

00570

4

2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS
METABOLITOS FITOTOXICOS DE *Esenbeckia yaxhoob*
LUNDELL (RUTACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)
P R E S E N T A
Q.F.B. IRMA SUSANA ROJAS TOME



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

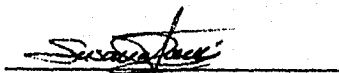
JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
VOCAL	Dr. MARIO GONZÁLEZ DE LA PARRA
SECRETARIO	Dra. MARÍA ALEJANDRA ROJAS MOLINA
1er. SUPLENTE	M. en C. ISABEL AGUILAR LAURENTS
2o. SUPLENTE	M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LÓPEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

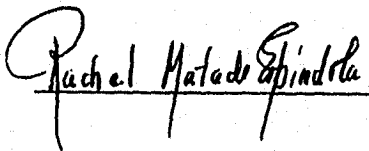
**LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

SUSTENTANTE



Q.F.B. IRMA SUSANA ROJAS TOMÉ

ASESOR



Dra. RACHEL MATA DE ESPÍNDOLA

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN206795 y CONACYT (Convenios No. 400313-S-2576PM).

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

Al Dr. Blas Lotina-Hennsen del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por proporcionar las semillas empleadas en los ensayos de bioautografía.

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

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR.

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

A los prestadores de Servicio Social del Laboratorio 124 del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Muy especialmente, deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a mi asesora, la Dra. Rachel Mata, que con comprensión y paciencia, me ha apoyado tanto para desarrollar este trabajo como para superar todas las dificultades que lo acompañaron y llevarlo a buen término.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE GRÁFICAS	XI
I. ANTECEDENTES	1
1. ANTECEDENTES SOBRE LA ESPECIE <i>Esenbeckia yaxhoob</i>	2
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	24
III. PARTE EXPERIMENTAL	28
1. MATERIAL VEGETAL	29
2. ENSAYOS BIOLÓGICOS	29
2.1 Determinación de la actividad fitotóxica mediante el método bioautográfico.	29
2.2 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i> Leach.	30

	Página
2.2.1 Preparación de las muestras.	30
2.2.2 Incubación de los huevecillos de <i>Artemia salina</i> .	30
2.2.3 Bioensayo.	31
3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	31
4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR	32
5. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS ACTIVAS	34
5.1 Obtención de la 2-tridecanona (63), la 2-pentadecanona (64) y la 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).	34
5.2 Obtención del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	34
5.3 Obtención del β -lupeol (59).	34
5.4 Obtención de la imperatorina (41) y de la asarinina (67).	36
5.5 Obtención del β -sitosterol (68).	38
5.6 Obtención de la hesperidina (69).	38
5.7 Preparación del aceite esencial de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	38
6. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES	39
6.1 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.	39

	Página
6.2 Prueba de Molish para carbohidratos.	40
6.3 Hidrólisis ácida de la hesperidina (69).	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. Evaluaciones biológicas preliminares del extracto total y de las fracciones primarias de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> Lundell.	42
2. Caracterización de los compuestos aislados en el presente estudio.	45
2.1 Identificación de las cetonas 2-tridecanona (63), 2-pentadecanona (64) y 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).	45
2.2 Identificación del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	56
2.3 Identificación del β -lupeol (59).	77
2.4 Identificación de la Imperatorina (41).	83
2.5 Identificación de la asarinina (67).	92
2.6 Identificación de la hesperidina (69).	101
3. Toxicidad para <i>Artemia salina</i> de los compuestos aislados en el presente estudio.	111
V. CONCLUSIONES	112
VI. BIBLIOGRAFÍA	114

RESUMEN

Esenbeckia yaxhoob Lundell (Rutaceae) es un árbol conocido popularmente con el nombre maya de *tankas-ché* y se encuentra distribuido en la Península de Yucatán. En la medicina tradicional yucateca es utilizado para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales. Recientemente se determinó el potencial herbicida de la especie mediante la evaluación del efecto del extracto $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1) preparado a partir de las partes aéreas de la planta, sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Con base en los resultados de las evaluaciones biológicas preliminares, el presente estudio se realizó con la finalidad de obtener los principios herbicidas potenciales a partir de las partes aéreas de *E. Yaxhoob*.

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto activo, empleando un método bioautográfico para monitorear la actividad inhibidora del crecimiento vegetal, permitió el aislamiento de siete metabolitos secundarios: tres cetonas [2-tridecanona (63), 2-pentadecanona (64) y 6,10,14-trimetil pentadecanona (65)], un triterpeno de tipo lupano [β -lupeol (59)], una cumarina [imperatorina (41)], un lignano [asarina (67)] y un nuevo triterpenoide tetracíclico de tipo dammarano (66). De manera adicional, se aisló al ramnoglucósido de una flavanona, la hesperidina (69), a partir de una de las fracciones inactivas.

La estructura del nuevo producto natural (66), se elucidó como la del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno mediante la aplicación de métodos espectrométricos y espectroscópicos, principalmente técnicas de alta resolución en la resonancia magnética nuclear que incluyeron experimentos COSY, HMQC y HMBC.

ABSTRACT

Esenbeckia yaxhoob Lundell (Rutaceae), commonly known as *tankas-ché*, is a medicinal tree which grows scattered along the Peninsula of Yucatan in the Southeast Mexico. It is used in traditional medicine for the treatment of gastrointestinal diseases. Recently the phytotoxic potential of this species was demonstrated by measuring the inhibitory activity of extract CHCl₃-MeOH (1:1) on seedling growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli*. This investigation describes the isolation and structural elucidation of the major phytotoxic principles from the aerial parts of *E. yaxhoob*. The active extract was repeatedly fractionated by column chromatography over Si gel, using the BPIP (bioautographic phytogrowth inhibitory bioassay) at each step for activity-directed fractionation. These procedures led to the isolation of seven bioactive compounds: 3 β -acetoxy-24-(S)-methyl-dammar-20,25-diene (**66**), a novel natural product, 2-tridecanone (**63**), 2-pentadecanone (**64**), 6,10,14-trimethyl-pentadecanone (**65**), β -lupeol (**59**), asarinin (**67**) and imperatorin (**41**). Additionally, hesperidin (**69**) was isolated from an inactive fraction. The known compounds were identified by comparison of their spectroscopic and spectrometric properties with those previously described in the literature.

The structure of the novel triterpene (**66**) was elucidated based on spectrometric and spectral analysis including ¹H-¹H COSY, HMQC and HMBC experiments.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género <i>Esenbeckia</i> .	2
Cuadro 2. Efecto de los lixiviados acuosos y del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> sobre la germinación y el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	16
Cuadro 3. Condiciones experimentales para determinar el potencial fitotóxico de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> mediante experimentos en invernadero.	19
Cuadro 4. Efecto de las partes aéreas al 1 % de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas.	20
Cuadro 5. Efecto de las partes aéreas al 2 % de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas.	22
Cuadro 6. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.	32
Cuadro 7. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.	32

LISTA DE CUADROS (CONTINUACIÓN)

	Página
Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento primario via cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	33
Cuadro 9. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria Ey-III (Cuadro 8).	35
Cuadro 10. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción Ey-III-D (Cuadro 9).	35
Cuadro 11 Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa Ey-IV (Cuadro 8).	36
Cuadro 12 Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria Ey-IV-D (Cuadro 11).	37
Cuadro 13 Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	43
Cuadro 14 Tiempos de retención y porcentaje de los componentes de la fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 8).	45
Cuadro 15 Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la 2-tridecanona (63).	49

LISTA DE CUADROS (CONTINUACIÓN)

	Página
Cuadro 16 Constantes espectrométricas y espectroscópicas del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	68
Cuadro 17 Constantes espectroscópicas y espectrométricas del β -lupeol (59).	77
Cuadro 18 Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la imperatorina (41).	86
Cuadro 19. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la asarinina (67).	94
Cuadro 20. Comparación de los datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de furofuranos tipo sesamina y del compuesto (67).	93
Cuadro 21. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la hesperidina (69).	105

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 8).	46

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 2. Espectro de masas (70 eV) de la 2-tridecanona (63).	50
Figura 3. Espectro de masas (70 eV) de la 2-pentadecanona (64).	51
Figura 4. Espectro de masas (70 eV) de la 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).	52
Figura 5. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de la fracción Ey-I del extracto de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> .	47
Figura 6. Espectro en el IR de la 2-tridecanona (63).	53
Figura 7. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la 2-tridecanona (63).	54
Figura 8. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la 2-tridecanona (63).	55
Figura 9. Espectro en el IR del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	69
Figura 10. Espectro de masas (70 eV) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	70

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 11. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	71
Figura 12. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional COSY (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	72
Figura 13. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	73
Figura 14. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl ₃) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	74
Figura 15. Correlaciones de C-26 y CH ₂ -26, C-21 y CH ₂ -21, C-3 y CH-3, y del grupo acetilo en el espectro HETCOR (300 MHz, CDCl ₃) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	75
Figura 16. Patrón de fragmentación del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	58
Figura 17. Núcleos de triterpenos tetracíclicos más comunes.	59

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 18. Espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	76
Figura 19. Correlaciones de C-5, CH ₃ -19, CH ₃ -28 y CH ₃ -29 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	61
Figura 20. Correlaciones de C-3, CH ₃ -28 y CH ₃ -29 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	62
Figura 21. Correlaciones de C-9, CH ₃ -18 y CH ₃ -19 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	63
Figura 22. Correlaciones de C-13 y CH ₃ -30 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	64
Figura 23. Correlaciones de C-17 y CH ₂ -21, C-27 y CH ₂ -26. C-24 y CH ₂ -26 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d ₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	66

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 24. Correlaciones C-H a larga distancia del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).	67
Figura 25. Espectro en el IR del β -lupeol (59).	79
Figura 26. Espectro de masas (70 eV) del β -lupeol (59).	80
Figura 27. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del β -lupeol (59).	81
Figura 28. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) del β -lupeol (59).	82
Figura 29. Espectro de masas (70 eV) de la imperatorina (41).	87
Figura 30. Espectro en el IR de la imperatorina (41).	88
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la imperatorina (41).	89
Figura 32. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la imperatorina (41).	90
Figura 33. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de la imperatorina (41).	91

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 34. Vista estereoscópica de la imperatorina (41).	85
Figura 35. Espectro de masas (70 eV) de la asarinina (67).	96
Figura 36. Espectro en el IR de la asarinina (67).	97
Figura 37. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de la asarinina (67).	98
Figura 38. Espectro de RMN- ¹³ C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de la asarinina (67).	99
Figura 39. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de la asarinina (67).	100
Figura 40. Posibles estructuras del compuesto (67).	93
Figura 41. Espectro en el IR de la hesperidina (69).	106
Figura 42. Espectro de masas modalidad FAB positivo de la hesperidina (69).	107
Figura 43. Espectro de RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO-d ₆) de la hesperidina (69).	108

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Figura 44. Espectro de RMN- ¹ H, (300 MHz, DMSO-d ₆) de la hesperidina (69).	109
Figura 45. Patrón de fragmentación de la hesperidina (69).	103
Figura 46. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) del derivado acetilado de la hesperidina (69a).	110
Figura 47. Posibles estructuras del compuesto (69).	104

LISTA DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1. Efecto de los lixiviados acuosos de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	17
Gráfica 2. Efecto del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> y <i>Echinochloa crusgalli</i> .	18

LISTA DE GRÁFICAS (CONTINUACIÓN)

	Página
Gráfica 3. Efecto de las partes aéreas al 1 % de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas.	21
Gráfica 4. Efecto de las partes aéreas al 2 % de <i>Esenbeckia yaxhoob</i> incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas.	23

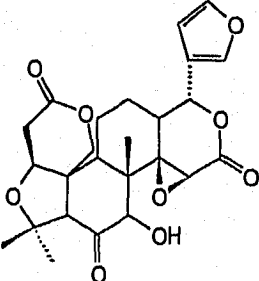
I. ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES SOBRE ESENBECKIA YAXHOOB

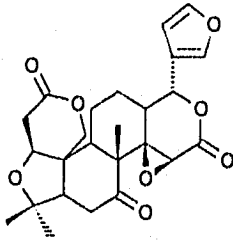
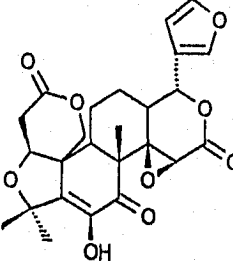
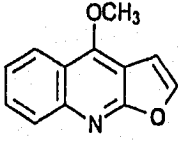
El género *Esenbeckia* (Rutaceae), se encuentra distribuido en todo el mundo y está constituido por 30 especies (Standley, 1923; Dreyer *et al.*, 1972), 17 de las cuales se localizan en México, principalmente en las zonas selváticas y tropicales de los estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (Ramos, 1991).

Desde el punto de vista químico, numerosas especies de este género han sido objeto de diversas investigaciones. Estos estudios han permitido el aislamiento y caracterización de una gran variedad de metabolitos secundarios que incluyen tetranortriterpenoides de tipo limonoide, alcaloides quinolinicos e indólicos, cumarinas, floroglucinoles, amidas, triterpenoides, lignanos, flavonoides, fenilpropanoides y poliprenoles. En el Cuadro 1 se presenta una revisión de los tipos de compuestos aislados de este género a la fecha. De acuerdo a los datos presentados, los metabolitos más abundantes en el género son los alcaloides de tipo quinollínico.

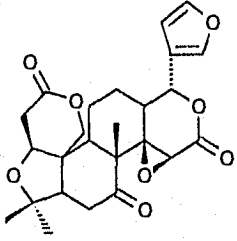
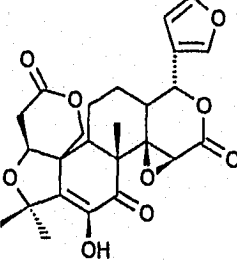
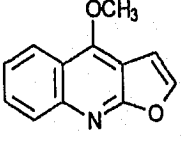
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia*.

LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. febrifuga</i> ^a , <i>E. hartmanii</i> ^b , <i>E. litoralis</i> ^c , <i>E. berlandieri</i> ^c .	 <p>Rutaevina (1)</p>	Vitagliano y Comin, 1970; Dreyer <i>et al.</i> , 1972; Dreyer, 1980.

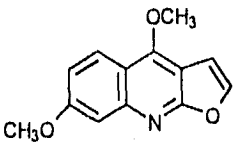
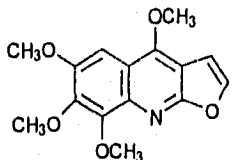
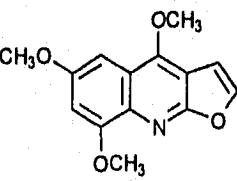
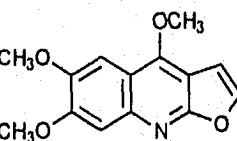
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. hartmanii</i> ^b , <i>E. litorali</i> ^c	 <p>Limonina (2)</p>	Dreyer <i>et al.</i> , 1972; Bevalot <i>et al.</i> , 1984.
<i>E. febrifuga</i> ^a , <i>E. hartmanii</i> ^b	 <p>Limonina diosfenol (3)</p>	Vitagliano y Comin, 1970; Dreyer <i>et al.</i> , 1972.
ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. litoralis</i> ^f , <i>E. flava</i> ^f , <i>E. lelocarpa</i> ^h	 <p>Dictamina (4)</p>	Dreyer, 1980; Delle <i>et al.</i> , 1989.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

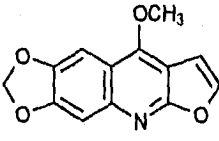
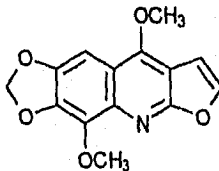
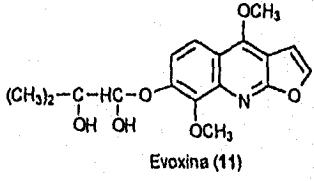
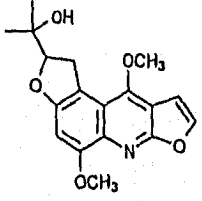
LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. hartmanii</i> ^b , <i>E. litorali</i> ^c .	 <p>Limonina (2)</p>	Dreyer <i>et al.</i> , 1972; Bevalot <i>et al.</i> , 1984.
<i>E. febrifuga</i> ^a , <i>E. hartmanii</i> ^b .	 <p>Limonina diosfenol (3)</p>	Vitagliano y Co- min, 1970; Dre- yer <i>et al.</i> , 1972.
ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. litoralis</i> ^f , <i>E. flava</i> ^f , <i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>Dictamina (4)</p>	Dreyer, 1980; Delle <i>et al.</i> , 1989.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

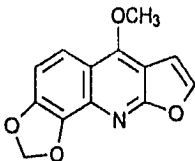
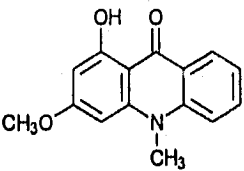
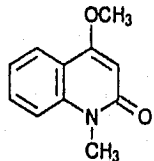
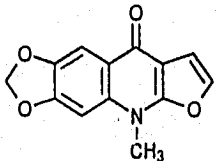
ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. litoralis</i> ^f , <i>E. flava</i> ^f .	 <p>Evolitrina (5)</p>	Dreyer, 1980.
<i>E. febrifuga</i> ^a , <i>E. hartmani</i> ^b , <i>E. litoralis</i> ^f , <i>E. flava</i> ^f .	 <p>Skimmianina (6)</p>	Vitagliano y Comin, 1970; Dreyer <i>et al.</i> , 1972.
<i>E. hartmani</i> ^b , <i>E. flava</i> ^f , <i>E. almawilla</i> ^f .	 <p>Maculosidina (7)</p>	Dreyer <i>et al.</i> , 1972; Oliveira <i>et al.</i> , 1996.
<i>E. litoralis</i> ^f , <i>E. pilocarpoides</i> ^h , <i>E. glandiflora</i> ^h , <i>E. bellzencis</i> ^g , <i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>Kokusaginina (8)</p>	Dreyer, 1980; Beva- lot <i>et al.</i> , 1984; Delle <i>et al.</i> , 1989; Ríos y Delgado, 1992; Oli- veira <i>et al.</i> , 1996.

I. Antecedentes

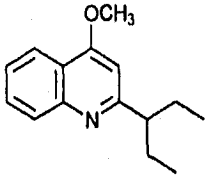
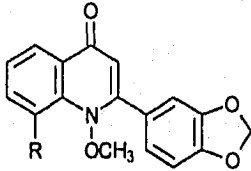
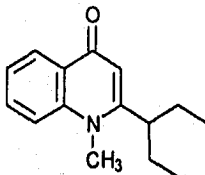
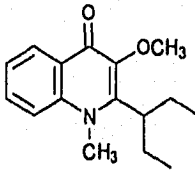
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

ALCALOIDES QUINOLINICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<p><i>E. litoralis</i>^a, <i>E. pilocarpoides</i>^h, <i>E. glandiflora</i>^h, <i>E. leiocarpa</i>^h.</p>	 <p>Maculina (9)</p>	<p>Dreyer, 1980; Bevalot <i>et al.</i>, 1984; Delle <i>et al.</i>, 1989; Oliveira <i>et al.</i>, 1996.</p>
<p><i>E. febrifuga</i>^a, <i>E. litoralis</i>^f, <i>E. pilocarpoides</i>^h, <i>E. almawillia</i>^{a,f}, <i>E. belizensis</i>^a, <i>E. glandiflora</i>^h, <i>E. leiocarpa</i>^h.</p>	 <p>Flindersiamina (10)</p>	<p>Dreyer, 1980; Delle <i>et al.</i>, 1989; Ríos y Delgado, 1992; Oliveira <i>et al.</i>, 1996.</p>
<p><i>E. hartmani</i>^b.</p>	 <p>Evoxina (11)</p>  <p>Cholsina (12)</p>	<p>Dreyer <i>et al.</i>, 1972.</p>

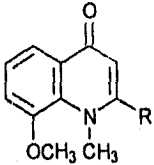
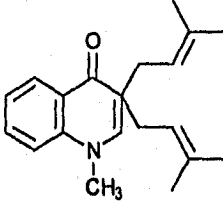
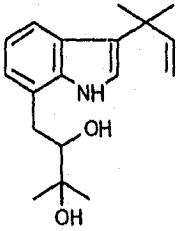
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. litoralis</i> ^{a,d} , <i>E. pilocarpoides</i> ^h .	 <p>Kokusagina (13)</p>  <p>1-Hidroxi-3-metoxi- N-metilacridona (14)</p>	Dreyer, 1980; Bevalot <i>et al.</i> , 1984.
<i>E. glandiflora</i> ^h .	 <p>4-Metoxi-1-metilquinolin- 2-ona (15)</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 1996.
<i>E. pilocarpoides</i> ^h .	 <p>Isomaculina (16)</p>	Bevalot <i>et al.</i> , 1984.

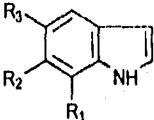
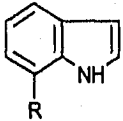
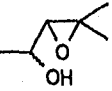
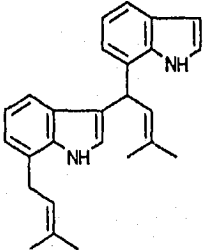
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>4-Metoxi-2-(3'-pentil)-quinolina (17)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.
<i>E. glandiflora</i> ^h .	 <p>R = H, 2(3-metoxi-4,5-metilen-dioxifenil)-1-metilquinolin-4-ona (18) R = OCH₃, 8-metoxi-2-(3'-metoxi-4,5-metilen-dioxifenil)-1-metilquinolin-4-ona (19)</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 1996.
<i>E. leiocarpa</i> ^{e,h} .	 <p>Leiokinina B (20)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989; Nakatsu <i>et al.</i> , 1990.
<i>E. leiocarpa</i> ^e .	 <p>Leiokinina A (21)</p>	Nakatsu <i>et al.</i> , 1990.

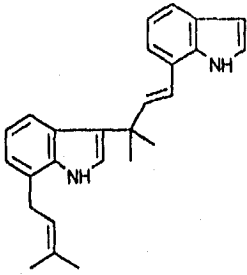
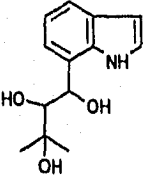
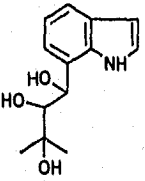
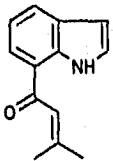
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

ALCALOIDES QUINOLÍNICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. almawillia</i> ^a .	 <p>R = -(CH₂)₄CH₃, 8-metoxi-2-pentil-4-quinolona (22) R = -(CH₂)₅CH₃, 8-metoxi-2-hexil-4-quinolona (23) R = -(CH₂)₆CH₃, 8-metoxi-2-heptil-4-quinolona (24)</p>	Guilhon <i>et al.</i> , 1994.
<i>E. flava</i> ^f .	 <p>3,3-diisopentenil-N-metil-2,4-quinoidiona (25)</p>	Dreyer, 1980.
ALCALOIDES INDÓLICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>Leiocarpadiol (26)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

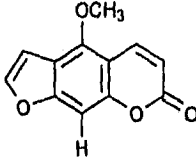
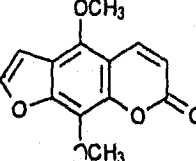
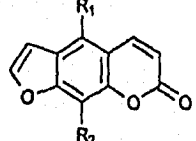
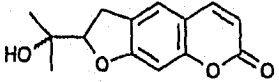
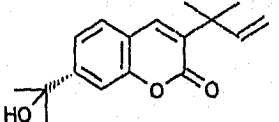
	ALCALOIDES INDÓLICOS	
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<p><i>E. leiocarpa</i>^h.</p>	 <p>R₁ = -(CH₂)₂CH=(CH₃)₂, R₂ = R₃ = H, 7-Isopentenilindol (27)</p> <p>R₁ = R₃ = H, R₂ = -(CH₂)₂CH=(CH₃)₂, 6-Isopentenilindol (28)</p> <p>R₁ = R₂ = H, R₃ = -(CH₂)₂CH=(CH₃)₂, 5-Isopentenilindol (29)</p>	
		
	<p>R = -COH, 7-Indolcarbaldehído (30)</p>	<p>Delle <i>et al.</i>, 1989.</p>
	<p>R = -CH₂OH, 7-Indolmetanol (31)</p>	
<p>R =  , Lelocarpol (32)</p>		
 <p>Annonidina A (33)</p>		

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

ALCALOIDES INDÓLICOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>Annonidina C (34)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.
<i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>Leiocarpatriol A (35)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1990.
	 <p>Leiocarpatriol B (36)</p>	
	 <p>Leiocarpona (37)</p>	

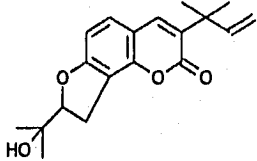
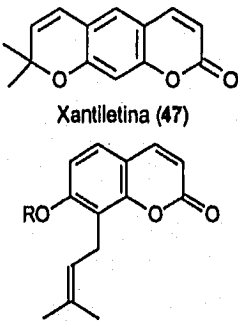
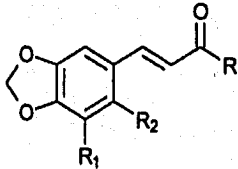
I. Antecedentes

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

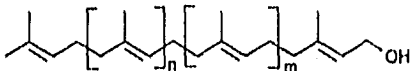
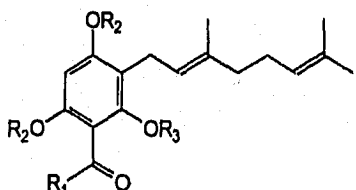
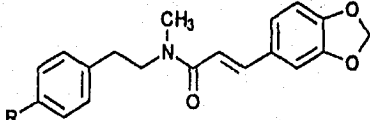
CUMARINAS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. litoralis</i> ^d , <i>E. bertandieri</i> ^a	 <p>Bergapteno (38)</p>	Dreyer, 1980.
<i>E. litoralis</i> ^d , <i>E. almawillia</i> ^a	 <p>Isopimpinellina (39)</p>	Dreyer, 1980; Guilhon <i>et al.</i> , 1994.
<i>E. litoralis</i> ^{a,f}	 <p>R₁ = OCH₃, R₂ = OH, 8-Hidroxi bergapteno (40) R₁ = H, R₂ = OCH₂CH=C(CH₃)₂, Imperatorina (41) R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₂CHC(CH₃)₂, Felopterinina (42) R₁ = CH₂CH=C(CH₃)₂, R₂ = OH, Aloimperatorina (43)</p>	Dreyer, 1980.
<i>E. leiocarpa</i> ^h	 <p>Marmesina (44)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.
<i>E. almawillia</i> ^{a,f}	 <p>Chalepina (45)</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 1996.

I. Antecedentes

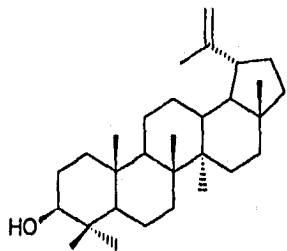
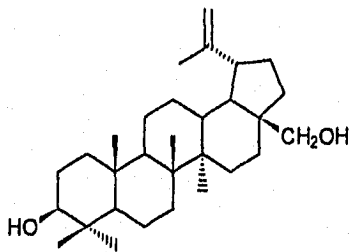
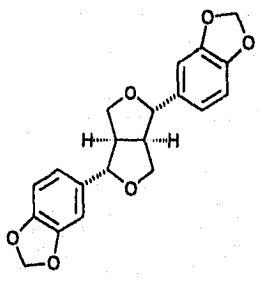
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

CUMARINAS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. glandiflora</i> ^h	 <p>3-(1',1'-dimetilalil)-columbianetina (46)</p>	Oliveira <i>et al.</i> , 1996.
<i>E. hartmann</i> ^b	 <p>Xantiletina (47)</p> <p>R = H, Osthol (48)</p> <p>R = CH₂CH=C(CH₃)₂, 7-Isopenteniloxi-8-Isopentenil cumarina (49)</p>	Dreyer <i>et al.</i> , 1972.
DERIVADOS DEL ACIDO CINÁMICO		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. almawillia</i> ^a	 <p>R = R₁ = H, R₂ = OCH₃, 2-Metoxi-4,5-metilendioxi-cinamaldehído (50)</p> <p>R = R₁ = OCH₃, R₂ = H, Ácido 3-metoxi-4,5-metilendioxi cinámico (51)</p>	Guilhon <i>et al.</i> , 1994.

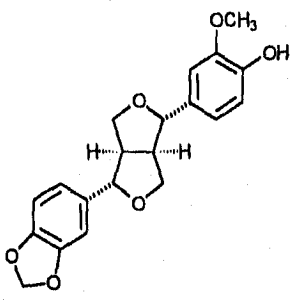
Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

POLIPRENOLES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. nesiotica</i> ^a .	 <p>n = 3, m = 8, (3 E, 9 Z)-13-prenol (52) n = 3, m = 5, (3 E, 6 Z)-10-prenol (53)</p>	Ríos y Delgado, 1992.
FLOROGLUCINOLES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. nesiotica</i> ^a .	 <p>R₁ = α-MeBu, R₂ = R₃ = H (54) R₁ = β-MeBu, R₂ = R₃ = H (55) R₁ = i-Bu, R₂ = R₃ (56)</p>	Ríos y Delgado, 1992.
AMIDAS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^h .	 <p>R = OCH₃, Amida A (57) R = H, Amida B (58)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1990.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

TRITERPENOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. hartmanni</i> ^b .	 <p>Lupeol (69)</p>	Dreyer <i>et al.</i> , 1972.
	 <p>Friedellina (60)</p>	
LIGNANOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^b .	 <p>Sesamina (81)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.

Cuadro 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Esenbeckia* (continuación).

LIGNANOS		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>E. leiocarpa</i> ^h	 <p>Metilpiperitol (62)</p>	Delle <i>et al.</i> , 1989.

^acorteza; ^btallos; ^csemillas; ^dcápsula de semillas; ^epartes aéreas; ^fmadera; ^gcáscara de frutos; ^hraíz.

La especie *Esenbeckia yaxhoob* Lundell es conocida popularmente en México con el nombre de *tankas-ché*. Los individuos de esta especie son árboles de hasta 10 m de altura que se encuentran localizados en la Península de Yucatán. En la medicina tradicional yucateca, se emplea para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales (Anaya *et al*, 1995). A la fecha no se han descrito estudios químicos sobre esta especie, sin embargo, en un estudio biológico realizado recientemente en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, se determinó el potencial alelopático de esta especie (García, 1995). Los resultados de estos bioensayos se presentan a continuación.

En primer término, se determinó el efecto de los lixiviados acuosos y del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de *E. yaxhoob* sobre la germinación y el crecimiento radicular de las especies *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* (Cuadro 2). En la Gráfica 1 puede

I. Antecedentes

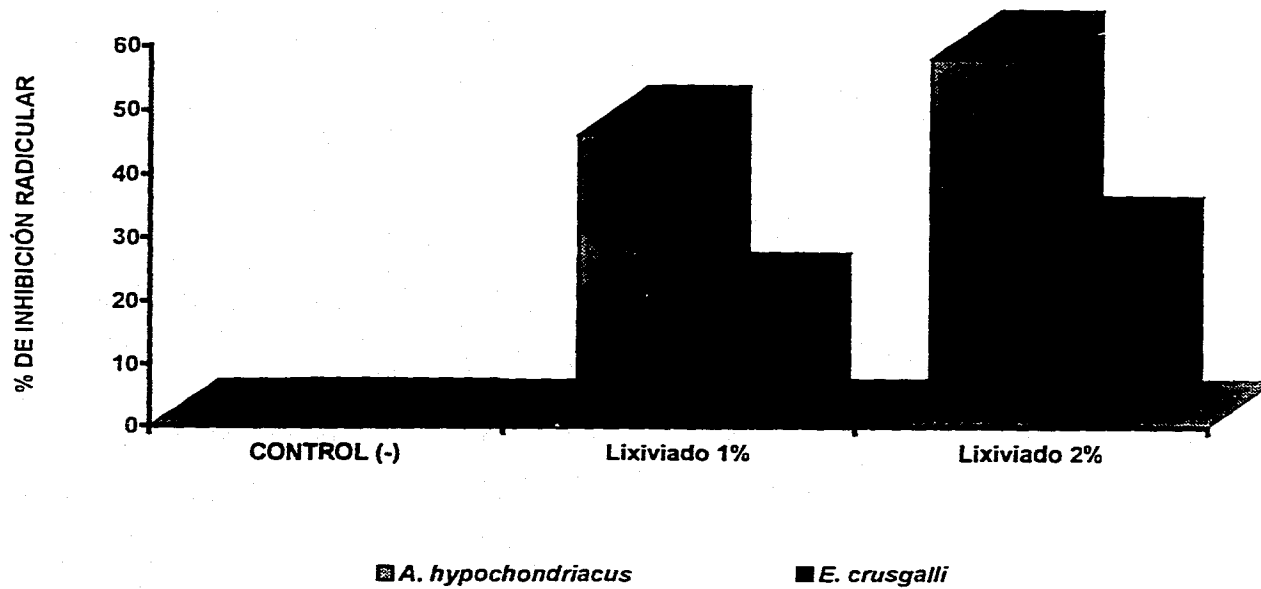
apreciarse que los lixiviados al 1 y al 2 % inhibieron significativamente el crecimiento radicular de ambas semillas de prueba. En el caso de *A. hypochondriacus* esta inhibición fue del 47 % con el lixiviado al 1 %, y del 58 % con el lixiviado al 2 %. Con respecto a *E. crusgalli*, únicamente se observó un efecto significativo con el lixiviado al 2 %, encontrándose una inhibición del 30 %. El proceso de germinación no se afectó de manera significativa en ninguno de los dos casos.

Cuadro 2. Efecto de los lixiviados acuosos y del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* (García, 1995).

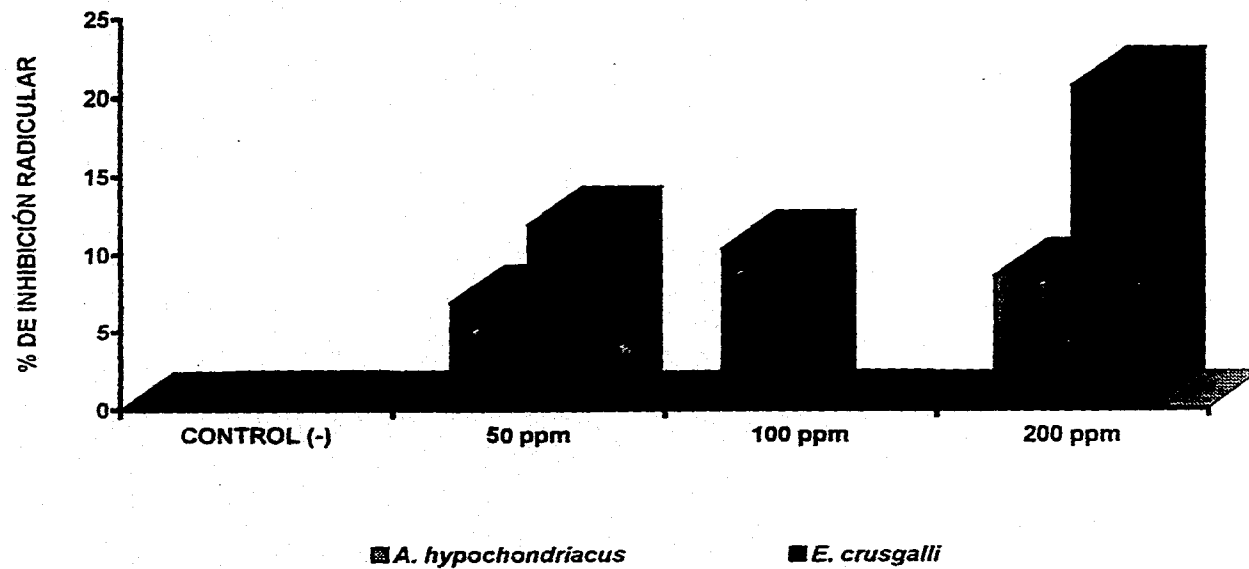
Tratamiento	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
	% Inhibición germinación	% Inhibición crecimiento radicular	% Inhibición germinación	% Inhibición crecimiento radicular
Control	2.5	0.0	17.5	0.0
Lixiviado 1 %	2.5	46.7*	12.5	20.2
Lixiviado 2 %	15.0	58.4*	7.5	29.2*
Control	7.5	0.0	20.0	0.0
Extracto 50 ppm	7.5	6.9	20.0	11.9
Extracto 100 ppm	7.5	10.4	30.0	0.0
Extracto 200 ppm	5.0	8.6	30.0	20.8*

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

En la Gráfica 2 se presenta el efecto del extracto cloroformo-metanólico sobre las mismas especies. En este caso, sólo se observó una actividad inhibitoria estadísticamente significativa sobre *E. crusgalli* a una concentración del extracto de 200 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 1. Efecto de los lixiviados acuosos de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.



Gráfica 2. Efecto del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* sobre el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*.

Por último, se realizó un experimento de invernadero con la finalidad de determinar si el potencial fitotóxico de *E. yaxhoob* se manifestaba cuando la planta se incorporaba al suelo, influyendo así sobre la germinación y el crecimiento de las especies presentes en el mismo (García, 1995).

Este experimento consistió en incorporar directamente las partes aéreas fragmentadas, en proporciones del 1 y 2 %, a un suelo con un elevado potencial florístico, contenido en macetas y que se encontraba seco y libre de restos orgánicos (Cuadro 3). Posteriormente, de manera periódica se realizó el conteo del número de malezas que germinaron y crecieron en cada maceta. La evaluación tuvo una duración de siete semanas y los resultados obtenidos indicaron que el efecto herbicida de las partes aéreas al 1 % de la especie en estudio, fue mayor al demostrado por el herbicida comercial dimetil tetracloro tereftalato (dacthal W-75) utilizado como un control positivo.

Cuadro 3. Condiciones experimentales para determinar el potencial fitotóxico de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* mediante experimentos en invernadero (García, 1995).

Tratamiento	Tierra (g)	Vermiculita (g)	Dacthal W-75 (Kg/Ha)	Partes aéreas (g)
Partes aéreas (1 %)	247.5	-	-	2.5
Control negativo	247.5	2.5	-	-
Control positivo	247.5	2.5	5.6	-
Partes aéreas (2 %)	245.0	-	-	5.0
Control negativo	245.0	5.0	-	-
Control positivo	245.0	5.0	11.2	-

I. Antecedentes

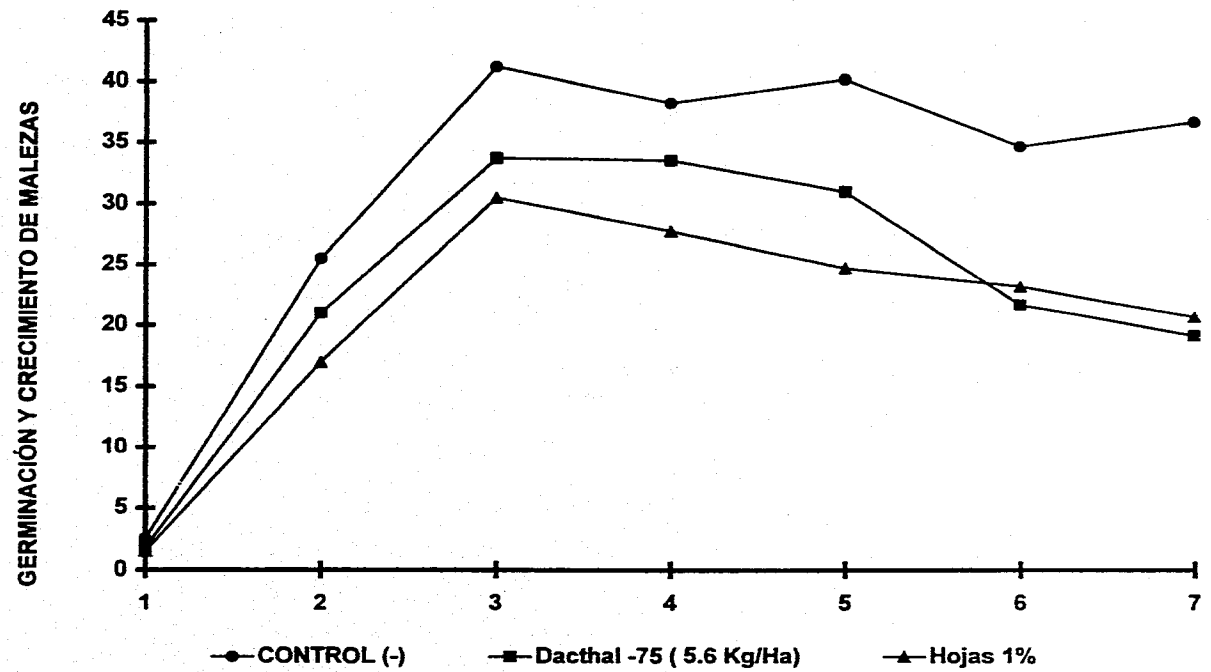
En el Cuadro 4 y en la Gráfica 3 se muestran los resultados del experimento con las partes aéreas incorporadas al 1 %, observándose que a todo lo largo de la determinación, la tendencia general fue un efecto inhibitorio. La actividad de las partes aéreas fue muy semejante a la del herbicida comercial incorporado a una concentración baja, sin embargo, el análisis de varianza indicó que la inhibición de las malezas causada por las partes aéreas de *E. yaxhoob* fue significativa a partir de la quinta semana y en el caso del herbicida, hasta la sexta semana.

Cuadro 4. Efecto de las partes aéreas al 1 % de *Esenbeckia yaxhoob* incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas (García, 1995).

Semana	Control negativo ^a	Dacthal W-75 ^a (5.6 Kg/Ha)	Partes aéreas ^a (1 %)
1	2.5 ± 1.7	1.75 ± 0.9	1.5 ± 1.0
2	25.2 ± 9.1	21.0 ± 5.1	17.0 ± .0
3	41.2 ± 15.0	33.7 ± 9.4	30.5 ± 6.0
4	38.2 ± 15.0	33.5 ± 9.9	27.7 ± 4.3
5	40.2 ± 15.0	31.0 ± 9.2	24.7 ± 7.0*
6	34.7 ± 17.0	21.7 ± 8.0	23.2 ± 5.6
7	36.7 ± 19.0	19.2 ± 7.0*	20.7 ± 4.0*

^a Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los datos representan el promedio del número de malezas que germinaron y crecieron en cada caso.

*Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha = 0.05$).



Gráfica 3. Efecto de las partes aéreas al 1 % de *E. yaxhoob* incorporadas al suelo sobre la germinación número de malezas (García, 1995).

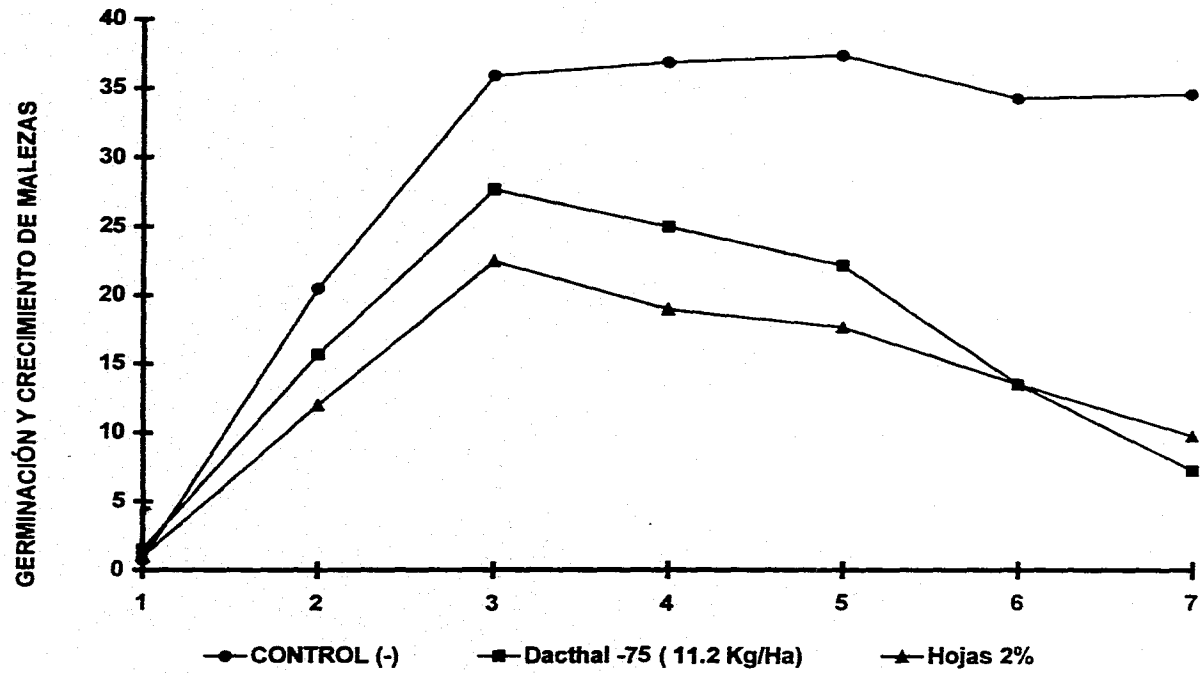
En el Cuadro 5 y en la Gráfica 4 se muestran los efectos de las partes aéreas al 2 % y del herbicida a la concentración recomendada. En este caso, ambos tratamientos ejercieron una inhibición significativa de la germinación y el crecimiento de las malezas, sin embargo, la acción fitotóxica de las partes aéreas se presentó desde la cuarta semana y la del herbicida comercial a partir de la quinta semana.

Cuadro 5. Efecto de las partes aéreas al 2 % de *Esenbeckia yaxhoob* incorporadas al suelo sobre la germinación y el crecimiento de malezas (García, 1995).

Semana	Control negativo ^a	Dacthal W-75 ^a (11.2 Kg/Ha)	Partes aéreas ^a (2 %)
1	0.75 ± 0.7	1.5 ± 1.7	1.0 ± 0.6
2	20.5 ± 5.9	15.7 ± 8.8	12.0 ± 4.2
3	36.0 ± 5.0	27.7 ± 13.0	22.5 ± 5.8
4	37.0 ± 8.0	25.0 ± 10.7	19.0 ± 5.3*
5	37.5 ± 7.1	22.2 ± 9.1*	17.7 ± 5.1*
6	34.5 ± 9.8	13.5 ± 5.1*	13.5 ± 4.0*
7	34.7 ± 4.6	7.25 ± 3.4*	9.75 ± 3.1*

^a Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado y los datos representan el promedio del número de malezas que germinaron y crecieron en cada caso.

*Valores que difieren estadísticamente del control (Duncan, $\alpha = 0.05$).



Gráfica 4. Efecto de las partes aéreas al 2 % de *E. yaxhoob* incorporadas al suelo sobre la germinación número de malezas (García, 1995).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II. Justificación y objetivos

La riqueza florística de México constituye sin lugar a dudas uno de los recursos naturales más importantes del mundo. Sin embargo, el porcentaje de especies estudiadas desde el punto de vista biológico es relativamente bajo, y si bien es cierto que la investigación científica de la flora mexicana se ha destacado por un notable y sostenido avance en el estudio fitoquímico de muchas especies botánicas, tan sólo un escaso número de compuestos aislados e identificados han sido evaluados para determinar sus propiedades biológicas en general. De lo anterior se desprende que el potencial de las plantas en México como una fuente de nuevos principios activos, incluyendo aquellos con propiedades herbicidas, aún no se ha explorado adecuadamente. Por otro lado, cabe subrayar que el interés científico por el estudio de las plantas mexicanas como fuente de principios bioactivos se ha visto incrementado en los últimos años y cada vez es más notable la incorporación del esquema de trabajo interdisciplinario en los programas de investigación.

En este contexto, y considerando que en los años recientes la búsqueda de nuevos agentes herbicidas, principalmente de origen natural, se ha incrementado notablemente debido a la alta toxicidad y persistencia de algunos de los herbicidas de origen sintético de mayor uso (Benner, 1993; Pillmoor, 1993; Rodgers, 1993), se ha establecido un programa interdisciplinario cuyo objetivo fundamental es determinar la potencialidad herbicida de especies selectas de la flora mexicana y de productos derivados de las mismas con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos agentes herbicidas biodegradables y de menor toxicidad (Anaya, 1987; Worsham, 1989). Si bien es cierto que son escasos los herbicidas de origen vegetal con aplicación comercial, ha sido posible generar nuevos herbicidas semisintéticos y sintéticos a partir de moléculas prototipo de origen natural con propiedades herbicidas demostradas. Un ejemplo reciente lo constituye el cinmetilino, desarrollado a partir del monoterpenoide cinmeoi (Worsham, 1989).

Una de las especies seleccionadas dentro del Programa de Investigación antes mencionado, como una fuente valiosa de principios herbicidas, es la

II. Justificación y objetivos

rutácea *Esenbeckia yaxhoob* Lundell. Como se indicó en la sección de antecedentes, los extractos cloroformo-metanólicos, los lixiviados y el polvo de esta especie, demostraron una actividad fitotóxica significativa *in vitro* y en experimentos en invernadero (García, 1995).

En el marco de estos antecedentes y consideraciones, se planteó la presente investigación con el objetivo primordial de **obtener los principios activos responsables de la actividad fitotóxica demostrada por la especie *E. yaxhoob*, mismos que pudieran constituir una base para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas de interés comercial.** Para el cumplimiento de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Recopilar la información bibliográfica acerca de los aspectos biológicos, fitoquímicos, etnobotánicos y taxonómicos de *E. yaxhoob*.
- b) Efectuar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales.
- c) Preparar el extracto a partir de las partes aéreas de la planta de acuerdo a la metodología convencional.
- d) Fraccionar el extracto activo mediante procedimientos cromatográficos, utilizando un método bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica y como semillas de prueba, las especies *Amaranthus hypochondriacus* L., *Echinochloa crusgalli* (Beauv) L., *Lactuca sativa* L. y *Lycopersicon esculentum* Mill.
- e) Aislar y purificar el mayor número de constituyentes posibles de las fracciones activas.
- f) Caracterizar los productos aislados mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.
- g) Determinar la toxicidad del extracto, fracciones y compuestos puros aislados para el crustáceo *Artemia salina* Leach, considerando que este bioensayo permite detectar de manera preliminar actividades biológicas más complejas que pudieran ser investigadas posteriormente.

II. Justificación y objetivos

Cabe mencionar, que la determinación de la fitotoxicidad de los compuestos que se obtengan de las fracciones activas, constituye uno de los objetivos de otra propuesta de tesis que se desarrolló en forma paralela al presente estudio (Macías, 1996).

III. PARTE

EXPERIMENTAL

1. MATERIAL VEGETAL

Las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* Lundell, se recolectaron en el estado de Quintana Roo, en febrero de 1995 y fueron identificadas por el Dr. Fernando Chiang del Instituto de Biología de la UNAM y la M. en C. Clara Ramos de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional (MEXU) [Voucher: ALA95-8].

La planta se secó a temperatura ambiente y se fragmentó en un molino de cuchillas modelo Willey 4.

Las semillas empleadas para las evaluaciones de fitotoxicidad se adquirieron en el Valley Seed Service de Fresno, California, y fueron proporcionadas por el Dr. Blas Lotina-Hennsen, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. Las especies de prueba incluyeron semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*

2. ENSAYOS BIOLÓGICOS

2.1 Determinación de la actividad fitotóxica mediante el método bioautográfico.

Para monitorear la actividad fitoinhibidora del extracto total y de las fracciones primarias se utilizó un método bioautográfico. Los ensayos correspondientes se efectuaron empleando placas de vidrio de 5 x 20 cm, recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck). En cada placa se aplicaron 10 mg de las muestras a evaluar y posteriormente se desarrollaron con el sistema de elución adecuado. Concluido el proceso de elución, se permitió la evaporación completa del disolvente y las cromatoplasmas se

III. Parte experimental

cubrieron con 20 mL de una suspensión de agar al 1 %. Una vez solidificada la suspensión, se colocaron las semillas de prueba hasta cubrir completa y homogéneamente la superficie. Las placas se incubaron en una atmósfera húmeda a 28 °C durante 24 hrs. (*A. hypochondriacus*), 48 hrs. (*E. crusgalli* y *L. sativa*) y 72 hrs. (*L. esculentum*). Transcurrido el período de incubación se observó la zona de inhibición y se determinó el factor de retención (R_t) correspondiente a la misma (Inoue *et al.*, 1992). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra de prueba, eluída en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado. Es importante mencionar que como control positivo se empleó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma) y que todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

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

Para determinar la toxicidad para *A. salina* se utilizó el método descrito por Meyer y colaboradores (1982). El procedimiento se describe a continuación:

2.2.1 Preparación de las muestras.

Las muestras (extracto, fracciones y compuestos puros) se prepararon disolviendo 20 mg del material a evaluar en 2 mL del disolvente apropiado. De esta disolución se transfirieron 500, 50 y 5 µL a tres frascos viales, dejándose evaporar el disolvente al vacío; cada concentración se preparó por triplicado.

III. Parte experimental

2.2.2 Incubación de los huevecillos de *Artemia salina*.

Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en un medio salino artificial durante un período de 48 hrs., a 30 °C.

2.2.3 Bioensayo.

Se transfirieron 10 crustáceos a cada uno de los viales que contenían las muestras a evaluar y se aforó a 5 mL con un medio salino artificial, obteniéndose una concentración final de 1000, 100 y 10 µg/mL. Los viales se mantuvieron con iluminación durante 24 hrs.; transcurrido ese tiempo se procedió a contar el número de larvas sobrevivientes y se calculó la concentración letal media (CL₅₀) empleando un análisis probit (Liebermann, 1993).

Cabe mencionar que para que un extracto o fracción se considere activo, la CL₅₀ debe ser menor a 1000 µg/mL; en el caso de un compuesto puro, la CL₅₀ debe ser menor a 200 µg/mL (Anderson *et al.*, 1991).

3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS

Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck), varios sistemas de eluyentes y diferentes agentes cromógenos (Gringerb, 1991). Los sistemas de elución y los reactivos reveladores empleados se resumen en los Cuadros 6 y 7, respectivamente.

III. Parte experimental

Cuadro 6. Sistemas de elución empleados para los análisis cromatográficos en capa fina.

SIST. DE ELUYENTES	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
A	Hex/CHCl ₃	Diversas
B	CHCl ₃	100
C	CHCl ₃ /MeOH	Diversas
D	iPrOH/AcOEt/H ₂ O	83:11:6

Cuadro 7. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina (Gringerb, 1991).

REACTIVO	COMPOSICIÓN
Sulfato cárico*	12.0 g sulfato cárico 22.2 mL ácido sulfúrico conc. 350.0 g hielo
Ácido sulfúrico al 10 %*	10.0 mL ácido sulfúrico conc. 90.0 mL agua destilada
Anisaldehído*	0.5 mL anisaldehído 9.0 mL etanol 0.5 mL ácido sulfúrico conc. 1.0 mL ácido acético

*para el desarrollo del color es necesario calentar por dos minutos aproximadamente a 110 °C.

4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR

El material vegetal molido (1.8 Kg) se extrajo dos veces con un volumen total de 8 litros de una mezcla de CHCl₃-MeOH 1:1, dejando cada extracción durante un período de 7 días. Al término de la maceración, el extracto resultante

III. Parte experimental

se filtró y se concentró al vacío, obteniéndose 123 g de un residuo color café verdoso.

El extracto concentrado se fraccionó mediante una cromatografía en columna abierta, utilizando como adsorbente gel de sílice (1.15 Kg de Sílica Gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). El proceso de elución se efectuó con hexano, hexano-cloroformo, cloroformo y cloroformo-metanol, en diferentes proporciones, obteniéndose un total de 131 fracciones de un litro cada una, combinándose aquellas que presentaron características cromatográficas similares. En el Cuadro 8 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

Cabe mencionar que el extracto original y las fracciones primarias se evaluaron mediante el método bioautográfico con la finalidad de monitorear la actividad fitotóxica. Las especies de prueba incluyeron *A. hypochondriacus*, *E. crusgalli*, *L. sativa* y *L. esculentum*. De manera adicional, se determinó el efecto tóxico contra las larvas de *A. salina*.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento primario vía cromatografía en columna del extracto cloroformo-metanólico de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hex/CHCl ₃	60:40	1-55	Ey-I ^{a,b}
Hex/CHCl ₃	40:60	56-60	Ey-II ^{a,b}
Hex/CHCl ₃	20:80	61-79	Ey-III ^c
CHCl ₃	100	80-106	Ey-IV ^a
CHCl ₃ /MeOH	90:10	107-120	Ey-V ^c
CHCl ₃ /MeOH	80:20	121-123	Ey-VI ^c
CHCl ₃ /MeOH	50:50	124-131	Ey-VII ^c

^a fracciones fitotóxicas; ^b fracciones tóxicas para *A. salina*; ^c fracciones inactivas.

5. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS ACTIVAS

5.1 Obtención de la 2-tridecanona (63), la 2-pentadecanona (64) y la 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).

La fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 8) se obtuvo como un sólido delicuescente (2.43 g) que al ser analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, demostró estar constituido por una mezcla de tres compuestos que se encontraban en una proporción de 84, 14 y 2 % y que fueron identificados como los productos (63), (64) y (65), respectivamente.

La separación del constituyente mayoritario se logró mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando un sistema cromatográfico Waters integrado a una bomba modelo 600, un detector con arreglo de diodos modelo 996 y una columna preparativa de fase normal (μ Porasil 19 x 300 mm, diámetro de partícula 10 μ m, irregular). En este análisis la longitud de onda de detección fue de 214 nm y la fase móvil estuvo constituida por hexano, con un flujo de 7.0 mL/min.

5.2 Obtención del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

De la fracción primaria activa Ey-II (Cuadro 8) cristalizaron 82 mg de un sólido cristalino de color blanco, soluble en CHCl_3 y con un p. f. de 135-138 °C.

5.3 Obtención del β -lupeol (59).

La fracción primaria Ey-III (Cuadro 8) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta de gel de sílice (7.5 g de muestra y 250 g de gel de sílice). El proceso de elución se efectuó con

III. Parte experimental

hexano y cloroformo, en diferentes proporciones. Se obtuvieron 119 fracciones de 150 mL cada una, reuniéndose las que resultaron cromatográficamente similares. En el Cuadro 9 se presentan los sistemas de elución utilizados y las fracciones combinadas.

Cuadro 9. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción primaria Ey-III (Cuadro 8).

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hex/CHCl ₃	80:20	1-32	Ey-III-A
Hex/CHCl ₃	70:30	33-50	Ey-III-B
Hex/CHCl ₃	60:40	51-68	Ey-III-C
Hex/CHCl ₃	20:80	69-100	Ey-III-D
CHCl ₃	100	101-119	Ey-III-E

La fracción secundaria Ey-III-D (1.0 g) (Cuadro 9) se recromatografió en una columna abierta sobre 100 g de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 48 fracciones de 50 mL cada una, utilizando como eluyentes hexano y cloroformo, en diversas proporciones. De nueva cuenta, las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa delgada con la finalidad de reunir las que presentaban homogeneidad cromatográfica. El Cuadro 10 resume este proceso cromatográfico.

Cuadro 10. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción Ey-III-D (Cuadro 9).

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hex/CHCl ₃	50:50	1-7	Ey-III-F
Hex/CHCl ₃	50:50	8-14	Ey-III-G
CHCl ₃	100	15-48	Ey-III-H

III. Parte experimental

De la fracción Ey-III-G precipitaron espontáneamente 177 mg de un sólido de color blanco, soluble en CHCl_3 y con un p. f. de 179-182 °C. Este sólido se caracterizó como el β -lupeol por comparación con una muestra auténtica.

5.4 Obtención de la imperatorina (41) y de la asarinina (67).

El compuesto (41) precipitó de manera espontánea de la fracción primaria activa Ey-IV (Cuadro 8), como un sólido cristalino de color blanco (75 mg), soluble en CHCl_3 y con un p. f. de 93-95 °C.

Posteriormente, las aguas madres de la fracción primaria, constituida principalmente por pigmentos, se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta (13 g de muestra y 270 g de gel de sílice). Como eluyentes se emplearon hexano- CHCl_3 , CHCl_3 y CHCl_3 -MeOH, en varias proporciones. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina y se reunieron aquellas que resultaron cromatográficamente similares. En el Cuadro 11 se presentan las fracciones combinadas y los sistemas de elución empleados.

Cuadro 11. Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna abierta de la fracción primaria activa Ey-IV (Cuadro 8).

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hex/ CHCl_3	70:30	1-49	Ey-IV-A
Hex/ CHCl_3	50:50	50-56	Ey-IV-B
Hex/ CHCl_3	40:60	57-74	Ey-IV-C
CHCl_3	100	75-106 107-110	Ey-IV-D Ey-IV-E
CHCl_3 /MeOH	80:20	111-134	Ey-IV-F

III. Parte experimental

Cada una de las fracciones secundarias resultantes se evaluaron mediante el ensayo de bioautografía, encontrándose que la actividad fitotóxica se concentraba en la fracción secundaria Ey-IV-D (Cuadro 11), por lo que se procedió a realizar la recromatografía de la misma en una columna abierta, empleando 8 g de muestra y 270 g de gel de sílice. En el Cuadro 12 se resumen los datos referentes a este fraccionamiento terciario.

A partir de la fracción Ey-IV-I (Cuadro 12) precipitó un sólido amorfo de color blanco. El análisis mediante cromatografía en capa fina de este sólido demostró que se trataba de una mezcla formada por dos constituyentes. La separación de los productos se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada, empleando como sistema de elución CHCl_3 -MeOH (99:1). Se utilizaron dos cromatoplasmas de gel de sílice (0.25 mm de espesor); en cada placa se sembraron 10 mg de muestra y el proceso de elución se realizó dos veces. Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron 6 mg adicionales del compuesto (41) y 10 mg del compuesto (67), este último bajo la forma de un sólido cristalino, soluble en CHCl_3 y con un p. f. de 122 °C.

Cuadro 12. Resumen de la cromatografía en columna abierta de la fracción secundaria Ey-IV-D (Cuadro 11).

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE DE LA FRACCIÓN COMBINADA
Hex/ CHCl_3	50:50	1-25	Ey-IV-G
Hex/ CHCl_3	40:60	26-39	Ey-IV-H
Hex/ CHCl_3	30:70	40-63	Ey-IV-I
Hex/ CHCl_3	20:80	64-76	Ey-IV-J
CHCl_3	100	77-81	Ey-IV-K
CHCl_3 /MeOH	90:10	82-107	Ey-IV-L

III. Parte experimental

5.5 Obtención del β -sitosterol (68).

De la fracción secundaria Ey-IV-I (Cuadro 12) se obtuvo un sólido cristalino de color blanco, soluble en CHCl_3 , que fue identificado como β -sitosterol por comparación con una muestra auténtica.

5.6 Obtención de la hesperidina (69).

De la fracción primaria Ey-VI (Cuadro 8) se aislaron 577 mg de un sólido amorfo de color café claro, soluble parcialmente en MeOH y agua e insoluble en CHCl_3 , con un p. f. de 258-261 °C.

5.7 Preparación del aceite esencial de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.

El aceite esencial de las partes aéreas de *E. yaxhoob* se obtuvo mediante el método de destilación por arrastre con vapor de agua que se describe a continuación:

En el matraz generador de vapor se colocaron aproximadamente 500 mL de agua destilada y se agregaron piedras de ebullición. En el matraz contenedor del material vegetal se colocaron 100 g de las partes aéreas fragmentadas a *grosso modo*. Posteriormente, el matraz generador de vapor se calentó hasta ebullición. El calentamiento se suspendió cuando se obtuvieron aproximadamente 250 mL de destilado.

El aceite esencial se extrajo totalmente del destilado mediante un proceso de partición, empleando acetato de etilo como disolvente orgánico. La fase acuosa se desechó y a la fase orgánica se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente. Posteriormente, la fase orgánica se filtró y se concentró al vacío.

Como resultado del proceso anterior, se obtuvieron 50 mg del aceite esencial, el cual, al ser analizado por cromatografía de gases acoplada a

III. Parte experimental

espectrometría de masas, resultó estar constituido en un 95.4 % por el compuesto (63).

6. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS NATURALES

6.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se describen corregidos.

Los espectros de infrarrojo se registraron en la Facultad de Química de la UNAM, en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599, en pastilla de KBr.

Los espectros de masas se determinaron en el Instituto de Química de la UNAM, en un aparato Hewlett-Packard 5890 serie II, mediante introducción directa a 70 eV, en tanto que los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos se obtuvieron en un aparato Jeol JMS-SX102A. En el caso de los análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se utilizó el mismo espectrómetro de masas y la columna de separación empleada fue de tipo PAS 1701 Tested 1702 silicona HP, con una longitud de 25 m x 0.32 de diámetro interior; como gas acarreador se empleó helio a presión con un flujo de 1 mL/min; la temperatura de la columna se programó de 100 a 270 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min; la temperatura de inyección fue de 260 °C.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protones y de carbono 13 se determinaron en el Instituto de Química, en aparatos Varian Unity Plus 300 y Varian Unity Plus 500, utilizando como disolventes CDCl_3 , benceno- d_6 o $\text{DMSO}-d_6$. Como referencia interna se empleó TMS.

El estudio de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, en un difractómetro Nicolet R3m.

6.2 Prueba de Molish para carbohidratos.

Una pequeña cantidad del producto (69), contenido en un tubo de ensayo, se disolvió en 3 mL de agua destilada y se le agregó 1 mL de una solución de reactivo de α -naftol (10 % en etanol); seguidamente se adicionaron por las paredes del tubo de ensayo dos gotas de H_2SO_4 concentrado, observándose entonces una coloración violeta en la interfase de los líquidos, lo cual fue indicativo de la presencia de carbohidratos (prueba de Molish positiva) (Vogel, 1989). Paralelamente, se desarrollaron un control positivo y un control negativo.

6.3 Hidrólisis ácida de la hesperidina (69).

A un gramo del producto (69) se le adicionaron 20 mL de etilenglicol y 1 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla de reacción se sometió a un calentamiento durante 40 min. Posteriormente, la solución se vertió sobre 50 mL de agua y el precipitado obtenido se filtró y se lavó con agua. El filtrado se neutralizó con NH_4OH y se concentró al vacío (Ikan, 1991).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

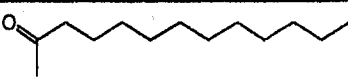
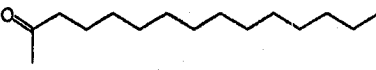
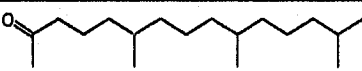
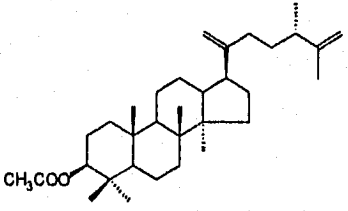
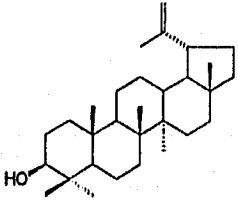
1. EVALUACIONES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DEL EXTRACTO TOTAL Y DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS DE *ESENBECKIA YAXHOOB* LUNDELL.

El extracto activo cloroformo-metanólico (1:1) de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* fue evaluado para determinar su efecto sobre la germinación y el crecimiento radicular de cuatro especies de semillas (*Amaranthus hypochondriacus*, *Echinochloa crusgalli*, *Lactuca sativa* y *Lycopersicon esculentum*), empleando el método bioautográfico indicado en el punto 2.1 de la Sección Experimental. La bioautografía del extracto permitió detectar claramente tres zonas de inhibición y sus valores de factores de retención, en el sistema de elución CHCl_3 (100 %), fueron 0.9, 0.8 y 0.4, respectivamente. Posteriormente, se procedió a fraccionar el extracto mediante una cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, con la finalidad de obtener los compuestos activos del mismo. Este proceso permitió la obtención de siete fracciones primarias (Cuadro 8, Sección Experimental) y la evaluación del efecto fitotóxico de las mismas mediante el ensayo de bioautografía, indicó que la actividad fitoinhibidora se concentraba en las fracciones Ey-I, Ey-II y Ey-IV. Es importante mencionar que los valores de factores de retención de los componentes mayoritarios de las fracciones activas, en el sistema de elución CHCl_3 (100 %), coincidían con los correspondientes a las zonas de inhibición observadas en la bioautografía del extracto original. Posteriormente, sucesivas cromatografías de las fracciones activas permitieron el aislamiento de nueve metabolitos secundarios. En el Cuadro 13 se especifican los compuestos aislados, su rendimiento con relación al peso de la planta seca y las fracciones de donde se obtuvieron.

De manera adicional, se evaluó el efecto tóxico para *Artemia salina* del extracto y de las fracciones primarias, encontrándose que tanto el extracto total como las fracciones fitoinhibidoras Ey-I y Ey-IV, mostraban una actividad larvicida significativa, obteniéndose valores de CL_{50} de 57.76, 282.73 y 56.86 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Anderson *et al.*, 1991).

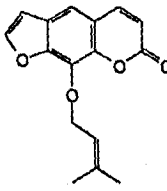
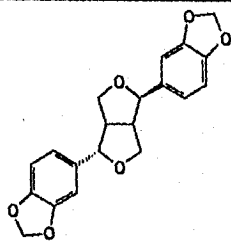
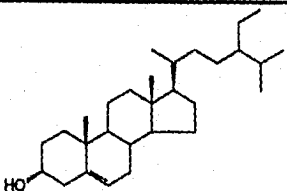
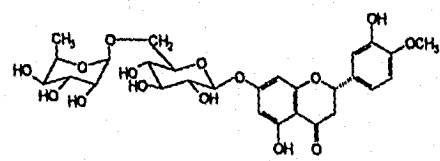
IV. Resultados y Discusión

Cuadro 13. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.

COMPUESTO	RENDIMIENTO	FRACCIÓN
 (63)	0.113 %	Ey-I
 (64)	0.019 %	Ey-I
 (65)	0.003 %	Ey-I
 (66)	0.005 %	Ey-II
 (69)	0.001 %	Ey-III

IV. Resultados y Discusión

Cuadro 13. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* (continuación).

COMPUESTO	RENDIMIENTO	FRACCIÓN
 <p>(41)</p>	0.005 %	Ey-IV
 <p>(67)</p>	0.001 %	Ey-IV
 <p>(68)</p>	no determinado	Ey-IV-I
 <p>(69)</p>	0.032 %	Ey-VI

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS AISLADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

La caracterización de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación se discutirá en detalle los aspectos más importantes del análisis que permitió la determinación de la estructura molecular de los mismos.

2.1 Identificación de las cetonas 2-tridecanona (63), 2-pentadecanona (64) y 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).

El análisis de la fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 8) mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, indicó que la misma estaba constituida por una mezcla de tres productos (Figura 1). Los tiempos de retención así como el porcentaje de los componentes en la fracción se indican en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Tiempos de retención y porcentaje de los componentes de la fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 8).

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	PROPORCIÓN (%)
2-tridecanona (63)	7.60	84
2-pentadecanona (64)	10.18	14
6,10,14-trimetilpentadecanona (65)	11.47	2

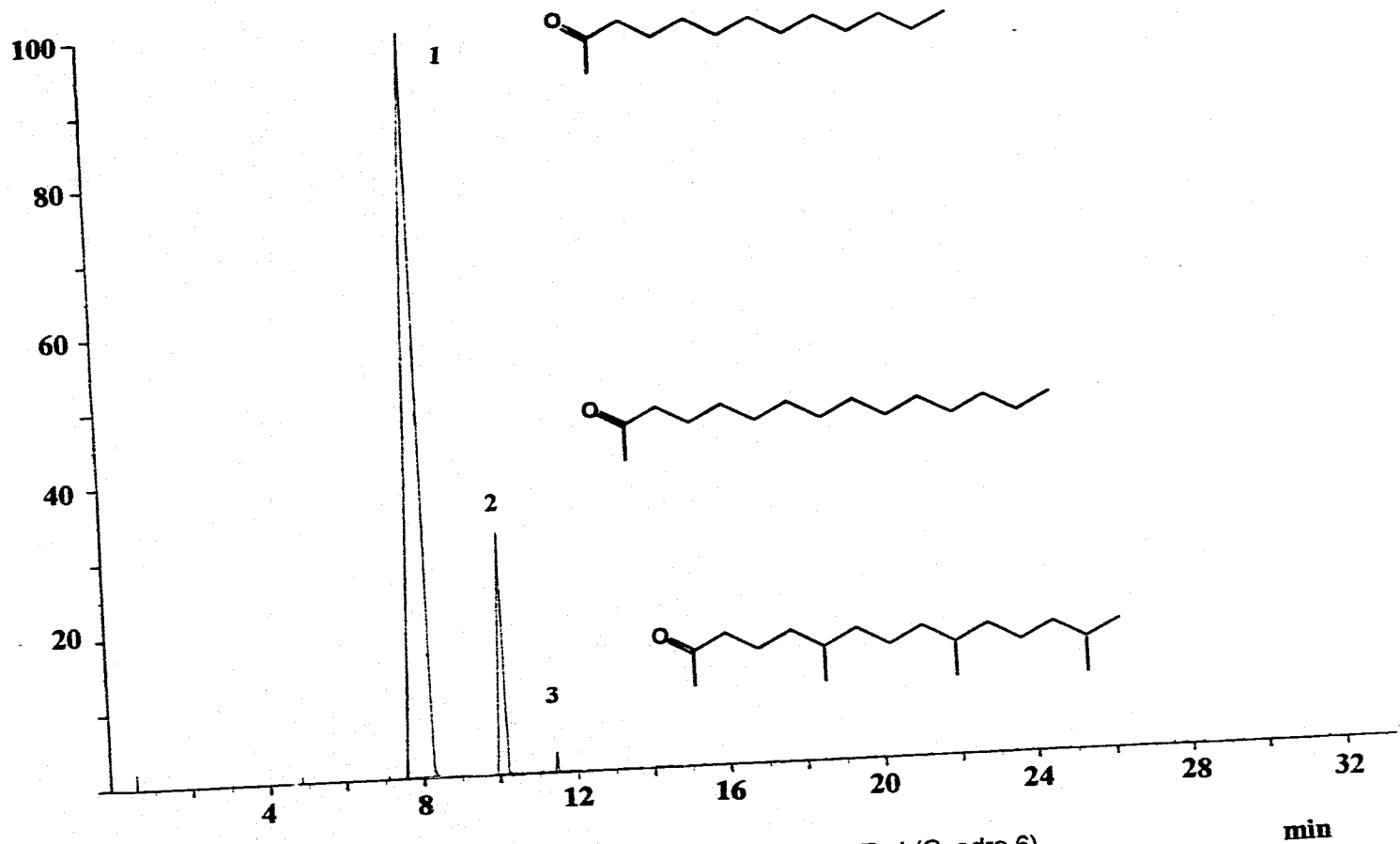
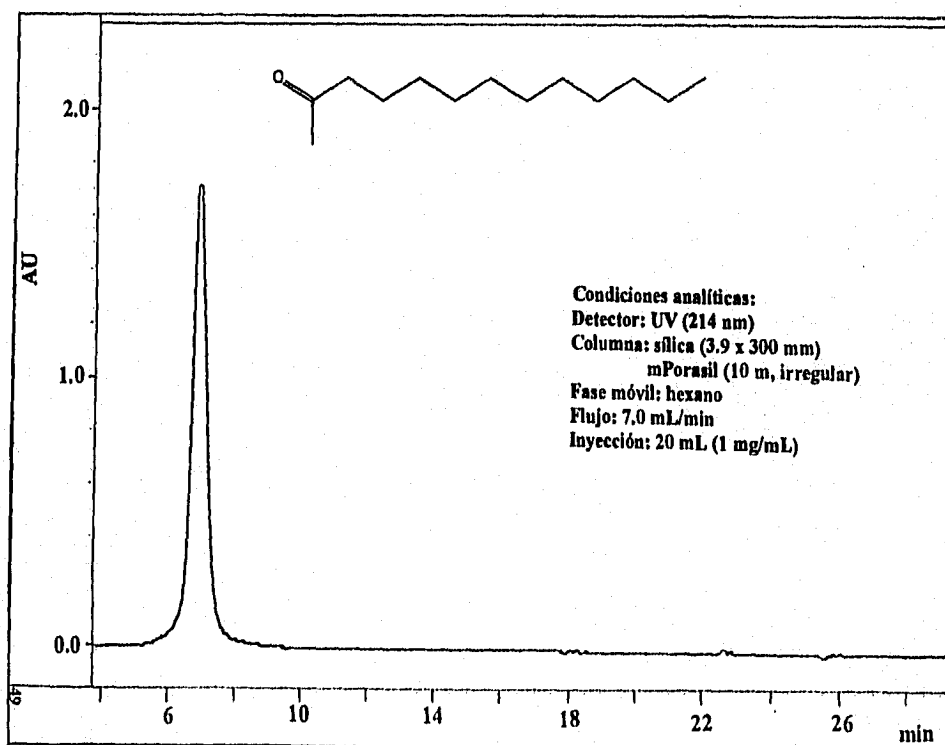


Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción primaria activa Ey-I (Cuadro 6).

IV. Resultados y Discusión

Estos compuestos se identificaron como la 2-tridecanona (**63**), la 2-pentadecanona (**64**) y la 6,10,14-trimetilpentadecanona (**65**), al comparar los espectros de masas generados con los registrados en un banco de datos (Public/NIST) [Figuras 2-4]. Posteriormente, el compuesto (**63**), componente mayoritario de la mezcla, se separó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, utilizando las condiciones que se indicaron en el punto 5.1 de la Sección Experimental (Figura 5). En el Cuadro 15 se resumen los datos espectrométricos y espectroscópicos para este compuesto.

Figura 5. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de la fracción Ey-I del extracto de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob*.



Su espectro en el IR (infrarrojo) [Figura 6] presenta la banda de absorción característica para el grupo carbonilo de una cetona alifática (ν_{\max} 1719 cm^{-1}). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular (M^+) con una relación de masa-carga (m/z) de 198 y permite establecer la fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}$ (Figura 2).

Los espectros de resonancia magnética nuclear confirmaron que el producto natural es una cetona lineal de trece átomos de carbono, con el grupo ceto en la posición C-2. Las evidencias más importantes que sustentan esta propuesta son las siguientes:

a) El espectro de RMN- ^1H (Resonancia Magnética Nuclear de Protones) [Figura 7] presenta señales para un metilo α a un grupo carbonilo (s, δ_{H} 2.13), un metilo terminal (t, δ_{H} 0.88, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -13) y para diez metilenos, uno vecinal al grupo carbonilo en δ_{H} 2.41 y los nueve restantes ubicados en la zona comprendida entre δ_{H} 1.26-1.58.

b) El espectro de RMN- ^{13}C (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13) [Figura 8] muestra señales para el carbonilo de la cetona en δ_{C} 209.10 (C-2) y para los dos metilos evidenciados en el espectro de RMN- ^1H en δ_{C} 29.67 (C-1) y δ_{C} 13.98 (C-13). Las señales restantes corresponden a grupos metilenos y la asignación de las mismas se realizó por comparación con modelos apropiados (Breitmaier y Voelter, 1989).

En general, los datos espectroscópicos del compuesto (63) se encontraron en perfecta armonía con los previamente descritos para este tipo de productos, y más específicamente, para la 2-tridecanona (Williams *et al.*, 1980; Breitmaier y Voelter, 1989). Cabe destacar que esta cetona ha sido aislada previamente de los exudados y de los aceites esenciales de varias especies de plantas del género *Lycopersicon* y que ha mostrado propiedades insecticidas significativas contra las especies *Manduca sexta*, *Heliothis zea* y *Aphis gossypii* (Kennedy y Henderson, 1978; Kennedy y Yamamoto, 1979; Williams *et al.*, 1980; Kennedy *et al.*, 1981; Dimock *et al.*, 1982).

Su espectro en el IR (infrarrojo) [Figura 6] presenta la banda de absorción característica para el grupo carbonilo de una cetona alifática (ν_{\max} 1719 cm^{-1}). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular (M^+) con una relación de masa-carga (m/z) de 198 y permite establecer la fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}$ (Figura 2).

Los espectros de resonancia magnética nuclear confirmaron que el producto natural es una cetona lineal de trece átomos de carbono, con el grupo ceto en la posición C-2. Las evidencias más importantes que sustentan esta propuesta son las siguientes:

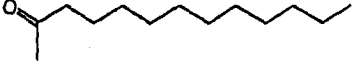
a) El espectro de RMN- ^1H (Resonancia Magnética Nuclear de Protones) [Figura 7] presenta señales para un metilo α a un grupo carbonilo (s, δ_{H} 2.13), un metilo terminal (t, δ_{H} 0.88, $J = 7.2$ Hz, CH_3 -13) y para diez metilenos, uno vecinal al grupo carbonilo en δ_{H} 2.41 y los nueve restantes ubicados en la zona comprendida entre δ_{H} 1.26-1.58.

b) El espectro de RMN- ^{13}C (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13) [Figura 8] muestra señales para el carbonilo de la cetona en δ_{C} 209.10 (C-2) y para los dos metilos evidenciados en el espectro de RMN- ^1H en δ_{C} 29.67 (C-1) y δ_{C} 13.98 (C-13). Las señales restantes corresponden a grupos metilenos y la asignación de las mismas se realizó por comparación con modelos apropiados (Breitmaier y Voelter, 1989).

En general, los datos espectroscópicos del compuesto (63) se encontraron en perfecta armonía con los previamente descritos para este tipo de productos, y más específicamente, para la 2-tridecanona (Williams *et al.*, 1980; Breitmaier y Voelter, 1989). Cabe destacar que esta cetona ha sido aislada previamente de los exudados y de los aceites esenciales de varias especies de plantas del género *Lycopersicon* y que ha mostrado propiedades insecticidas significativas contra las especies *Manduca sexta*, *Heliothis zea* y *Aphis gossypii* (Kennedy y Henderson, 1978; Kennedy y Yamamoto, 1979; Williams *et al.*, 1980; Kennedy *et al.*, 1981; Dimock *et al.*, 1982).

IV. Resultados y Discusión

Cuadro 15. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la 2-tridecanona (63).

 $C_{13}H_{26}O$	
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Figura 6)	2925, 2854, 1466, 1719.
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 2)	$[M^+]$ 98 (4), 183 (2), 155 (1), 140 (5).
RMN- 1H , δ (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 7)	2.41 (t, 2H, CH_2 -3), 2.13 (s, 3H, CH_3 -1), 1.58 (m, 2H, CH_2 -4), 1.26 (s, 16H), 0.88 (t, J = 6.6 Hz, 3H, CH_3 -13).
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 8)	209.09 (CO), 43.66 (C-3), 31.79 (C-4), 29.67 (C-1), 29.51 (C-5), 29.36 (C-6), 29.30 (C-7), 29.24 (C-8), 29.08 (C-9,10), 23.76 (C-11), 22.56 (C-12), 13.98 (C-13).

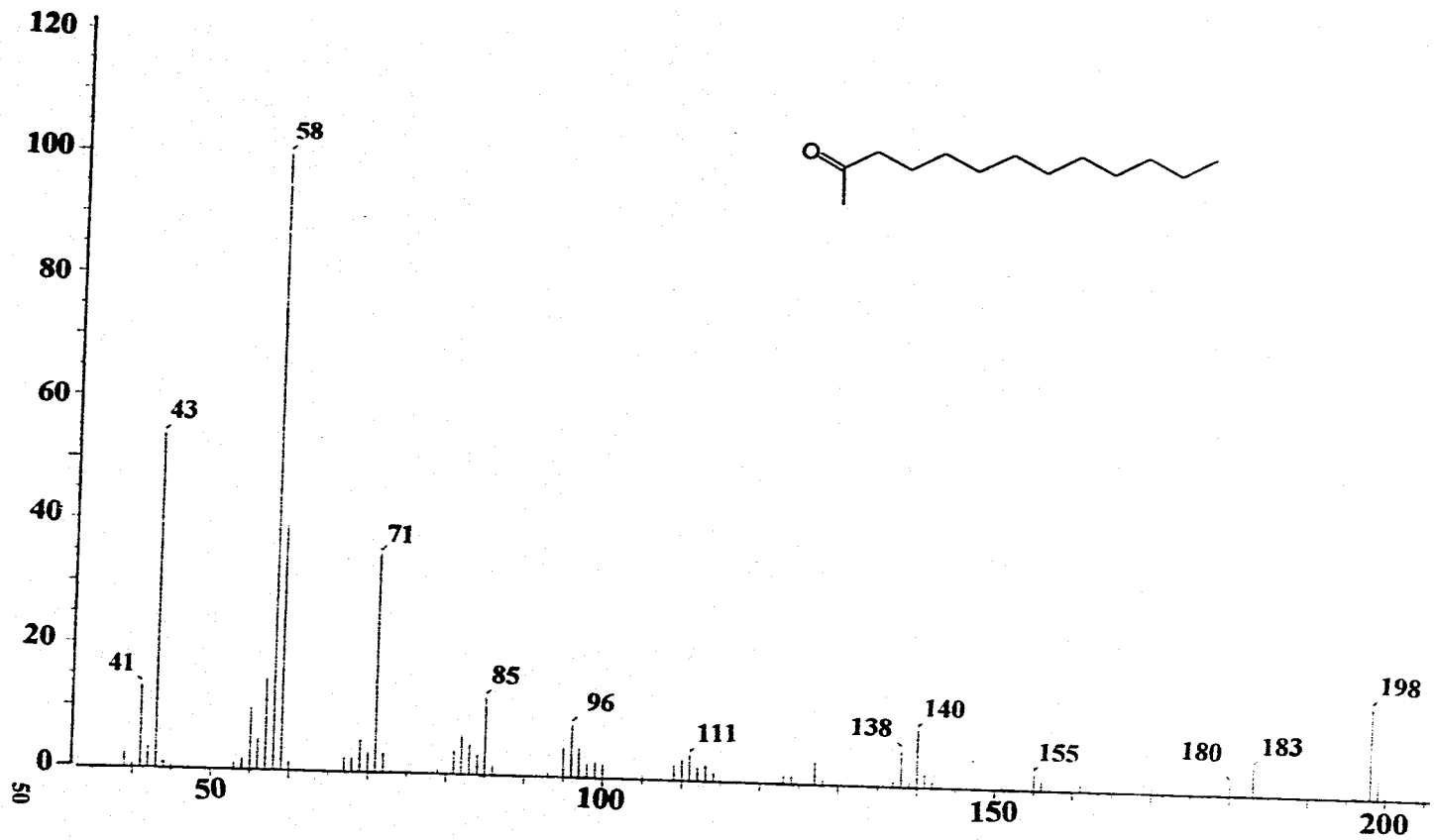


Figura 2. Espectro de masas (70 eV) de la 2-tridecanona (63).

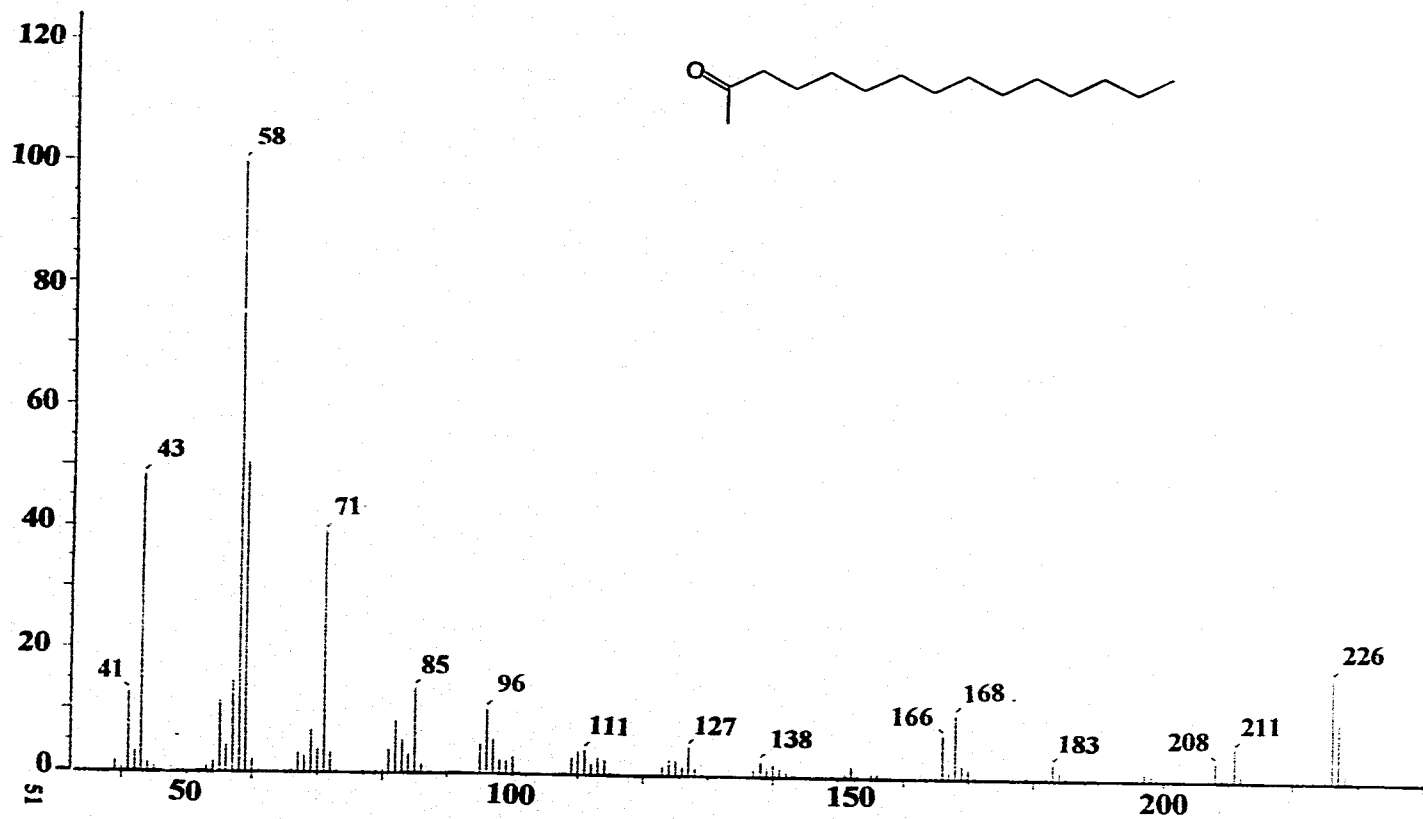


Figura 3. Espectro de masas (70 eV) de la 2-pentadecanona (64).

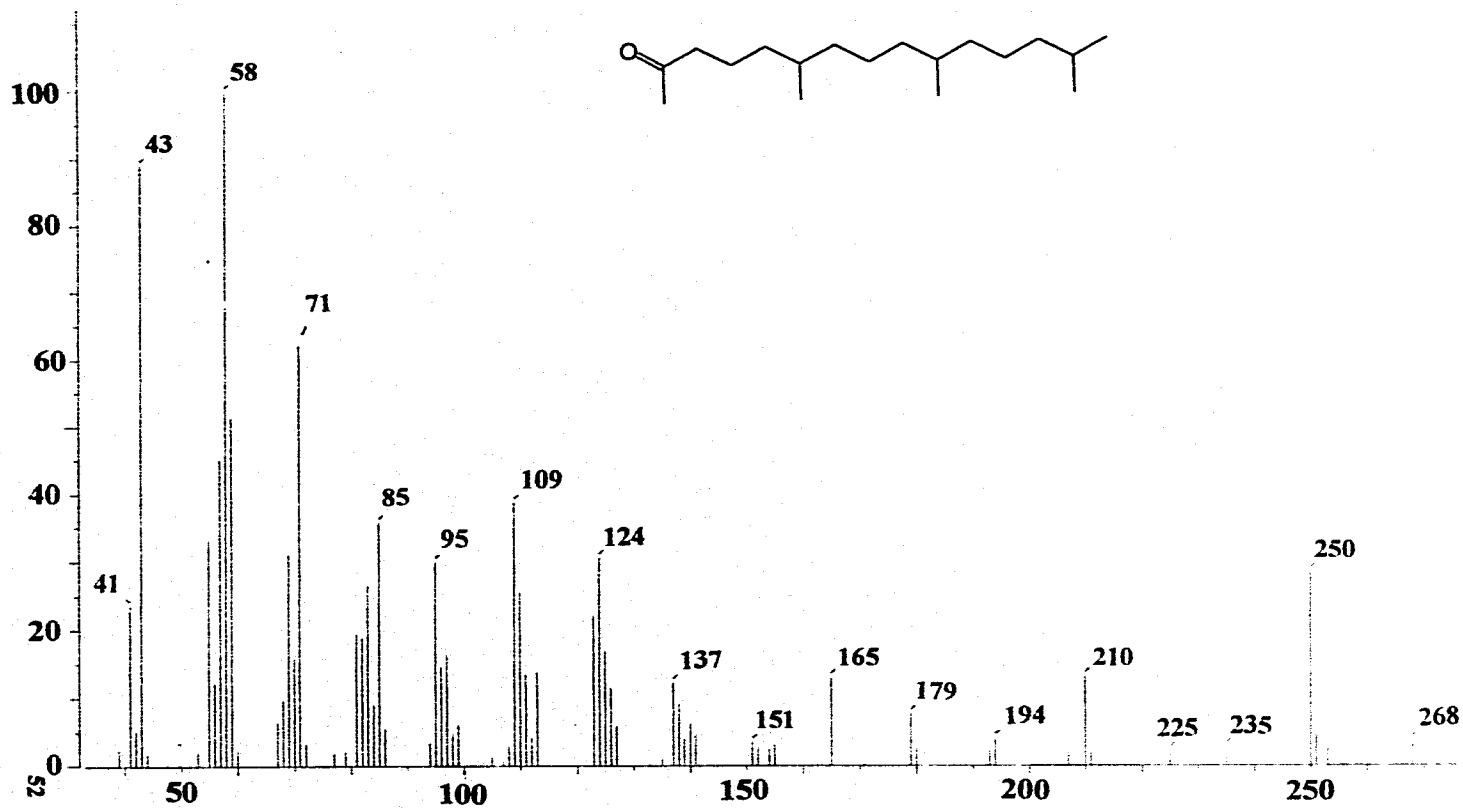


Figura 4. Espectro de masas (70 eV) de la 6,10,14-trimetilpentadecanona (65).

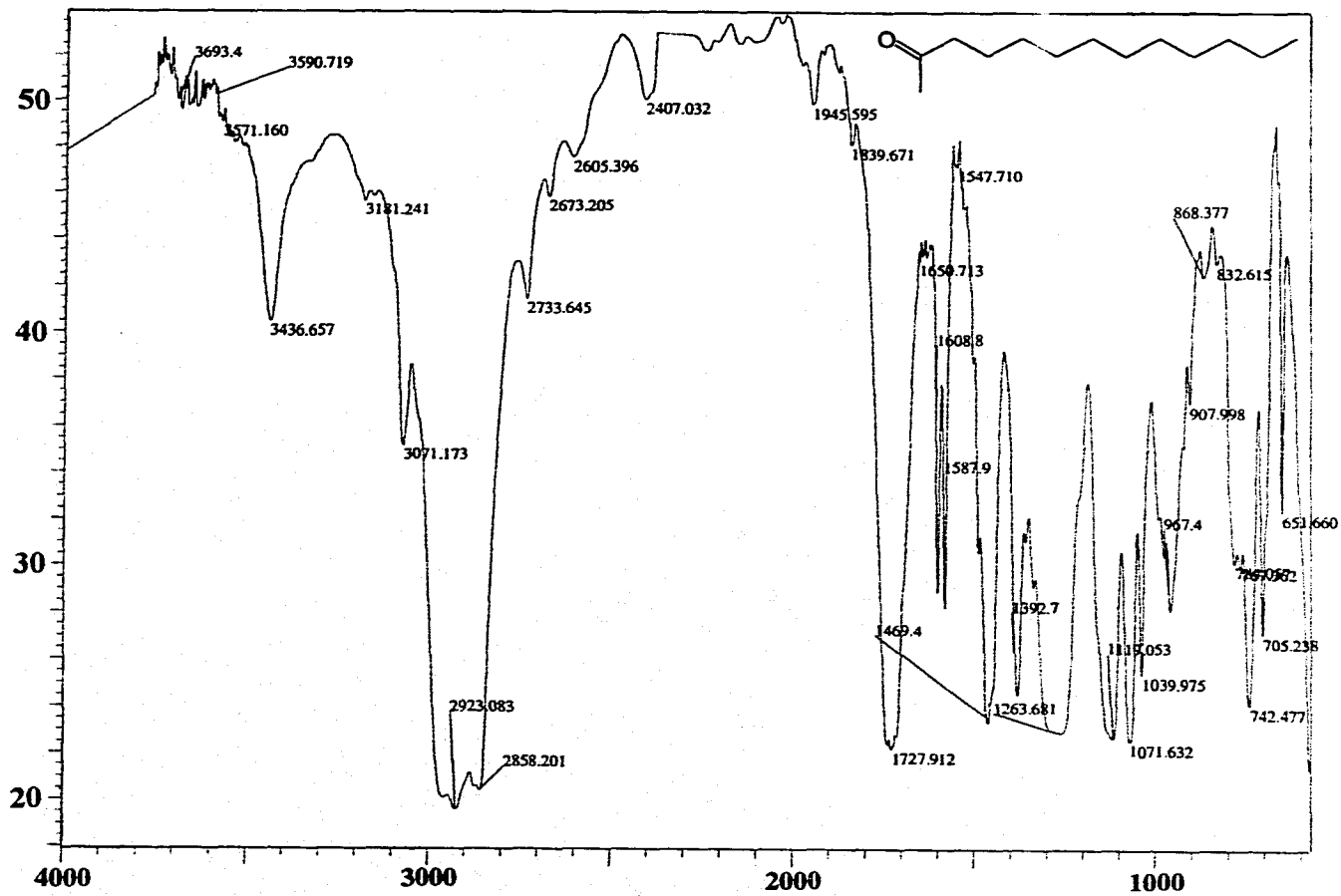


Figura 6. Espectro en el IR de la 2-tridecanona (63).

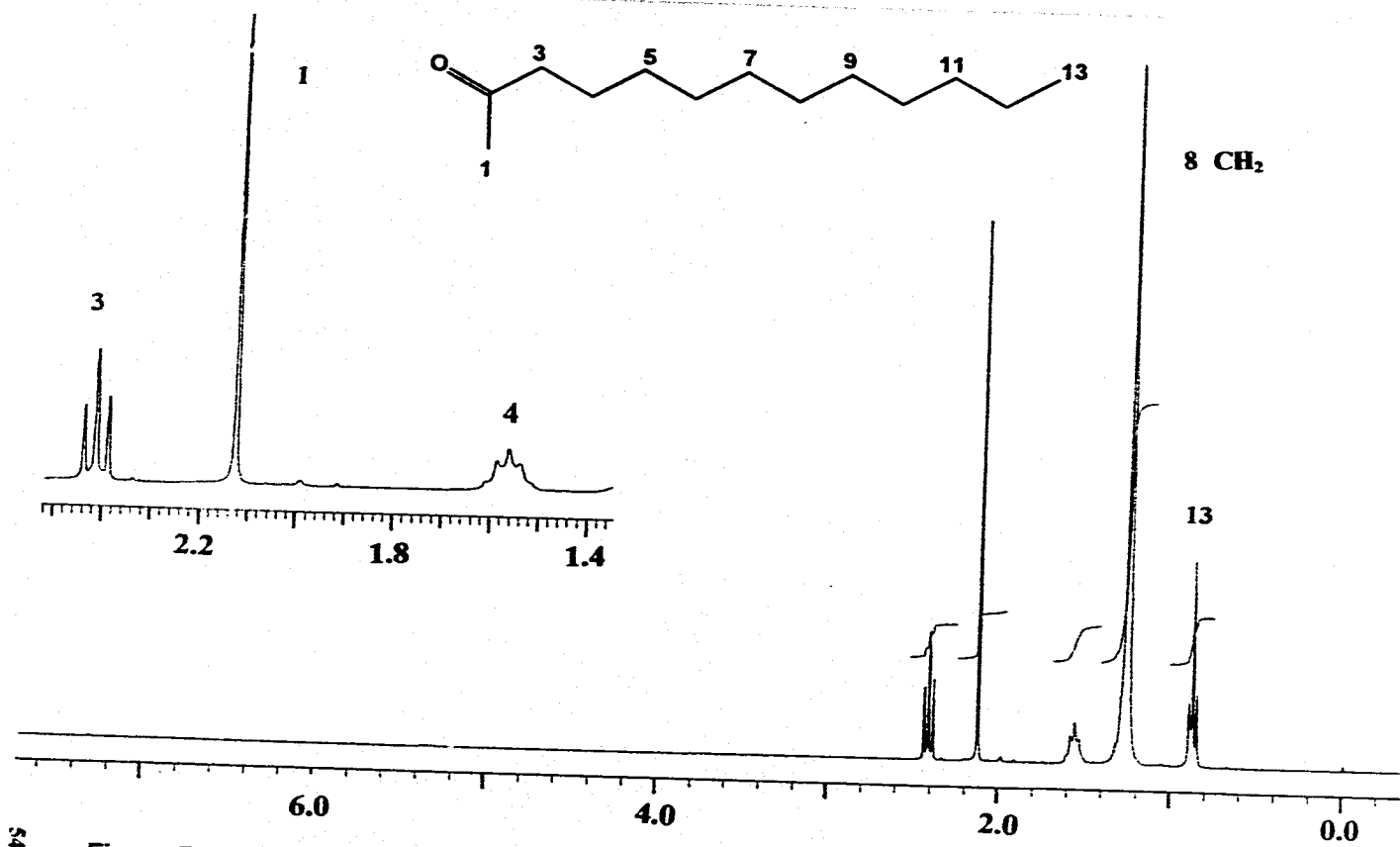


Figura 7. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) de la 2-tridecanona (63).

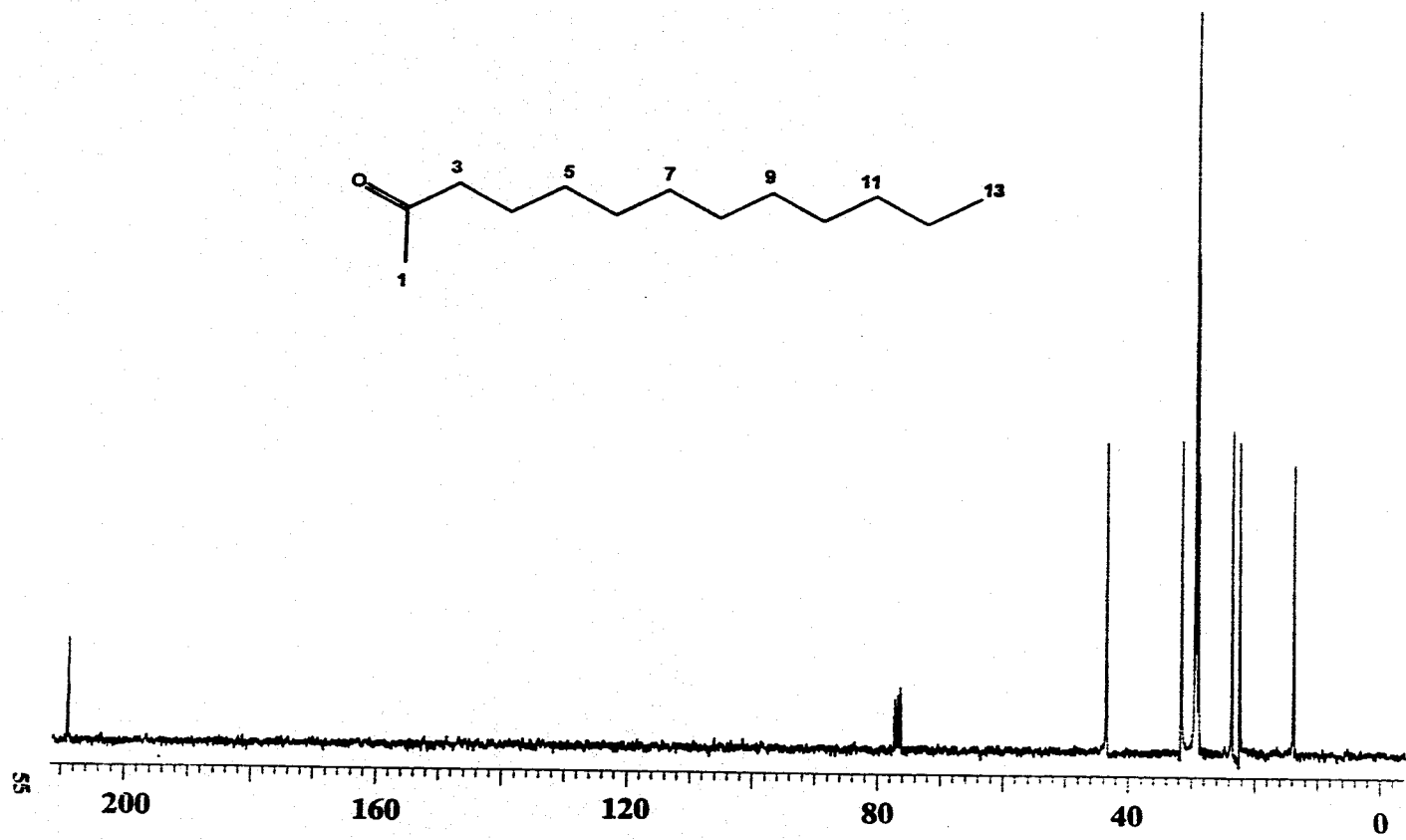


Figura 8. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la 2-tridecanona (63).

2.2 Identificación del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

El producto natural (66) se obtuvo de la fracción primaria Ey-II (Cuadro 8, Sección Experimental) como un sólido cristalino de color blanco, soluble en CHCl_3 . Las constantes espectroscópicas y espectrométricas utilizadas para su caracterización se resumen en el Cuadro 16.

El espectro en el IR de este compuesto (Figura 9) presenta bandas de absorción asociadas con la presencia en la molécula de funciones éster (ν_{max} 1726 y 1252 cm^{-1}) y olefínicas (ν_{max} 1642 y 884 cm^{-1}).

El ion molecular observado en el espectro de masas con una relación m/z de 482 (Figura 10) permite establecer la fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{54}\text{O}_2$, la cual permite un índice de insaturación de siete.

El espectro de RMN- ^1H (Figura 11) presenta dos sistemas AB asignables a los protones de dos metilenos vinílicos (δ_{HA} 4.96 y δ_{HB} 4.92; $\delta_{\text{HA}'}$ 4.83 y $\delta_{\text{HB}'}$ 4.81); cada par de señales muestra correlación en el espectro bidimensional homonuclear COSY (Correlated Spectroscopy) [Figura 12]. La presencia de estas señales de tipo vinílico es congruente con la existencia de dos dobles ligaduras terminales en la molécula. Se observan también seis singuletes atribuibles a seis grupos metilo sobre carbonos cuaternarios (uno de los cuales debe corresponder a un metilo sobre una doble ligadura, considerando su desplazamiento químico en $\delta_{\text{H}} = 1.62$) y un doblete en $\delta_{\text{H}} 1.02$ ($J = 6.5$ Hz) asignable a un grupo metilo sobre un carbono terciario. Por último, en $\delta_{\text{H}} 1.75$ se observa un singulete característico del grupo metilo de una función acetato y una señal doble de dobles en $\delta_{\text{H}} 4.68$ ($J = 13.0, 5.0$ Hz) atribuible al hidrógeno geminal de una función éster.

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura 13) presenta señales para 33 carbonos en armonía con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas. El espectro de RMN- ^{13}C en su modalidad DEPT (Distortionless Enhancement by

IV. Resultados y Discusión

Polarization Transfer) [Figura 14] permite asignar estas señales a ocho metilos (δ_c 27.96, 21.35, 19.83, 18.87, 16.49, 16.28, 15.89 y 15.58), doce metilenos (δ_c 109.51, 107.03, 38.76, 35.31, 33.67, 32.44, 31.31, 29.18, 24.95, 23.69, 21.35 y 18.15), seis metinos (δ_c 80.91, 55.93, 50.83, 47.51, 45.40 y 40.43) y a siete carbonos cuaternarios (δ_c 171.03, 153.32, 149.96, 49.43, 40.99, 37.88 y 37.11).

Cabe hacer notar que el número de metilenos y metilos que se observan en los espectros de RMN, así como el número de carbonos presentes en la molécula, permiten inferir que el producto natural es de naturaleza triterpenoide.

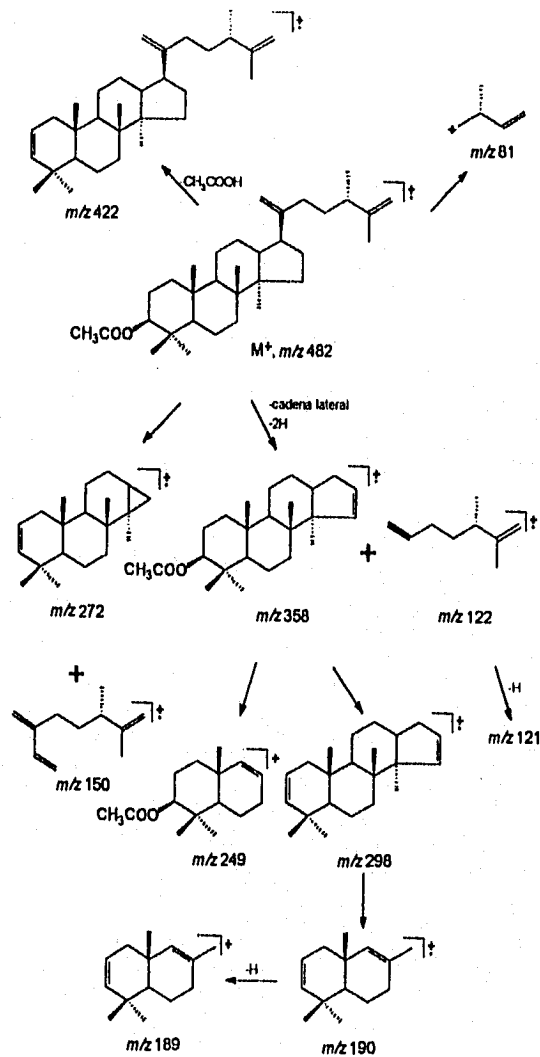
Los desplazamientos químicos de dos de los carbonos cuaternarios (δ_c 153.32 y δ_c 149.96) y de dos de los metilenos (δ_c 107.03 y δ_c 109.51) proporcionan una evidencia adicional de la presencia de dos dobles ligaduras terminales en la molécula. Las absorciones vinílicas evidenciadas en el espectro de RMN- 1H en δ_H 4.71 y δ_H 4.69, muestran una clara correlación con los metilenos en δ_c 107.03 y δ_c 109.51, respectivamente, en el espectro HETCOR (Heteronuclear Chemical Shift Correlation) [Figura 15]. Por otra parte, la absorción para el carbono cuaternario en δ_c 171.03, asignable a un grupo carbonilo, y la señal en δ_c 21.35, que correlaciona en el espectro HETCOR con la señal en δ_H 2.05 (Figura 15), evidencian la presencia de un grupo acetato en el triterpenoide. Por último, la señal doble de dobles ($J = 5, 13$ Hz) en δ_H 4.48 que correlaciona con el metino en δ_c 80.91 en el espectro HETCOR (Figura 15), es consistente con la presencia de un metino unido a una función éster.

Los elementos estructurales antes mencionados satisfacen los dos oxígenos y tres de los siete grados de insaturación requeridos por la fórmula molecular. En consecuencia, para cumplir con los requisitos de la fórmula, en cuanto a insaturaciones se refiere, el núcleo triterpenoide debe ser tetracíclico. Los fragmentos más importantes evidenciados en el espectro de masas del producto natural, y que se resumen en la Figura 16, son congruentes con esta

IV. Resultados y Discusión

hipótesis (Budzikiewckz *et al.*, 1964; Pinto *et al.*, 1980; Kikuchi *et al.*, 1985; Fattorusso *et al.*, 1985; De Pascual Teresa *et al.*, 1986).

Figura 16. Patrón de fragmentación del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (**66**).

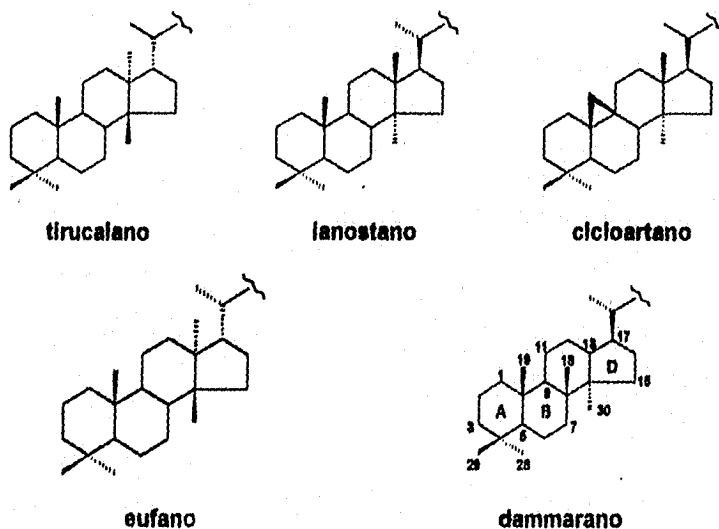


IV. Resultados y Discusión

En general, los triterpenoides presentan en sus núcleos ocho grupos metilos, los cuales se pueden encontrar en diferentes estados de oxidación (Torsell, 1983; Manitto, 1981; Herbert, 1981). En el caso del producto natural (66) aislado de *E. yaxhoob*, los espectros de RMN evidencian un total de siete metilos, sin contar la señal del acetato. Considerando que los metilenos vinílicos representan grupos metilos transformados, el producto cuenta entonces con nueve metilos, de tal forma que el compuesto aislado constituye un metil-triterpenoide tetracíclico, con dos metilenos vinílicos terminales y un grupo acetoxi.

A fin de establecer la naturaleza del núcleo triterpenoide tetracíclico, se compararon los datos de RMN con los previamente descritos para varios triterpenoides de los tipos tirucalano, lanostano, cicloartano, eufano y dammarano [Figura 17] (Asakawa *et al.*, 1977; Pinto *et al.*, 1980; Das y Mahato, 1983; Fattorusso *et al.*, 1985; Rao *et al.*, 1986; De Pascual Teresa *et al.*, 1986; Guang-Yi *et al.*, 1988; Gray *et al.*, 1988; Tori *et al.*, 1988; Mahato *et al.*, 1992).

Figura 17. Núcleos de triterpenos tetracíclicos más comunes.



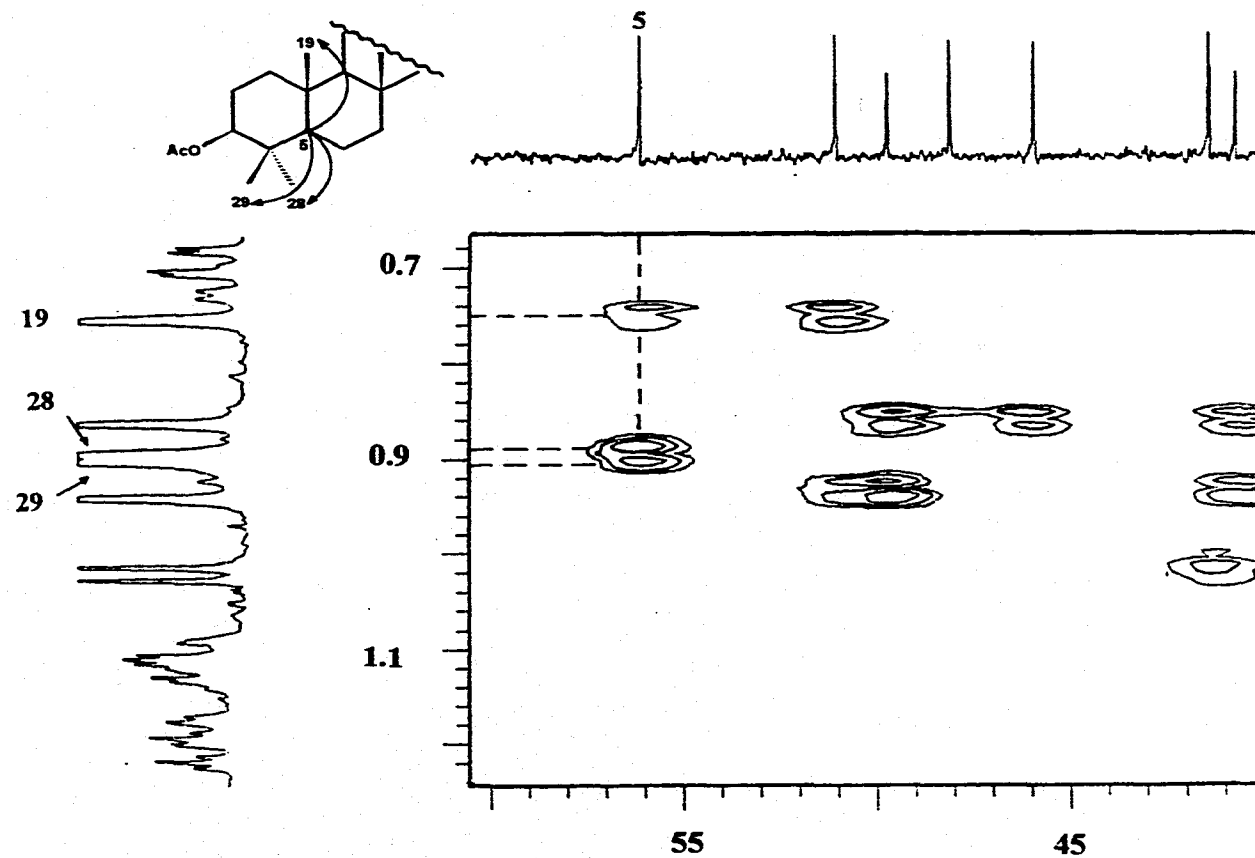
IV. Resultados y Discusión

Este análisis comparativo sugiere *a priori* que el compuesto posee un núcleo de tipo dammarano, lo cual resulta inesperado desde el punto de vista quimiotaxonómico, ya que los triterpenos tetracíclicos que se han aislado de la familia Rutaceae corresponden principalmente a los tipos tirucalano y cicloartano (Das y Mahato, 1983; Mahato *et al.*, 1992).

El análisis anterior y el estudio del espectro HETCOR (Figura 15) permiten la asignación de la mayoría de las señales del espectro de RMN-¹³C según se indica en el Cuadro 16. Con la finalidad de comprobar inequívocamente la estructura base del triterpenoide, se registró el espectro HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), el cual permite medir acoplamientos C-H a dos y tres enlaces [Figura 18] (Bax y Summers, 1986; Mahato y Kundu, 1994). El análisis de este espectro permite establecer las siguientes correlaciones y conclusiones:

En primer lugar, se observa que el metino asignable a C-5 (δ_c 56.15) correlaciona con los singuletes en δ_H 0.75, 0.89 y 0.90, los cuales son asignables a los hidrógenos de los metilos 19, 28 y 29, respectivamente. Todos los grupos mencionados se encuentran ubicados en el anillo A del tetraciclo y son prácticamente iguales en los triterpenoides tetracíclicos más comunes (Figura 19). Así mismo, la correlación de CH_3 -28 y CH_3 -29 con el oximetino en δ_c 80.49, permite ubicar al grupo acetoxi en la posición C-3 (Figura 20).

En segundo lugar, el metilo 19 (δ_H 0.75) correlaciona con el metino en δ_c 51.06 (C-9). Este último muestra también una correlación con el singulete en δ_H 0.94, el cual se atribuye a CH_3 -18 (Figura 21). Las correlaciones antes descritas sólo son posibles si el núcleo del triterpenoide es de tipo dammarano.



19

Figura 19. Correlaciones de C-5, CH₃-19, CH₃-28 y CH₃-29 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (**66**).

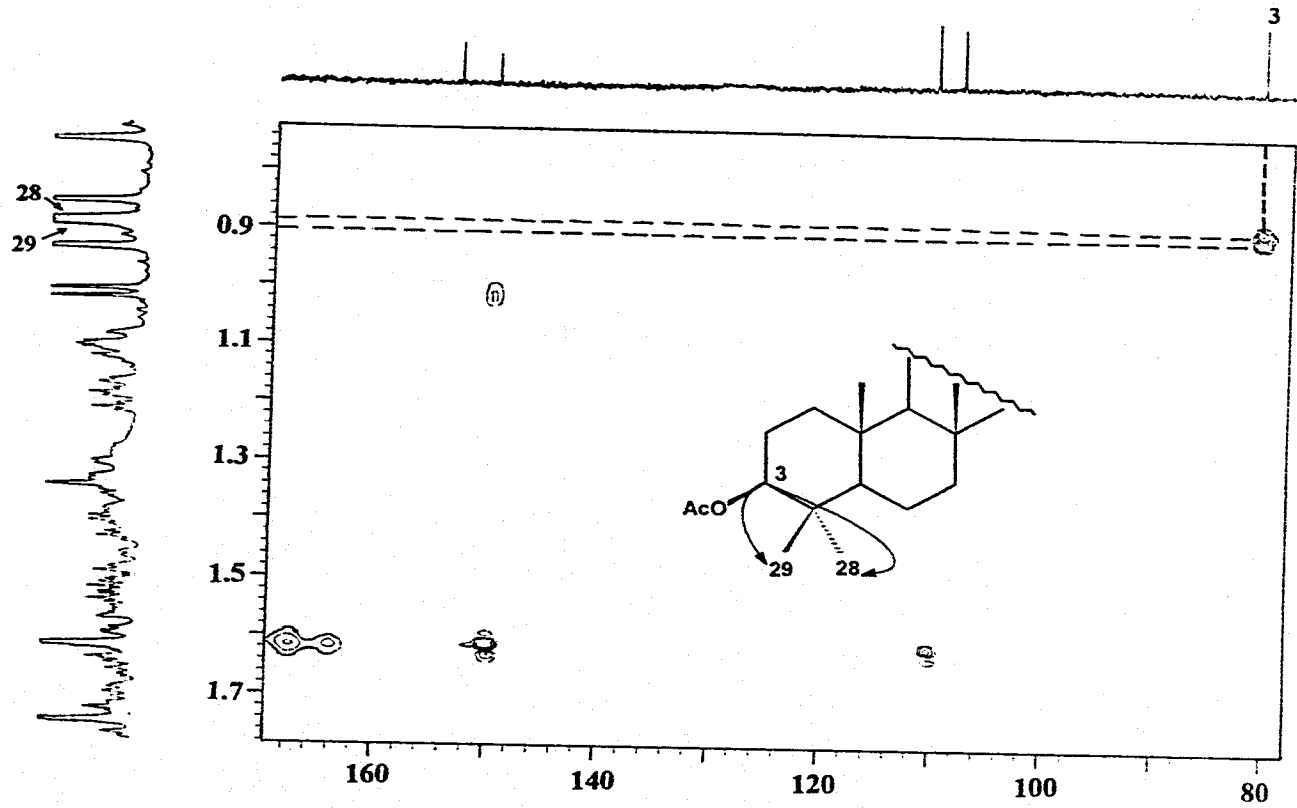
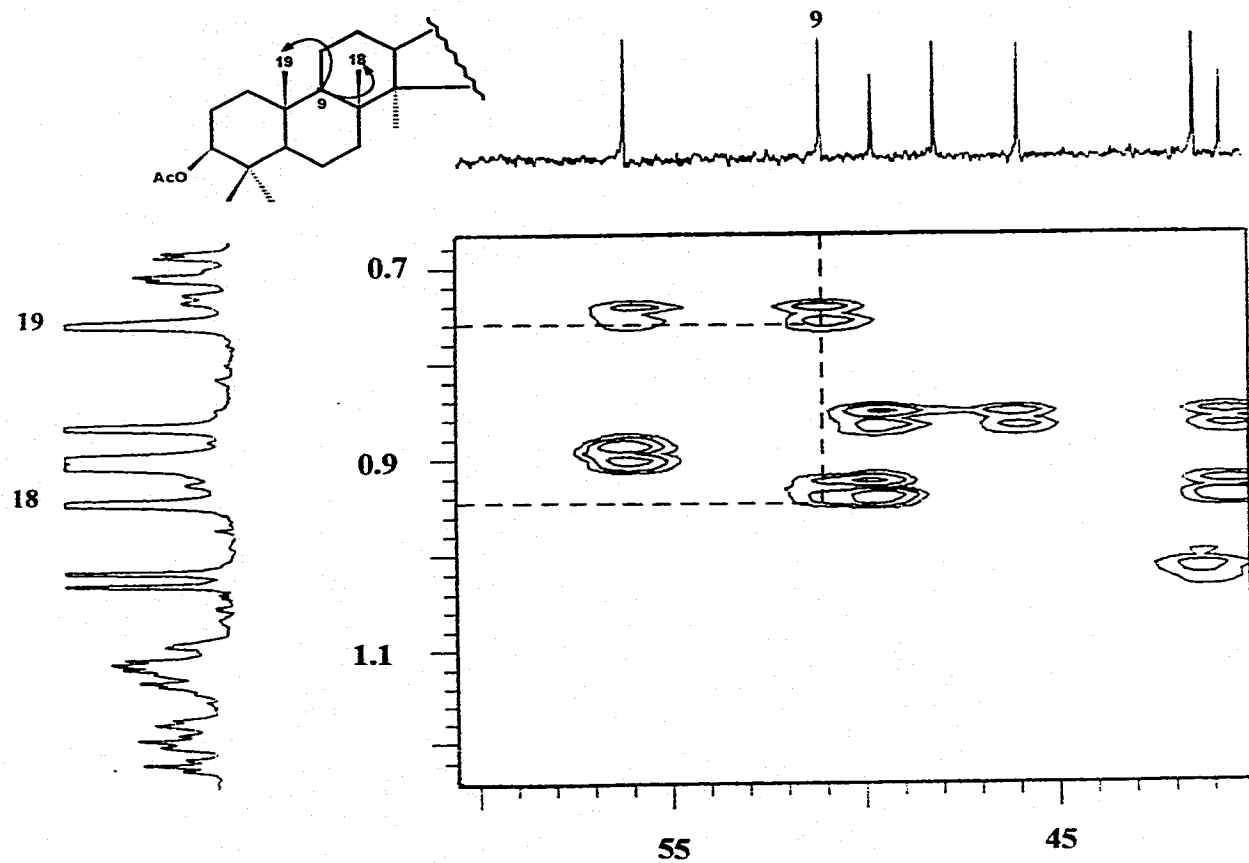


Figura 20. Correlaciones de C-3, CH₃-28 y CH₃-29 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

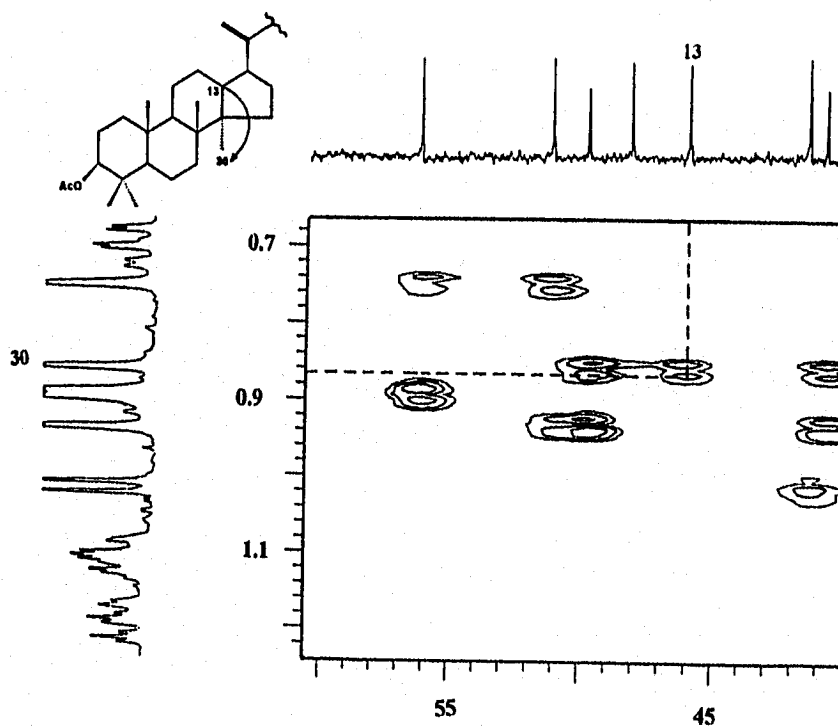


21 **Figura 21.** Correlaciones de C-9, CH₃-18 y CH₃-19 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxy-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

IV. Resultados y Discusión

Por otra parte, el singulete en δ_H 0.86 (CH_3 -30) muestra una clara interacción con el metino en δ_C 45.9 (C-13). Esta última correlación proporciona una evidencia adicional de la presencia en la molécula de un núcleo de tipo dammarano (Figura 22).

Figura 22. Correlaciones de C-13 y CH_3 -30 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno- d_6) del 3β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).



IV. Resultados y Discusión

En conclusión, con base en las correlaciones antes indicadas, se estableció que el núcleo del producto corresponde al de un dammarano.

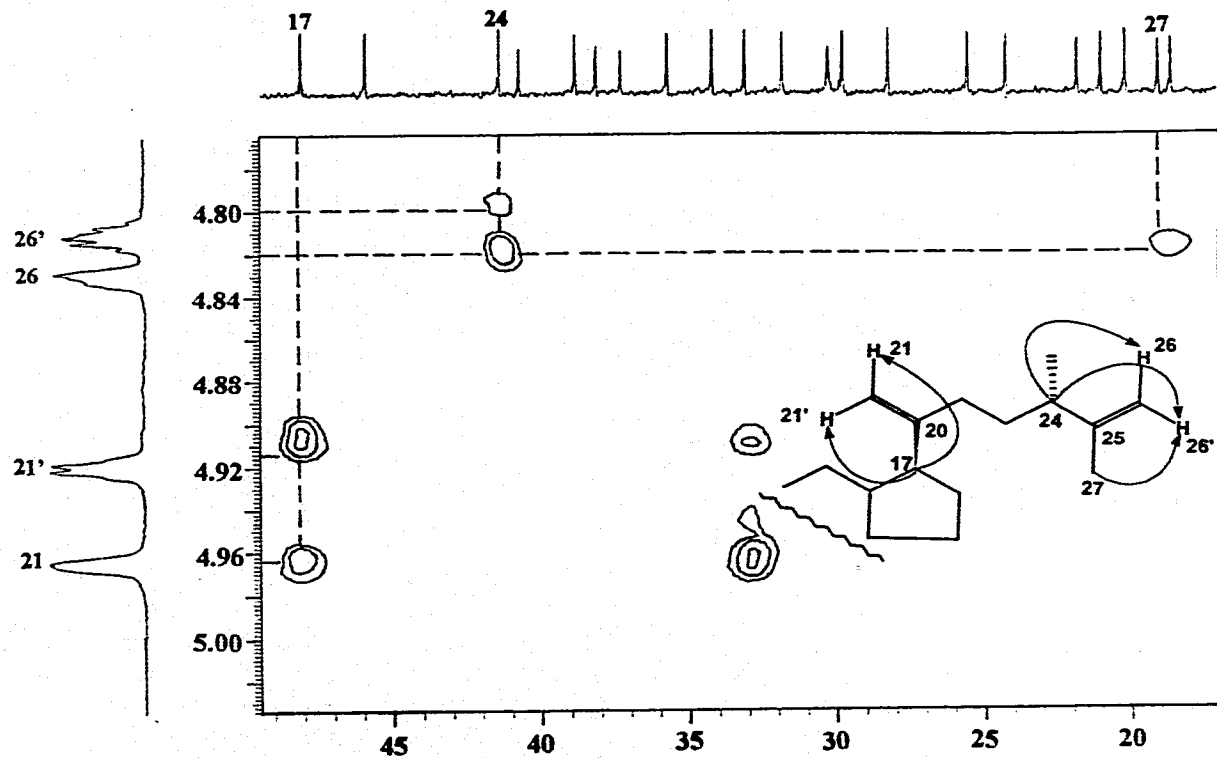
Una vez evidenciado el núcleo estructural del compuesto (66), el siguiente paso fue determinar la estructura de la cadena lateral, la cual debería contener las dos dobles ligaduras disustituidas y el metilo adicional. Para ello, el análisis del espectro HMBC fue también de gran importancia.

En primer término, la correlación del metino en δ_C 48.09 (C-17) con los hidrógenos de uno de los sistemas AB vinílicos (δ_{HA} 4.96 y δ_{HB} 4.92), indica que una de las dobles ligaduras se debe ubicar en el carbono de la posición 20 (Figura 23). Por otra parte, las correlaciones que se observan entre el metilo 27 y el otro sistema AB vinílico, permiten ubicar a la otra doble ligadura en el carbono de la posición 25 (Figura 23).

Por último, la correlación que se presenta entre el metino en δ_C 41.38 y los hidrógenos del sistema AB vinílico de la posición 25, permiten ubicar el metilo adicional en C-24 (Figura 23). En la Figura 24 se ilustran las correlaciones más importantes observadas en el espectro HMBC del compuesto (66).

En relación al sustituyente en C-24, los desplazamientos químicos que se observan para los carbonos C-31, C-26 y C-27 en el espectro de RMN en $CDCl_3$, resultan prácticamente idénticos a los del 24-metil-lanosta-9(11),25-dien-3-ona, producto natural aislado de la especie *Bridelia tomentosa* Bl. (Euphorbiaceae) y que presenta una estereoquímica S en el centro quiral ubicado en C-24 (Bates *et al.*, 1990).

Con base en el análisis detallado presentado anteriormente, se propone como estructura para el compuesto (66) la del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno. Es importante mencionar que este compuesto constituye un nuevo producto natural.

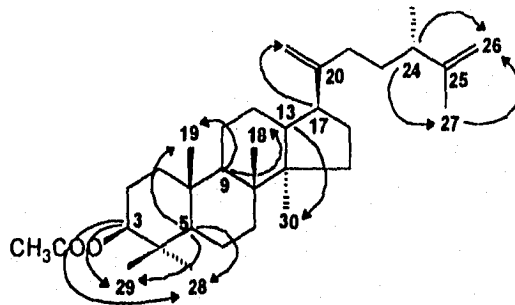


99

Figura 23. Correlaciones de C-17 y CH₂-21, C-27 y CH₂-26, C-24 y CH₂-26 en el espectro HMBC (500 MHz, benceno-d₂) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammer-20,25-dieno (66).

IV. Resultados y Discusión

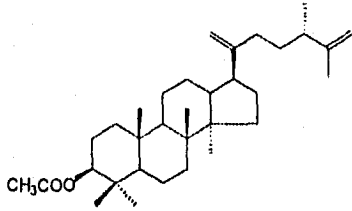
Figura 24. Correlaciones C-H a larga distancia del 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).



Desde el punto de vista biológico, en la literatura se encuentra descrito que algunos triterpenos del tipo ursano y oleanano juegan un papel importante en las interacciones alelopáticas de muchas especies vegetales que los contienen y que muchos de ellos han demostrado un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento vegetal de numerosas malezas. Sin embargo, a la fecha no se ha descrito este tipo de efecto para los triterpenos con núcleo dammarano (Fisher, 1991).

IV. Resultados y Discusión

Cuadro 16. Constantes espectrométricas y espectroscópicas del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

 $C_{33}H_{54}O_2$	
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Figura 9)	1726, 1642, 1252, 884.
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 10)	$[M^+]$ 482 (30), 422 (8), 407 (7), 358 (8), 298 (6), 289 (31), 272 (6), 249 (26), 218 (25), 190 (55), 189 (100), 150 (70), 122 (52), 121 (53), 95 (66), 81 (48).
RMN- 1H , δ (500 MHz, Benceno- d_6) (Figura 11)	4.96 (d, J = 0.5 Hz, CH-21), 4.92 (d, J = 0.5 Hz, CH-21'), 4.83 (d, J = 0.5 Hz, CH-26), 4.81 (d, J = 0.5 Hz, CH-26'), 4.68 (dd, J = 5, 13 Hz, CH-3), 1.75 (s, CH ₃ CO), 1.60 (s, CH ₃ -27), 1.02 (d, J = 6.5 Hz, CH ₃ -31), 0.94 (s, CH ₃ -18), 0.90 (s, CH ₃ -29), 0.89 (s, CH ₃ -28), 0.86 (s, CH ₃ -30), 0.75 (s, CH ₃ -19).
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, CDCl ₃) (Figura 13)	171.03 (CO), 153.32 (C-20), 149.96 (C-25), 109.51 (C-26), 107.03 (C-21), 80.91 (C-3), 55.93 (C-5), 50.83 (C-9), 49.43 (C-14), 47.51 (C-17), 45.40 (C-13), 40.99 (C-8), 40.43 (C-24), 38.76 (C-1), 37.88 (C-4), 37.11 (C-10), 35.31 (C-7), 33.67 (C-23), 32.44 (C-22), 31.31 (C-15), 29.18 (C-16), 27.96 (C-28), 24.95 (C-12), 23.69 (C-2), 21.35 (CH ₃ COO, C-11), 19.83 (C-31), 18.87 (C-27), 18.15 (C-6), 16.49 (C-29), 16.28 (C-19), 15.89 (C-30), 15.58 (C-18).

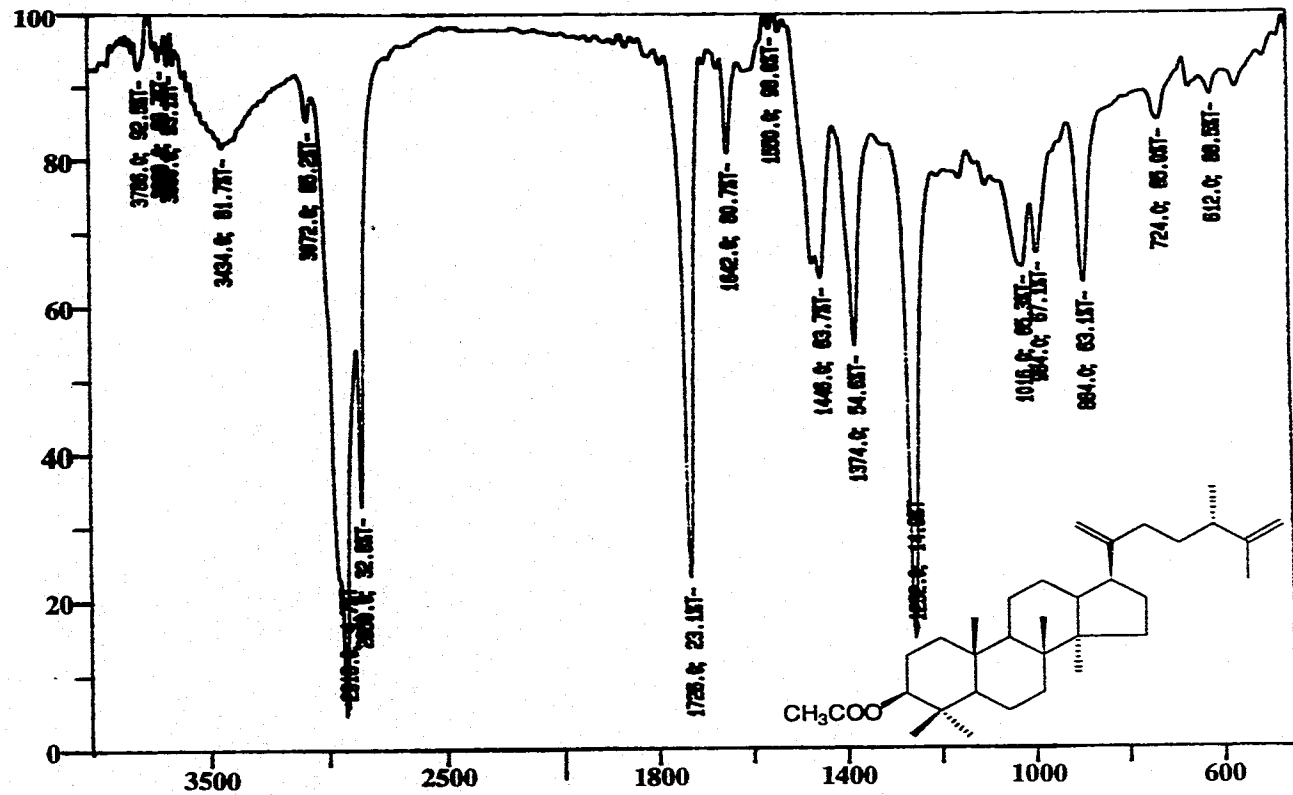


Figura 9. Espectro en el IR del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

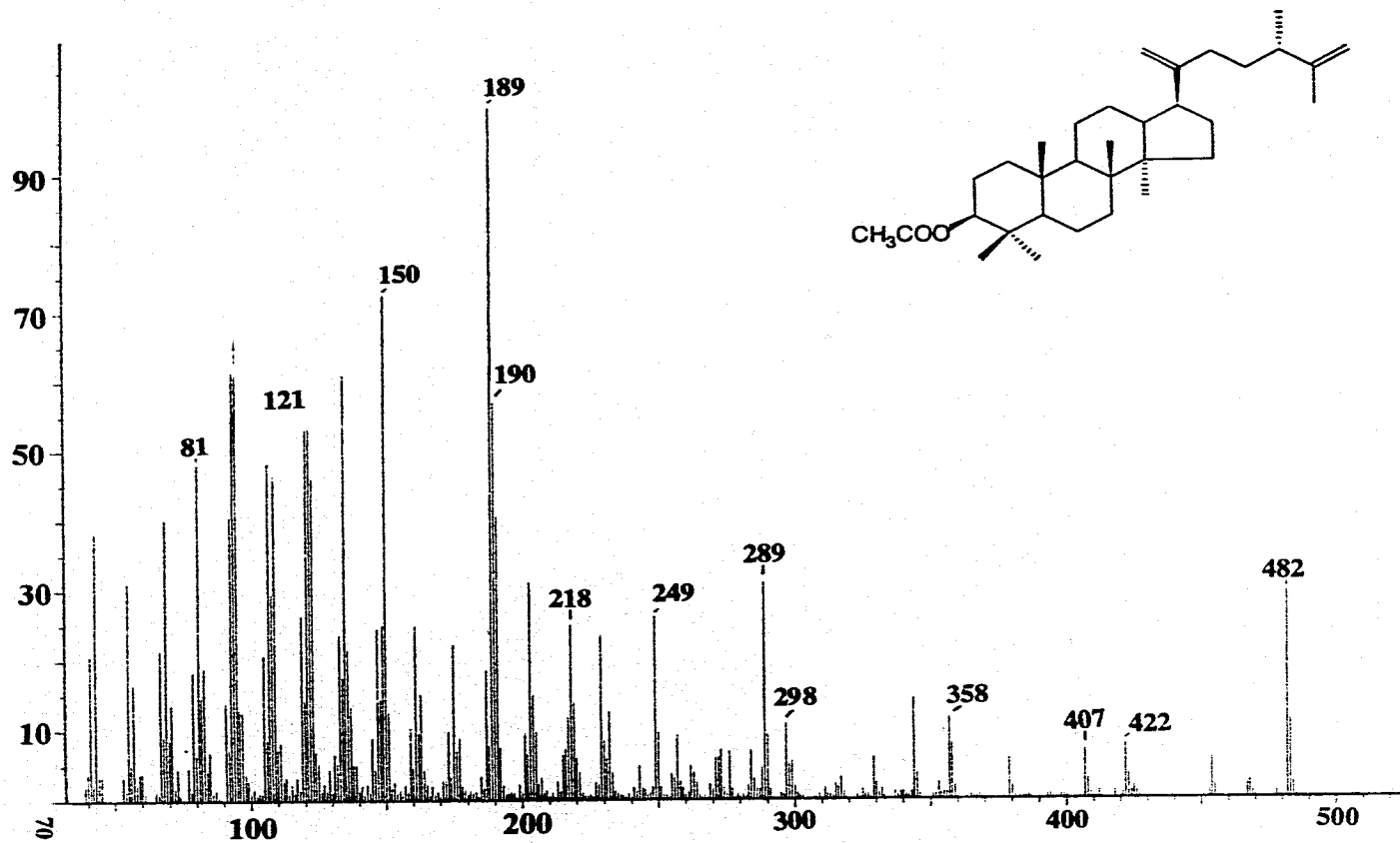


Figura 10. Espectro de masas (70 eV) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

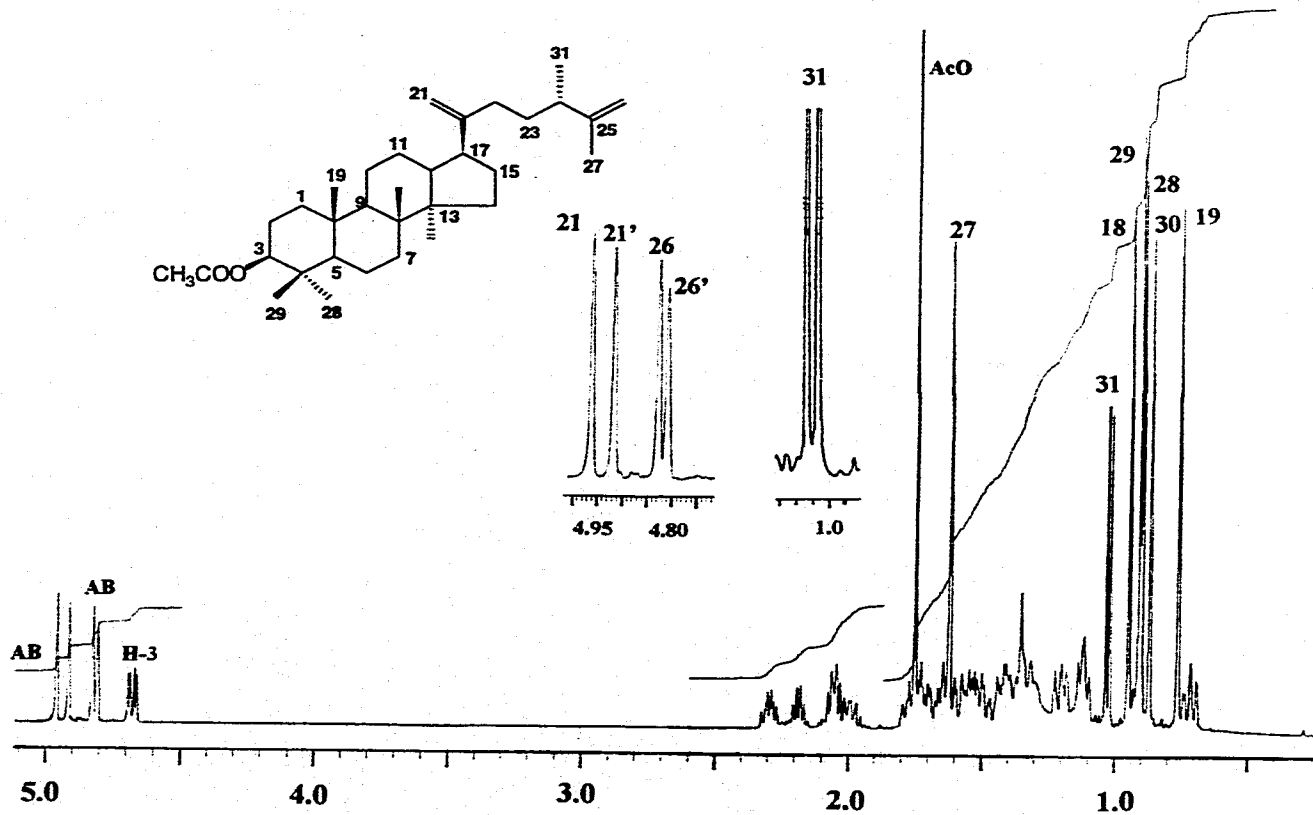


Figura 11. Espectro de RMN-¹H (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

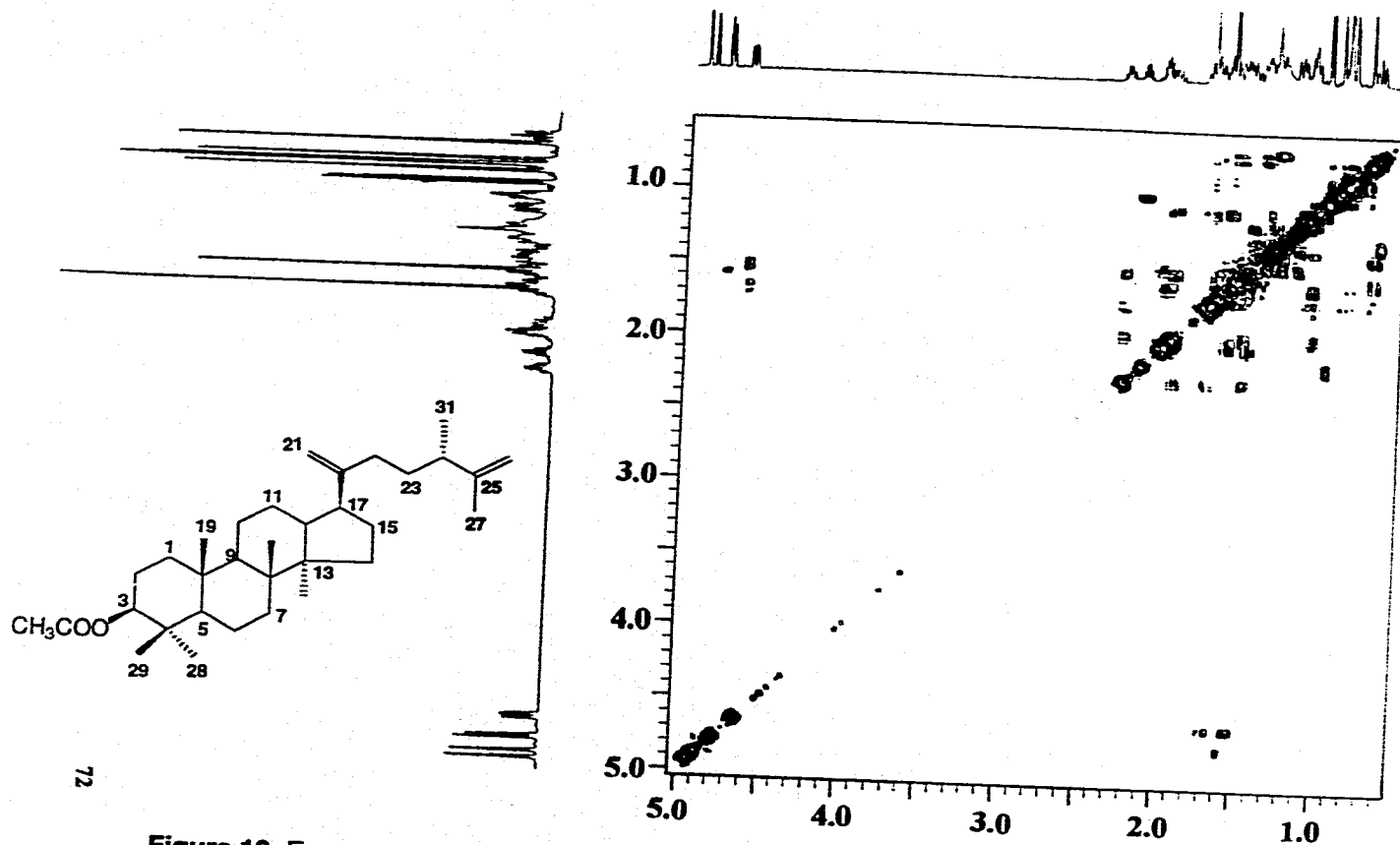


Figura 12. Espectro de RMN-¹H bidimensional COSY (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

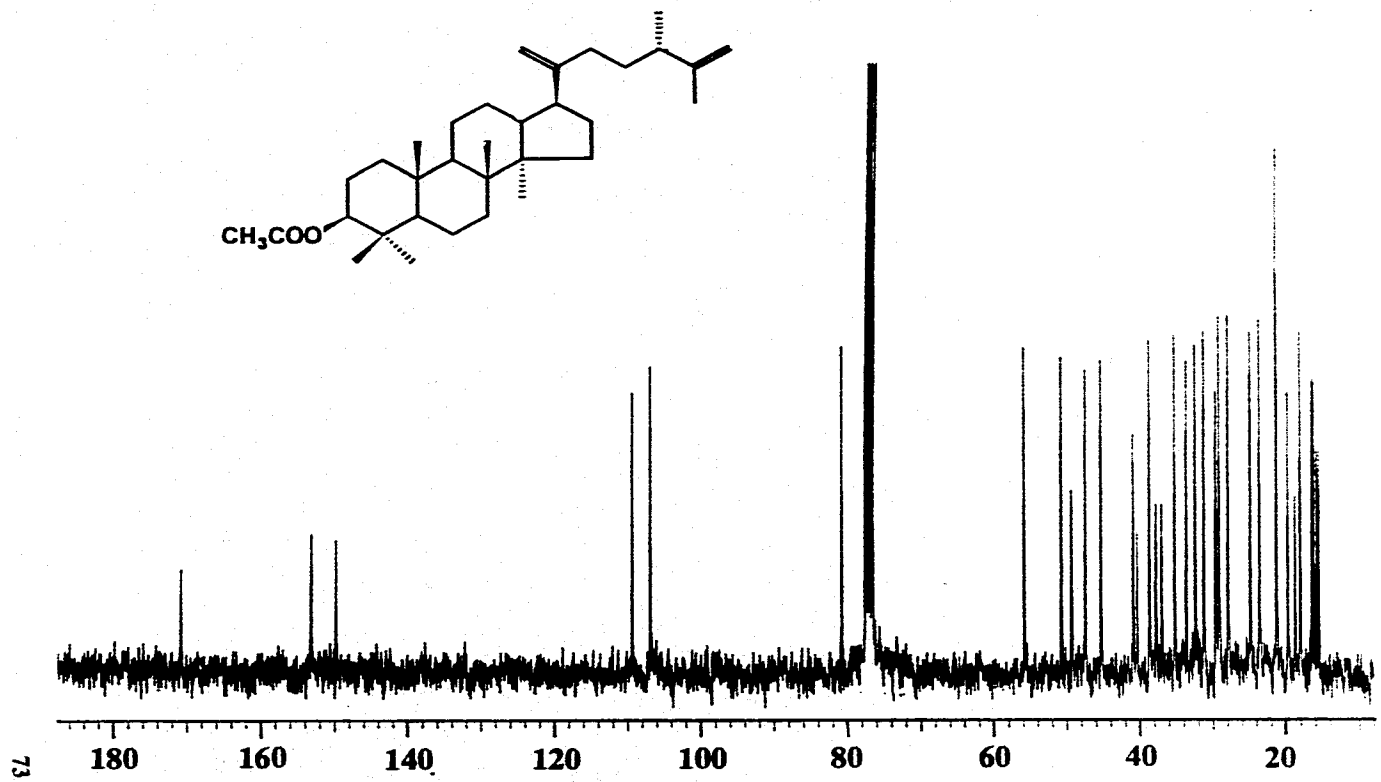


Figura 13. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

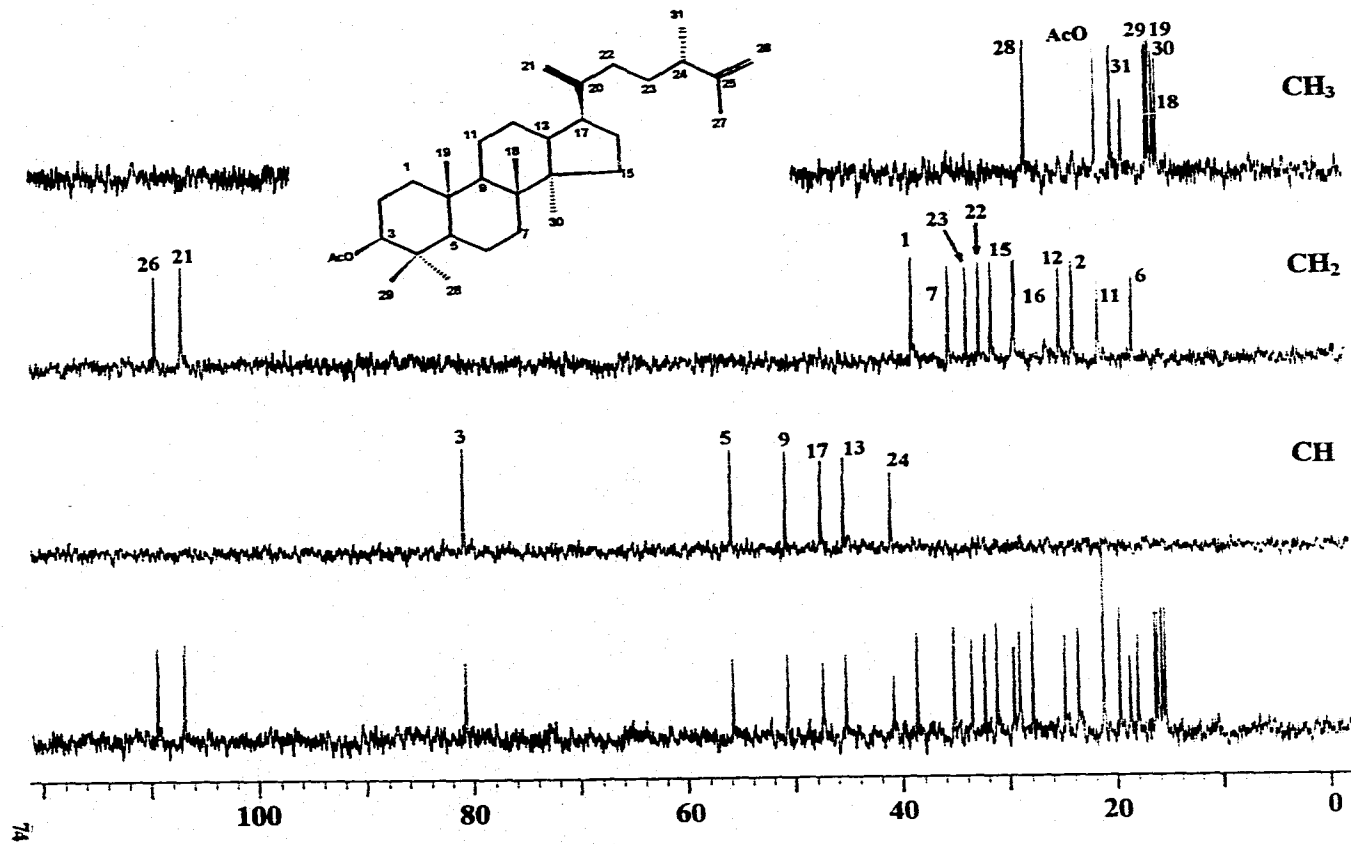


Figura 14. Espectro de RMN-¹³C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl₃) del 3β-acetoxy-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

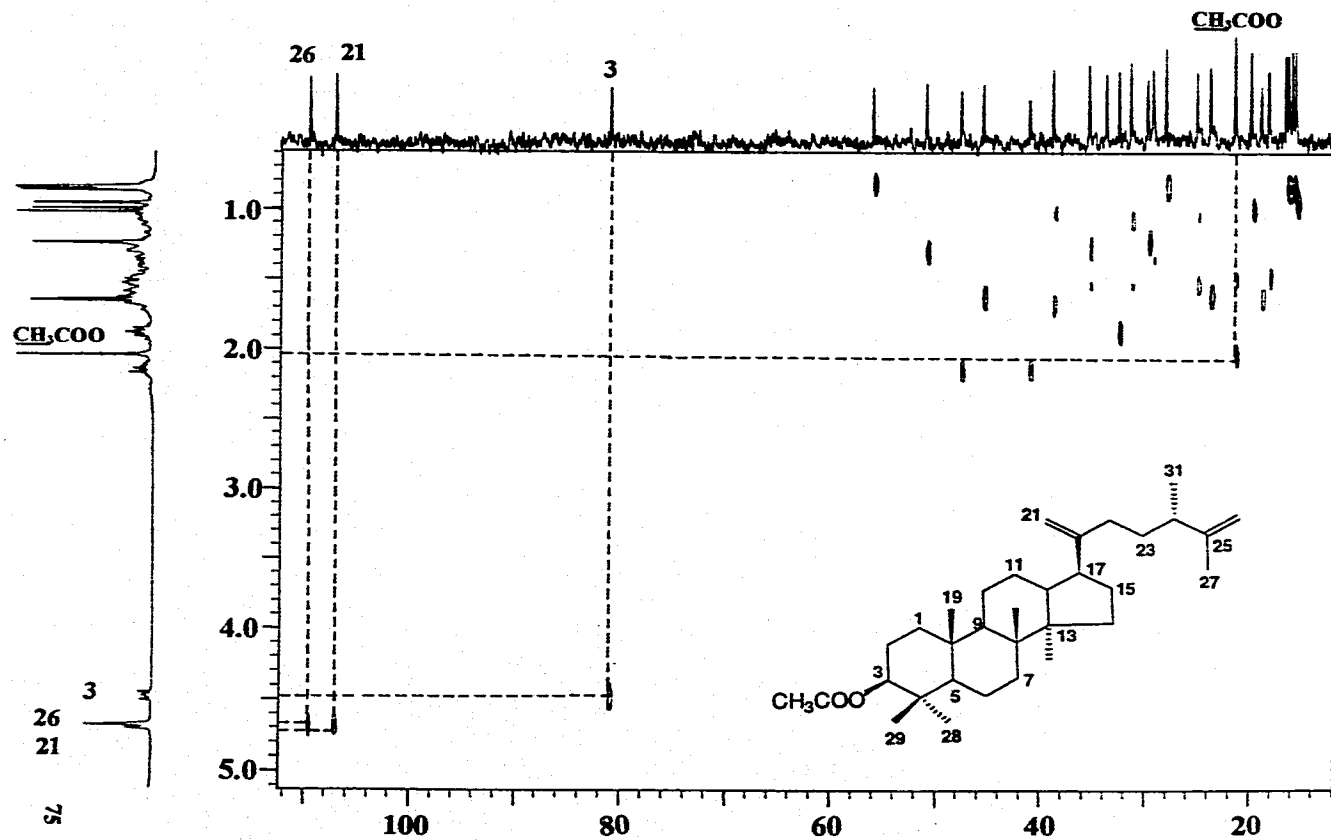


Figura 15. Correlaciones de C-26 y CH₂-26, C-21 y CH₂-21, C-3 y CH-3, y del grupo acetilo en el espectro HETCOR (300 MHz, CDCl₃) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

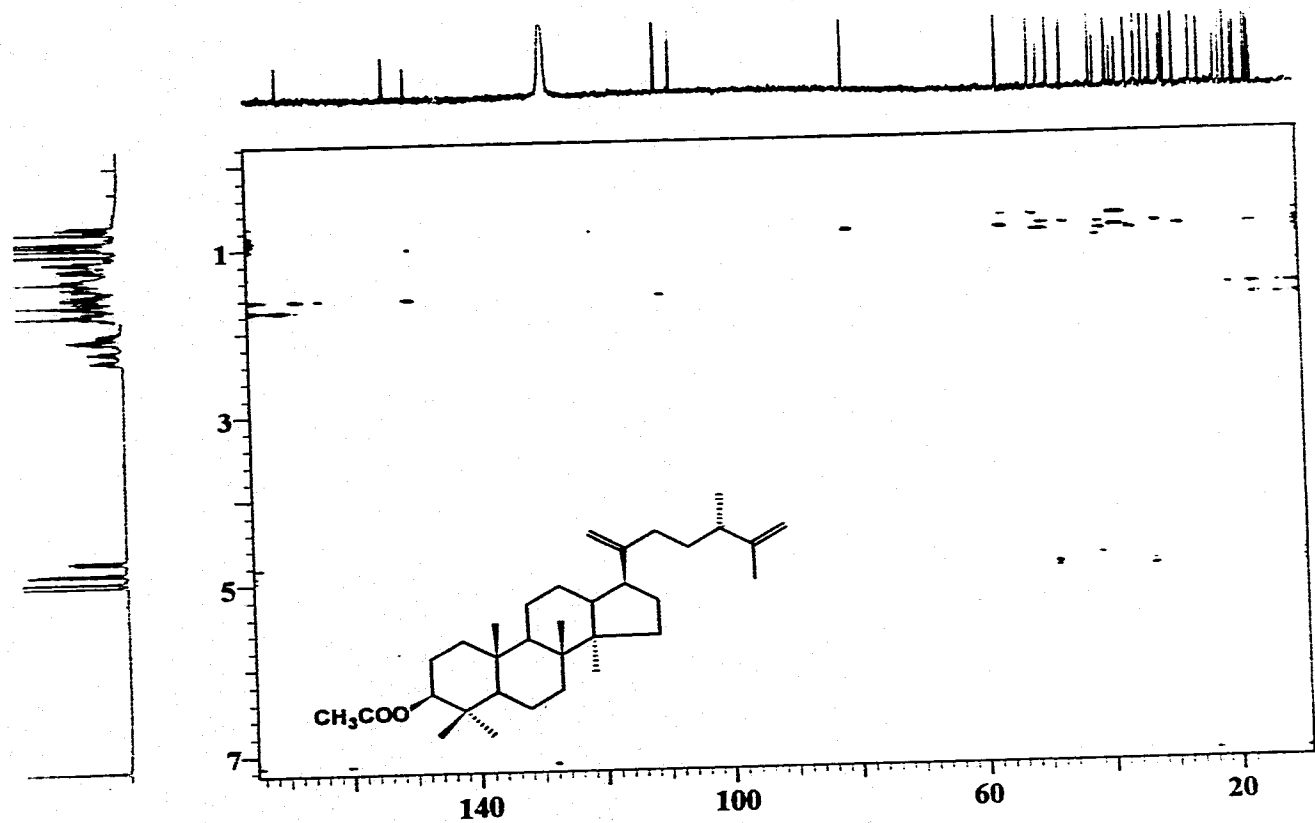


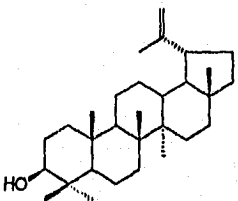
Figura 18. Espectro HMBC (500 MHz, benceno-d₆) del 3β-acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno (66).

IV. Resultados y Discusión

2.3 Identificación del β -lupeol (59).

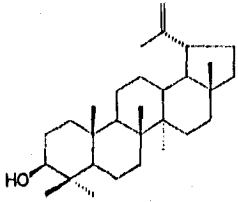
Sucesivas cromatografías en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria Ey-IV (Cuadro 8, Sección Experimental) condujeron al aislamiento de un producto sólido de color blanco (59), el cual fue identificado como β -lupeol por comparación en cromatografía en capa fina con una muestra auténtica. Cabe señalar que sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se encuentran en armonía con las descritas previamente en la literatura para este compuesto y se presentan en el Cuadro 17 (Budzikiewickz *et al.*, 1964; Mahato y Kundu, 1994).

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del β -lupeol (59).

 $C_{30}H_{50}O$	
IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} (Figura 25)	3376, 2940, 1640, 1454, 882.
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 26)	[M ⁺] 426 (100), 411 (25), 218 (77), 207 (76), 189 (73), 147 (30), 135 (58), 109 (57).
RMN- ¹ H, δ (300 MHz, CDCl ₃) (Figura 27)	4.68 (d, J = 2.4 Hz, CH-29), 4.56 (d, J = 2.4 Hz, CH-29'), 3.19 (dd, J = 5.25, 10.95 Hz, CH-3), 2.38 (ddd, J = 5.6, 11.03 Hz, CH-19), 1.67 (s, CH ₃ -30), 1.03 (s, CH ₃ -26), 0.97 (s, CH ₃ -23), 0.94 (s, CH ₃ -27), 0.83 (s, CH ₃ -25), 0.79 (s, CH ₃ -28), 0.78 (s, CH ₃ -24).

IV. Resultados y Discusión

Cuadro 17. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del β -lupeol (59) (continuación).

 $C_{30}H_{60}O$	
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 28)	150.96 (C-20), 109.31 (C-29), 78.98 (C-3), 55.27 (C-5), 50.41 (C-9), 48.28 (C-18), 47.97 (C-19), 43.00 (C-17), 42.80 (C-14), 40.80 (C-8), 39.99 (C-22), 38.85 (C-4), 38.68 (C-1), 38.03 (C-13), 37.14 (C-10), 35.56 (C-16), 34.25 (C-7), 29.82 (C-21), 27.98 (C-23), 27.41 (C-2, 15), 25.12 (C-12), 20.90 (C-11), 19.29 (C-30), 18.30 (C-6), 17.98 (C-28), 16.11 (C-25), 15.95 (C-26), 15.35 (C-24), 14.52 (C-27).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

79

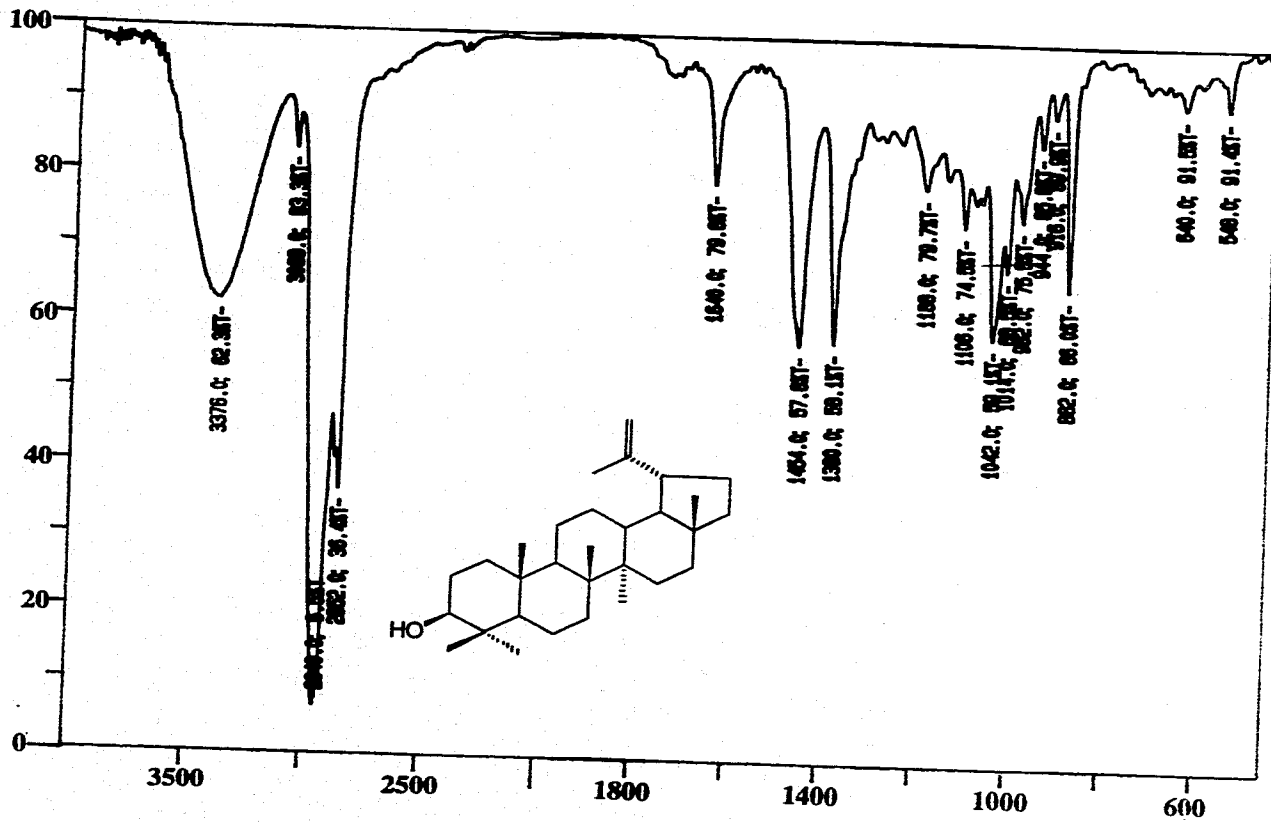


Figura 25. Espectro en el IR del β -lupeol (59).

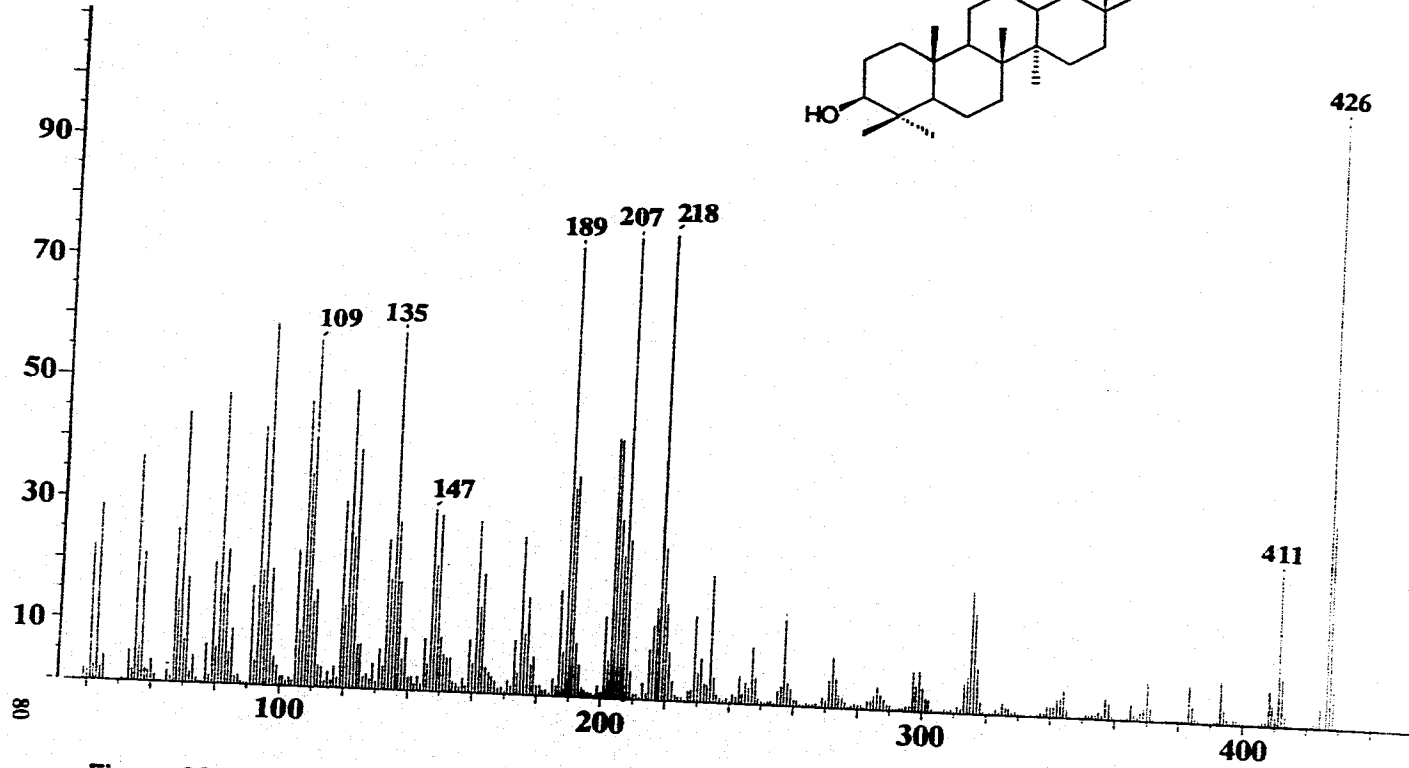
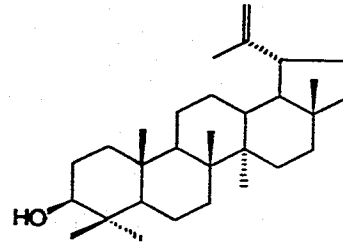
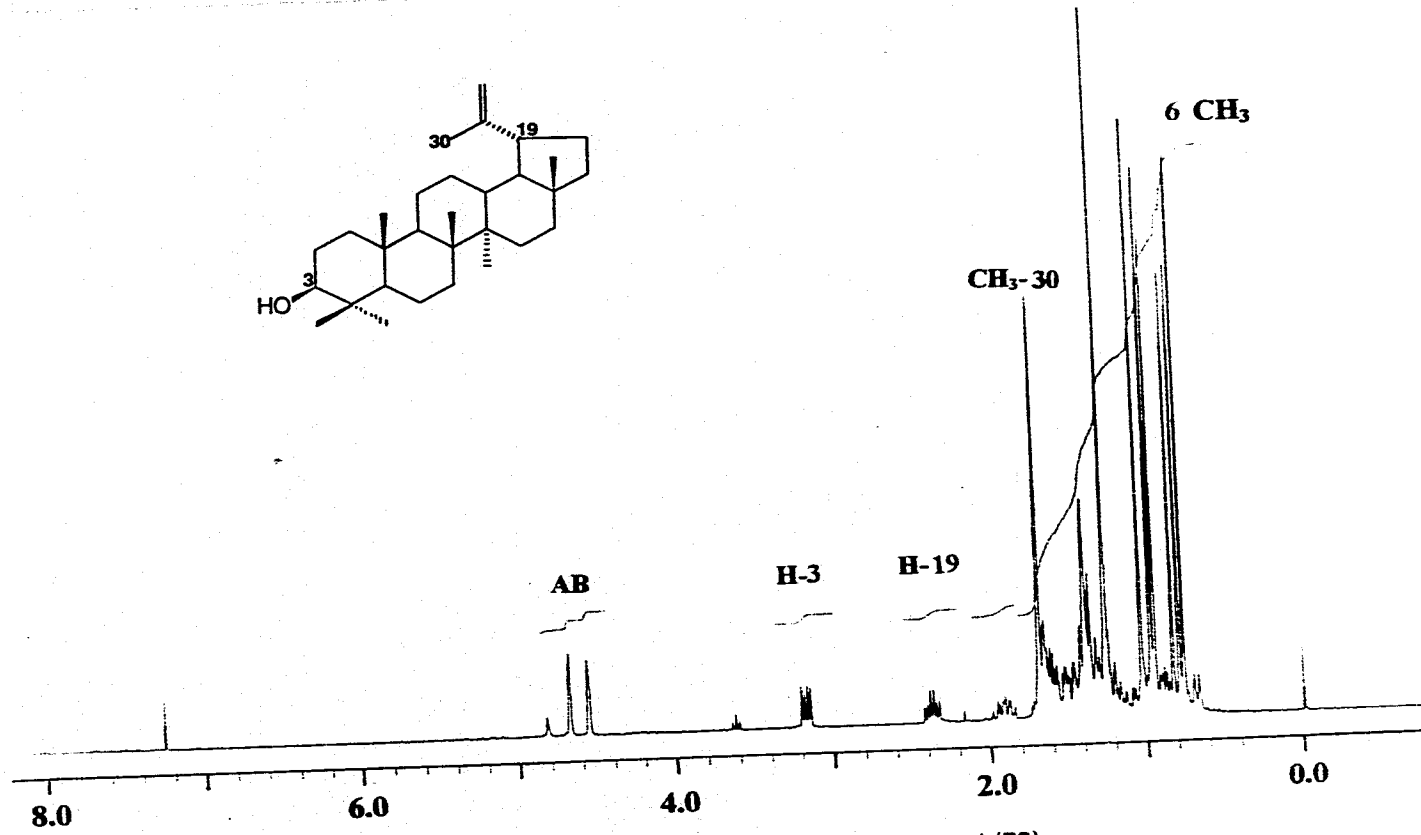
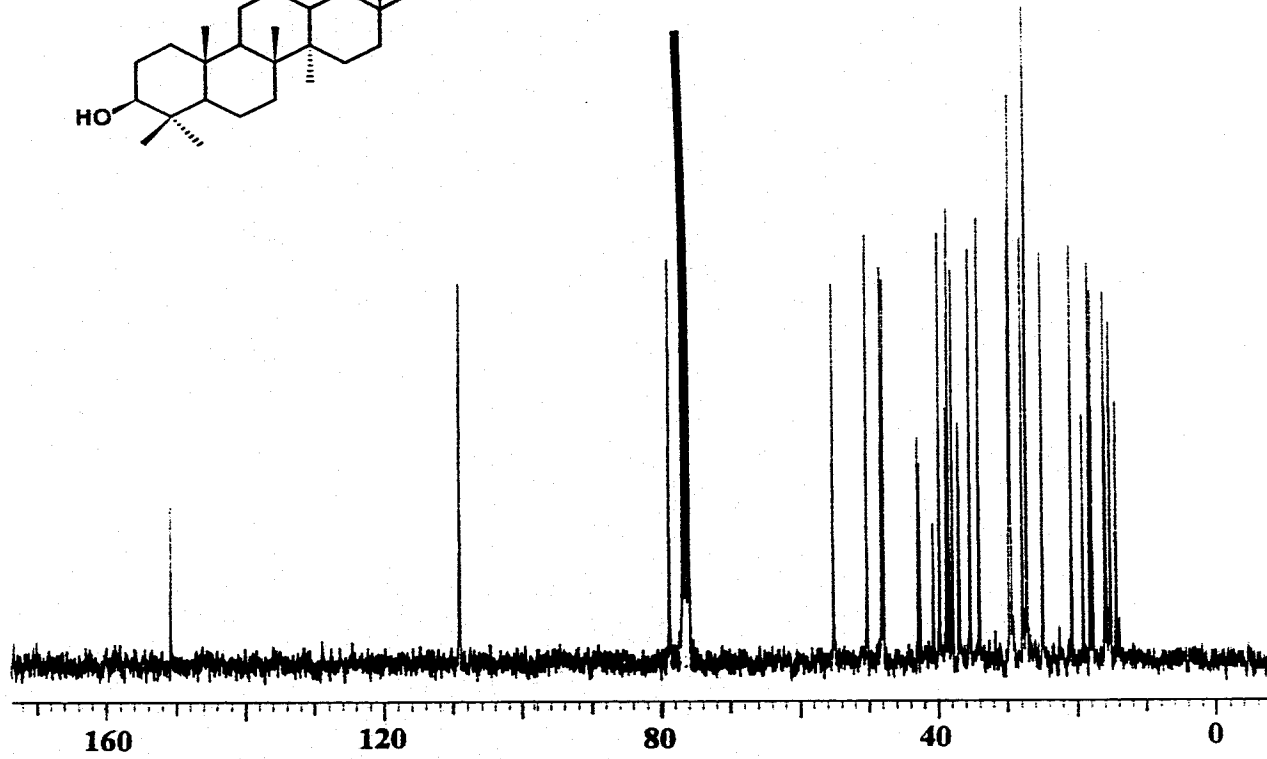
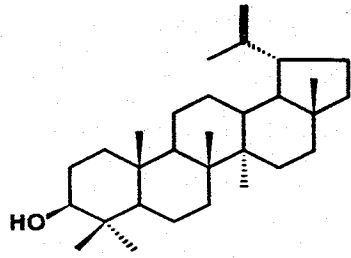


Figura 26. Espectro de masas (70 eV) del β -lupeol (59).



18 **Figura 27.** Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) del del β -lupeol (59).



IV. Resultados y Discusión

Figura 28. Espectro de RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del β-lupeol (59).

2.4 Identificación de la imperatorina (41).

El producto (41) se aisló de la fracción primaria activa Ey-IV (Cuadro 8, Sección Experimental) como un sólido cristalino de color amarillo. Las constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en el Cuadro 18. La fórmula molecular de este compuesto se estableció por espectrometría de masas como $C_{18}H_{14}O_3$, permitiendo un índice de insaturación de diez (Figura 29).

Su espectro en el IR (Cuadro 18, Figura 30) muestra bandas de absorción características para el grupo carbonilo de una α -pirona (ν_{\max} 1720 cm^{-1}) y para un anillo furano (ν_{\max} 3132, 1586, 1504, 1028, 125, 876 cm^{-1}).

El espectro de RMN- 1H (Cuadro 18, Figura 31) muestra el perfil típico de una furano cumarina lineal con un sustituyente en la posición C-8 (Murray *et al.*, 1982) y presenta señales para:

- a) El sistema AB (δ_H 7.68, d, J = 2.4 Hz; δ_H 6.81, d, 2.4 Hz) correspondiente a los hidrógenos del anillo furano.
- b) El hidrógeno aromático en C-5 (s, δ_H 7.35).
- c) El sistema AB (δ_H 7.75, d, 9.3 Hz; δ_H 6.36, d, J = 9.6 Hz) característico de los hidrógenos del anillo α -pirona.
- d) Un hidrógeno de carácter vinílico en δ_H 5.62 (tq, J = 1.5, 7.35 Hz).
- e) Un metileno unido a una función oxigenada en δ_H 5.0 (J = 7.2 Hz).
- f) Dos metilos sobre una doble ligadura en δ_H 1.73 y 1.71 (c/u d, J = 1.0 Hz).

Las señales descritas en los incisos d, e y f son congruentes con la presencia de un grupo prenilo en la molécula.

Por otra parte el espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 18, Figura 32) muestra señales para 16 carbonos en congruencia con la fórmula molecular establecida y presenta también el perfil tipo de una furano cumarina lineal (Murray *et al.*, 1982).

IV. Resultados y Discusión

El análisis del espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT (Figura 33) indica que las señales corresponden a dos metilos, un metileno, seis metinos y siete carbonos cuaternarios. La asignación de las absorciones para el núcleo furano cumarina se realizó utilizando los datos descritos previamente en la literatura fitoquímica para este tipo de compuestos (Murray *et al.*, 1982; Breitmaier y Voelter, 1994). Las señales en δ_c 131.62, 119.75, 70.11, 25.76 y 18.07 confirman la presencia de la unidad de cinco carbonos evidenciada en el espectro de RMN-¹H.

Cabe mencionar que el valor del desplazamiento químico que se observa para el metileno del grupo prenilo (δ_c 70.11), confirma que este último sustituyente se encuentra presente como un grupo éter. Cuando el grupo prenilo se encuentra unido directamente al núcleo aromático, la señal del metilo aparece a campos sensiblemente más altos (Murray *et al.*, 1982).

Con base en el análisis espectroscópico anterior, la estructura del compuesto (41) se estableció como la de la imperatorina, la cual ha sido aislada previamente de otras especies de rutáceas (Dreyer, 1980).

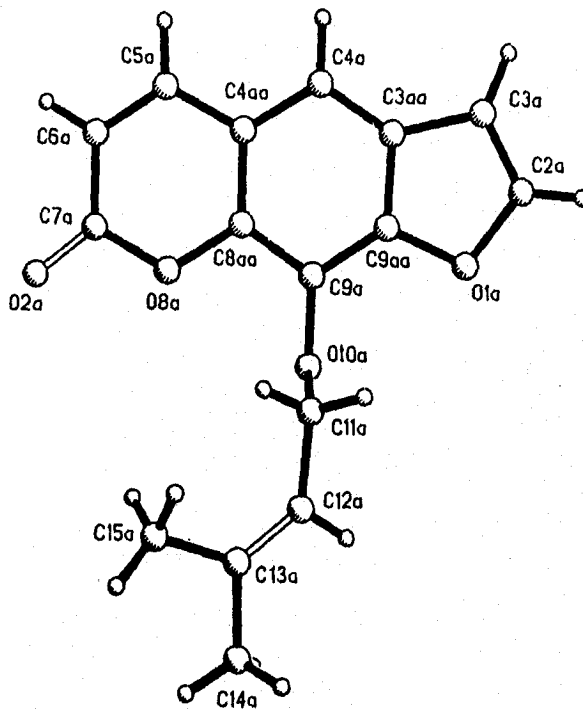
Por último, es importante destacar que la estructura de la furanocumarina se confirmó inequívocamente mediante un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 34 se presenta una vista estereoscópica de este compuesto.

Cabe señalar que en un estudio biológico reciente se ha demostrado que la imperatorina (41) ejerce un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento radicular de *L. sativa* (Macías *et al.*, 1993). Por otra parte, se ha descrito que esta furanocumarina posee propiedades mutagénicas sobre diversas cepas de *Salmonella typhimurium*, atribuyéndose esta actividad a la presencia de los dobles enlaces 2',3' en el anillo furano y 3,4 en el anillo α -pirona. Estos grupos funcionales están involucrados en la formación de enlaces covalentes con el ADN (Rodighiero *et al.*, 1970; Jurd *et al.*, 1971; Scott *et al.*, 1976). Así mismo, en la literatura se encuentra descrito que la imperatorina (41), al igual que otras furanocumarinas lineales, ejerce una actividad inhibitoria del crecimiento de diversas especies de insectos tales como *Spodoptera littoralis* (Werner *et al.*,

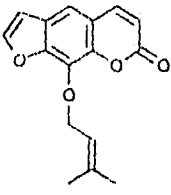
IV. Resultados y Discusión

1994). El amplio rango de actividades biológicas y farmacológicas que presenta la cumarina (41) es de esperarse, debido al hecho de que este tipo de compuestos contribuyen al sistema de defensa de las plantas (Murray *et al.*, 1982; Berengaum, 1978; Klocke *et al.*, 1989).

Figura 34. Vista estereoscópica de la imperatorina (41).



Cuadro 18. Constantes espectrométricas y espectroscópicas de la imperatorina (41).

 $C_{18}H_{14}O_4$	
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Figura 32)	1720, 3198, 3132.
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 31)	$[M^+]$ 270 (1), 202 (100), 174 (17), 173 (10), 146 (3), 145 (3), 118 (2), 90 (3), 89 (6).
RMN- 1H , δ (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 33)	7.68 (d, $J = 2.4$ Hz, $CH-2'$), 6.81 (d, 2.4 Hz, $CH-3'$), 7.35 (s, $CH-5$), 7.75 (d, 9.3 Hz, $CH-4$), 6.36 (d, $J = 9.6$ Hz, $CH-3$), 5.62 (tq, $J = 1.5, 7.35$ Hz), 5.0 (d, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.73 (d, $J = 1.0$ Hz, CH_3), 1.71 (d, $J = 1.0$ Hz, CH_3).
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 34)	160.47 (CO), 148.57 (C-7), 146.57 (C-2'), 144.30 (C-4), 139.65 (C-9), 131.62 (C-4''), 125.81 (C-6, 8), 119.75 (C-3''), 116.46 (C-10), 114.65 (C-3), 113.11 (C-5), 106.68 (C-3'), 70.11 (C-2''), 25.76 (C-5''), 18.07 (C-6'').

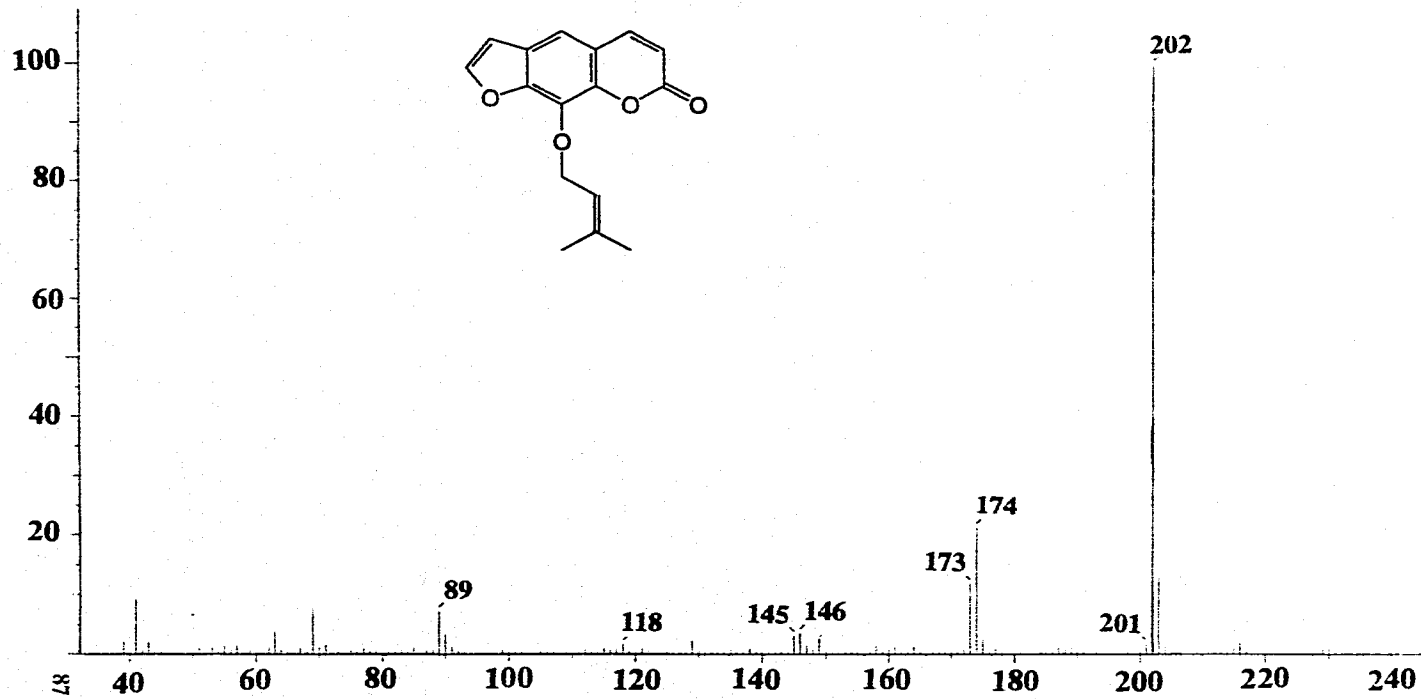


Figura 29. Espectro de masas (70 eV) de la imperatorina (41).

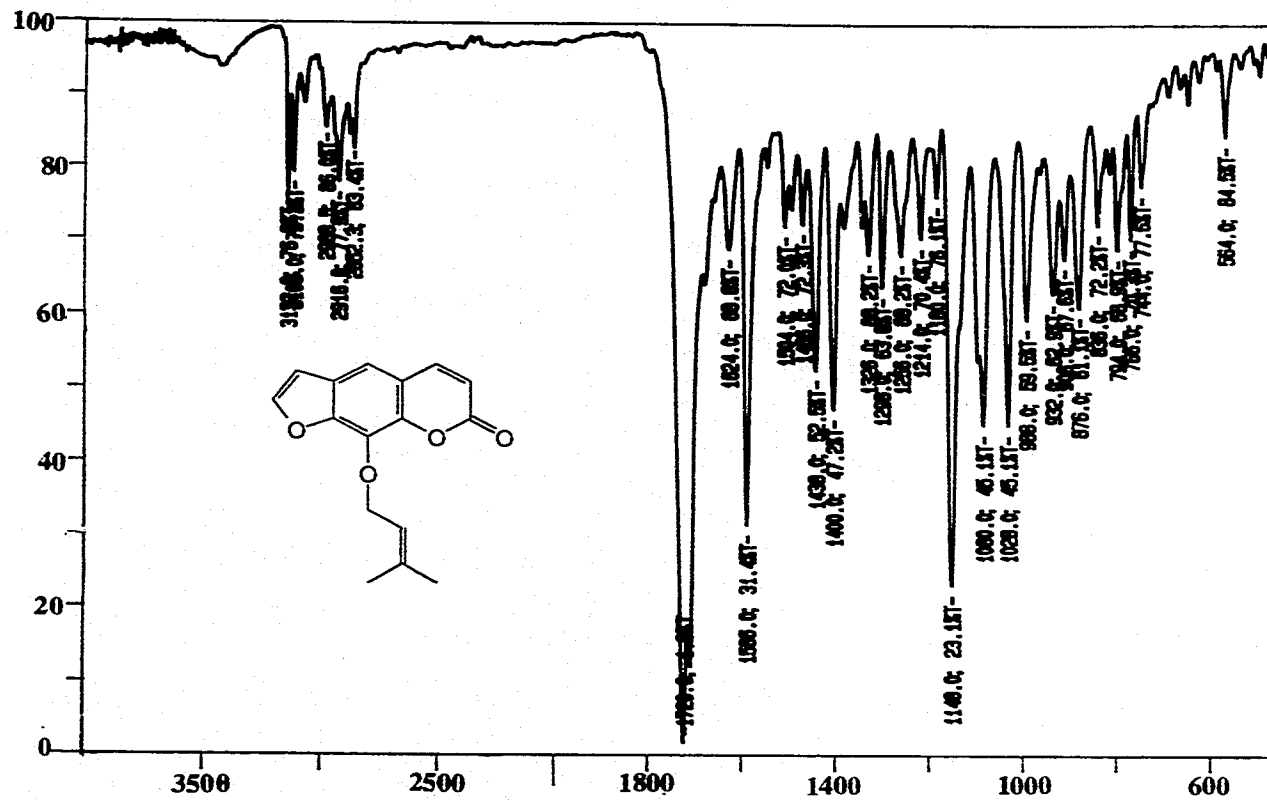


Figura 30. Espectro en el IR de la imperatorina (41).

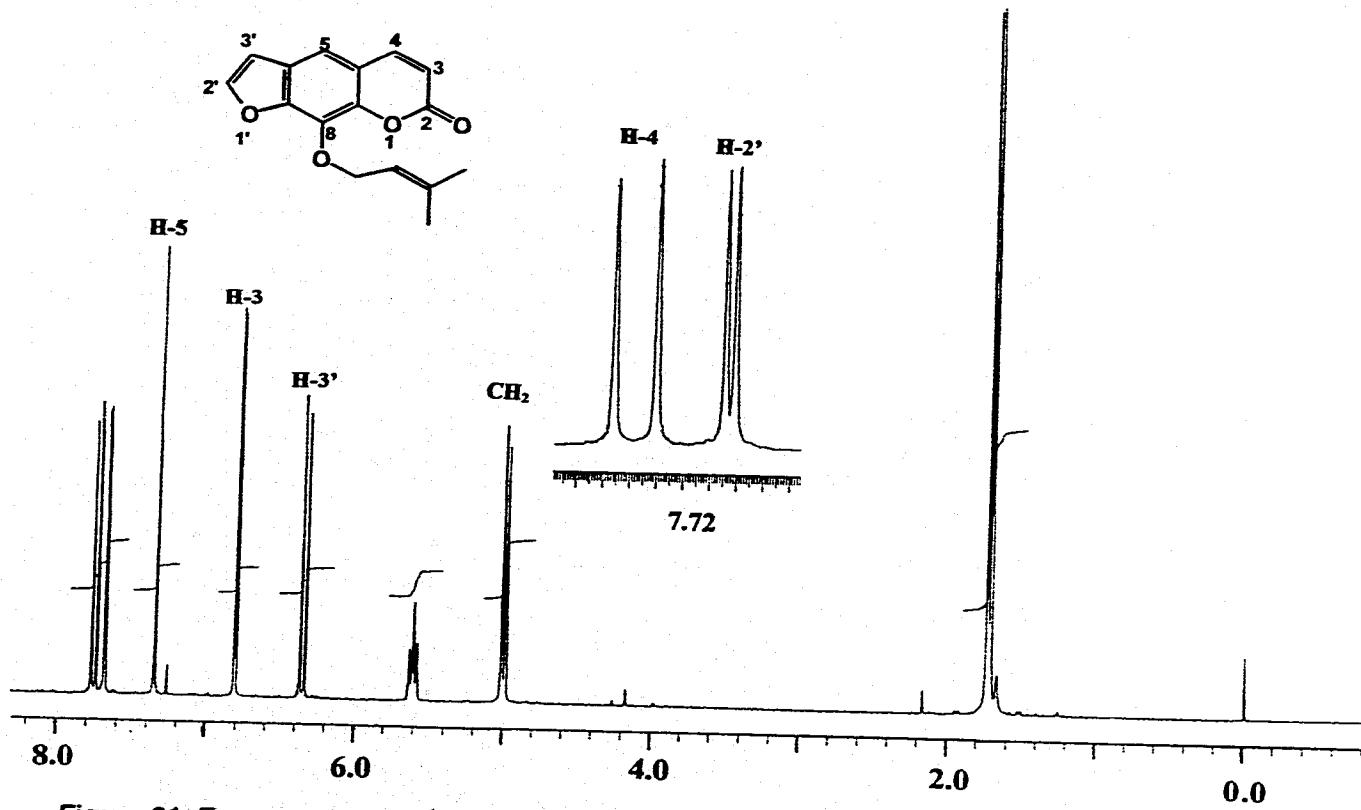


Figura 31. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de la imperatorina (41).

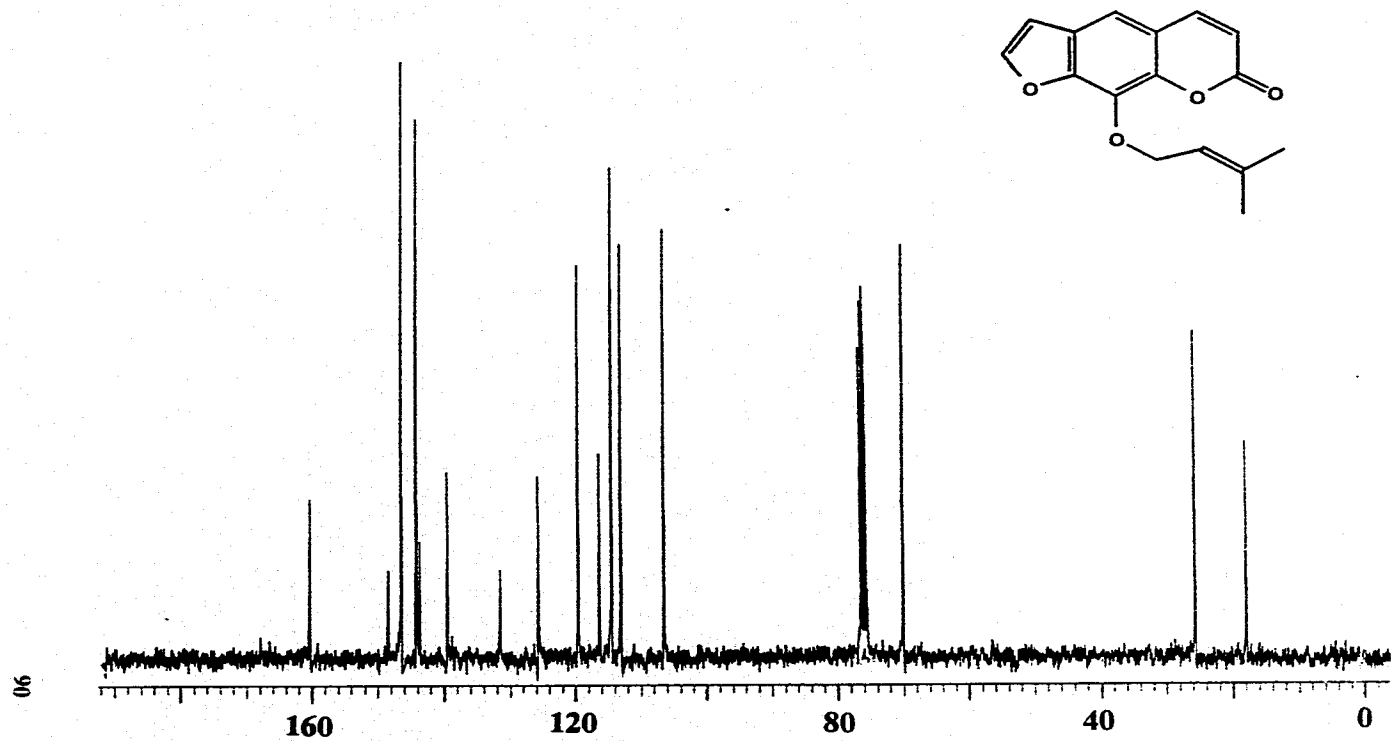
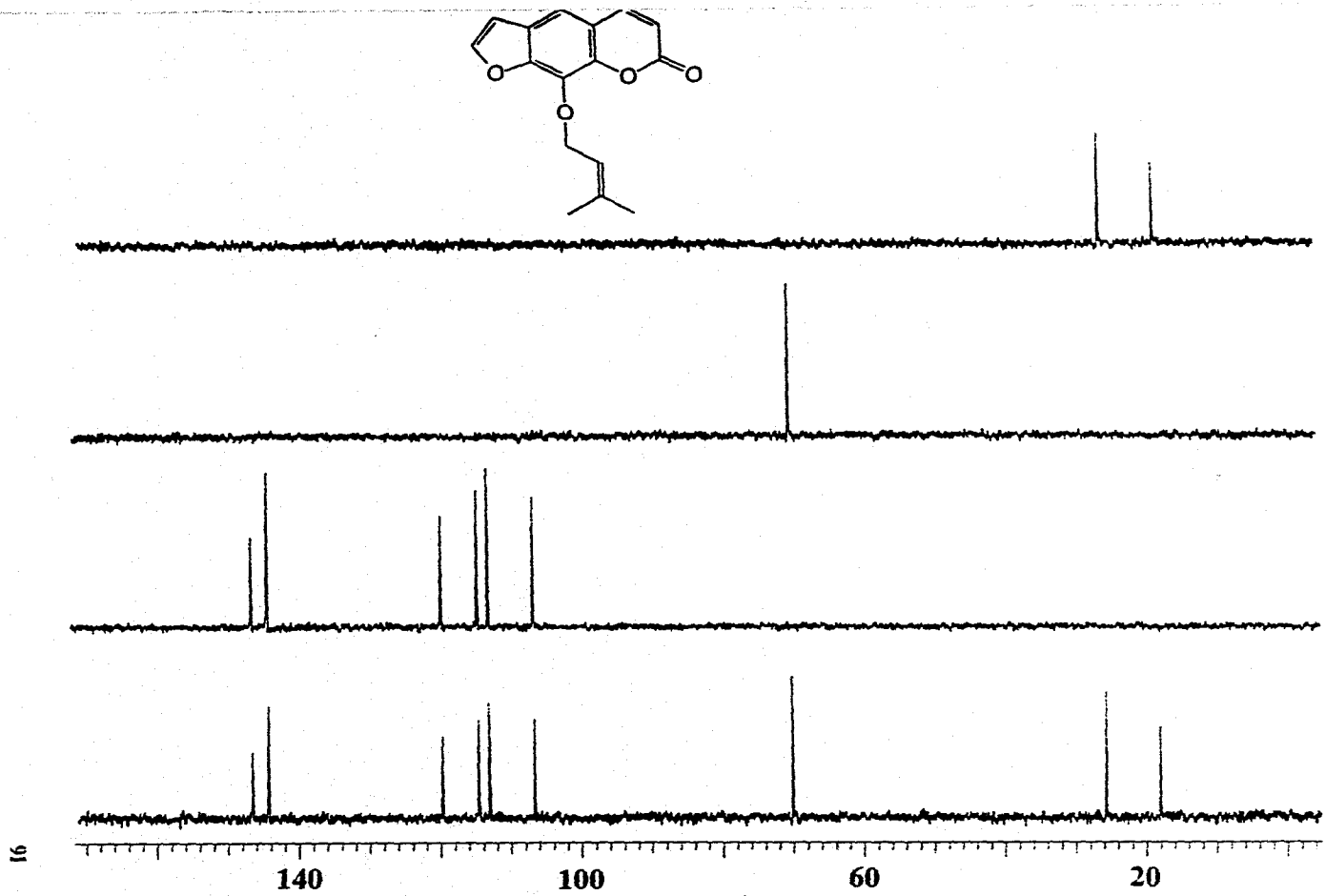


Figura 32. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de la imperatorina (41).



96

Figura 33. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl_3) de la imperatorina (41).

2.5 Identificación de la asarinina (67).

Sucesivas cromatografías en columna y en capa delgada sobre gel de sílice de la fracción primaria Ey-V (Cuadro 8, Sección Experimental), permitieron el aislamiento de un producto cristalino de color blanco, soluble en CHCl_3 , con un p. f. de 121-122 °C. La fórmula molecular de este compuesto se estableció por espectrometría de masas como $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ (Cuadro 19, Figura 35), la cual permite un índice de insaturación de doce.

El análisis detallado de los espectros de RMN (Cuadro 19) así como consideraciones de tipo quimiotaxonómico, permiten establecer que el producto natural es un lignano de tipo furofurano, sustituido asimétricamente con dos grupos piperonilos en las posiciones 7 y 7' (Ayres y Loickek, 1990). Las observaciones más importantes que apoyan esta proposición estructural son las siguientes:

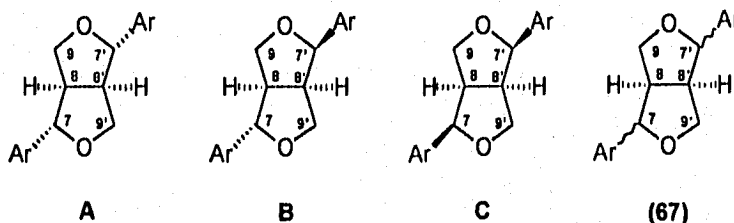
El espectro de RMN- ^{13}C (Cuadro 19, Figura 37) presenta señales para veinte carbonos. De estas señales, dos son asignables a los grupos metilendioxi, doce a carbonos aromáticos y seis a carbonos alifáticos. Cabe señalar que la discriminación entre metilos, metilenos y metinos se realizó mediante el análisis del espectro DEPT (Figura 38). En este último espectro se observan las absorciones correspondientes a los metinos 7, 8, 7' y 8' (δ_{C} 87.57, 54.61, 81.88, 50.12) y a los metilenos 9 y 9' (δ_{C} 70.88, 69.62) de la porción furofurano. Las señales asignables a los grupos metilendioxi de los dos anillos piperonilos se observan en δ_{C} 100.91 y δ_{C} 100.97, en consecuencia, las señales restantes que se observan en el espectro de RMN- ^{13}C son atribuibles a seis carbonos cuaternarios, cuatro de los cuales se encuentran unidos a funciones oxigenadas (δ_{C} 147.86, 147.55, 108.73, 108.73).

Por otro lado, los datos generados por el espectro de RMN- ^1H (Cuadro 19, Figura 39) también resultan similares a los descritos previamente para lignanos de tipo furofurano (Ayres y Loickek, 1990) y confirman la presencia de los dos grupos metilendioxi (δ_{H} 5.94, 5.95), de los seis hidrógenos aromáticos

IV. Resultados y Discusión

(δ , 6.76-6.86) y de las señales para el sistema furofurano. Con base en el análisis anterior, fue factible proponer las estructuras de los productos naturales A, B y C que se indican en la Figura 40 para el compuesto (67). A fin de discriminar entre las tres posibilidades, se analizaron comparativamente los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN para las posiciones C-7 - C-9 de los núcleos de los productos A, B y C con los del compuesto (67) [Cuadro 20]. La no equivalencia de las señales correspondientes a las posiciones 7,7' y 8,8' en los espectros de RMN del producto (67) es congruente con una disposición asimétrica de los grupos piperonilos en el anillo furofurano y, en consecuencia, es posible descartar las estructuras isoméricas A y C.

Figura 40. Posibles estructuras del compuesto (67).



Cuadro 20. Comparación de los datos de RMN-¹H y RMN-¹³C de furofuranos tipo sesamina y del compuesto (67).

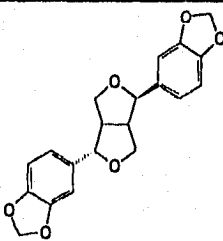
DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (ppm)				
	A	B	C	(67)
H-7	4.75 (85.77)	4.45 (87.53)	4.90 (83.96)	4.39 (87.57)
H-7'		4.85 (81.96)		4.82 (81.98)
H-8	3.15 (54.31)	2.90 (54.44)	3.15 (49.49)	2.85 (54.61)
H-8'		3.30 (50.11)		3.30 (50.12)
H-9 β	3.80-4.00 (71.72)	3.35 (70.92)	3.30-3.65 (68.75)	3.30 (69.62)
H-9' β		3.85 (69.64)		4.09 (70.89)
H-9 α	4.20-4.40 (71.72)	3.85 (70.92)	3.65-4.00 (68.75)	3.80 (69.62)
H-9' α		4.13 (69.64)		3.80 (70.89)

IV. Resultados y Discusión

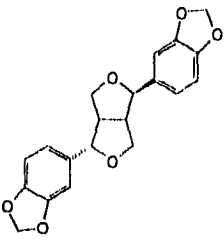
Finalmente, es importante mencionar que para este lignano existen dos enantiómeros posibles, el isómero (+) y el isómero (-). A fin de discernir entre ambas posibilidades, se determinó el valor de rotación óptica, el cual indicó que el compuesto corresponde a la (-)-asarinina ($[\alpha]_D^{20} = -86^\circ$), la cual ha sido obtenida previamente de otras fuentes naturales (Pelter *et al.*, 1976).

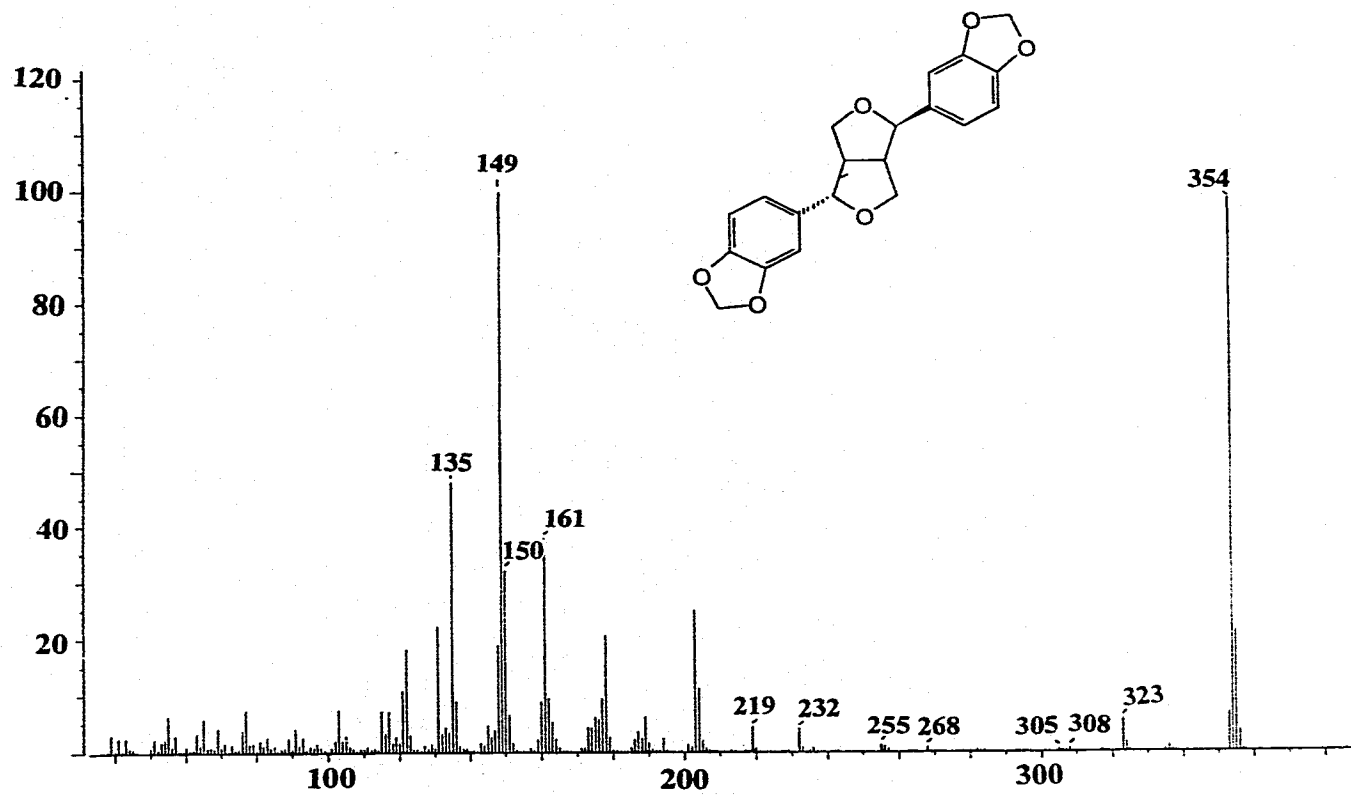
Cabe señalar que los lignanos juegan un papel destacado en la regulación del crecimiento vegetal. Así por ejemplo, se sabe que compuestos análogos a la asarinina (67), tales como la sesamina y la fargesina, retardan considerablemente la germinación de semillas de *Cucumis sativus* y *Arachis hypogaea*. De igual manera que otros compuestos aromáticos, incluyendo a los ácidos *orto* y *para*-cumáricos y cinámico, la inhibición que ejercen sobre la germinación de semillas es el resultado de la interferencia que causan en el transporte de aminoácidos y en la síntesis proteica (Van Sumere *et al.*, 1972).

Cuadro 19. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la asarinina (67).

 $C_{20}H_{18}O_6$	
IR ν_{max} . (KBr) cm^{-1} (Figura 36)	3100, 2048, 1856, 1722, 1620, 1488, 1370.
EM-IE m/z (int. rel.) (Figura 35)	$[M^+]$ 354 (98), 135 (48), 150 (32), 149 (100), 161 (38).

Cuadro 19. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la asarinina (67) [continuación].

 $C_{20}H_{18}O_6$	
RMN- 1H , δ (300 MHz, $CDCl_3$) (Figura 39)	5.95 (s, O-CH ₂ -O), 5.94 (s, O-CH ₂ -O), 4.82 (d, J = 5.4 Hz, CH-7'), 4.39 (d, 7.2 Hz, CH-7), 4.09 (d, 9.3 Hz, CH-9 α), 3.80 (m, CH-9 α , CH-9 β), 3.30 (m, CH-8', CH-9' β), 2.85 (dd, J = 6.9, 7.5 Hz, CH-8).
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, $CDCl_3$) (Figura 37)	147.86 (C-4'), 147.55 (C-4), 147.11 (C-5'), 146.48 (C-5), 135.06 (C-1'), 132.18 (C-1), 119.50 (C-2'), 118.60 (C-2), 108.73 (C-3,3'), 106.49 (C-6'), 106.34 (C-6), 100.97 (OCH ₂ O), 100.97 (OCH ₂ O), 87.57 (C-7), 81.98 (C-7'), 70.89 (C-9), 69.62 (C-9'), 54.61 (C-8), 50.12 (C-8').



96

Figura 35. Espectro de masas (70 eV) de la asarinina (67).

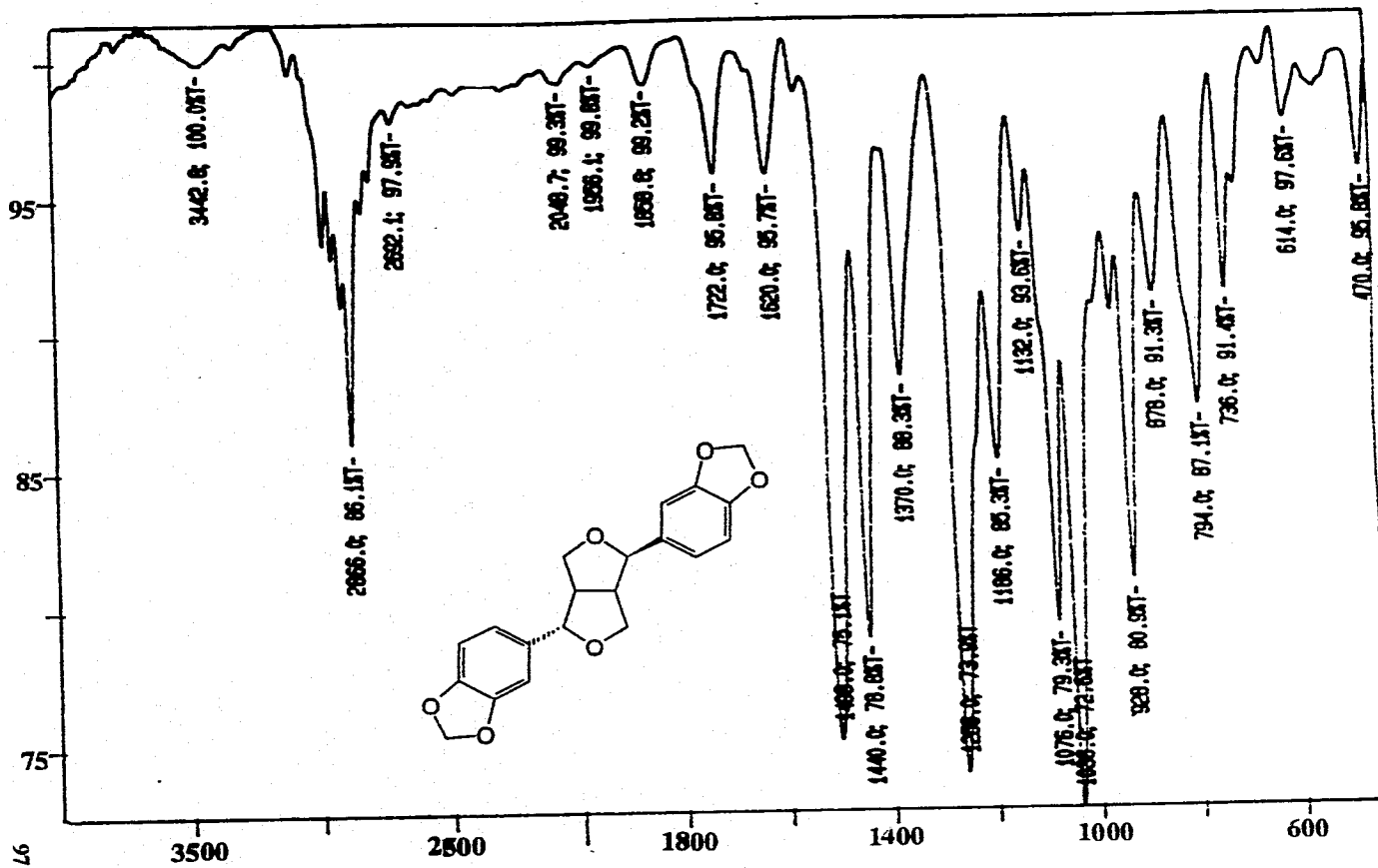


Figura 36. Espectro en el IR de la asarinina (67).

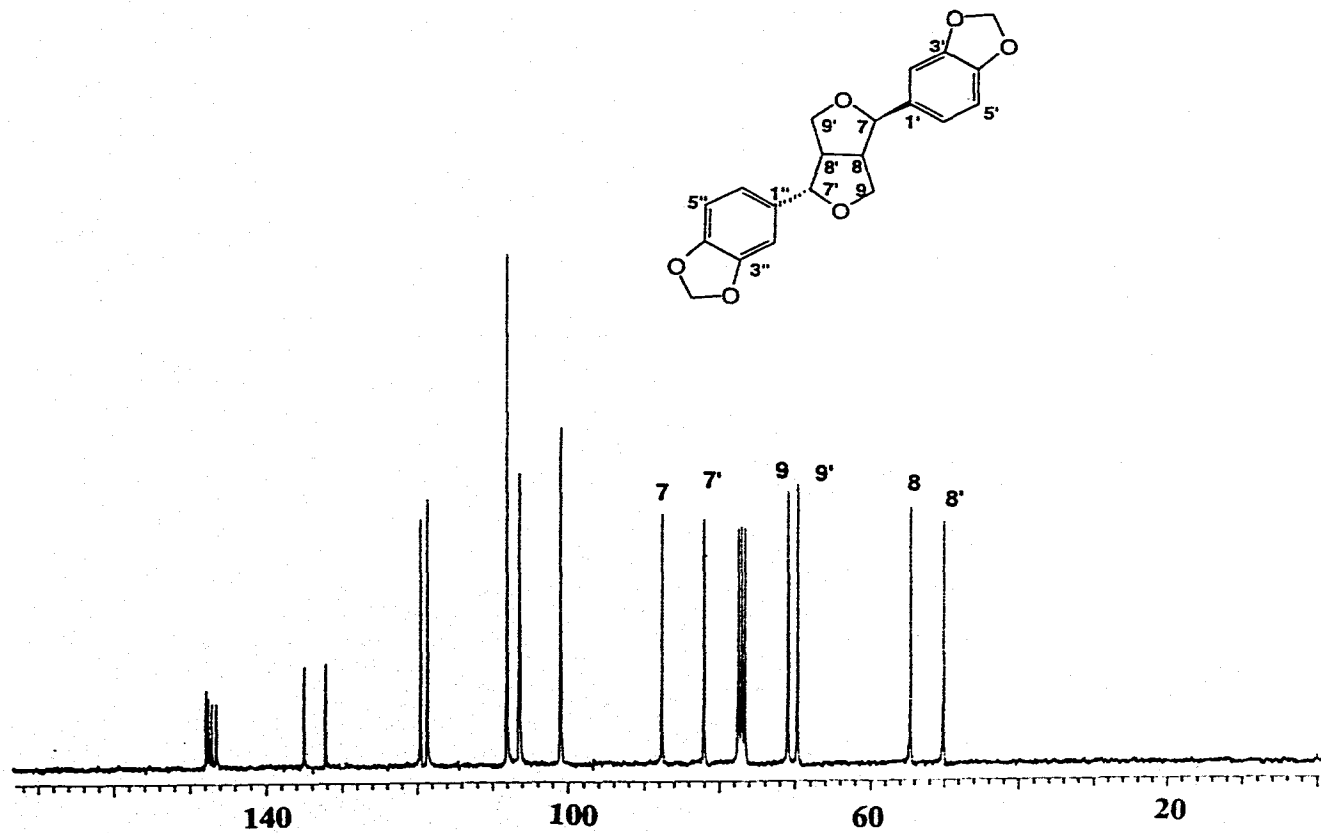


Figura 37. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de la asarinina (67).

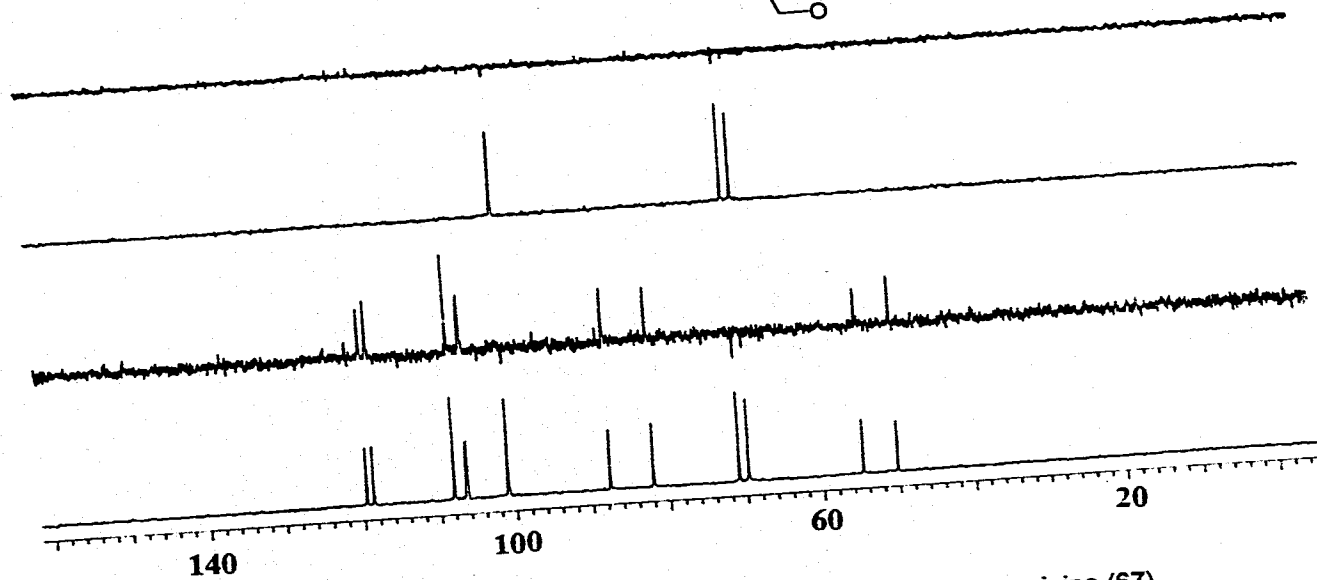
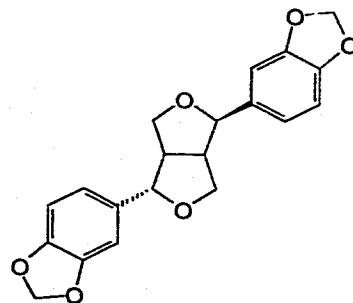


Figura 38. Espectro de RMN- ^{13}C modalidad DEPT (75 MHz, CDCl_3) de la asarinina (67).

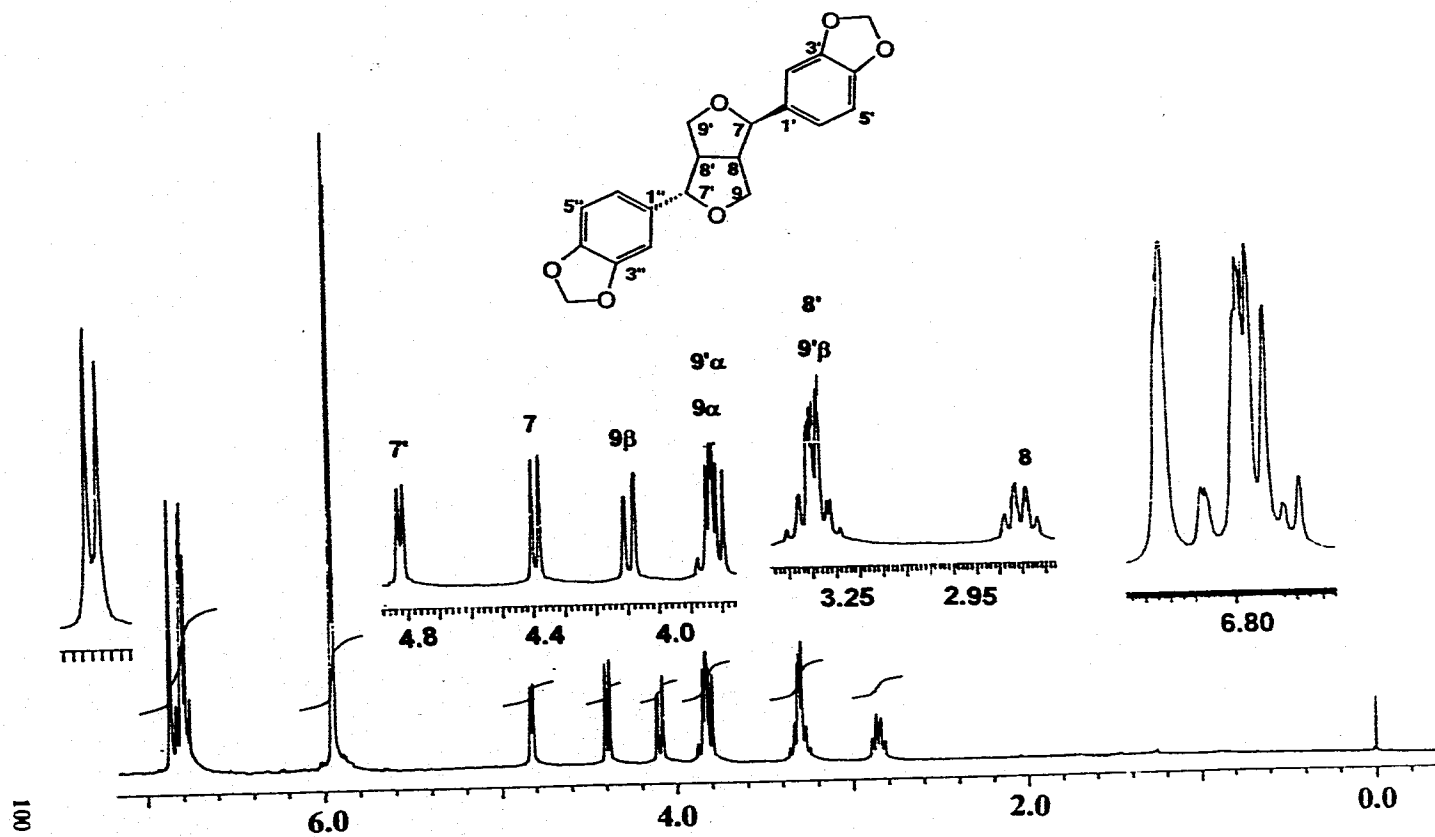


Figura 39. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) de la asarinina (67).

2.6 Identificación de la hesperidina (69).

El compuesto (69) se obtuvo de la fracción primaria inactiva Ey-VI (Cuadro 8, Sección Experimental) como un sólido amorfo de color café claro, soluble en mezclas de MeOH-H₂O y en DMSO, e insoluble en CHCl₃. En el Cuadro 21 se resumen los datos espectroscópicos y espectrométricos de este compuesto.

Su espectro en el IR (Cuadro 21, Figura 41) muestra bandas de absorción características para grupos hidroxilo (ν_{\max} 3420 cm⁻¹), enlaces C-H (ν_{\max} 2918 cm⁻¹) y carbonilo de γ -pirona (ν_{\max} 1604 cm⁻¹).

La solubilidad del compuesto en disolventes polares, las absorciones observadas en su espectro en el IR y su reacción positiva frente al reactivo de Molish, permitieron inferir el carácter glicosídico de este producto natural.

Su fórmula molecular se estableció por espectrometría de masas modalidad FAB positivo (Fast Atom Bombardment) como C₂₈H₃₄O₁₅ (Cuadro 21, Figura 42). La hidrólisis ácida del producto natural permitió detectar a la ramnosa y a la glucosa como los únicos azúcares presentes en la molécula.

Por otra parte, los espectros de RMN del ramnoglucósido presentan la apariencia típica de una flavanona (Harborne 1975; Harborne, 1994). El espectro de RMN-¹³C (Cuadro 21, Figura 43) presenta 28 señales, doce de las cuales son asignables a una unidad β -D-glucosa (δ_C 99.43, 76.27, 75.52, 73.00, 70.72, 66.04) y a una de α -L-ramnosa (δ_C 100.63, 72.07, 70.29, 69.60, 68.35, 17.85). Una evidencia adicional de la presencia de ramnosa en la molécula, puede obtenerse a partir de la observación en el espectro de RMN-¹H (Cuadro 21, Figura 44) de la señal correspondiente al protón anomérico en δ_H 4.51 y del doblete en δ_H 1.07, característico del metilo en la posición C-5 del azúcar. Esta demostración espectroscópica de la naturaleza disacárida del producto natural se encuentra en armonía con los resultados de la hidrólisis ácida y con los fragmentos en m/z 463 (M⁺-Ram) y en m/z 301 (M⁺-Ram-Glc) que se observan

IV. Resultados y Discusión

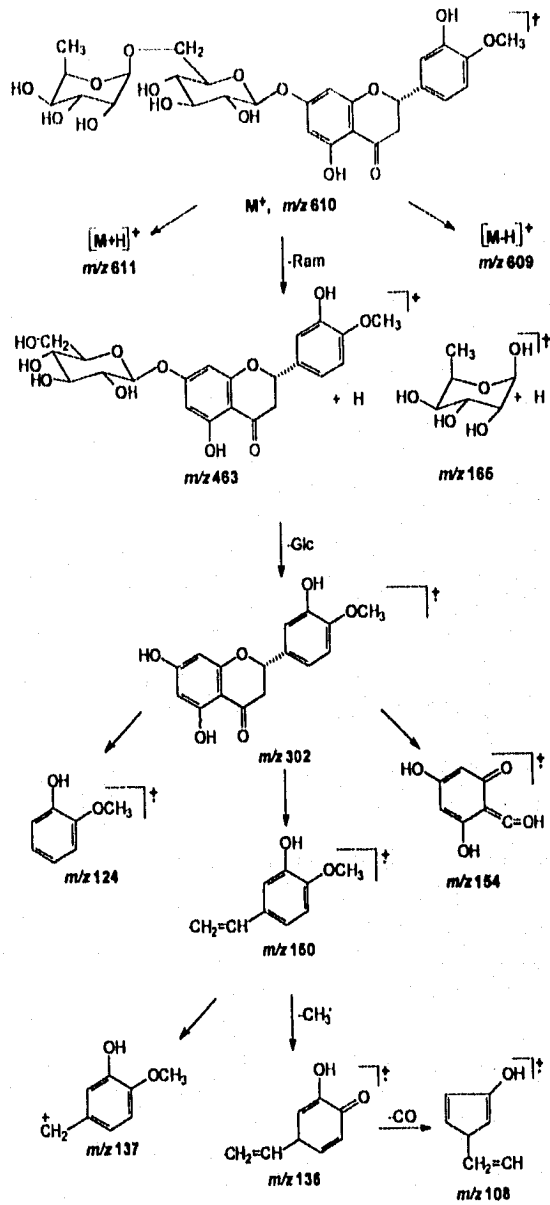
en el espectro FAB positivo (Cuadro 21, Figura 42). El orden de estas pérdidas de masa indica que la unión O-glicosídica se realiza a través del hidroxilo sobre el carbón anomérico de la glucosa. En la Figura 45 se presenta el patrón de fragmentación del compuesto (69) [Mabry y Markham, 1975; Delle, 1987]. Por otro lado, el desplazamiento químico del hidroximetileno de la glucosa (δ_C 117.98) es consistente con una unión 1-6- α -glicosídica entre la glucosa y la ramnosa (Markham *et al.*, 1975). Las señales restantes del espectro de RMN- ^{13}C son atribuibles a un núcleo flavanona sustituido en los anillos A y B con dos funciones oxigenadas cada uno (Markham *et al.*, 1975).

El análisis del espectro de RMN- 1H permite establecer de manera inequívoca el patrón de sustitución del anillo A, ya que se observa un sistema AB (δ_H 6.13, d, J = 2.1 Hz; δ_H 6.10, d, J = 2.1 Hz), atribuible a dos hidrógenos aromáticos *meta* relacionados. De manera adicional, la señal para un hidroxilo quelatado en δ_H 12.00, indica que el anillo A se encuentra 5,7-disustituido y que el sustituyente en la posición C-5 corresponde a un grupo hidroxilo. Por otro lado, la magnitud de la diferencia en el desplazamiento químico de las señales del sistema AB en el producto acetilado ($\Delta\delta_{H,6} = + 0.53$ y $\Delta\delta_{H,8} = + 0.34$) [Figura 46] son congruentes con la presencia del hidroxilo en C-5 y con la presencia en C-7 de un grupo metoxilo, o de la porción sacárida.

Para establecer el patrón de sustitución del anillo B, el análisis de la porción aromática del espectro de RMN- 1H del derivado acetilado es de gran utilidad (Figura 46). En el espectro del derivado, los hidrógenos del anillo B se observan como un sistema ABX para una flavanona 3',4'-disustituida. Los hidrógenos más afectados en su desplazamiento químico, en relación al producto natural, son CH-2' (δ_H 7.28) y CH-5' (δ_H 7.36), indicando estas últimas observaciones que en la posición C-4' debe encontrarse un grupo hidroxilo, mientras que en C-3' se pueden encontrar el grupo metoxilo o la porción sacárida.

IV. Resultados y Discusión

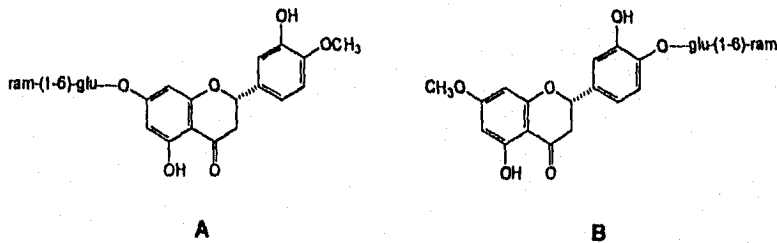
Figura 45. Patrón de fragmentación de la hesperidina (69).



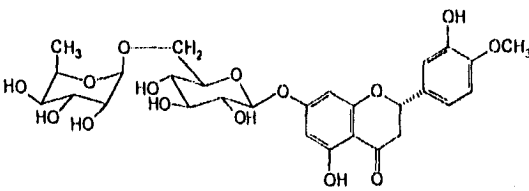
IV. Resultados y Discusión

Con base en el análisis espectroscópico anterior, fue factible proponer cualquiera de las estructuras A o B indicadas en la Figura 47 para el compuesto (69). La comparación de los desplazamientos químicos para C-7 (δ_C 165.14) y C-4' (δ_C 55.68) con los descritos previamente en la literatura para compuestos similares (Markham *et al.*, 1975; Harborne, 1994), permitieron establecer que la estructura del producto natural (69) es la correspondiente a la hesperidina (Figura 47, estructura A). Cabe mencionar que este flavonoide se encuentra ampliamente distribuido en la familia de las rutáceas, representando uno de los constituyentes mayoritarios de la corteza de la naranja y de otros cítricos. Desde el punto de vista biológico, quizás la propiedad más importante de este producto es su capacidad de disminuir la fragilidad capilar. En consecuencia, este compuesto se ha utilizado para el tratamiento de la hipertensión y de otros trastornos vasculares (Trease y Evans, 1991).

Figura 47. Posibles estructuras del compuesto (69).



Cuadro 21. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de la hesperidina (69).

 <p style="text-align: center;">$C_{28}H_{34}O_{16}$</p>	
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} (Figura 41)	3420, 2918, 1604.
EM-FAB+ m/z (int. rel.) (Figura 42)	611 (4), $[M^+]$ 610 (1.5), 609 (1), 462 (2), 303 (9), 302 (3), 165 (3), 154 (100), 150 (3), 137 (59), 136 (64), 124 (4), 108 (18).
RMN- 1H , δ (300 MHz, DMSO- d_6) (Figura 44)	12.00 (s, HO-5), 9.10 (s, HO-3'), 6.91 (m, CH-2', CH-5', CH-6'), 6.13 (d, J = 2.1 Hz, CH-8), 6.10 (d, J = 2.1 Hz, CH-6), 5.48 (dd, J = 12.3, 3.6 Hz, CH-2), 4.96 (d, J = 7.5 Hz, CH-1 Glc), 4.51 (s, CH-1 Ram), 3.76 (s, OCH ₃ -4'), 2.75 (m, CH ₂ -3), 1.07 (d, J = 6.3 Hz, CH ₃ -6 Ram).
RMN- ^{13}C , δ (75 MHz, DMSO- d_6) (Figura 43)	197.04 (C-4), 165.14 (C-7), 163.05 (C-5), 162.51 (C-9), 147.96 (C-4'), 146.43 (C-3'), 130.88 (C-1'), 117.98 (C-6'), 114.15 (C-2'), 112.00 (C-5'), 100.63 (C-1 Ram), 99.43 (C-1 Glc), 96.38 (C-6), 95.56 (C-8), 78.39 (C-2), 76.27 (C-3 Glc), 75.52 (C-5 Glc), 73.00 (C-2 Glc), 72.07 (C-4 Ram), 70.72 (C-4 Glc), 70.29 (C-2 Ram), 69.60 (C-3 Ram), 68.35 (C-5 Ram), 66.04 (C-6 Glc), 55.68 (OCH ₃ , C-4'), 42.08 (C-3), 17.85 (C-6 Ram).

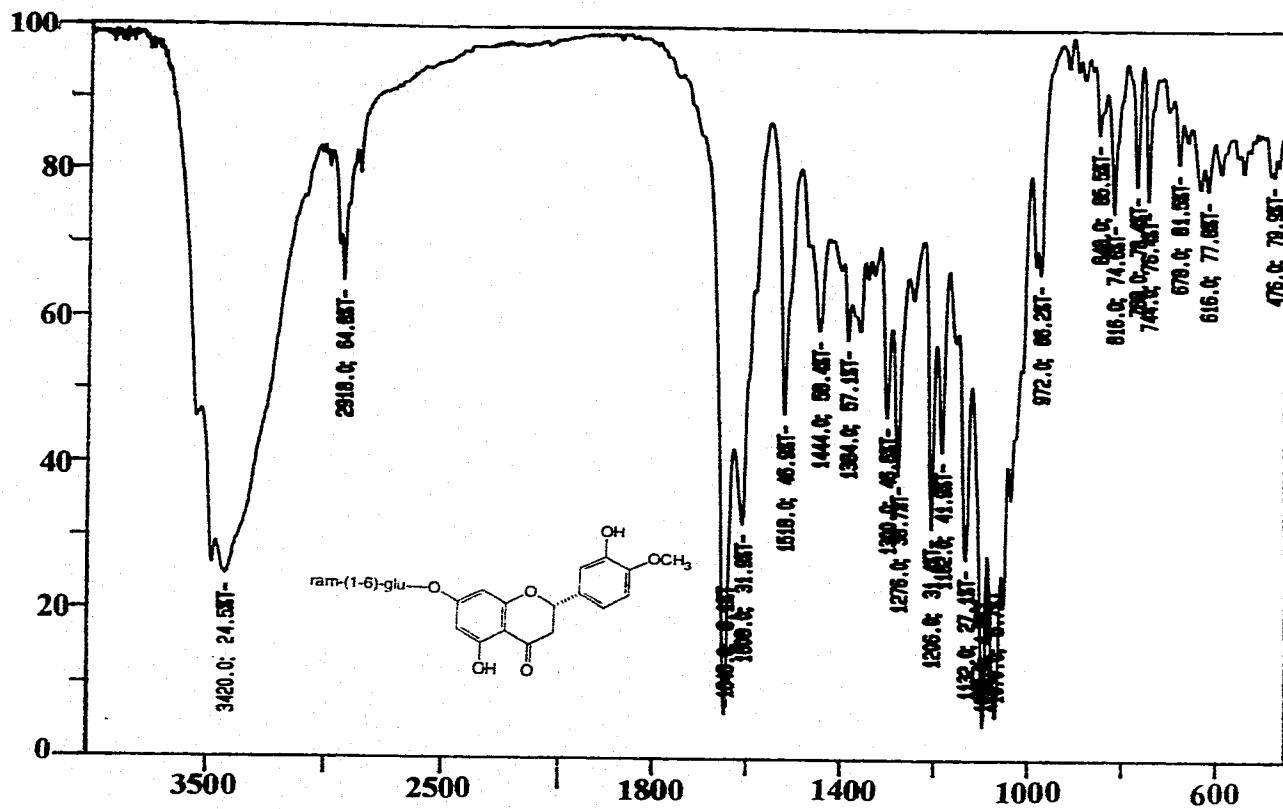


Figura 41. Espectro en el IR de la hesperidina (69).

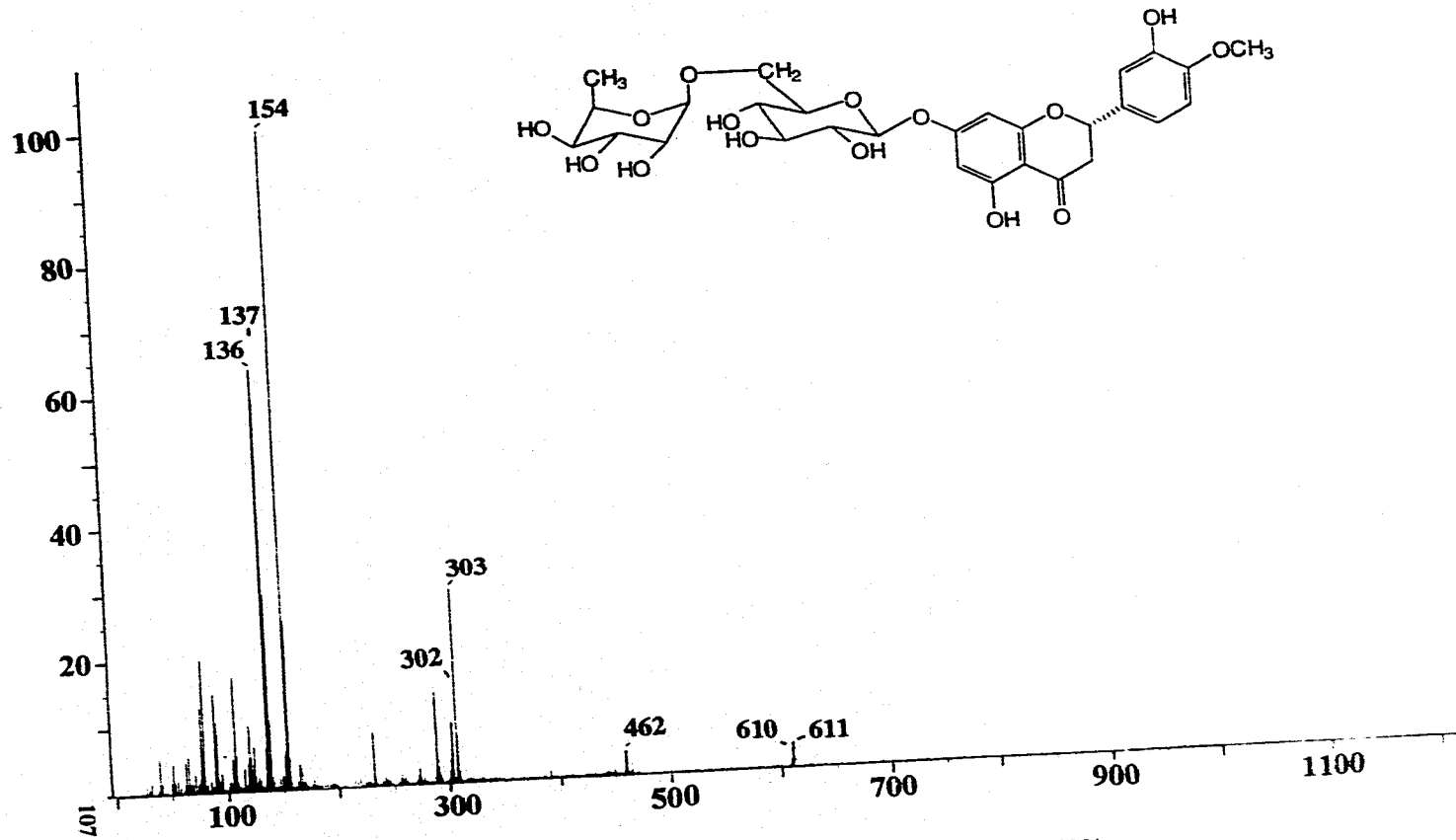


Figura 42. Espectro de masas modalidad FAB positivo de la hesperidina (69).

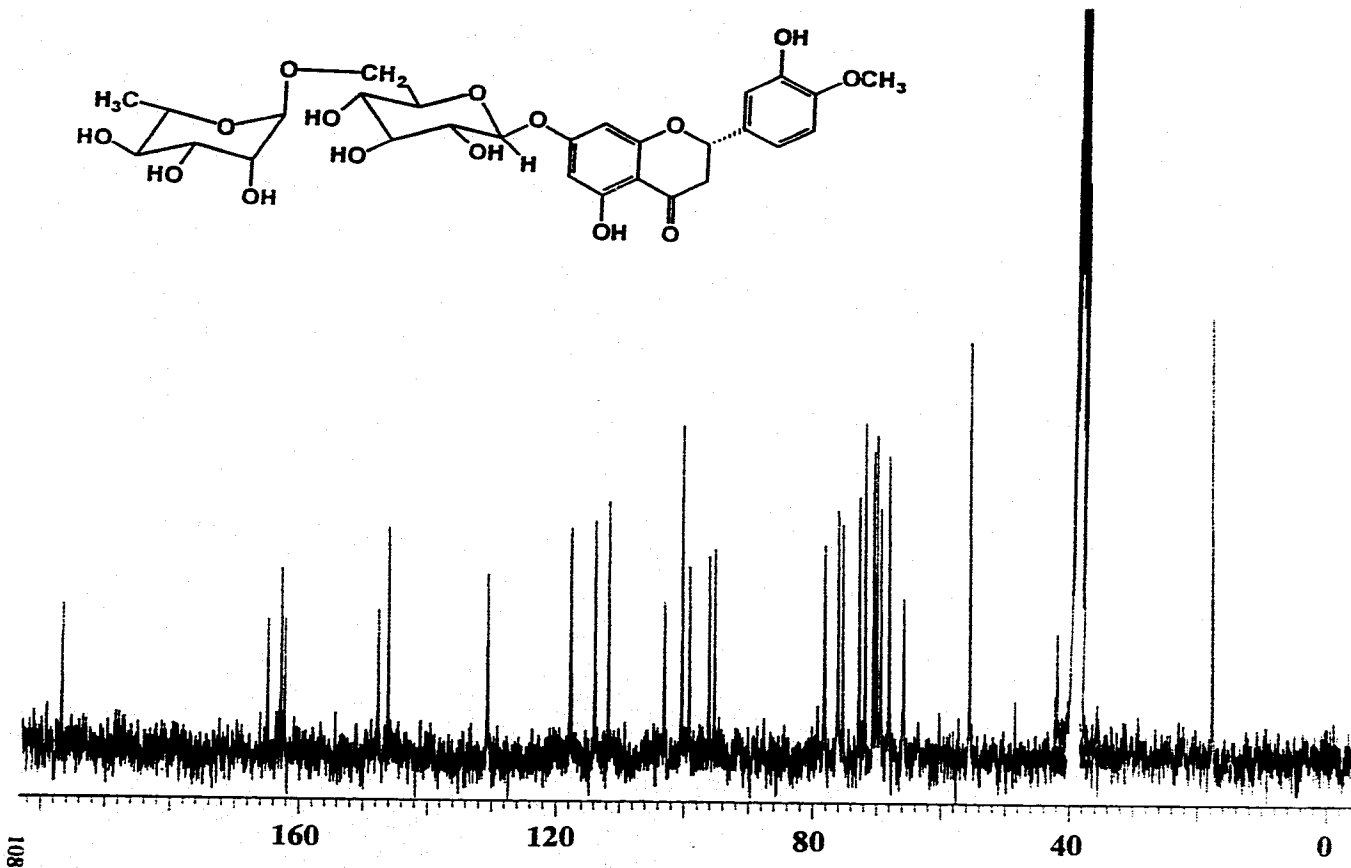


Figura 43. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) de la hesperidina (69).

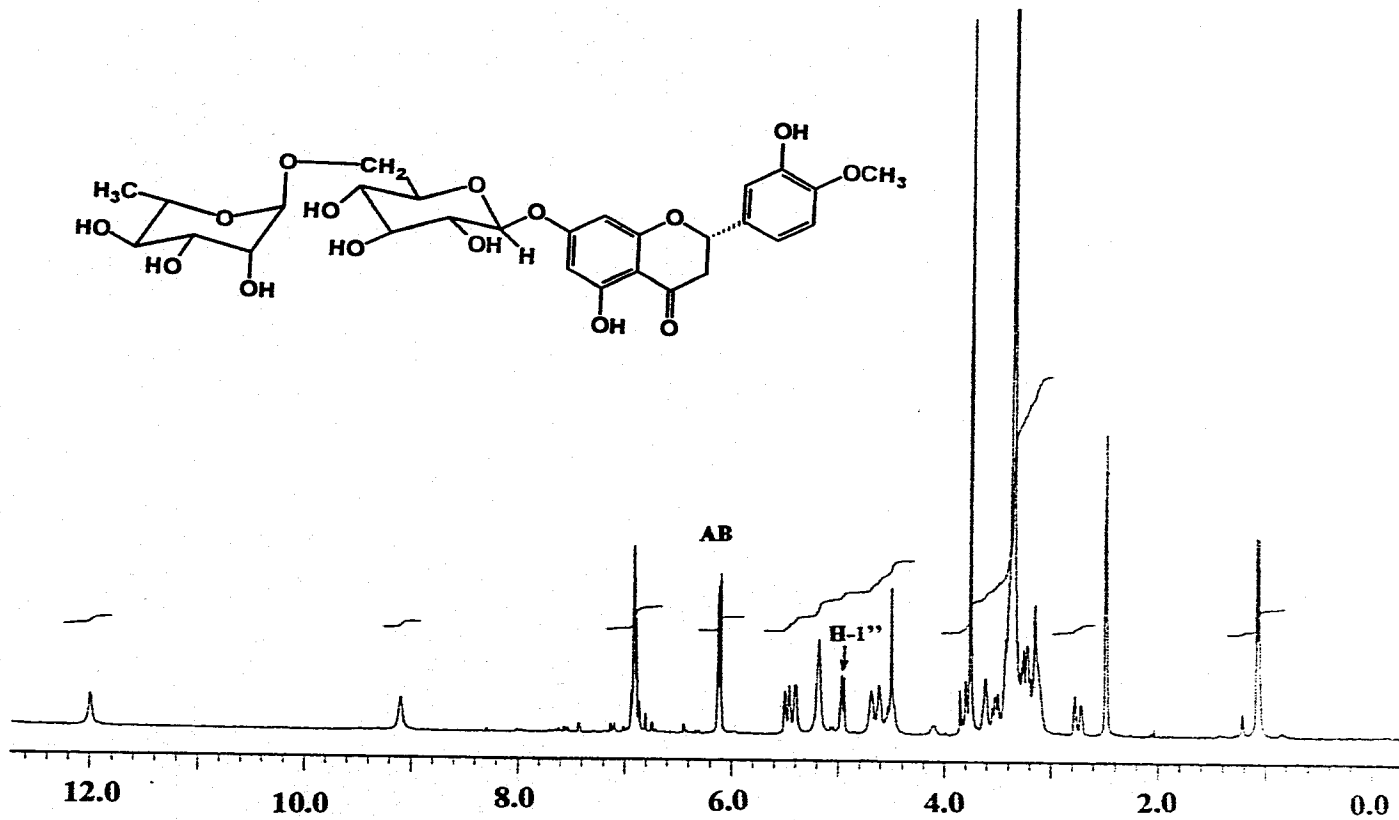


Figura 44. Espectro de RMN-¹H, (300 MHz, DMSO-d₆) de la hesperidina (69).

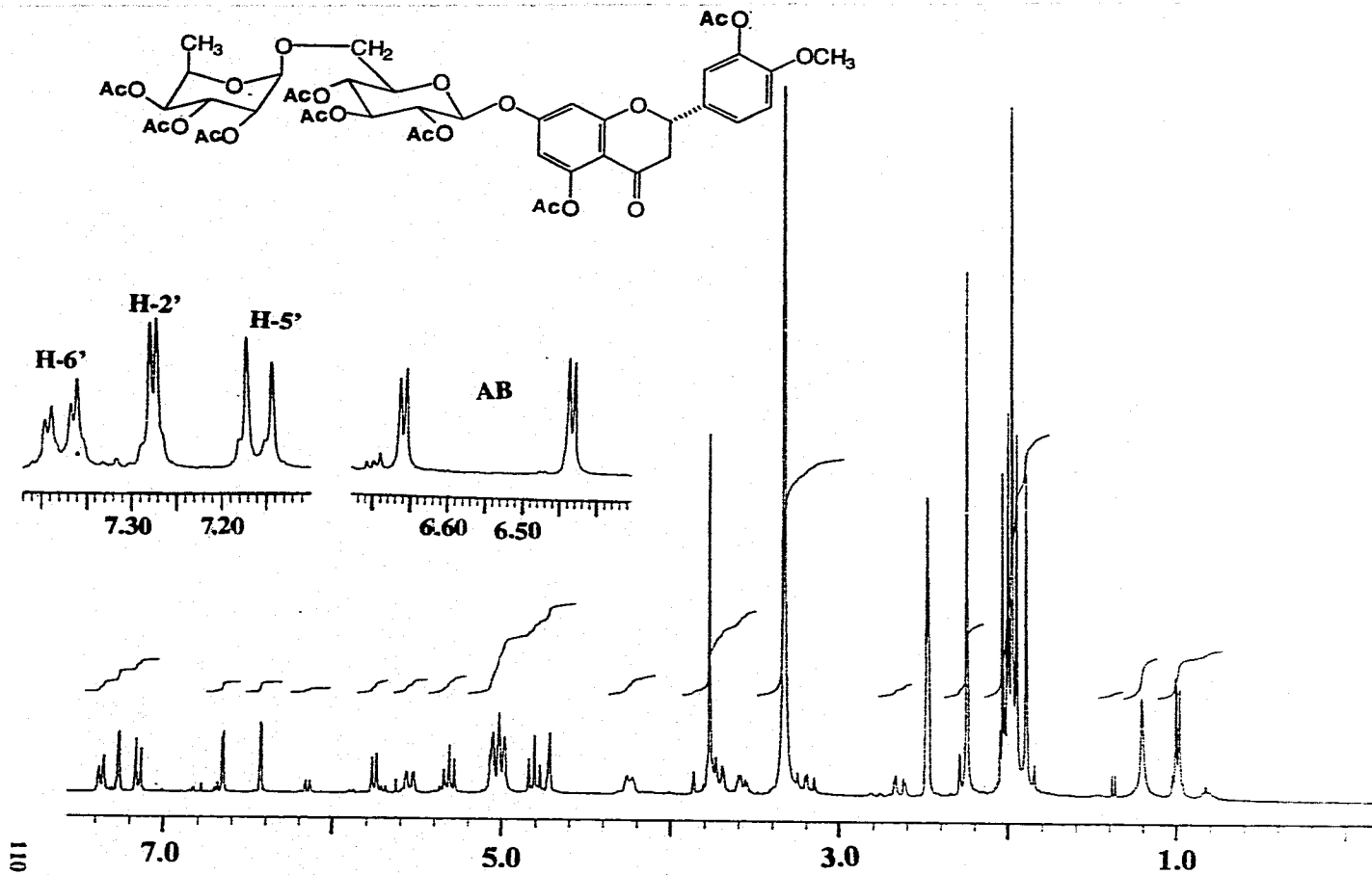


Figura 46. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) del derivado acetilado de la hesperidina (69a).

3. TOXICIDAD PARA ARTEMIA SALINA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

Ninguno de los compuestos obtenidos a partir de las partes aéreas de *Esenbeckia yaxhoob* en esta investigación, con excepción de la cumarina (41), demostraron una toxicidad significativa para el crustáceo *A. salina*. Los valores de CL_{50} obtenidos fueron mayores a 500 ppm. En el caso de la imperatorina (41) la CL_{50} fue de 58.60 $\mu\text{g/mL}$.

V. CONCLUSIONES

V. Conclusiones

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto fitotóxico cloroformo-metanólico de *Esenbeckia yaxhoob* Lundell, empleando un método bioautográfico para monitorerar la actividad inhibidora del crecimiento vegetal, permitió el aislamiento y caracterización de nueve metabolitos secundarios: tres cetonas (la 2-tridecanona **63**, la 2-pentadecanona **64** y la 6,10,14-trimetil pentadecanona **65**), un triterpeno pentacíclico (el β -lupeol **59**), una cumarina (la imperatorina **41**), un lignano (la asarinina **67**), un esteroide (el β -sitosterol **68**), el ramnoglicósido de una flavanona (la hesperidina **69**) y un triterpeno tetracíclico (el 3 β -acetoxi-24(S)-metil-dammar-20,25-dieno **66**), constituyendo este último metabolito un nuevo producto natural.

Los compuestos (**63**), (**66**), (**41**) y (**67**) fueron aislados de las fracciones primarias que demostraron una actividad fitotóxica significativa (Ey-I, Ey-II y Ey-IV), de acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos de bioautografía.

La 2-tridecanona (**63**) y la Imperatorina (**41**) poseen propiedades insecticidas demostradas, por lo que su presencia en el extracto orgánico de *Esenbeckia yaxhoob* indica que esta especie vegetal es una fuente importante de principios pesticidas. Estos productos pueden estar involucrados no sólo en las interacciones planta-planta de esta especie, sino también en las interacciones planta-insecto.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. Bibliografía

- Anaya, A. L.; Hernández, B. E.; Calera, M. R.; Torres, A.; Pelayo, H. y Fernández, E. (1995). A methodological model used in the search for allelopathic potential in some mexican plants. En G. R. Waller y S. Narwal (Eds.), *Methodology for Allelopathy Research*. En prensa.
- Anaya, A. L.; Ramos, O. R.; Cruz, O. R. y Hernández, J. (1987). Studies on allelopathy in Mexico. En G. R. Waller (Ed.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. ACS, Symposium Series 330, 89-101, Washington.
- Anderson, J. E.; Goetz, C. M. y McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2, 107-11.
- Asakawa, J.; Kasal, R.; Yamasaki, K. y Tanaka, O. (1977). ^{13}C NMR study of Ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes. *Tetrahedron* 33, 1935-9.
- Ayres, D. C. y Lolckek, J. D. (1990). *Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
- Bates, R. B.; Caldera, S. y Suvannachut, K. (1990). A new triterpenoid from *Bridella tomentosa*. *Journal of Natural Products* 53, 209-11.
- Benner, J. P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science* 39, 95-102.
- Berenbaum, M. R. (1978). Toxicity of a furanocoumarin to armyworms: a case of biosynthetic escape from insect herbivores. *Science* 201, 532,3.

VI. Bibliografía

- Bevalot, F.; Fournet, A.; Moretti, C. y Vaquette, J. (1984). Alkaloids from *Esenbeckia pilocarpoides*. *Planta Medica* **50**, 522.
- Breitmaier, E. y Voelter, W. (1989). *Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. Third edition, Weinheim, Federal Republic of Germany, pp. 216-22.
- Breitmaier, E. y Voelter, W. (1994). *¹³C NMR Spectroscopy of Organic Compounds. High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. Third edition, VCH, Holanda.
- Budzikiewckz, H.; Djerassi, C. y Willams, D. H. (1964). *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. 2, Holden-Day, San Francisco, pp. 127-39.
- Das, M. C. y Mahato, S. B. (1983). Triterpenoids: Review. *Phytochemistry* **22**, 1071-95.
- De Pascual Teresa, J.; Bellido, I. S.; González, M. S. y Vicente, S. (1986). Tetracyclic triterpenes and nerolidol derivatives from *Santolina oblongifolia*. *Phytochemistry* **25**, 185-90.
- Delle, A. (1987). F.A.B.-Mass spectrometry of carbohydrates. En: R. S. Tipson y D. Horton (Eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Vol. 45, pp. 19-72.
- Delle, F.; Delle, G.; Moraes e Souza, M.; Da Saleta, M. y Chiappeta, A. (1989). Isopentenylindole derivatives and other components of *Esenbeckia leiocarpa*. *Gazzetta Chimica Italiana* **119**, 435-9.

VI. Bibliografía

- Delle, F.; Di Benedetto, R.; De Moraes e Souza, M. y Sandor, P. (1990). *Esenbeckia leiocarpa*: II. Further components. *Gazzetta Chimica Italiana* **120**, 387-9.
- Dimock, M. B.; Kennedy, G. G. y Williams, W. G. (1982). Toxicity studies of analogs of 2-tridecanone, a naturally occurring toxicant from a wild tomato. *Journal of Chemical Ecology* **8**, 837-42.
- Dreyer, D. L. (1980). Alkaloids, limonoids and furanocoumarins from three Mexican *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* **19**, 941.
- Dreyer, D. L.; Pickering, M. V. y Cohan, P. (1972). Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry* **11**, 705.
- Fattorusso, E.; Santacroce, C. y Xaasan, C. F. (1985). Dammarane triterpenes from the resin of *Boswellia freerana*. *Phytochemistry* **24**, 1035-6.
- Fischer, N. (1991). Plant terpenoids as allelopathic agents. En: J. B. Harborne y F. A. Tomas-Barberan (Eds.), *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoides*. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Clarendon Press-Oxford, pp. 376-98.
- García, C. (1995). Potencial aleloquímico de *Stauranthus perforatus* (Rutaceae) "Tankas-ché". *Tesis de Licenciatura*, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Gray, A. I.; Bhandari, P. y Waterman, P. G. (1988). New protolimonoids from the fruits of *Phellodendron chinense*. *Phytochemistry* **27**, 1805-8.

VI. Bibliografía

- Grinberg, N. (1991). Modern Thin Layer Chromatography. En N. Grinberg (Ed.), *Chromatography Science Series*, Vol. 52. New York, Marcel Dekker.
- Guang-Yi, L.; Gray, A. I. y Waterman, P. G. (1988). Tirucallane and oleanane triterpenes from the resin of *Aucoumea klaineana*. *Phytochemistry* **27**, 2283-6.
- Guilhon, G.; Baetas, A. C.; Maia, J. y Conserva, L. (1994). 2-alkyl-4-quinolone alkaloids and cinnamic acid derivatives from *Esenbeckia almawillia*. *Phytochemistry* **37**, 1193-5.
- Harborne, J. B. (1975). *The Flavonoids*. Edited by J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry, Academic Press, New York.
- Harborne, J. B. (1994). *The Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. Edited by J. B. Harborne, 1st. ed., Chapman and Hall, University Press, Cambridge, Great Britain.
- Herbert, R. B. (1981). *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Chapman and Hall, London, pp.63-6.
- Ikan, R. (1991). *Natural Products. A Laboratory Guide*. 2nd edition, Academic Press, Inc., USA, pp. 12-4.
- Inoue, M.; Nishimura, H.; Li, H.-H. y Mizutani, J. (1992). Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1833-1840.
- Jurd, L.; King, A. D. y Milhara, K. (1971). Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. *Phytochemistry* **10**, 2965-70.

- Kennedy, G. G. y Henderson, W. R. (1978). A laboratory assay for resistance to the tobacco hornworm in *Lycopersicon* and *Solanum* spp. *Journal of American Society Horticulture Science* 103, 334-6.
- Kennedy, G. G. y Yamamoto, R. T. (1979). A toxic factor causing resistance in a wild tomato to the tobacco hornworm and some other insects. *Entomology Experimental Applications* 26, 121-6.
- Kennedy, G. G.; Yamamoto, R. T.; Dimock, M. B.; Williams, W. G. y Bordner, J. (1981). Effect of daylength and light intensity on 2-tridecanone levels and resistance in *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum* to *Manduca sexta*. *Journal of Chemical Ecology* 7, 704-16.
- Kikuchi, T.; Kadota, S.; Suchara, H. y Namba, T. (1985). Studies on the constituents of orchidaceous plants. III. Isolation of non-conventional side chain sterols from *Nervilia purpurea* Schlechter and structure determination of nervisterol. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 33, 2235-42.
- Klocke, J. A.; Balandrin, M. F.; Barnby, M. A. y Yamasaki, R. B. (1989). Limonoids, phenolics and furanocoumarins as insect antifeedants, repellents and growth inhibitory compounds. En: B. Arnason, R. Philogene y P. Moreland (Eds.), *Insecticides of plant origin*, U.S. A., pp. 137-49.
- Lieberman, H. R. (1983). Estimating LD₅₀ using the probit technique: a basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology* 6, 111-6.
- Mabry, T. y Markham, K. (1975). Mass spectrometry of flavonoids. En: J. B. Harborne, T. J. Mabry y H. Mabry (Eds.), *The flavonoids*, Vol. I, Academic Press Inc., U.S.A., pp. 78-126.

- Macías, F. A.; Galindo, J. C.; Massanet, G. M.; Rodríguez, F. y Zubía, E. (1993). Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *Journal of Chemical Ecology* 19, 1371-9.
- Maclas, M. L. (1996). Determinación del potencial herbicida de los principios fitotóxicos de *Esenbeckia yaxhoob* y *Stauranthus perforatus*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Mahato, S. B. y Kundu, A. P. (1994). ^{13}C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37, 1517-75.
- Mahato, S. B.; Nandy, A. K. y Roy, G. (1992). Triterpenoids. *Phytochemistry* 7, 2199-2249.
- Manitto, P. (1981). *Biosynthesis of Natural Products*. John Wiley and Sons, USA, pp. 266-85.
- Markham, K. R.; Chari, M. y Mabry, T. (1975). Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids, *ibid*, pp. 19-134.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E. y McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45, 31-4.
- Murray, R. O.; Méndez, J. y Brown, S. (1982). *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley and Sons LTD, Paye Bros, Norwich.

VI. Bibliografía

- Nakatsu, T.; Johns, T. y Kubo, I. (1990). Isolation, structure and synthesis of novel 4-quinolinone alkaloids from *Esenbeckia leiocarpa*. *Journal of Natural Products* **53**, 1508-13.
- Oliveira, M.; Santana, G.; Conserva, M.; Maia, S. y Guillon, P. (1996). Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* **44**, 647-49.
- Pelter, A.; Ward, R. S.; Rao, E. V. y Sastry, K. V. (1976). Revised structures for pluviatilol, methyl-pluviatilol y xanthoxylol. *Tetrahedron* **32**, 2783-8.
- Pillmoor, J. B.; Wright, K. y Terri, S. A. (1993). Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science* **39**, 131-40.
- Pinto, A. C.; Baker, P. M.; Gilbert, B.; Pinchin, R.; Reis, F.; Waineraich, M. S. y Zocher, D. (1980). Vellozone, a tetracyclic triterpene from *Vellozia stipitata*. *Phytochemistry* **19**, 2486-7.
- Ramos, C. H. (1991). Revisión taxonómica de *Esenbeckia* (Rutaceae) de México. *Tesis de Maestría*, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Rao, K. L.; Ramraj, S. K.; Nath, A. R.; Rao, S. y Sundararamaiah, T. (1986). Cycloart-25-en-3 β -ol from *Euphorbia nivulia*. *Phytochemistry* **25**, 277-8.
- Ríos, M. Y. y Delgado, G. (1992). Polyprenols and acylphloroglucinols from *Esenbeckia nesiotica*. *Phytochemistry* **31**, 3491-4.
- Ríos, M. Y. y Delgado, G. (1992). Terpenoids and alkaloids from *Esenbeckia belizencia*. *Journal Natural Products* **55**, 1307-9.

VI. Bibliografía

- Rodgers, B. P. (1993). Potential of biopesticides in agriculture. *Pesticide Science* **39**, 117-29.
- Rodighiero, G.; Musajo, Y.; Dall'acqua, F.; Marciani, S.; Caporale, G. y Ciavatta, L. (1970). Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins: photoreactivity of various furocoumarins with native DNA and ribosomal RNA. *Biochimical and Biophysical Acta* **217**, 40-9.
- Scott, B. R.; Pathak, M. A. y Mohy, G. (1976). Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutat. Research* **39**, 27-74.
- Standley, P. C. (1923). Trees and Shrubs of Mexico. *Contributions from the United States National Herbarium* **23**, 537. Smithsonian Institution, Washington, D. C.
- Tori, M.; Matsuda, R.; Sono, M. y Asaka, Y. (1988). ^{13}C NMR assignment of dammarane triterpenes and dendropanoxido: application of 2D Long-Range ^{13}C - ^1H correlation spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* **26**, 581-90.
- Torssell, K. B. (1983). *Natural Products Chemistry. A Mechanistic and Biosynthetic Approach to Secondary Metabolism*. John Wiley and Sons Limited, Great Britain, pp. 197-204.
- Trease, G. E. y Evans, W. C. (1991). *Farmacognosia*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill, México, pp: 62, 450, 479-80.
- Van Sumere, C. F.; Cottenie, J.; De Greef, J. y Kint, J. (1972). Biochemical studies in relation to the possible germination regulatory role of naturally

VI. Bibliografía

- occurring coumarins and phenolics. *Recent Advances in Phytochemistry* 4, 165-221.
- Vitagliano, J. C. y Comin, J. (1970). Studies on Argentine plants XXVIII. Alkaloids from *Esenbeckia febrifuga* Jass. *Anales de la Asociación Quimica de Argentina* 58, 59.
- Vitagliano, J. C. y Comin, J. (1970). Studies on Argentine plants XXIX. Limonoids from *Esenbeckia febrifuga* Jass. and *Helietta longifoliata* Britt. *Anales de la Asociación Quimica de Argentina* 58, 273.
- Vogel, A. Y. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*. 5th ed., Longman Scientific and Technical, U. K., pp. 1225.
- Werner, A.; Hadecek, F.; Muller, C. y Greger, H. (1994). Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apiodeae). *Journal of Chemical Ecology* 20, 2035-54.
- Williams, W. G.; Kennedy, G. G.; Yamamoto, R. T.; Thacker, J. D. y Bordner, J. (1980). 2-tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207, 888-9 y referencias ahí citadas.
- Williams, W. G.; Kennedy, G. G.; Yamamoto, R. T.; Thacker, J. D. y Bordner, J. (1980). 2-tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicum hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207, 888-9.
- Worsham, A. D. (1989). Current and potential technique used in allelopathy as aid in weed management. En: C. H. Chou y G. R. Waller (Eds.),

VI. Bibliografia

Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allonones. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph, Series No. 9, Taipei, ROC.