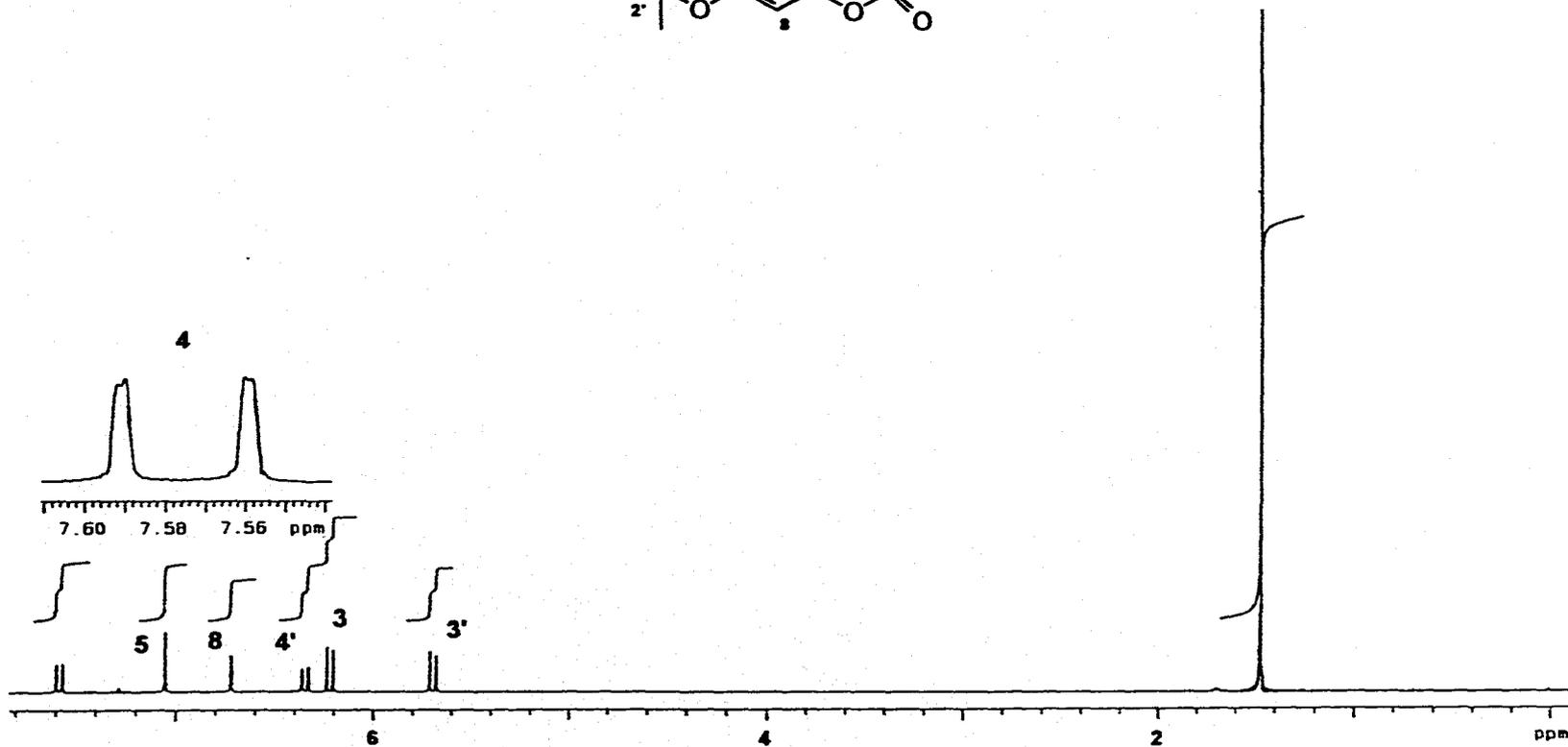
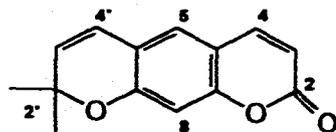
82

Espectro 3. Espectro de masas de la xantiletina 5.

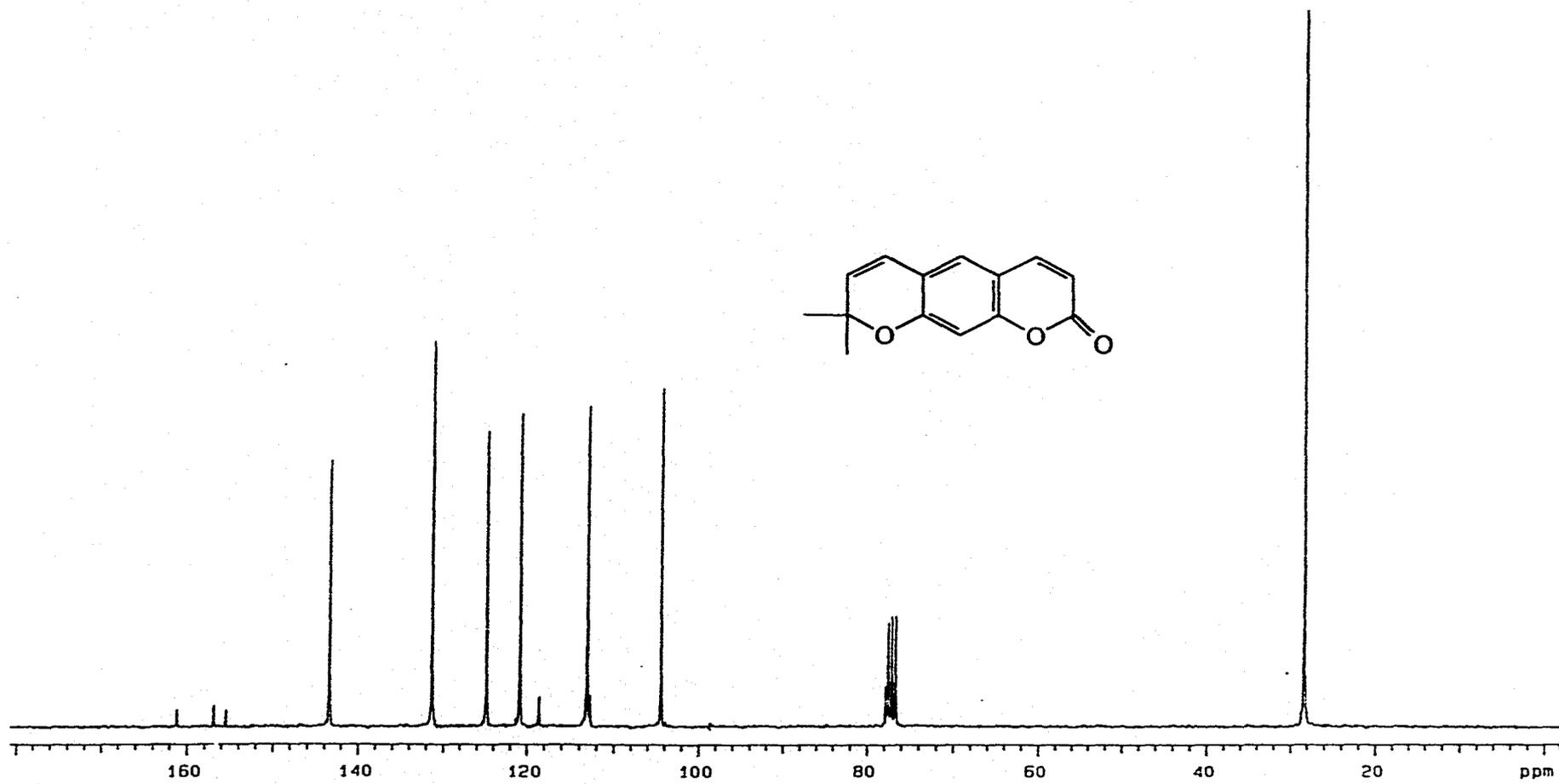
Ion Mode : EI+



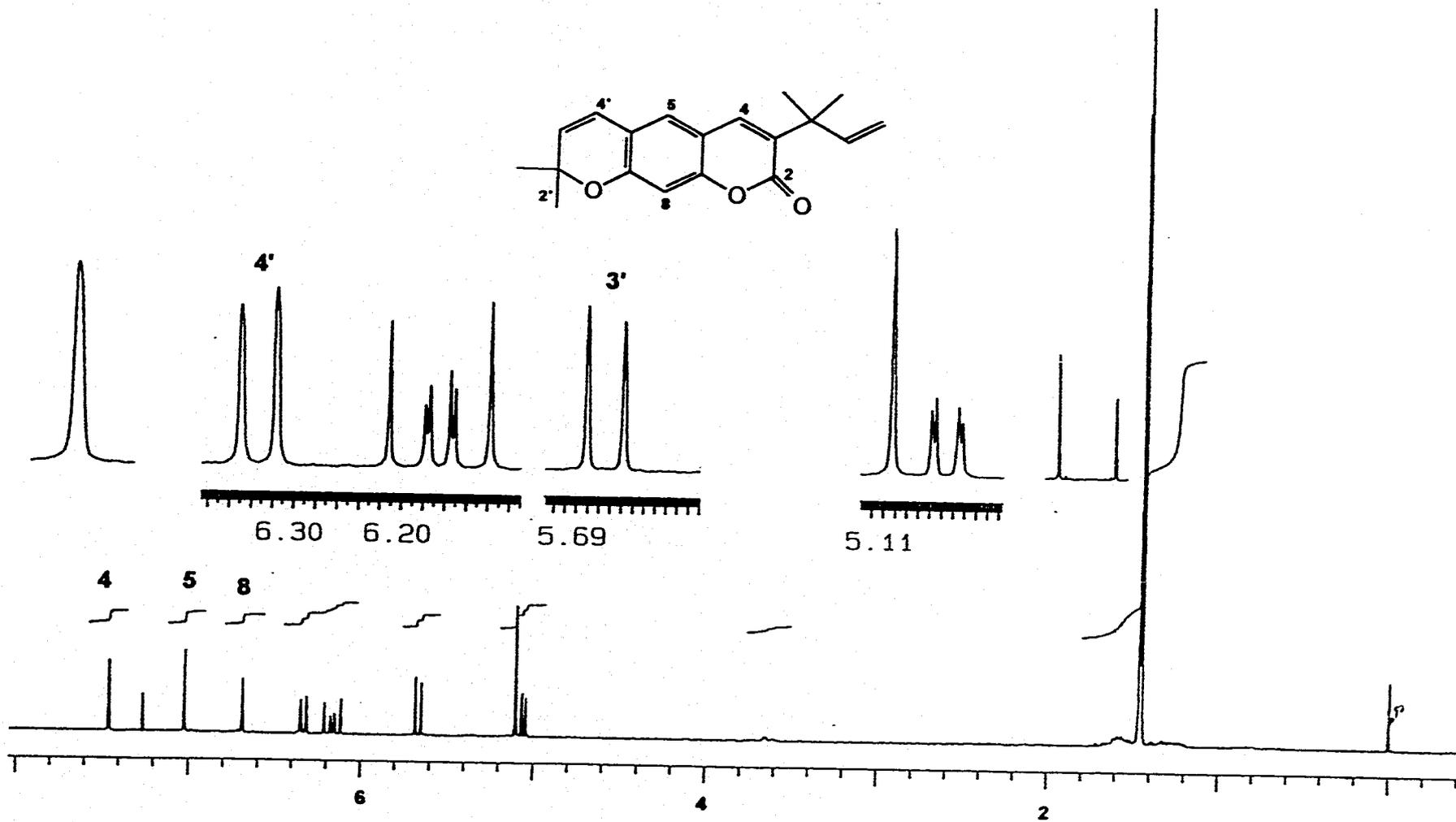
Espectro 4. Espectro de masas de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.



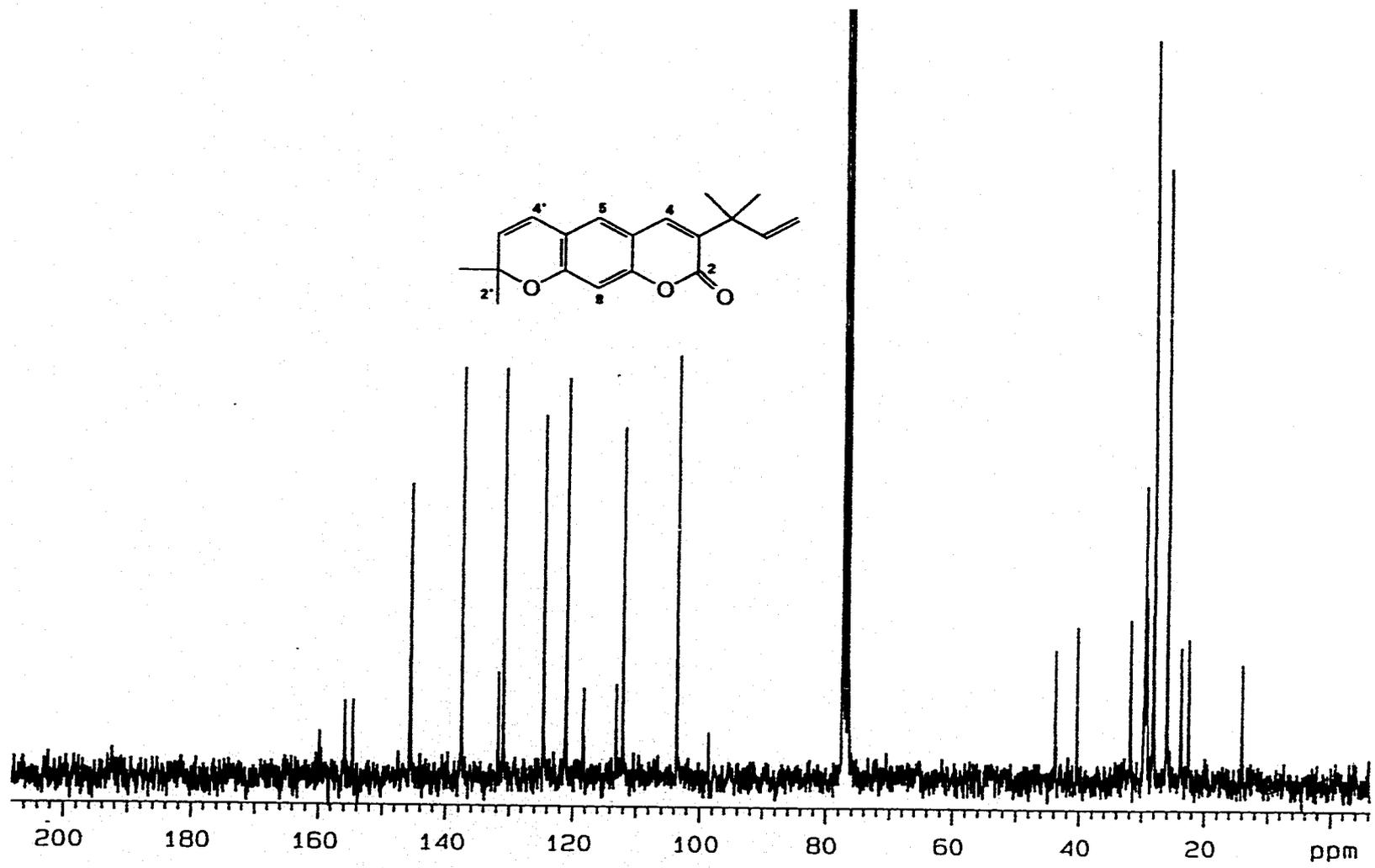
Espectro 5. Espectro de RMN- ^1H de la xantiletina 5.



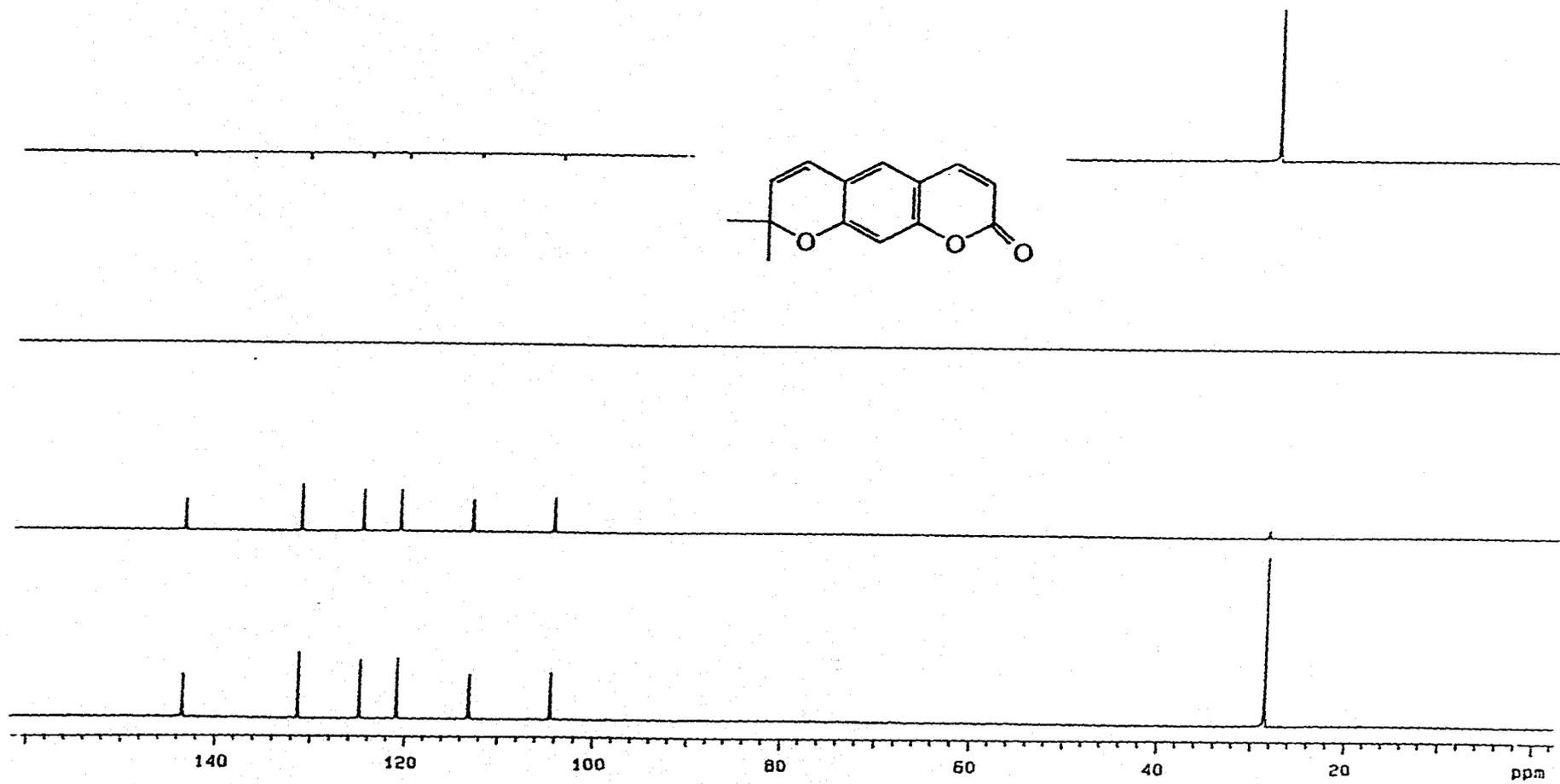
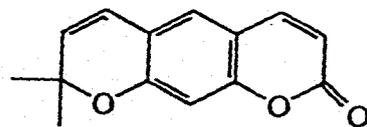
Espectro 6. Espectro de RMN-¹³C de la xantiletina 5.



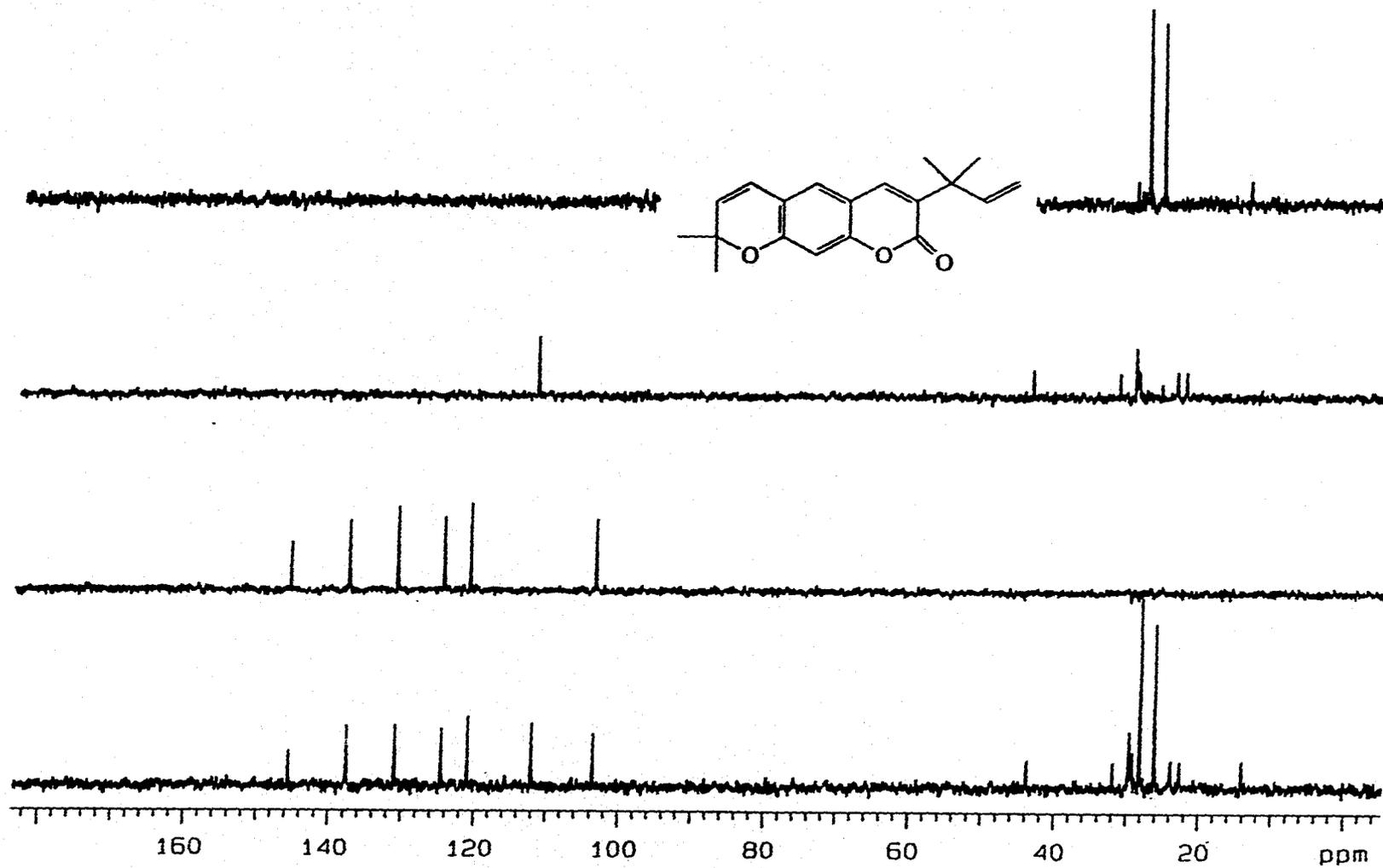
Espectro 7. Espectro de RMN-¹H de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.



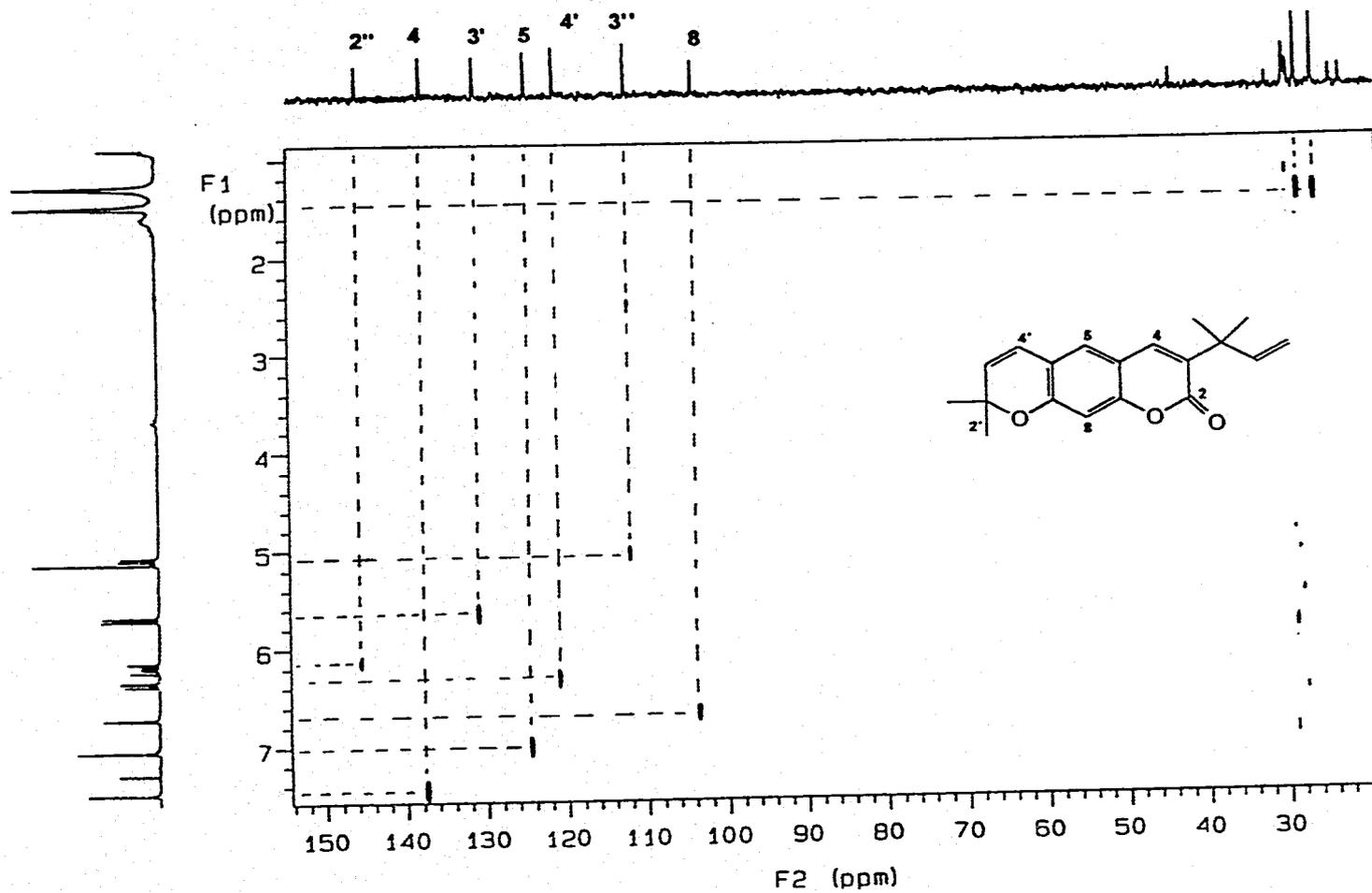
Espectro 8. Espectro de RMN-¹³C de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.



Espectro 9. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la xantiletina 5.

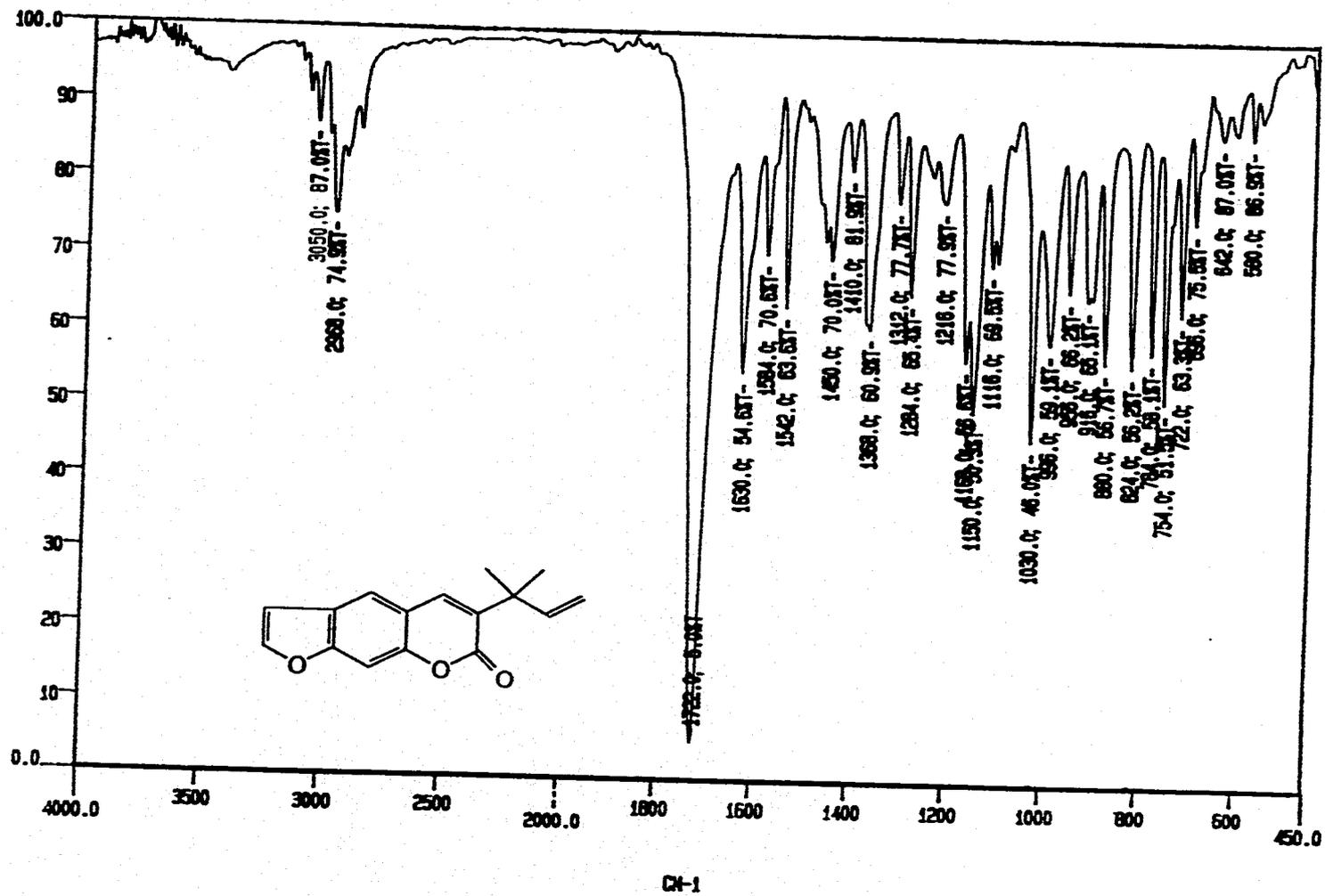


Espectro 10. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.

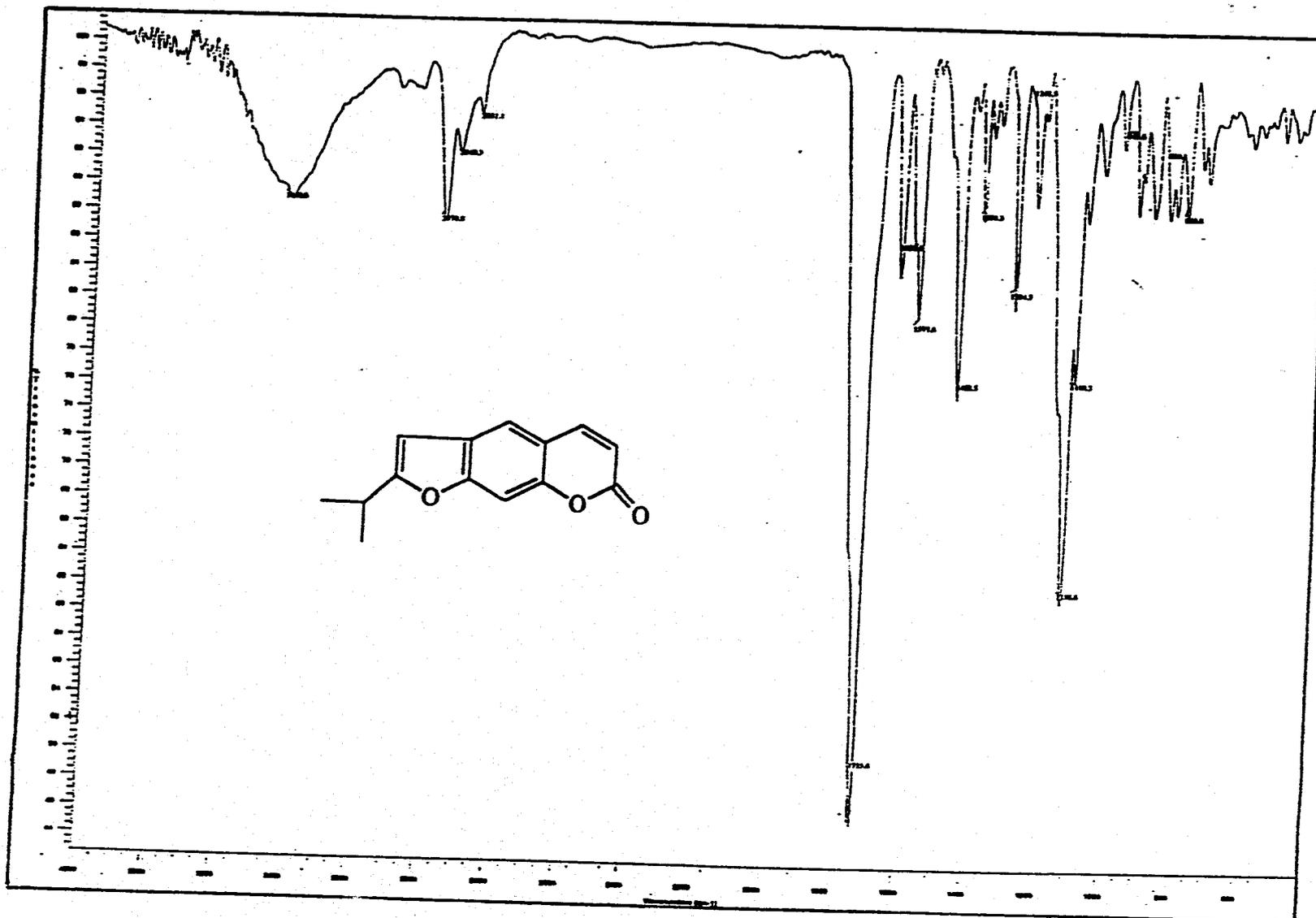


06

Espectro 11. Espectro de RMN-HETCOR de la 3-(1,1-dimetilalil)-xantiletina 2.

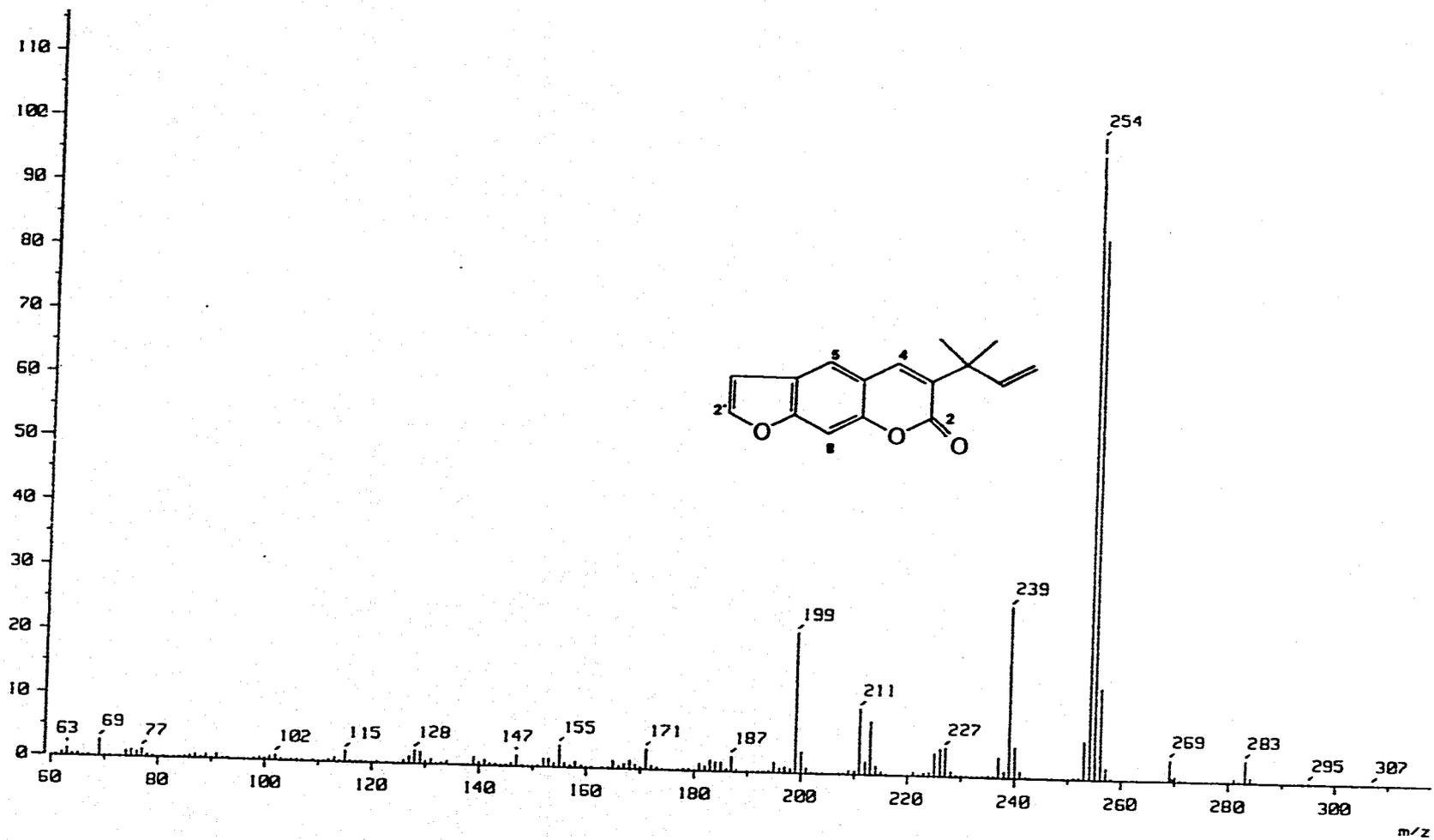


Espectro 12. Espectro de IR de la chalepentina 3.



Espectro 13. Espectro de IR del 2'-isopropil-soraleno 6.

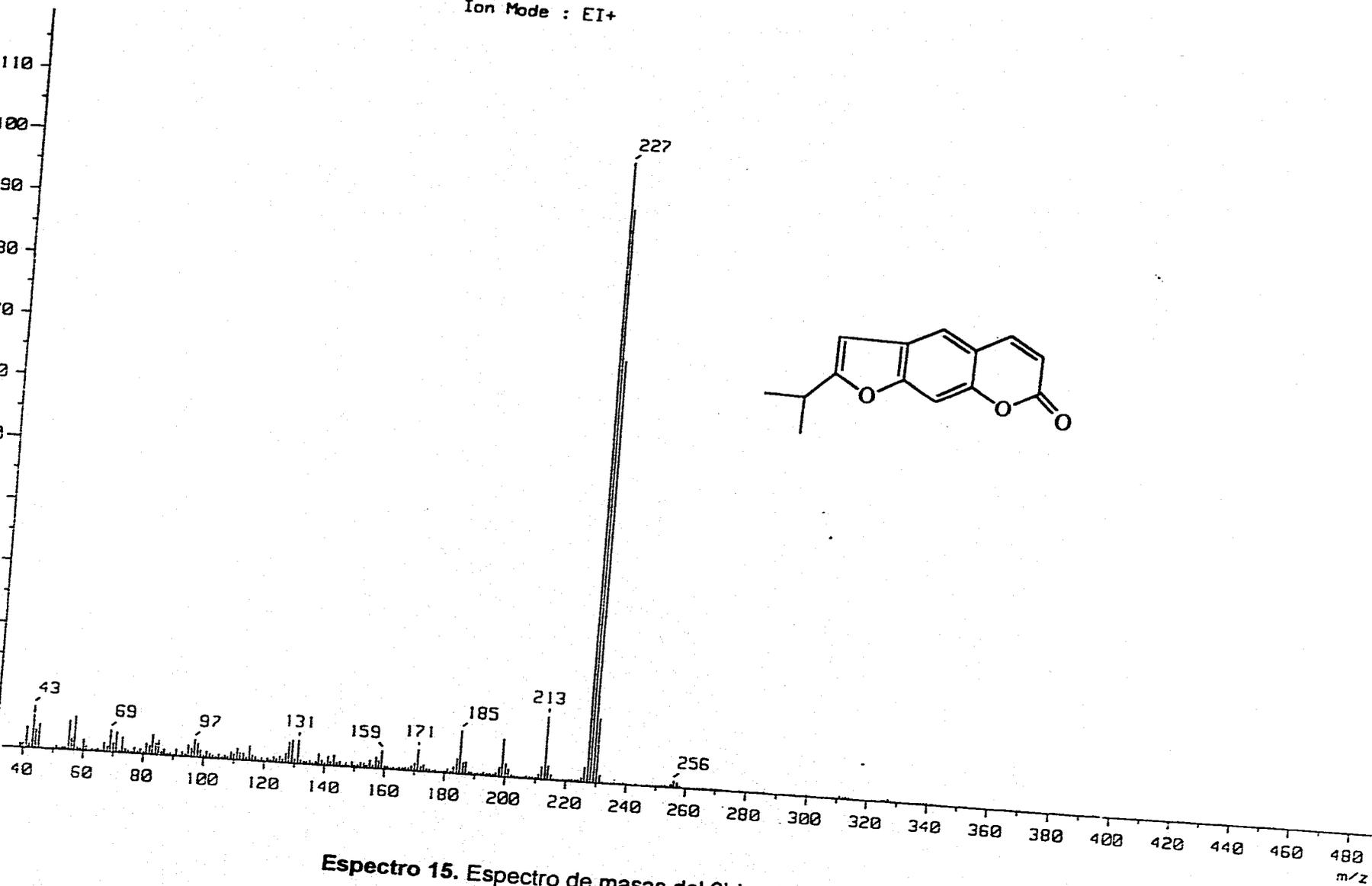
Ion Mode : CI+



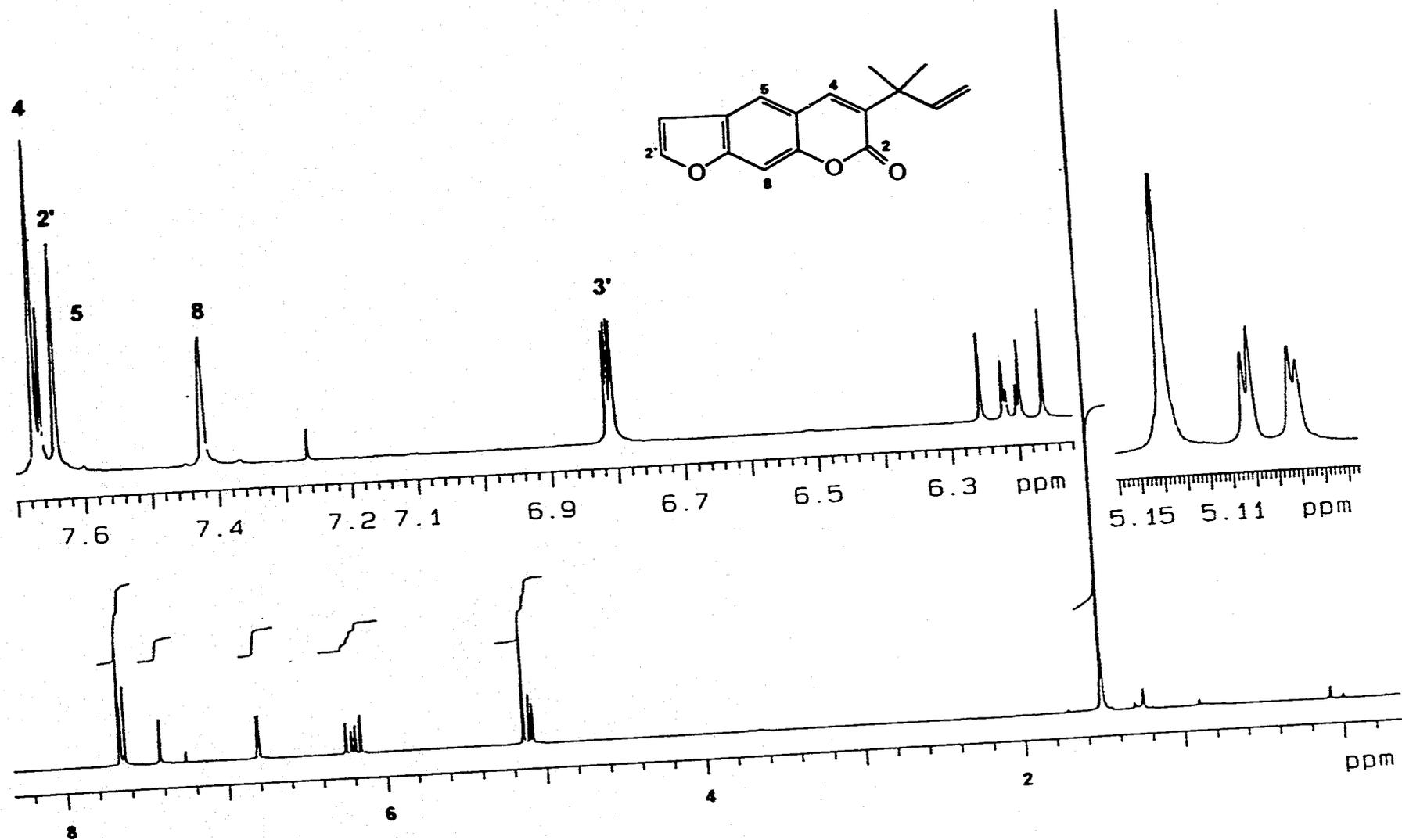
93

Espectro 14. Espectro de masas de la chalapensina 3.

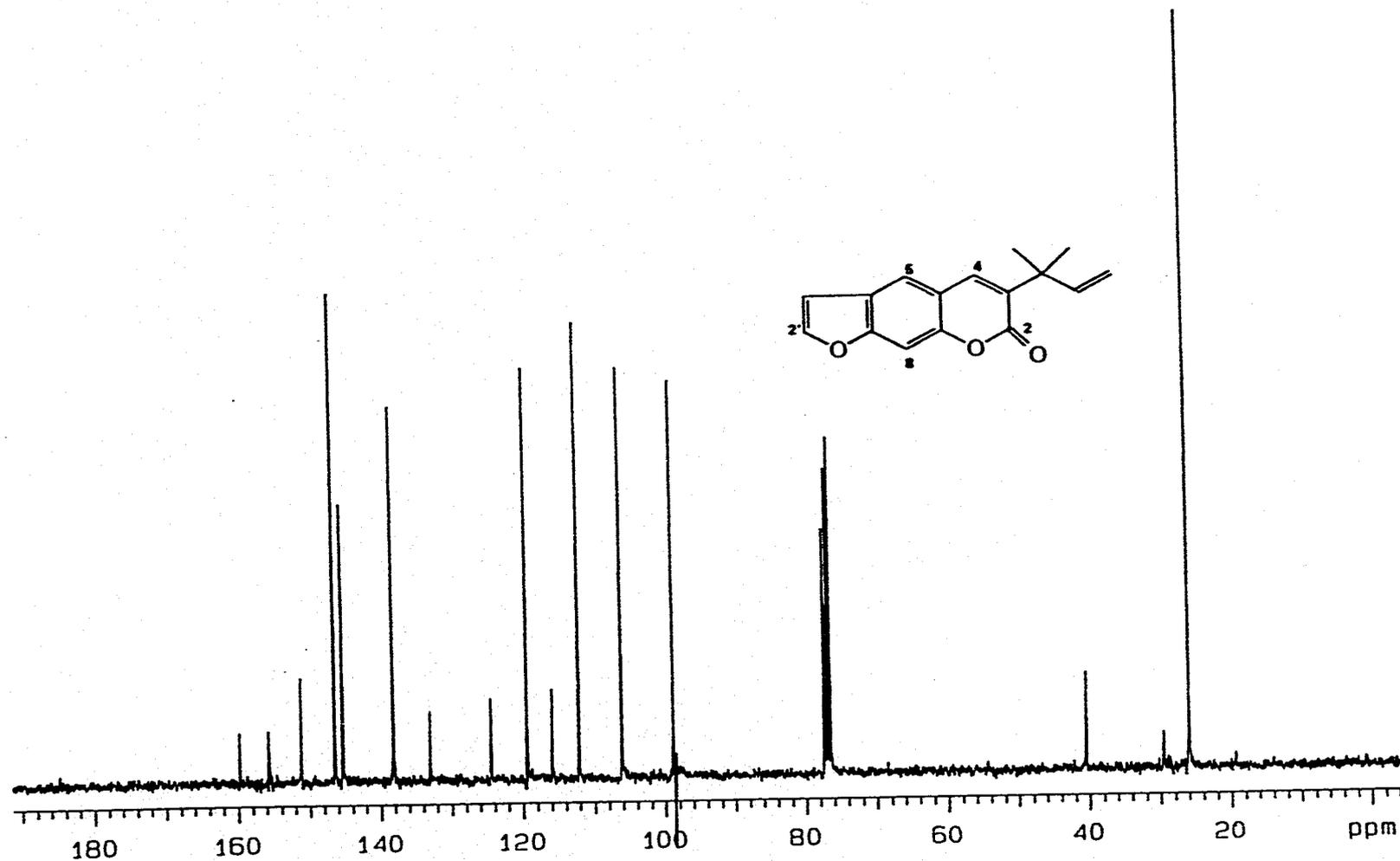
Ion Mode : EI+



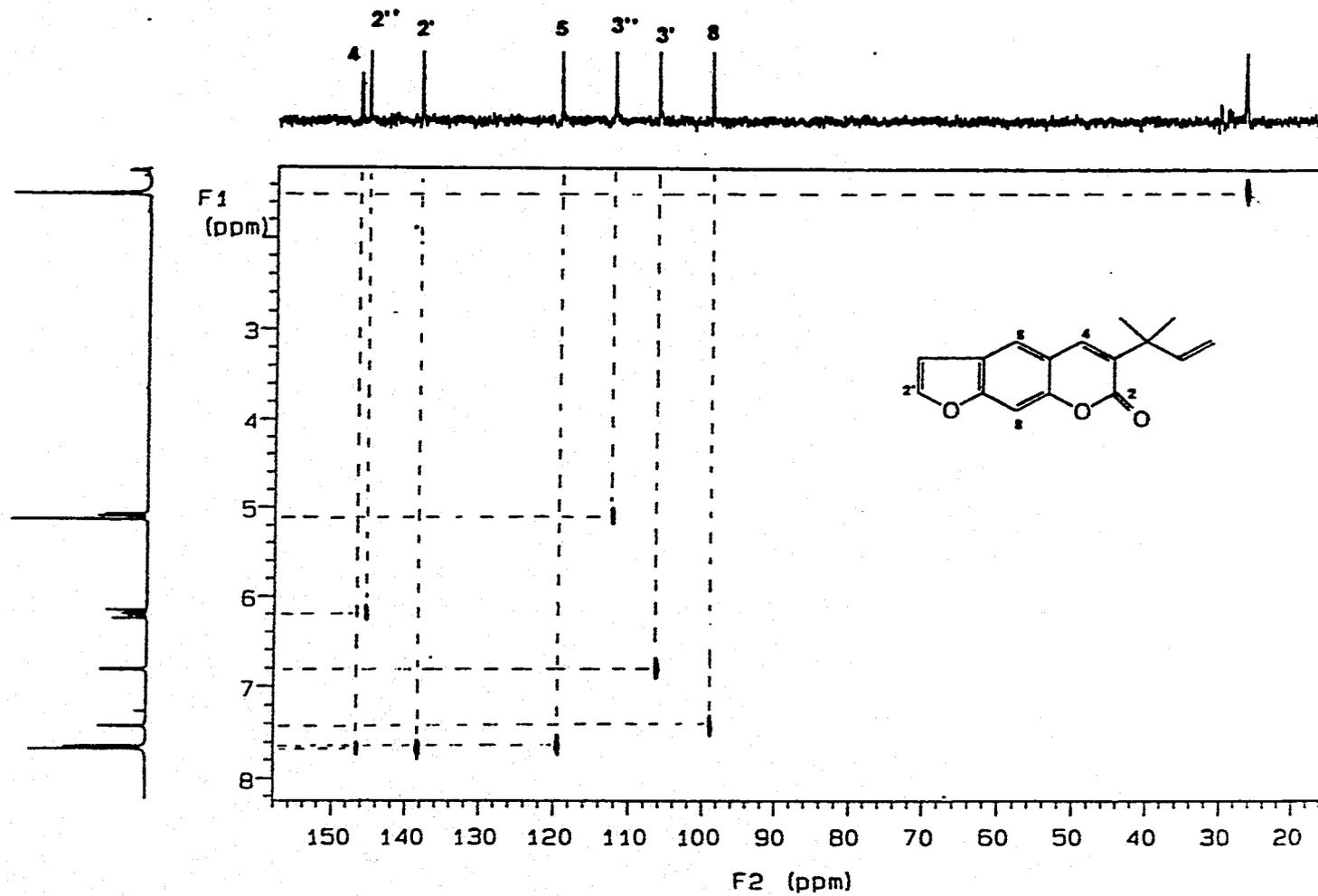
Espectro 15. Espectro de masas del 2'-isopropil-soraleno 6.



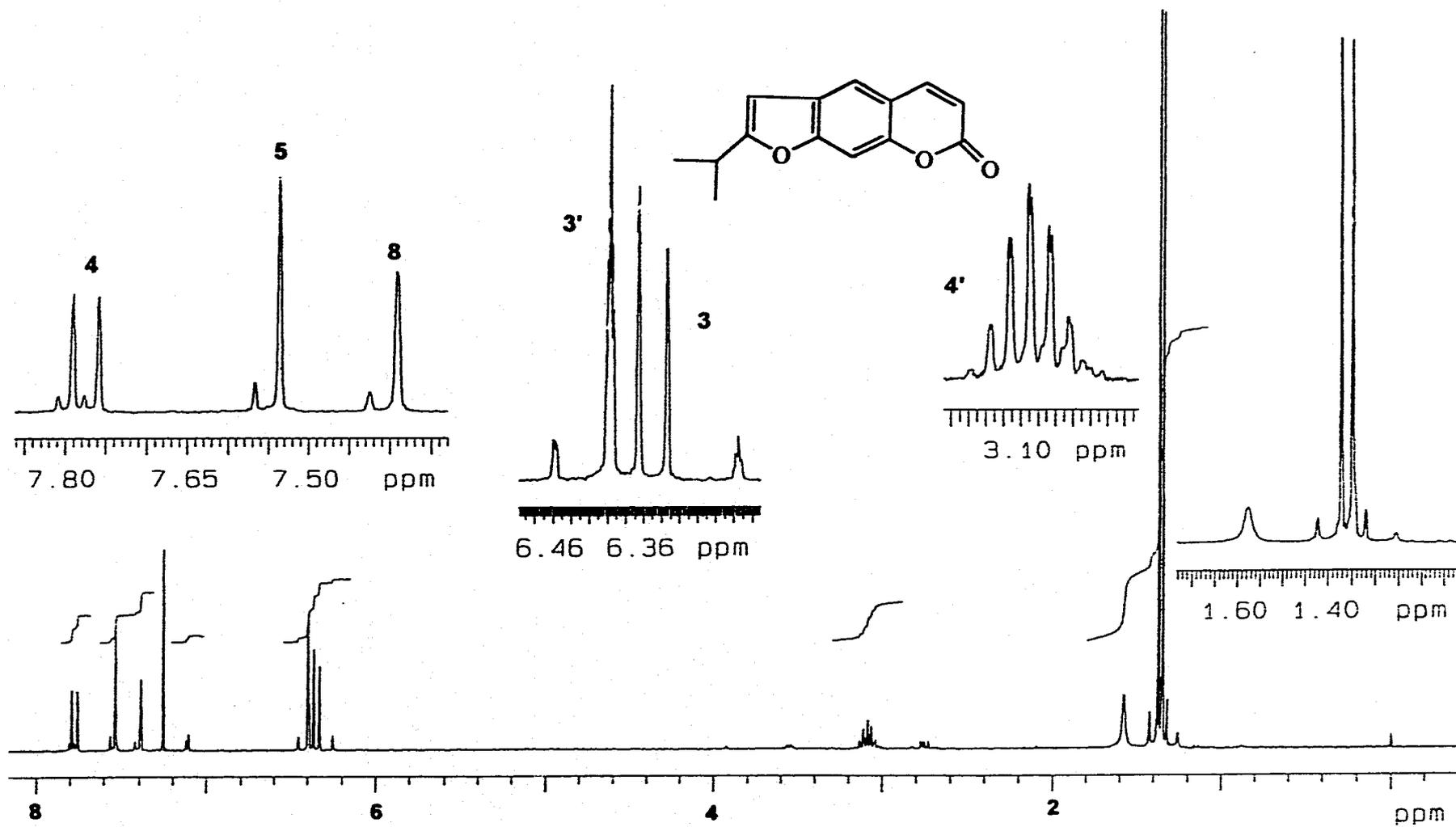
Espectro 16. Espectro de RMN-¹H de la chalepensisina 3.



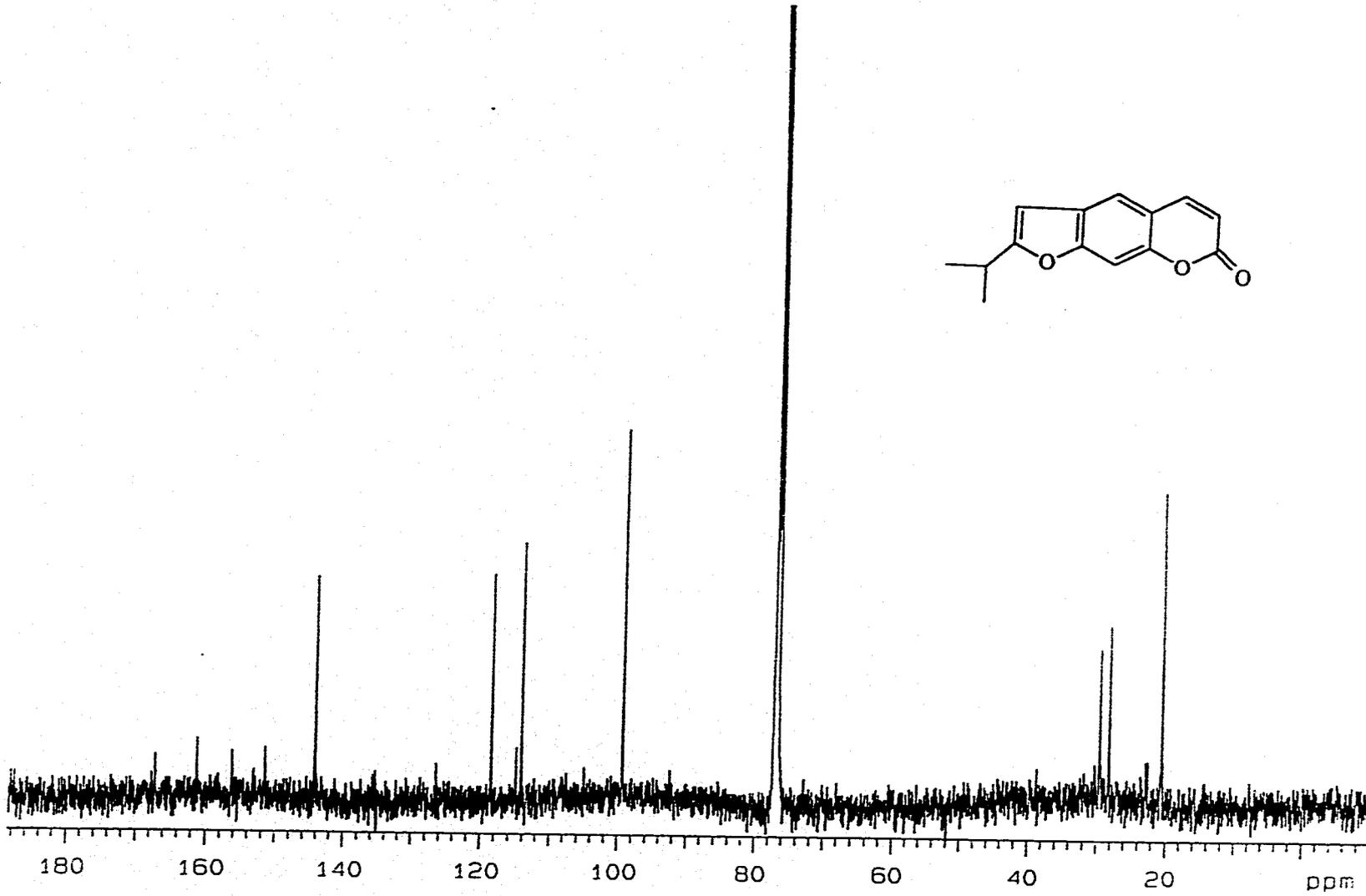
Espectro 17. Espectro de RMN-¹³C de la chalapensina 3.



Espectro 18. Espectro de RMN-HETCOR de la chalepensina 3.

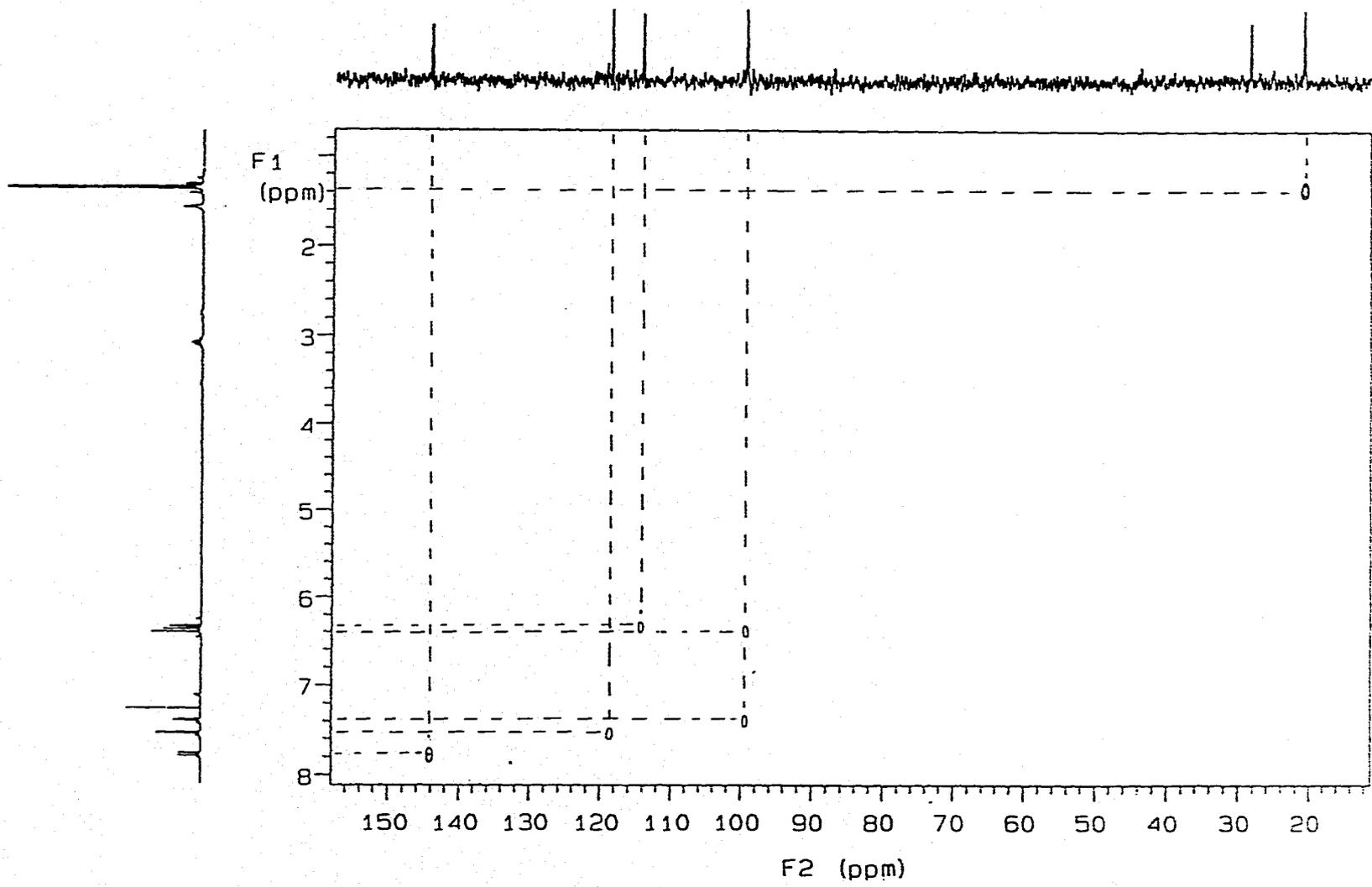


Espectro 19. Espectro de RMN- ^1H del 2'-isopropil-soraleno 6.



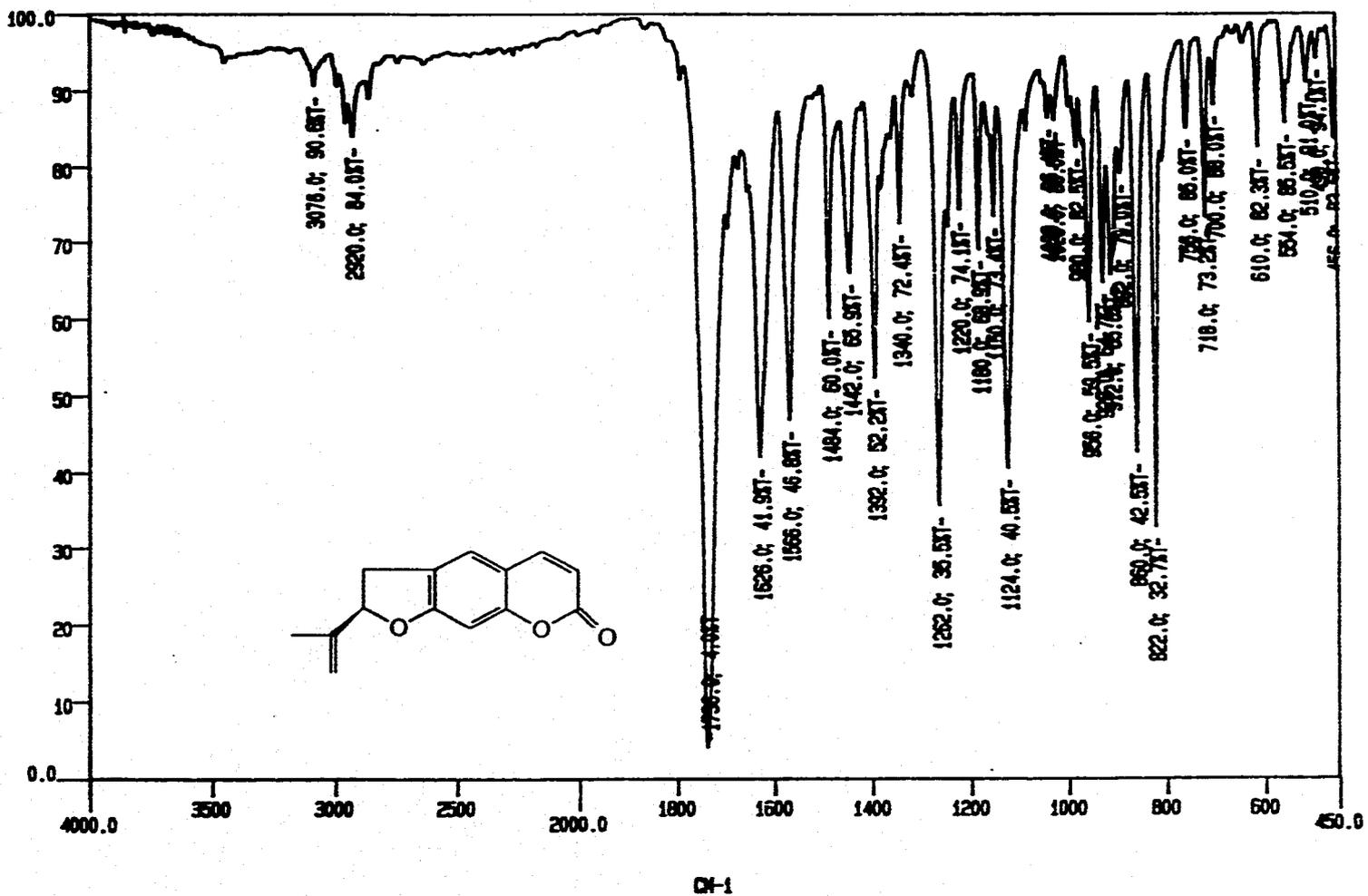
66

Espectro 20. Espectro de RMN-¹³C del 2'-isopropil-soraleno 6.

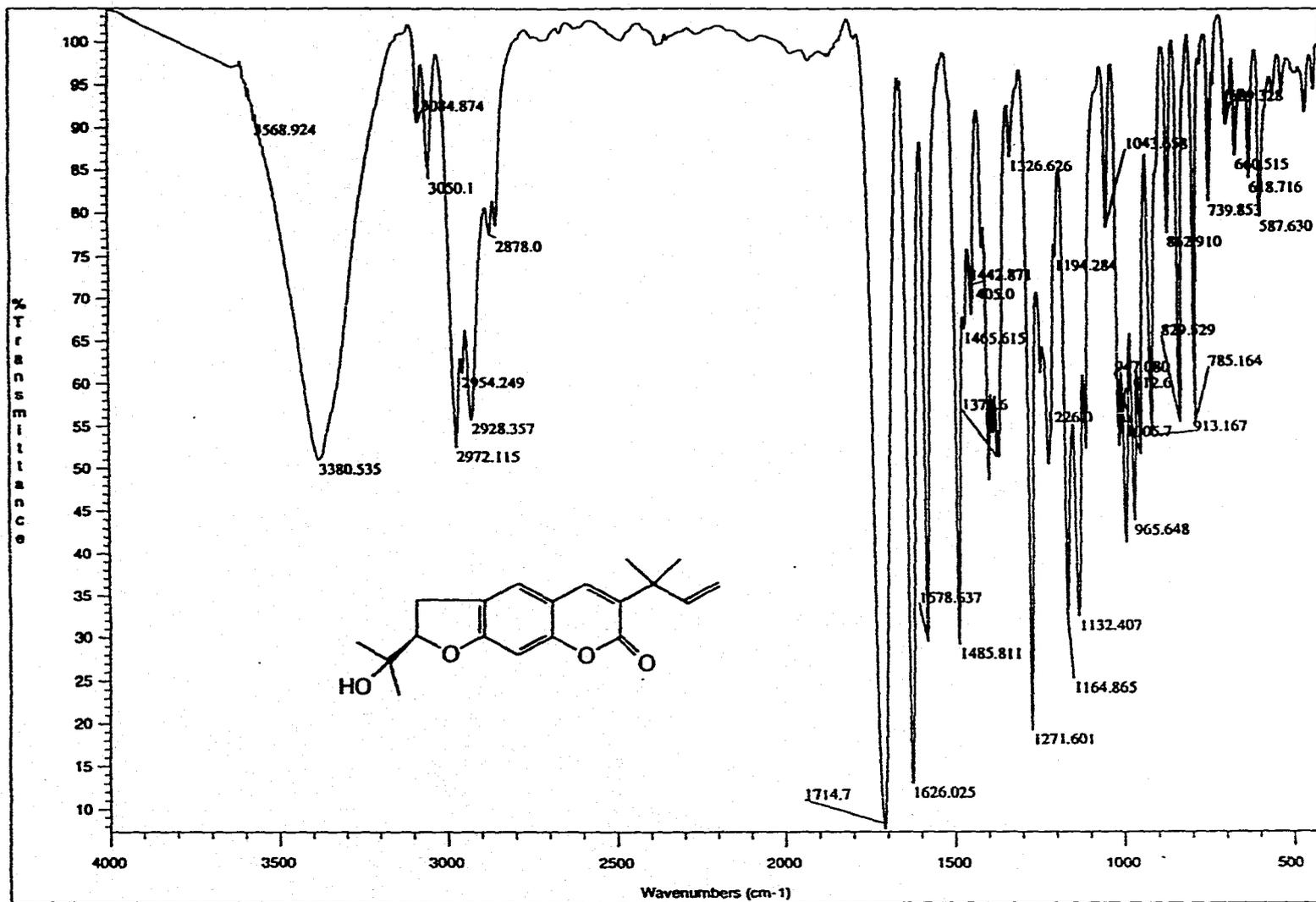


Espectro 21. Espectro de RMN-HETCOR del 2'-isopropil-soraleno 6.

BT

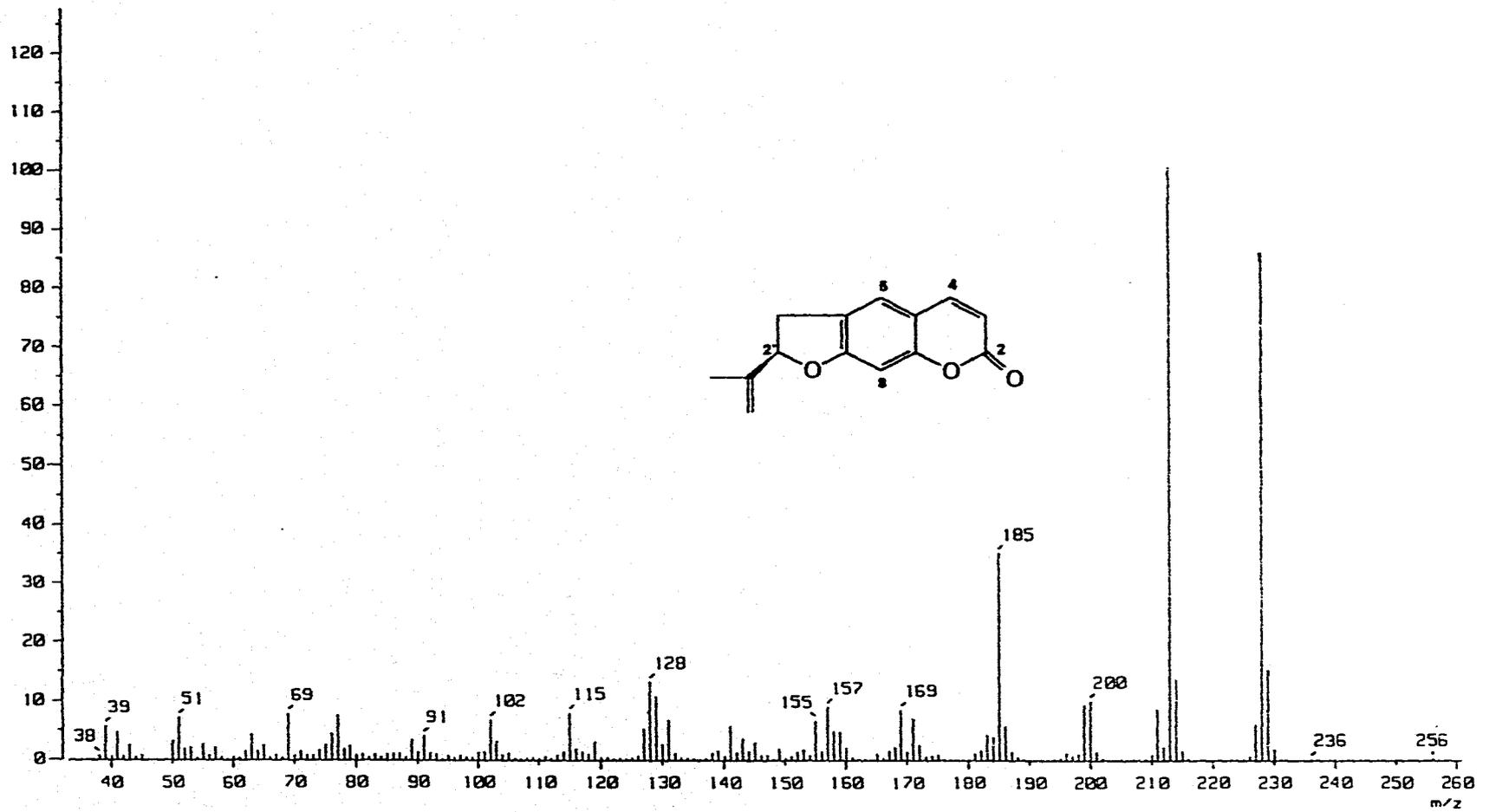


Espectro 22. Espectro de IR de la amirina 9.



Espectro 23. Espectro de IR de la chalepina 11.

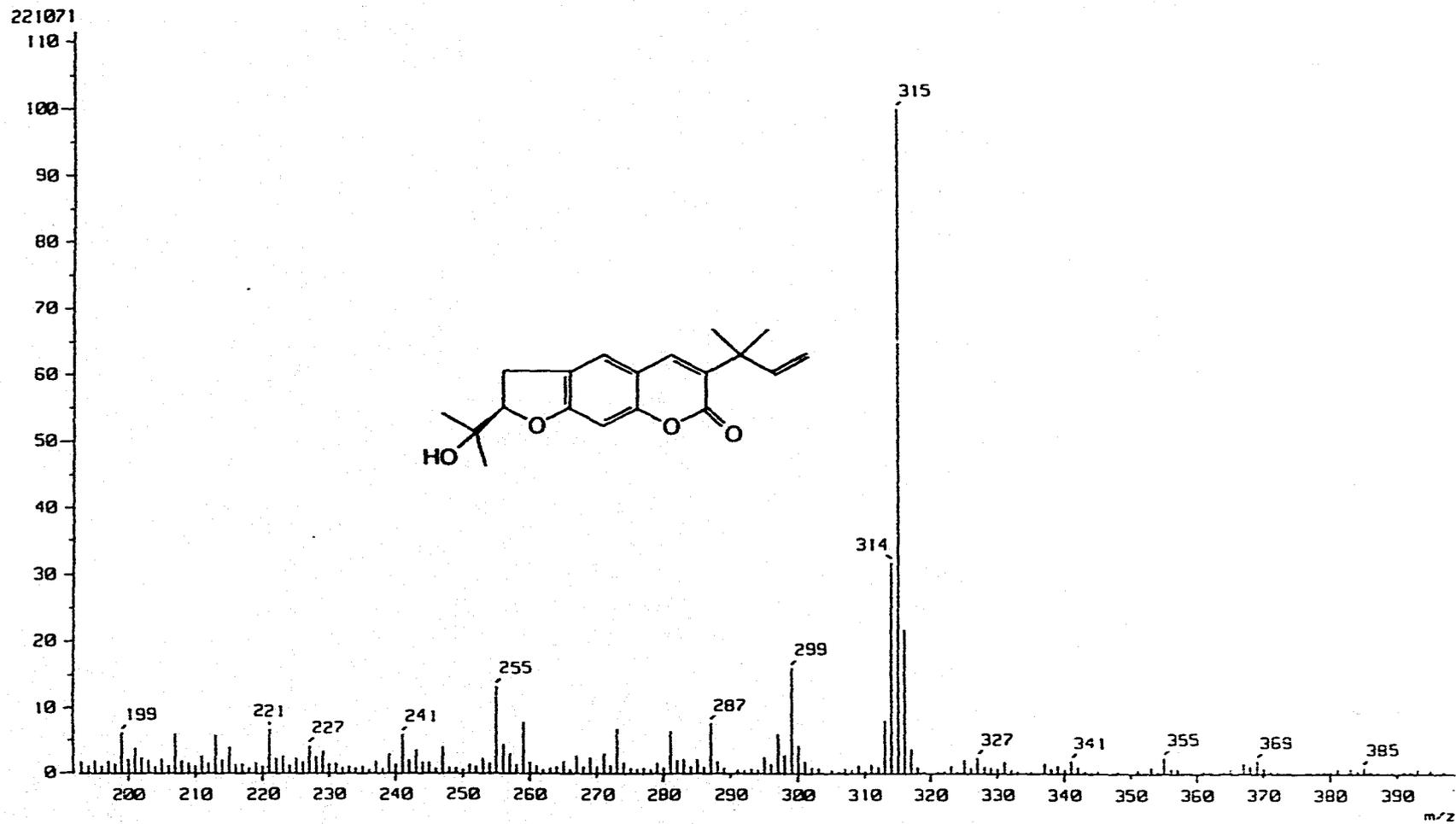
Ion Mode : EI+



103

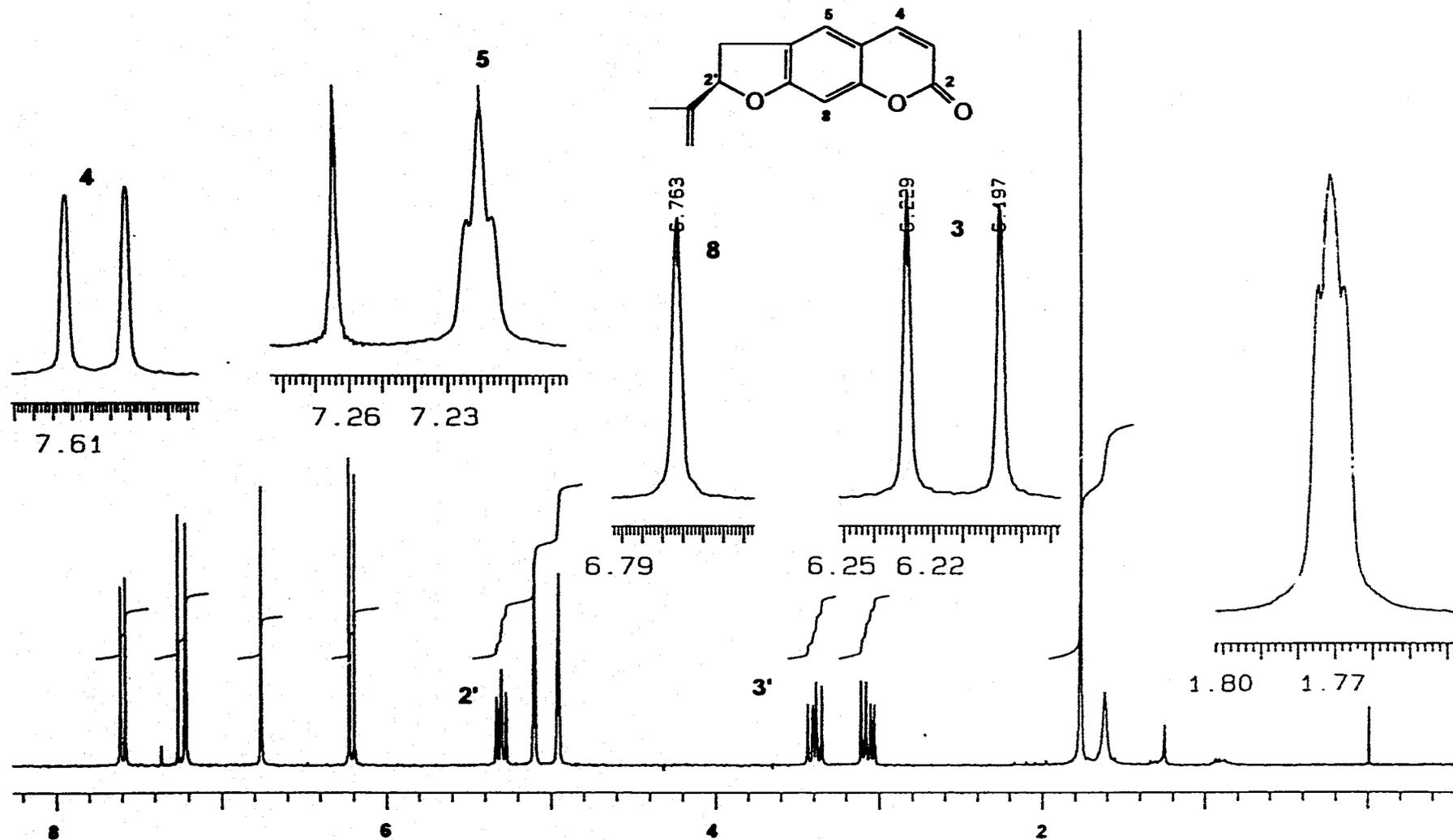
Espectro 24. Espectro de masas de la amirina 9.

Ion Mode : FAB+

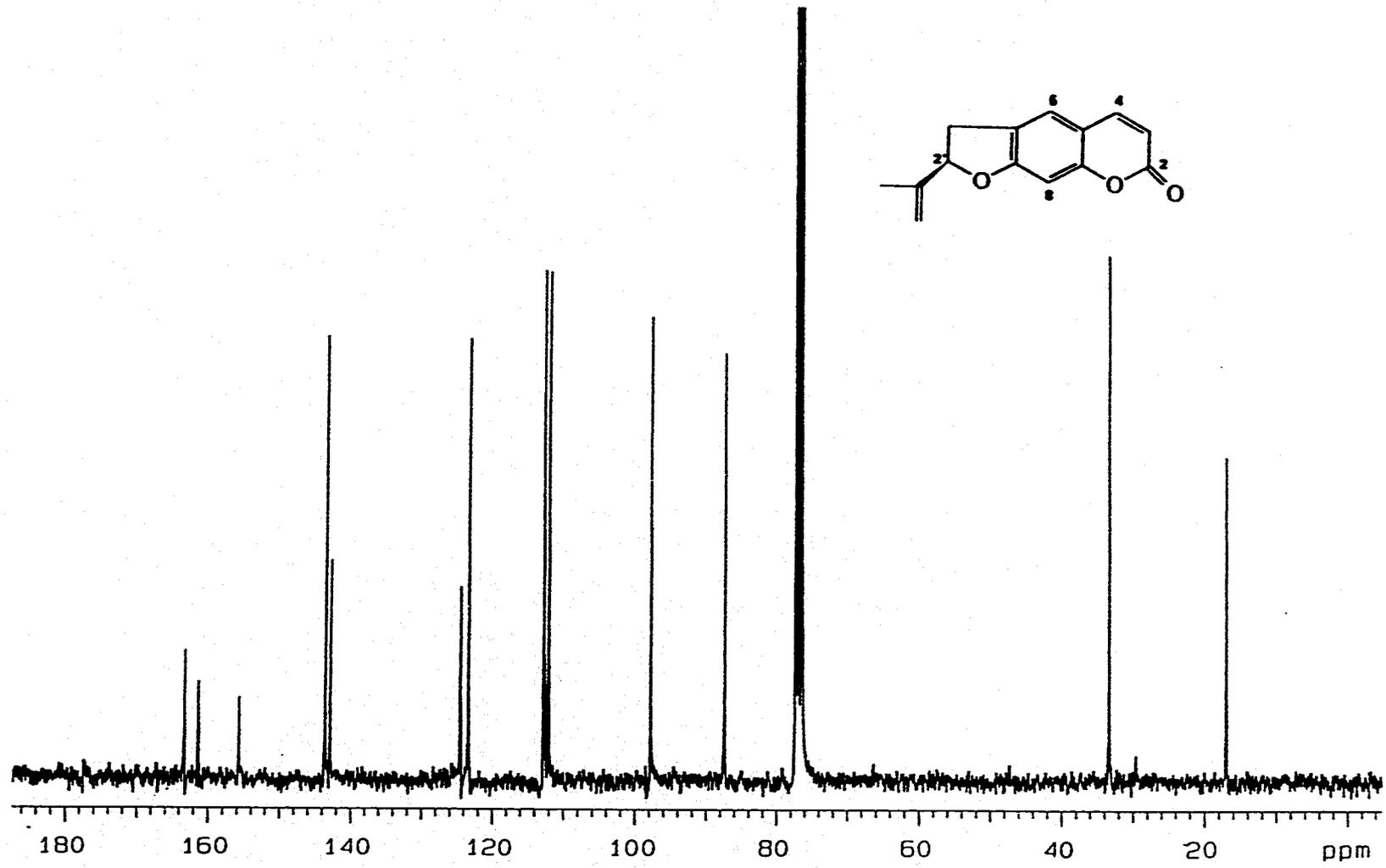


104

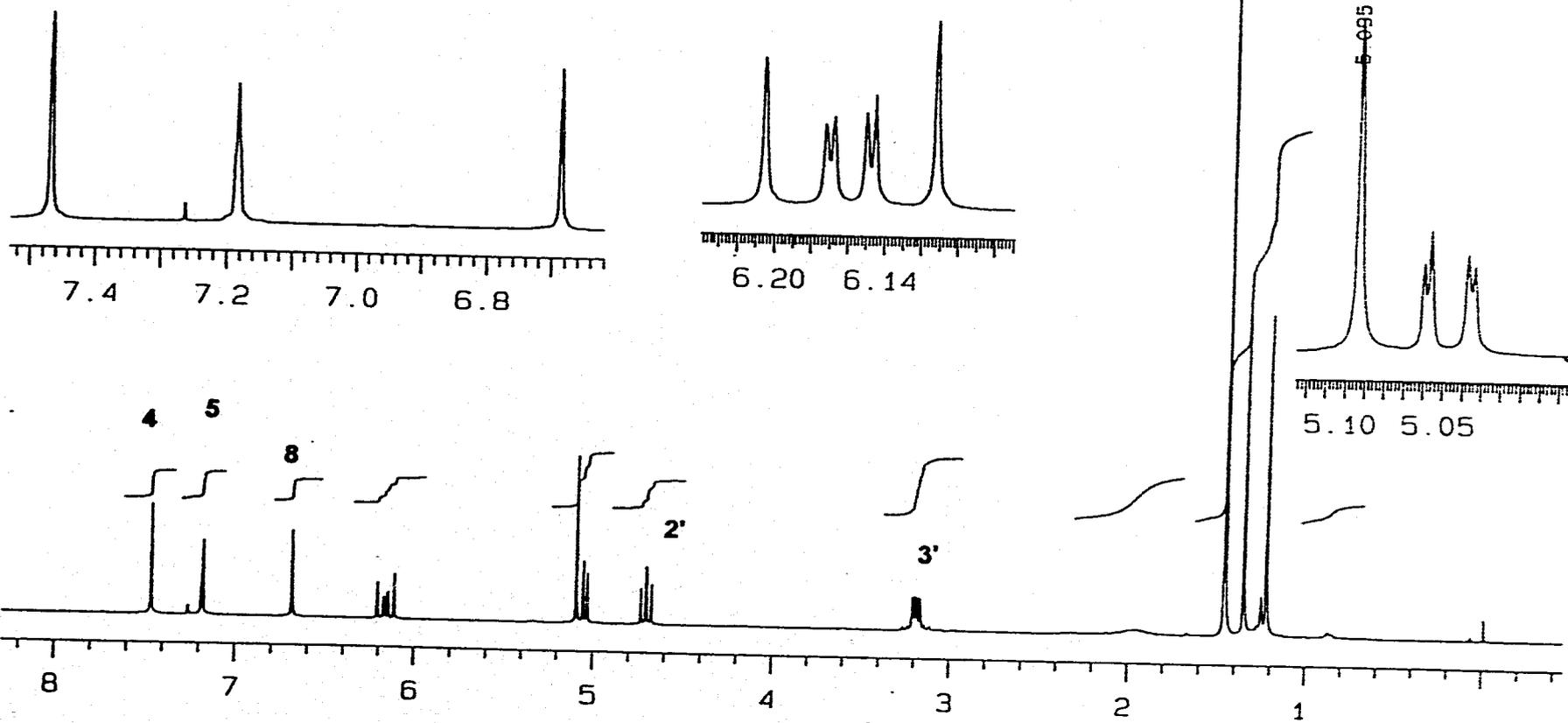
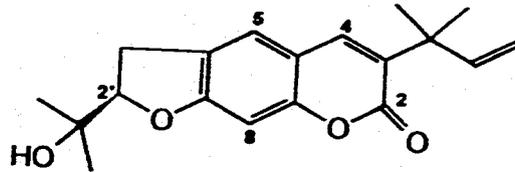
Espectro 25. Espectro de masas de la chalepina 11.



Espectro 26. Espectro de RMN-¹H de la de la amirina 9.

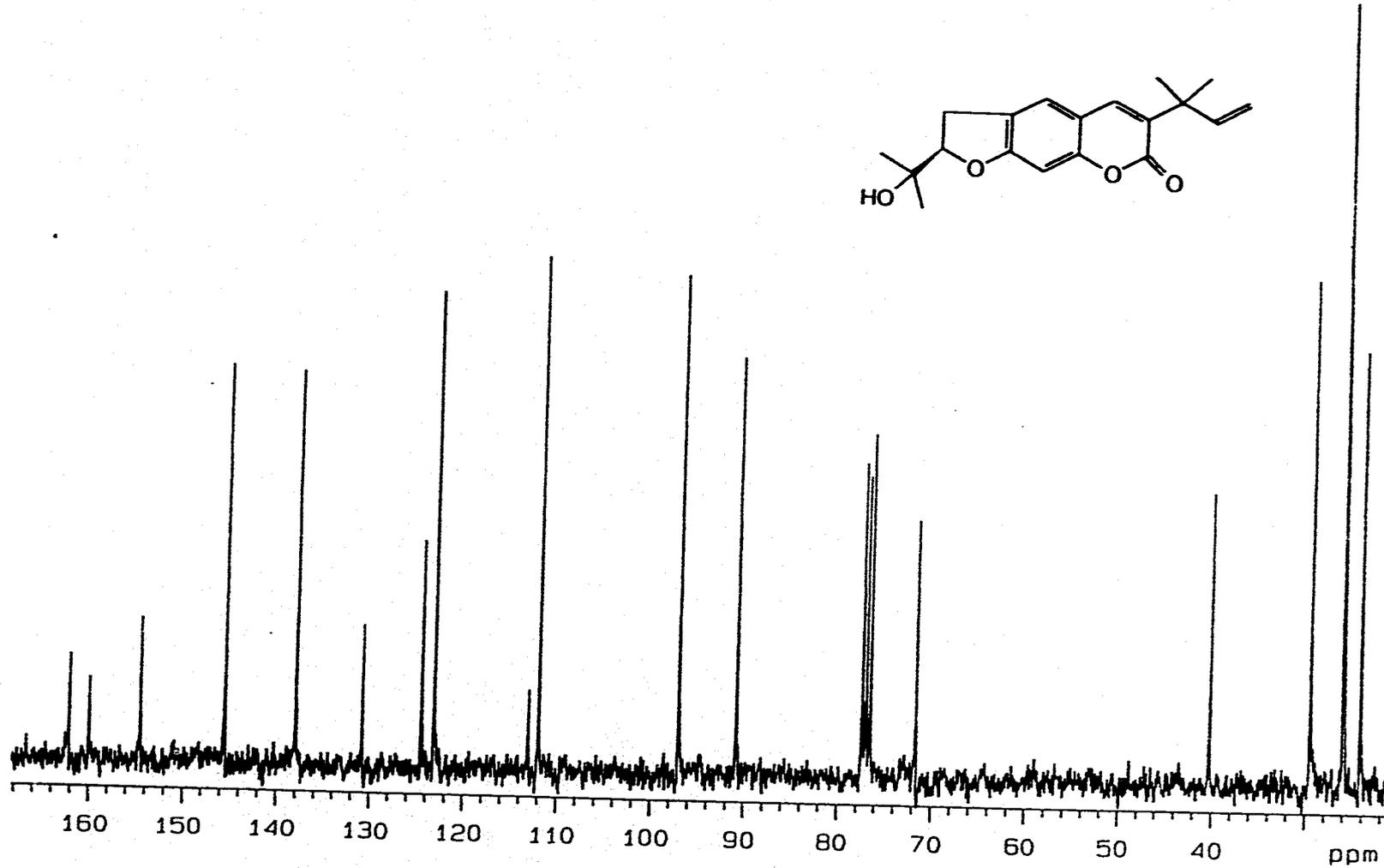
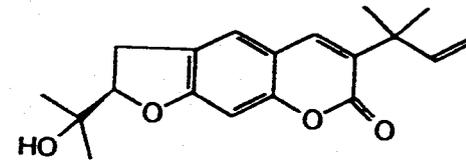


Espectro 27. Espectro de RMN-¹³C de la amirina 9.

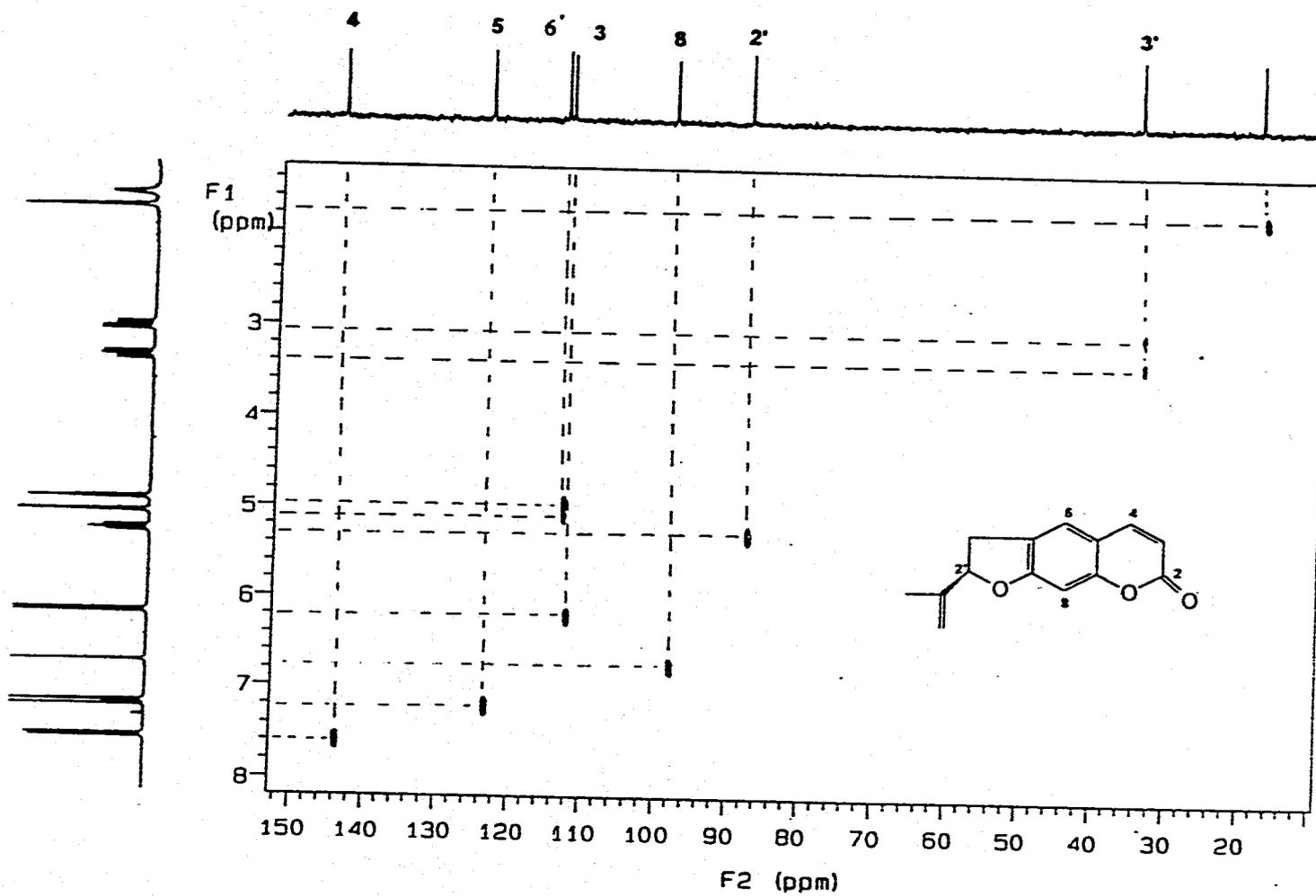


107

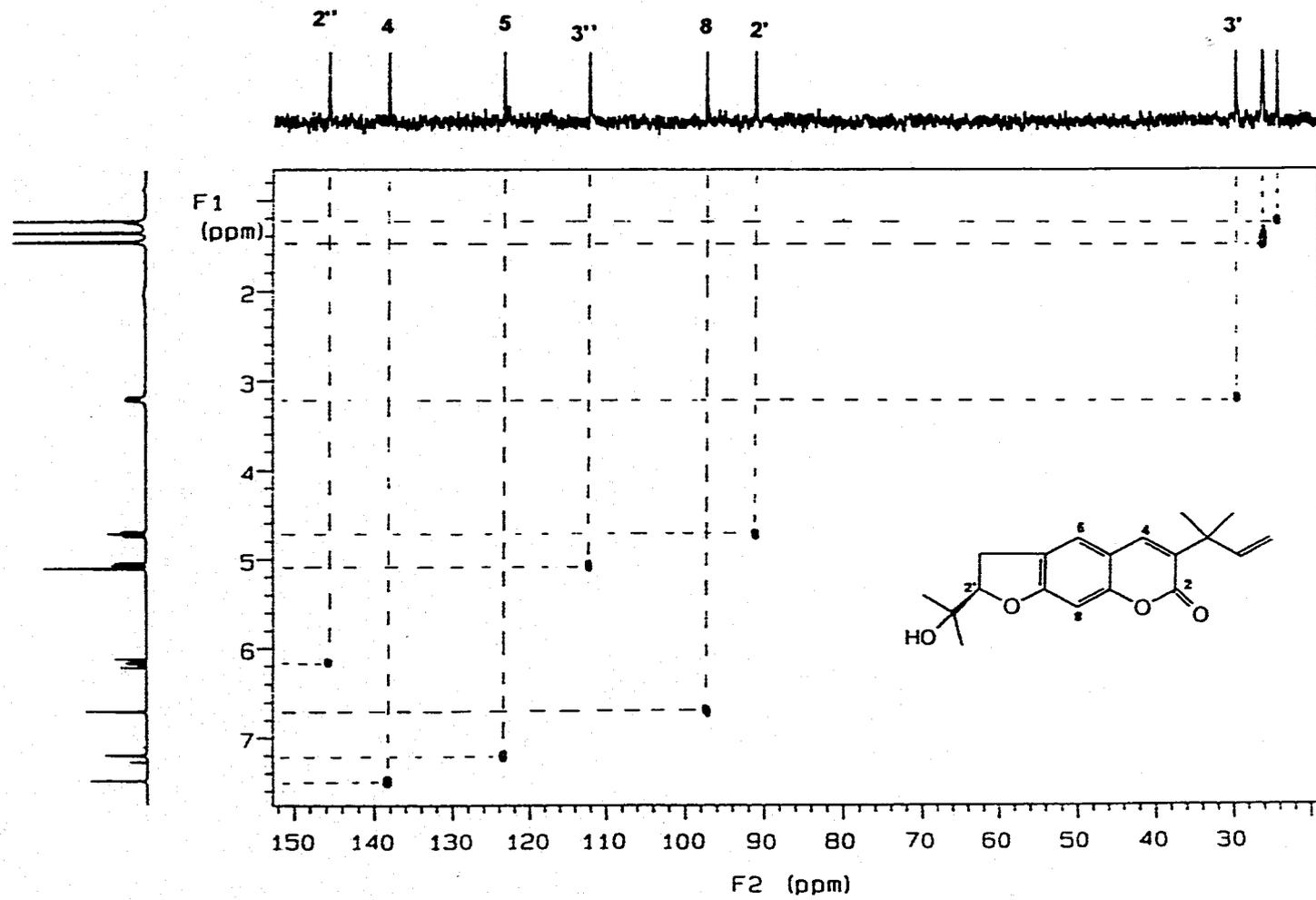
Espectro 28. Espectro de RMN-¹H de la chalapina 11.



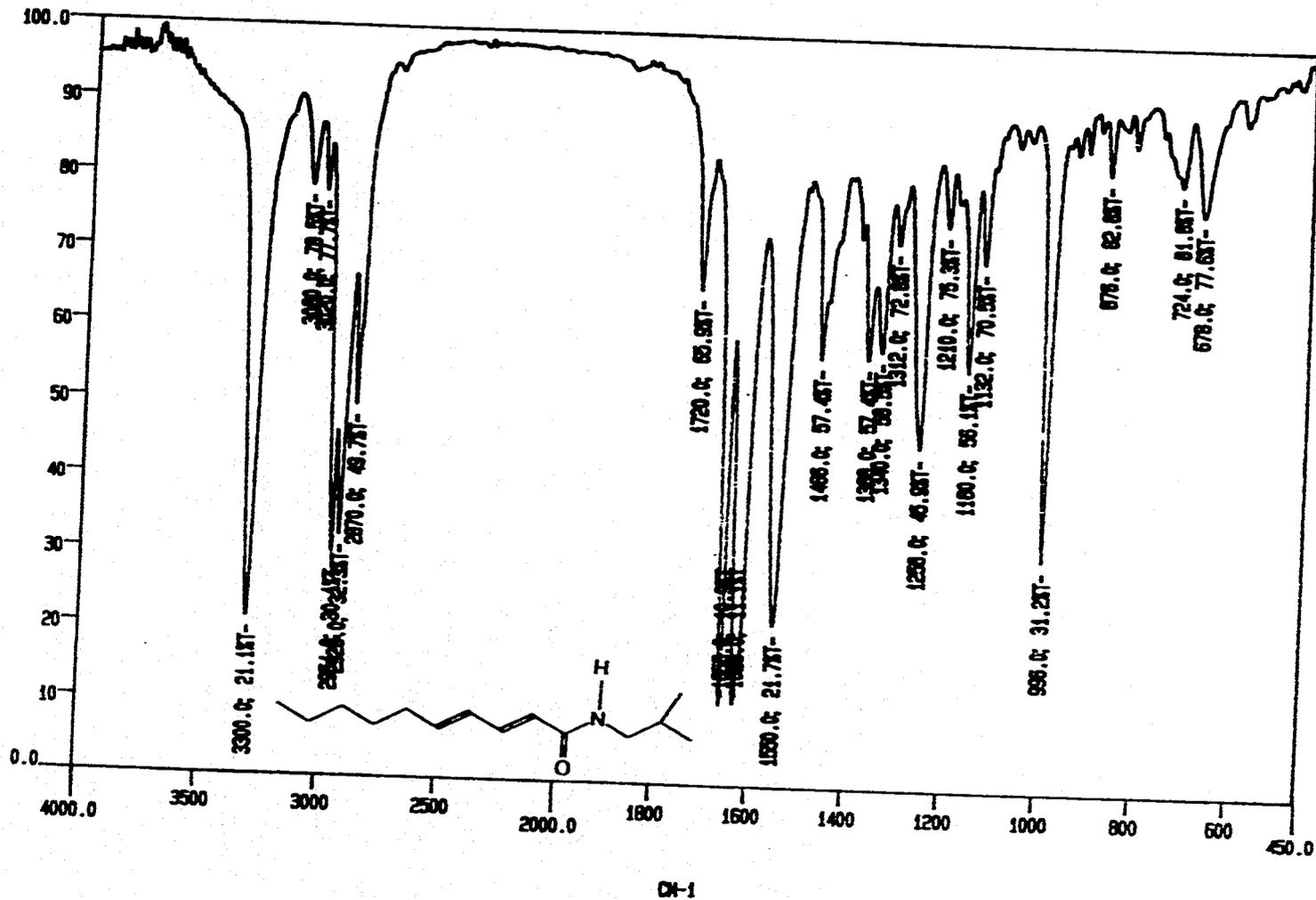
Espectro 29. Espectro de RMN-¹³C de la chalapina 11.



Espectro 30. Espectro de RMN-HETCOR de la amirina 9.

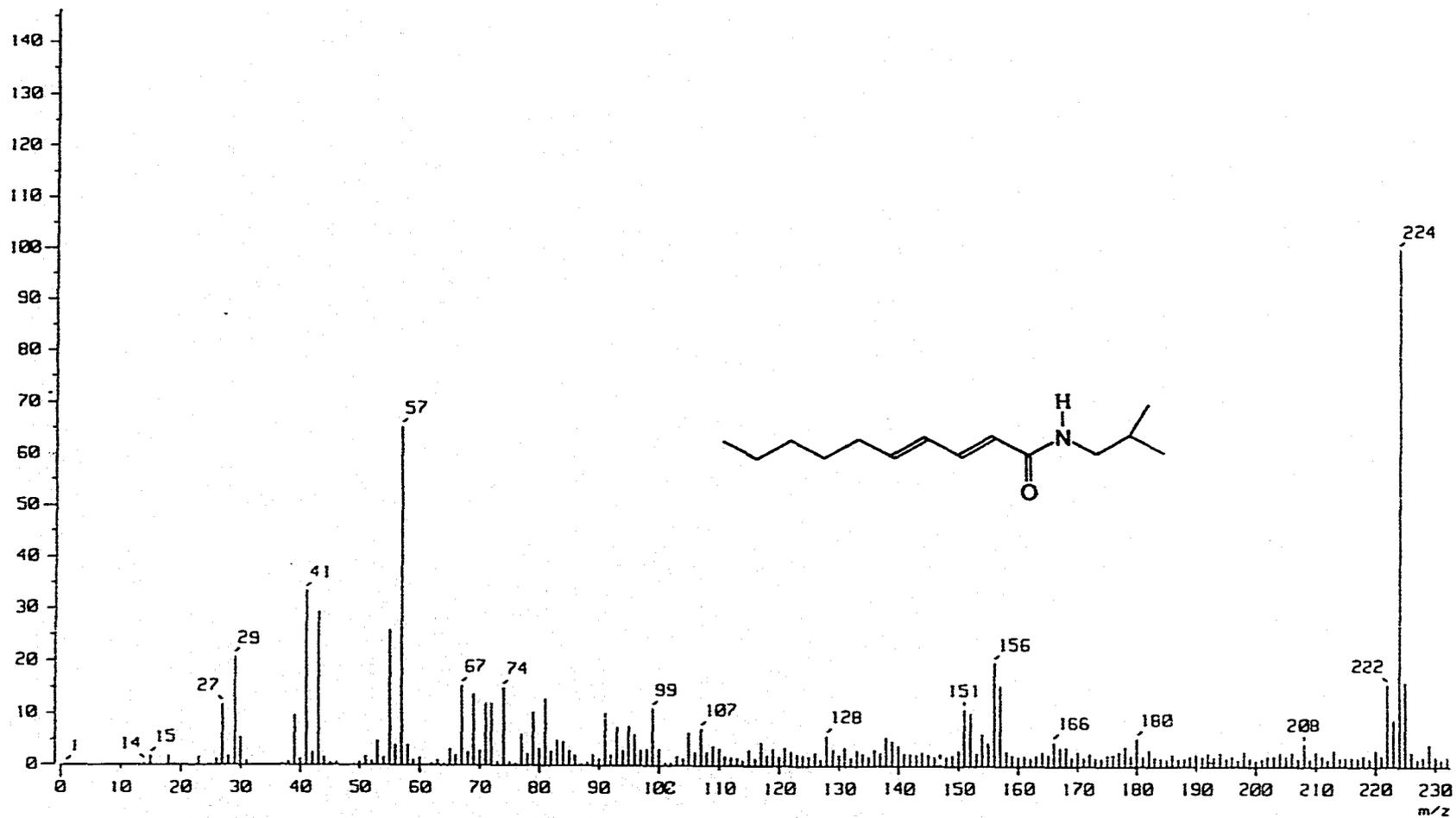


Espectro 31. Espectro de RMN-HETCOR de la chalapina 11.



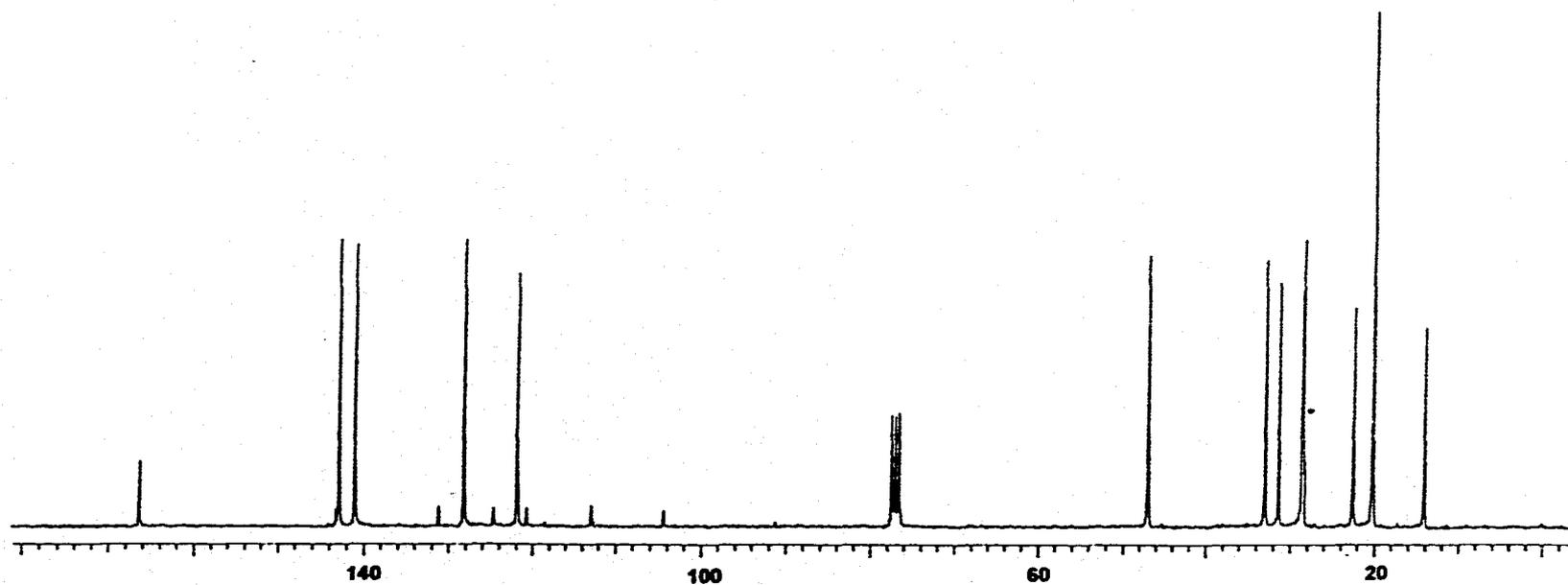
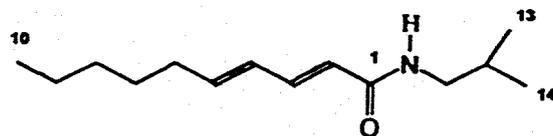
Espectro 32. Espectro de IR de la pelitorina 8.

Ion Mode : FAB+



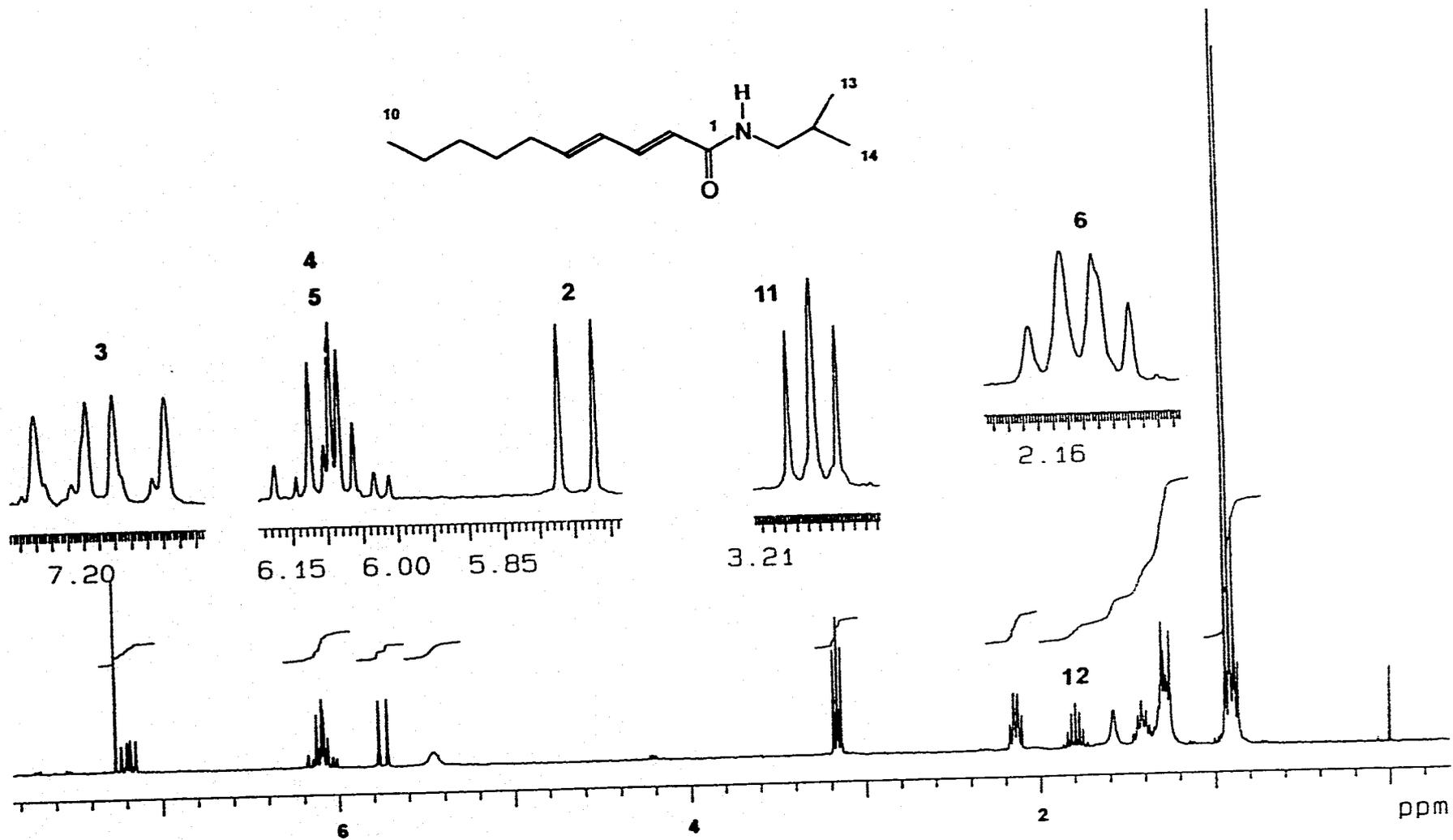
112

Espectro 33. Espectro de masas de la pelitorina 8.

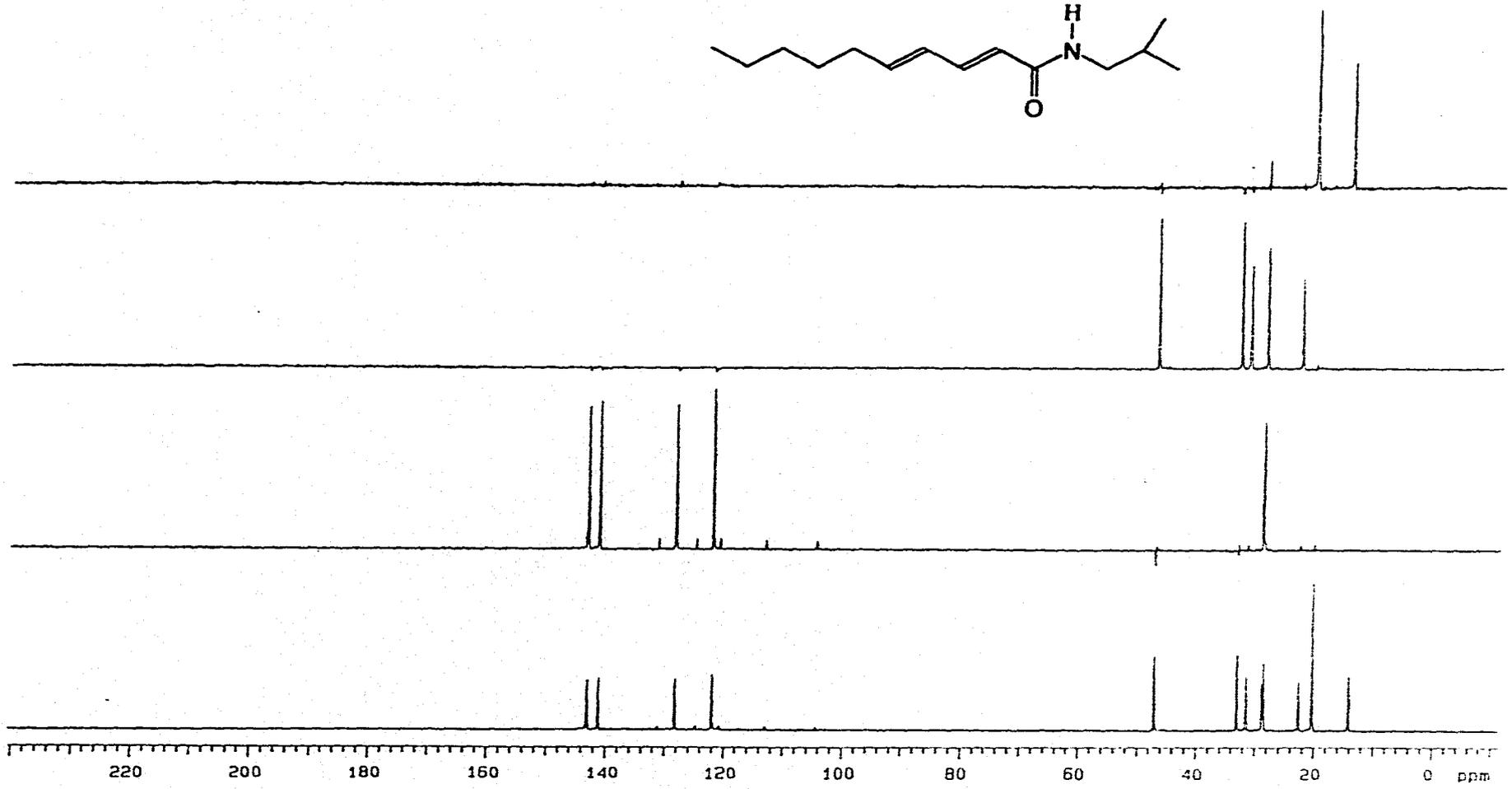
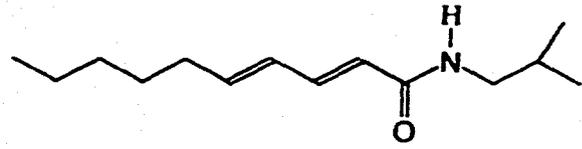


113

Espectro 34. Espectro de RMN- ^{13}C de la pelitorina 8.



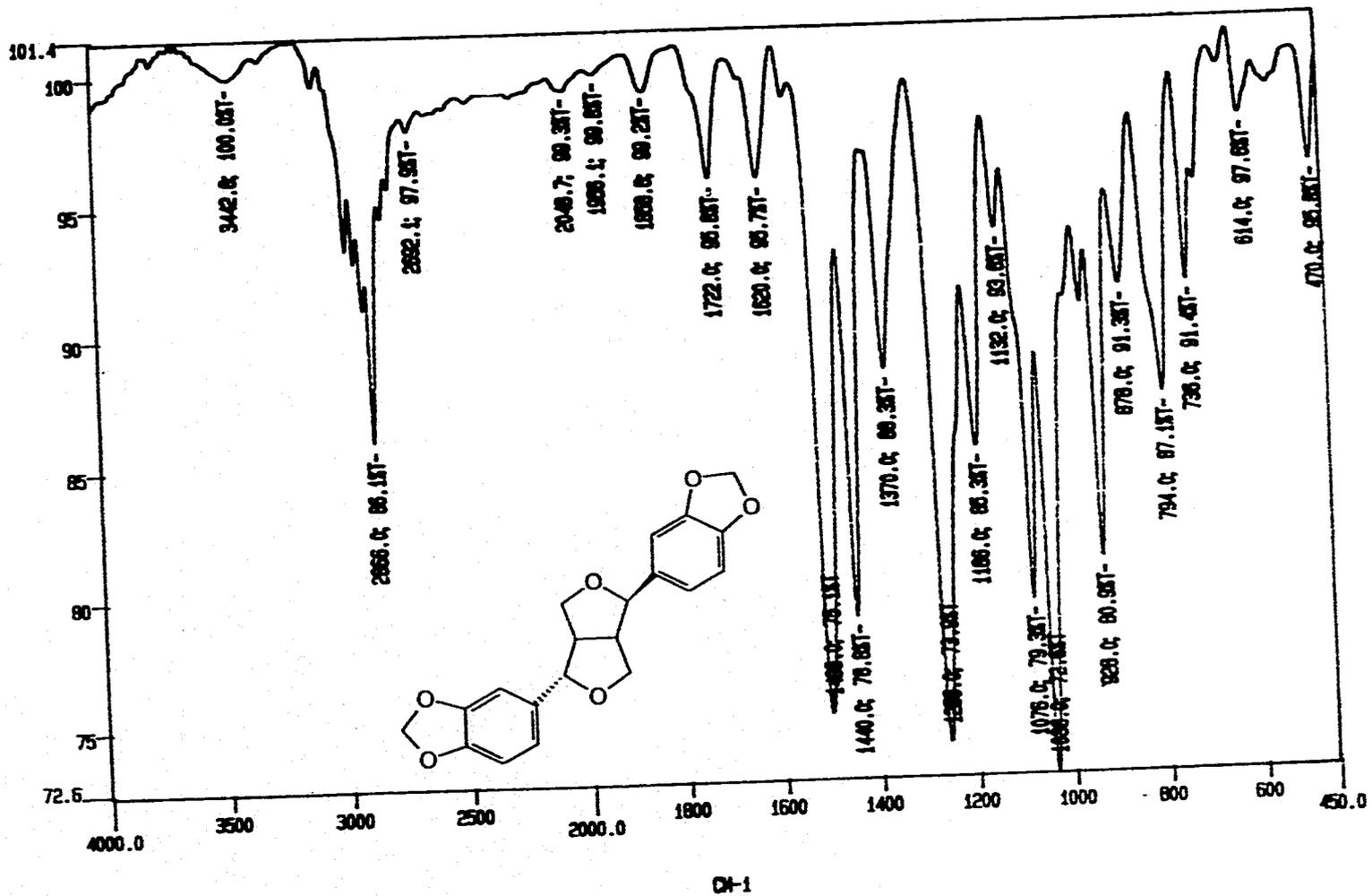
Espectro 35. Espectro de RMN- ^1H de la pelitorina 8.



115

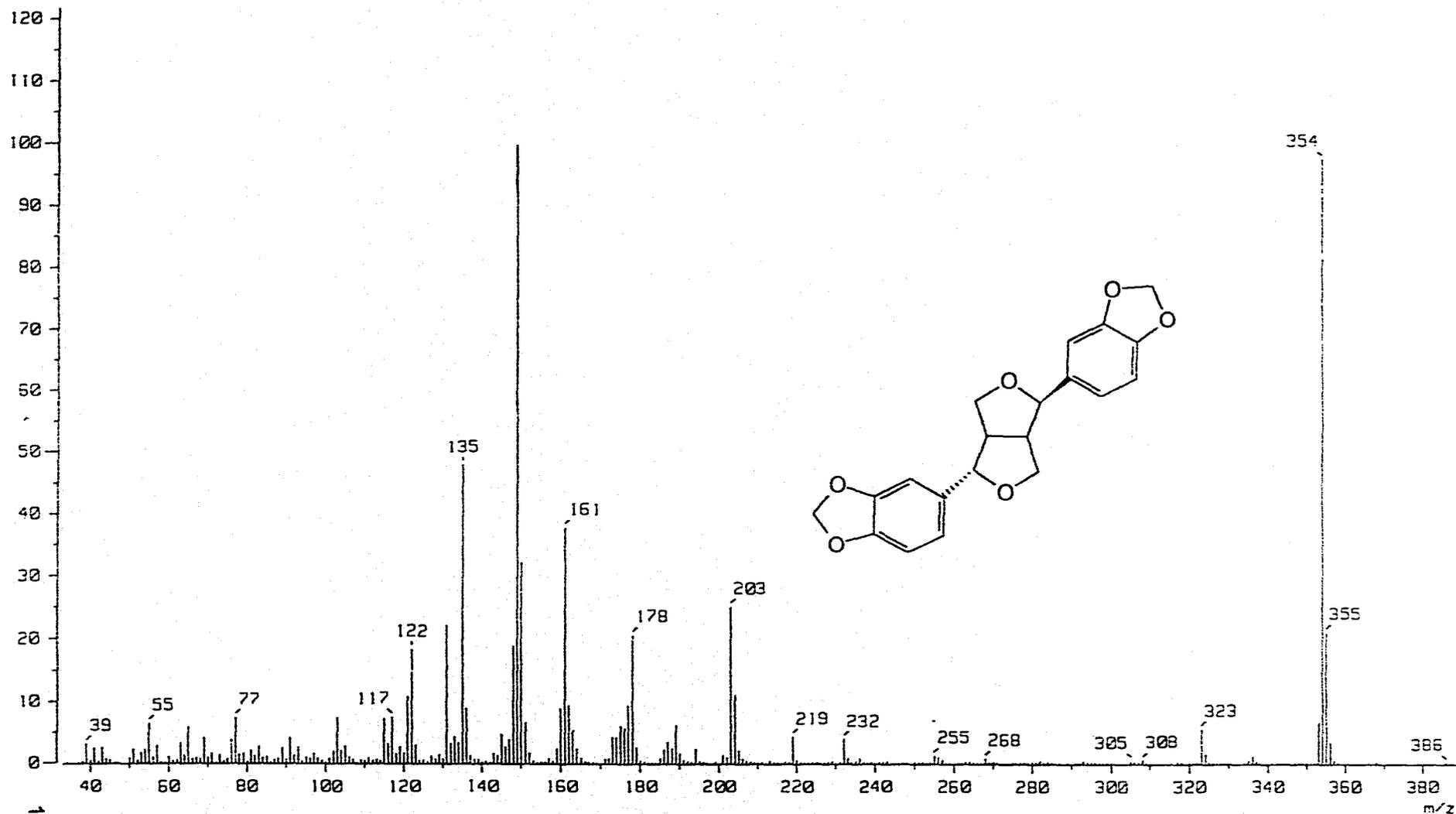
Espectro 36. Espectro de RMN ¹³C-DEPT de la pelitorina 8.

51

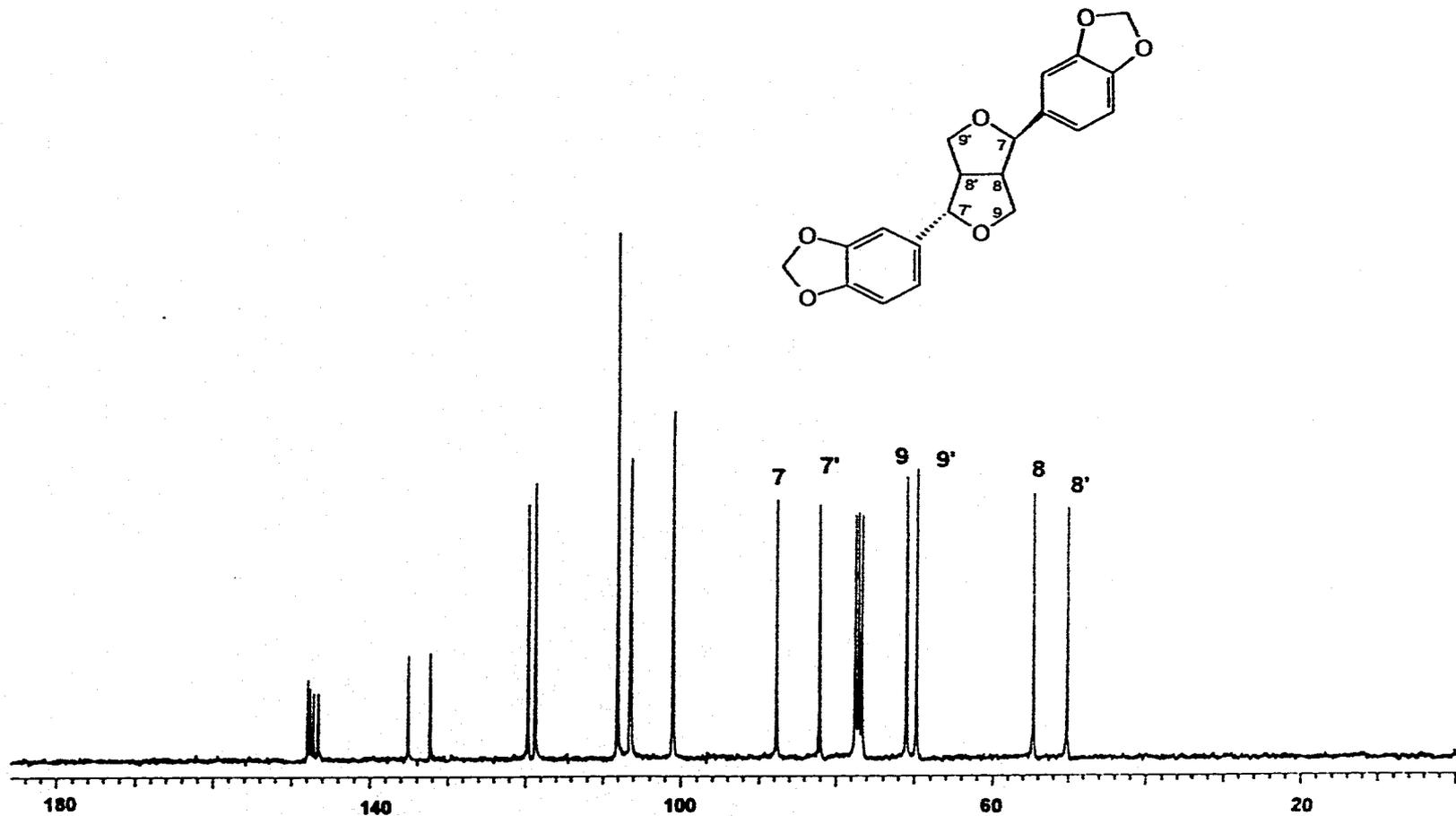


Espectro 37. Espectro de IR de la asarinina 4.

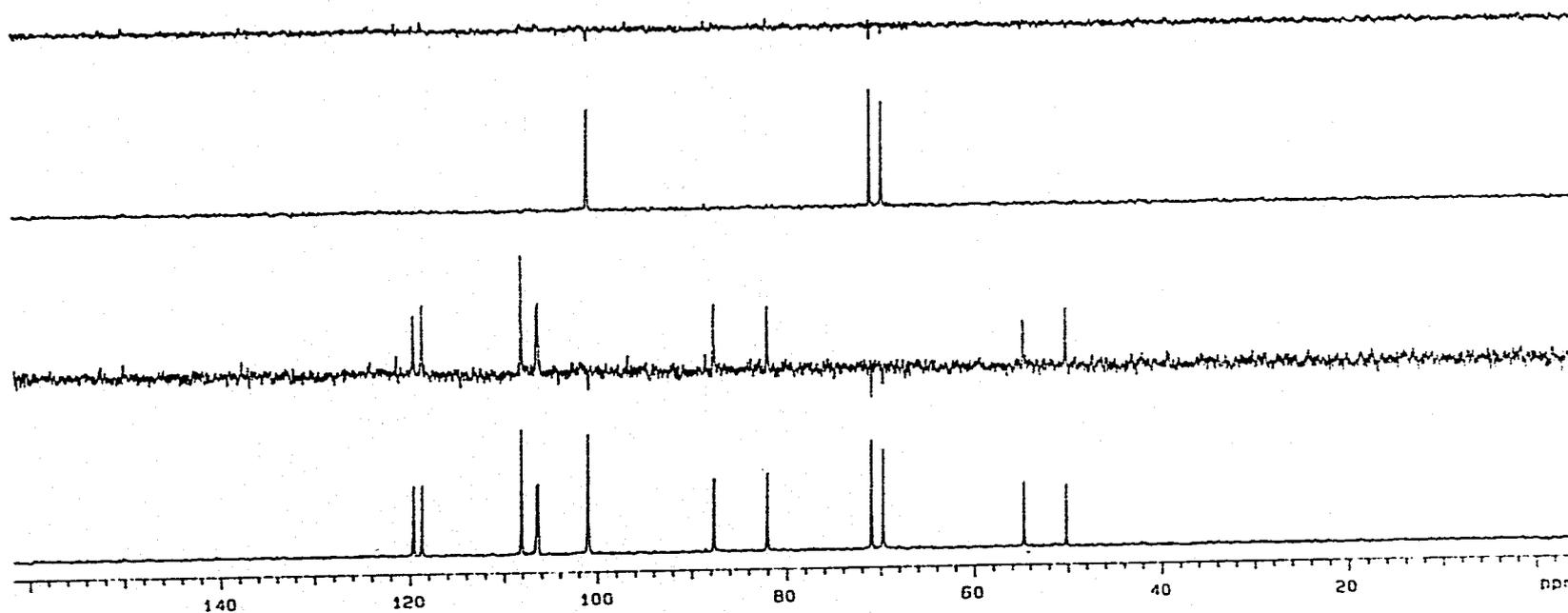
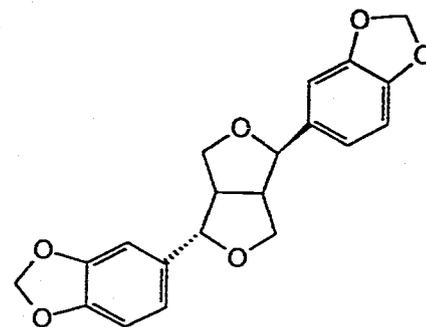
Ion Mode : EI+



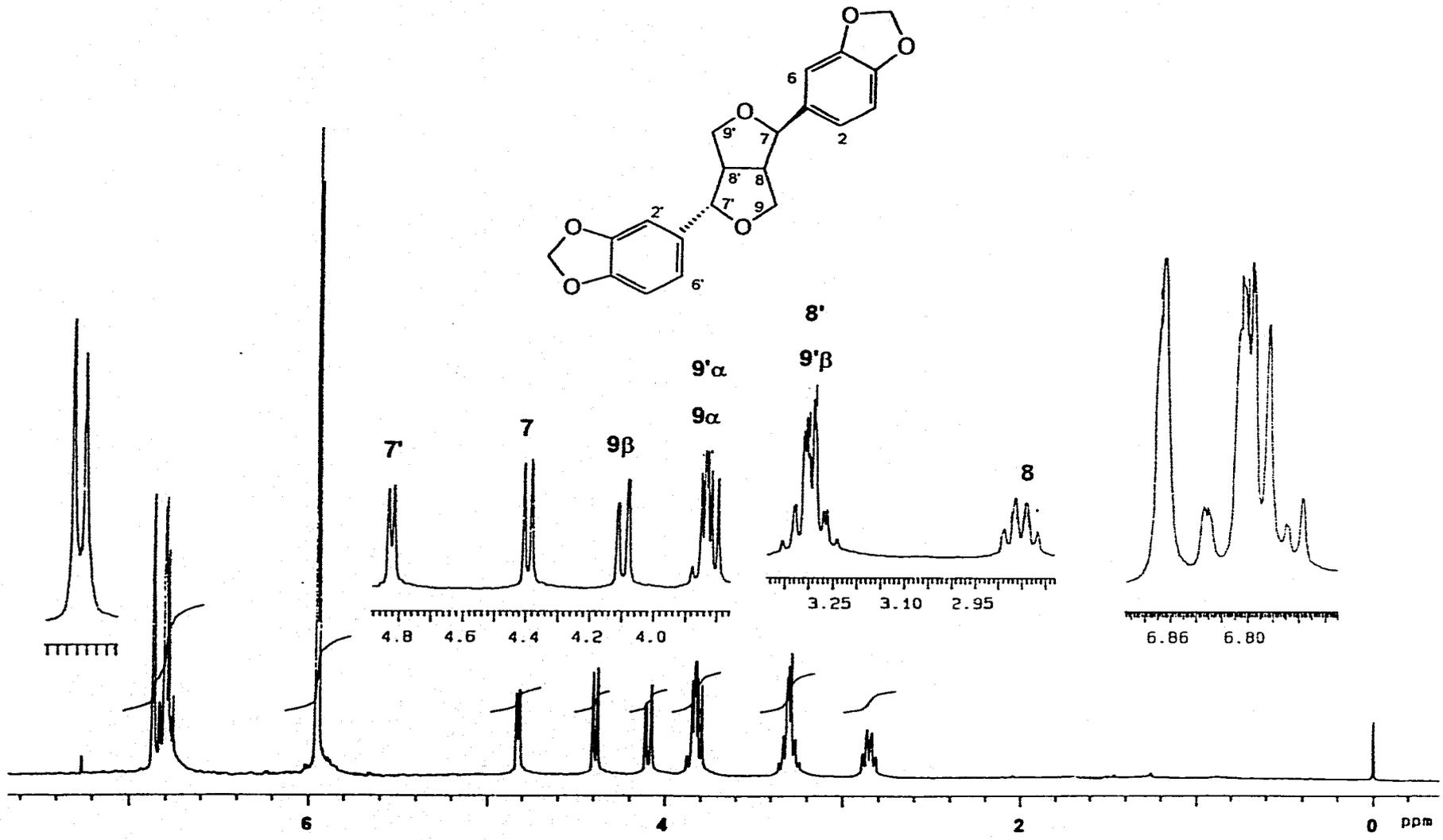
Espectro 38. Espectro de masas de la asarinina 4.



Espectro 39. Espectro de RMN- ^{13}C de la asarinina **4**.



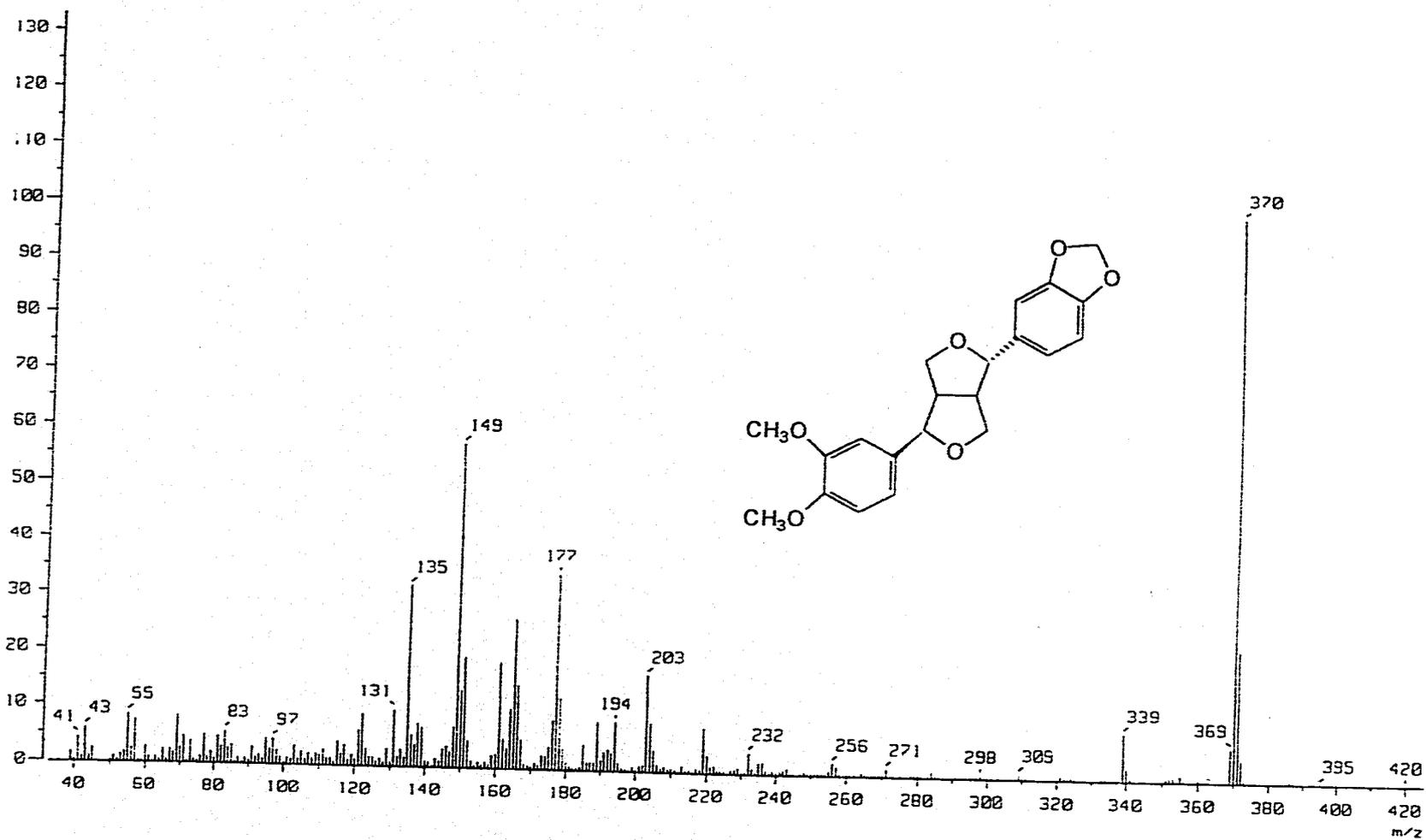
Espectro 40. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT de la asarinina 4.



120

Espectro 41. Espectro de RMN-¹H de la asarinina 4.

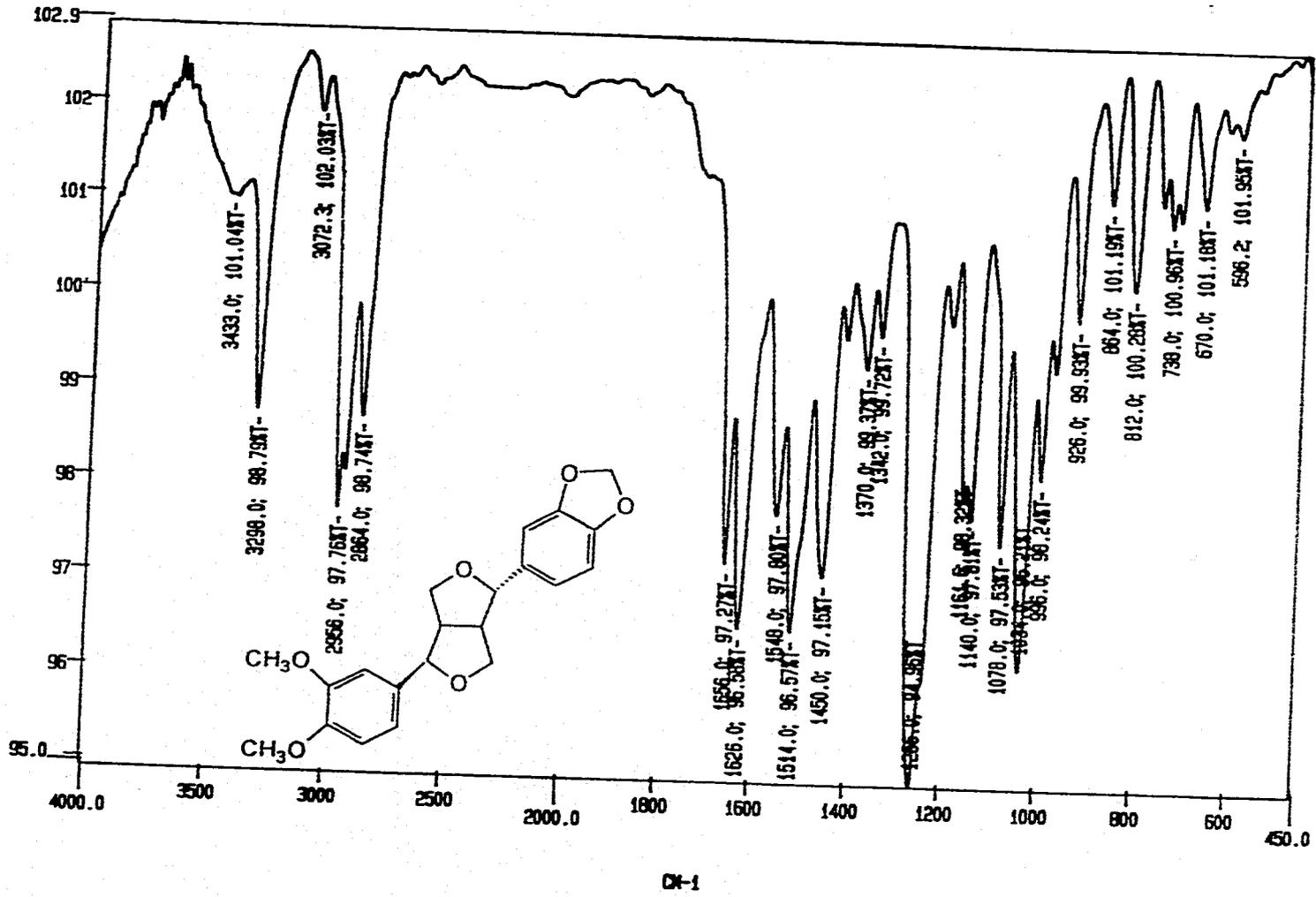
Ion Mode : EI+



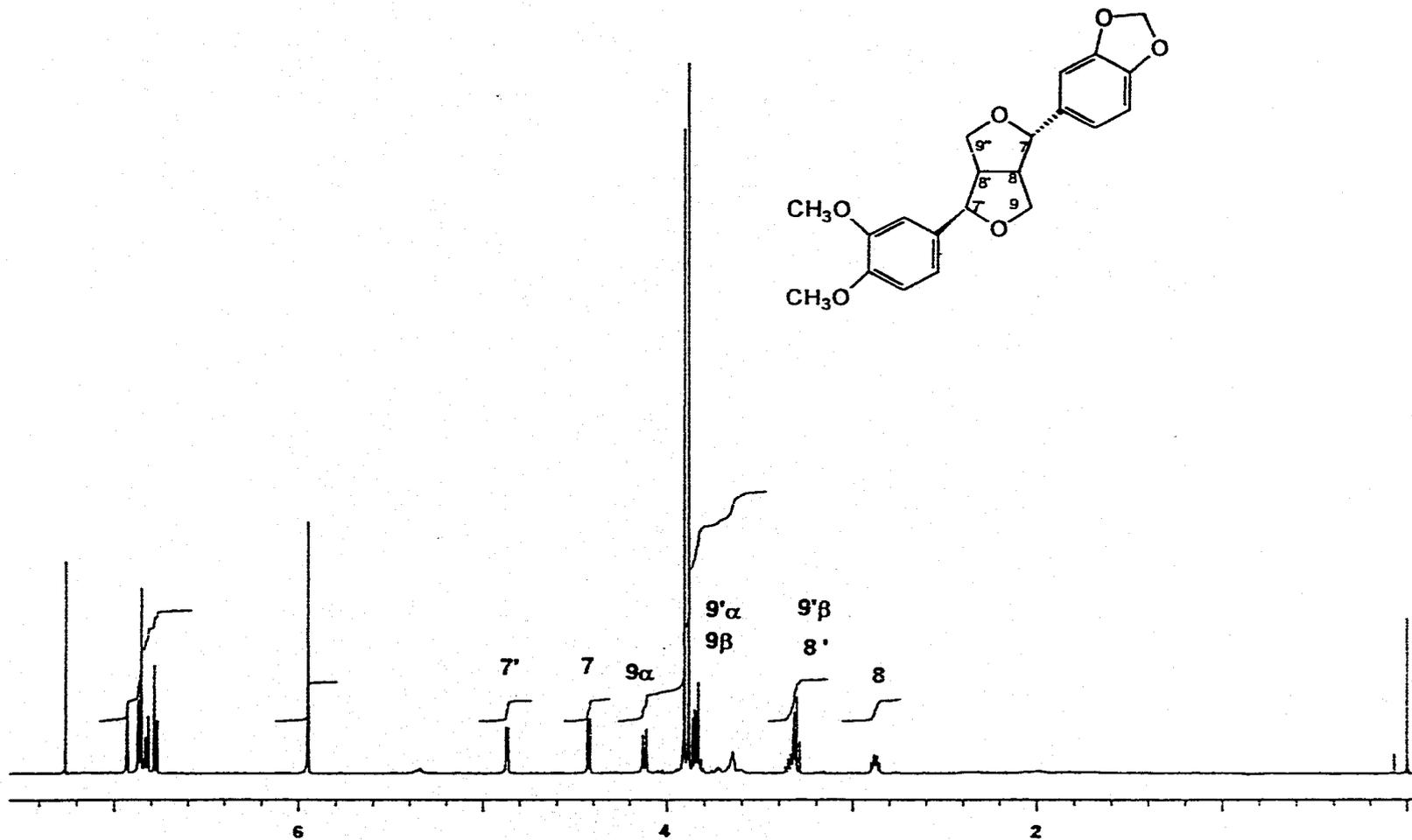
121

Espectro 42. Espectro de masas de la fargesina 10.

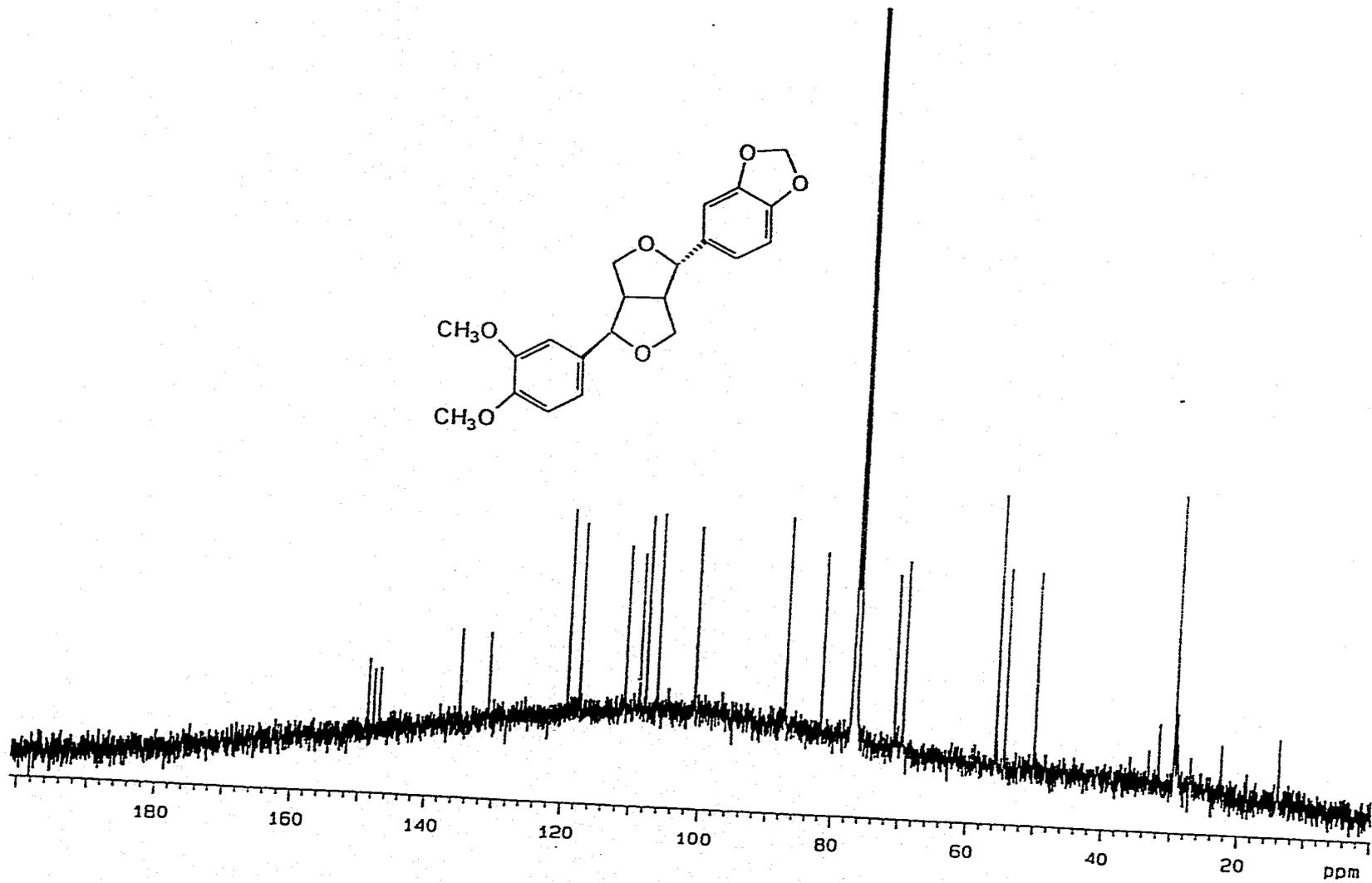
24



Espectro 43. Espectro de IR de la fargesina 10.



Espectro 44. Espectro de RMN- ^1H de la fargesina 10.



Espectro 45. Espectro de RMN-¹³C de la fargesina 10.

BIBLIOGRAFIA

Abaul, J.; Philogene, E. y Bourgeois, P. Contribution a la connaissance des Rutacées américaines: Etude des feuilles de *Triphasia trifolia*. *Journal of Natural Products*, **57**, 846-848, (1994).

Abu-Mustafa, E. A. y Fayez, M. B. E. Natural Coumarins. I. Marmesin and Marmesinin, further products from the fruits of *Ammi majus*. *J. Org. Chem.* **26**, 161-166, (1961).

Abu-Mustafa, E. A.; El-Bay, F. K. y Fayez, M. B. E. Amminin, a new coumarin constituent from *Ammi majus* L. Fruits. *Naturwissenschaften* **62**, 39-40, (1975).

Acevedo, L. y Estrada, S. Estudio químico y biológico preliminar de *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, (1995).

Ahmad, J.; Wizart, K.; Shamsuddin, K. M.; Zaman, A. y Connolly, J. D. Jangomolide, a novel limonoid from *Flacourtia jangomas*. *Phytochemistry*, **23**, 1269-1270, (1984).

Ahmad, A.; Misra, L-N.; Gupta, M. M. Hydroxyalk-(4Z)-enoic acids and volatile components from the seeds of *Zanthoxylum armatum*. *Journal of Natural Products*, **56**, 456-460, (1993).

Al-yahya, M. A.; Al-Rehaily, A. J. Ahmad, M. S.; Al-Said, M. S. y El-Ferally, F. S. New alkaloids from *Haplophyllum tuberculatum*. *Journal of Natural Products*, **55**, 899-903, (1992).

Anaya A. L.; Calera, M.; Mata, R. y Pereda, M. R. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2145-2152, (1990).

Anaya A. L.; Ramos O. R. L.; Cruz O. R. y Hernández J. Studies on allelopathy in México. En Waller G. R. de. Allelochemicals: Role in agriculture and forestry. ACS Symposium Series 330, Washington, 89-101, (1987).

Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L. y Suffeness, M. A. Blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, **2**, 107-111.

Andrade N.; Silveira, E. R.; Braz-Filho, R.; Gambardela, M.; Santos, R. 24-Methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. *Phytochemistry*, **35**, 739-743, (1994).

Arisawa, M.; Handa, S. S.; McPherson, D. D.; Lankin, D. C.; Cordell, G. A.; Fong, H. H. S. y Farnsworth, N. R. Cleomiscosin A from *Simaba multiflora*, *Soulamea soulameoides* and *Matayba arborescens*. *J. Nat. Prod.* **47**, 300-307, (1984).

Amason, J. T.; Philogene, J. R. y Towers, G. H. N. Phototoxins in plant-insect interactions, in G. A. Rosenthal, M. R. Berenbaum (eds.). *Hervibores: Their interactions with secondary plant metabolites*, 2nd ed. Vol. 2. Ecological and Evolutionary Processes. 317-343, Academic Press, New York, (1992).

Aruda, M. S. P.; Fernandez, J. B.; Vieira, P. C.; Das, M. F.; Da Silva, G. F. y Pirani, J. R. Protolimonoids and lignans from *Zanthoxylum petiolare*. *Phytochemistry*, **36**, 1303-1306, (1994).

- Ayres, D. C. y Loickek, J. D. Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties. Cambridge University Press. Cambridge UK. (1990).
- Bakhtiar, A.; Gleye, J.; Moulls, C.; Founaste, I. O-Glucosyl-C-glycosylflavones from *Galipea trifoliata*. *Phytochemistry*, **35**, 1593-1594, (1994).
- Baskin, J. M.; Lodlow, C. J.; Harris, T. M. y Wolf, F. T. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, **6**, 1209-1213 (1967).
- Beier, R. C. y Oertli, E. H. Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry*, **22**, 2595-2597, (1983).
- Ben-Yehoshua, S.; Rodov, V.; Kim, J. J. y Carmeli, S. Preformed and induced antifungal materials of citrus fruits in relation to the enhancement of decay resistance by heat and ultraviolet treatments. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1217-1221, (1992).
- Benner, J. P.; Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science*, **39**, 95-102, (1993).
- Bennet, E. L. y Bonner, J. Isolation of plant growth inhibitor from *Thamnosia montana*. *Am J. Botany*, **40**, 29-33, (1953).
- Bennet, R. D.; Hasewaga, S. y Herman, Z. Glucosides of acidic limonoids in Citrus. *Phytochemistry*, **28**, 2777-2781, (1989).
- Bentley, K.W. b-Phenylethylamines and isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports* **8**, 339-366, (1991).
- Bentley, K.W. β -Phenylethylamines and isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports* **10**, 449-470, (1993).
- Berenbaum, M. R. Coumarins . In *Hervibores their interaction with secondary plant metabolites* (Rosental, G. A. y Berenbaum, M. R. eds.), 2nd Edn. Vol. 1 Academic Press, New York, 221-249, (1991).
- Berenbaum, M. R. Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: A case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science*, **201**, 532-533 (1978).
- Berhow, M. A.; Bennet, R. D.; Kanas, K.; Poling, S. M. y Vandercook, C. E. A Malonic acid ester derivative of Naranginin in grapefruit. *Phytochemistry*, **30**, 4198-4200, (1991).
- Berhow, M. A.; Bennet, R. D.; Poling, S. M.; Vannier, S.; Hidaka, T. y Omura, M. Acylated flavonoids in callus cultures of *Citrus aurantifolia*. *Phytochemistry*, **36**, 1225-1227, (1994).
- Berhow, M. A.; Omura, M.; Ohta, H.; Ozaki, Y. y Hasewaga, S. Limonoids in seeds of three *Citrus* hybrids related to *Citrus ichangensis*. *Phytochemistry*, **36**, 923-925, (1994).
- Bhattacharyya, P.; Biswas, G. K.; Barua, A. K.; Saha, C.; Roy, I. B. y Chowdhury, B. K. Clausenalene, a carbazole alkaloid from *Clausena heptaphylla*. *Phytochemistry*, **33**, 248-250, (1993).
- Bhattacharyya, P.; Maiti, A. K.; Basu, K. y Chowdhury, B. K. Carbazole alkaloids from *Murraya koenigii*. *Phytochemistry*, **35**, 1085-1086, (1994).
- Blade, R. J.; Burt, P. J. y Moss, M. D. *Pest. Sci.* **25**, 329-325, (1985).
- Boeykens, M.; De Klimpe, N.; Debenedetti, S. L.; Nadinik, E. L.; Gomez, M A.; Coussio, J. D.; Aбыshev, A. Z. y Gindin, V. A. Revision of the structure of Obtusifol. *Phytochemistry*, **36**, 1559-1560, (1994).

- Bohlmann, F.; Jacob, J. y Grenz, M. Über Inhaltsstoffe von *Scaevola lobelia* (Th) Murr. *Chem. Ber.* 108, 433-436. (1975).
- Borges del Castillo, J.; Secundino, M.; Hartley, T. G. y Waterman, P. G. Four aromatic derivatives from *Ruta angustifolia*. *Phytochemistry*, 25, 2209-2210, (1986).
- Bose, P. K. On some biochemical properties of natural coumarins. *J. Ind. Chem. Soc.* 35, 367-375, (1958).
- Bowers, W. S.; Ortega, F.; You, X. y Evans, P. H. Insect repellents from the chinese prickly ash *Zanthoxylum bungeanum*. *Journal of Natural Products*, 56, 935-938, (1993).
- Brooker, R. M.; Eble, J. N. y Starkovsky, N. A. Chalepentin, chalepin y chalepin Acetate, three novel furocoumarins from *Ruta chalepensis*. *Lloydia*. 30, 73-76, (1967).
- Brown, S. A. Coumarins, The biochemistry of plants, a comprehensive Treatise. Con, E. E. (eds.) Academic Press New York. (1981).
- Byrne, L. T.; Tri, M. V.; Phuong, N. M.; Sargent, M. V.; Skeleton, B. W. y White, A. H. Perforatin: A novel tetranortriterpenoid from *Harrisonia perforata*. *Aust. J. Chem.* 44, 165-169, (1991).
- Cadet, J.; Vigny, P. y Midden, W. R. Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *J. Photochem. Photobiol.* 6, 197-206, (1990).
- Calera, M. M. Efecto de algunos aleloquímicos (Lactonas sesquiterpénicas y 4-fenilcumarinas) sobre la fase luminosa de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de *Splnaceae oleraceae* L. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM. (1995).
- Campos, A. M.; Khac, D. D. y Fetizon, M. Chromones from *Dictyoloma incanescens*. *Phytochemistry*, 26, 2819-2832, (1987).
- Candy, D. J.; Gbewonyo, W. S. K. y Anderson, M. Structure-Activity Relationships of Insecticidal Amides from *Piper guineense* Root. *Pest. Sci.* 37, 57-66, (1993).
- Cole, R. S. Psoralen monoadducts and interstrand cross-links in DNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 254, 30-39. (1971).
- Connolly, J. D.; Ngouela, S. y Tsamo, E. Lignans and other constituents of *Zanthoxylum heitzii*. *Phytochemistry*, 37, 867-869, (1994).
- Couillerot, E.; Caron, C.; Comoe, L.; Audran, J. C.; Molinati, P.; Reches, M.; Men-Ollvier, L.; Jardillier, J. C. y Cheniux, J. C. Benzophenanthridine and furoquinoline accumulation in cell suspension cultures of *Fagara zanthoxyloides*. *Phytochemistry*, 37, 425-428, (1994).
- Cragg, G.; Shepartz, S.; Suffness, M. y Grever. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 56, 1657-1668, (1993).
- Cremllyn, R. y Campbell, W. Pesticides: Preparation and Mode of Action. J. Wiley. (1991).
- Cromble, L. Amides of vegetable origin. Part IV. The nature of pellitorine and anacyclin. 999-1006, (1955).
- Chakraborty, A.; Chowshury, B. K. y Bhattacharyya. Clausenol and clausenine two carbazole alkaloids from *Clausena anisata*. *Phytochemistry*, 40, 295-298, (1995).
- Champange, D. E.; Koul, O.; Isman, B. M.; Scudder, G. E. y Towers, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, 31, 377-394, (1992).

- Chan, B. G.; Waiss, A. C. Jr.; Stanley, W. L. y Goodban, A. E. *J. Econ. Entomol.* **71**, 366, (1978).
- Chatterjee, A. y Mitra, S. S. On the constitution of the active principles isolated from the matured bark of *Aegle marmelos*, Correa. *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 606-609, (1949).
- Chen, I-S.; Lin, Y-C.; Tsai, I-L.; Teng, C-M.; Ko, F-N.; Ishikawa, T.; Ishii, H. Coumarins and antiplatelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, **39**, 1091-1097, (1995).
- Chen, I-S.; Tsai, I-L.; Wu, S-J.; Sheen, W-S.; Ishikawa, T. y Ishi, H. Toddaquinoline from formosan *Toddalia asiatica*. *Phytochemistry*, **34**, 1449-1451, (1993).
- Chen, I-S.; Wu, S-J.; Lin, Y-C.; Tsai, I-L.; Seki, H.; Ko, F-N. y Teng, C-M. Dimeric-2-quinolone alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*, **36**, 237-239, (1994).
- Chen, I-S.; Wu, S-J.; Tsai, I-L.; Wu, T-S.; Pezzuto, J. M.; Lu, M. C. y Su, H. C. N. Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. *Journal of Natural Products*, **57**, 1206-1211, (1994).
- Chou, C-J. y Lin, L-C. Novel acetophenones from fruits of *Evodia merillii*. *Journal of Natural Products*, **55**, 795-799, (1992).
- De Silva, L. B.; Herath, W. M.; Liyanage, C.; Kumar, V.; Ahmad, V. U. y Sultana, A. Demethylacrovestone from *Achronychia pedunculata* fruits. *Phytochemistry*, **30**, 1709-1710, (1991).
- Del Río, J. A.; Benavente, O.; Castillo, J. y Borrego, F. Neodismin, a flavone glycoside of *Citrus Aurantium*. *Phytochemistry*, **31**, 723-724, (1992).
- Desoky, E.K. Long chain polyprenyl acetates in *Murraya exotica*. *Phytochemistry*, **39**, 1383-1385, (1995).
- Elavumoottil, L.; Garnier, J.; Mahuteau, J. y Plat, M. Two methylendioxi flavones from *Zieridium ignambiensis*. *Phytochemistry*, **30**, 3488-3489, (1991).
- Engler, A.; Rutaceae. En Engler and Prantl. Die natürlichen Pflanzen Familien. 2nd. Ed. 187-459. (1931).
- Escoubas, P.; Fukushi, Y.; Lajide, L. y Mizutani, J. A new method for fast isolation of insect antifeedant compounds from complex mixtures. *J. Chem. Ecol.* **18**, 1819-1832, (1992).
- Ezell, E. y Smith, L. ¹H and ¹³C-NMR Spectra of Camptothecin and derivatives. *J. Nat. Prod.* **54**, 1645-1650, (1991).
- Farnsworth N. R. y Wagner H. (eds.). Economic and Medicinal Plant Research. Vol. 4 y 6, (1990).
- Feuer, G. Inhibition and enhancement of mammary tumorigenesis by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Int J. Clin Pharmacol. Ther. Toxicol* **9**, 62-69, (1974).
- Foumet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cave, A.; Richomme, P. y Bruneton, J. Les Chimaniines, nouvelles quinoléines substituées en 2, isolées d' une plante Bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1547-1552, (1993).

- Fraga, B. M. Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports* 9, 217-241, (1992).
- Frederic M.; Bevalot F.; Laude V. y Vaquette, J. Alkaloids from stem bark of *Dutailleya baudouini*. *Phytochemistry*, 31, 1087-1089, (1992).
- Funayama, S.; Murata, K. y Nozoe, S. Quinoline alkaloids from *Orixa japonica*. *Phytochemistry*, 36, 525-528, (1994).
- García, C.; Potencial aleloquímico de *Stauranthus perforatus* Liebm. (Rutaceae) "Tankas-ché". Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, 1995.
- Gebreyesus, T. y Chapya A. Antifeedants from *Clausena anisata* (Willd.) Hook F. ex Benth (Rutaceae). *Curr. Themes Trop. Sci. (Nat. Prod. Innovative Pest Manage)*, 2, 237-242, (1983).
- Gerzon, K. y Svoboda, G. H. Acridone alkaloids: Experimental antitumor activity of acronycine. En: *The Alkaloids*. A. Brossi (ed.). 21, Academic Press, New York, 1-28 (1983).
- Ghosh, P.; Akihisa, T.; Tamura, T. y Kimura, Y. Dihydroxy- Acidissiminol and Acidissiminol epoxide, two tyramine derivatives from *Limonia Acidissima*. *Phytochemistry*, 37, 757-760, (1994).
- Ghosh, P.; Prabal, S.; Das, S. y Thakur, S. Tyramine derivatives from the fruit *Limonia Acidissima*. *Journal of Natural Products*, 54, 1389-1393, (1991).
- Gomes, C. M. R. y Gottlieb, O. R. Alkaloid evolution and angiosperm systematics. *Biochem. Syst. Ecol*, 8, 81-87, (1980).
- González, A. G.; Darías, V.; Alonso, G.; Boada, J. N. y Rodríguez-Luis, F. Cytostatic activity of some Canary Islands species of Rutaceae. *Planta Med.* 31, 351-356, (1977).
- Goswami, R.; Goswami, K. N.; Yadava, V. S.; Padmananbhan, V. M.; Koul, S. K. y Dhar, K. L. Crystal and molecular structures of methyl pluviatilol. *Indian J. Phis, Sect A.* 65, 101, (1991).
- Gottstein, D.; Gröger, D.; Sulistyowati, L.; Keane, P. J. y Anderson, J. W. Accumulation of the phytoalexin, 6,7-dimethoxycoumarin, in roots and stems of citrus seedlings following inoculation with *Phytophthora citriophora*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 37, 451-461, (1990).
- Gray, A. I. Coumarins and chromones of the Rutales. In: *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* (Waterman, P. G.; Grundon, M. F. eds.) Academic Press, London, (1983).
- Gray, A. I. Quinoline alkaloids. In *Methods In Plant Biochemistry*, Vol 8, Nitrogen and Sulphur Containing compounds. (Waterman, P. G. ed.) Academic Press, London, (1992).
- Grayer R. J. y Harborne, J. B. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37, 19-42, (1994).
- Greger, H.; Hadacek, F.; Hofer, O.; Wurz, G. y Zechner, G. Different types of sulphur-containing amides from *Glycosmis cf. chloperma*. *Phytochemistry*, 32, 933-936, (1993)
- Greger, H.; Hofer, O.; Kahlig, H. y Wurz, G. Sulfur containing cinnamides with antifungal activity from *Glycosmis cyanocarpa*. *Tetrahedron.* 48, 1209-1218, (1992).

Greger, H.; Hoffer, O.; Zechner, G.; Hadacek, F. y Wurz, G. Sulphones derived from methylthiopropenoic acid amides from *Glycosmis angustifolia*. *Phytochemistry*, **37**, 1305-1310, (1994).

Greger, H.; Tsai, I-L.; Teng, C-M. y Chen, I-S. Sulphur-containing amides from *Glycosmis* species with a different antifungal activity. *Phytochemistry*, **34**, 175-179, (1993a).

Grundon, M. F. Quinoline alkaloids related to anthranilic acid. In *The Alkaloids*, Vol 30 (Brossi, A. ed.) Academic Press, New York, 341-439.

Guilhon, M. S. P.; Baetas, A. C. S.; Maia, J. G. S. y Conserva, L. M. 2-Alkyl-4-quinolone alkaloids and cinamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*. *Phytochemistry*, **37**, 1193-1195, (1994).

Guisalberti, E. L. Capítulo 2 "Detection and Isolation of bioactive natural products". In *Detection, Isolation and Structural Determination*. CRC. Press, Florida 9-51, (1993).

Gunatilaka, Kingston, D. G.; Wijeratne, E. M. K.; Bandara, B. M. R. y Hofman, G. A. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. *Journal of Natural Products*, **57**, 518-520, (1994).

Hadacek, F.; Müller, C.; Werner, A.; Greger, H. y Proksch. Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). *J.Chem. Ecol.* **20**, 2035-2054, (1994).

Haji, A.; Momose, Y.; Takeda, R. y Nakanishi, S. Increased feline cerebral blood flow induced by dehydroevodiamine hydrochloride from *Evodia rutaecarpa*. *Journal of Natural Products*, **57**, 387-389, (1994).

Haller, H. L.; La Forge, F. B. y Sullivan, W. N. Some compounds related to sesamin: their structure and their synergistic effect with pyrethrum insecticides. *J. Org. Chem.* **7**, 185-188, (1942).

Hamburguer, M.; Marston, A.; y Hostettmann, K. Search for new drugs of plant origin, in *Advances in Drug Research*, Vol 20, Testa, B.; (de.). Academic Press London, 167, (1991).

Harborne, J. B. The flavonoids of the Rutales. In *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* (Waterman, P. G. Grundon, M. F. eds.) Academic Press, London, 147-173, (1983).

Hassanali, A.; Bentley, M. D.; Slawin, A. M. Z.; Williams, D. J. Shepard, R. N. y Chaphya, A. W. En : a spiro tetranortriterpenoid insect antifeedant from *Harrisonia abyssinica*. *Phytochemistry* **26**, 573-575, (1987).

Hatakoshi, M.; Miyakado, M.; Ohno, N. y Nadayama, I.; *Appl. Entomol Zool.* **19**, 288-292, (1984).

Heath-Pagliuso, S.; Mattin, S. A.; Fang, N. B.; Thompson, R. H. y Rappaport, L. Stimulation of furanocoumarin accumulation in celery and celeriac tissues by *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii*. *Phytochemistry* **31**, 2683-2688, (1992).

Hegnauer R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*, 9, Springer Verlag, Basel, (1991).

Horwitz, S. Mechanism of action of taxol. *Trends. Pharm. Sci.* **13**, 134-136, (1992).

- Hostettmann K. y Hamburger M. Bioactivity in Plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30, 3864-3874, (1991).
- Hostettmann, K.; Chou, F. Y.; Kubo, I.; Nakanishi, K. y Taniguchi, M. Isolation of an insect antifeedant N-methylindersine and several benzo[c]phenanthridine alkaloids from east African plants; a comment on chelerythrine. *Heterocycles*, 7, 967-977, (1977).
- Hou, R-S.; Duh, C-Y.; Wang, S-K.; Chang, T-T. Cytotoxic Flavonoids from the leaves of *Melicope triphylla*. *Phytochemistry*, 35, 271-272, (1994).
- Hsiang, Y-H.; Hertzberg, R.; Hecht, S. y Liu, L-F. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase. *Y. J. Biol. Chem.* 260, 14873-14878, (1985).
- Ida, Y.; Satoh, Y.; Ohtsuka, M.; Nagasao, M. y Shogi, J. Phenolic constituents of *Phellodendron amurense* bark. *Phytochemistry*, 35, 209-215, (1994).
- Ishii, H y Ishikawa, T. Structural establishment of amocoumarin and amottiacoumarin due to chemical modification of marmesin and rutaretin methyl ether. *Chem Pharm. Bull.* 26, 2598-2600, (1978).
- Ito, C.; Kanbana, H.; Wu, T-S. y Furukawa, H. Murrayamine-C from *Murraya euchrestifolia*. *Phytochemistry*, 31, 1083-1084, (1992).
- Jacobson, M. "Naturally Occurring Insecticides." Jacobson, M; Crosby, D. G. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York. 139-176, (1971).
- Jen, C-M.; Tsal, I-L.; Horng, D-J. y Chen, I-S. Isolation and structure determination of two new compounds from *Zanthoxylum integrifolium*. *Journal of Natural Products*, 56, 2019-2021, (1993).
- Johns, T.; Graham, K. y Towers, G. N. H. Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from Asteraceae. *Phytochemistry*. 21, 2737-2738, (1982).
- Johnson, C.; Branon, D. R. y Kuk, J. Xanthotoxin: A phytoalexin of the *Pastinaca sativa* root. *Phytochemistry*. 12, 2961-2962. (1973).
- Joseph, C. Thin layer Chromatography: Quantitative environmental and clinical applications. Joseph, C. y Rogers, D. (eds.). New York Wiley, (1980).
- Joshi, P. C.; Mandal, S.; Das, P. C.; Chatterjee, A. Two minor coumarins of *Boenninghausenia albiflora*. *Phytochemistry*, 32, 481-483, (1993).
- Joshi, P. C.; Mandal, S.; Das, P. C.; Chatterjee, A. Albiflorin-1, a coumarin from *Boenninghausenia albiflora*. *Phytochemistry*, 30, 2094-2096, (1991).
- Jurd, L.; King, A. D. Jr. Bayne, H. y Mihara, K. Antimicrobial properties of natural phenols III. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. *Phytochemistry*. 10, 2965-2970, (1971).
- Kakisawa, H.; Chen, Y. P. y Hsü H. Y. Lignans in flower buds of *Magnolia fargessii*. *Phytochemistry* 11, 2289-2293, (1972).
- Kamikado, T.; Chang, C-F.; Murakoshi, S.; Sakurai, A. y Tamura, K. Isolation and structure elucidation of growth inhibitors on silkworm larvae from *Magnolia kobus* D.C. *Agric. Biol. Chem.* 39, 833-836, (1975).
- Kishi, K.; Yoshikawa, K. y Arihara, S. Limonoids and protolimonoids from the fruits of *Phellodendron amurense*. *Phytochemistry*, 31, 1335-1338, (1992).

Klocke, J. A.; Balandrin, M. F.; Bamby, M. A. y Yamasaki, R. B. Limonoids, Phenolics, and Furanocoumarins as Insect Antifeedants, Repellents, and Growth Inhibitory compounds. Arnason, B. J. R. Philogene y Morand, P (eds.). *Insecticides of plant origin* ACS, Washington D. C. 137-149, (1989).

Koike, K. y Ohmoto, T. Canthin-6-one alkaloids. In *The Alkaloids* (Brossi, A. ed.) Vol. 36, Academic Press, New York, 135-170, (1989).

Kong, Y.-C.; But, P. P.-H.; Ng, K.-H.; Li, Q.; Cheng, K.-F. y Waterman, P. G. Micromelum: A key genus in the chemosystematics of the Clausenae. *Biochem. System. Ecol.* 16, 485-489, (1988).

Kubo, I.; Klocke, J. A. y Matsumoto, T. Insecticidal and molluscicidal activities of isobutylamides isolated from *Fagara macrophylla* and their synthetic analogs. *ACS*, 163-172, (1984).

Kubo, I.; y Klocke, J. A. in "Plant Resistance to Insects". ACS Symposium Series 208, American Chemical Society: Washington D. C. 329-346, (1983).

Kung-Ying, Y. y Ling-Ling, Y. Antibacterial agents from coumarins of Umbelliferae plants. *T'ai-wan K'o Hsueh*, 33, 1-12, (1979).

Kumar, V.; Bulumulla, H. N. K.; Wimalasini, W. R. y Reisch, J. Coumarins and Indole alkaloid from *Pamburus missionis*. *Phytochemistry*, 36, 879-881, (1994).

Kumar, V.; Niyaz, N. M.; Wickramaratne, D. B.M.; Balasubramanian, S. Tirucalane derivatives from *Paramignya monophylla* fruits. *Phytochemistry*, 30, 1231-1233, (1991).

Kumar, V.; Vallipuram, K.; Adebajo, A. C. y Reisch, J. 2,7-dihydroxy-3-formyl-1-(3'-methyl-2'-butenyl)-carbazole from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 40, 1563-1565, (1995).

Lavaud, C.; Massiot, G.; Vasquez, C.; Moretti, C.; Sauvan, M. Balderrama, L. 4-Quinoline alkaloids from *Dyctyoloma perviana*. *Phytochemistry*, 40, 317-320, (1995).

Lewis, J. R. Muscarine, oxazole, imidazole, thiazole and peptide alkaloids and other miscellaneous alkaloids. *Natural Product Reports* 10, 29-50, (1991).

Ley S. V. y Merrit, A. T. Clerodane diterpenoids. *Natural Product Reports* 9, 243-287, (1992).

Li W.-S.; Mc Chesney, J. D. y El-farly, F. S. Carbazole alkaloids from *Clausena Lansium*. *Phytochemistry*, 30, 343-346, (1991).

Lichius, J. J.; Cosson, J. P.; Hadi, A. H. A.; Thoison, O.; Montagnac, A.; Païs, M.; G-Voegelín, F. y Sévenet, T. Antimitotic and cytotoxic flavonols from *Ziendium pseudobtusifolium* and *Acronychia porteri*. *Journal of Natural Products*, 57, 1012-1016, (1994).

Lle-Chwen Lin. Two new acetophenones from fruits of *Evodia merillii*. *Journal of Natural Products*, 56, 926-928, (1993).

Lontsi, D.; Ayafor, J. F. Sondengam, B. L.; Connolly, J. D. y Rycroft, D. S. The use of two-dimensional long-range δ_H/δ_C correlation in conjunction with the one dimensional proton-coupled ^{13}C -NMR spectrum in the structural elucidation of ekeberginine, a new carbazole alkaloid from *Ekebergia senegalensis* (Meliaceae). *Tetrahedron Letters*, 26, 4249-4252, (1985).

- Lumonadio, L. y Vanhaelen, M. Indole alkaloids from *Hannoa klaineana* roots. *Phytochemistry*, **23**, 453-455, (1984).
- Luthria, D. L.; Ramakrishnan, V. y Banerji, A. Insect antifeedant activity of furochromones structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, **56**, 671-675, (1993).
- Luthria, D. L.; Ramakrishnan, V.; Verma, G. S.; Prabhu, B. R. y Banerji, A. Insect antifeedants from *Atalantia racemosa*. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1435-1437, (1989).
- Macías, F. A.; Massanet, G. M. y Rodríguez, L. F. ¹³C-NMR of coumarins I. 3-(1',1'-dimethylalil)-xanthyletin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **27**, 705-706, (1989).
- Macías, F. A.; Galindo, J. C. G.; Massanet, G. M.; Rodríguez-L, F.; Zubía, E. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *J. Chem. Ecol.* **19**, 1371-1379, (1993).
- Maier, V. P. Chemistry and significance of selected *Citrus* limonoids and flavonoids. In *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* (Waterman, P. G.; Grundon, M. F. eds.) Academic Press, London, 319-342, (1983).
- Maier, W.; Baumert, A.; Schuman, B.; Furukawa, H. y Gröger, D. Synthesis of 1,3-dihydroxy-N-methylacridone and its conversion to rutacridone by cell-free extracts of *Ruta Graveolens* cell cultures. *Phytochemistry*, **32**, 691-698, (1993).
- Manzini, P.; Rodighiero, P.; Pastorini, G. y Guiotto, A. ¹H-NMR Spectra of pyranocoumarins. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **25**; 740-742; (1987).
- Martin, J. T.; Baker, E. A. y Byrde, R. J. W. *Ann. Appl. Biol.* **46**, 501, (1966).
- Massanet G. M.; Galán H. R.; Pando E.; Rodríguez F y Salva J. Synthesis of (±)-3-(1',1'-dimethylalil)-decursinol y 3-(1',1'-dimethylalil)-xanthyletin. *Heterocycles*, **27**, 775-777, (1988).
- Masuda, T.; Muroya, Y. y Nakatani, N. 7-hydroxycoumarin derivatives from the juice oil of *Citrus hassaku*. *Phytochemistry*, **31**, 1363-1366, (1992).
- Mester, I. Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutaceae. En *Chemical Taxonomy of the Rutales*. Waterman y Grundon (eds.). Academic Press, London 31-96, (1983).
- Michael, J. P. Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids. *Natural Product Reports* **8**, 53-68, (1991).
- Michael, J. P. Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids. *Natural Product Reports* **9**, 25-35, (1992).
- Michael, J. P. Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids. *Natural Product Reports* **10**, 99-108, (1993).
- Michael, J. P. Quinoline, quinazoline, and acridone alkaloids. *Natural Product Reports* **11**, 163-172, (1994).
- Miyakado, M.; Nakayama, I.; Yoshioka, H. y Nakatani, N. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1609, (1979).
- Miyake, M.; Ozaki, Y.; Ayano, S.; Bennet, R. D.; Herman, Z. y Hasewaga, S. Limonoid glucosides in Calamondin seeds. *Phytochemistry*, **31**, 1044-1046, (1992).
- Mizuno, M.; Xiong, Q.; Shi, D. Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. *Phytochemistry*, **39**, 723-725, (1995).

- Mizutani, K.; Fukunaga, Y.; Tanaka, O.; Takasugi, N.; Saruwatari, Y.-I.; Fuwa, T.; Yamauchi, T.; Wang, J.; Jia, M-R; Li F. Y. y Ling, Y-K. Amides from Huajiao, pericarps of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Chem Pharm. Bull.* 36, 2362-2365, (1988).
- Molynoux R. J. y Colegate S. M. (eds.) *En Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination.* CRC. Press. Florida 159-172, (1993).
- Moroland, D. E. Mechanism of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 31, 597-638, (1980).
- Muckensturm, B.; Duplay, D.; Roberyt, P. C.; Simonis, M.-T. y Kienlen, J.-C. Substances antiappétantes pour insectes phytophages présentes dans *Angelica silvestris* et *Heracleum sphondylium*. *Biochem. Syst. Ecol.* 9, 289-292, (1981).
- Muller, A. H.; Degaspari, L. R. D.; Vieira, P. C.; Da Silva, M. F. D.; Fernandez, J. B. y Pirani, J. R. 3-Methoxyfurocoumarins from *Pilocarpus riedelianus*. *Phytochemistry*, 34, 585-586, (1993).
- Noble, R. L.; Beer, C. T. y Cutts, J. H. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 76, 893, (1958).
- Ohnuma, T.; obata, R.; Nishiyama, Y.; Yamasaki, Y.; Kamai, H. y Naito, T. Preparation and antitumor activity of 2"-O- 3" and 2", 3"-Di-O -substituted derivatives of etoposide. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1783-1788, (1992).
- Osborne, A. G. y Warmesley J. F. ¹H- and ¹³C-NMR spectral studies of some 2,4-dimethoxyquinolines, inconsistencies with Montrutanine, an alkaloid from *Ruta Montana*. *Journal of Natural Products*, 55, 589-595, (1992).
- Ozaki, Y.; Miyake, M.; Maeda, H.; Ifuku, Y.; Bennet, R. D. y Hasewaga, S. Limonoid glucosides in *Tetradium rutaecarpa*. *Phytochemistry*, 30, 2365-2367, (1991).
- Paulini, H.; Waibel, R.; Schimmer, O. Mutagenicity and structure-mutagenicity relationships of furaquinolines, naturally occurring alkaloids of the Rutaceae. *Mutation Res.* 227, 179-186, (1989).
- Pelter, A.; Ward, R. S.; Rao, E. V. y Sastry, K. V. Revised structures for pluviallitol, methyl-pluviallitol y xanthoxylol. *Tetrahedron*, 32, 2783-2788, (1976).
- Pezzuto J. M. y Angerhofer C. K. Application of biotechnology in drug discovery and evaluation. *En Biotechnology and Pharmacy.* J. M. Pezzuto et al. (eds.) Chapman and Hall, New York, 312-365, (1993).
- Pezzuto, J. M.; Arisawa, M.; Bevelle, C. y Cordell, G. A. Potential anticancer agents XXXI. N-demethylation of fagaronine. *J. Nat. Prod.* 47, 453-458, (1984).
- Phillipson, J. D. y O'Neill, M. J. Antimalarial and amoebicidal natural products. *En: Biologically Active Natural Products.* Hostetmann y Lea (eds.). Clarendon Press, Oxford. 49-64, (1987).
- Piek, T. *In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Kerkut, G. A. y Gilbert, L. I. (eds.). Pergamon Press, Oxford. 11, 55-118, (1985).
- Pillmoor J. B.; Wright K. y Terri S. A. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science.* 39, 131-140, (1993).
- Polonsky, J. Chemistry and biological activity of the quassinoids. *En: Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales.* Waterman y Grundon (eds.). Academic Press London, 247-266, (1983).

- Pozzi, H.; Sánchez, E. y Comin, J. Studies on Argentine Plants-XXII. Hellettin, a new furocoumarin from *Helietta longifoliata* Britt. *Tetrahedron* 23, 1129-1137, (1967).
- Oriowo, M. A. *Planta Med.* 44, 54, (1982).
- Prance G. T. (ed.). *Ethnobotany and the search for new drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons. New York. (1994).
- Quader, A.; Armstrong, J. A.; Gray, A. I.; Hartley, T. G. y Waterman, P. G. Chemosystematics of *Acradenia* and general significance of acetophenones in Rutaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 19, 171-176, (1991).
- Rashid, M. A.; Armstrong, J. A.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. ProtoBruceols: New 6-C monoterpene-5,7-oxygenated coumarins from *Eriostemon brucei* Nat. *Prod. Lett.* 79-84, (1992).
- Raymond D. B.; Hasewaga, S. y Wong, R. Y. Limonoids from *Atalantia zeylanica*. *Phytochemistry*, 36, 163-166, (1994).
- Razdan, T. K.; Qadri, B.; Harkar, S. y Waight, E.S. Chromones and coumarins from *Skimmia lauroala*. *Phytochemistry*, 26, 2063-2069, (1987).
- Reisch, J.; Aladesanmi, A. J.; Adebajo, A. C. y Kumar, V. Two carbazole alkaloids from *Murraya Koenigii*. *Phytochemistry*, 36, 1073-1076, (1994).
- Ríos, M. Y. y Delgado G. Terpenoids and alkaloids from *Esenbeckia belicensis*. Spontaneous oxidation of furoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, 55, 1307-1309, (1992).
- Rodgers B. P. Potencial of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science*. 39, 117-129, (1993).
- Rodighiero, G. Influenza di furanocumarine naturali sulla germinazione dei semi sullo sviluppo dei germogli e delle radici di lattuga. *G. Biochim.* 3, 138-146, (1954).
- Rodighiero, G. E.; Musajo, Y.; Dall'acqua, F.; Marclani, S.; Caporale, G. y Ciavatta, L. Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins: Photoreactivity of varios furocoumarins with native DNA and ribosomal RNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 217, 40-49. (1970).
- Sánchez, L.; Velasco, A. M.; Del Rio, F. Volatile compounds of *Sargentia Greggii*. *Phytochemistry*, 30, 1915-1916, (1991).
- Sánchez, P. y Soto, F. Compuestos bioactivos de *Ratibida mexicana* Wats. Sharp. (Asteraceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM (1994).
- Saxena V. K. y Shrivastava, P. 4-hidroxy-3,6-dimethoxy-6",6"-dimethylchromeno-(7,8,2",3")-flavone from *Citrus reticulata cv blanco*. *Phytochemistry*, 36, 1039-1041, (1994).
- Saxton, J. E. Recent progress in the chemistry of indole alkaloids and mould metabolites. *Natural Product Reports* 8, 251-307, (1991).
- Sheen, W-S.; Tsai, I-L.; Teng, C. M. y Wu, P-L. Nor-neolignan and phenyl propanoid from *Zanthoxylum ailanthoides*. *Phytochemistry*, 36, 213-215, (1994).
- Shimomura, H.; Sashida, Y.; Nakata, H.; Kawasaki, J. y Ito, Y. Plant growth regulators from *Heracleum lanatum*. *Phytochemistry*, 21, 2213-2215, (1982).

- Song, P.; Harter, M. L.; Moore, T. A. y Herndon, W. C. Luminiscence spectra and photocycloaddition of the excited coumarins in DNA bases. *Photochem. Photobiol.* **14**, 521-530, (1971).
- Scott, B. R.; Pathak, M. A. y Mohy, G. H. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutat. Res.* **39**, 27-74, (1976).
- Soine, T. O. Naturally occurring coumarins and related physiological activities. *J. Pharm. Sci.* **53**, 23, (1964).
- Song, F. y Gordon, W. H. Spectroscopic study of excited states of coumarin. *J. Phys. Chem.* **74**, 4234-4240, (1970).
- Srivastava, J. B. *Indian J. Exptl. Biol.* **8**, 224, (1970).
- Stahelin H. F.; Wartburg A. The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: Ninth Cain memoria Award Lecture. *Cancer Research* **5**; 15-15, (1991).
- Stange, R. R. Jr.; Midland, S. L.; Eckeret, J. W. y Sims, J. J. An antifungal compound produced by grapefruit and valencia orange after wounding of the peel. *Journal of Natural Products*, **56**, 1627-1629, (1993).
- Su, H. C. F y Horvart, R. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 115, (1981).
- Tang, W. y Eisenbrand, G. Chinese Drugs of Plant Origen. Chemistry, pharmacology, use in traditional and modern medicine. Springer Verlag, Berlin, 239-285, (1992).
- Tinto, W.; Mc Lean, S. F. y Reynolds, W: F. Hortiamide, a new tyramine alkaloid from *Hortia regia*. *Journal of Natural Products*, **55**, 1676-1678, (1992).
- Towers, G. H. N. Interactions of light with phytochemicals in some natural and novel systems. *Can. J. Bot.* **62**, 2900-2911, (1984).
- Ulubelen, A.; Gil, R. R.; Cordell, G. A.; Mericli, A. H. y Mericli, F. Prenylated lignans from *Haplophyllum ptilostylum*. *Phytochemistry*, **39**, 417-422, (1995).
- Ulubelen, A.; Mericli, A. H.; Mericli, F. y Kaya, Ü. An alkaloid and lignans from *Haplophyllum telephioides*. *Phytochemistry*, **35**, 1600-1601, (1994).
- Ulubelen, A.; Mericli, A. H.; Mericli, F. y Tan, N. Two new coumarins from *Haplophyllum ptilostylum*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1184-1186, (1993).
- Uwaifo, A. O. The mutagenicities of seven coumarin derivatives and a furan derivative (nimbolide) isolated from three medicinal plants. *J Toxicol. and Environ. Health.* **13**, 521-530, (1984).
- Van Sumere, C. F.; Cottenle, J.; De Greef, J.; Y Kint, J. Biochemical studies in relation to the posible germination regulatory role of naturally occurring coumarins and phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry.* **4**, 165-221, (1972).
- Venkata, E.; Bhirvamurty, P.; Rama, K. D. y Sastry, K. Effect of some furofuranoid lignans on three species of seeds. *Curr. Sci.* **48**, 949-950, (1979).
- Wani, M.; Taylor, M.; Wall, M.; Coggon, P. y McPhail, A. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325-2327, (1971).
- Waterman P. G. Phytochemical Diversity in the order Rutales. En *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Vol 27, 203-223, (Downum, K. R. Romeo, J.; Stafford, H. eds.) Plenum Press, New York, (1993).

Waterman, P. G. NMR assignments for the pentacyclic coumarins Bruceol and Deoxybruceol. *Journal of Natural Products*, **55**, 681-684, (1992).

Waterman, P. G. y Grundon, M. F. (eds.). Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales. Academic Press London. (1983).

Waterman, P. G.; Armstrong, J. A. y Gray, A. I. Alkaloids, flavonols, and coumarins from *Drummondita hassellii* and *D. calida*. *Phytochemistry*, **31**, 1265-1269, (1992a).

Waterman, P. G.; Sarker, S. D. y Armstrong, J. A. Coumarin glycosides from two species of *Eriostemon*. *Journal of Natural Products*, **58**, 1109-1115, (1995).

Waterman, P. G.; Ahsan, M. y Gray, A. I. Farnesyl acetophenone and flavanone compounds from the aerial parts of *Boronia ramosa*. *Journal of Natural Products*, **57**, 673-676, (1994).

Waterman, P. G.; Armstrong, J. A. y Gray, A. I. Sesquiterpenyl coumarins and geranyl benzaldehyde derivatives from the aerial parts of *Eriostemon myoporoides*. *Phytochemistry*, **37**, 1287-1294, (1994a).

Waterman, P. G.; Armstrong, J. A. y Sarker, S. D. An alkaloid coumarins and a triterpene from *Boronia algida*. *Phytochemistry*, **39**, 801-804, (1995a).

Waterman, P. G.; Ashan, M. y Armstrong, J. A. Dihydrochalcones from the aerial parts of *Boronia incospicua*. *Phytochemistry*, **36**, 799-801, (1994b).

Waterman, P. G.; Ashan, M.; Gray, A. I.; Leach, G. Quinolone and acridone alkaloids from *Boronia lanceolata*. *Phytochemistry*, **33**, 1507-1510, (1993a).

Waterman, P. G.; Ashan, M.; Leach, G. Novel angular pyranocoumarins from *Boronia lanceolata*. *Phytochemistry*, **36**, 777-780, (1994c).

Waterman, P. G.; Auzi, A. A.; Gray, A. I.; Hartley, T. G. y Waigh, R. D. A xanthine alkaloid from the leaves of *Bosistoa floydii*. *Phytochemistry*, **36**, 535-536, (1994d).

Waterman, P. G.; Gray, A. I.; Rashid, M. A. Coumarins from *Phebalium Tuberculosis* ssp. *Megaphyllum* and *Phebalium filifolium*. *Journal of Natural Products*, **55**, 851-858, (1992b).

Waterman, P. G.; Hasan, C. M.; Kong, D-Y.; Gray, A. I. Microcybin: a novel dimeric coumarin from *Microcybe multiflorus* and *Nematolepis pheballoides*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1839-1842, (1993b).

Waterman, P. G.; Parson, I. C. y Gray, A. I. New triterpenes and flavonoids from the leaves of *Bosistoa brassii*. *Journal of Natural Products*, **56**, 46-53, (1993c)

Waterman, P. G.; Parsons, I. C.; Gray, A. I. y Hartley, T. G. Brombyns from the stem bark of *Brombya platynema*. *Phytochemistry*, **33**, 479-482, (1993d).

Waterman, P. G.; Rashid, M. A.; Gray, A. I. Coumarins from *Eriostemon spicatus*. *Journal of Natural Products*, **55**, 685-687, (1992c).

Waterman, P. G.; Rashid, M. A.; Armstrong, J. A.; Gray, A. I. Pyranocoumarins as Chemotaxonomic Markers in *Eriostemon coccineus* and *Philoteca citrina*. *Phytochemistry*, **30**, 4033-4035, (1991).

Waterman, P. G.; Sarker, S. D. y Armstrong, J. A. 3,4,8-Trimethoxy-2-quinolone: a new alkaloid from *Eriostemon gardneri*. *Journal of Natural Products*, **58**, 574-576, (1995b).

Waterman, P. G.; Sarker, S. D. y Gray, A. I. Coumarins from two *Asterolasia* species. *Journal of Natural Products*, **57**, 324-327, (1994e).

Waterman, P.G.; Ahsan, M.; Gibbons, S.; Gray, A. I. Novel o-prenylated flavonoids from two varieties of *Boronia coerulescens*. *Phytochemistry*, **37**, 259-266, (1994h).

Waterman, P. G.; Sarker, S. D.; Armstrong, J. A. y Gray, A. I. Coumarins from *Asterolasia Trymalioides*. *Journal of Natural Products*, **57**, 1549-1551, (1994f).

Waterman, P. G.; Sarker, S. D.; Armstrong, J. A. (-)-1,12-Oxagual-10(15)-ene: a sesquiterpene from *Eriostemon fitzgeraldii*. *Phytochemistry*, **40**, 1159-1162, (1995c).

Waterman, P. G.; Sukari, A.; Rahman, R.; Taufik-Yap, Y-H. e Ismail, H. B. M. New coumarin and dihydrocinnamic acid derivatives from Malaysian populations of *Micromelum minutum*. *Phytochemistry*, **37**, 561-564, (1994g).

Waykole, P.; Shaikh, S. y Usgaonkar, R. N. Two new syntheses of xantyletin. *Indian J. Chem.* **19B**, 238-240, (1980).

Werner, A.; Hadecek, F.; Muller, C.; Greger, H. y Proksch. Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioidae). *J. Chem. Ecol.* **20**, 2035-2054, (1994).

Wijeratne, E. M. K.; Bandara, B. M. R. y Gunatillaka, A. A. L. Chemical constituents of three Rutaceae species from Sri Lanka. *Journal of Natural Products*, **55**, 1261-1269, (1992).

Williams, P. D. y Hoagland, R. E. The effect of natural occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Sci.* **30**, 206-212. (1982).

Worsham A. D. Current and potential techniques using allelopathy as an aid in weed management. En Chou C. H. y Waller G. R. eds. *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and insects Pheromones and Allonones*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 9, Taipei ROC. 275-291, (1989).

Wu, C. M.; Koehler, P. E. y Ayres, J. C. *Appl. Microbiol.* **23**, 852, (1972).

Wu, T-S. Flavonoids from root bark of *Citrus sinensis* y *C. nobilis*. *Phytochemistry*, **28**, 3558-3560, (1989).

Wu S-J y Chen I-S. Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*, **34**, 1659-1661, (1993).

Wu T-S. Chang F-C. y Wu P-L. Flavonoids, amidosulfoxides and an alkaloid from the leaves of *Glycosmis citrifolia*. *Phytochemistry*, **39**, 1453-1457, (1995).

Wu T-S.; Wangi M-L.; Lai, J-S.; Ito, C. y Furokawa, H. Binary carbazole alkaloids from *Murraya Euchrestifolia*. *Phytochemistry*, **30**, 1052-1054, (1991).

Wu, T-S.; Huang, S-C.; Lai, D-S.; Temg, C-M.; Ko, F. N. y Kouh, S-C. Chemical and antiplatelet aggregative investigation of the leaves of *Clausena excavata*. *Phytochemistry*, **32**, 449-451, (1993a).

Wu, T-S.; Chan, Y-Y.; Leu, Y-L. y Huang, S-C. A flavonoid and indole alkaloid from flowers of *Murraya paniculata*. *Phytochemistry*, **37**, 287-288, (1994).

Wu, T-S.; Chang, F-C. y Wu, P-L. Flavonoids, amidosulfoxides and an alkaloid from the leaves of *Glycosmis citrifolia*. *Phytochemistry*, **39**, 1453-1457, (1995).

Wu, T-S.; Yeh, J-H. y Wu, P-L. The heartwood constituents of *Tetradium glabrifolium*. *Phytochemistry*, **40**, 121-124, (1995a).

Wu, T. S.; Huang, S-C. y Lai, J-S. Stem bark coumarins of *Citrus grandis*. *Phytochemistry*, **36**, 217-219, (1994a).

Wu, T-S. Murrayamine-A-B-C and (+)-Mahanined, carbazole alkaloids from *Murraya Euchrestifolia*. *Phytochemistry*, **30**, 1048-1051, (1991a).

Yajima, T. y Munakata, K. Phloroglucinol-type furocoumarins, a group of potent naturally occurring insect antifeedants. *Agric. Biol. Chem.* **43**, 1701-1706, (1979).

Yajima, T.; Kato, N. y Munakata, K. Isolation of antifeeding principles in *Orixa japonica* Thunb. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1263-1268, (1977).

Yang, J-L., Shen, Z-M.; Sun, Y-F.; Han, J-X. y Xu, B. Cultured human hepatoma cell (BEL-7404) for anticancer drug screening. *Acta Pharmacol. Sin.* **6**, 144-148, (1985).

Yang, J-L.; Han, J-X.; Shen, Z-M. y Zhou, X-J. Effect of 10-hidroxicamptothecin on the cell proliferation and ³H-thymidine uptake into DNA of gastric carcinoma cell (SCG-7901) in vitro. *Tumor*, **2**, 21-23, (1985a).

Yang, M-S; Wu, T-S y Wang, C-H. Citracridone-I: A new antispasmodic from root barks of *Citrus depressa*. *Planta Medica*. 143-147 (1987).

Yasuda, Y.; Takeya, K. y Ilokawa; H. Structures of amides from *Asiasarum heterotropoides* Maek. Var. *mandshuricum* Maek. *Chem Pharm Bull.* **29**, 564-566, (1981).

Young, D.; Michelotti, E.; Swindell, C. y Krauss, N. Antifungal properties of taxol and varios analogues. *Experientia*. **48**, 882-885, (1992).

Zangerl, A. R. y Berenbaum, M. R. Plant chemistry, insect adaptations to plant chemistry, and host plant utilization patterns. *Ecology*. **74**, 47-54, (1993).

Zhou, S-M.; Lee, K. J.; Chang, J.; Wu, S-S.; Chen, H-X.; Gon, X.; Chen Y-C. y Lee, K-H. Antitumor agents 144. New γ -lactone ring modified arylamino etoposide analogues as inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J. Med. Chem.* **37**, 287-292, (1994).

Zobel, A. M. y Brown, S. A. *Allelopathy J.* **2**, 9, (1995).