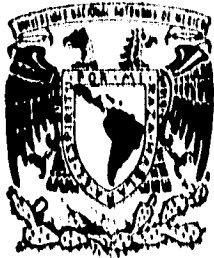


00570



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROTOLIMONOIDES Y LIMONOIDES BIOACTIVOS DE  
*Guarea grandifolia* A.P. DE CANDOLLE (Meliaceae)

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS  
(QUIMICA-FARMACEUTICA)  
P R E S E N T A  
L.C.Q. EDELIA CLAUDINA VILLARREAL  
IBARRA



MEXICO, D.F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

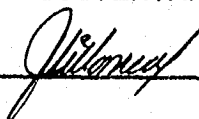
JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** Dra. MARTHA ALBORES VELASCO  
**PRIMER VOCAL:** Dr. LEOVIGILDO QUIJANO  
**SECRETARIO:** M. en C. ANGELA SOTELO LÓPEZ  
**PRIMER SUPLENTE:** Dr. ROGELIO PEREDA MIRANDA  
**SEGUNDO SUPLENTE:** M. en C. Ma. ISABEL AGUILAR LAURENTS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 6 DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PLANTAS  
MEDICINALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA Y LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

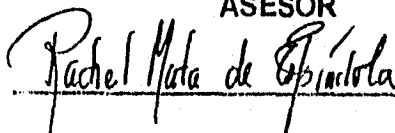
**SUSTENTANTE**



---

L.C.Q. EDELIA CLAUDINA VILLARREAL IBARRA

**ASESOR**



---

Dra. RACHEL MATA DE ESPÍNDOLA

## INDICE

	Página
Resumen	ii
Abstract	iii
Lista de abreviatura.....	v
Lista de cuadros.....	vii
Lista de espectros.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de gráficas.....	xi
Lista de tablas.....	xii
<b>I.- INTRODUCCION</b>	
1.1 Generalidades sobre limonoides.....	1
1.2 Antecedentes fitoquímicos y biológicos acerca del género <i>Guarea</i> (Meliaceae).....	8
1.3 Generalidades acerca de <i>Guarea grandifolia</i> A. P. de Candolle.....	16
<b>II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS</b>	19
<b>III.- PARTE EXPERIMENTAL</b>	
3.1.- Material vegetal.....	24
3.2.- Análisis Cromatográficos.....	24
3.3.- Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.....	26
3.4 Pruebas biológicas	
3.4.1 Determinación de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal.....	28
3.4.2 Determinación de la actividad insecticida.....	30
3.5 Preparación de los extractos orgánicos a partir de las diferentes partes vegetales de <i>G. grandifolia</i>	
3.5.1 Extracto derivado de la testa de las semillas (Extracto A).....	31
3.5.2 Extracto derivado de la corteza (Extracto B).....	31
3.6 Fraccionamiento de los extractos orgánicos derivados de la semilla y corteza de <i>G. grandifolia</i>	
3.6.1 Fraccionamiento de la testa de las semillas (Extracto A).....	32
3.6.2 Fraccionamiento de la corteza (Extracto B).....	32
3.7 Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias	
3.7.1 Aislamiento de la 21 $\alpha$ -acetoximellanona (26) de la fracción activa S-II.....	34

## INDICE (continuación)

	Página
3.7.2 Aislamiento y purificación de la melianona (27) de la fracción activa S-VII.....	35
3.7.3 Aislamiento y purificación del melianodiol (28) de la fracción activa S-VIII.....	35
3.7.4 Aislamiento y purificación de la gedunina (29) de la fracción activa S-IV.....	36
3.7.5 Aislamiento y purificación de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) de la fracción activa S-VI.....	36
3.7.6 Aislamiento y purificación del $\beta$ -lupeol (21) y acetato de $\beta$ -lupeol (33) de la fracción aprimaria activa C-III.....	37
3.7.7 Aislamiento del $\beta$ -D-glucositosterol (34).....	38
3.8 Obtención de los derivados	
3.8.1 Obtención de la 21-acetoximelianona.....	39
3.8.2 Obtención del melianodiol a partir de la melianona (27).....	39
<b>IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1.- Evaluaciones biológicas preliminares que permitieron la selección de la especie <i>Guarea grandifolia</i> A. P. de Candolle.....	40
4.2.- Caracterización de los constituyentes activos	
4.2.1 Caracterización de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), melianona (27) y melianodiol (28).....	48
4.2.2 Caracterización de la gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxo gedunina (29) y 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (30).....	66
4.2.3 Caracterización del $\beta$ -lupeol (21) y del acetato de $\beta$ -lupeol (33).....	81
4.2.4 Caracterización del $\beta$ -D-glucositosterol (34).....	81
4.3. Actividades biológicas de los constituyentes puros aislados de <i>Guarea grandifolia</i> .....	82
<b>V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>VI. APENDICE 1.....</b>	<b>93</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>138</b>

## RESUMEN

El fraccionamiento biodirigido del extracto fitotóxico e insecticida de la testa de las semillas de *Guarea grandifolia* A. P. de Candolle (Meliaceae) permitió el aislamiento y la caracterización de tres protolimonoides [21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), melianona (27), melianodiol (28)] y tres limonoides [gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)]. Por otra parte, el estudio fitoquímico convencional de la corteza condujo al aislamiento del  $\beta$ -lupeol (32), acetato de  $\beta$ -lupeol (33),  $\beta$ -D-glucositolsterol (34), gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).

Los protolimonoides 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y melianodiol (28) demostraron una actividad inhibidora significativa del crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli* a 1000  $\mu$ g/ml.

Los protolimonoides 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y melianodiol (28) demostraron un importante efecto inhibitor del crecimiento de las larvas del gusano barrenador del maíz [*Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralidae)] a 50  $\mu$ g/ml en un 45.5 y 36 %, respectivamente, con relación al control. Por otra parte, el melianodiol (28) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31), modifican el crecimiento de las larvas de prueba, observándose también una reducción significativa del peso promedio de las mismas.

La especie *Guarea grandifolia* constituye una fuente potencial de compuestos con propiedades insecticidas y reguladoras del crecimiento vegetal.

---

## ABSTRACT

Bioassay guided fractionation of the phytotoxic and insecticidal extract from the seeds's testa of *Guarea grandifolia* A. P. de Candolle (Meliaceae) has led to the isolation of three protolimonoids [21 $\alpha$ -acetoxymelianone (26), melianone (27), melianodiol (28)] and three limonoids [gedunin (29), 7-deacetoxy-7-oxogedunin (30), 6 $\alpha$ -acetoxy gedunin (31)]. On the other hand, the insecticidal extract prepared from the stem bark of the plant yield  $\beta$ -lupeol (32),  $\beta$ -lupeol acetate (33),  $\beta$ -D-glucosytosterol (34), gedunin (29), 7-deacetoxy-7-oxogedunin (30), 6 $\alpha$ -acetoxygedunin (31). In general, the structures of isolated compounds were elucidated by chemical, spectroscopy and spectral methods. Additionally, the structures of 7-deacetoxy-7-oxogedunin (30) and 6 $\alpha$ -acetoxy gedunin (31) have been establish unequivocally by diffraction Rayos-X studies.

The 21 $\alpha$ -acetoximelianone (26) and melianodiol (28) inhibited significantly the radicle growth of *Amaranthus hypochondriacus* and *Echinochloa crusgalli* at 1000 ppm. The isolated protolimonoids caused noted growth reduction of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralydae) larvae, at 50  $\mu$ g/ml.

The results indicate the existence of bioactive compounds in *Guarea grandifolia* capable of fighting most types of crop plagues. This active principles could be useful for the development of pesticidal agents.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
HCl	Acido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
H <sub>2</sub> O	Agua
$\alpha$	Alfa
bz	Benceno
Bz-D <sub>6</sub>	Benzeno deuterado
KBr	Bromuro de potasio
$\beta$	Beta
cm	Centímetro
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50
J	Constante de acoplamiento
ccf	Cromatografía en capa fina
cpp	Cromatografía en placa preparativa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
$\delta$	desplazamiento químico
<i>dd</i>	doble de doble
<i>ddd</i>	doble de doble de doble
<i>d</i>	doblete
<i>dt</i>	doblete tripleteado
DL <sub>50</sub>	dosis letal 50
HETCOR	Espectroscopía bidimensional heteronuclear
COSY	Espectroscopía bidimensional homonuclear
EMIE	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EM-FAB	Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
edo	Estado
°C	Grados centígrados
g	Gramos
Hz	Hertz
Hex	Hexano
hrs	Horas
Int rel	Intensidad relativa
IR	infrarrojo
L	litros



## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

$\lambda_{\text{max}}$	Longitud de onda máxima
MHz	Megahert
MeOH	Metanol
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{L}$	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Millilitros
<i>m</i>	Multiplete
ppm	Partes por millón
Py-D <sub>5</sub>	Piridina pentadeuterada
%	Por ciento
p.f.	Punto de fusión
m/z	Relación masa carga
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
<i>s</i>	Singulete
<i>sa</i>	Singulete ancho
TMS	Tetrametilsilano
<i>t</i>	Triplete
uma	Unidades de masa
UV	Ultravioleta

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación biogénica de los limonoides.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	25
<b>Cuadro 3.</b> Sistemas de eluyentes utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	26
<b>Cuadro 4.</b> Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto A de <i>Guarea grandifolia</i> .....	33
<b>Cuadro 5.</b> Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto B de <i>Guarea grandifolia</i> .....	34
<b>Cuadro 6.</b> Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción activa C-III de <i>Guarea grandifolia</i> .....	38
<b>Cuadro 7.</b> Metabolitos secundarios aislados de la especie <i>Guarea grandifolia</i> .....	45

## LISTA DE ESPECTROS

	Página
<b>Espectro 1.</b> Espectro de IR de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	94
<b>Espectro 2.</b> EMIE de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	95
<b>Espectro 3.</b> RMN <sup>13</sup> C de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	96
<b>Espectro 4.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	97
<b>Espectro 5.</b> RMN <sup>13</sup> C de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	98
<b>Espectro 6.</b> RMN-HETCOR de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (11) .....	99
<b>Espectro 7.</b> Espectro de IR del Melianodiol (28).....	100
<b>Espectro 8.</b> EMIE del Melianodiol (28).....	101
<b>Espectro 9.</b> RMN <sup>13</sup> C del Melianodiol (28).....	102
<b>Espectro 10.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT del Melianodiol (28).....	103
<b>Espectro 11.</b> RMN <sup>1</sup> H del Melianodiol (28).....	104
<b>Espectro 12.</b> RMN-HETCOR del Melianodiol (28).....	105
<b>Espectro 13.</b> Espectro de IR de la Melianona (27).....	106
<b>Espectro 14.</b> EMIE de la Melianona (27).....	107
<b>Espectro 15.</b> RMN <sup>13</sup> C de la Melianona (27).....	108
<b>Espectro 16.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT de la Melianona (27).....	109
<b>Espectro 17.</b> RMN <sup>1</sup> H de la Melianona (27).....	110
<b>Espectro 18.</b> RMN-COSY de la Melianona (27).....	111
<b>Espectro 19.</b> Espectro de IR de la Gedunina (29).....	112
<b>Espectro 20.</b> EMIE de la Gedunina (29).....	113
<b>Espectro 21.</b> RMN <sup>13</sup> C de la Gedunina (29).....	114
<b>Espectro 22.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT de la Gedunina (29).....	115
<b>Espectro 23.</b> RMN <sup>1</sup> H de la Gedunina (29).....	116
<b>Espectro 24.</b> RMN-HETCOR de la Gedunina (29).....	117

## LISTA DE ESPECTROS (continuación)

	Página
<b>Espectro 25.</b> Espectro de IR de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	118
<b>Espectro 26.</b> EMIE de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	119
<b>Espectro 27.</b> RMN <sup>13</sup> C de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	120
<b>Espectro 28.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	121
<b>Espectro 29.</b> RMN <sup>1</sup> H de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	122
<b>Espectro 30.</b> RMN-HETCOR de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30).....	123
<b>Espectro 31.</b> Espectro de IR de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	124
<b>Espectro 32.</b> EMIE de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	125
<b>Espectro 33.</b> RMN <sup>13</sup> C de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	126
<b>Espectro 34.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	127
<b>Espectro 35.</b> RMN <sup>1</sup> H de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	128
<b>Espectro 36.</b> RMN-HETCOR de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	129
<b>Espectro 37.</b> Espectro de IR del $\beta$ -lupeol (32).....	130
<b>Espectro 38.</b> EMIE del $\beta$ -lupeol (32).....	131
<b>Espectro 39.</b> RMN <sup>1</sup> H del $\beta$ -lupeol (33).....	132
<b>Espectro 40.</b> Espectro de IR del acetato de $\beta$ -lupeol (32).....	133
<b>Espectro 41.</b> EMIE del acetato de $\beta$ -lupeol (32).....	134
<b>Espectro 42.</b> RMN <sup>13</sup> C del acetato de $\beta$ -lupeol (33).....	135
<b>Espectro 43.</b> RMN <sup>13</sup> C-DEPT del acetato de $\beta$ -lupeol (33).....	136
<b>Espectro 44.</b> RMN <sup>1</sup> H del acetato de $\beta$ -lupeol (33).....	137

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Biogénesis del núcleo base de los limonoides.....	2
<b>Figura 2.</b> Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides.....	4
<b>Figura 3.</b> Distribución en México de la <i>Guarea grandifolia</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Semillas de <i>Guarea grandifolia</i> A. P. de Candolle.....	17
<b>Figura 5.</b> Fragmentaciones características del protolimonoides 21 $\alpha$ -acetoximelianona ( <b>26</b> ).....	53
<b>Figura 6.</b> Espectro COSY de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona ( <b>26</b> ).....	56
<b>Figura 7.</b> Análisis comparativo de las absorciones de la cadena lateral observadas en los espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del melianodiol ( <b>28</b> ).....	59
<b>Figura 8.</b> Fragmentaciones características de la melianona ( <b>27</b> ).....	63
<b>Figura 9.</b> Análisis comparativo de las absorciones de la cadena lateral observadas en los espectros de RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C de la melianona ( <b>27</b> ).....	64
<b>Figura 10.</b> Fragmentaciones características de limonoides con estructura tipo gedunina.....	73
<b>Figura 11.</b> Espectro COSY de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina ( <b>31</b> ).....	77
<b>Figura 12.</b> Vista estereoscópica de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina ( <b>13</b> ).....	79
<b>Figura 13.</b> Vista estereoscópica de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina ( <b>31</b> ).....	80

## LISTA DE GRÁFICAS

	Página
<b>GRÁFICA 1.</b> Porcentajes de inhibición de los extractos de <i>G. grandifolia</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .....	42
<b>GRÁFICA 2.</b> Efecto de la 21 $\alpha$ -acetoximeliana (26) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .....	85
<b>GRÁFICA 3.</b> Efecto de la 21 $\alpha$ -acetoximeliana (26) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de <i>E. crusgalli</i> .....	85
<b>GRÁFICA 4.</b> Efecto de la gedunina (29) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> .....	86
<b>GRÁFICA 5.</b> Efecto de la gedunina (29) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de <i>E. crusgalli</i> .....	86
<b>GRÁFICA 6.</b> Efecto de algunos de los metabolitos de <i>G. grandifolia</i> sobre el crecimiento de larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .....	91

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Metabolitos secundarios aislados del género <i>Guarea</i> .....	10
<b>Tabla 2.</b> Efecto de los extractos de <i>G. grandifolia</i> sobre larvas de <i>Ostrinia nubilalis</i> .....	41
<b>Tabla 3.</b> Efecto de los extractos de <i>G. grandifolia</i> sobre el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .....	43
<b>Tabla 4.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).....	49
<b>Tabla 5.</b> Datos de RMN <sup>1</sup> H de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y derivados.....	50
<b>Tabla 6.</b> Datos de RMN <sup>13</sup> C de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y derivados.....	51
<b>Tabla 7.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del melianodiol (28).....	57
<b>Tabla 8.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la melianona (27).....	60
<b>Tabla 9.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Gedunina (29).....	67
<b>Tabla 11.</b> Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31).....	68
<b>Tabla 12.</b> Datos de RMN <sup>1</sup> H de la gedunina (29) y derivados.....	69
<b>Tabla 13.</b> Datos de RMN <sup>13</sup> C de la gedunina (29) y derivados.....	71

LISTA DE TABLAS (continuación)

	Página
<b>Tabla 14.</b> Efecto de los compuestos puros aislados de <i>G. grandifolia</i> sobre la inhibición y el crecimiento radicular de <i>A. hypochondriacus</i> y <i>E. crusgalli</i> .....	83
<b>Tabla 15.</b> Efecto de los limonoides y protolimonoides de <i>G. grandifolia</i> sobre el peso máximo de las larvas de <i>O. nubilalis</i> con un grado de desarrollo de 23 días.....	89



## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de ésta 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 N0. 2576 PM).

Al CONACYT a la Dirección de Intercambio Académico de la UNAM y a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, por las becas otorgadas, que me permitieron realizar mis estudios de Maestría en Química Farmacéutica.

A la Dra. Rachel Mata por su dedicación a la investigación y por su invaluable contribución y apoyo a lo largo de este proyecto.

A los miembros del jurado designado para la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Thor Arnason de la Universidad de Ottawa, Canada, por proporcionar las facilidades para la realización de los ensayos biológicos relacionados con la evaluación de la actividad insecticida de los extractos y productos puros obtenidos durante la presente investigación.

A la M. en C. Adelina Jimenez por la determinación de la actividad insecticida y al Dr. Rogelio Pereda por su diligente colaboración durante la realización de los ensayos antes mencionados

Al Dr. Alfredo Toscano del laboratorio de Rayos X, del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los Rayos X de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina y 6 $\alpha$ -acetoxigedunina.

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

Así como 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 la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez del departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de IR y rotación óptica.

A Daniel Chavez por su colaboración en la corrección de la presente Tesis.

## I. INTRODUCCION

### 1.1 Generalidades sobre limonoides

La familia Meliaceae esta constituida por aproximadamente 1400 especies agrupadas en 50 géneros. Desde el punto de vista quimiotaxonómico, los limonoides y los protolimonoides constituyen los metabolitos secundarios más representativos de esta familia de plantas (Pennington, 1981; Taylor *et al.*, 1984; Banerji *et al.*, 1984; Champagne *et al.*, 1992, *Inter alia*).

Los limonoides son metabolitos secundarios de tipo tetranortriterpenoide que derivan biogénicamente de triterpenoides tetracíclicos del tipo  $\Delta^7$ -eufol [(H-20,C-20 (S)) o  $\Delta^7$ -tirucalol [(H-20,C-20 (R))] (Arigoni *et al.*, 1960; Halsall y Aplin, 1964; Son y Bredenberg, 1964; Polonsky *et al.*, 1964); la cadena lateral de estos compuestos se oxida para formar primero un protolimonoido intermediario, a partir del cual tras sucesivas oxidaciones y rearreglos se generan los distintos tipos de limonoides (Taylor *et al.*, 1984; Champagne *et al.*, 1992). Durante el proceso biosintético la cadena lateral de los precursores triterpenoides se transforma en un anillo furano (Su *et al.*, 1990), con una pérdida de cuatro átomos de carbono, de ahí que los limonoides sean tetranortriterpenoides (C<sub>26</sub>). En la Figura 1 se representa de manera esquemática la formación de un tetranortriterpenoide de tipo *apo* eufol-tirucalol (limonoido de primer paso biogénico). Cabe destacar que los limonoides de tipo *apo*-eufol constituyen los precursores de las otras clases de limonoides, las cuales se generan a partir del apo-

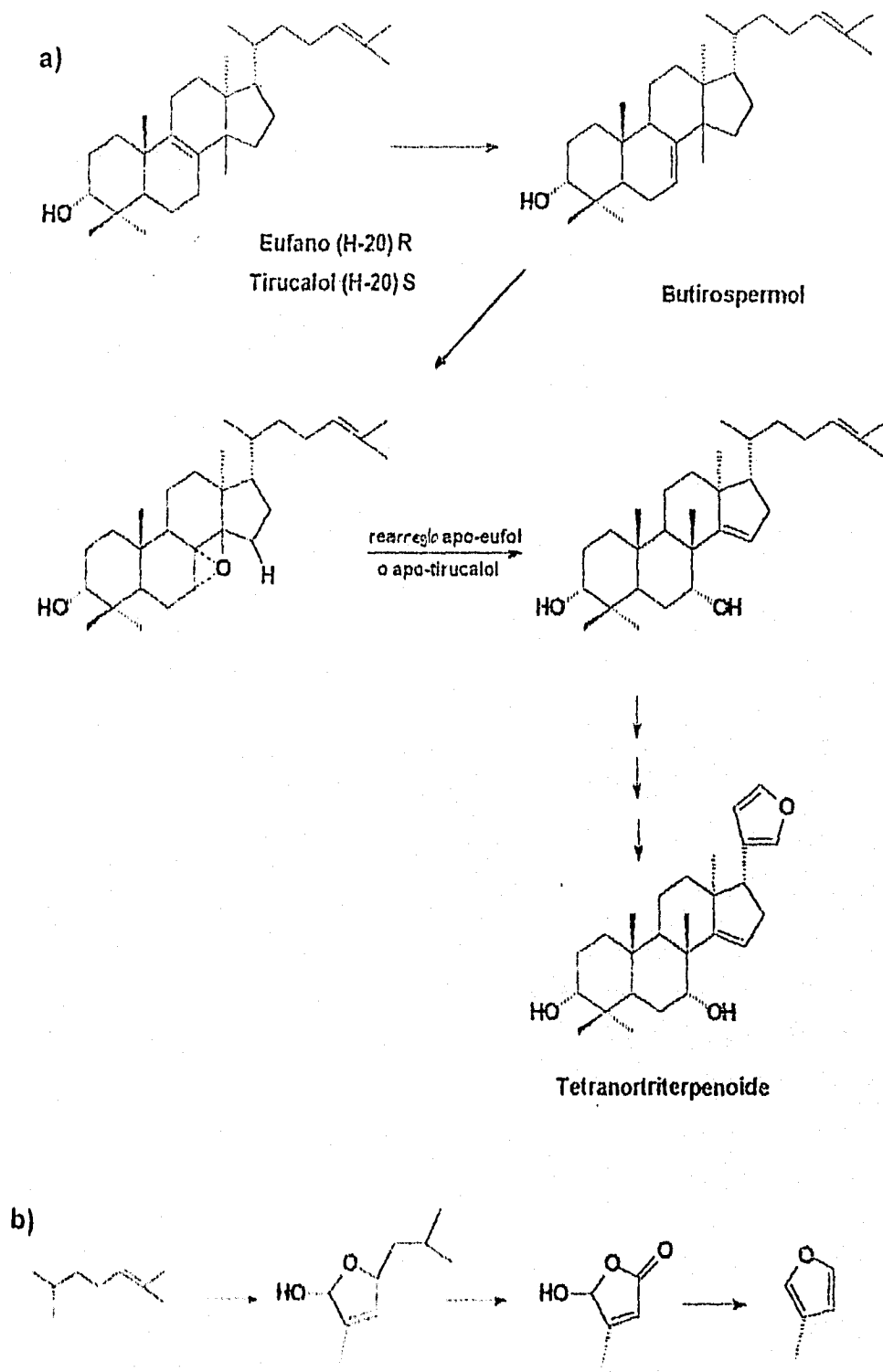


Figura 1. Biogénesis del núcleo base de los ilmonoides: (a) Formación del núcleo base tipo apo-eufol. (b) Transformación de la cadena lateral.

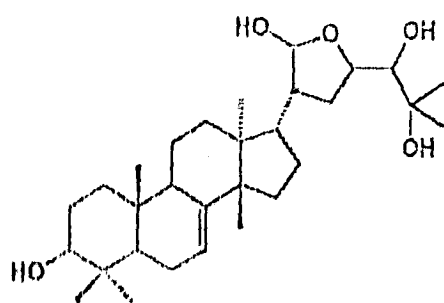
eufol apropiado tras sucesivas reacciones de oxidación y una gran variedad de rearreglos (Taylor *et al.*, 1984; Champagne *et al.*, 1992; Hasegawa y Herman, 1992).

El término limonoide deriva del nombre de la especie del limón (*Citrus limon*) y hoy en día se utiliza para designar de manera general a todos los compuestos relacionados con la limonina (9), primer compuesto tetranortriterpenoide natural aislado a partir de la corteza del limón (Bevan *et al.*, 1963). Cabe hacer mención que a los limonoides derivados de las meliáceas se les conoce también con el nombre de meliacinas (Connolly *et al.*, 1970; Torsell, 1983).

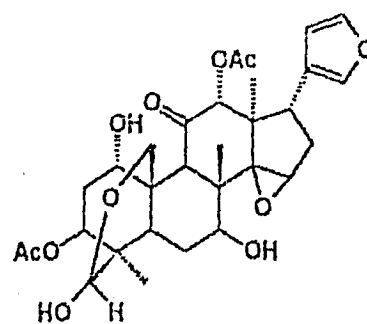
Los limonoides se han obtenido principalmente de especies de varios géneros de las familias Meliaceae, Rutaceae y Cneoraceae, todas del orden de las rutales, siendo particularmente abundantes en la primera. En 1979 se descubrió la presencia de tetranortriterpenoides en *Harrisonia abyssinica*, una especie de la familia Simaroubaceae (Taylor *et al.*, 1984). Es importante mencionar que estos compuestos generalmente se acumulan en todos los tejidos (semilla, hoja, corteza y madera) de las plantas que los biosintetizan (Champagne *et al.*, 1992).

Desde el punto de vista biogénético los limonoides se clasifican en 10 grupos principales, mismos que se indican en el Cuadro 1. En la Figura 2 se ilustran ejemplos representativos de cada grupo.

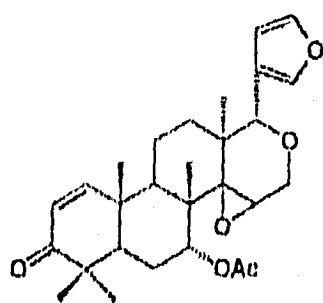
Para la elucidación estructural de los limonoides se han utilizado principalmente métodos espectroscópicos, espectrométricos y químicos. Los métodos químicos consisten fundamentalmente en degradaciones y correlaciones químicas. Recientemente los métodos espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos han



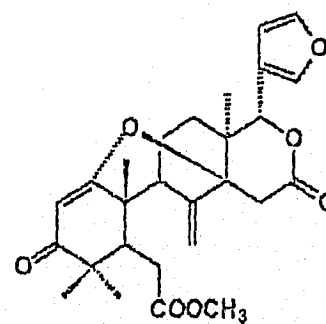
Meliantriol (1)



Toosendanina (2)

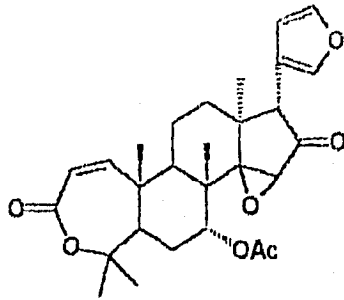


Gedunina (3)

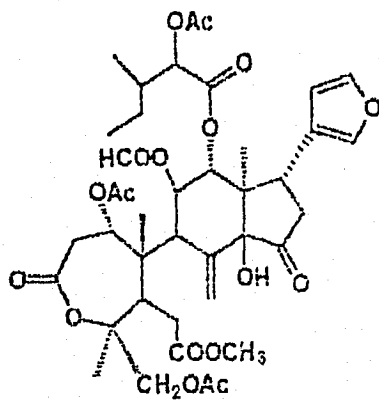


Metil angolensato (4)

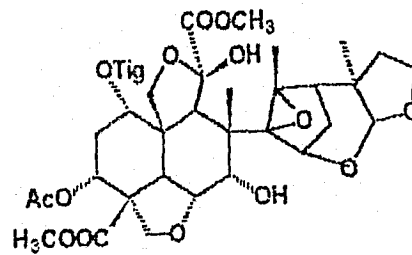
Figura 2. Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides



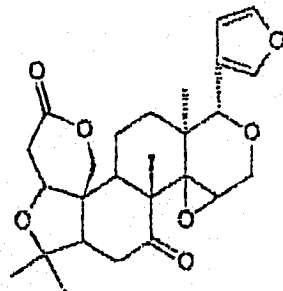
Evodulona (6)



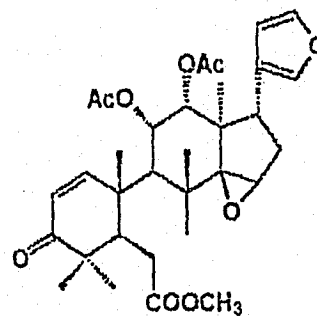
Prieurianina (7)



Azadiractina (8)



Limonina (9)



Toonacilina (10)

Figura 2. Ejemplos representativos de los diferentes grupos de limonoides

demostrado ser la mejor herramienta para la caracterización de estos compuestos. De manera particular, la resonancia magnética nuclear de alta resolución (RMN) es la técnica más utilizada (Taylor *et al.*, 1984; Cremlyn, 1991; Olugbade, 1991; Lins *et al.*, 1992; Segura-Correa *et al.*, 1993 y 1994. *Inter alia*). Resulta importante destacar que también se han descrito varios estudios de cristalografía de Rayos X (Ferguson *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1992; Soriano-García *et al.*, 1996).

**Cuadro 1.** Clasificación biogénica de los limonoides

LIMONOIDE	TIPO	EJEMPLO*
Grupo 1	Protolimonoides	Meliantriol (1)
Grupo 2	Limonoides con esqueleto apo-eufol intacto	Toosendanina (2)
Grupo 3	Limonoides con anillo D-seco	Gedunina (3)
Grupo 4	Limonoides con anillo B,D-seco	Metil angolensato (4)
Grupo 5	Limonoides con anillo B,D-seco	Mexicanolido (5)
Grupo 6	Limonoides con anillo A-seco	Evodulona (6)
Grupo 7	Limonoides con anillo A,B-seco	Prieurianina (7)
Grupo 8	Limonoides con anillo C-seco	Azadiractina (8)
Grupo 9	Limonoides con anillo A,D-seco	Limonina (9)
Grupo 10	Limonoides con anillo B-seco	Toonacilina (10)

\* Las estructuras se indican en la Figura 2.

Desde el punto de vista biológico los limonoides han demostrado poseer una gran variedad de propiedades, mismas que podrían ser de utilidad para el desarrollo de



nuevos agentes pesticidas y terapéuticos (Das *et al.*, 1973; Taylor *et al.*, 1984; Jowani *et al.*, 1981; Klocke, 1989; Champagne *et al.*, 1992. *Inter alia*). Entre las propiedades medicinales más importantes demostradas por estos terpenoides destacan las siguientes: antiprotozoaria (Bray, 1990; Rochanakij *et al.*, 1985), antimicrobiana (Rojanapo 1985; Khan *et al.*, 1974), citotóxica (Jolad *et al.*, 1981; Polonsky *et al.*, 1978 y 1979; Pettit *et al.*, 1982 y 1983), diurética (Duke y Wayne, 1981), antifúngica (Jacobson *et al.*, 1971), antihelmíntica (Oelrichs *et al.*, 1983; Watt *et al.*, 1962) y antiulcérica (Duke y Wayne, 1981; Khalid *et al.*, 1986). Pero quizás la actividad biológica más importante de estos compuestos es la insecticida (Lavie *et al.*, 1967; Dalziel *et al.*, 1984; Miller *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 1990; Bentle *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1992; Arnason *et al.*, 1992 y 1993; Jain y Tripathi, 1993; Kubo *et al.*, 1991 y 1993; Thompson, 1995). De acuerdo a una revisión reciente muchos de estos compuestos ejercen una actividad fago-inhibidora y reguladora del crecimiento sobre una gran variedad de insectos (Champagne *et al.*, 1992; Schmutterer *et al.*, 1995; Thompson, 1995). Esta notable actividad insecticida ha permitido el desarrollo comercial de dos limonoides: La azadiractina (8) y la toosendandina (2) obtenidos a partir de *Azadirachta indica* y *Melia toosendan*, respectivamente. La azadiractina y compuestos relacionados ejercen su efecto insecticida modificando la motilidad de los insectos (Rembold *et al.*, 1989). En el caso de la toosendandina el mecanismo de acción está relacionado con el del compuesto (8), sin embargo aún no se encuentra bien caracterizado.

Por último cabe mencionar que recientemente se demostró que dos limonoides del grupo 5, las humilínolidas A y C, aislados de la especie medicinal *Swietenia humilis*

poseen propiedades reguladoras del crecimiento vegetal (Segura Correa *et al.*, 1993). Ambos compuestos inhibieron de manera selectiva y significativa el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*.

## 1.2 Antecedentes fitoquímicos y biológicos acerca del género *Guarea* (Meliaceae)

El género *Guarea* incluye 40 especies, principalmente distribuidas en América, donde se localiza desde Veracruz, México hasta el centro y oeste del Amazonas en Sud América. En la Figura 3 se indica la distribución del género en México, Centro y Sud América.

Desde el punto de vista fitoquímico, varias especies del género han sido investigadas. La mayoría de los trabajos publicados a la fecha describen el aislamiento y caracterización de limonoides, principalmente de los grupos 3 y 7, y protolimonoides como los principales metabolitos secundarios presentes en las diferentes especies. También, se ha descrito la presencia de varios esteroides, cicloartanos y bisabolenos (Housley *et al.*, 1962; Bevan *et al.*, 1963 y 1967; Ferguson, 1973 y 1975; Akinniyi *et al.*, 1980; Mulholland, 1988; Hasegawa *et al.*, 1989; Furlan *et al.*, 1993). En la Tabla 1 se indican los limonoides y protolimonoides aislados a la fecha de las distintas especies del género estudiadas desde el punto de vista químico.



**Figura 3. Distribución en México de la *Guarea grandifolia* A. P. de Candolle**

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Guarea*.

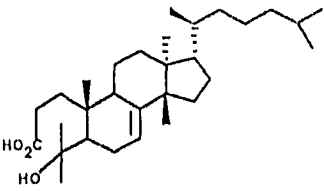
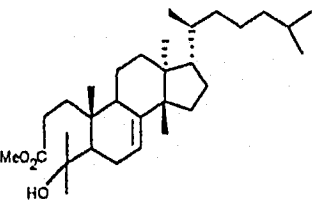
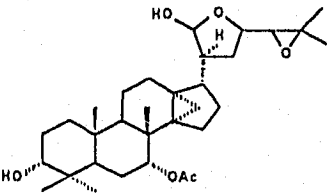
PROTOLIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
Grupo 1		
<i>G. cedrata</i>	<p style="text-align: center;">Anillo A intacto</p>  <p style="text-align: center;">Acido entrandólido-5-isopropenil-3,21-decarboxílico <math>\Delta^{24,25}</math>, 20<math>\epsilon</math> H (11)</p>	Taylor <i>et al.</i> , 1984
	 <p style="text-align: center;">Entandrólido 3-monometil ester (12)</p>	Akinniyi <i>et al.</i> , 1980
<i>G. glabra</i>	 <p style="text-align: center;">Glabretal 3<math>\alpha</math>-OH, 7<math>\alpha</math>-OAc, 24R, 25-epóxi-14<math>\alpha</math>, 18-ciclo, 20<math>\alpha</math> H (13)                      Glabretal 3-(2'-hidroxivaleril), 3<math>\alpha</math>-angelil, 3<math>\alpha</math>-tiglil, 3<math>\alpha</math>-metacril (14) y 3-oxo (15)</p>	Ferguson <i>et al.</i> , 1975

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Guarea* (continuación).

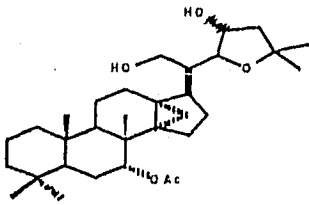
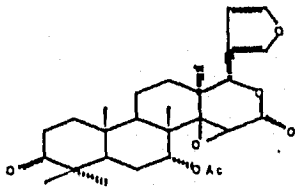
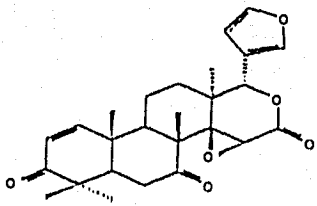
LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
Grupo 1		
<i>G. glabra</i>	 <p>3-oxo,7<math>\alpha</math>-OAc,21,23<math>\epsilon</math>-hidróxi,14<math>\alpha</math>,18 ciclo glabretal (16)</p>	Ferguson et al., 1984
LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
Grupo 3		
<i>G. thompsonii</i>	 <p>1,2-dihidrogedunina (17)</p>	Housely et al., 1962 Bevan et al., 1963
<i>G. guidona</i>	 <p>7-deacetoxy-7-oxogedunina (30)</p>	Lokacova et al., 1975

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Guarea* (continuación).

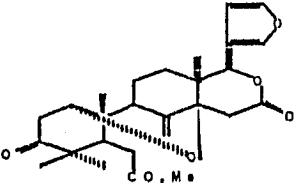
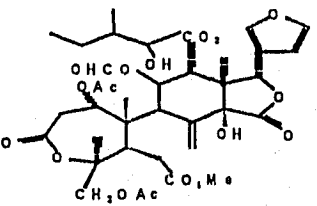
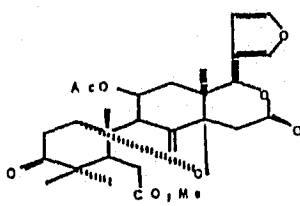
LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
Grupo 4		
<i>G.thompsonii</i>	 <p style="text-align: center;">Metil angolensato (4)</p>	Housely <i>et al.</i> , 1962
	 <p style="text-align: center;">Metil 6,12<math>\alpha</math>-diacetoxiangolensato (18)</p>	Connolly <i>et al.</i> , 1976
Grupo 7		
<i>G. guidona</i>	 <p style="text-align: center;">Prieurianina (7)</p>	Lukacova <i>et al.</i> , 1975

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Guarea* (continuación).

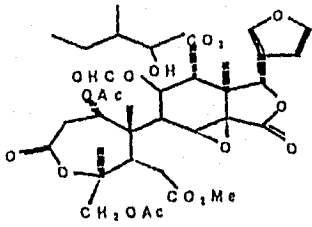
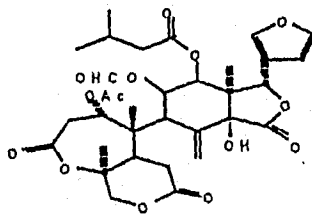
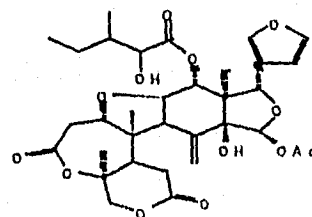
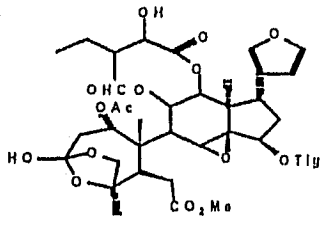
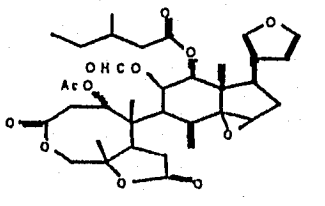
LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
	Grupo 7	
<i>G. guidona</i>	 <p>14β-15β-epoxiprieurianina (19)</p>	Lukacova <i>et al.</i> , 1975
<i>G. cedrata</i>	 <p>12-(2'-OH-3-metil valeril oxil) rohitukina</p>	Akinniyi <i>et al.</i> , 1980
<i>G. thompsonii</i> <i>G. kunthiana</i>	Rohituka 7,29 lactona (21)	Connolly <i>et al.</i> , 1975
<i>G. thompsonii</i>	 <p>12-formil oxil-14β,15β-oxido de rohituka</p>	Taylor <i>et al.</i> , 1984

Tabla 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Guarea* (continuación).

LIMONOIDES		
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
	<b>Grupo 1</b>	
<i>G.thompsonii</i>	 <p style="text-align: center;">14,β-15β-epoxihispidina A (24)</p>	Taylor <i>et al.</i> , 1984
<i>G.thompsonii</i> <i>G.kunthiana</i>	 <p style="text-align: center;">12-(2'-deacetil)dregeanina (25)</p>	Connolly <i>et al.</i> , 1976



Algunos de los limonoides aislados de este género son de gran interés por sus propiedades biológicas, principalmente por su actividad insecticida. Así el metil angolensato (4) inhibe la ingesta de alimento de la especie *Pectinophora gossypiella* (Lepidopterae a  $EC_{50} = 15$  ppm); por su parte la priedurianina (7) inhibe el crecimiento de *Heliothis zea* a una concentración de 6  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, la rohitukina no demostró efecto alguno contra *Heliothis zea* a 19  $\mu\text{g/ml}$  (Lidet et al., 1985; Kubo y Klocke, 1986).

Publicaciones recientes describen el efecto insecticida de algunos extractos derivados de distintas especies de este género, mismos que inhiben significativamente el crecimiento de larvas del gusano barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralidae). Las especies estudiadas incluyen la *G. glabra*, *G. pterorachis* y *G. pyriformis* y los resultados obtenidos indicaron que los extractos derivados de las hojas y de la corteza no presentaron actividad. Sin embargo, los distintos extractos orgánicos preparados a partir de la madera de *G. pyriformis* inhibieron el crecimiento de las larvas de manera significativa (Arnason et al., 1992; Kubo, 1991 y 1993; Thompson, 1995).

En estudios conducentes a determinar la potencialidad antiprotozoario de extractos y productos derivados de meliáceas africanas y mexicanas se demostró que los extractos de *G. rhopalocarpa* y *G. grandifolia* inhibían el desarrollo de *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani* (Thaithong et al., 1983).

De acuerdo a estudios de tipo histopatológico la fruta de *G. trichilioides* es un poderoso irritante tóxico (Saad y Linardi, 1970; Andrade, 1976). Así mismo, los

extractos de la *G. guidona* demostraron una marcada actividad depresiva sobre el SNC (Lins *et al.*, 1992).

En diversas partes del mundo, los árboles del género *Guarea* son apreciados por la importancia comercial de sus finas maderas, mismas que se utilizan para la elaboración de muebles y otros insumos. Así en Africa se emplea la madera de *G. cedrata* y *G. Thompsonii*, y en la América tropical las de *G. gomma*, *G. glabra* y *G. cartaquenya* (Housley, 1962; Bevan *et al.*, 1963).

Por último, las flores frescas de *G. spiciflora* Juss produce un aceite esencial en un rendimiento de 0.03 a 0.05%, el cual se utiliza como un adulterante del aceite de sándalo (Bevan *et al.*, 1967).

### 1.3 Generalidades acerca de *Guarea grandifolia* A.P. de Candolle

*Guarea grandifolia* A.P. de Candolle Figura 4 es conocida popularmente con los nombres de "Chichón de montaña" (Tabasco, Méx.), "Trompillo" (Chiapas, Méx.), "Javin", "Sabino", "Aycoy" y "Azote" (Veracruz, Méx.).

Su distribución en México comprende los estados de Veracruz, Tabasco y Chiapas. La especie es un árbol de tierras bajas y crece hasta 50 m de altura; algunos de sus rasgos anatómicos más sobresalientes son las ramas y masivos con grandes espirales terminales de hojas enormes; la corteza en arboles grandes es café pálido en platos irregulares; las flores tienen un cáliz rojizo con una corola blanca o coloreada

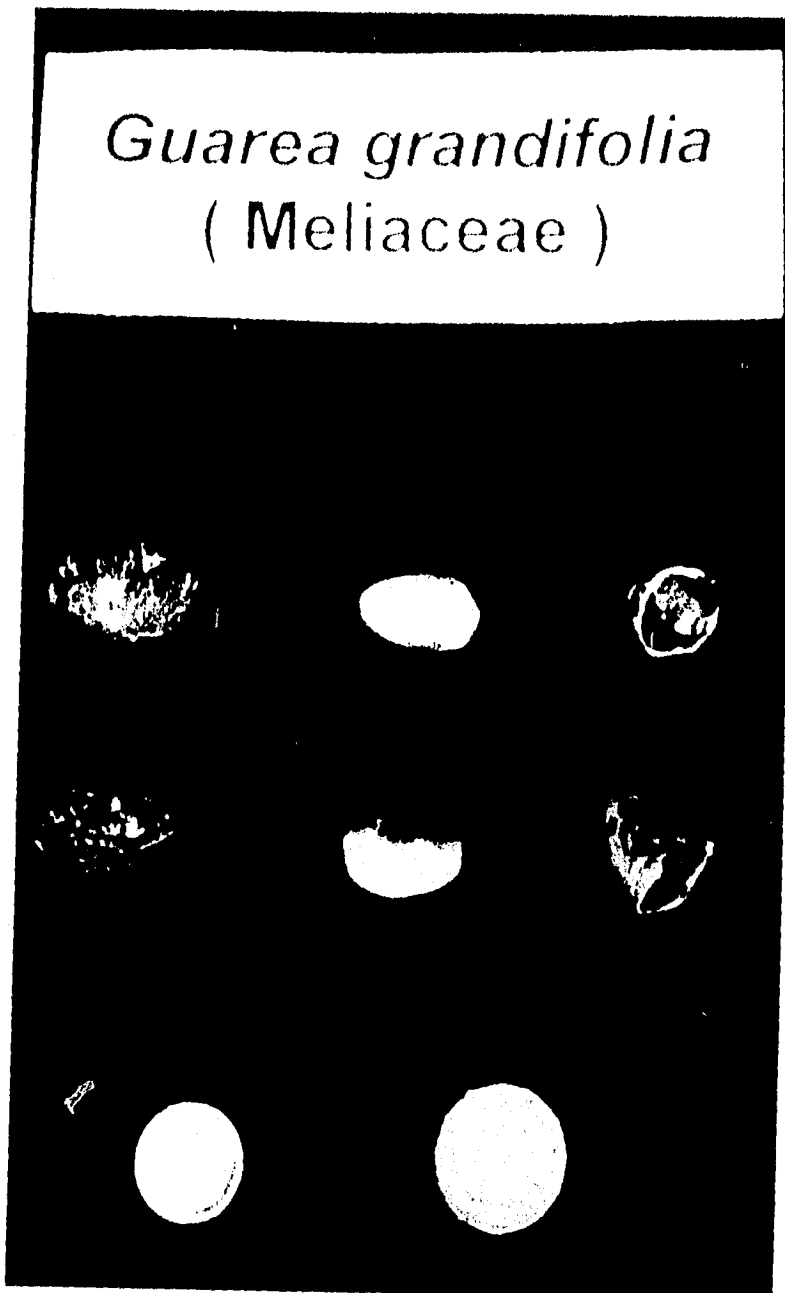


Figura 4. Semillas de *Guarea grandifolia* A. P. de Candolle.

crema. El fruto maduro es muy rojizo, las semillas son de un naranja brillante con un gran hilum adaxial blanco y tiene péndulos sobre el folículo. (Pennington, 1984)

La *G. grandifolia* se emplea en la medicina tradicional de México para el tratamiento de la gonorrea (Ogunlana, 1975). En Sud América se le atribuyen propiedades febrifugas (Morton *et al.*, 1981). De manera adicional, este árbol es apreciado por su fina madera la cual se utiliza para la fabricación de casas, muebles y otros enseres.

Desde el punto de vista fitoquímico esta especie no ha sido objeto de estudios previos. Sin embargo, en estudios relacionados con la determinación de la actividad antipalúdica *in-vivo* e *in-vitro* de algunos extractos y compuestos derivados de plantas de la familia Meliaceae, se demostró que el extracto metanólico de *G. grandifolia* inhibía la incorporación de hipoxantina marcada con tritio en parásitos de una especie resistente de *Plasmodium falciparum* (Desjardins *et al.*, 1979; Bray *et al.*, 1990).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Con la finalidad de combatir las pérdidas ocasionadas por las plagas en cultivos de interés económico, se han desarrollado numerosos agentes pesticidas, principalmente de origen sintético (Einhelling, 1985; Putnam, 1986; Worsham, 1989; Cremlyn, 1991).

Si bien es cierto que la mayoría de los pesticidas actuales, son altamente eficaces para combatir las diferentes plagas también lo es el hecho de que los mismos producen daños irreversibles al ecosistema al inducir la contaminación del suelo, el aire y el agua. De manera adicional, muchos de estos plaguicidas son neurotóxicos para los organismos vivos (Nava, 1987; Cremlyn, 1991; Arnason *et al.*, 1993; Agrios, 1995). En el caso de los insecticidas, el mecanismo de acción neurotóxico ha generado un rápido desarrollo de resistencia cruzada en poblaciones de insectos (Balandrin *et al.*, 1985; Klocke *et al.*, 1989). Por último, cabe destacar que el empleo de estos productos sintéticos resulta altamente costoso. Así por ejemplo, en los Estados Unidos se gastan aproximadamente un billón de libras de pesticidas para erradicar las plagas y/o enfermedades de cultivos, a un costo aproximado de 3.6 billones de dolares. En el caso de México, el empleo indiscriminado de plaguicidas, esta más generalizado y en consecuencia se generan mayores problemas de costos y contaminación (Pimentel, 1981; Anaya, *et al.*, 1989).

Considerando los problemas antes mencionados, la necesidad de desarrollar nuevos pesticidas de origen natural, menos tóxicos y biodegradables, es indudable (Yamamoto, 1970; Waller, 1987; Harborne, 1988; Selitrennikoff, 1992; Kubo, 1993). En ese contexto y considerando que las plantas han desarrollado mecanismos de defensa, incluyendo la biosíntesis de metabolitos secundarios, para combatir el ataque de insectos y otras plagas, el reino vegetal ofrece numerosas perspectivas para el hallazgo de nuevos agentes pesticidas (Chou, 1989; Banerji, 1990). En la literatura contemporánea de los productos naturales bioactivos se han descrito numerosos ejemplos de compuestos vegetales que han representado un papel importante en el desarrollo de agentes insecticidas y herbicidas comerciales. Así, el camfecol y uno de los derivados semisintéticos el cimetilino representan dos ejemplos recientes de herbicidas desarrollados por la compañía Du Pont a partir de los productos naturales camfenol y cineol, respectivamente (Duke, 1991; Thompson, 1995). En lo que se refiere a los **insecticidas verdes**, destacan las piretrinas naturales obtenidas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae); la rotenona y rotenoides relacionados que se obtienen de varias especies de leguminosas entre ellas *Lonchocarpus spp.*, *Tephrosia spp.* y otras; la nicotina que se obtiene de varias especies del género *Nicotiana* (Solanaceae) (Cremlyn, 1991); la toosendandina insecticida empleado comercialmente en China derivado de *Melia toosendan* (Meliaceae) (Kraus *et al.*, 1980); y el limonoide azadiractina obtenido de *Melia azadirach* y *Azadiracta indica*. A la fecha la azadiractina es el limonoide

insecticida más potente (Gill y Lewis, 1971; Warthen, 1979; Rembold, 1989; Kubo, 1991). Haciendo referencia particular a las meliáceas recientemente se ha incrementado el interés por la búsqueda de limonoides insecticidas a partir de estas especies, debido a que estos compuestos son inocuos para el hombre y otros vertebrados, así mismo presentan mecanismos de acción no neurotóxicos entre los que se puede mencionar las actividades fago inhibidora y reguladora del crecimiento de insectos. Además, esta clase de insecticidas vegetales presentan una mayor especificidad en su acción biológica, son biodegradables y, en consecuencia, la probabilidad de desarrollar resistencia cruzada es relativamente nula debido a su rápida degradación en los ecosistemas naturales (Bray *et al.*, 1990; Vannucci, 1992).

A pesar del éxito comercial obtenido con la azadiractina y la toosendandina actualmente no se ha desarrollado ningún **insecticida verde** a partir de meliáceas americanas. En años recientes algunos grupos de investigación han realizado estudios sistemáticos conducentes a determinar la potencialidad insecticida de extractos y limonoides derivados de meliáceas del nuevo mundo, sin embargo, a la fecha no se han generado extractos o compuestos novedosos tan potentes como la azadiractina (Kubo y Nakanishi, 1977; Munakata, 1977; Jacobson *et al.*, 1978; Reed *et al.*, 1981; Rembold, 1989; Arnason *et al.*, 1991, 1993). En el caso específico de México que cuenta con una gran diversidad de especies de esta familia (Pennington, 1984) son escasos los estudios realizados con la finalidad de detectar pesticidas con posible interés comercial a partir de estos vegetales. En

consecuencia se inició un programa de investigación de carácter multidisciplinario con el objetivo primordial **de establecer la potencialidad insecticida y herbicida de extractos y limonoides derivados de meliáceas mexicanas con la finalidad de desarrollar nuevos agentes pesticidas verdes de utilidad comercial.** Una de las especies recientemente preseleccionadas dentro de este programa como una fuente potencial de principios bioactivos con propiedades pesticidas fue la *G. grandifolia*. En este contexto el presente trabajo tiene por objetivo principal aislar y caracterizar los principios fitotóxicos e insecticidas de las semillas y corteza de *G. grandifolia* con el propósito de descubrir nuevos productos naturales de utilidad para el desarrollo de **pesticidas verdes.** Con la finalidad de cumplir con este objetivo se plantearon las siguientes actividades:

- 1.- Recopilar la información bibliográfica acerca de los aspectos biológicos y fitoquímicos de la planta objeto de estudio.
- 2.- Preparar el o los extractos de las diferentes partes vegetales mediante un proceso de maceración.
- 3.- Determinar la potencialidad herbicida de los extractos mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radicular de dos especies de arvense *Amaranthus hypochondriacus* (Amararantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae).
- 4.- Determinar la potencialidad insecticida mediante la evaluación del efecto de los extractos sobre el desarrollo y crecimiento de larvas neonatas del gusano barrenador del maíz [*Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralidae)].



5.- Realizar el fraccionamiento de los extractos de la semilla y corteza mediante procesos cromatográficos. En el caso de los extractos fitotóxicos el fraccionamiento se realizará de manera biodirigida.

6.- Separar y purificar los constituyentes mayoritarios de las fracciones activas obtenidas durante el proceso de fraccionamiento de los distintos extractos.

7.- Caracterización los compuestos aislados mediante el empleo de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

8.- Determinar el efecto inhibitor de los compuestos puros aislados de la corteza y semilla de *G. grandifolia* sobre el desarrollo y crecimiento de larvas neonato del gusano barrenador del maíz [*Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralidae)].

9.- Determinar el efecto de los compuestos puros aislados de la corteza y semilla de *G. grandifolia* sobre el crecimiento radicular de dos especies de arvenses *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae) y *Echinochloa crusgalli* (Gramineae).

### **III. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **3.1 Material vegetal**

El material vegetal (corteza y semilla) utilizado en el presente estudio se recolectó en Agosto de 1994, en el Municipio de San Andrés, Tuxtla, estado de Veracruz, México, por el Biol. Gustavo Carmona. Un ejemplar de referencia se depositó en la colección etnobotánica del herbario del Instituto Nacional de Ecología (Xal), Jalapa (Voucher: R. Ortega No. 710). La identificación de la especie estuvo a cargo del Dr. R. Ortega.

El proceso de desecación del material vegetal (corteza y semilla) se llevó a cabo a temperatura ambiente. En el caso de la semilla, se separó manualmente la testa de la parte interna. Posteriormente el material vegetal desecado se fragmentó por separado empleando un molino de cuchillas, modelo Wiley No. 4

#### **3.2 Análisis cromatográficos**

A fin de monitorear el desarrollo de las cromatografías en columna abierta, realizar purificaciones a nivel preparativo, verificar el desarrollo de las reacciones químicas efectuadas y comprobar la pureza de los productos obtenidos se utilizaron las técnicas convencionales de cromatografía en capa fina (ccf),

utilizando en cada caso distintos sistemas de elución y diferentes agentes cromógenos. Los reactivos reveladores y los sistemas de elución empleados se resumen en los Cuadros 2 y 3, respectivamente.

**Cuadro 2.** Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

REACTIVO	AGENTES CROMOGENOS (composición)	REFERENCIA
Sulfato cérico* A	12 g de sulfato cérico 22.2 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc) 350 g de hielo	Lowery <i>et al.</i> , 1993
Acido sulfúrico al 10 %	90 ml de agua destilada 10 ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc)	Bevan <i>et al.</i> , 1965

\*En todos los casos antes de revelar con el crómogeno A, se procedió a visualizar las placas con luz UV (onda corta 254 nm y onda larga 365 nm); para el desarrollo del color fué necesario calentar por dos minutos a 110 °C aproximadamente.

Para la ccf de tipo analítico se emplearon cromatoplasmas de vidrio recubiertas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (20 x 20 cm, 0.25 mm de espesor) y cromatofolios de aluminio) recubiertos de gel de sílice gel 60 F<sub>254</sub> Merck (20 x 20 cm, 0.25 mm de espesor). En el caso de las cromatografías preparativas se emplearon cromatoplasmas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Merck (20 x 20 cm, 2 ó 1 mm de espesor).

**Cuadro 3.** Sistemas de eluyentes utilizados para los análisis cromatográficos en capa delgada.

SISTEMA DE ELUYENTES	COMPOSICION	PROPORCION	REFERENCIA
I	hex:CHCl <sub>3</sub>	Diversas	Bevan <i>et al.</i> , 1965
II	hex:AcOEt		
III	CHCl <sub>3</sub> :AcOEt		
IV	CHCl <sub>3</sub> :MeOH		
V	AcOEt:MeOH		
VI	Bz:AcOEt		
VII	AcOEt	100 %	Bevan <i>et al.</i> , 1965
VIII	CHCl <sub>3</sub>		
IX	hex		

Para efectuar las cromatografías en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60, Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 3.5 a 7.0 ASTM.

### 3.3 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599-B o en un aparato Nicolet FT-5X, en pastilla de KBr o en película.

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP 360. El registro de los espectros de IR y rotación óptica se realizó en el laboratorio de espectroscopía de la Facultad de Química de la UNAM. Por último, los espectros de UV, se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 202.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de Carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) se generaron en un aparato Varian VXR-3005, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz y 75.44 MHz, respectivamente. Los espectros se obtuvieron en  $\text{CDCl}_3$  ó  $\text{C}_6\text{D}_6$  y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades  $\delta$  (ppm) referidos al Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) y heteronuclear (HETCOR).

Los espectros de masas se obtuvieron en un aparato Hewlett-Packard 5985-B mediante introducción directa a 70 eV. En tanto que los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB), se registraron en un aparato Jeol DX300 con un sistema JMA-3500. Para el bombardeo de átomos se utilizó Xenón con 6 keV. Estos análisis se efectuaron en el Instituto de Química de la UNAM.

Los análisis de difracción de rayos X se determinaron en un difractómetro Siems P4/PC en el Laboratorio de Rayos X del Instituto de Química de la UNAM.

### 3.4 Pruebas biológicas

#### 3.4.1 Determinación de la actividad Inhibidora del crecimiento vegetal

La actividad inhibidora del crecimiento vegetal (potencial alelopático) se determinó mediante el empleo de los bioensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Anaya *et al.*, 1987; 1990). Para cuantificar la actividad fitotóxica se utilizó el método de caja Petri y para el monitoreo de esta actividad a nivel de las fracciones cromatográficas se utilizó un método bioautográfico (Inoue *et al.*, 1992).

##### a) Método de caja Petri

La actividad de los extractos y compuestos puros derivados de las semillas y corteza de *G. grandifolia*, se evaluó midiendo el efecto de los mismos sobre el crecimiento radicular de semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (Amarantaceae) y *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv (Gramineae).

Los bioensayos se realizaron en cajas petri de 10 cm de diámetro. De cada muestra de prueba (extrato o compuesto puro) se prepararon concentraciones de 1000, 750, 500, 250 50 y 5  $\mu\text{g/ml}$  de forma independiente y por separado, utilizando como disolvente  $\text{CHCl}_3$ . A continuación se transfirieron a cajas petri (conteniendo un disco de papel filtro Whatman No. 1), 2 ml de cada una de estas concentraciones y se dejó evaporar el disolvente mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se colocaron 20 semillas en cada caja conteniendo la muestra a evaluar, finalmente se inició la germinación de las especies vegetales, humedeciendo el papel filtro con 2 ml de agua destilada.

Se utilizó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como un control positivo. El mismo protocolo se utilizó para los controles negativos que contenían únicamente disolvente. Las cajas petri se mantuvieron en la oscuridad a 30 °C y la actividad alelopática se registro calculando el porcentaje de germinación y midiendo la longitud de las radículas después de 24 h para *A. hypochondriacus* y 48 h para *E. crusgalli*. Se trabajaron cuatro réplicas por tratamiento en las muestras de prueba y en los controles.

Los resultados obtenidos, se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA, ( $p < 0.05$ ) (Anaya, 1990).

#### **b) Método bioautográfico**

El método bioautográfico se realizó sobre placas cromatográficas de 20 x 5 cm recubiertas con gel de sílice (60 F254 Merck). En cada placa se sembró 5 a 10 mg del extracto, posteriormente se efectuó la elución utilizando un sistema de elución apropiado. Al cabo del proceso de elución se evaporó el disolvente y las cromatoplasas se recubrieron con 20 ml de una suspensión de agar al 1%. Se realizaron dos réplicas en todos los casos. Paralelamente dos placas sin muestra

problema se eluyeron con el sistema de elución correspondiente. Estas se utilizaron como control negativo.

Posteriormente, cada una de las placas cromatográficas se cubrieron completamente con las semillas de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. Las placas con las semillas fueron incubadas a temperatura y humedad controlada (30 °C) durante 24 h para *A. hypochondriacus* y 48 h para *E. crusgalli*. Transcurrido el tiempo de incubación se observó la inhibición y se midió el  $R_f$  correspondiente a la zona de inhibición (Inoue *et al.*, 1992). Este último procedimiento se realizó por comparación con una placa conteniendo la muestra, eluida en las mismas condiciones y revelada con el agente cromógeno apropiado.

### **3.4.2 Determinación de la actividad insecticida**

La determinación de la actividad insecticida de los extractos y algunos de los compuestos puros se determinó mediante la evaluación de los efectos inducidos por estos productos a diferentes concentraciones sobre el crecimiento y desarrollo de las larvas del gusano barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera:pyralidae). Las evaluaciones se realizaron, de acuerdo a los protocolos previamente establecidos (Arnason *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1992), en el laboratorio del Dr. J. T. Arnason del Departamento de Biología de la Universidad de Ottawa, Canada.



### **3.5. Preparación de los extractos orgánicos a partir de las diferentes partes vegetales de *Guarea grandifolia***

#### **3.5.1 Extracto derivado de la testa de las semillas (*Extracto A*)**

El material vegetal seco y molido (637 g) se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración exhaustivo con  $\text{CHCl}_3$ /hex 1:1 (Volumen total 9 L). El proceso se repitió tres veces, con intervalos de 8 días entre cada extracción. El extracto resultante se concentró a presión reducida obteniéndose un residuo resinoso amarillo-rojizo (72.72 g).

#### **3.5.2 Extracto derivado de la corteza (*Extracto B*)**

El material vegetal seco y molido (1600 g) se extrajo inicialmente mediante un proceso de maceración exhaustivo con  $\text{CHCl}_3$ /MeOH 1:1 (Volumen total 21 L). El proceso se repitió tres veces, con intervalos de 8 días entre cada extracción. El extracto resultante se concentró a presión reducida obteniéndose un residuo resinoso café-verdoso (125.66 g). El extracto obtenido se sometió a los mismos ensayos indicados en el inciso 3.4.1.

### **3.6 Fraccionamiento de los extractos orgánicos derivados de la semilla y corteza de *G. grandifolia***

#### **3.6.1. Fraccionamiento de la testa de las semillas (extracto A)**

El extracto A (69 g) se fraccionó vía una cromatografía de adsorción en columna de vidrio, empacada con gel de sílice, bajo condiciones normales de gravedad. El proceso de elución se efectuó con hex, mezclas de hex/CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>, mezclas de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt, AcOEt, diversas proporciones de AcOEt/MeOH y MeOH, obteniéndose 122 fracciones de 250 ml cada una. Se realizó el control por cromatografía en capa fina de cada fracción, uniéndose aquellas cromatográficamente similares; este proceso permitió la obtención de IX fracciones primarias. El Cuadro 4 resume el número de eluatos, eluyentes y fracciones combinadas.

#### **3.6.2. Fraccionamiento de la corteza (extracto B)**

El extracto B (110 g) se fraccionó vía una cromatografía de adsorción en columna de vidrio, al vacío, empacada con 680g de gel de sílice 60. El proceso de elución se efectuó con hex, mezclas de hex/AcOEt, AcOEt, diversas proporciones de AcOEt/MeOH y MeOH. Se colectaron un total de 170 fracciones de 250 ml

cada una. El análisis por cromatografía en capa fina permitió la combinación de de varias fracciones para finalmente obtener X fracciones primarias. El Cuadro 5 resume el número de eluatos, eluyentes y fracciones combinadas.

**Cuadro 4.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto A de *G. grandifolia*.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
hex	100	1-6	1-29	S-I	3.09
hex-CHCl <sub>3</sub>	90:10	7-13	30-40	S-II	0.91
	80:20	14-19	41-49	S-III	7.15
	70:30	20-22	50-68	S-IV*	2.02
	60:40	23-28	69-70	S-V*	4.80
	50:50	29-34	71-73	S-VI*	3.93
	40:60	35-40	74-82	S-VII*	3.43
	30:70	41-45	83-110	S-VIII*	5.15
	20:80	46-49	111-122	S-IX	16.20
CHCl <sub>3</sub>	100	50-52			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	100	53-58			
	90:10	59-64			
	80:20	65-70			
	70:30	71-75			
	60:40	76-80			
	50:50	81-85			
	40:60	86-98			
	30:70	99-103			
20:80	104-108				
10:90	109-112				
AcOEt	100	113-115			
AcOEt:MeOH	50:50	116-119			
MeOH	100	120-122			

\* Fracciones fitotóxicas de acuerdo al ensayo bioautográfico

**Cuadro 5.** Resumen del fraccionamiento preliminar vía cromatografía en columna del extracto B de *Guarea grandifolia*.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
hex	100	1-4	1-20	C-I	1.73
hex-AcOEt	95:5	15-20	21-26	C-II	6.11
	90:10	21-24	27-42	C-III*	12.98
	80:20	25-34	43-51	C-IV*	0.25
	70:30	35-44	52-61	C-V*	1.44
	60:40	45-52	62-106	C-VI*	11.92
	50:50	53-58	107-157	C-VII	11.26
	40:60	59-92	158-163	C-VIII	12.83
	30:70	93-128	164-167	C-IX	6.99
	20:80	129-137	168-170	C-X	4.89
AcOEt	100	138-149			
AcOEt:MeOH	95:5	150-156			
	85:15	157-161			
MeOH	100	162-170			

\* Fracciones fitotóxicas de acuerdo al ensayo bioautográfico

### 3.7. Aislamiento y purificación de los productos de las fracciones primarias

#### 3.7.1 Aislamiento de la 21 $\alpha$ -acetoxi melianona (26) de la fracción activa S-II

Sucesivas cromatografías preparativas en capa fina de gel de sílice de la fracción activa S-II (0.91 g) de la columna primaria (Cuadro 4), permitieron el aislamiento de 39 mg del compuesto caracterizado como 21 $\alpha$ -acetoximellanona (26), bajo la forma de un aceite viscoso ligeramente amarillo. El sistema de elución empleado para el análisis cromatográfico fué una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 95:5.

### **3.7.2 Aislamiento y purificación de la melianona (27) de la fracción activa S-VII**

De la fracción primaria S-VII (Cuadro 4) cristalizaron espontáneamente 1.8 g de un sólido cristalino el cual se purificó tras sucesivas cromatografías preparativas en capa fina de gel de sílice, de donde se aislaron 1.53 g del producto caracterizado como melianona (27), bajo la forma de un compuesto cristalino-amorfo de color blanco con un p.f. de 232-233 °C. El sistema de elución empleado para el análisis cromatográfico fué una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt 9:1.

### **3.7.3 Aislamiento y purificación del melianodiol (28) de la fracción activa S-VIII**

De la fracción primaria S-VIII (Cuadro 4) cristalizaron espontáneamente 2.38 g de un sólido cristalino de color blanco, el cual se purificó tras sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice. Este proceso cromatográfico permitió el aislamiento de 1.21 g del compuesto caracterizado como melianodiol (28), bajo la forma de un compuesto cristalino-amorfo de color blanco con un p.f. de 219-22 °C. El sistema de elución empleado para el análisis cromatográfico fué una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/AcOEt.

### **3.7.4 Aislamiento y purificación de la gedunina (29) de la fracción**

#### **activa S-IV**

De la fracción primaria S-IV (2.02 g) (Cuadro 5) tras sucesivas cromatografías preparativas, en capa delgada de gel de sílice se aislaron 67 mg de gedunina (29), bajo la forma de un compuesto cristalino de color blanco con un p.f. de 217-218 °C. El sistema de elución empleado para el análisis cromatográfico fué una mezcla de benceno/AcOEt 3:1, eluyendo 3 veces (Bevan *et al.*, 1965).

### **3.7.5 Aislamiento y purificación de la y 7-oxo-deacetoxi-7-oxogedunina (30) y 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) de la fracción activa S-VI**

De la fracción primaria S-VI (Cuadro 4) cristalizaron espontáneamente 3.53 g de un sólido cristalino de color blanco, constituido por dos compuestos mayoritarios, los factores de retención de los compuestos en el sistema corresponden a valores de 0.60 y 0.66. La separación de los dos componentes se realizó mediante sucesivas cromatografías preparativas en capa fina de gel de sílice. Los compuestos aislados se obtuvieron como cristales con un p.f. de 262-265 y 270-273 °C, respectivamente y fueron caracterizados como 7-oxo-deacetoxi-7-oxogedunina (30) y 6 $\alpha$ -acetoxi gedunina (31). El sistema de elución empleado para la cromatografía preparativa estaba constituido por una mezcla de

benceno/AcOEt 3:1. El proceso de elución se realizó tres veces (Bevan *et al.*, 1965).

### **3.7.6 Aislamiento y purificación del $\beta$ -lupeol (32) y acetato de $\beta$ -lupeol (33) de la fracción primaria activa C-III**

La fracción primaria activa C-III (11 g) (Cuadro 5) se recromatografió en una columna abierta sobre 180 g de gel de sílice. El proceso de elución se inicio con hexano y posteriormente se continuo con mezclas de hex/ $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$  /AcOEt, en diversas proporciones AcOEt, mezclas de AcOEt/MeOH y finalmente con MeOH. Se obtuvieron 186 fracciones de 250 ml cada una, uniéndose aquellas cromatográficamente similares. El proceso se resume en el Cuadro 6. Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice de la fracción activa CIII-3 (0.257 g) utilizando como eluyente una mezcla de benceno/ $\text{CHCl}_3$  8:2, permitieron el aislamiento de 27 mg de acetato de  $\beta$ -lupeol (33) y 9.3 mg del  $\beta$ -lupeol (32). El primer compuesto se aisló como un polvo blanco y el segundo como un sólido cristalino amorfo. Ambos compuestos se caracterizaron por comparación con muestras auténticas (Rojas, 1996; Trejo y Rivero, 1996).

**Cuadro 6.** Resumen del fraccionamiento secundario vía cromatografía en columna de la fracción activa C-III de *G. grandifolia*.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE	PESO (g)
hex	100	1-11	1-55	CIII-1	0.050
hex-CHCl <sub>3</sub>	95:5	12-26	56-63	CIII-2*	0.302
	90:10	27-41	64-65	CIII-3*	0.257
	80:20	42-62	66-71	CIII-4*	1.806
	70:30	63-74	72-85	CIII-5	4.255
	60:40	75-81	86-103	CIII-6	0.434
	50:50	82-88	104-122	CIII-7	0.399
	40:60	89-95	123-165	CIII-8	0.198
	30:70	96-101	166-177	CIII-9	0.112
	20:80	102-108	178-186	CIII-10	0.719
	10-90	109-115			
CHCl <sub>3</sub>	100	116-122			
	95:5	123-129			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	90:10	130-136			
	80:20	137-143			
	70:30	144-152			
AcOEt	50:50	153-160			
	100	161-179			
AcOEt:MeOH	50:50	180-186			
MeOH	100				

\* Fracciones fitotóxicas de acuerdo al ensayo bioautográfico

### 3.7.7 Aislamiento del $\beta$ -D-glucositosterol (34) de la fracción inactiva primaria C-VII

De la fracción C-VII de la columna primaria (Cuadro 5) precipitó espontáneamente 153.2 mg de un sólido cristalino de color blanco, con un punto de fusión de 275-278 °C, identificado como el  $\beta$ -D-glucositosterol (34) por comparación con una muestra auténtica.



### 3.8 Obtención de los derivados

#### 3.8.1 Obtención de la 21-acetóximelianona a partir de la melianona (27)

La melianona (20 mg) se disolvió en 2 ml de piridina; posteriormente a la solución se agregaron 2 ml de anhídrido acético. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 hrs. Al término de este tiempo el producto acetilado se separó de la manera habitual (Schriner *et al.*, 1980), obteniéndose una mezcla de (18.4 mg) de varios compuestos; uno de ellos mayoritario. La separación del compuesto mayoritario se realizó por cromatografía preparativa en capa fina utilizando una mezcla de benceno/AcOEt 8:2. Este procedimiento condujo al aislamiento de 11 mg de un producto idéntico en todos sus aspectos a la 21 $\alpha$ -acetóxi melianona (26).

#### 3.8.2 Obtención del melianodiol a partir de la melianona (27)

El tratamiento de 25 mg de la melianona (27) con 0.25 ml de ácido perclórico en una solución de dioxano (2 ml), manteniendo la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 hrs, permitió la obtención de 18 mg de un compuesto con un p.f. de 230-232 °C, el cual fue idéntico en todos sus aspectos al melianodiol (28) natural aislado en el presente estudio. (Lavie *et al.*, 1967).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Evaluaciones biológicas preliminares que permitieron la selección de la especie *Guarea grandifolia* como fuente potencial de principios pesticidas.

La preselección de la especie *G. grandifolia* se realizó considerando que la familia de las meliacéas ha demostrado ser una fuente valiosa de principios pesticidas (Champagne *et al.*, 1992; Segura-Correa *et al.*, 1993). Posteriormente, durante la realización de ensayos biológicos preliminares conducentes a la determinación de la potencialidad insecticida e inhibidora del crecimiento vegetal de los extractos totales derivados de diferentes partes vegetales de la planta se comprobó que la testa de las semillas contiene principios activos capaces de modificar el desarrollo del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner) y el crecimiento radicular de la arvense *Amaranthus hypochondriacus*. Así mismo se determinó que la corteza contiene también principios insecticidas.

En la Tabla 2 se resume el efecto preliminar de los extractos de las semillas y corteza sobre las larvas (Fase II) de *Ostrinia nubilalis*. Como se puede apreciar en la tabla los dos extractos incorporados a la dieta artificial de las larvas afectaron el desarrollo de las mismas con respecto al control. La actividad del extracto de la semilla fué mayor ocasionando una inhibición del crecimiento relativo de 39 % con respecto al control.

**Tabla 2.** Efecto de los extractos de *Guarea grandifolia* sobre larvas de *Ostrinia nubilalis*.

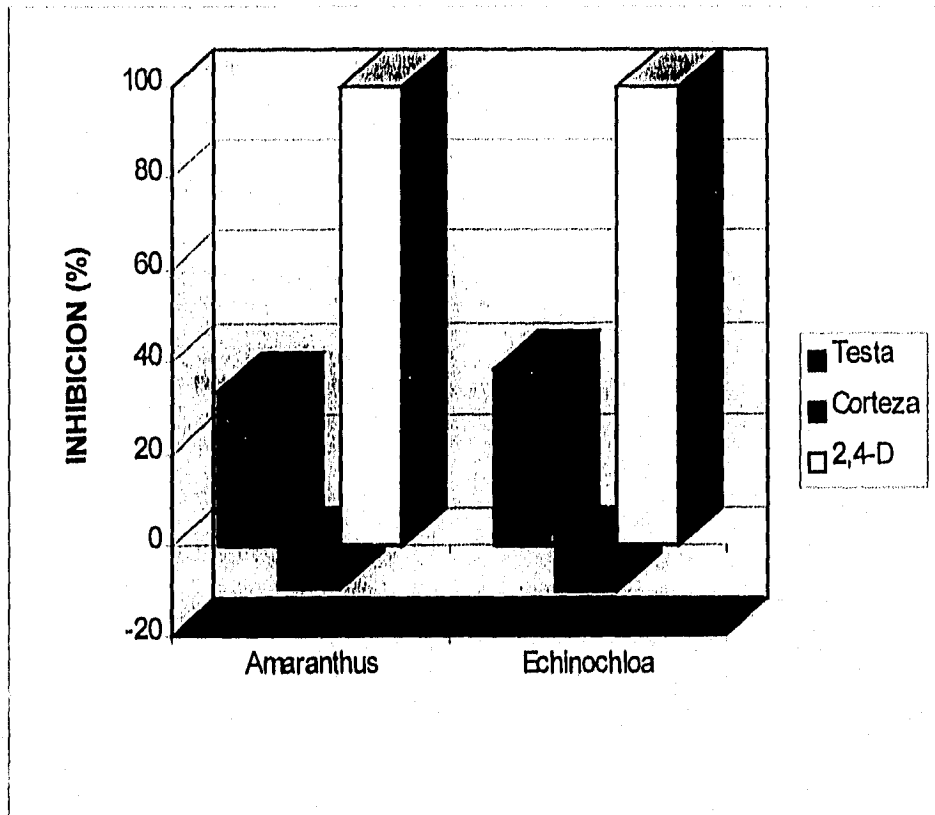
Extracto	Mortalidad (%)	Peso promedio de las larvas (mg)		Crecimiento (%)	Crecimiento relativo (%)
		Día 0	Día 4		
Corteza <sup>1</sup>	10	0,49	1,70	110	73
Testa de la semilla <sup>2</sup>	20	0,49	1,32	92	61
Control	0	0,51	3,64	150	100

<sup>1</sup>Extracto CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). <sup>2</sup>Extracto CHCl<sub>3</sub>-Hex (1:1). Los extractos se incorporaron, en la dieta artificial (100 µg/ml, 0,1 %). Se emplearon 20 larvas por cada tratamiento.

Los resultados de la determinación del efecto sobre el crecimiento radicular de los extractos de la semilla y la corteza se resumen en la Tabla 3 y en la Gráfica 1. De los mismos se infiere que el extracto de la testa inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de la arvense *A. hypochondriacus* con respecto al control. La especie *E. crusgalli* es más sensible al tratamiento y a la misma concentración el efecto inhibitorio es de 38,5 %. En el caso del extracto de la corteza se observa un efecto contrario al del extracto de la semilla, es decir los tratamientos ocasionan una leve estimulación del crecimiento radicular.

Con base en los resultados presentados se decidió llevar a cabo el estudio fitoquímico de las semillas y de la corteza de *G. grandifolia* con la finalidad de aislar los principios activos. La preparación del extracto en gran escala se realizó mediante un procedimiento de maceración tal como se indica en la sección experimental (inciso 3.4). Posteriormente, los extractos activos, se fraccionaron de manera preliminar mediante una cromatografía en columna abierta de gel de sílice. En el caso del extracto derivado de la testa de las semillas este proceso permitió la obtención de

**Grafica 1** Porcentajes de inhibición de los extractos de *Guarea grandifolia* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.



La concentración de prueba de cada una de las fracciones fué de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (100  $\mu\text{g/ml}$ ) como un control positivo. Los procedimientos del bioensayo se describen en la sección experimental 3.4.

**Tabla 3.** Efectos de los extractos obtenidos a partir de *Guarea grandifolia* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Crecimiento radicular (mm) <sup>a</sup>		Inhibición del crecimiento (%) <sup>b</sup>	
	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>
<b>Testa de las semillas (CHCl<sub>3</sub>-hex)</b>				
10	13.97 $\pm$ 0.90	23.17 $\pm$ 3.42	+22.32 <sup>c</sup>	+2.07 <sup>c</sup>
500	7.55 $\pm$ 0.62	13.95 $\pm$ 1.07	33.71 <sup>c</sup>	38.54 <sup>c</sup>
<b>Corteza (CHCl<sub>3</sub>-MeOH)</b>				
10	11.75 $\pm$ 2.42	30.12 $\pm$ 2.65	+3.06 <sup>c</sup>	+32.68 <sup>c</sup>
500	12.5 $\pm$ 0.66	24.95 $\pm$ 2.99	+9.45 <sup>c</sup>	+9.91 <sup>c</sup>
<b>Control<sup>d</sup></b>				
10	11.42 $\pm$ 1.37	22.7 $\pm$ 2.62	0.0	0.0
500	11.42 $\pm$ 1.37	22.7 $\pm$ 2.62	0.0	0.0
<b>Control Positivo<sup>e</sup></b>				
10	8.11 $\pm$ 0.39	16.73 $\pm$ 0.43	71.10	73.71
500	0.0	0.0	100.0	100.0

<sup>a</sup>Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas ( $\pm$ DE); 20 plántulas cada una. <sup>b</sup>Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo. <sup>c</sup>P < 0.05 (ANOVA). <sup>d</sup>Como control blanco se emplea agua destilada. <sup>e</sup>Como control positivo se emplea el 2,4-D.

nueve fracciones primarias SI-SIX; en el caso de la corteza se obtuvieron diez fracciones primaria CI-CX (Cuadros 4 y 5, respectivamente).

Todas las fracciones primarias derivadas de la semilla se ensayaron mediante un método bioautográfico para monitorear la actividad inhibidora del crecimiento vegetal (Inoue *et al.*, 1992; sección experimental 3.4), encontrándose que la actividad fitotóxica se concentra en las fracciones S-IV, S-V, S-VI, S-VII y S-VIII.

Las fracciones activas derivadas del extracto de la semilla fueron sometidas a diversos procedimientos cromatográficos como se indica en la sección experimental (inciso 3.7), lo cual permitió el aislamiento y la caracterización de seis metabolitos secundarios( 26, 27, 28, 29, 30 y 31). El protolimonoide 26 constituye un nuevo producto natural.

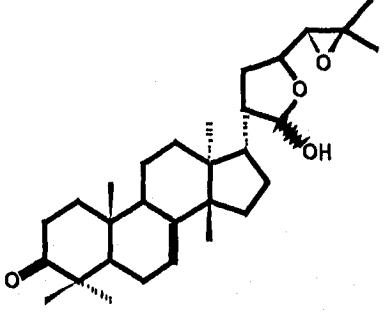
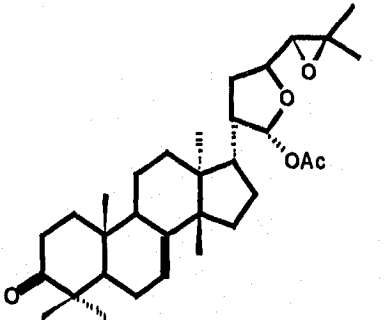
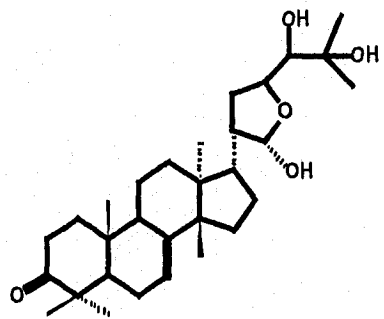
En el caso de la corteza el estudio se realizó de la manera convencional y para ello las fracciones primarias se sometieron de igual forma a diversos procedimientos cromatográficos con la finalidad de aislar los principios insecticidas potenciales. Como resultado de este proceso se aislaron también seis metabolitos secundarios.

En el Cuadro 6 se indican las estructuras de los compuestos aislados y sus rendimientos correspondientes

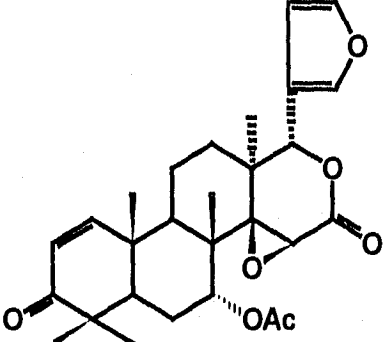
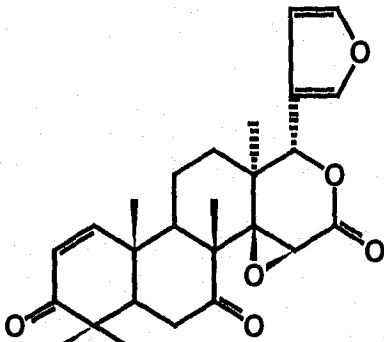
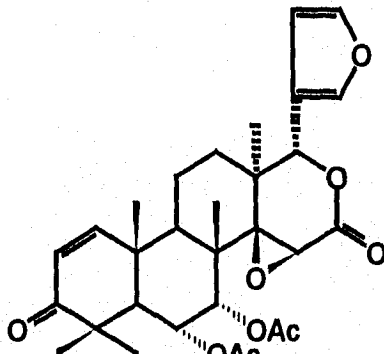
#### **4.2 Caracterización de los constituyentes activos**

En general los compuestos aislados se caracterizaron mediante la aplicación de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales, así como de métodos químicos. En el caso de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina

**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados de la especie *Guarea grandifolia*.

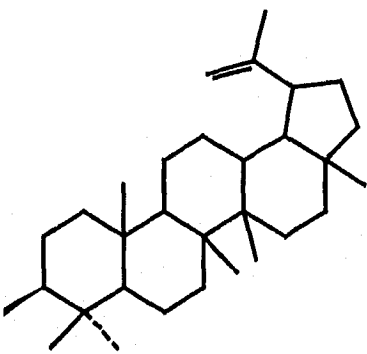
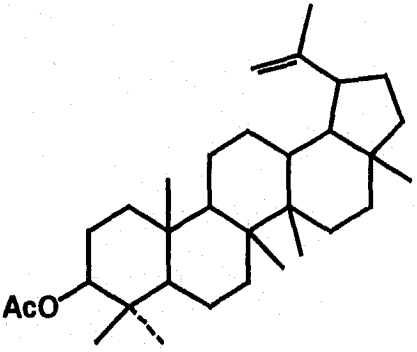
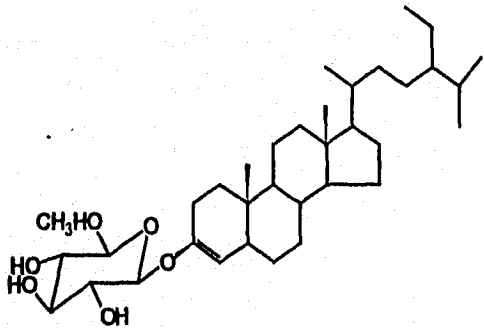
COMPUESTO	PARTE DE LA PLANTA	FRACCION	RENDIMIENTO (%)
 Melianona (27)	Testa de la semilla	S-VIII	0.0073
 21α-acetoximelianona (26)	Testa de la semilla	S-II	0.89
 Melianodiol (28)	Testa de la semilla	S-VIII	0.89

**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados de la especie *Guarea grandifolia*  
(continuación)

COMPUESTO	PARTE DE LA PLANTA	FRACCION	RENDIMIENTO (%)
 Gedunina (29)	Testa de la semilla  Corteza	S-IV  CIII-2	0.00058  0.0031
 7-deacetoxy-7-oxogedunina (30)	Testa de la semilla  Corteza	S-VI  CIII-4	0.053  0.0012
 6α-acetoxigedunina (31)	Testa de la semilla  Corteza	S-VI  CIII-4	0.23  0.0052



**Cuadro 7.** Metabolitos secundarios aislados de la especie *Guarea grandifolia*  
(continuación)

COMPUESTO	PARTE DE LA PLANTA	FRACCIÓN	RENDIMIENTO (%)
 $\beta$ -lupeol (32)	Corteza	C-III	0.00058
 Acetato de $\beta$ -lupeol (33)	Corteza	C-III	0.00468
 $\beta$ -D-glucositosterol (34)	Corteza	C-V	0.00656

(31) las estructuras se confirmaron inequívocamente mediante un análisis de difracción de rayos X.

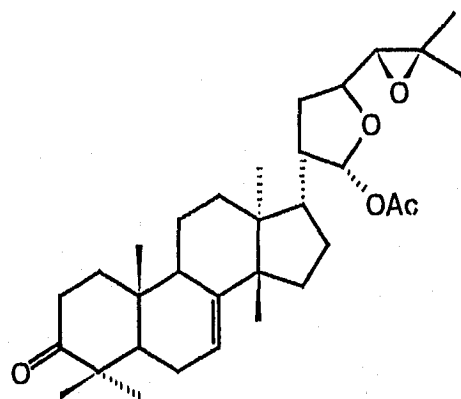
En la presente sección se describe el análisis de los parámetros espectrométricos y espectroscópicos obtenidos para cada uno de los compuestos, mismo que permitió proponer la estructura molecular de los metabolitos obtenidos. Se hace particular énfasis en la elucidación estructural del nuevo producto natural.

#### 4.2.1 Caracterización de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), melianona (27) y melianodiol (28).

La 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), se obtuvo de la fracción activa S-VII bajo la forma de un aceite viscoso ligeramente amarillo. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto natural se resumen en la Tabla 4. Su espectro de IR (Espectro 1) presenta absorciones asociadas con grupos hidroxilo ( $3292\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo ( $1718\text{ cm}^{-1}$ ) y vinílico ( $1624\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de masas generado por este compuesto presenta el ion molecular en una  $m/z$  de 512 uma (Espectro 2), correspondiente a la fórmula  $C_{32}H_{48}O_5$ , la cual permite 9 grados de insaturación. El espectro presenta también fragmentos importantes en  $m/z$  452 (M-60), 437 (M-60-15 pico base), 313 (M-199), 245, 123 y 71 uma.

La información proporcionada por la espectrometría de masas y el análisis detallado de los espectros de RMN (Tablas 6 y 5) del producto (26), permiten establecer

**Tabla 4.** Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la  
**21 $\alpha$ -acetoximellianona**



FM.	$C_{32}H_{48}O_5$
PM.	512
$[\alpha]_D$	-66° (MeOH)
IR $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$ (Espectro 1)	1718, 1624, 1550, 1462, 1264, 1158, 998, 820
EMIE m/z (int rel) (Espectro 2)	512 [ $M^+$ (26)], 497 (8), 453 (12.5), 452 (22.5), 438 (34), 437 (100), 381 (33), 366 (27), 365 (75), 297 (32), 271 (22), 257 (12), 245 (10), 185 (13), 166 (59), 123(25), 109 (58), 95 (45), 55(44), 43 (72)

Tabla 5. Datos de RMN  $^{13}\text{C}$  de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y sus derivados.

Carbon	Compuesto		
	21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)	Melianona (27)	Melianodiol (28)
C-1	38.01	38.4	35.07
C-2	36.5	36.0	24.34
C-3	216	215.2	216.94
C-4	170.01	47.8	38.52
C-5	52.37	52.6	52.4
C-6	23.7	24.6	23.23
C-7	118.46	118.03	118.5
C-8	145.33	146.5	145.64
C-9	50.90	48.6	48.92
C-10	34.90	35.2	34.89
C-11	17.89	18.0	17.64
C-12	34.18	32.2	31.45
C-13	46.01	44.0	43.47
C-14	52.2	51.3	52.42
C-15	34.84	34.7	34.18
C-16	27.22	27.8	27.45
C-17	47.86	45.7	45.32
C-18	21.02	21.5	21.54
C-19	12.8	12.7	12.72
C-20	31.7	31.69	45.2
C-21	96.91	97.78	96.93
C-22	31.6	31.6	30.09
C-23	79.84	77.05	78.69
C-24	66.88	65.39	75.61
C-25	57.14	57.32	26.71
C-26	19.7	19.6	22.56
C-27	22.1	24.9	21.54
C-28	21.5	25.1	21.5
C-29	23.52	27.7	23.0

Los desplazamientos químicos están dados en ppm. Las asignaciones se apoyaron por DETP y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

Tabla 6. Datos de RM- H<sup>1</sup> de la 21 $\alpha$ -acetoximellanona y sus derivados.

Proton	Compuesto		
	21 $\alpha$ -acetoximellanona (26)	Mellanona (27)	Mellanodiol (28)
H-2 $\alpha$	2.71 <i>ddd</i> (5.7, 14.79)	2.78 <i>ddd</i> (5.6, 14.8)	2.70
H-7	5.29 <i>dt</i> (2.20, 5.5)	5.3 <i>m</i>	5.23 <i>dt</i> (1.5)
H-21	6.17 <i>d</i> (3.6)	5.3 <i>m</i>	5.35 <i>m</i>
H-23	3.85 <i>dt</i> (7.2, 9.9)	3.85 <i>m</i>	4.5 <i>m</i>
H-24	2.67 <i>d</i> (7.5)	2.7 <i>d</i> (7.7)	2.2 <i>d</i> (2)
CH <sub>2</sub> -18	0.831 <i>s</i>	0.83 <i>s</i>	0.84 <i>s</i>
CH <sub>2</sub> -19	1.21 <i>s</i>	1.2 <i>s</i>	1.0 <i>s</i>
CH <sub>2</sub> -26/27	1.25 <i>d</i>	1.24 <i>d</i>	1.26 <i>d</i>
CH <sub>2</sub> -28	1.0 <i>s</i>	1.02 <i>s</i>	1.03 <i>s</i>
CH <sub>2</sub> -29	1.02 <i>s</i>	1.05 <i>s</i>	1.04 <i>s</i>
CH <sub>2</sub> -30	1.08 <i>s</i>	1.09 <i>s</i>	1.11 <i>s</i>
CH <sub>2</sub> COO	2.04 <i>s</i>	-	-

Los desplazamientos químicos (relativos al TMS) están dados en ppm y las constantes de acoplamiento (en parentesis) en Hz. Las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y HETCOR.

que el producto es un protolimonoide del tipo  $\Delta^7$ -tirucalano con un acetal cíclico y una función epoxídica en la cadena lateral (Bevan *et al.*, 1965; Lavie *et al.*, 1967; Runeckles y Mabry, 1973; Kraus *et al.*, 1980; Connolly y Hill, 1989; Olugbade, 1991; Tinto *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1992. Inter alia). Así el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 3) presenta señales para 32 carbonos en congruencia con la fórmula molecular calculada; el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en su modalidad DEPT (Espectro 4) indica claramente que estas señales corresponden a ocho metilos, ocho metilénos, ocho metinos y ocho carbonos cuaternarios. De acuerdo al espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 5) siete de los metilos ( $\delta_{\text{H}}$  1.30, 1.25, 1.08, 1.02, 1.00, 0.97, 0.83) se encuentran unidos a centros cuaternarios alifáticos y, el último corresponde al metilo de un grupo acetato ( $\delta_{\text{H}}$  2.03). La presencia en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de una señal para un grupo carbonilo de acetato en  $\delta_{\text{C}}$  170.01 proporciona una evidencia adicional de la existencia de este grupo funcional en la molécula.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 5) del producto natural también presenta señales diagnósticas para:

1.- La doble ligadura trisustituida [ $\delta_{\text{H}}$  5.29, *dd*,  $J=2.20, 5.5$  Hz, H-7] de un  $\Delta^7$ -tirucalano (Bevan *et al.*, 1967; Purushothaman *et al.*, 1985; Kundu *et al.*, 1985; Guang-Yi *et al.*, 1988; Lins *et al.*, 1992, Inadda *et al.*, 1994).

2.- El hidrógeno  $2\alpha$  de un tirucalano con una función cétonica en C-3 [ $\delta_{\text{H}}$  2.71, *td*,  $J= 5.7, 14.79$  Hz, H- $2\alpha$ ] (Bevan *ibid*; Guang-Yi *et al.*, 1988; Olugbade, 1991). La función cétonica se evidencia también por la presencia de una absorción en  $\delta_{\text{C}}$  203 en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ . Así mismo, el fragmento en  $m/z$  123 *uma* (Figura 5) es

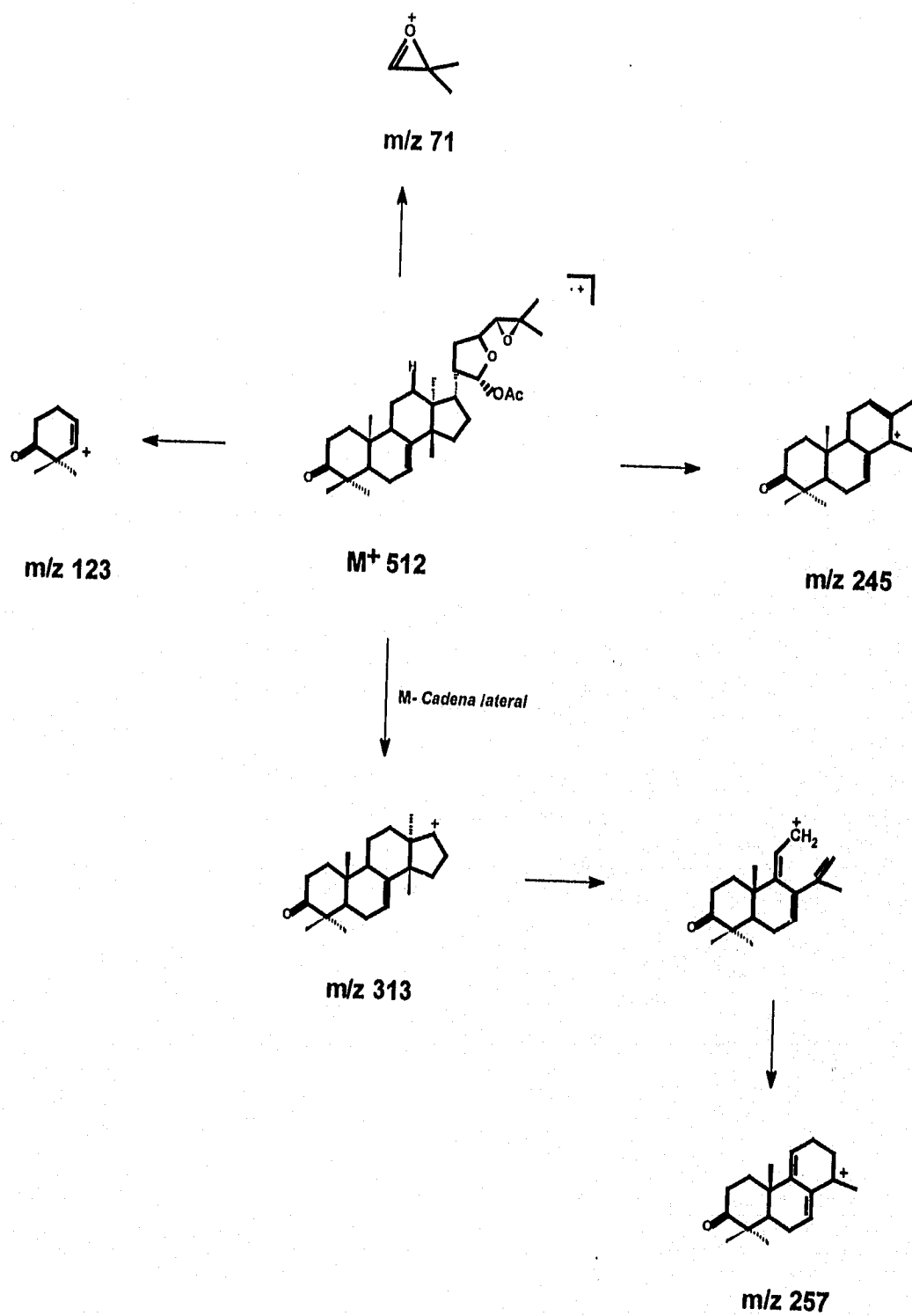


Figura 5. Fragmentaciones características del protolimonoido 21 $\alpha$ -acetoximelianona.

congruente con la presencia de un grupo ceto en el anillo A del tirucalano (Bevan *ibid*; Olugbade, 1991).

3.- Dos hidrógenos bases de funciones oxigenadas en  $\delta_H$  3.86 (*dt*,  $J = 7.2, 9.9$  Hz, H-23) y 6.17 (*d*,  $J = 3.6$  Hz, H-21) mismas que correlacionan con las señales en  $\delta_C$  79.84 (C-23) y 96.91 (C-21), respectivamente, en el espectro HETCOR (Espectro 6). Los desplazamientos químicos de todas estas señales son consistentes con la presencia de un acetal cíclico en el cual el hidróxilo hemiacetalico se encuentra formando un éster, en este caso particular un acetato.

4.- Un hidrógeno base de una función epoxídica en  $\delta_H$  2.67 (*d*,  $J = 7.5$  Hz, H-24) misma que correlaciona con el metino en  $\delta_C$  66.88 en el espectro HETCOR (Espectro 6). Esta última absorción y la del carbono cuaternario en  $\delta_C$  57.14 confirman la presencia de una función epoxídica en la estructura del producto (26) (Connolly *et al.*, 1979; Nakanishi *et al.*, 1986).

Los elementos estructurales evidenciados mediante el análisis de los espectros de RMN satisfacen las nueve insaturaciones y el número de oxígenos requeridos por la fórmula molecular, y solo resta por establecer la disposición de la función epoxídica y del acetato del hemiacetal cíclico. En este sentido, el fragmento con una relación  $m/z$  de 313 en el espectro de masas (Figura 5) indica que tanto el acetal cíclico como la función epóxido se encuentran presentes en la cadena lateral del protolimonoide (Lavie *et al.*, 1967; Connolly *et al.*, 1979; Nakanishi *et al.*, 1986). Por otra parte, la presencia del fragmento con una relación  $m/z$  de 71 indica que el epóxido se encuentra ubicado entre los carbonos C-24 y C-25 (Figura 5). Por último, la disposición



del acetal cíclico se determina como vecinal al epóxido con base en la interacción que se observa en el espectro COSY (Figura 6) entre el hidrógeno base del epóxido ( $\delta_H$  2.67, *d*,  $J = 7.5$ , H-24) y el oximetino del acetal en H-23 ( $\delta_H$  3.86, *dt*,  $J = 7.2, 9.9$  Hz). Estas observaciones indican también que el acetal está conformado por los carbonos C20-C23 del tirucalano. La estereoquímica del grupo acetoxi del acetal se determina como  $\alpha$  con base en las siguientes observaciones:

a) El valor de la constante de acoplamiento entre H-23 y el hidrógeno geminal al éster (H-21), la cual presenta una magnitud de 3.6 Hz. Si la disposición del éster es  $\beta$  el valor de la constante de acoplamiento sería de 2.75 Hz (Lavie *et al.*, 1967).

b) La magnitud del desplazamiento químico del carbono base del éster ( $\delta_C$  96.91). Si la estereoquímica es  $\beta$  el desplazamiento químico tendría una magnitud de alrededor de 100 ppm (Lins *et al.*, 1992)

Con base en las evidencias presentadas el compuesto (26) se caracteriza como la 21 $\alpha$ -acetoximelianona. Cabe destacar que éste metabolito secundario no se ha descrito previamente como un producto natural. Sin embargo, la acetilación del producto natural (27) aislado también en el presente estudio ha permitido la obtención de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) por un proceso de semisíntesis (Lavie *et al.*, 1967).

El siguiente producto se caracterizó como el melianodiol (28), el cual se aisló de la fracción activa S-VIII, bajo la forma de cristales amorfos. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 7. El espectro de IR (Espectro 7) al igual que en el caso del producto (26) presenta absorciones características para carbonilo de cetona ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ), y para un sistema

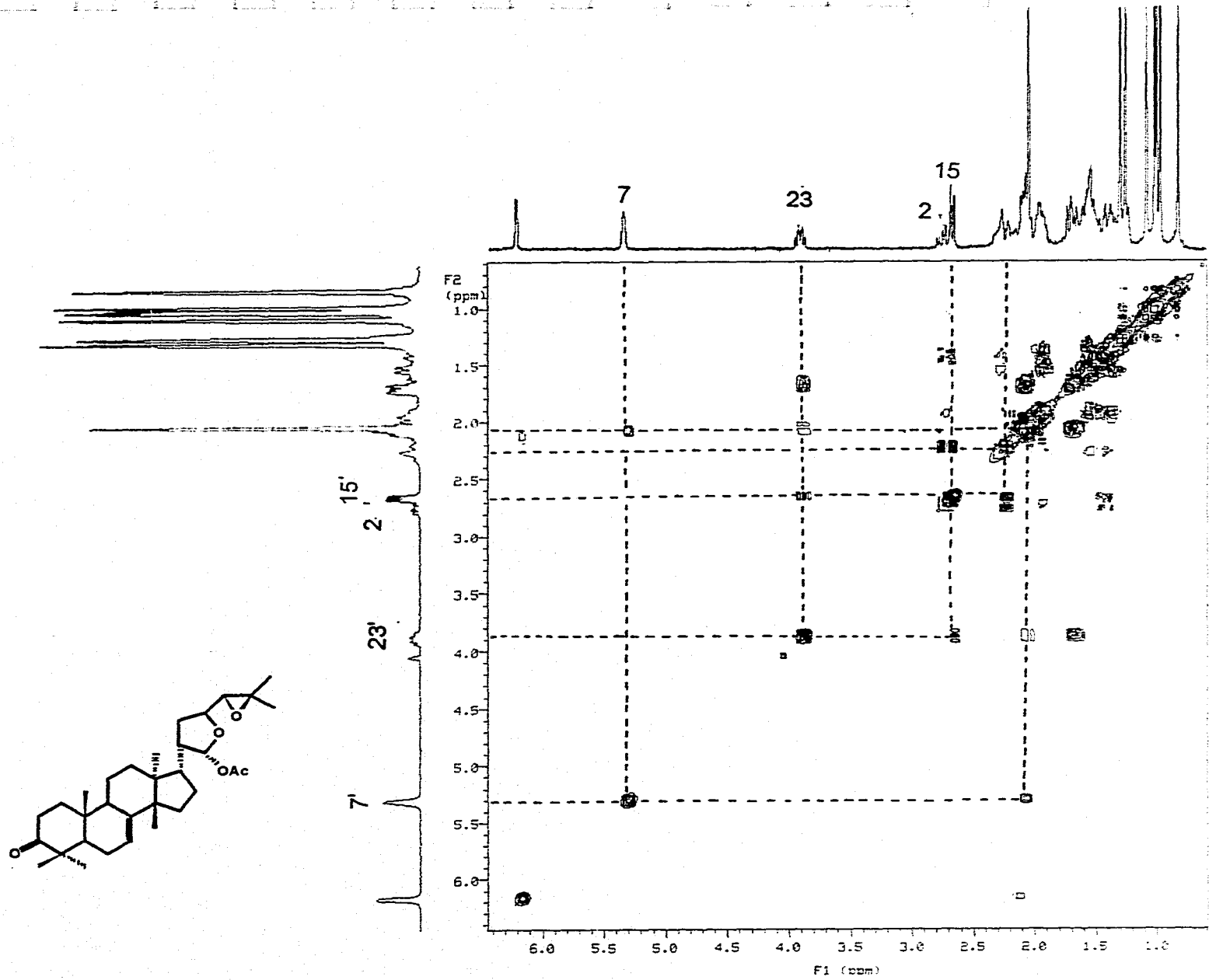
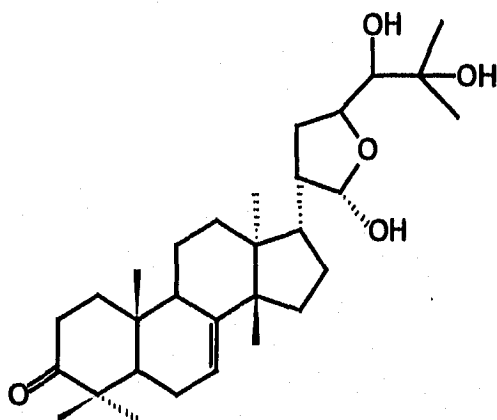


Figura 6 . Espectro de RMN- $^1\text{H}$  bidimensional COSY de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)

Tabla 7. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del melianodiol



FM	$C_{30}H_{48}O_5$
PM	488
$[\alpha]_D$	- 39° (CHCl <sub>3</sub> )
IR $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$ (Espectro 7)	3424, 3368, 1700, 1456, 1382, 1246, 820
EMIE m/z (int rel) (Espectro 8)	488 [M <sup>+</sup> (19)], 455 (34), 437 (50), 397 (100), 381 (25), 366 (23), 365 (75), 297 (52), 271 (27), 257 (20), 245 (27), 185 (24), 166 (20), 123(32), 109 (34), 95 (53), 55(56), 43 (62.5)

vínilico sustituido ( $820\text{ cm}^{-1}$ ). Sin embargo, en lugar de la señal del acetato se observa una señal muy intensa para hidroxilo en  $3424\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro de masa generado por este compuesto permite observar el ion molecular en  $m/z$  488 el cual corresponde a la fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_5$  (Espectro 8). Esta fórmula permite calcular siete grados de insaturación, dos menos que en el caso del producto (26). Otros picos importantes en el espectro se observan en una  $m/z$  de 437, 381, 365, 313, 297, 271, 166 y 123.

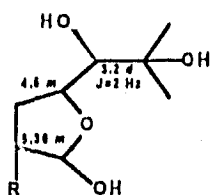
Los espectros de RMN (Tabla 5 y 6, Espectros 9, 10, 11 y 12) del producto (28) muestran una gran similitud a los de la  $21\alpha$ -acetoximelianona (26). Esta analogía sugiere que este producto es también un  $\Delta^7$ -tirucalano, (Bevan *et al.*, 1965; Lavie *et al.*, 1967; Runeckles y Mabry, 1973; Kraus *et al.*, 1980; Torrsell, 1983; Connolly y Hill, 1989; Olugbade, 1991; Tinto *et al.*, 1991; Itokawa *et al.*, 1992. *Inter alia*). La presencia en el espectro de masas del fragmento en  $m/z$  313 permite concluir que los anillos A-D de este tirucalano son idénticos a los de la  $21\alpha$ -acetoximelianona (Figura 5).

Las principales diferencias observadas entre los espectros de RMN de la  $21\alpha$ -acetoximelianona (26) y el producto (28) corresponden a las absorciones de la cadena lateral. A continuación se describen estas diferencias:

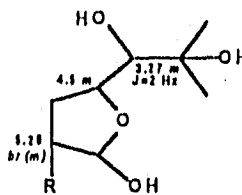
1.- En lugar de las señales para la función epoxídica se observan absorciones atribuibles a dos funciones carbinólicas, una secundaria ( $\delta_{\text{H}} 4.5$ ,  $m$ , H-23;  $\delta_{\text{C}} 78.84$ , C-23) y la otra terciaria ( $\delta_{\text{C}} 75.61$ , C-24)

2.- Las señales para el grupo acetato y para el hidrógeno base de la función acetal del producto (26) se encuentran ausentes. En este caso el espectro de RMN  $^1\text{H}$

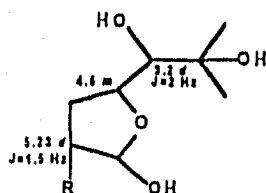
a)



Melianodiol<sup>1</sup>

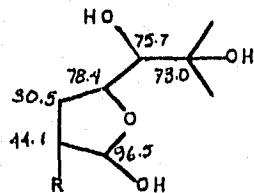


Apo tirucalano C<sup>2</sup>

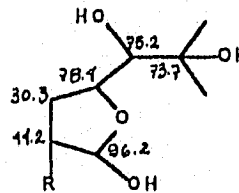


Producto 28

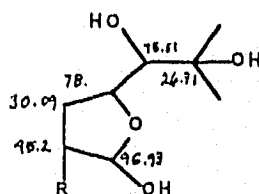
b)



Melianodiol<sup>1</sup>



Apo tirucalano C<sup>2</sup>



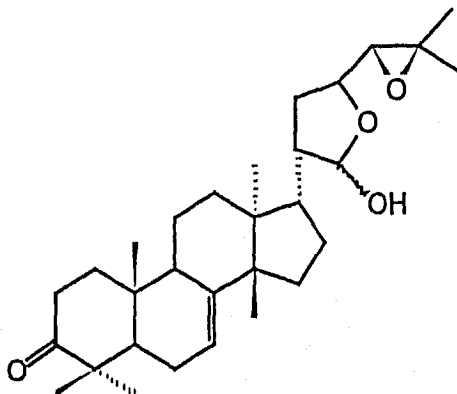
Producto 28

**Figura 7.** Análisis comparativo de las absorciones de la cadena lateral observadas en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}^{\text{a}}$  y  $^{13}\text{C}^{\text{b}}$  del Melianodiol (Merrien y Polonsky, 1971), del Apotirucalano C (Connolly, 1979) y del producto (28).

(Espectro 11) presenta señales para grupos hidróxilos en  $\delta_H$  5.3 y 2.15, mismas que desaparecen al equilibrar el espectro con  $D_2O$ . También en los espectros se observa la señal para el hidrógeno base de un hemiacetal, el cual como es de esperarse se encuentra desplazado diamagnéticamente ( $\delta_H$  5.23,  $d$ ,  $J = 1.5$  Hz, H-21) en relación al hidrógeno base del acetal del producto (28). Por analogía con el producto (26), la estereoquímica del hidrógeno en C-21 ( $\delta_H$  5.3,  $m$ ,  $\delta_C$  96.91) se determina como  $\alpha$  por comparación de la magnitud del desplazamiento químico del carbono hemiacetalico ( $\delta_C$  96.93) con aquellos de modelos apropiados (Connolly *et al.*, 1979; Merrien y Polonsky, 1971). Por otro lado, la estereoquímica del hidróxilo en C-24 se establece como  $\beta$  por comparación de la magnitud de los desplazamientos químicos de H-23 (C-23) y H-24 (C-24), y de la magnitud de la constante de acoplamiento entre H-23 y H-24 con aquellos descritos para el apotirucalano C (Connolly *et al.*, 1979). (Figura 7). Este análisis comparativo permite establecer la estructura del compuesto como la del melianodiol (28) (Connolly y Hill, 1989), producto natural aislado previamente de *Melia azaderach* y *Samadera madagascariensis* (Merrien y Polonsky, 1971; Su *et al.*, 1990; Lins *et al.*, 1992; Lavie *et al.*, 1967; Merrien *et al.*, 1971).

El último protolimonoido aislado se caracterizó como la melianona (27). Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas del producto se resumen en la Tabla 8. El espectro de IR (Espectro 13) muestra absorciones diagnósticas para funciones hidroxilo ( $3424\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ) y olefínica ( $1456\text{ cm}^{-1}$ ). La fórmula molecular del producto (27), se determinó por espectrometría de masas

Tabla 8 Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la melianona



FM	$C_{30}H_{46}O_4$
PM	470
p.f.	232-233 °C
$[\alpha]_D$	- 43° (AcOEt)
IR $\nu_{max}$ (KBr) $cm^{-1}$ (Espectro 13)	3424, 1706, 1456, 1382, 1246, 1114, 820
EMIE m/z (int rel) (Espectro14)	470 [ $M^+$ (10)], 452 (42), 437 (18), 409 (13), 381 (24), 365 (23), 297 (19), 271 (24), 257 (12), 245 (12), 185 (13), 166 (100), 123(32), 109 (35), 95 (69), 55(39), 43 (42.5)

---

(Espectro 14), como como  $C_{30}H_{46}O_4$  a partir del ion molecular observado en  $m/z$  470, el cual presenta 60 uma menos que el del producto (26).

Los espectros de RMN y de masas (Tablas 5 y 6, Espectros 15, 16, 17 y 18) son muy similares a los de la  $21\alpha$ -acetoximellanona (26). El análisis comparativo de los mismos permite concluir que el éster acetálico presente en el producto (26) se encuentra sustituido por un hemiacetal cíclico en el producto (27) y que por lo tanto su estructura corresponde a la melliánona (27). La diferencia de 60 uma de los iones moleculares de ambos compuestos y la presencia del fragmento en  $m/z$  409 en el producto (27) son congruentes con esta propuesta. El fragmento  $m/z$  409 resulta de la pérdida de ácido fórmico (diagnóstico para hemiacetales) y de un metilo a partir del ion molecular (M-15-46). La generación del fragmento  $m/z$  409 se ilustra en la Figura 8 (Lavie *et al.*, 1967). La absorciones observadas en los espectros de RMN son prácticamente iguales a las del producto (26) y las diferencias más importantes se observan en las señales asociadas con la porción hemiacetal evidenciada mediante el espectro de masas. En la Figura 9 se ilustran comparativamente las diferencias en los desplazamientos químicos observados para ambos compuestos.

Es importante destacar que las señales asignables al epoxido (C-24 y C-25), C-7 y C-21 se encontraban duplicadas en los espectros de RMN de la melliánona (27); esta duplicidad de las señales sugiere que el producto natural es una mezcla de epímeros que difieren tan solo en la configuración en el centro quiral C-21 (Bevan *et al.*, 1967; Lavie *et al.*, 1967; Nakanishi *et al.*, 1986)



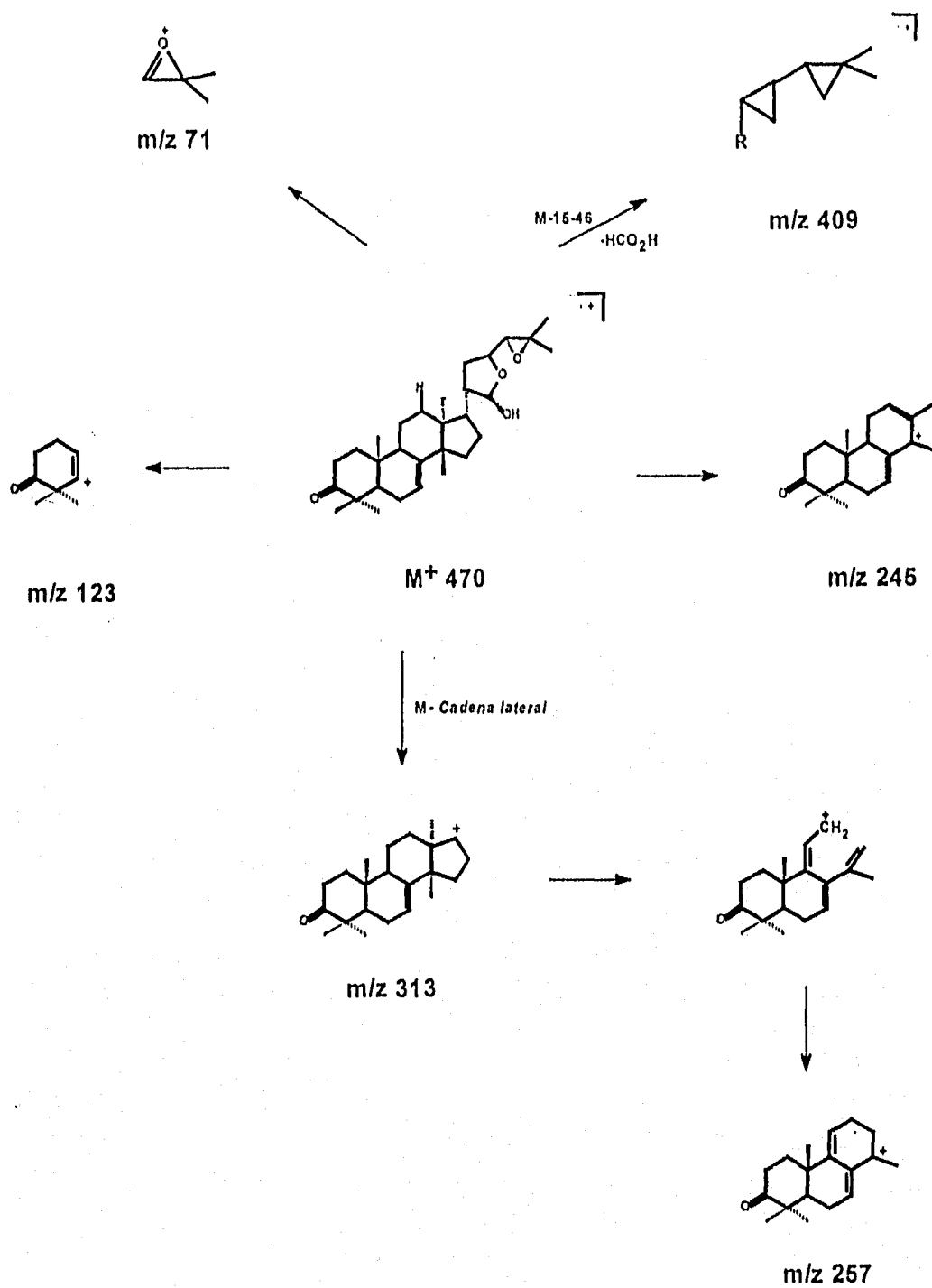
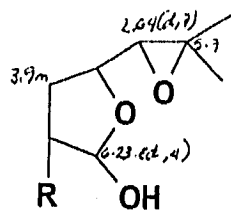
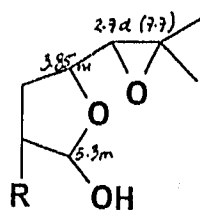
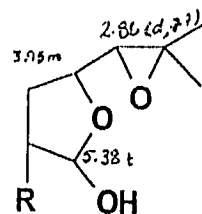


Figura 8. Fragmentación característica de la Melianona (27)

a)

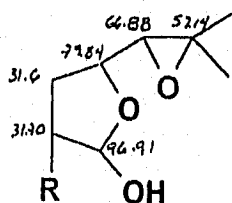
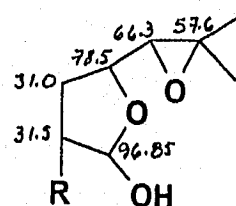
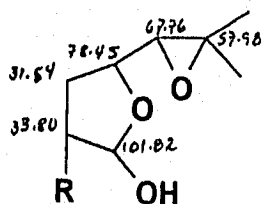


melianona



27

b)



**Figura 9.** Análisis comparativo de las absorciones de la cadena lateral observadas en los espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  Y  $^{13}\text{C}$  de la Melianona (27)

La comparación de los datos espectroscópicos encontrados en este estudio con los previamente descritos para la melianona (mezcla de dos epiméros) indican que se trata del mismo producto (27). La melianona (27) se ha aislado en múltiples ocasiones de varias meliáceas y en todos los casos se ha obtenido como mezcla epimérica (Bevan *et al.*, 1967; Lavie *et al.*, 1967; Connolly *et al.*, 1979; Nakanishi *et al.*, 1986; Guang-Yi *et al.*, 1988). Tanto en este trabajo como en estudios previos se ha tratado de separar la mezcla epimérica por métodos cromatográficos convencionales (ccp, cc, HPLC) sin resultados satisfactorios (Nakanishi *et al.*, 1986; Guang-Yi *et al.*, 1988).

Resulta interesante comparar el hecho de que el melianodiol (28) no se aisló como una mezcla epimérica, esto puede deberse a que el hidroxilo en C-24 forma un puente hidrógeno con el oxígeno heterocíclico del hemiacetal para así anclar el anillo de cinco miembros en una conformación tal que el hidróxilo hemiacetalico adopte una disposición  $\alpha$  en C-21.

Aunque esta explicación no se ha proporcionado en estudios previos en las dos ocasiones que el melianodiol (28) ha sido obtenido como producto natural, se ha aislado el epimero  $\alpha$  exclusivamente.

El tratamiento de la melianona (27) con ácido perclórico y dioxano (ver sección experimental 3.8.2) permite la obtención de un producto idéntico en todos sus aspectos al melianodiol (28) aislado como producto natural en el presente trabajo. Esta correlación química proporciona una evidencia adicional para la caracterización del melianodiol (28).

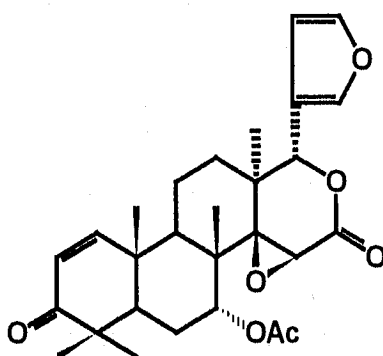
Por último, la acetilación de la melianona con anhídrido acético y piridina (ver sección experimental 3.8.1) generó una mezcla de dos productos. La separación del producto mayoritario mediante ccp permitió la obtención de un producto idéntico a la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26).

#### 4.2.2 Caracterización de la gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxo gedunina (30) y 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)

Los compuestos gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxo gedunina (30) y 6 $\alpha$ -acetoxi gedunina (31), presentan el núcleo base estructural de un triterpenoide del tipo D-seco (Grupo 3, Tabla 1) con el anillo D formando una epoxi- $\delta$ -lactona. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas utilizadas para su caracterización se resumen en las Tablas 9, 10 y 11.

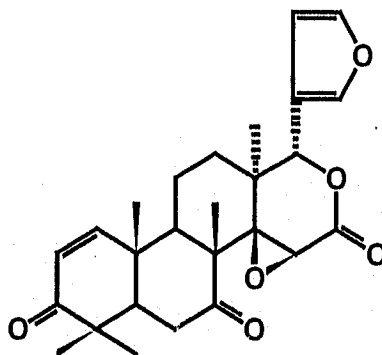
Los espectros en el IR (Espectros 19, 25, 31) para los tres limonoides presentan como característica común las absorciones asociadas con la presencia de una cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada (1670  $\text{cm}^{-1}$ ), un grupo furano (1514 y 820  $\text{cm}^{-1}$ ) y un carbonilo de  $\delta$ -lactona (1736  $\text{cm}^{-1}$ ). De manera adicional, el espectro de los productos (29) y (31) presenta bandas de absorción para carbonilo de acetato en 1708  $\text{cm}^{-1}$ . Por último, el del producto (30) presenta una absorción diagnóstica para una cetona en anillo de seis miembros no conjugada (1706  $\text{cm}^{-1}$ ).

Tabla 9. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la Gedunina (29)



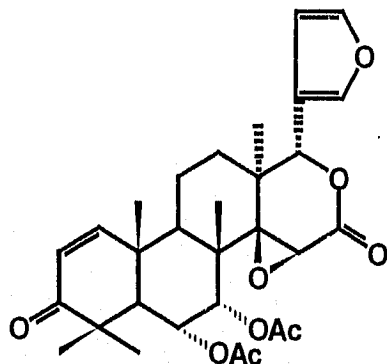
FM	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>
PM	482
p.f.	218 °C
[α] <sub>D</sub>	- 44° (CHCl <sub>3</sub> )
IR V <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> (Espectro 19)	3452, 1736, 1708, 1670, 1514, 1288, 1028, 820
EMIE m/z (int rel) (Espectro 20)	482 [M <sup>+</sup> (9)], 467 [M-15 (1)], 423 [M <sup>+</sup> +H -60 (2)], 407 (7), 379 (3), 328 (17), 299 (100), 281 (5), 257 (6), 256 (5), 213 (7), 163 (12), 149 (25), 137 (15), 121 (12), 95 (16), 69 (16), 43 (26)

Tabla 10. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 7-deacetóxi-7-oxo gedunina (30)



FM	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>
PM	438.51
p.f.	262-265 °C
[α] <sub>D</sub>	50 (CHCl <sub>3</sub> )
IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> (Espectro 25)	3452, 3044, 1736, 1708, 1670, 1504, 1288, 1030, 818
EM-FAB, m/z (int rel) (Espectro 26)	439 [M <sup>+</sup> (2)], 423 [M-15 (5)], 395 (5), 368 (4), 368 (4), 316 (23), 315 (100), 297 (7), 256 ( ), 236 (5), 189 (4), 161 (10), 137 (12), 135 (11), 95 (13), 69 (12), 43 (11)

**Tabla 11. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)**



<b>FM</b>	C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>
<b>PM</b>	540
<b>p.f.</b>	270-273 °C
<b>[<math>\alpha</math>]<sub>D</sub></b>	+ 141° (CHCl <sub>3</sub> )
<b>IR V<sub>max</sub> (KBr) cm<sup>-1</sup></b> (Espectro )	3434, 1746, 1708, 1674, 1502, 1162, 1116, 1096, 1026, 932, 874, 820, 776
<b>EMIE m/z (int rel)</b> (Espectro )	540 [M <sup>+</sup> (3)], 481 [M-59 (2)] 480 [M <sup>+</sup> -60 (1.5)], 417 [M-123 (10)], 405 (5), 386 (13), 357 (12), 297 (101), 279 (8), 213 (7), 199 (12), 161 (13), 95 (20), 69, 43 (42)

El espectro de masas del limonoide (29) (Espectro 20) presenta un ión molecular de 482 uma el cual permite establecer una fórmula molecular de  $C_{28}H_{34}O_7$ . El espectro del segundo limonoide (30) (Espectro 26), presenta un ión molecular de 439 uma [dos unidades de masa menos que el producto (29)] y su fórmula se calcula como  $C_{26}H_{30}O_6$ . Por último, el espectro de masas del producto (31) presenta un ión molecular de 540 [60 uma más que el producto (29)] que permite una fórmula molecular de  $C_{30}H_{36}O_9$ .

Los espectros de RMN (Tablas 12 y 13, Espectros 21, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 35 y 36) presentan el perfil típico de un tetranortriterpenoide del Grupo 3 con una cetona conjugada en el anillo A, un anillo furano  $\beta$ -sustituido en C-17 y una epoxi- $\delta$ -lactona (anillo D) (Baldwin *et al.*, 1967; Bevan *et al.*, 1967; Lavie *et al.*, 1972; Mulholland y Taylor, 1980; Sondengam *et al.*, 1981; Hasegawa *et al.*, 1989; Neto *et al.*, 1995; Fuzzati *et al.*, 1996).

En todos casos los espectros de RMN  $^1H$  (Espectros 23, 24, 29, 30, 35, 36) contienen:

1.- El sistema AB correspondiente a los protones vinílicos conjugados con la función cetona en C-3 [ $\delta_H$  5.85, *d*,  $J= 10$  Hz, H-2 y 7.10, *d*,  $J= 10$  Hz, H-1 en (29);  $\delta_H$  5.92, *d*,  $J= 9.9$  Hz, H-2 y 7.11, *d*,  $J= 10.2$  Hz, H-1 en (30) y  $\delta_H$  5.93, *d*,  $J= 10$  Hz, H-2 y 7.07, *d*,  $J= 10$  Hz, H-1 en (31)]. Cabe destacar que la presencia en los espectros de masas (Espectros 20, 26 y 32) de los tres compuestos del fragmento en  $m/z$  121 (Figura 10) es consistente con la ubicación de la cetona conjugada en el anillo A (Baldwin *ibid*).



Tabla 12. Datos de RMN-<sup>1</sup>H de la gedunina (29) y sus derivados

Proton	Compuesto		
	Gedunina (29)	7-deacetoxi-7-oxogedunina (30)	6-acetoxigedunina (31)
H-1	7.10 <i>d</i> (10)	7.11 <i>d</i> (10.2)	7.07 <i>d</i> (10)
H-2 <sub>α</sub>	5.85 <i>d</i> (10.2)	5.92 <i>d</i> (9.9)	5.93 <i>d</i> (10)
H-5	2.12 <i>dd</i> (2.7, 13.2)	2.23 <i>d</i> (2.6, 13.2)	2.55 <i>dd</i> (2.8, 13.8)
H-6	5.27	2.92 <i>t</i> (2.9)	5.30 <i>dd</i> (2.4, 12.4)
H-7	4.54 <i>dd</i> (2.20, 5.5)	--	4.89 <i>d</i> (2.4)
H-9	2.46 <i>dd</i> (12.1)	2.21 <i>d</i> (1.3)	2.47 <i>dd</i> (12.0)
H-11	2.19 <i>m</i>	2.19 <i>m</i>	2.19 <i>d</i>
H-15	3.6 <i>s</i>	3.94 <i>s</i>	3.61 <i>s</i>
H-17	5.6 <i>s</i>	5.5 <i>s</i>	5.6 <i>s</i>
H-21	7.41 <i>su</i>	7.41 <i>t</i> (0.3)	7.4 <i>su</i>
H-22	6.34 <i>dd</i> (1.2)	6.36 <i>dd</i> (1.2)	6.32 <i>dd</i> (1.2)
H-23	7.41 <i>su</i>	7.42 <i>dd</i> (0.9)	7.41 <i>su</i>
H-24	2.67 <i>d</i> (7.5)	2.59 <i>d</i> (7.4)	2.61 <i>d</i> (7.5)
CH-18	1.3 <i>s</i>	1.38 <i>s</i>	1.57 <i>s</i>
CH-19	1.20 <i>s</i>	1.22 <i>s</i>	1.35 <i>s</i>
CH-25/27	0.83 <i>d</i>	0.90 <i>d</i>	0.96 <i>d</i>
CH-28	1.086 <i>s</i>	1.8 <i>s</i>	1.22 <i>s</i>
CH-29	1.301 <i>s</i>	1.16 <i>s</i>	1.16 <i>s</i>
CH-30	1.259 <i>s</i>	1.14 <i>s</i>	1.14 <i>s</i>
CH-COO-6	--	--	2.02
CH-COO-7	2.10	--	2.14

Los desplazamientos químicos (relativos al TMS) están dados en ppm y las constantes de acoplamiento (en paréntesis) en Hz. Las asignaciones se realizaron por una combinación de COSY y HETCOR.

Tabla 13. Datos de RMN-<sup>13</sup>C de la gedunina (29) y sus derivados

Carbon	Compuesto		
	Gedunina (29)	7-deacetoxi-7-oxogedunina (30)	6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)
C-1	156.85	155.88	156.06
C-2	125.99	126.42	126.65
C-3	203.87	203.7	203.98
C-4	44.04	44.2	44.98
C-5	45.04	47.53	47.92
C-6	23.4	36.67	69.69
C-7	73.22	208	72.69
C-8	42.63	45.22	43.18
C-9	39.54	52.56	38.85
C-10	40.2	39.60	40.64
C-11	15.1	17.17	15.09
C-12	26.1	32.21	36.66
C-13	38.73	37.72	38.52
C-14	69.76	65.7	68.6
C-15	56.89	54.64	56.28
C-16	167.1	166.83	167.04
C-17	76.24	77.95	76.13
C-18	17.73	17.36	20.28
C-19	19.74	19.82	18.12
C-20	120.42	120.1	120.39
C-21	143.66	143.09	143.22
C-22	109.84	107.95	109.84
C-23	141.15	141.0	141.24
C-28	27.1	20.93	25.97
C-29	21.24	20.52	17.92
C-30	18.1	26.92	18.5

Los desdoblamientos químicos están dados en ppm. Las asignaciones se apoyaron por DEPT y por comparación de los desplazamientos químicos con aquellos asignados a compuestos relacionados.

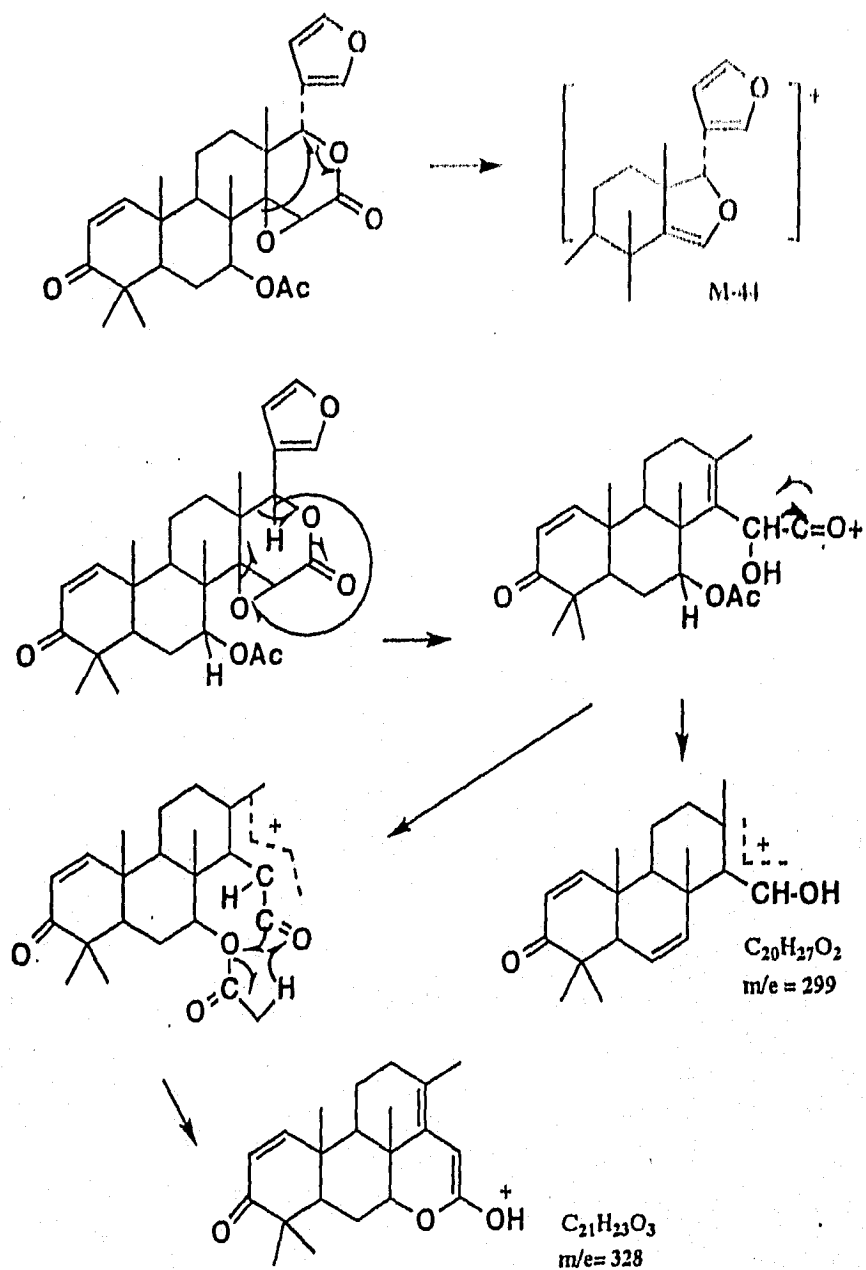


Figura 10. Fragmentaciones características de limonoides con estructura tipo gedunina (29)

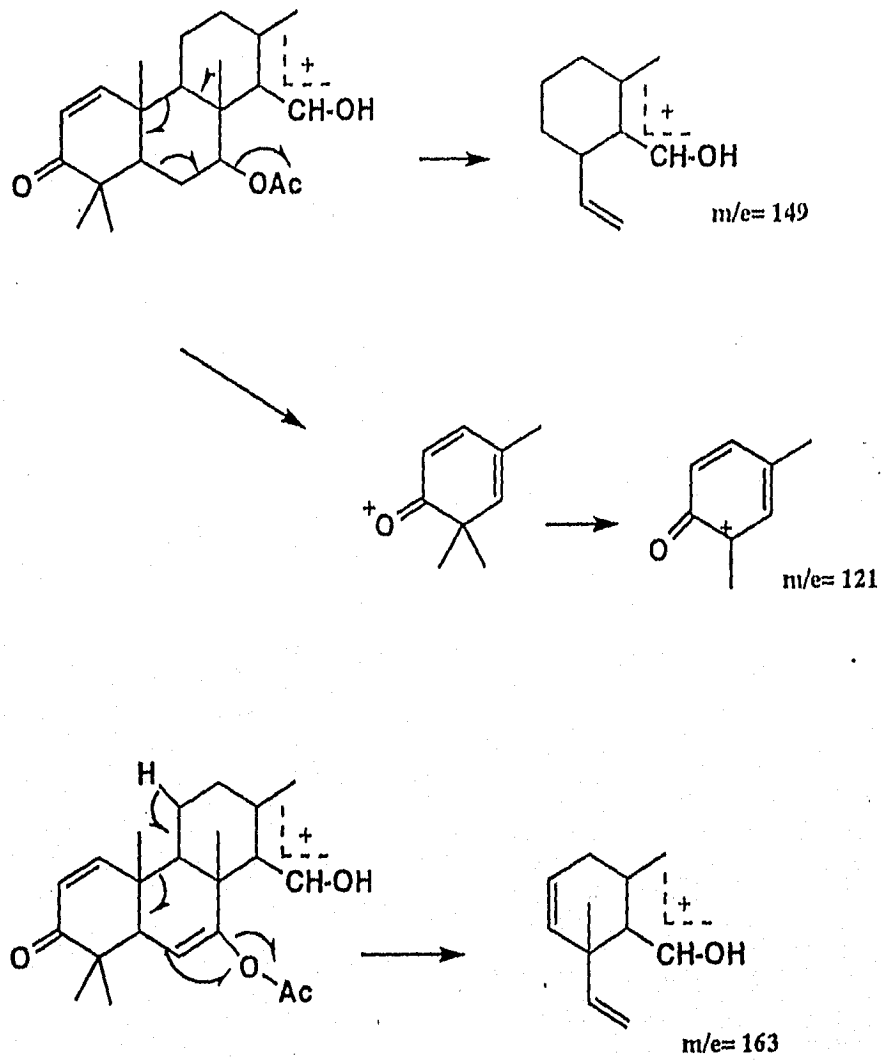


Figura 10. Fragmentaciones características de limonoides con estructura tipo gedunina (29) (continuación)

2.- Las señales del anillo furano  $\beta$ -sustituido, los cuales se observan como singuletes anchos en  $\delta_H$  7.41 (H-21,23) y 6.38 (*t*, J=1.2, H-22) en (29);  $\delta_H$  7.42 (*dd*, J=0.9, H-23), 7.41 (*t*, J=0.3, H-21) y 6.36 (*dd*, J=1.2, H-22) en (30);  $\delta_H$  7.41 (*sa*, H-21, 23) y 6.36 (*dd*, J=1.2, H-22) en (31) (Bevan et al., 1967).

3.- La señal para el hidrógeno base de la función oxigenada de la  $\delta$ -lactona (H-17). Esta señal se observa como un singulete en el rango de  $\delta_H$  5.47 - 5.6.

4.- Un singulete en el rango de  $\delta_H$  3.94 - 3.55, asignable a la función epoxidica ubicada entre C-14 y C-15.

6.- Cinco singuletes asignables a metilos unidos a centros cuaternarios (ver Tablas 12 y 13).

Los espectros de RMN  $^{13}C$  (Tabla 13) confirman la presencia de los grupos funcionales evidenciados mediante la RMN $^1H$ .

La gedunina (29), además de las señales antes mencionadas, presenta las relacionadas con la presencia de un éster de acetato. En el caso de la RMN $^1H$  (Tabla 12) el metilo del acetato se observa como un singulete en  $\delta_H$  2.10 y el hidrógeno base del

éster se encuentra como un singulete ancho en  $\delta_H$  4.56. En el espectro de RMN  $^{13}C$  RMN $^1H$  (Tabla 13) las señales correspondientes se observan en  $\delta_C$  21.1 y 73.1, respectivamente, y el carbonilo de acetato aparece en  $\delta_C$  169.8. La presencia en el espectro de masas del fragmento  $m/z$  149 es consistente con la ubicación del grupo acetato en C-7 y la estereoquímica  $\alpha$  del mismo se establece con base en la

apariciencia como singulete ancho del hidrógeno base del éster. Si la estereoquímica hubiera sido  $\beta$  la señal se observaría como un doble de doble (Baldwin *ibid*).

En el caso de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30) los espectros de RMN (Tabla 12 y 13) no presentan las señales asociadas con el éster. En su lugar el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 27) muestra la absorción característica para una cetona no conjugada en  $\delta_{\text{C}}$  203.7.

Por último, los espectros de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) presentan señales para dos ésteres de acetato, uno más que en el caso de la gedunina (29). Las señales para los grupos acetato se observan en  $\delta_{\text{H}}$  2.14 y 2.02 en el espectro de RMN $^1\text{H}$  y en  $\delta_{\text{C}}$  169.98 y 170.06 en el espectro de RMN $^{13}\text{C}$ . Por otro lado, los hidrógenos base del éster se observan en  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (dd,  $J=12.4, 2.4$ , H-6) y 4.89 (d,  $J=2.4$ , H-7) mismos que correlacionan en el espectro HETCOR (Espectro 36) con los oximetinos en  $\delta_{\text{C}}$  69.98 y 72.69, respectivamente.

La interacción observada entre los hidrógenos base de los ésteres en el espectro COSY (Figura 11) permite establecer la relación vecinal de los mismos. Por otro lado, la correlación entre H5 y la señal asignable al hidrógeno geminal a una de las funciones acetoxi permite concluir que los grupos acetoxi se encuentran ubicados en C-6 y C-7.

El patrón de acoplamiento (dd,  $J=12.4, 2.4$  Hz) observado para H-6 permite proponer que la estereoquímica del grupo acetoxi en C-6 es  $\alpha$ . La constante de acoplamiento de 12.4 Hz se debe a la interacción *trans-diaxial* entre H-6 y H-5 y la constante de acoplamiento de 2.4 Hz se debe a la interacción *ecuatorial-axial* entre H-

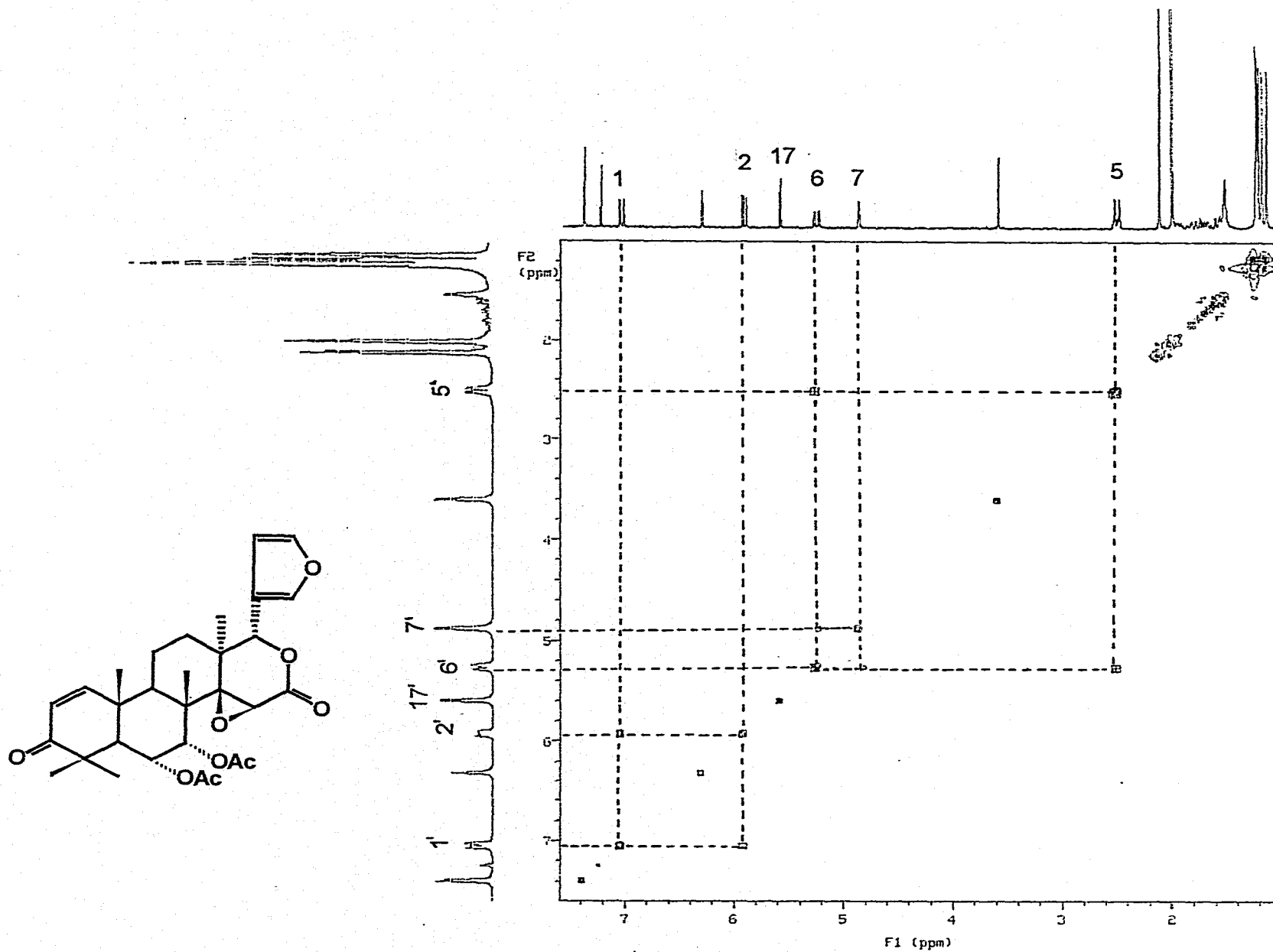


Figura 11. Espectro de RMN-COSY de la 6 $\alpha$ - acetoxigedunina (31).

6 y H-7 (Neto *ibid*). Así mismo, por analogía con la gedunina (29) la estereoquímica del acetoxi en C-7 se establece como  $\alpha$  debido a la apariencia de la señal como un singulete.

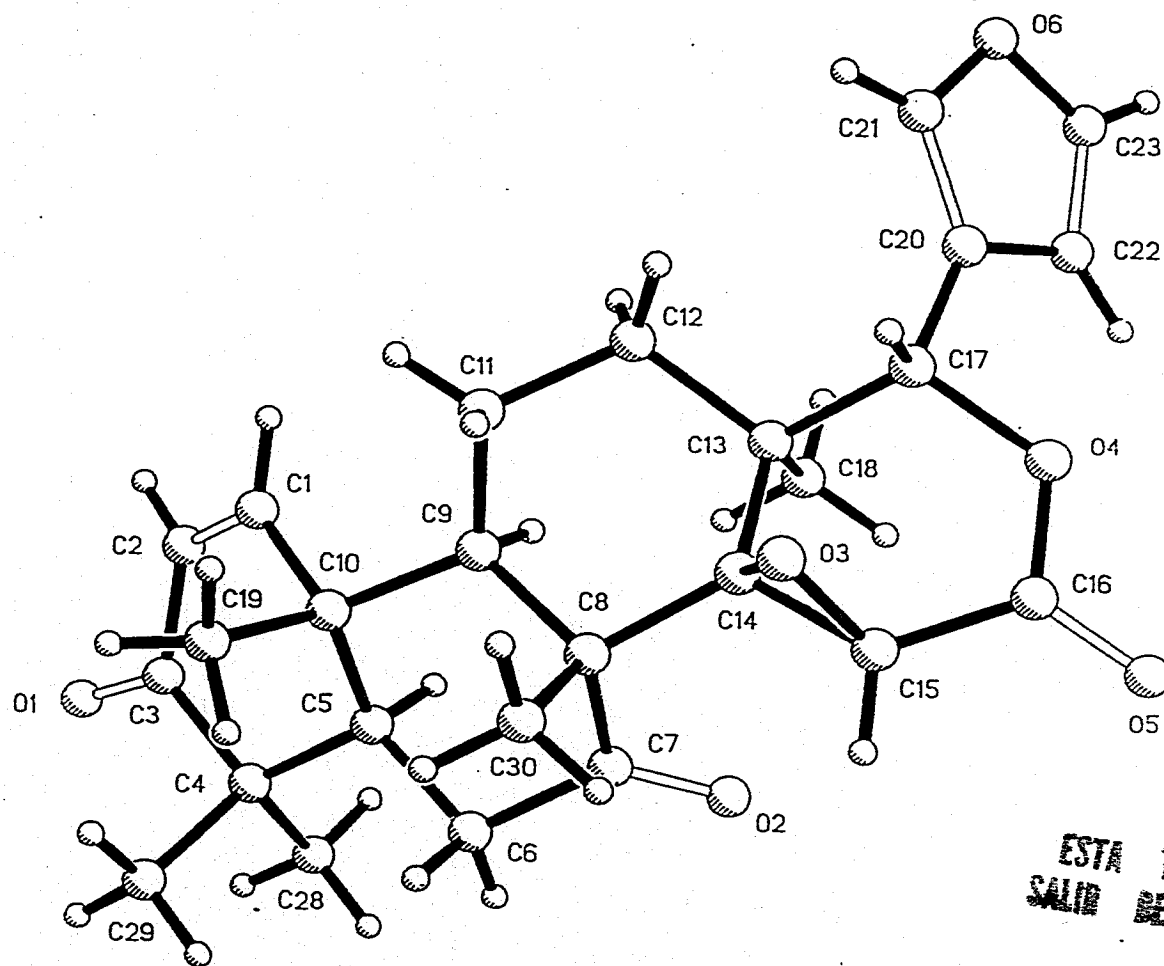
Con base al análisis anterior las estructuras de los productos (29), (y (31)), corresponden a la gedunina, la 7-deacetoxi-7-oxo gedunina y la  $6\alpha$ -acetoxi gedunina, respectivamente. Las constantes espectroscópicas se encuentran en perfecta armonía con las previamente descritas para estos metabolitos, mismos que se han aislado en varias ocasiones de otras especies de la familia Meliaceae (Taylor *et. al.*, 1984; Champagne *et al.*, 1992).

En el caso de 7-deacetoxi-7-oxo gedunina (30) y la  $6\alpha$ -acetoxi gedunina (31) la determinación inequívoca de la estructura se realizó mediante un análisis de difracción de rayos X.

Los parámetros de longitudes de enlace y ángulos de enlace se enlistan en los apéndices 1 y 2. Una vista estereoscópica de las estructuras de los productos naturales (30) y (31) se muestran en las Figuras 12 y 13, respectivamente.

Cabe destacar que este trabajo constituye la primera descripción de análisis de rayos X de derivados de la gedunina.





ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 12. Vista estereoscópica de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina

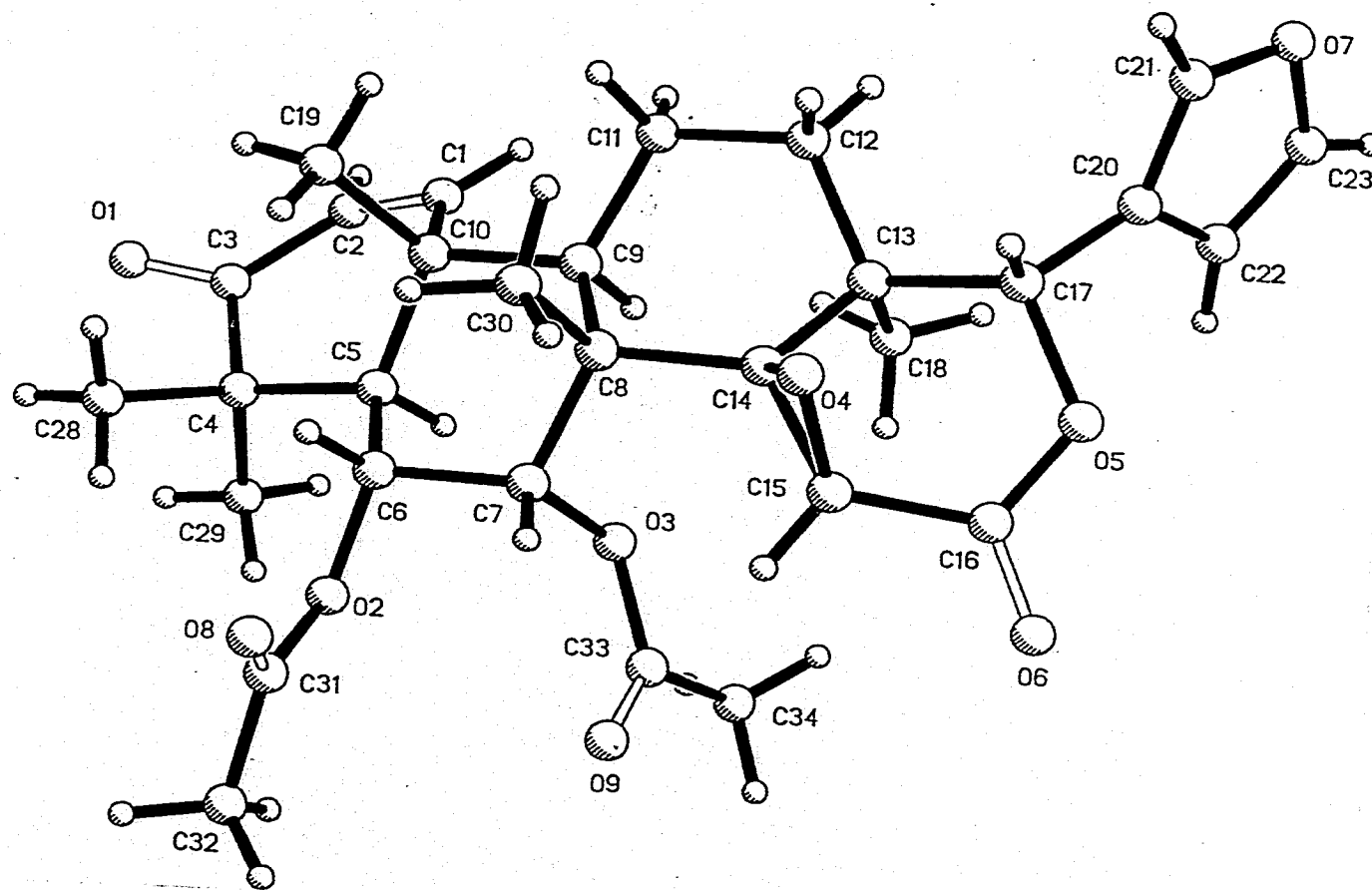


Figura 12. Vista estereoscópica de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)

#### **4.2.3 Caracterización del $\beta$ -lupeol (32) y acetato de $\beta$ -lupeol (33)**

Sucesivas cromatografías preparativas en capa delgada de gel de sílice de la fracción activa CIII-3 (Cuadro 8, Sección experimental 3.3.6), condujeron al aislamiento de dos productos, uno de ellos bajo la forma de un sólido cristalino amorfo de color blanco (9.3 mg) y el otro como un polvo blanco (27 mg), los cuales fueron identificados como el  $\beta$ -lupeol y el acetato de  $\beta$ -lupeol, respectivamente. Ambos compuestos se caracterizaron por comparación mediante cromatografía en capa fina con muestras auténticas.

Cabe señalar que sus constantes espectroscópicas y espectrométricas se encuentran en armonía con las descritas previamente para estos compuesto. (Budzikiewickz et al., 1964; Mahata y Kundu, 1994; Rojas, 1996; Trejo y Rivero, 1996).

#### **4.2.4 Caracterización del $\beta$ -D-glucositolsterol (34)**

De la fracción C-VII de la columna primaria (Cuadro 5) precipitaron espontáneamente 153.2 mg de un sólido cristalino de color blanco. El compuesto se caracteriza como el  $\beta$ -D-glucositolsterol (34) por comparación con una muestra auténtica (Trejo y Rivero, 1996).

### 4.3 Actividades biológicas de los constituyentes puros aislados de *Guarea grandifolia*

De acuerdo con el diseño experimental planteado en esta investigación, se realizaron una serie de ensayos biológicos, cuya finalidad fué la determinación del potencial herbicida e insecticida de los compuestos aislados de *G. grandifolia*. En primer lugar se discutirán las evaluaciones relacionadas con la evaluación del efecto de los metabolitos secundarios sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. Los compuestos evaluados se obtuvieron de fracciones fitotóxicas e incluyeron los siguientes: 21 $\alpha$ -acetoxi melianona (**26**), melianona (**27**), melianodiol (**28**), gedunina (**29**), 7-deacetoxi-7-oxogedunina (**30**) y 6 $\alpha$  acetoxigedunina (**31**).

En todos los casos el rango de concentración utilizado para las evaluaciones fué de 5 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados de las evaluaciones conducidas con los productos antes señalados se indican en la Tabla 16 y en las Gráficas 2, 3, 4 y 5. Los resultados se encuentran expresados como porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de las especies de prueba. De acuerdo a los resultados los constituyentes más activos fueron el melianodiol (**28**) y la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (**26**).

**Tabla 16.** Efecto de los compuestos puros aislados de *G. grandifolia* sobre la inhibición y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

	Concentración (ppm)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
		Crecimiento (mm) <sup>a</sup>	Inhibición (%) <sup>b</sup>	Crecimiento (mm) <sup>a</sup>	Inhibición (%) <sup>b</sup>
<b>21<math>\alpha</math>-acetoximelianona</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		8.25 $\pm$ 1.25		27.75 $\pm$ 2.75	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	3.78 $\pm$ 1.37	45.90 <sup>c</sup>	14.74 $\pm$ 4.63	53.15 <sup>c</sup>
	250	2.16 $\pm$ 0.98	26.22 <sup>c</sup>	13.51 $\pm$ 6.03	48.71 <sup>c</sup>
	50	1.75 $\pm$ 1.12	21.31 <sup>c</sup>	11.38 $\pm$ 6.15	41.02 <sup>c</sup>
	5	1.28 $\pm$ 0.90	15.57 <sup>c</sup>	6.26 $\pm$ 5.26	22.56 <sup>c</sup>
<b>Melianona</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		8.25		27.75	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	7.25	12.12 <sup>c</sup>	24.75	10.81 <sup>c</sup>
	250	11.0	+33.33 <sup>c</sup>	28.5	+2.7 <sup>c</sup>
	50	11.0	+33.33 <sup>c</sup>	33	+18.91 <sup>c</sup>
	5	17.5	+42.42 <sup>c</sup>	28.5	+1.8 <sup>c</sup>
<b>Melianodiol</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		4.02		11.92	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	3.84	86.6 <sup>c</sup>	7.15	60.0 <sup>c</sup>
	250	2.07	48.5 <sup>c</sup>	9.05	24.07 <sup>c</sup>
	50	2.37	41.04 <sup>c</sup>	10.55	11.49 <sup>c</sup>
	5	2.92	27.36 <sup>c</sup>	17.87	+49.74 <sup>c</sup>

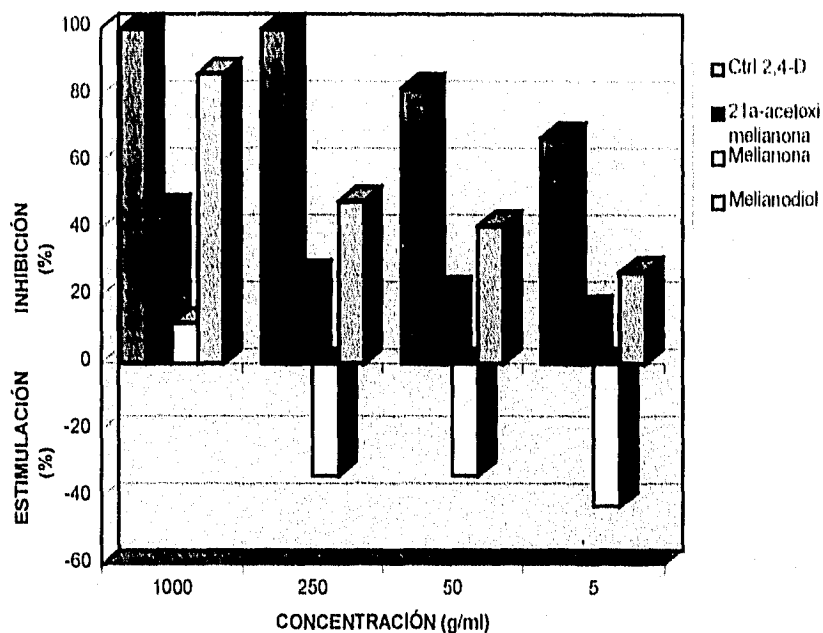
<sup>a</sup>Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas ( $\pm$ DE); 20 plántulas cada una. <sup>b</sup>Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control blanco. <sup>c</sup>P < 0.05 (ANOVA). <sup>d</sup>Como control blanco se emplea agua destilada. <sup>e</sup>Como control positivo se emplea el 2,4-D.

**Tabla 16.** Efecto de los compuestos puros aislados de *G. grandifolia* sobre la inhibición y el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*. (continuación)

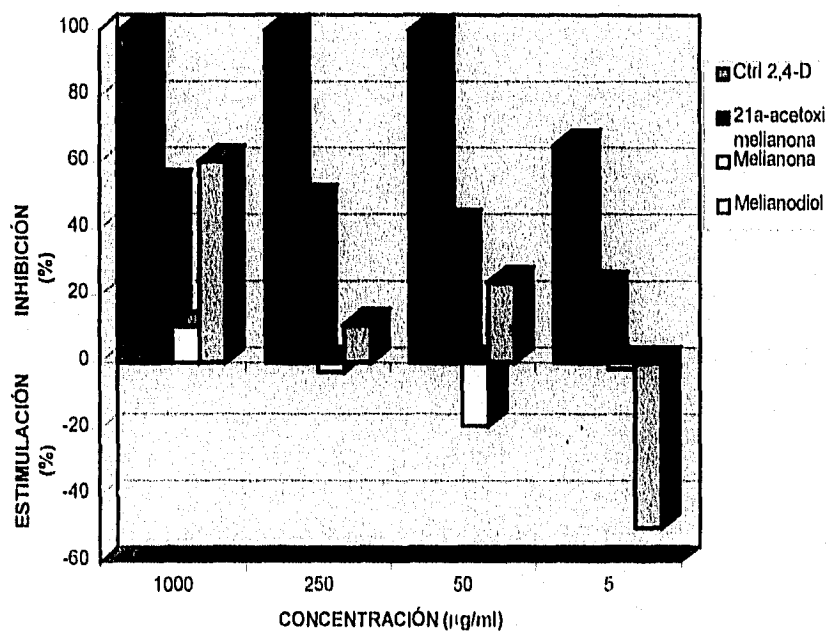
	Concentración (ppm)	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>		<i>Echinochloa crusgalli</i>	
		Crecimiento (mm) <sup>a</sup>	Inhibición (%) <sup>b</sup>	Crecimiento (mm) <sup>a</sup>	Inhibición (%) <sup>b</sup>
<b>Gedunina</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		8.32 ±		28.1 ± 12.05	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	5.3 ±	36.22 <sup>c</sup>	20.96 ± 2.16	25.40 <sup>c</sup>
	250	9.3 ±	+11.89 <sup>c</sup>	25.17 ± 6.47	10.42 <sup>c</sup>
	50	13.77 ±	+65.50 <sup>c</sup>	31.53 ± 2.97	+12.20 <sup>c</sup>
	5	15.36 ±	+84.61 <sup>c</sup>	30.66 ± 4.33	+9.11 <sup>c</sup>
<b>6<math>\alpha</math>-acetoxigedunina</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		9.25 ± 1.70		25.25 ± 2.14	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	7.5 ± 1.29	18.91 <sup>c</sup>	23 ± 1.63	8.91 <sup>c</sup>
	250	9.25 ± 1.70	0	25.5 ± 2.64	+0.99 <sup>c</sup>
	50	9.5 ± 0.57	+2.7 <sup>c</sup>	25.75 ± 2.87	+1.98 <sup>c</sup>
	5	9.5 ± 1.73	+2.7 <sup>c</sup>	25.5 ± 3.10	0 <sup>c</sup>
<b>7-deacetoxi-7-oxogedunina</b>					
Ctrl blanco <sup>d</sup>		7.25 ± 0.95		26.0 ± 2.70	
Ctrl positivo <sup>e</sup>	100	0	100	0	100
	1000	6.25 ± 1.25	15.35 <sup>c</sup>	20.75 ± 3.86	20.19 <sup>c</sup>
	250	2.75 ± 1.70	25.98 <sup>c</sup>	19.0 ± 4.54	26.92 <sup>c</sup>
	50	5.5 ± 1.29	28.54 <sup>c</sup>	21.25 ± 4.03	18.26 <sup>c</sup>
	5	4.5 ± 1.29	26.57 <sup>c</sup>	21.5 ± 2.64	17.3 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Cada valor representa el promedio de cuatro réplicas ( $\pm$ DE); 20 plántulas cada una. <sup>b</sup>Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control blanco. <sup>c</sup> $P < 0.05$  (ANOVA). <sup>d</sup>Como control blanco se emplea agua destilada. <sup>e</sup>Como control positivo se emplea el 2,4-D.

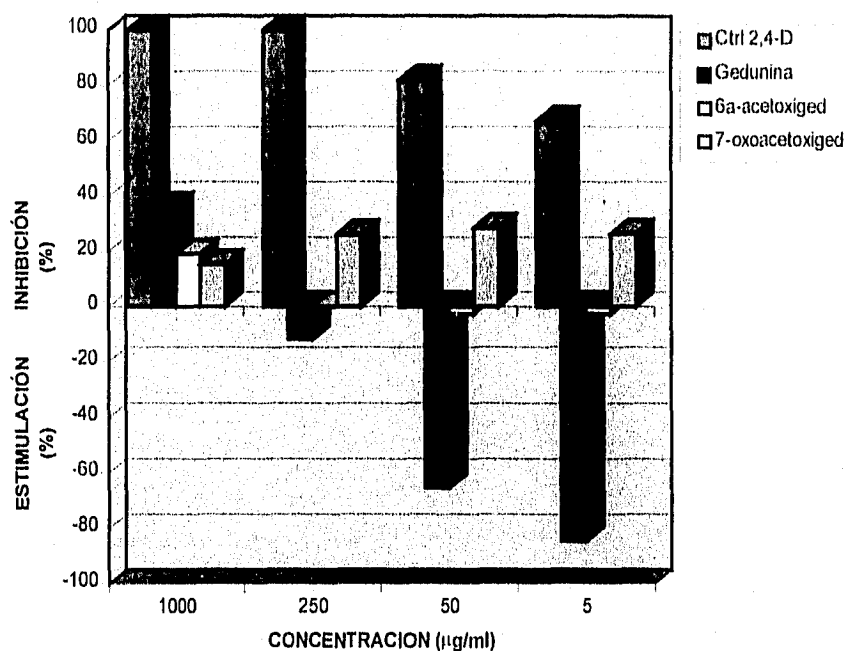
**Gráfica 2.** Efecto de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*.



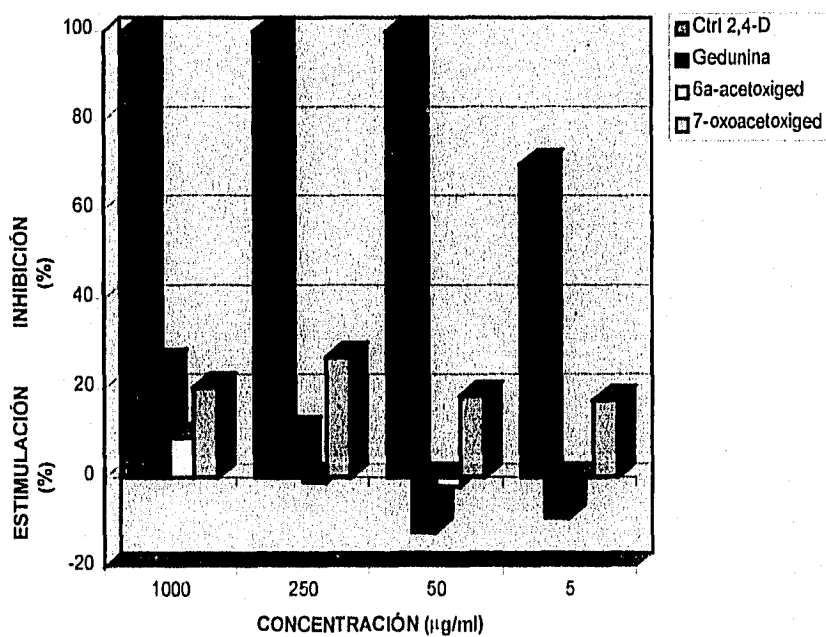
**Gráfica 3.** Efecto de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*.



**Gráfica 4.** Efecto de la gedunina (29) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus*



**Gráfica 5.** Efecto de la gedunina (29) y sus derivados sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crusgalli*.





El melianodiol (**28**) inhibe de manera significativa el crecimiento radicular de las dos semillas de prueba, aunque la especie más sensible fué *A. hypochondriacus*. El efecto inhibitor en este caso fué dependiente de la concentración encontrándose que a 50.0 mg/ml la inhibición es de 41.04 % y a 1000 µg/ml la inhibición es de 86.0 %. Este efecto es comparable al demostrado por el herbicida comercial 2,4-D a 100 µg/ml.

Con relación a la especie *E. crusgalli* se observa que a 5.0 µg/ml el compuesto induce el crecimiento radicular, sin embargo, a mayores concentraciones el efecto es inhibitorio, encontrándose que a 1000 µg/ml la inhibición es del 60 %.

La 21 $\alpha$ -acetoximelianona (**26**) inhibió en mayor grado el crecimiento de *E. crusgalli* a las concentraciones de 50, 250 y 1000 µg/ml. En este caso también es dependiente de la concentración.

La melianona (**27**) a diferencia de los otros protolimonoides no afectó significativamente el crecimiento radicular de las dos especies de prueba a las concentraciones ensayadas.

En general los derivados de la gedunina (**29**) (Tabla 15, Gráficas 4 y 5) no demostraron un efecto inhibitor del crecimiento radicular apreciable. A bajas concentraciones (5 y 50 µg/ml) la gedunina (**29**) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (**31**) estimulan el crecimiento radicular de ambas especies de prueba.

Previamente Segura-Correa (1993) y colaboradores demostraron que las humilnolidas A y C (limonoides del grupo 5 ) inhiben el crecmineto radicular de estas mismas especies de prueba. El efecto inducido por estos limonoides es comparable al demostrado por los protolimonoides melianodiol (28) y la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) en el presente estudio.

El potencial insecticida de algunos de los metabolitos aislados de *G. grandifolia* se determinó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el desarrollo de las larvas del gusano barrenador del maíz *Ostrinia nubilalis*. Los experimentos se iniciaron con larvas neonatas del insecto de prueba, el peso de las larvas se determinó en diferentes etapas (9, 13, 17, 21 y 23 días) del desarrollo de las mismas. Los compuestos evaluados [21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), melianona (27), melianodiol (28) y 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)] se incorporaron a la dieta artificial de las larvas a dos concentraciones diferentes (5 y 50  $\mu$ g/ml). En general todos los compuestos evaluados a 50  $\mu$ g/ml disminuyeron el desarrollo de las larvas de manera significativa. Como se desprende de los resultados ilustrados en la Tabla 17 y la Gráfica 6, la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y la melianona (27) fueron los compuestos más activos inhibiendo el crecimiento de las larvas con un grado de desarrollo de 23 días en un 45.40 y 36.0 %, respectivamente.

El melianodiol (28) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) también inhiben de manera significativa; aunque en menor grado, el desarrollo de las larvas de *Ostrinia nubilalis*.

**Tabla 17.** Efecto de los limonoides y protolimonoides de *G. grandifolia* sobre el peso máximo de las larvas de *O. nubilalis* con un grado de desarrollo de 23 días.

COMPUESTO	Peso máximo de las larvas (mg)	
	5 ppm	50 ppm
Control	82.90 ± 22.18	82.90 ± 22.18
21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)	96.26* ± 28.47	45.25* ± 23.32
Melianona (27)	80.76* ± 36.52	53.05* ± 22.31
Melianodiol (28)	83.94* ± 23.49	68.46* ± 20.36
6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)	85.15* ± 26.44	69.88* ± 27.62

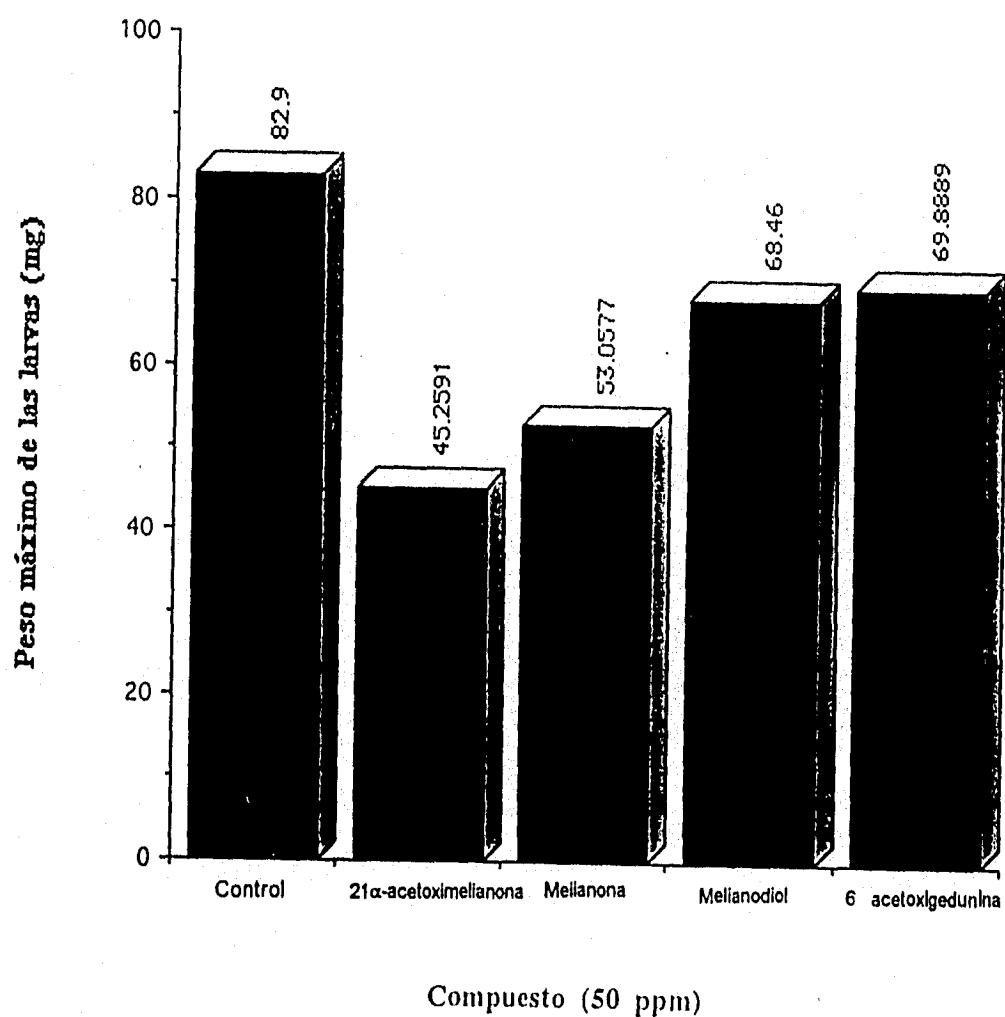
\* P < 0.05

A 5  $\mu$ g/ml ninguno de los compuestos afectó de manera significativa (con relación al control) el desarrollo de las larvas (Jiménez *et al.*, 1996). La disminución del desarrollo larvario inducido por los compuestos aislados de *G. grandifolia* es comparable al previamente demostrado por otros compuestos de naturaleza limonoide (Arnason *et al.*, 1987 y 1993).

Previamente la melianona (27) había demostrado una actividad fago inhibidora en contra del insecto *Epilachna varivestris* (Champagne *et al.*, 1992; Arnason *et al.*, 1987 y 1993) sin embargo, su efecto sobre el desarrollo de *Ostrinia nubilalis* no ha sido descrito.

Por último, cabe destacar que los otros dos limonoides [gedunina (29) y 7-deacetoxi-7-oxogedunina (31)] aislados en el presente estudio no fueron evaluados ya que previamente se ha demostrado su actividad fagoinhibidora e inhibidora del crecimiento de varios insectos, incluyendo el gusano barrenador del maíz (Champagne *et al.*, 1992).

**Gráfica 6. Efecto de los limonoides y protolimonoides de *G. grandifolia* sobre el peso máximo de las larvas de *O. nubilalis* con un grado de desarrollo de 23 días.**



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.- En el presente estudio se demostró el potencial insecticida de los extractos de la corteza y la semilla de *G. grandifolia* mediante la evaluación del efecto sobre el desarrollo de las larvas del gusano barrenador del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner). De manera adicional, se investigó el potencial herbicida de la especie a través de la determinación del efecto de los extractos derivados de las diferentes partes vegetales sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crusgalli*.

2.- El fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico activo de la testa de la semillas (extracto  $\text{CHCl}_3$ -hex 1:1), utilizando un ensayo bioautográfico para monitorear la actividad fitotóxica, permitió el aislamiento y caracterización de tres protolimonoides [21 $\alpha$ -acetoximelianona (26), melianona (27) y melianodiol (28)] y tres limonoides [gedunina (29), 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30), 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)]. El protolimonoides 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) constituye un nuevo producto natural. Así mismo el estudio fitoquímico convencional del extracto ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH 1:1) de la corteza permitió el aislamiento y caracterización de un dos triterpenoides [ $\beta$ -lupeol (32) y acetato de  $\beta$ -lupeol (33)], un esteroles [ $\beta$ -D-glucositosterol (34)], un limonoide (29) y dos protolimonoides (27) y (28), estos últimos compuestos aislados también de la testa de las semillas.

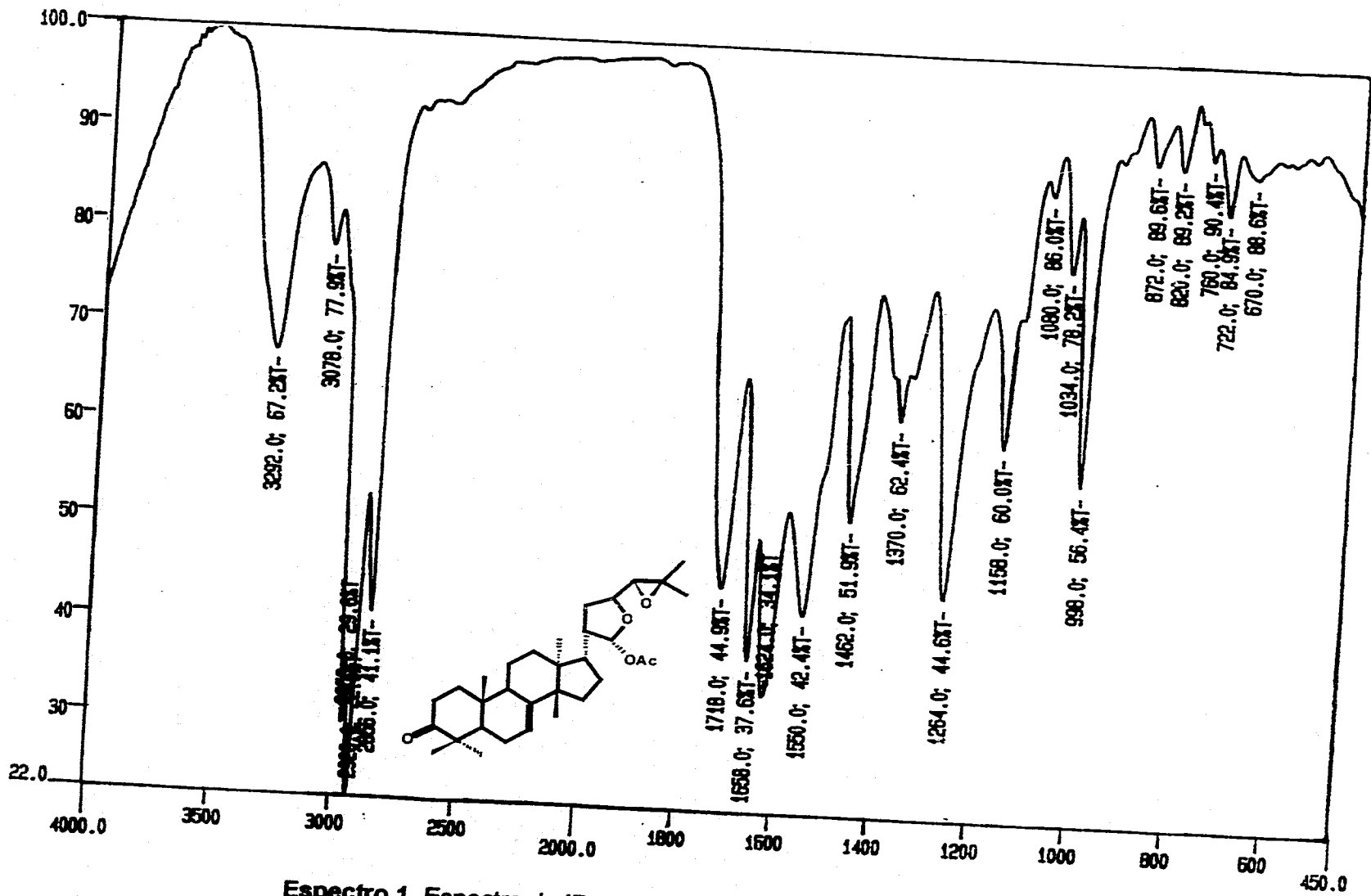
En general la caracterización de los productos naturales se realizó por métodos químicos y espectroscópicos. En el caso de la 7-deacetoxi-7-oxogedunina (30) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) la determinación inequívoca de su estructura se realizó mediante un análisis de difracción de Rayos X.

3.- Se determinó el efecto regulador del crecimiento vegetal de los productos naturales aislados del extracto fitotóxico encontrándose que los protolimonoides melianodiol (28) y 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) inhiben de manera significativa el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* y *E. crusgalli*. A pesar de que el extracto de la corteza contiene también los principios fitotóxicos detectados en la semilla el efecto estimulante inicial demostrado por el extracto puede deberse a la presencia de otras sustancias que antagonicen el efecto inhibitor demostrados por la 21 $\alpha$ -acetoximeilanona (26) y la melianona (27).

4.- Los protolimonoides 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26) y melianona (27) muestran un importante efecto inhibitor del crecimiento de las larvas del gusano barrenador del maíz. A 50  $\mu$ g/ml estos productos reducen el peso máximo de las larvas del insecto de prueba en un 45.5 y 36 % respectivamente, en relación al control. Por otra parte el melianodiol (28) y la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31) modifican el crecimiento de las larvas de prueba, observándose también una reducción significativa del peso promedio de las mismas.

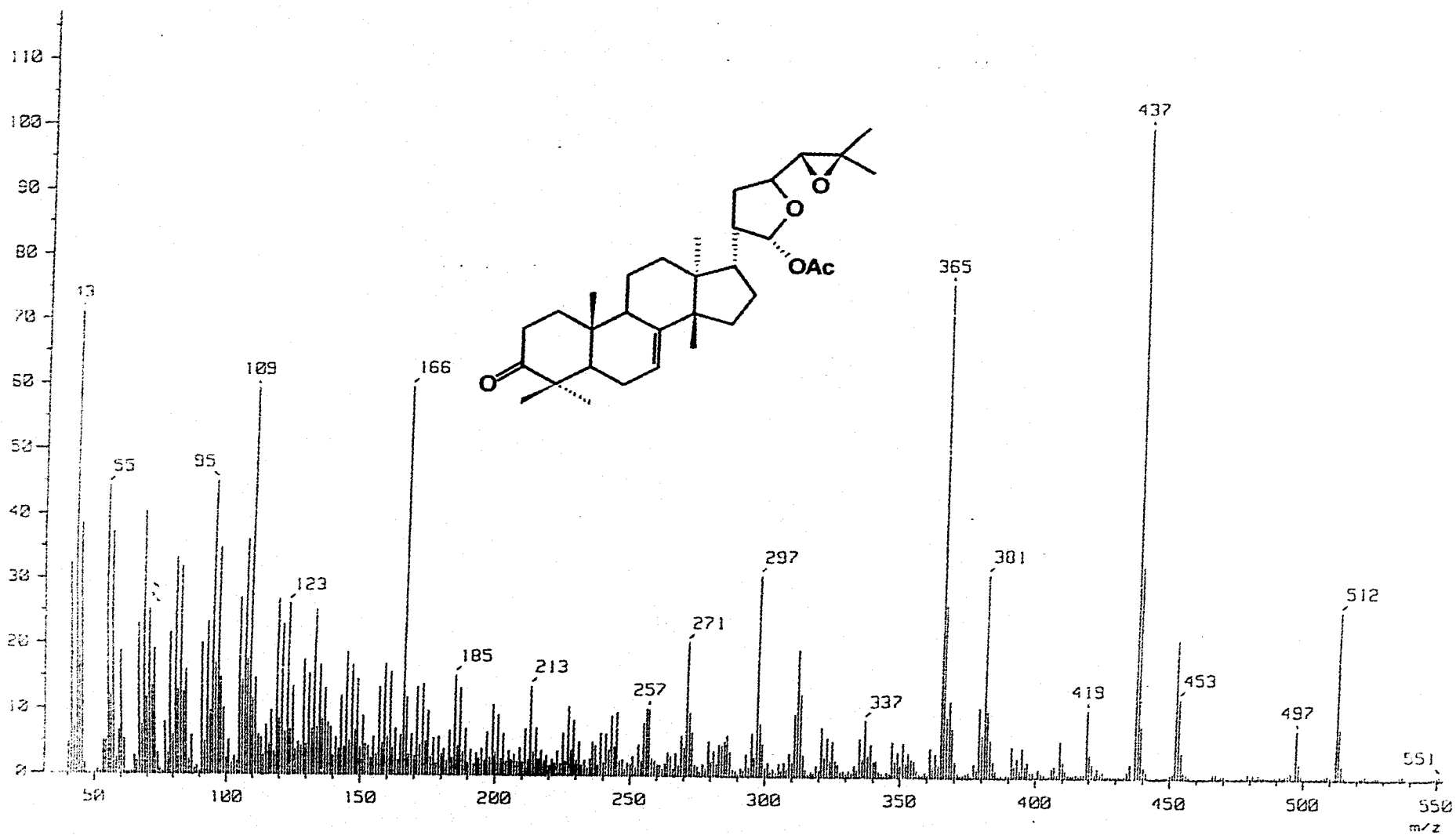
5. La especie *Guarea grandifolia* constituye una fuente potencial de compuestos con propiedades insecticidas y reguladoras del crecimiento vegetal.

# ***Apendice 1***

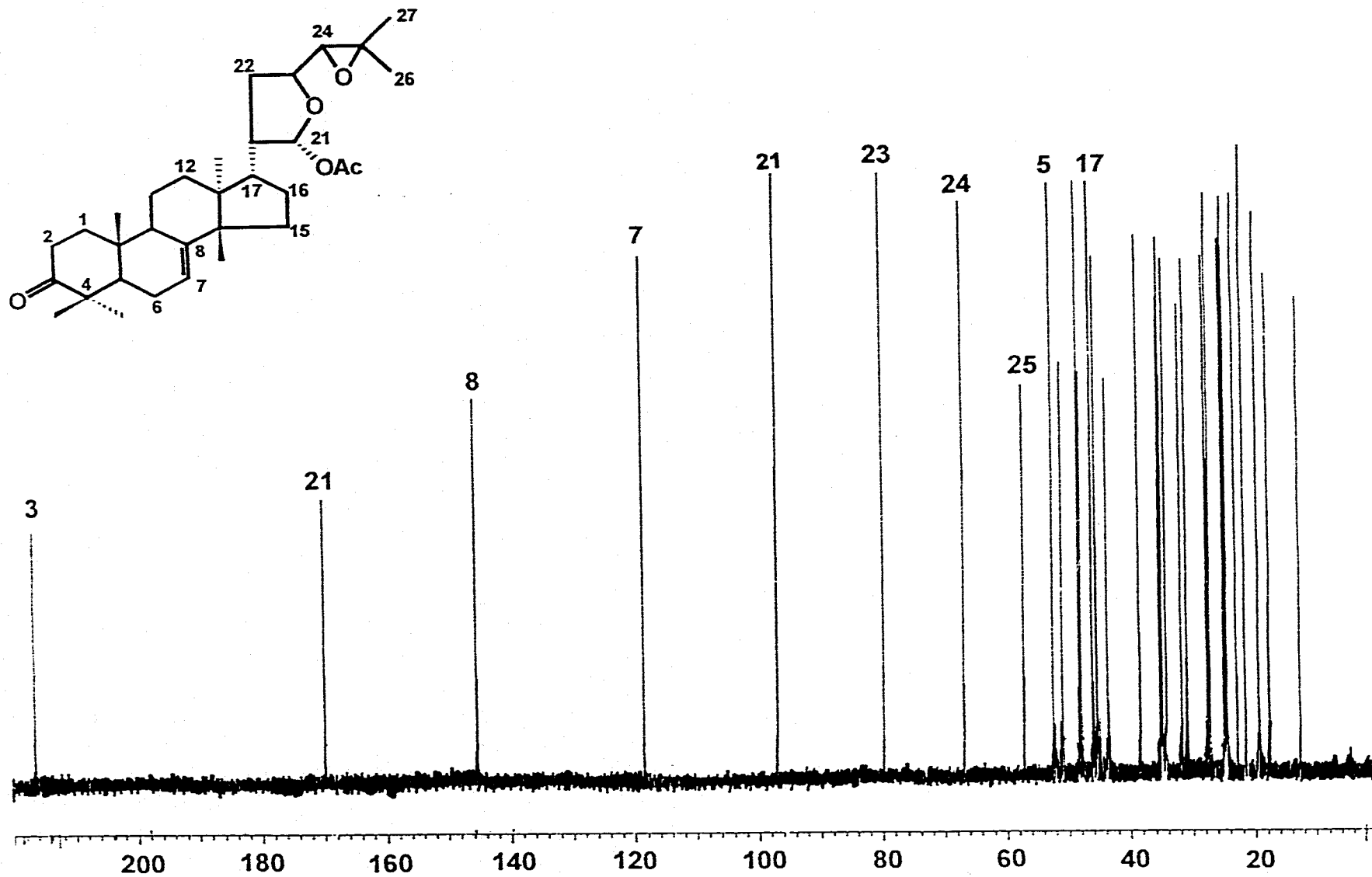


Espectro 1. Espectro de IR de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)

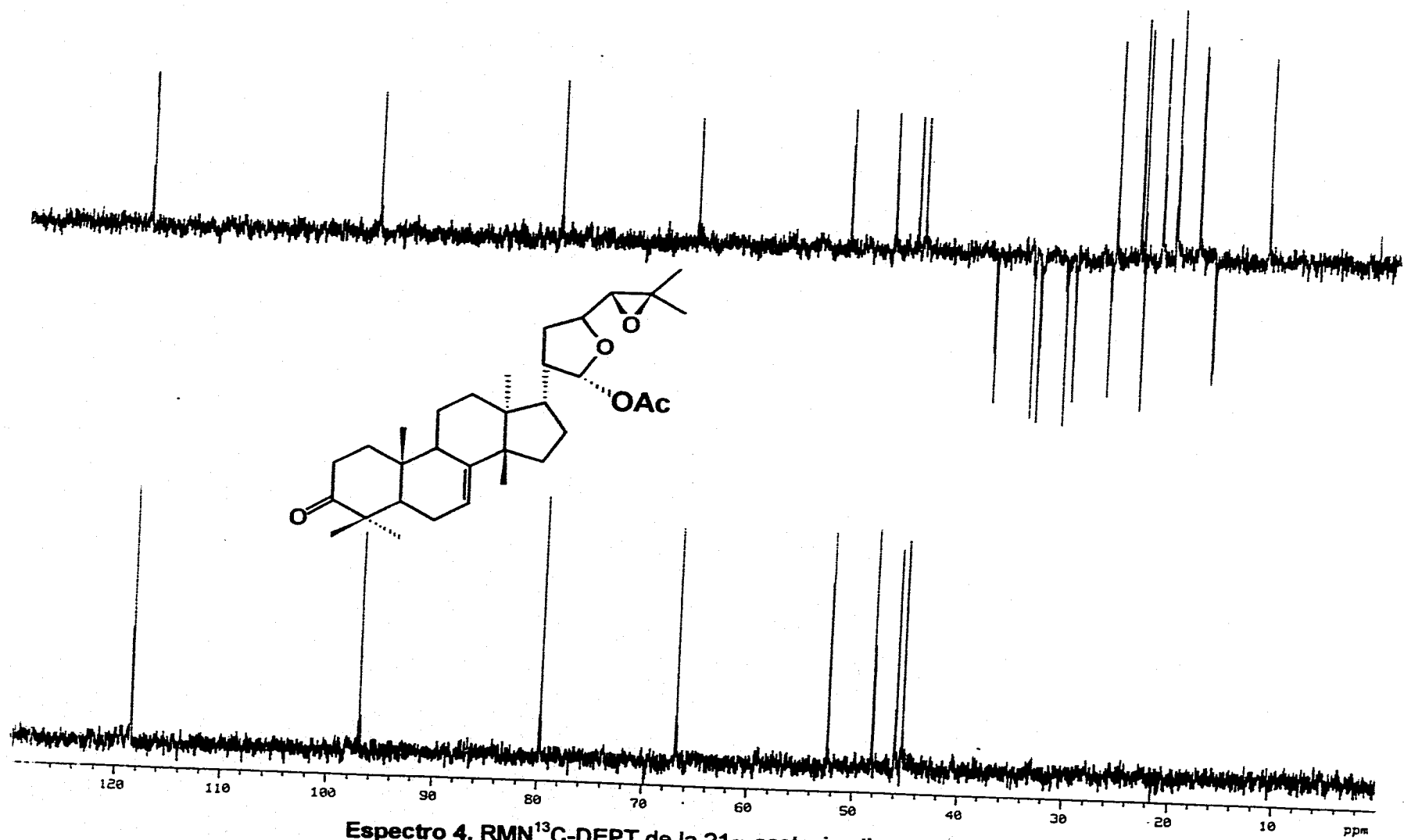




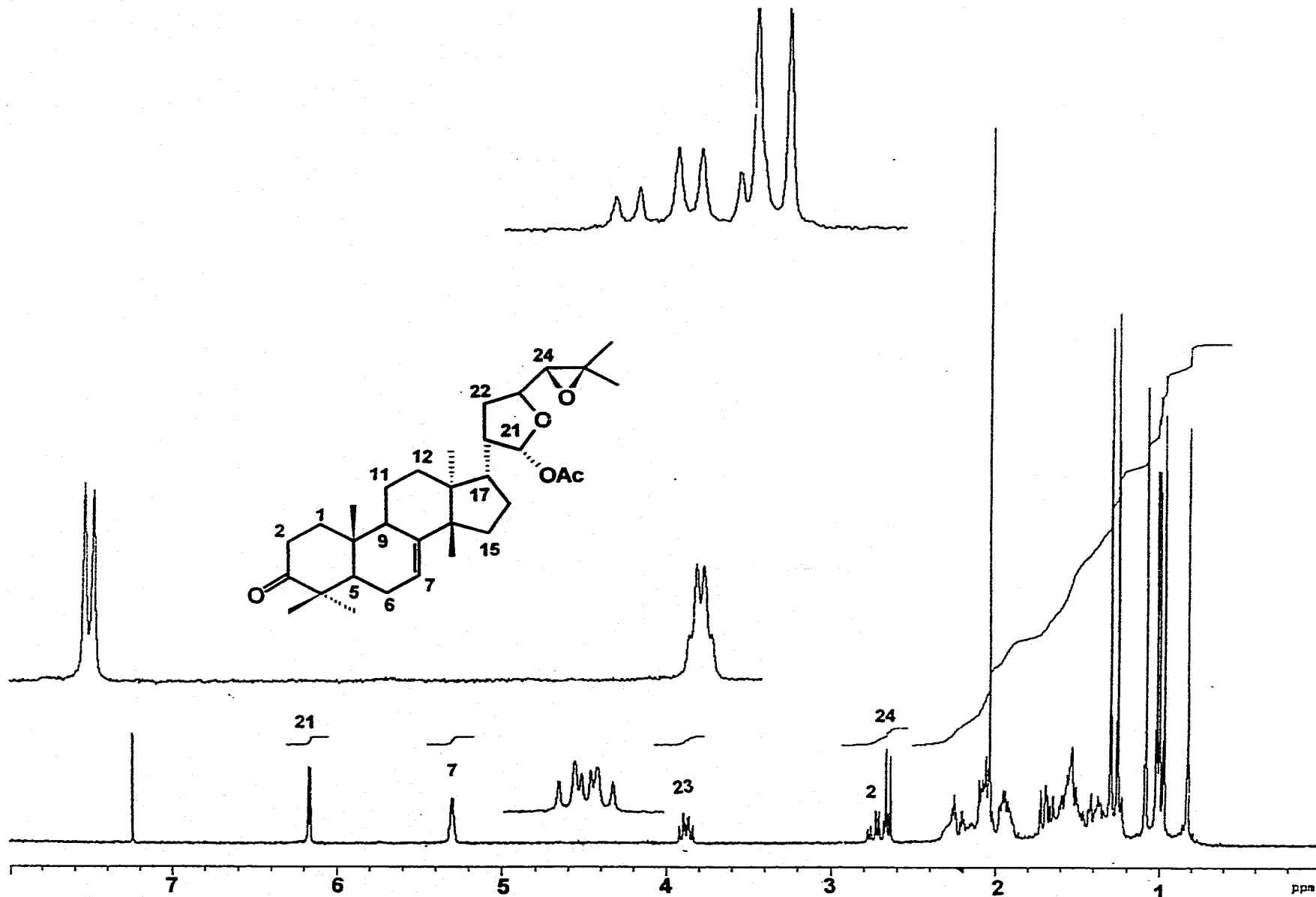
**Espectro 2. EMIE de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)**



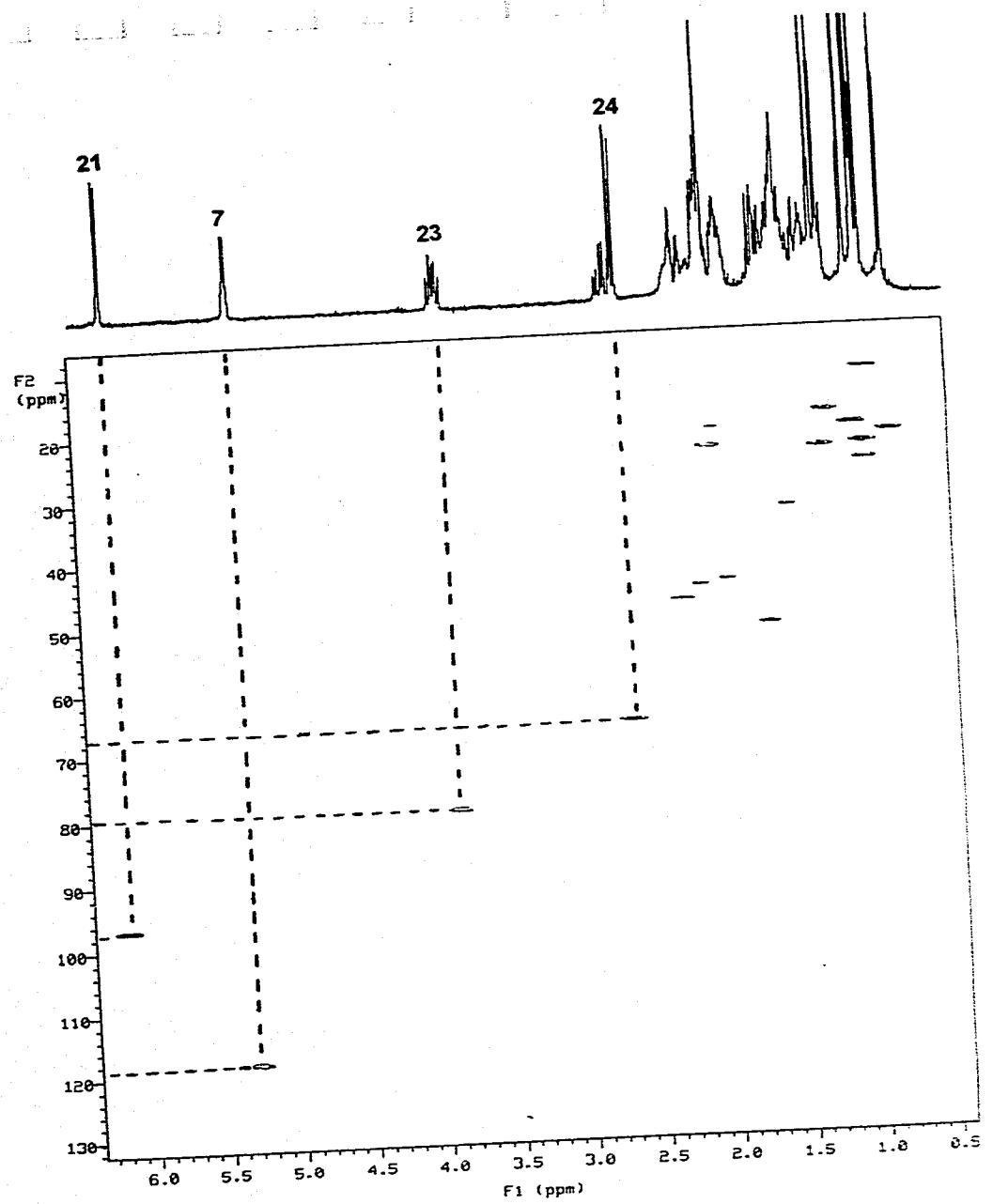
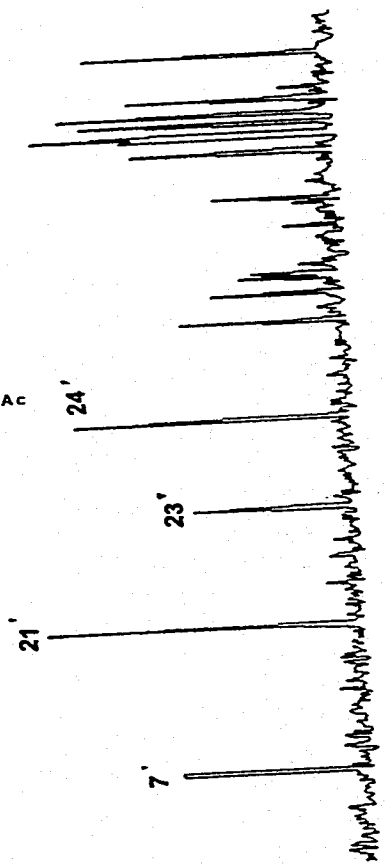
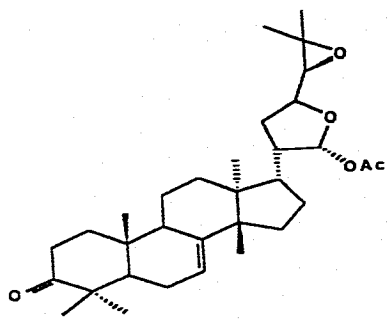
Espectro 3. RMN $^{13}\text{C}$  de la 21 $\alpha$ -acetoximeliano (26)



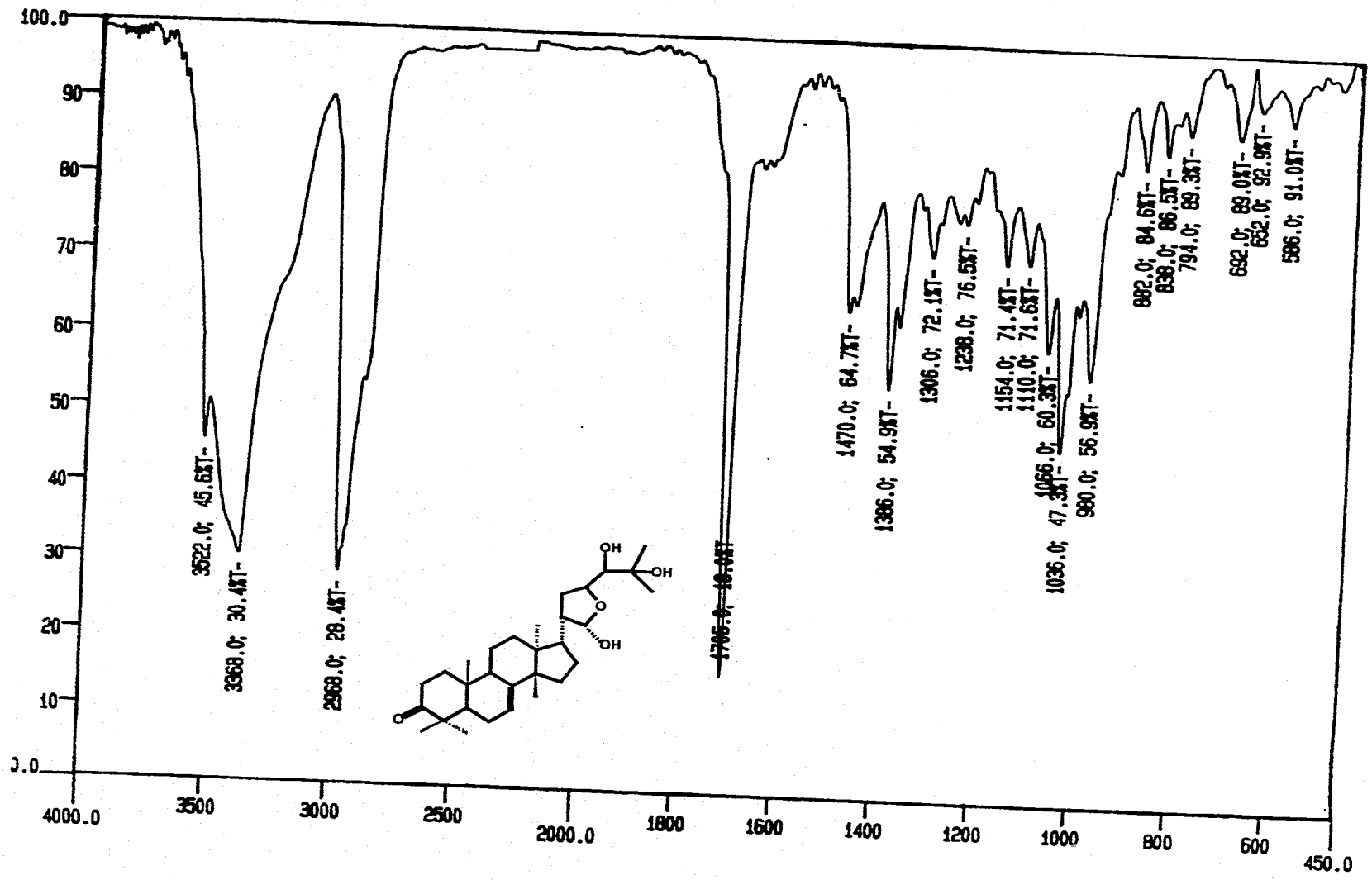
Espectro 4. RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (26)



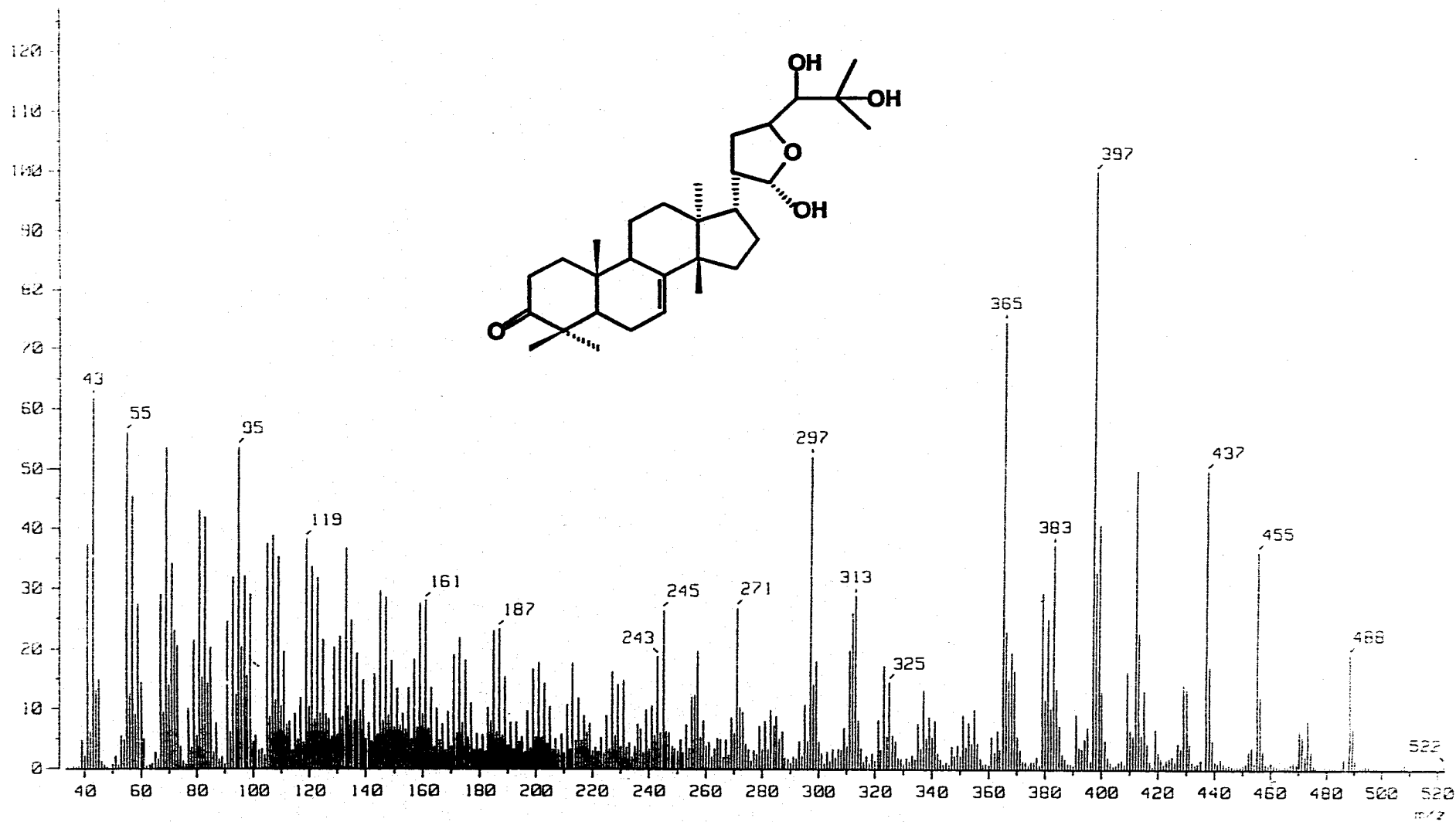
Espectro 5. RMN<sup>1</sup>H de la 21α-acetoximelianona (26)



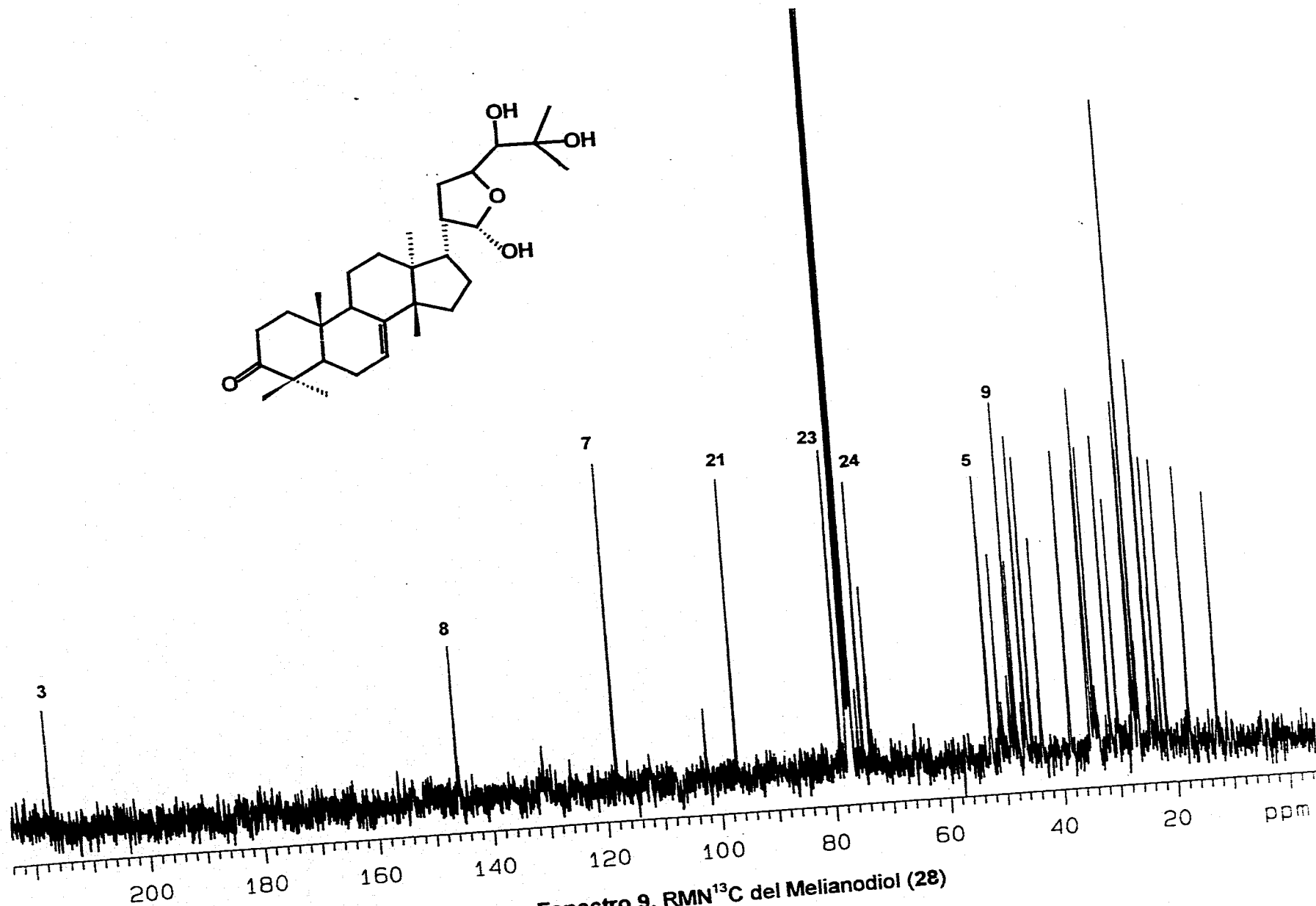
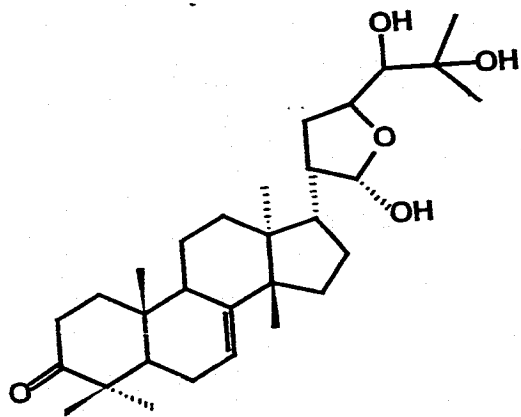
**Espectro 6 .RMN-HETCOR de la 21 $\alpha$ -acetoximelianona (11)**



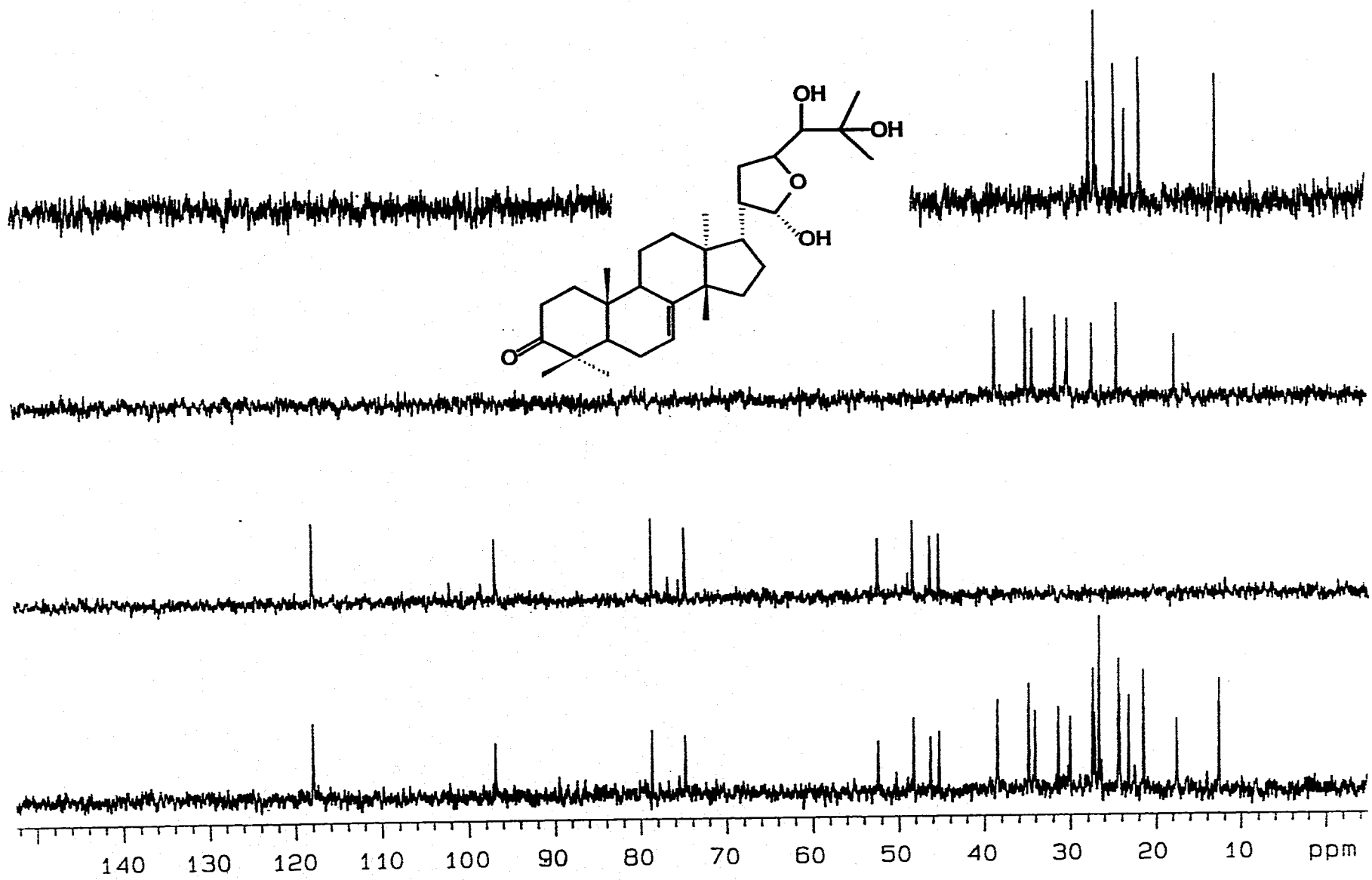
Espectro 7. Espectro de IR del Melianodiol (28)



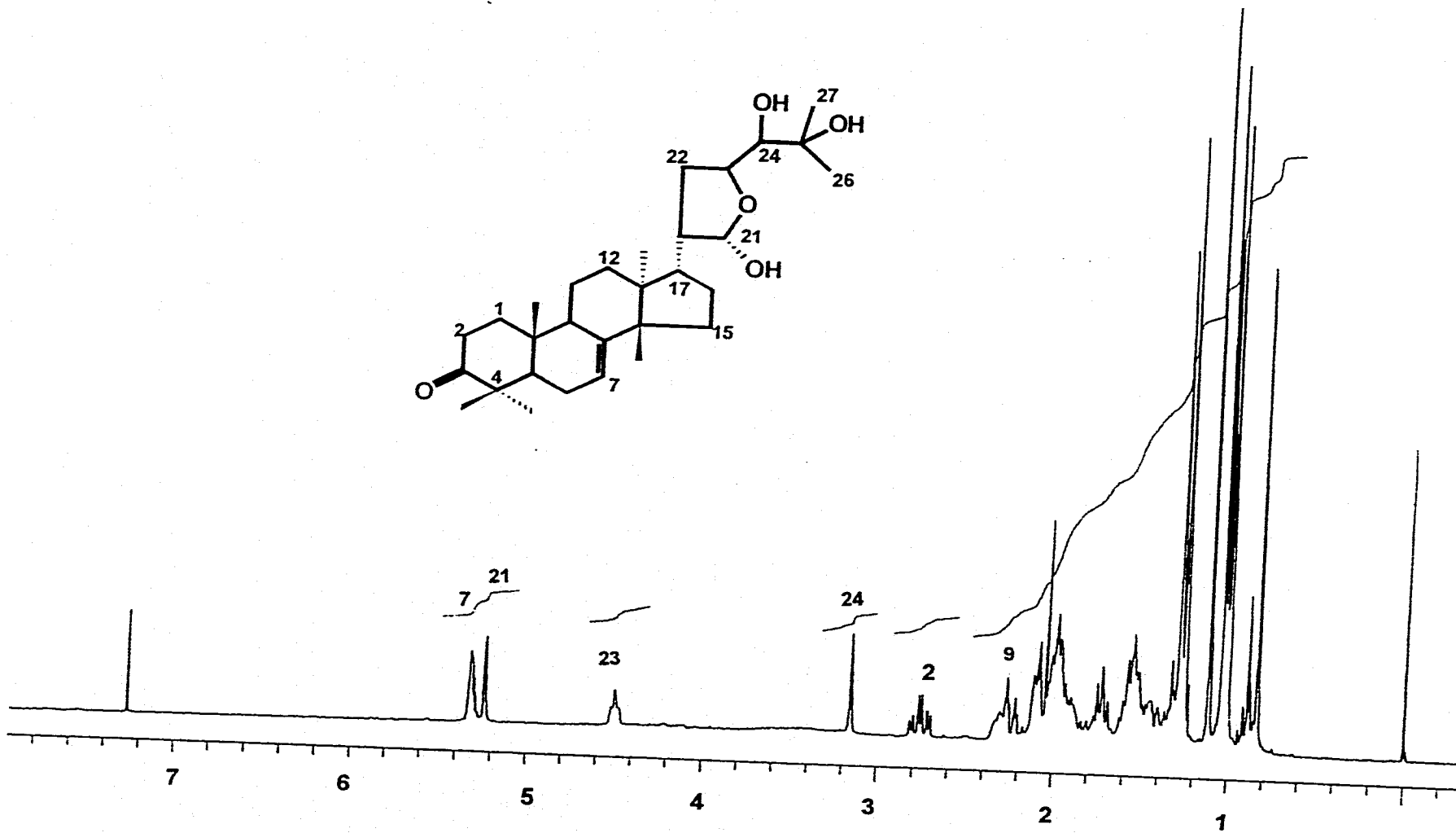
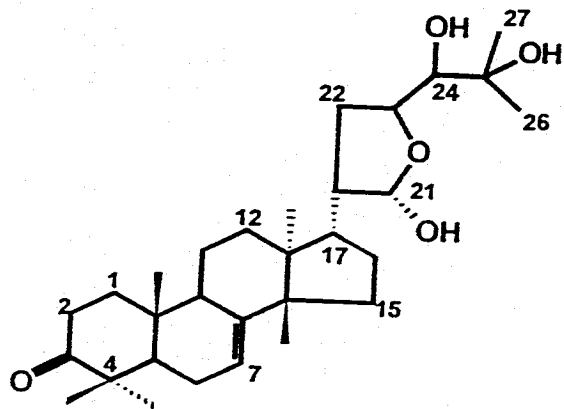
**Espectro 8. EMIE del Melianodiol (28)**



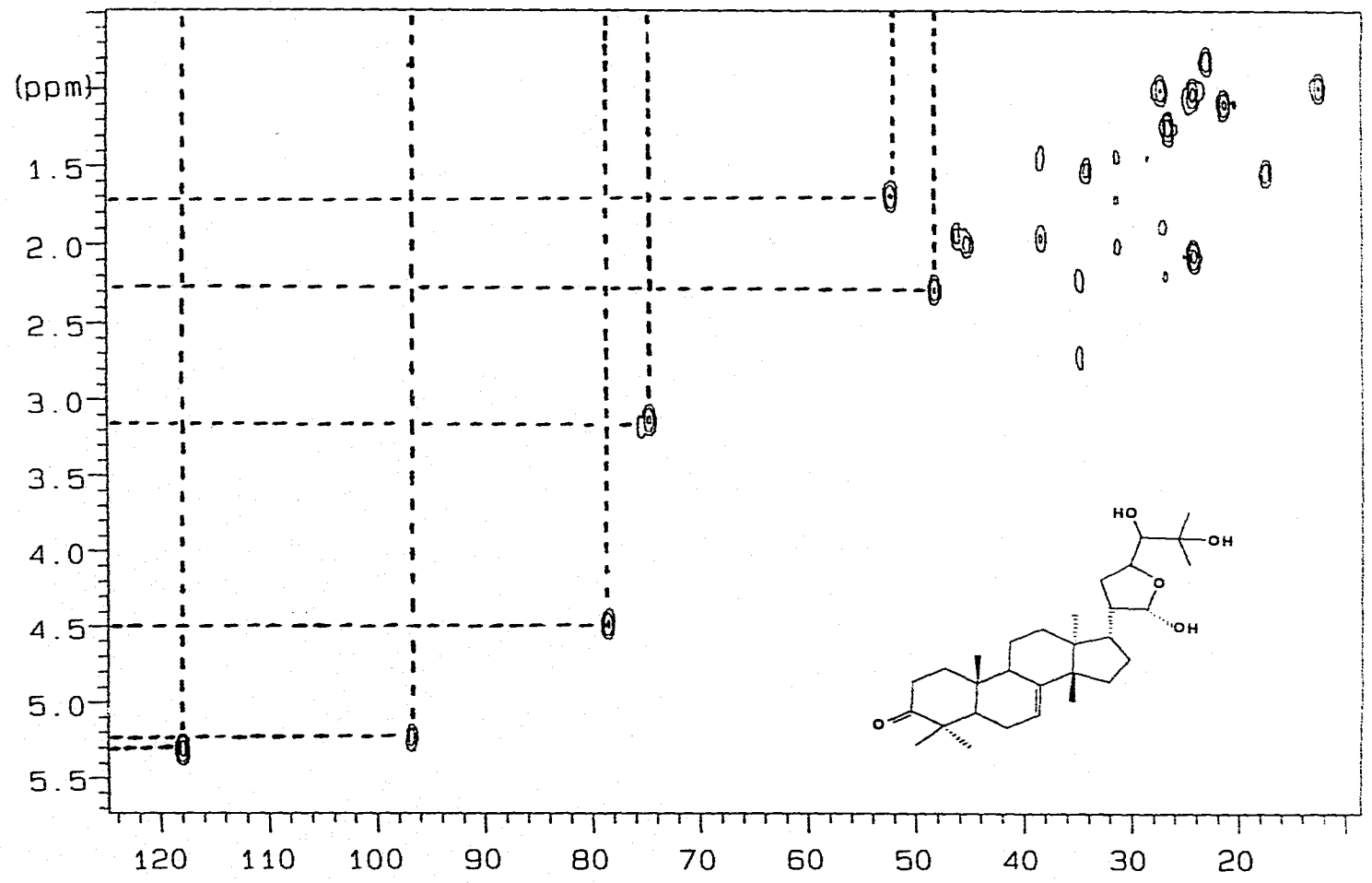
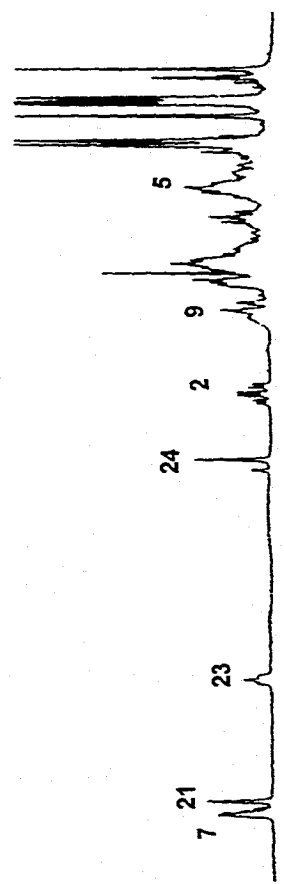
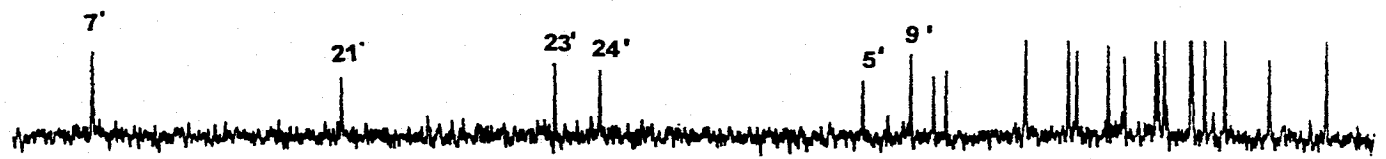




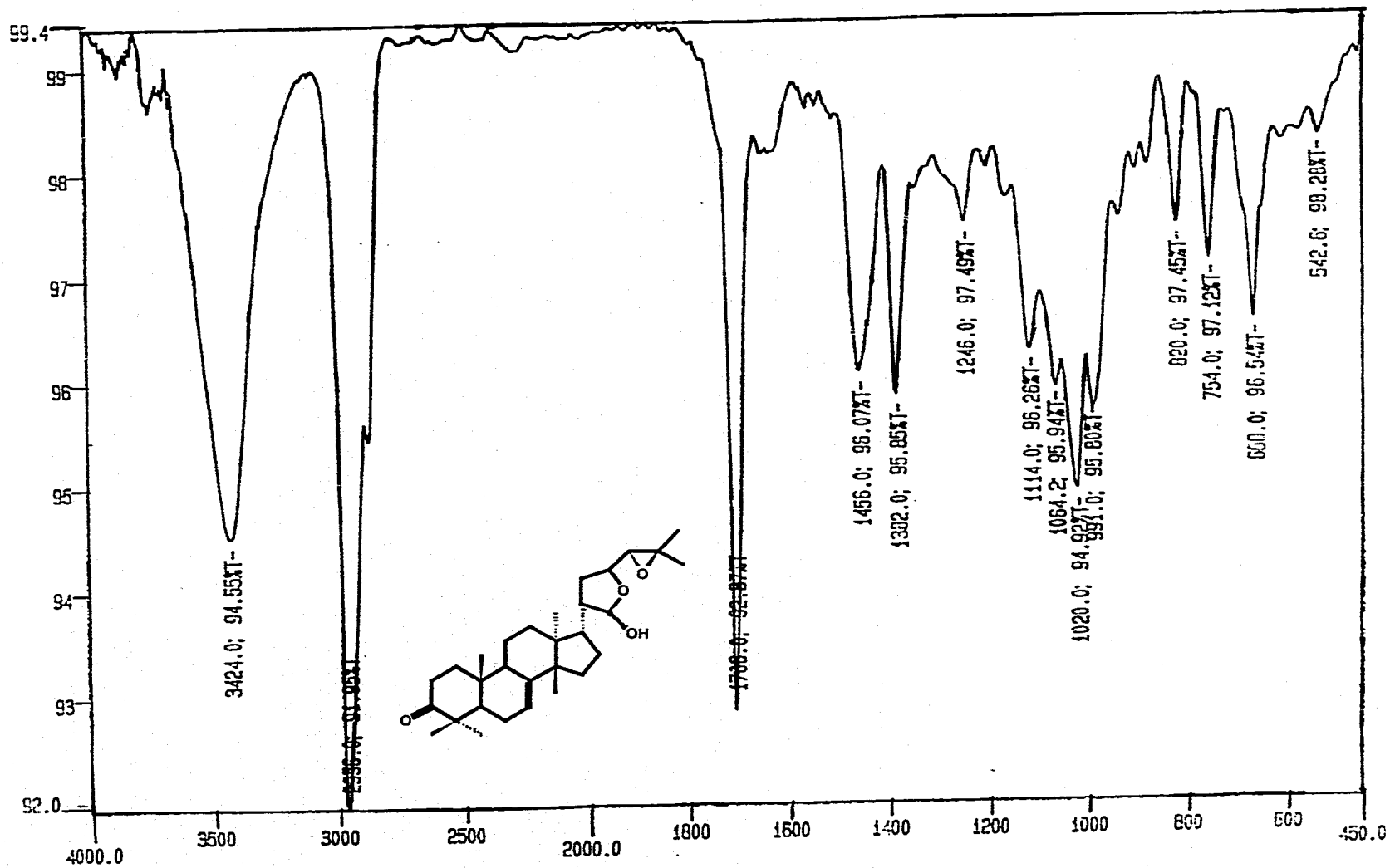
Espectro 10. RMN<sup>13</sup>C-DEPT del Melianodiol (28)



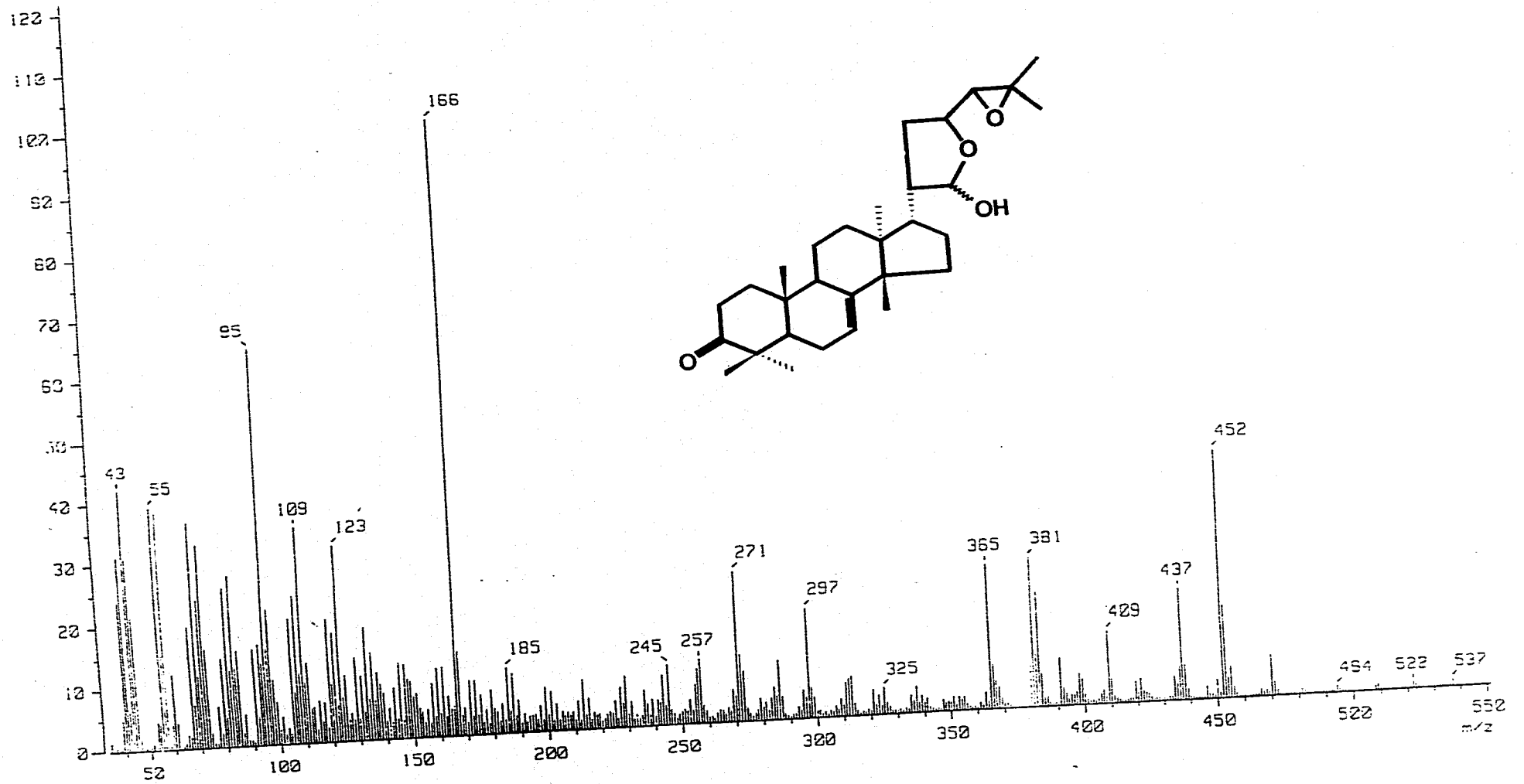
Espectro 11. RMN<sup>1</sup>H del Melianodiol (28)



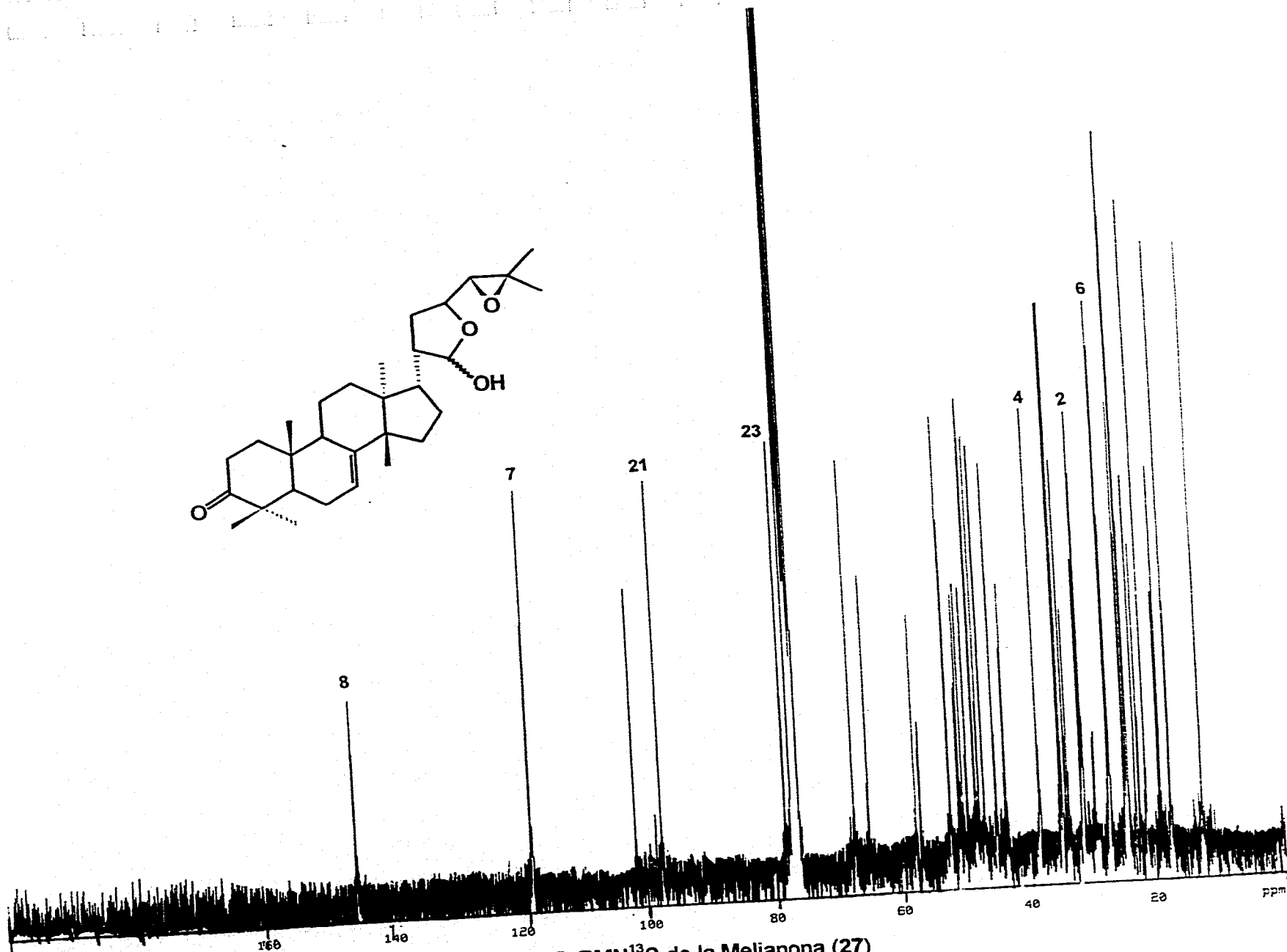
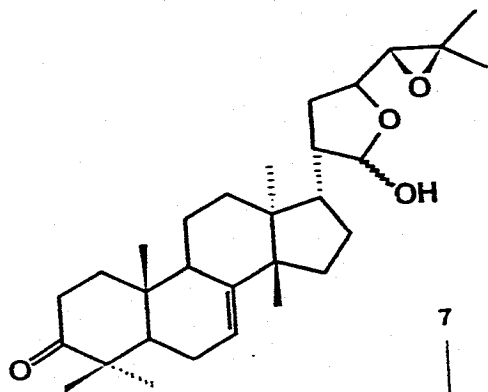
**Espectro 12. RMN-HETCOR del Melianodiol (28)**



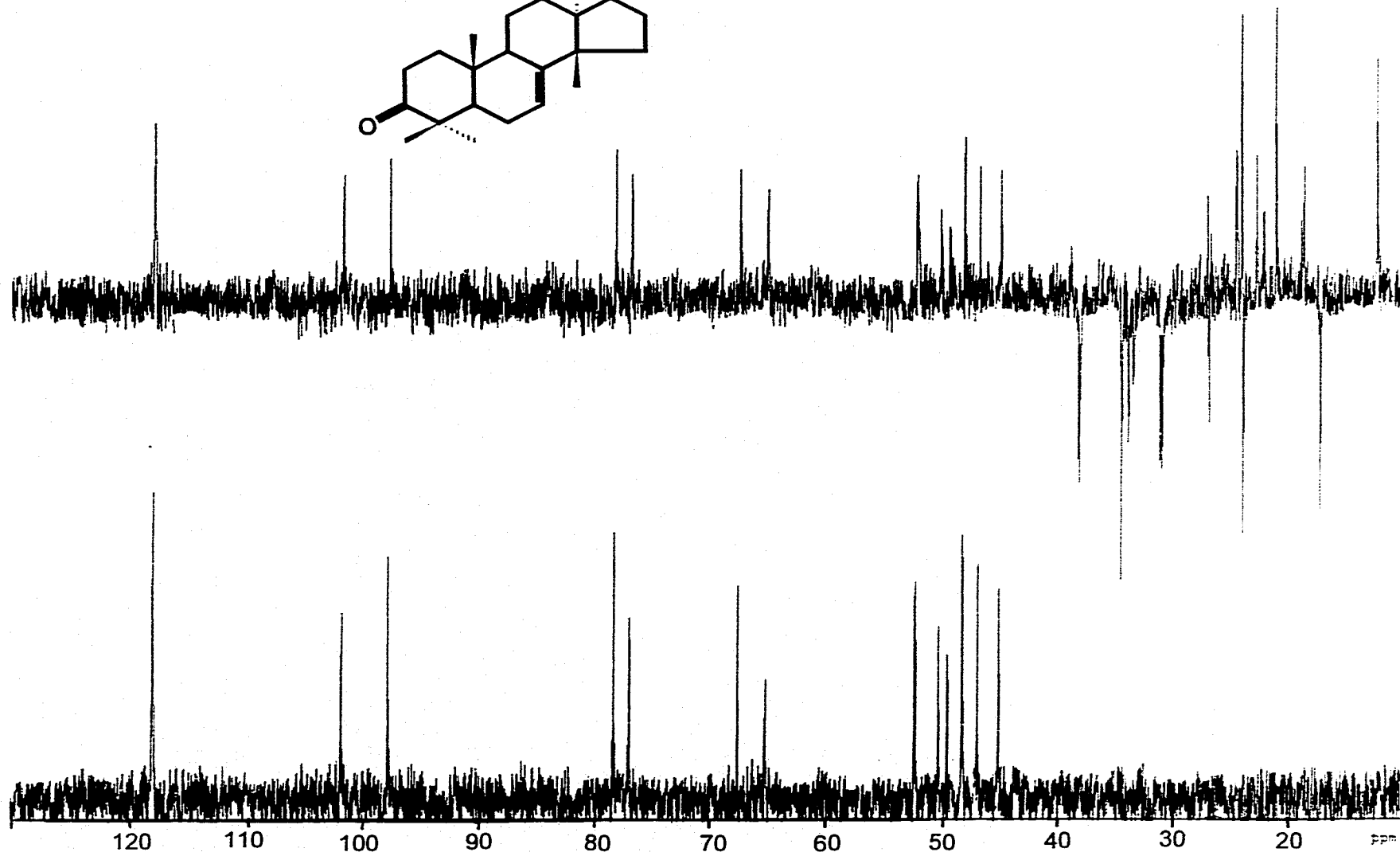
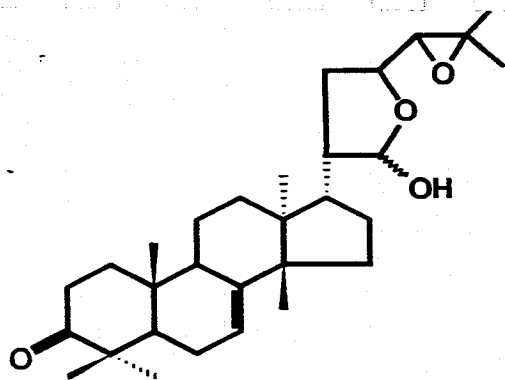
Espectro 13. Espectro de IR de la Melianona (27)



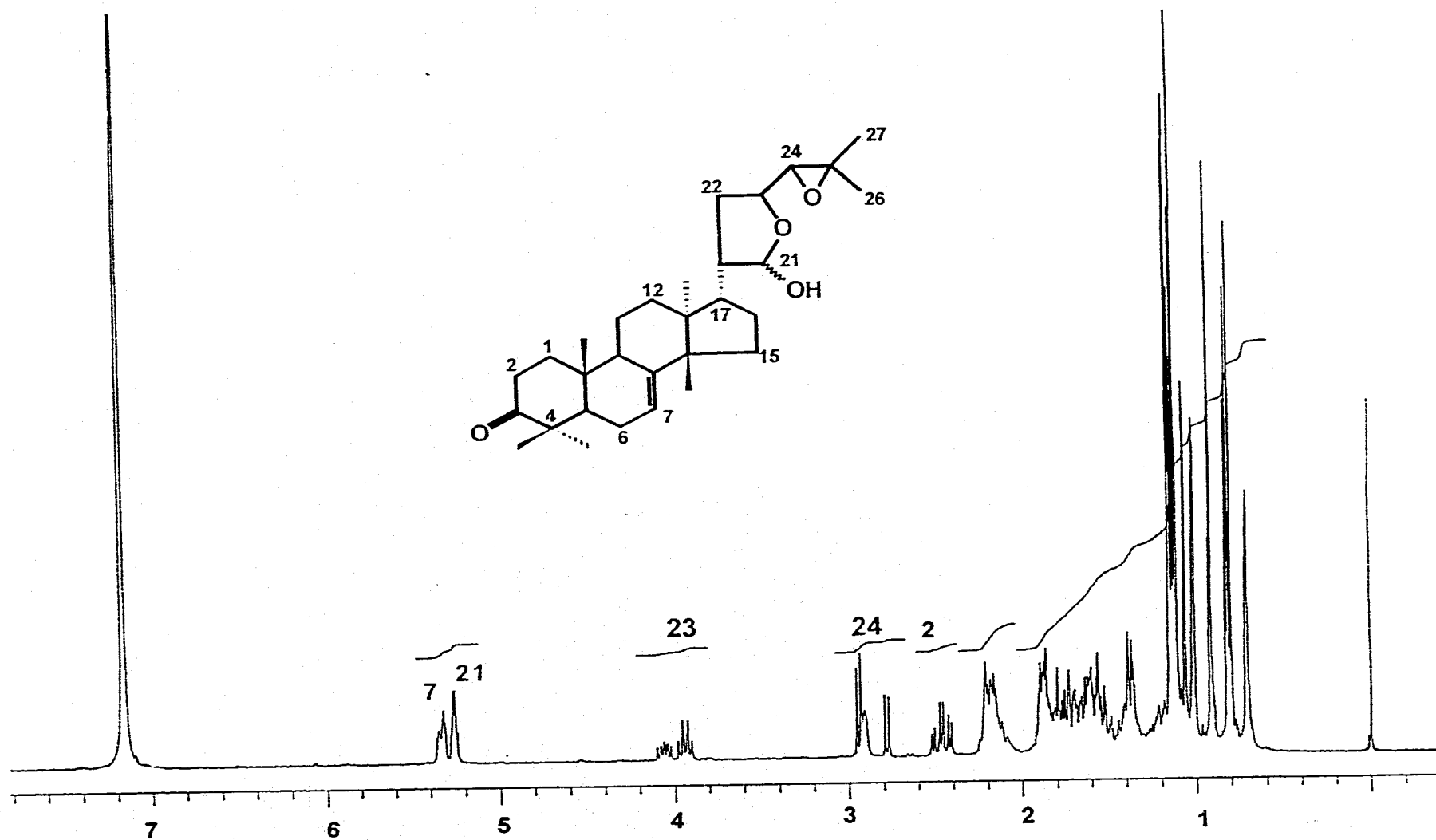
**Espectro 14. EMIE de la Melianona (27)**



Espectro 15. RMN<sup>13</sup>C de la Melianona (27)

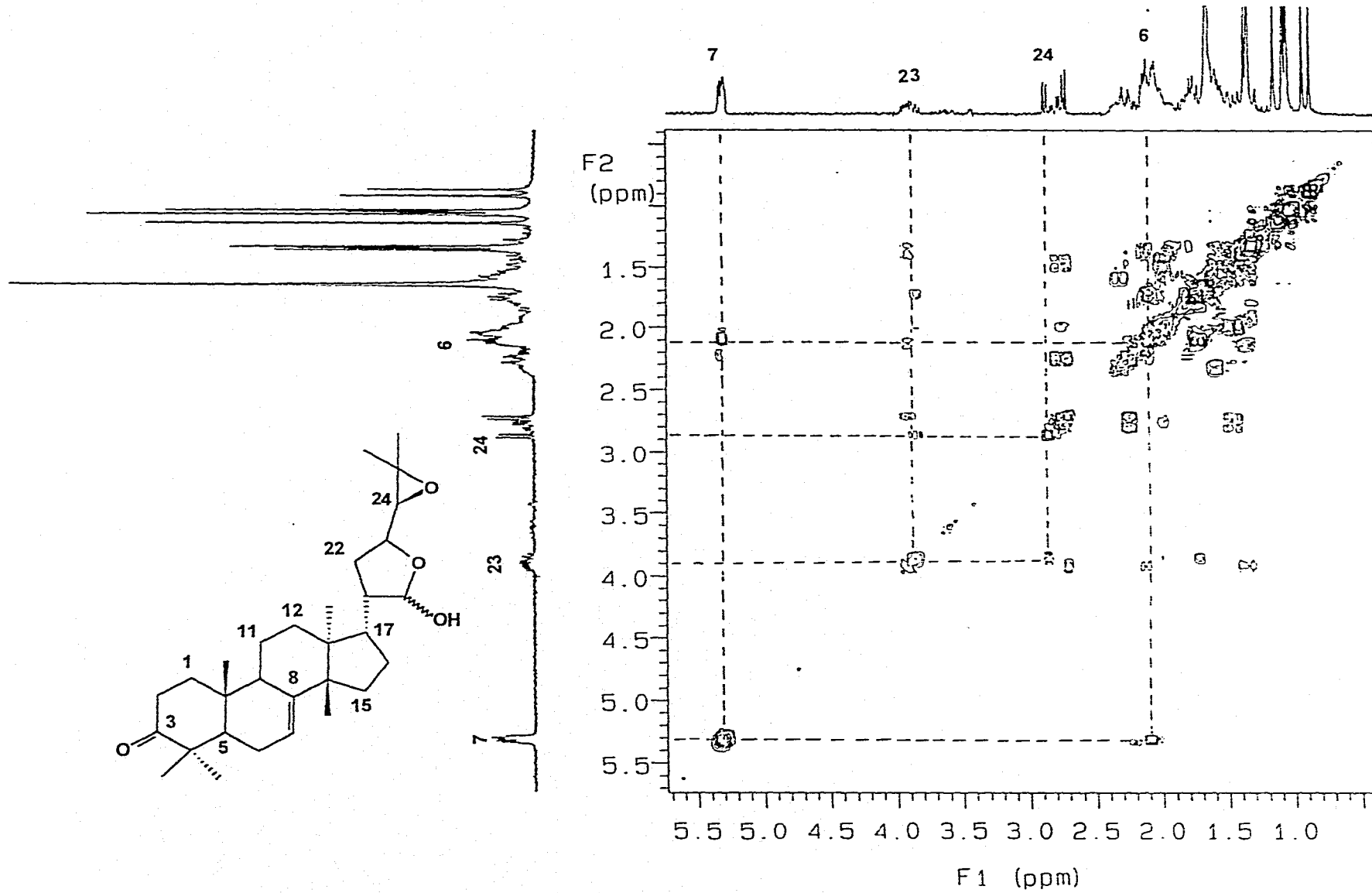


**Espectro 16. RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT de la Melianona (27)**

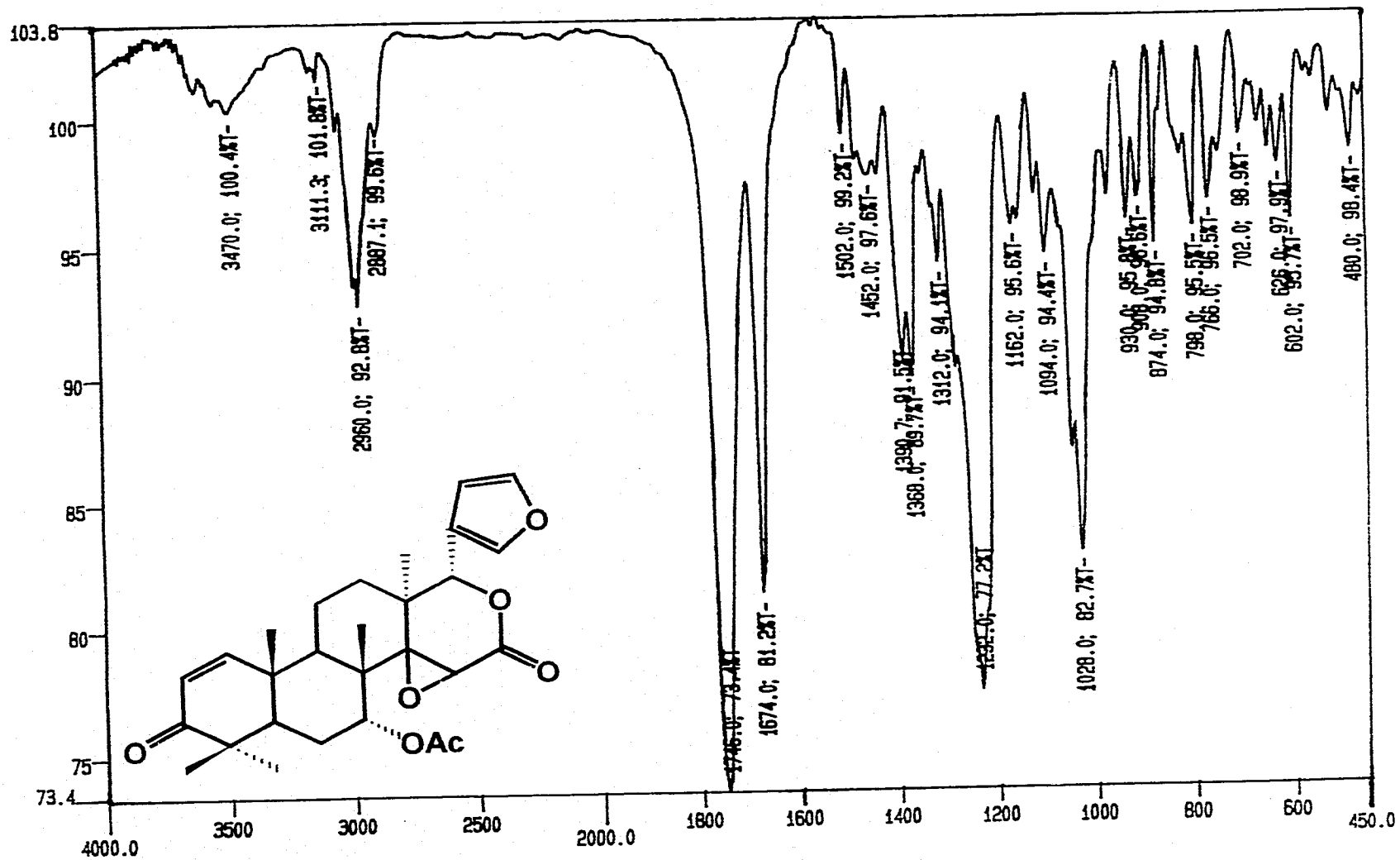


Espectro 17. RMN<sup>1</sup>H de la Melianona (27)

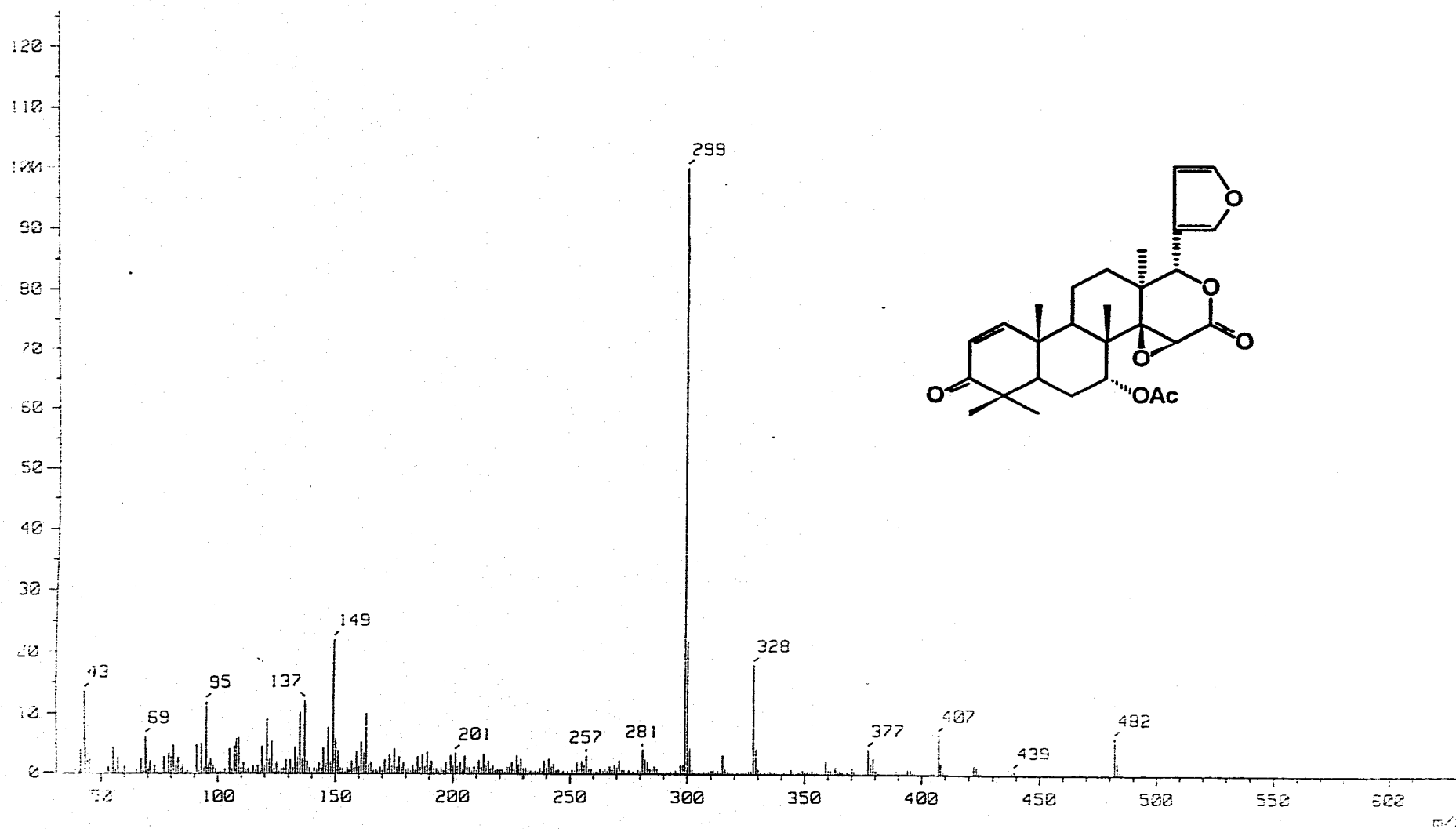




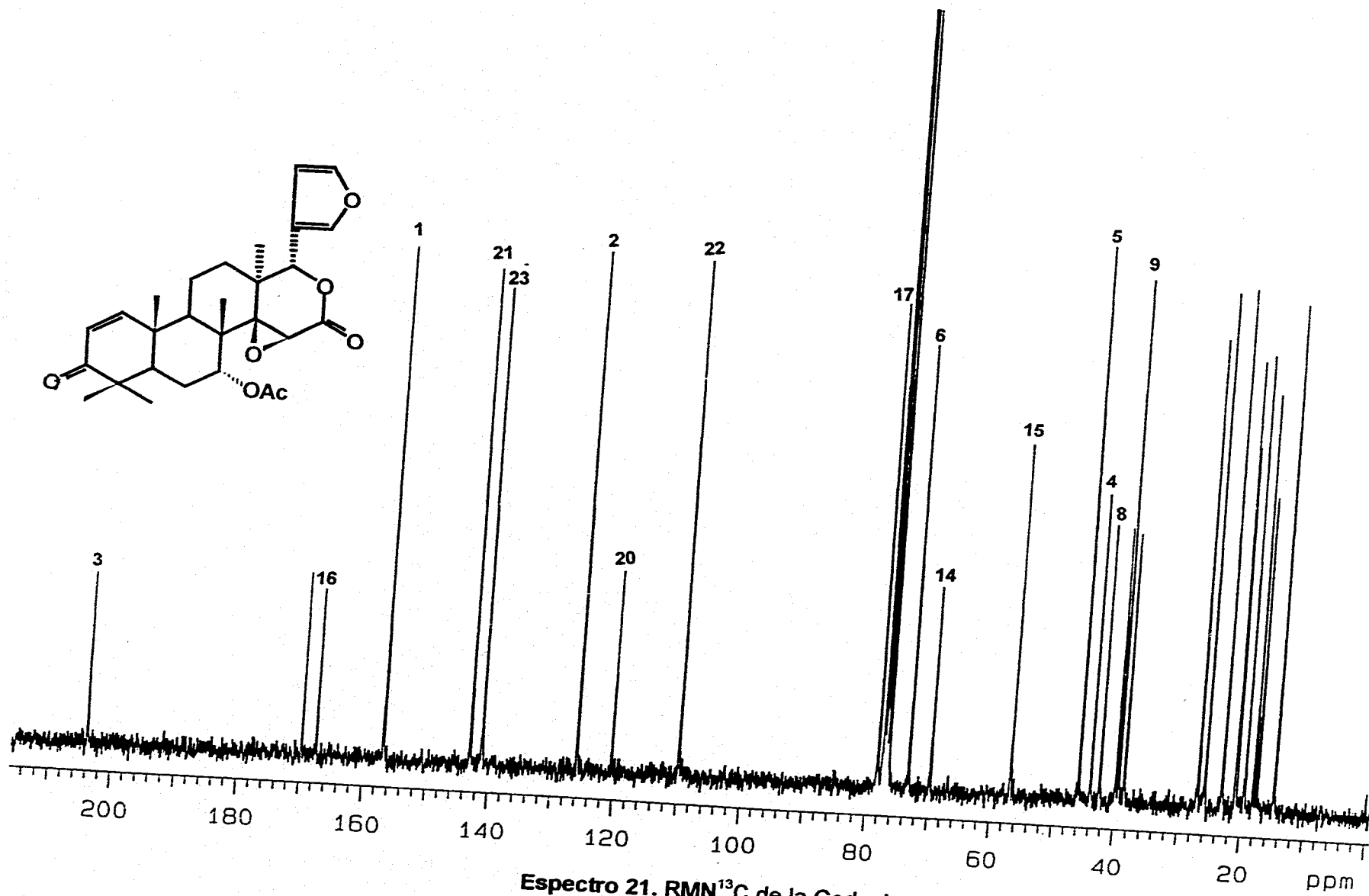
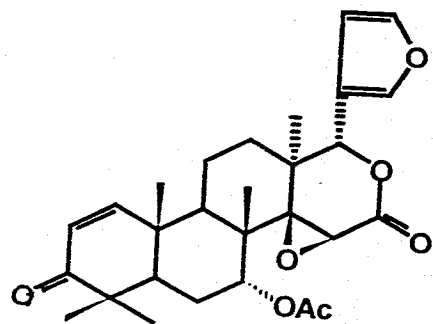
**Espectro 18. RMN-COSY de la Melianona (27)**



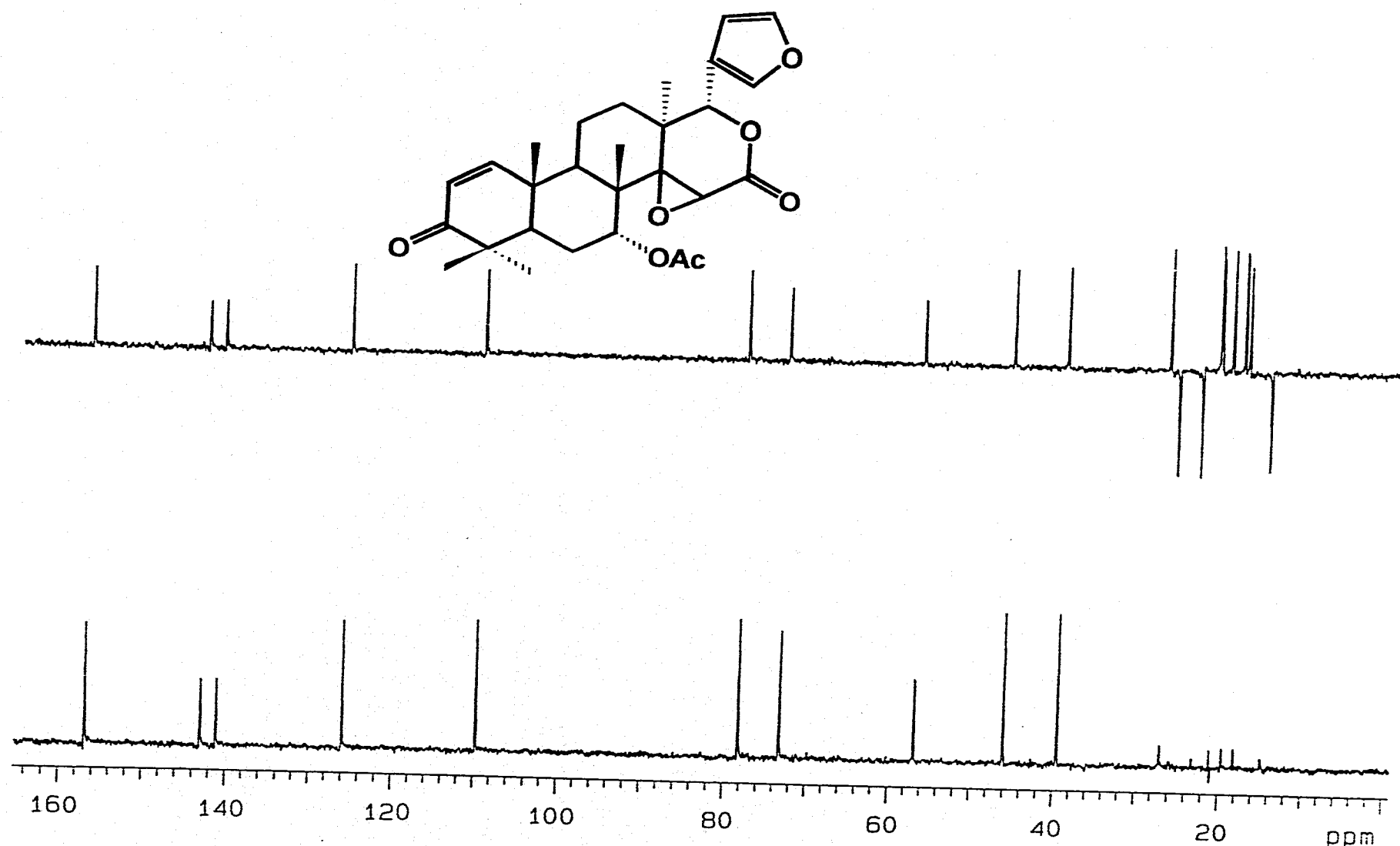
Espectro 19. Espectro de IR de la Gedunina (29)



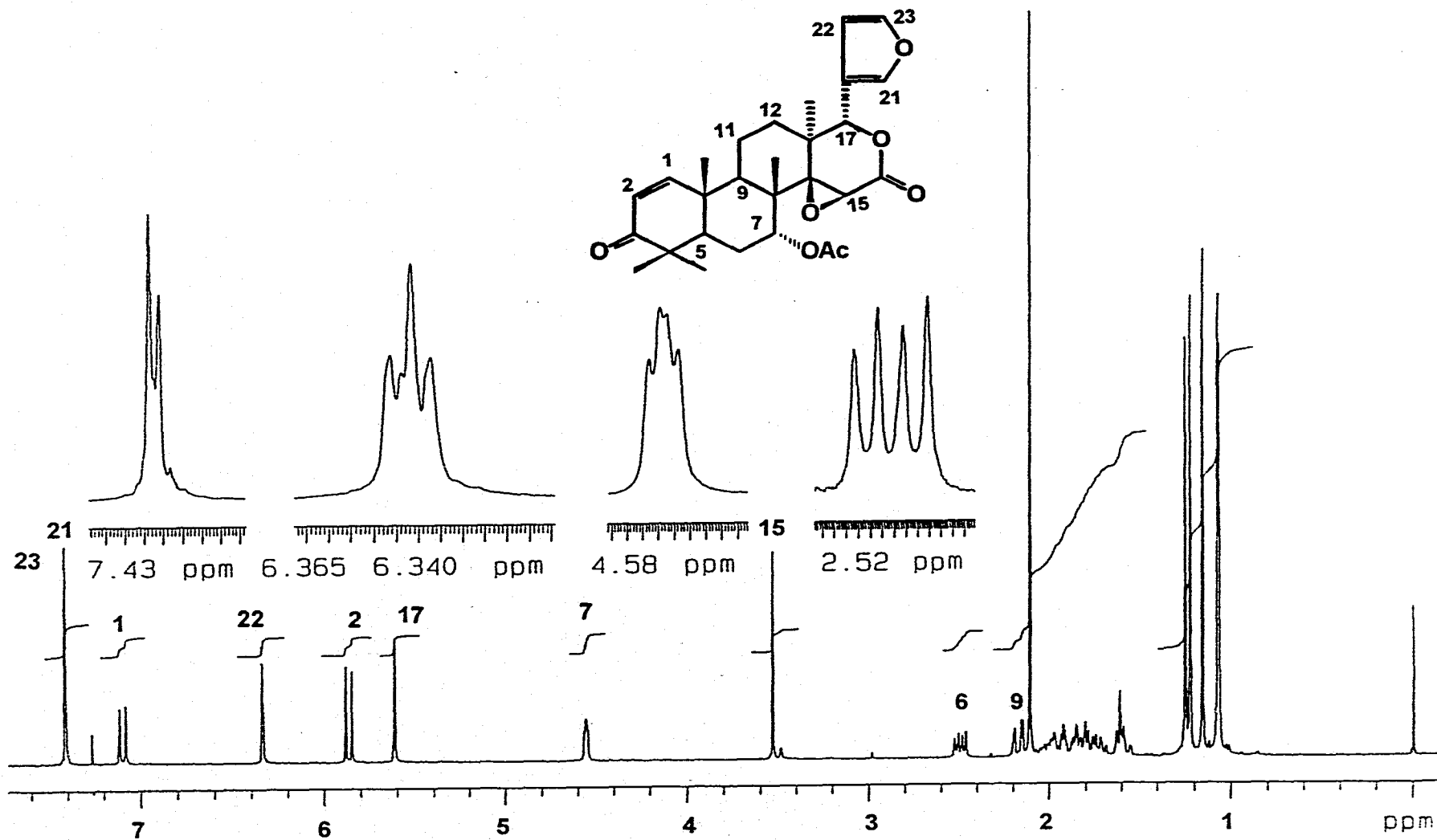
**Espectro 20. EMIE de la Gedunina (29)**



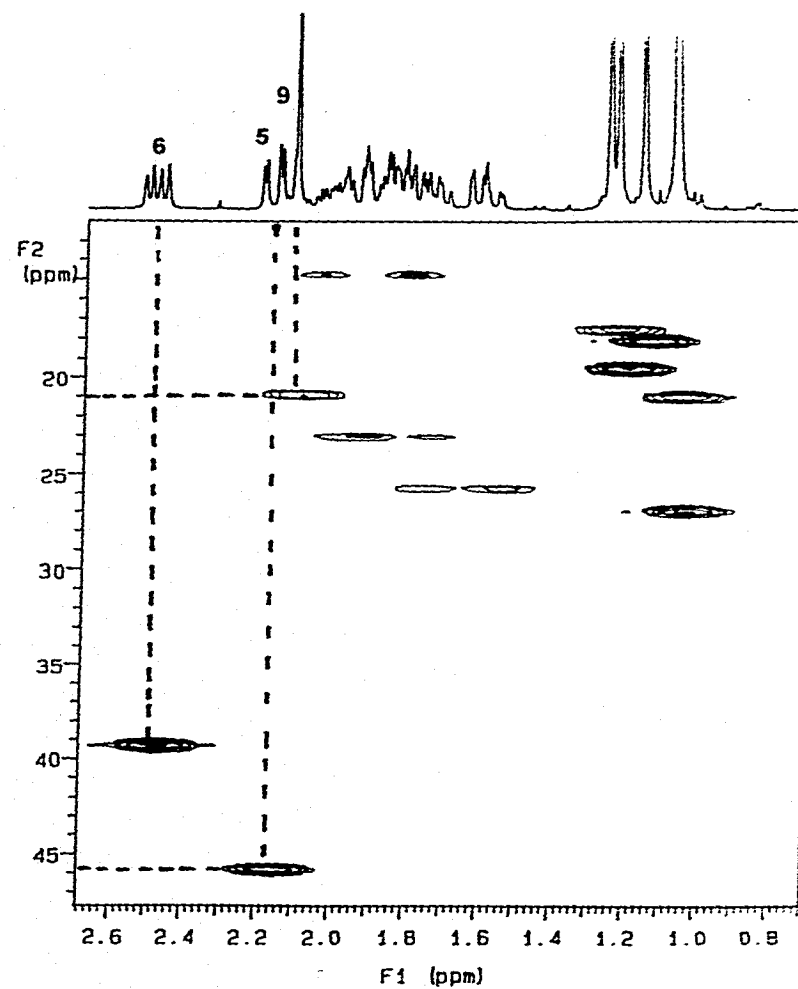
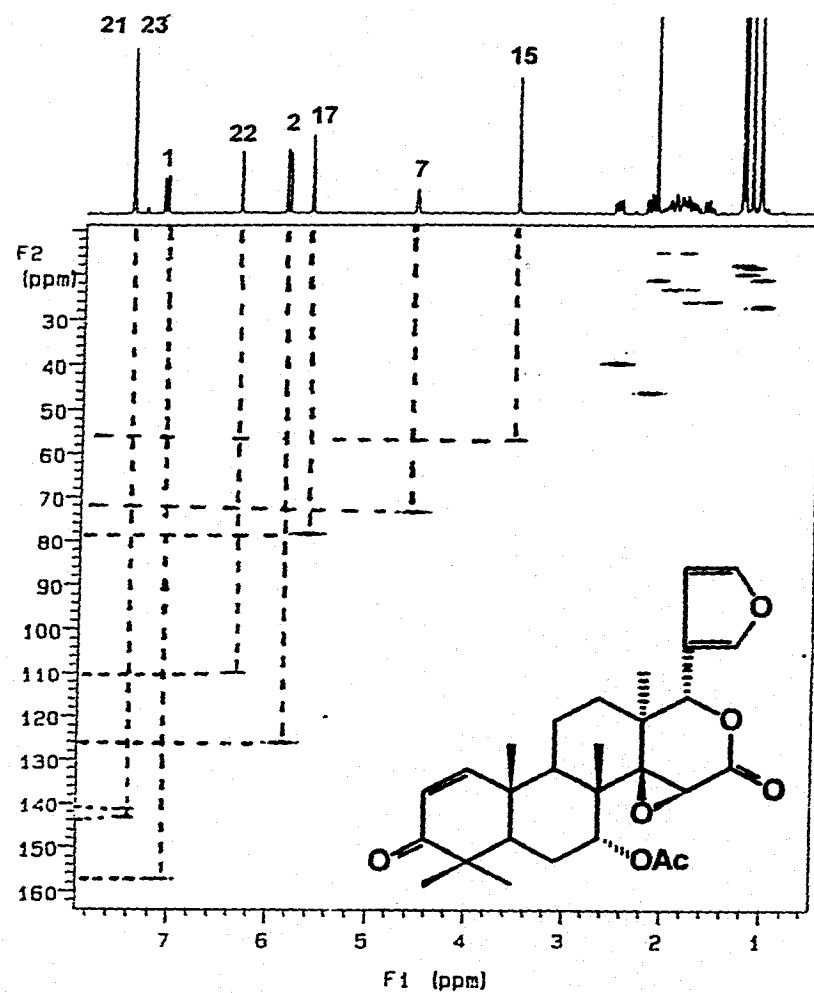
Espectro 21. RMN<sup>13</sup>C de la Gedunina (29)



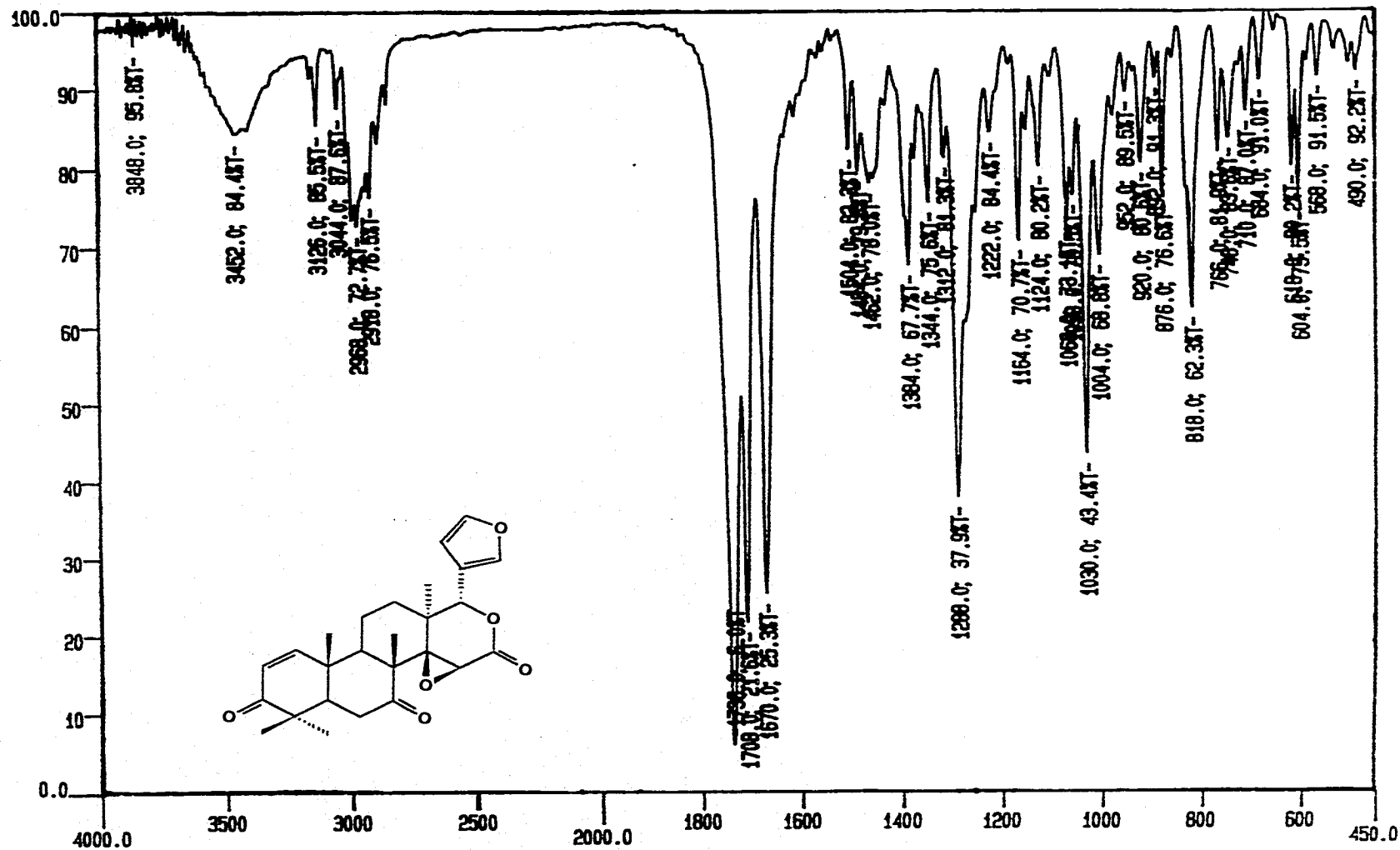
Espectro 22. RMN<sup>13</sup>C-DEPT de la Gedunina (29)



Espectro 23. RMN<sup>1</sup>H de la Gedunina (29)

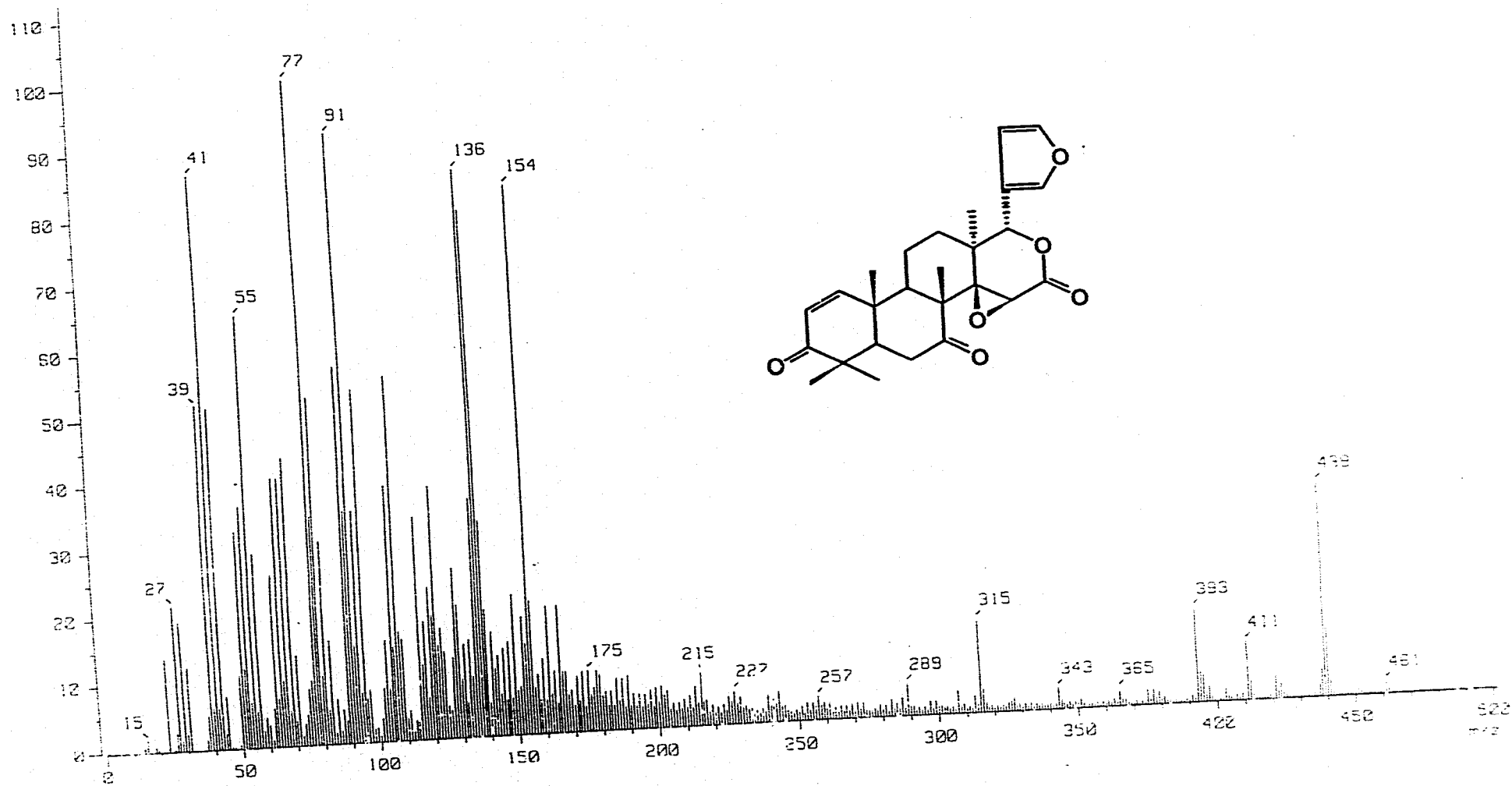


**Espectro 24. RMN-HETCOR de la Gedunina (29)**

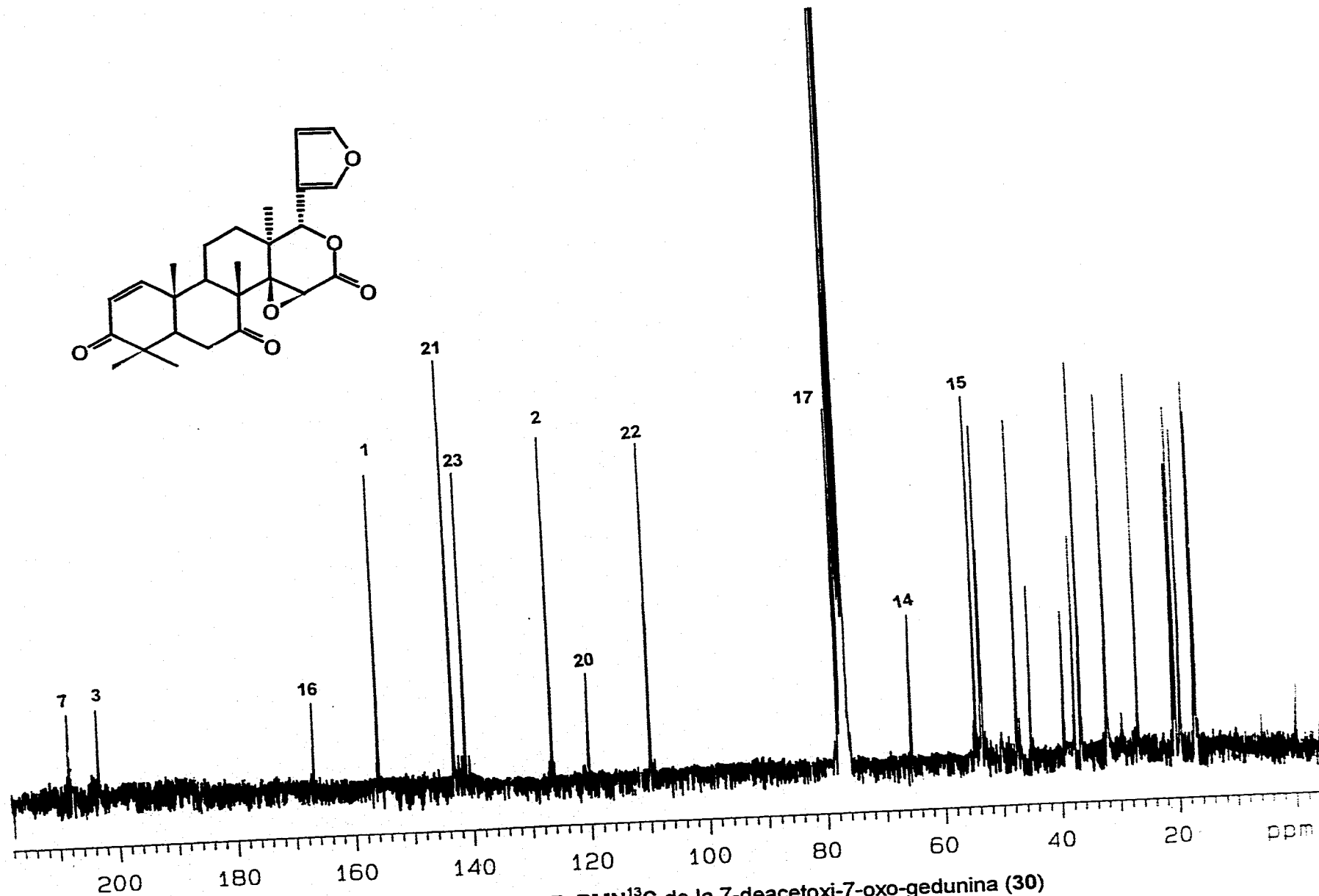
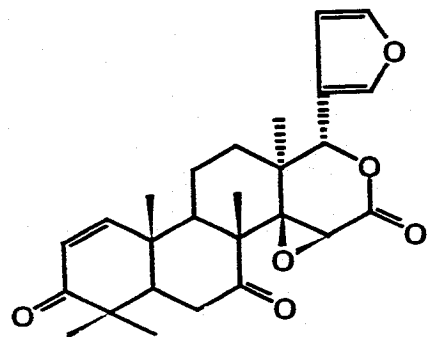


Espectro 25. Espectro de IR de la 7-deacetoxy-7-oxo-gedunina

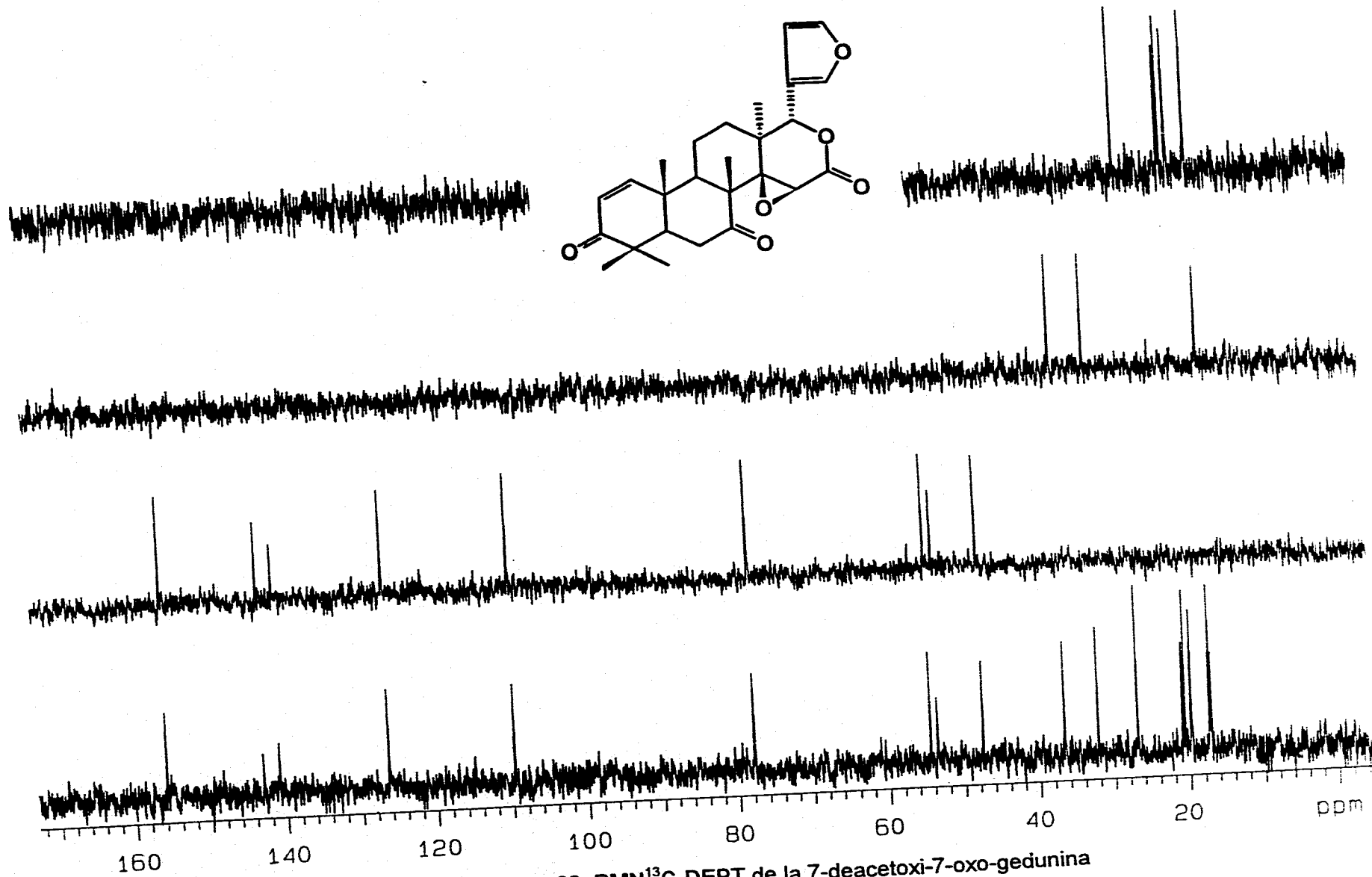




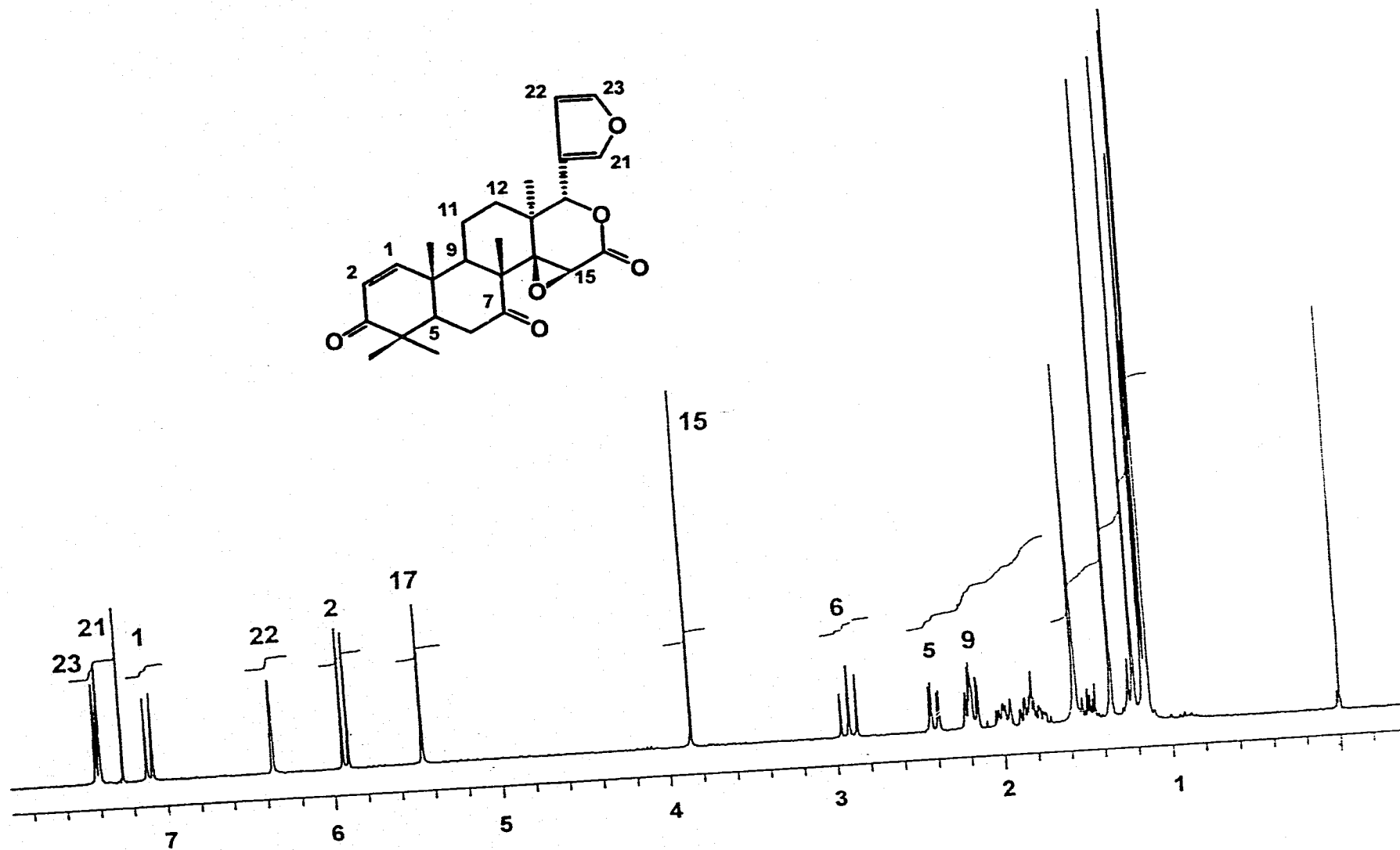
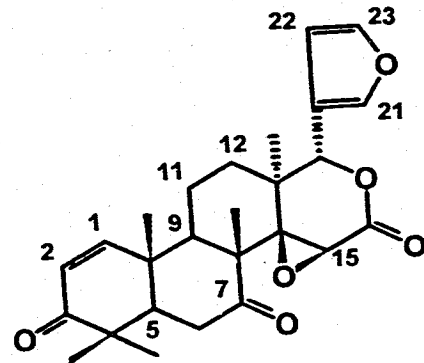
**Espectro 26. EMIE de la 7-deacetoxy-7-oxo-gedunina (30)**



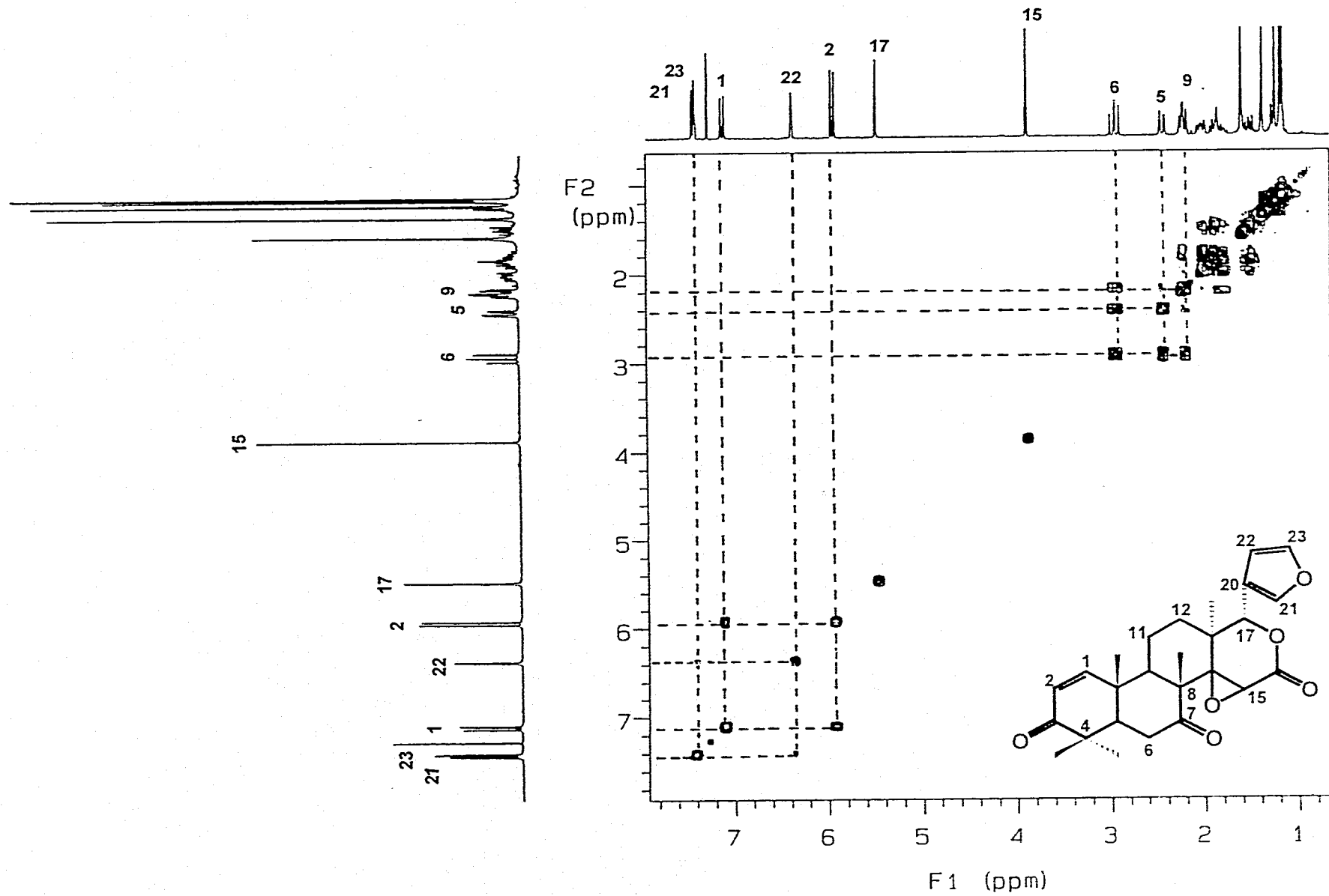
Espectro 27. RMN $^{13}\text{C}$  de la 7-deacetoxy-7-oxo-gedunina (30)



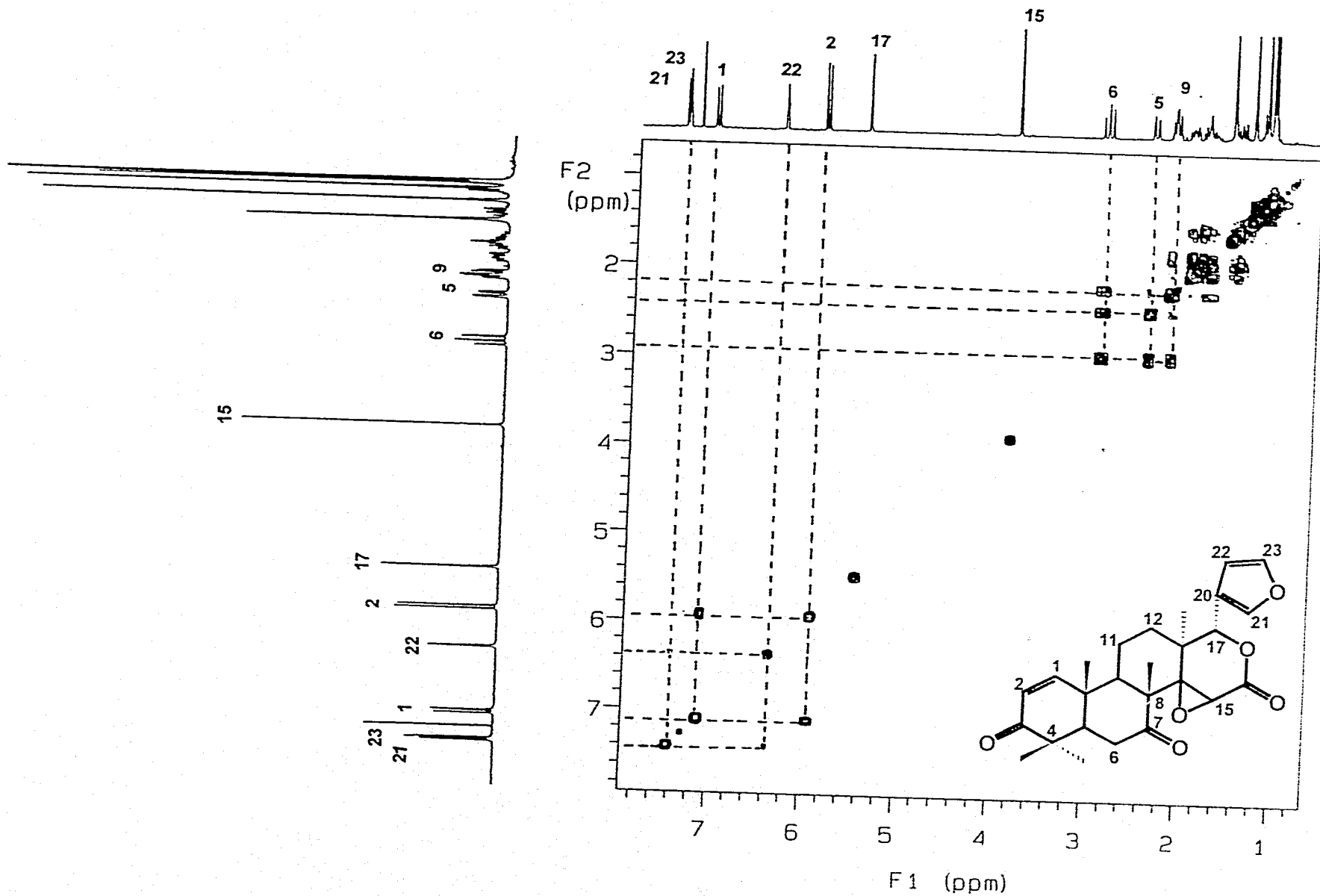
Espectro 28. RMN<sup>13</sup>C-DEPT de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina



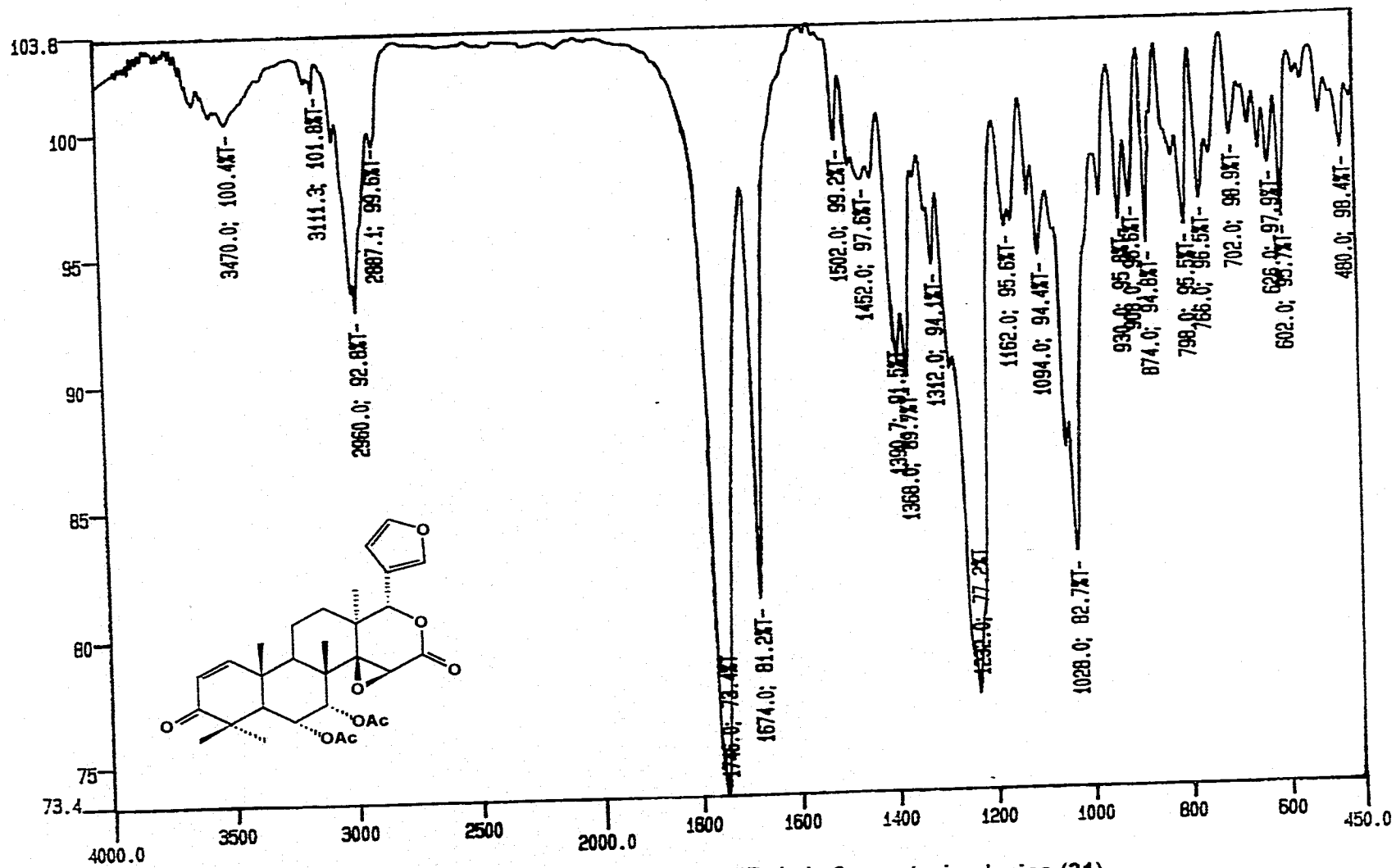
Espectro 29. RMN<sup>1</sup>H de la 7-deacetoxi-7-oxo-gedunina (30)



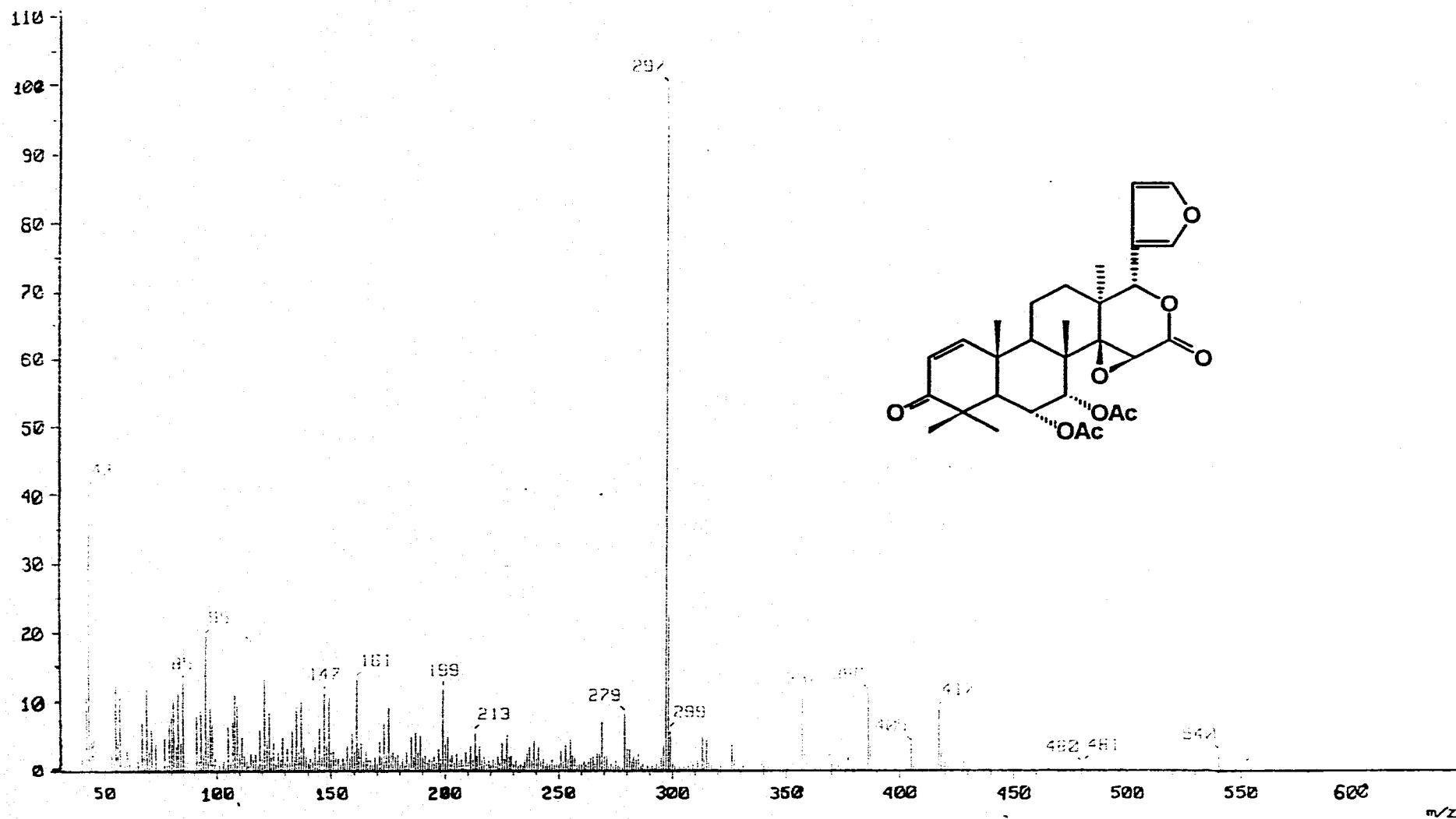
Espectro 24. RMN-COSY de la 7-deacetoxy-7-oxo-gedunina (30)



Espectro 24. RMN-COSY de la 7-deacetoxy-7-oxo-gedunina (30)

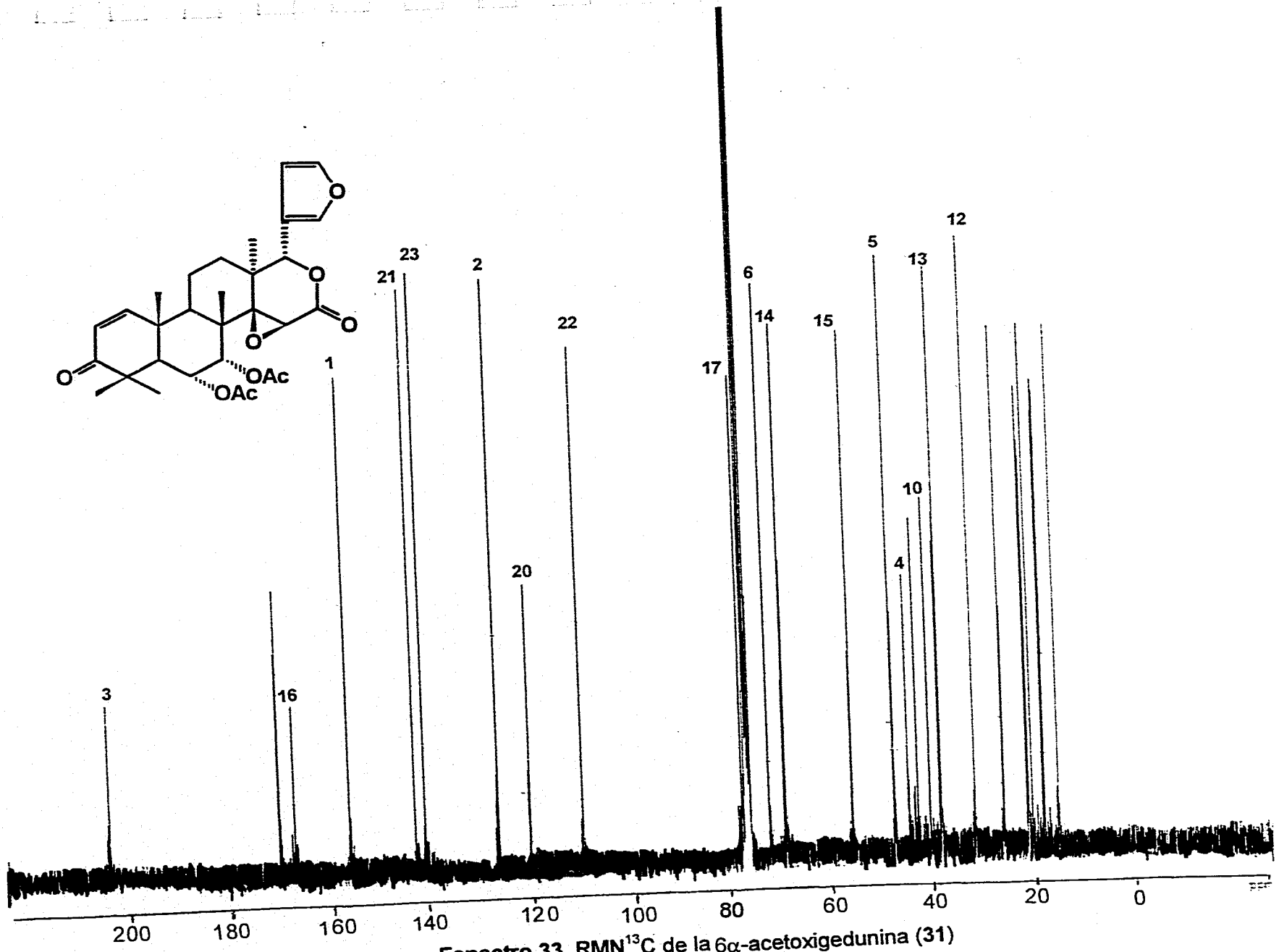


Espectro 31. Espectro de IR de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)

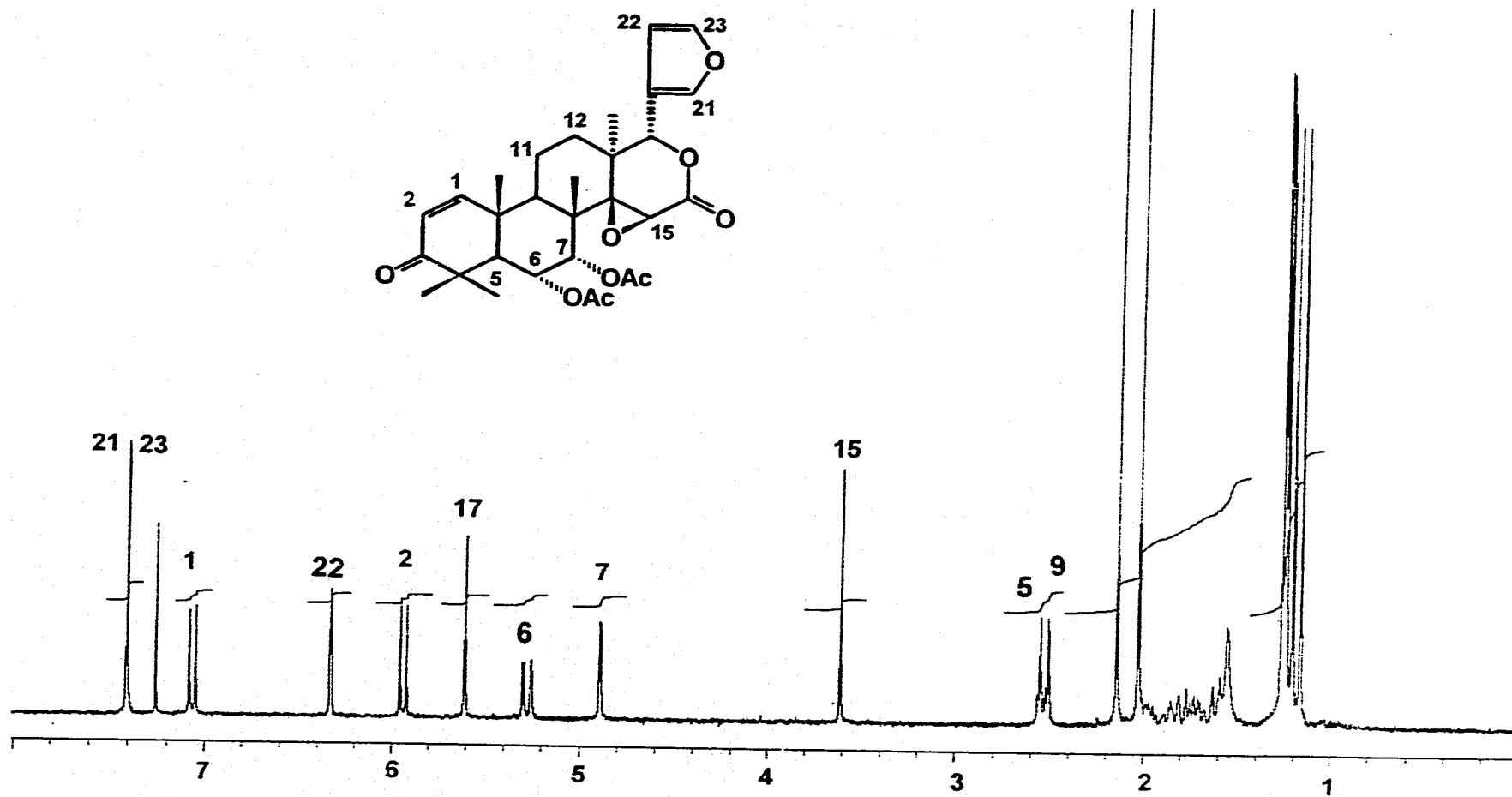
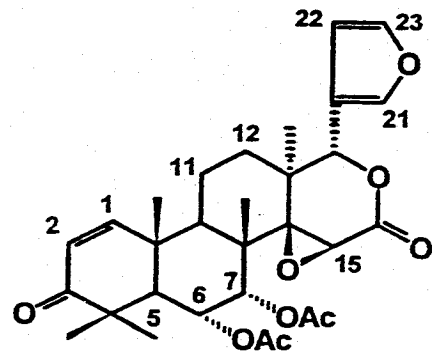


**Espectro 32. EMIE de la 6α-acetoxigedunina (31)**

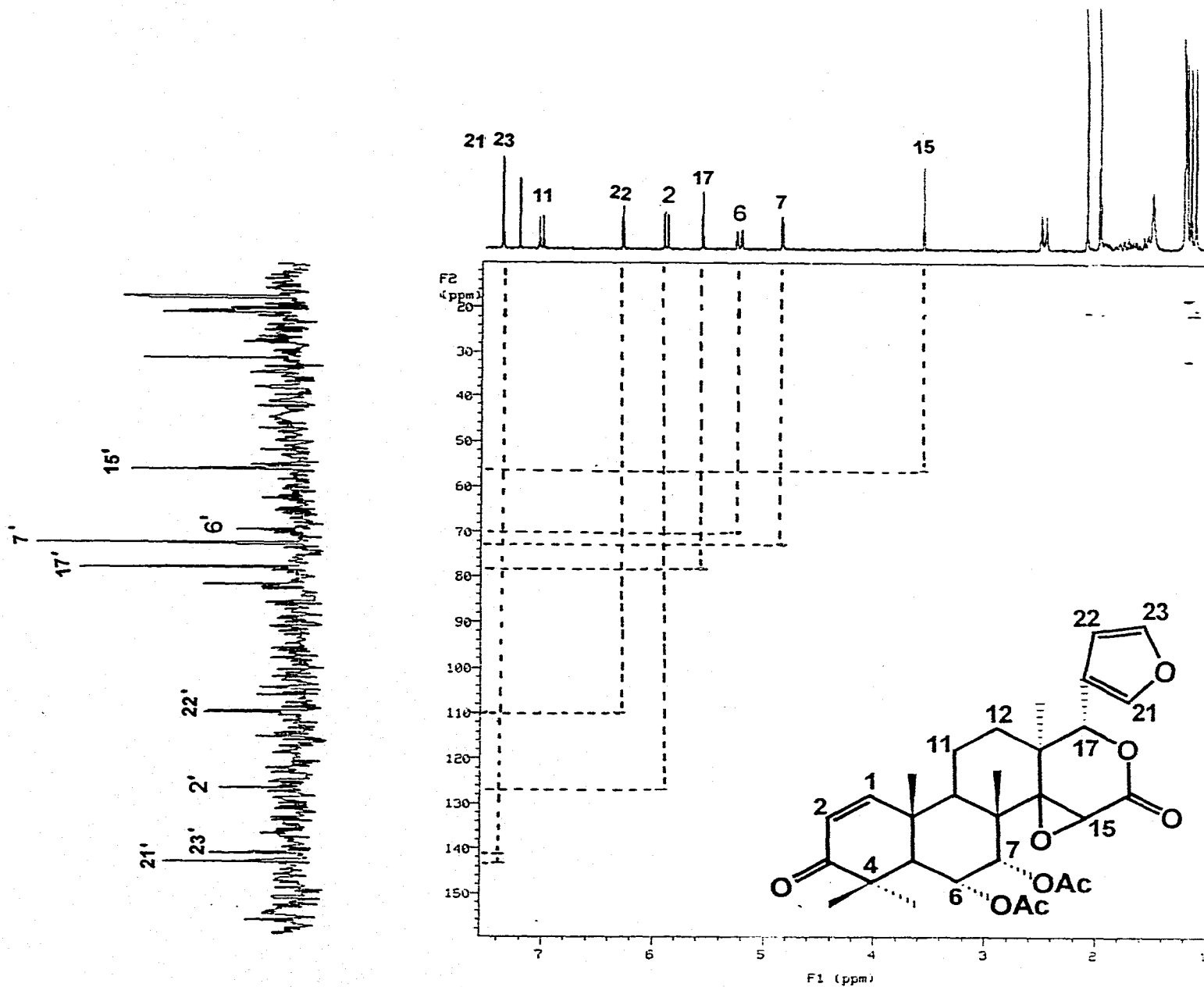




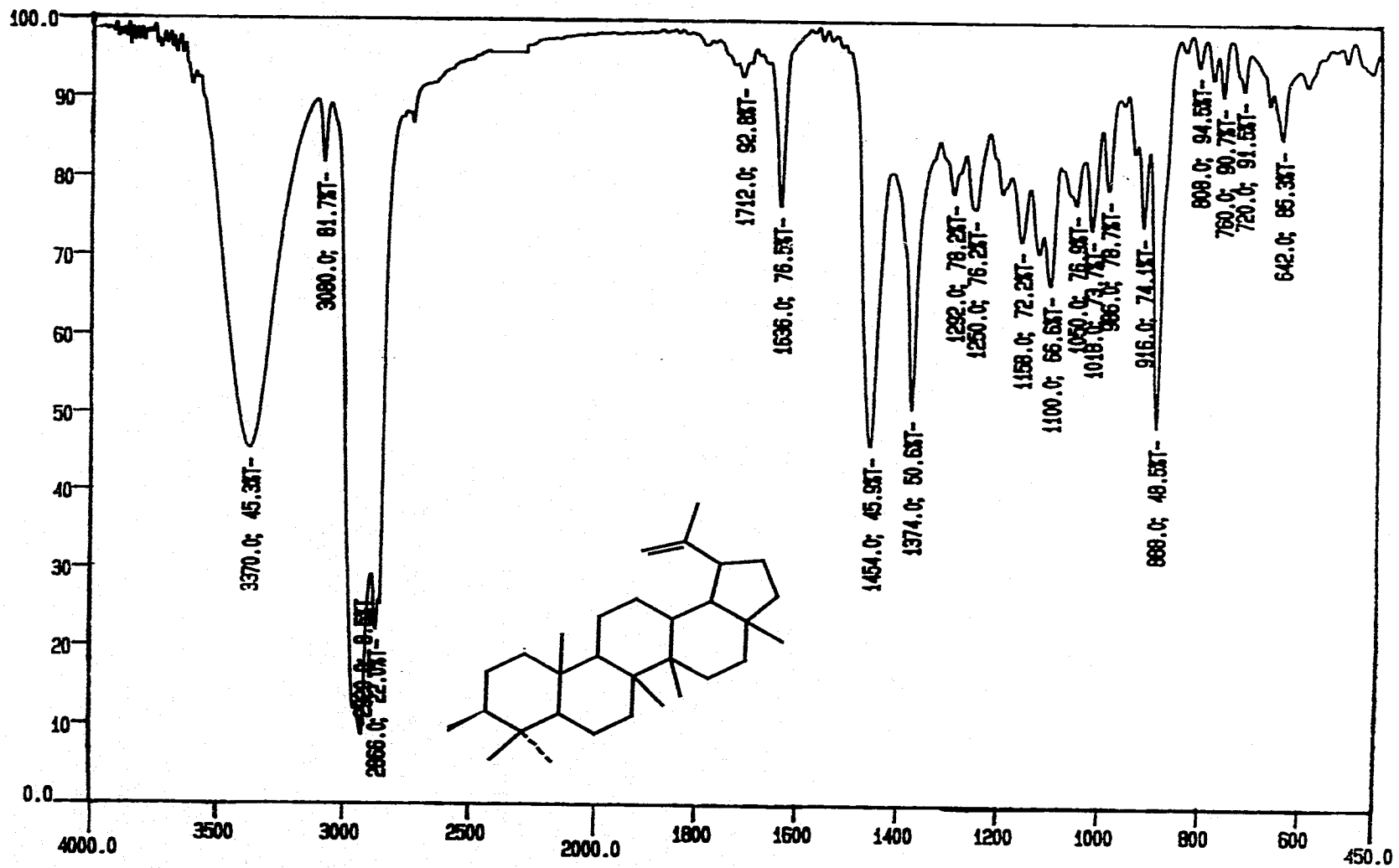
Espectro 33. RMN $^{13}\text{C}$  de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)



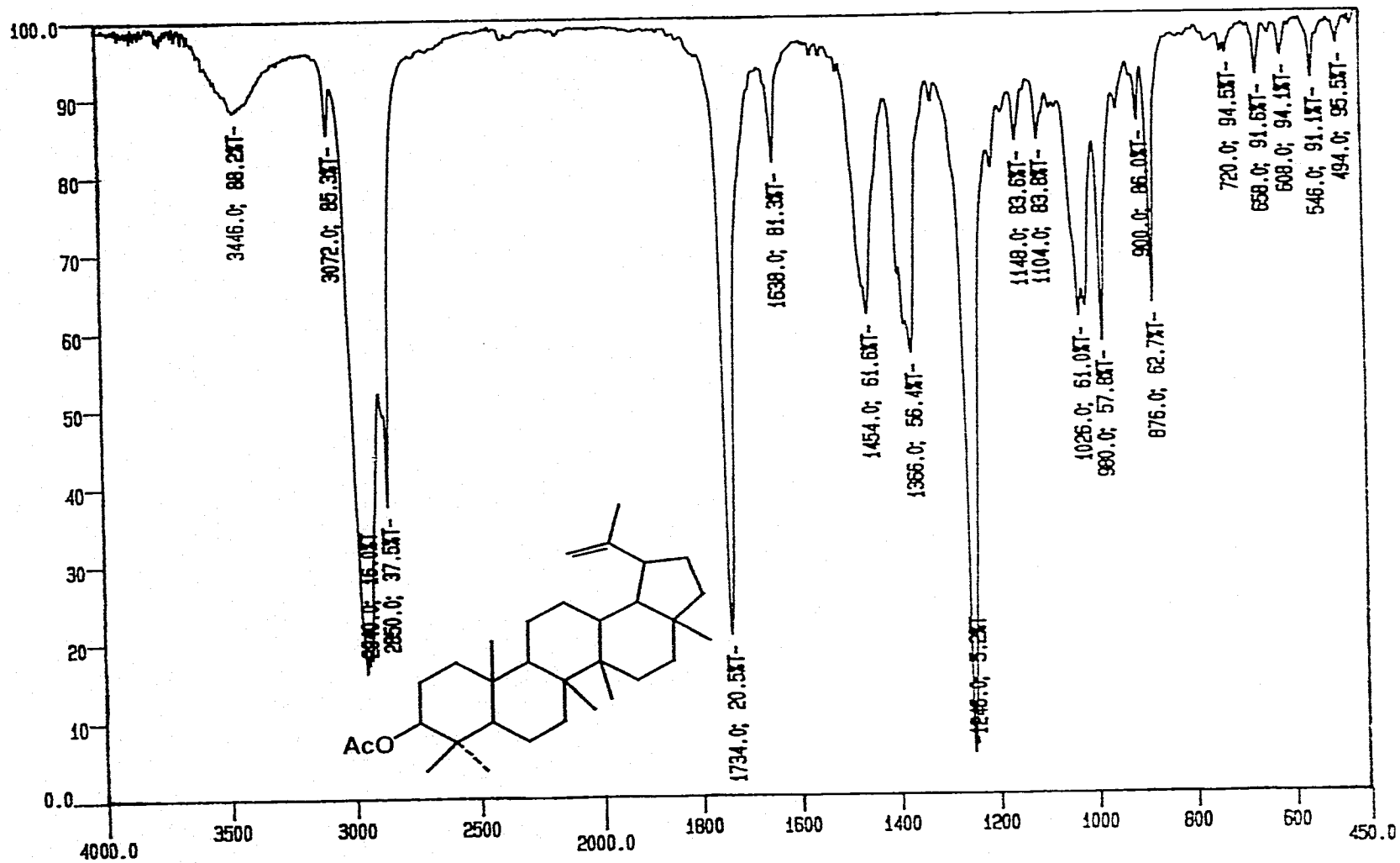
**Espectro 35. RMN<sup>1</sup>H de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)**



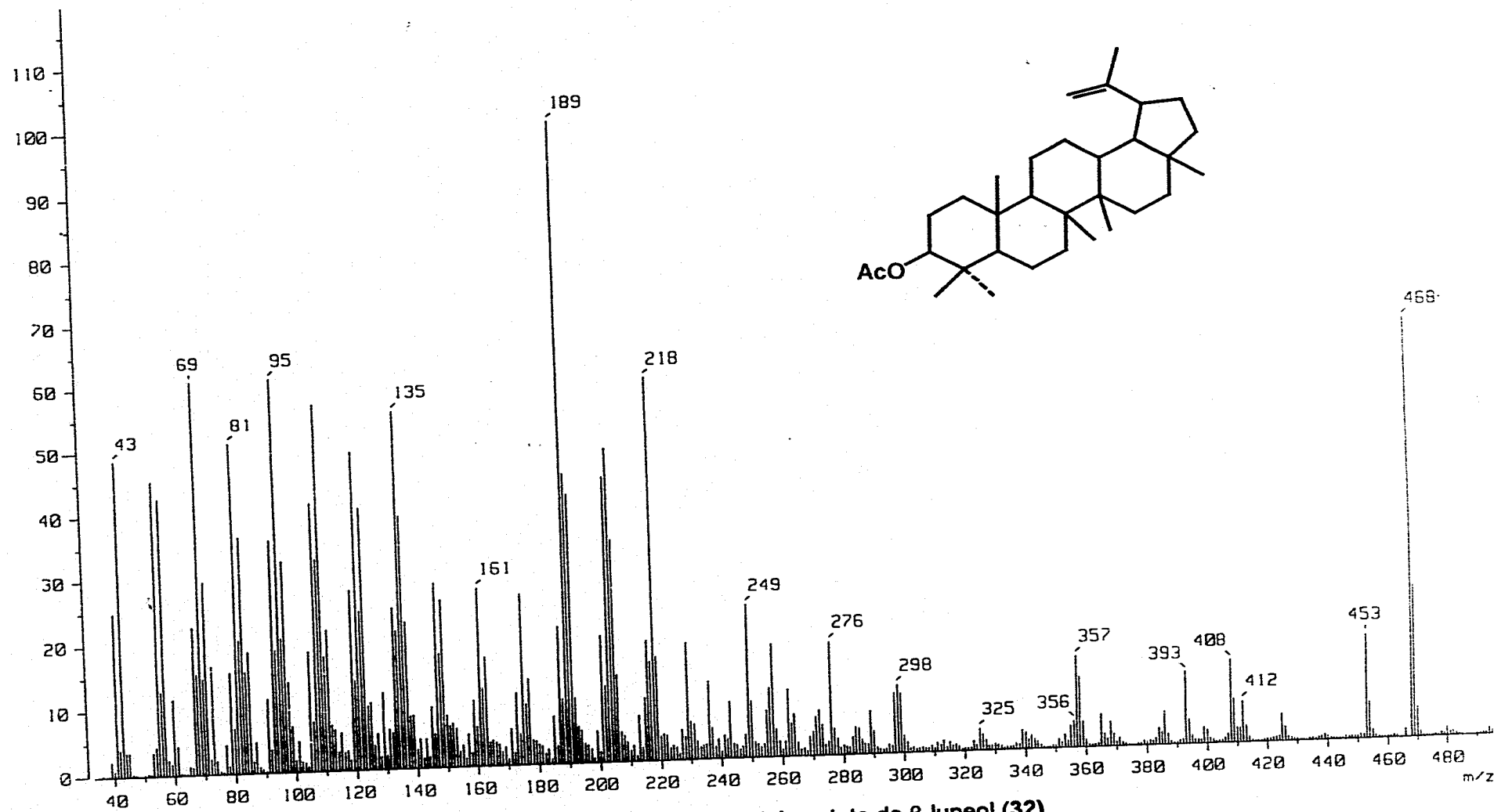
**Espectro 36. RMN-HETCOR de la 6 $\alpha$ -acetoxigedunina (31)**



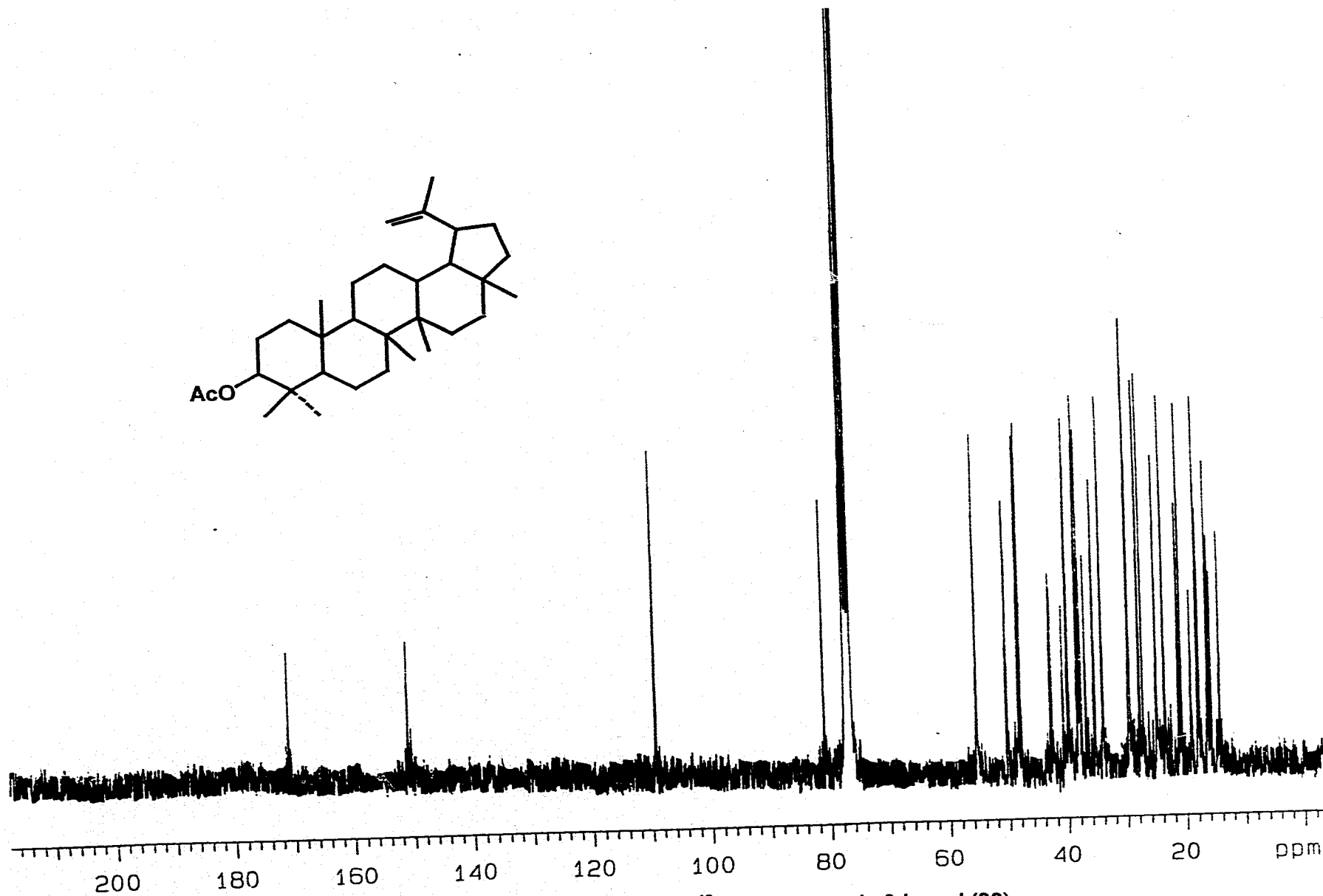
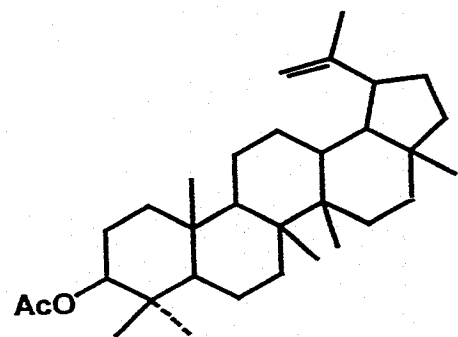
Espectro 37. Espectro de IR del  $\beta$ -lupeol (32)



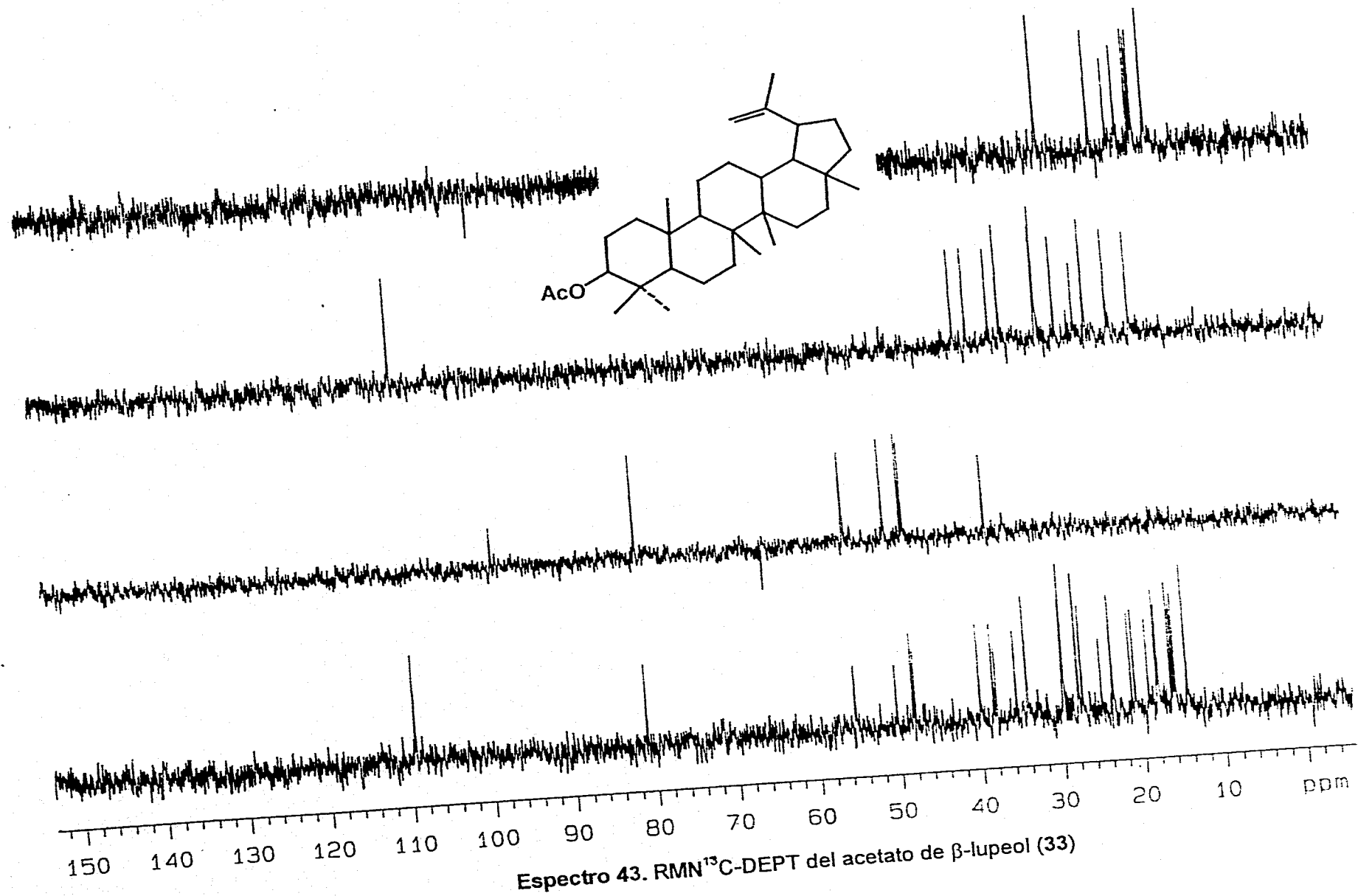
Espectro 40. Espectro de IR del acetato de  $\beta$ -lupeol (32)



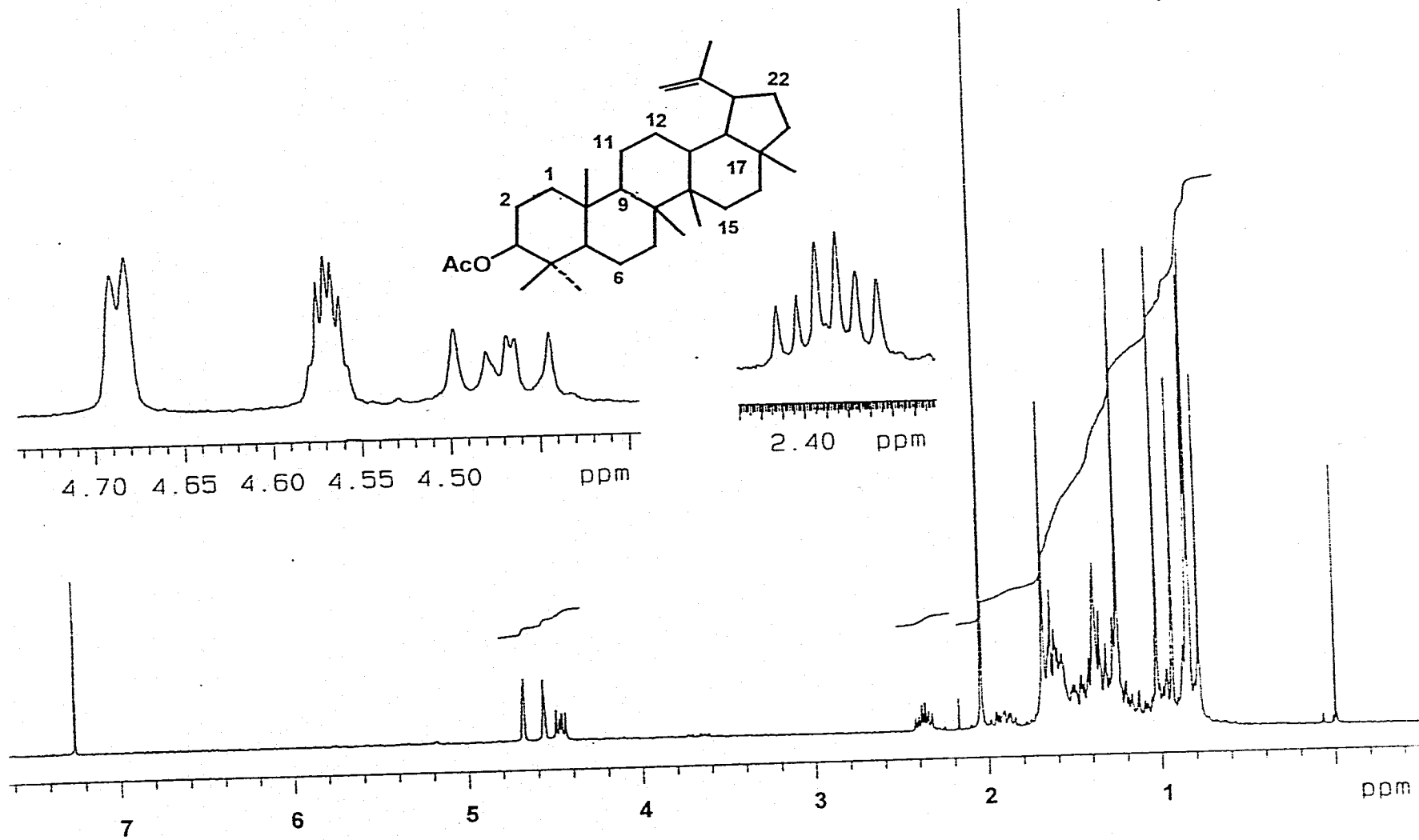
**Espectro 41. EMIE del acetato de  $\beta$ -lupeol (32)**



Espectro 42. RMN<sup>13</sup>C del acetato de  $\beta$ -lupeol (33)







Espectro 44. RMN<sup>1</sup>H del acetato de  $\beta$ -lupeol (33)

### VIII. BIBLIOGRAFIA

Adesida, G. A.; Okorie, D.A. (1973) Heudebolin: A new limonoid from *Trichilia heudelotii*, *Phytochemistry*, **12**, 3007-3008.

Adesogan, E. K.; Powell, J.W.; Taylor, D.A.H. (1967) Extractives from the seed of *Khaya senegalensis*. *J. Chem. Soc.* 554-556.

Akinniyi, J. A.; Connolly, J.D. y Rycroft, D. S.; Sondengam, L.; Ifeadike, N. P. (1980). Tetranortriterpenoids and related compounds. Part 25. Two 3,4-secotitucallane derivatives and 2'-hidroxyrohitukin from the bark of *Guarea cedrata* (Meliaceae), *Can. J. Chem.*, **58**, 1865-1868.

Anaya A. L.; Ortega, R.C.; Nava. T. (1992). Impact of Allelopathy in the Traditional Management of Agroecosystems in México. In: Rizvi, S. L. H.; V. Rizvi (Eds.). *Allelopathy: Basic and Applied Aspect*. Chapman and Hall. 271-361.

Anaya, A. L.; Calera, M.R.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R. (1990). *J. Chem. Ecol.* **13**, 2083-2101.

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

Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L. y Suffeness, M. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*. **2**. 107-111.

Andrade, S.O.; Linardi, M. C. F.; Assad, R.; Ladeira, A. M. (1976) inflammatory action and toxicity of *Guarea trichilioides* L. in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **38**, 39-46.

Agrios, G. (1995) Control de las enfermedades de las plantas. En: Fitopatología. 3a ed. 139-170.

Arnason, J. T.; Philogene, B. J. R.; Donskov, N.; Kubo, I. (1987). Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding growth and development of the *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.* **43**, 221-226.

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

Arnason, J. T.; Mackinnon S.; Durst, A. *et al.* (1993). Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. En: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Downum, K. R.; Romeo, J. T.; Stafford, H. A. (Eds.). Plenum Press, New York, 107-131.

Baldwin, M. A.; Iodun, A. G.; Maccoll, A. (1967) The Mass Spectra of mellacins and related compound. Part I. Gedunin and related compounds. *J. Chem. Soc*, 1026-1034.

Baldwin, M. A.; Motoo, B. S.; Játiva, C.; Tinto, W. F.; Reynolds, W. F. y McLean, S. (1992) Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana*: structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy. *Can. J. Chem.*, **70**, 1260-1263.

Banerji, B.; Nigam, S. K.; (1984). A Review Fitoterapia. LV, **1**, 3-36.

Banerji, B.; (1990). Insect control by biotechnical procedures-lessons from the plant kingdom., *Proc Conf. Insect. Chem. Ecol.*, 235-244.

Benner, J.P. (1993). Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticide Science*. **39**, 95-102.

Breitmaier, E.; 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.; Voelter, W. (1994). *Carbon-13 NMR Spectroscopy of Organic Compounds. High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*. Third edition, VCH. Holanda.

Bevan, W. L.; Ekong, E. U.; Taylor, A.H. (1965) **Nature**, 1323-1325

Bevan, W. L.; Powell, J. W.; Taylor, D. A. H. (1963) West African Timbers. Part VI. Petroleum extracts from species of the genera *Khaya*, *Guarea*, *Carapa* and *Cedrela*. *J. Chem. Soc.* 980-982.

Bevan, W. L.; Ekong, D.E.U. (1967) West African Timbers. Part XX. The structure of turreanthin an oxygenated tetracyclic triterpene monoacetate. *J. Chem. Soc.* 820-828.

---

Bevan, W. L.; Powell, J. W.; Taylor, A. H. (1967) West African Timbers. Part XIX. The Structure of metilangolensate, a ring-B-seco tetranortetracyclic triterpene of the Meliaceae family. *J. Chem. Soc.* 163-170.

Bray, D. H.; Warhurst, D.C.; Connolly, J.D.; O'Neil, M. J.; Phillipson, J. D. (1990) Plants as sources of antimalarial drugs. Part 7. Activity of some species of Meliaceae Plants and their constituent limonoids. *Phytotherapy Research.*, **4**, 1,, 29-35.

Buchanas J. G.; Halsall T.G.(1970) The conversion of thurreanthin and thurreanthis A into simple meliacins by a route involving an oxidative rearrangement of probable biogenetic importance. *J.Chem.Soc.* 2280-2284.

Buchanas J. G.; Halsall T.G.(1969) *Chem. Comm.* 242-244.

Budzikiewckz, H.; Djerassi, C.; Williams, D. H. (1964). *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Vol. 2, Holden-Day, San Francisco, pp. 127-139.

Burke, B.A.; Chan, W.R. Magnus, K.E.; Taylor, D.A.H. (1969) Extractives of *Cedrela odorata* L.-III. The structure of photogedunin. *Tetrahedron*, **25** , 5007-5011.

Champagne, D. E.; Murray, B. Y.; Neil Towers, G. H. (1990) Insecticidal Activity of Phytochemical and Extracts of the Meliaceae. pp. 95-109. In: Arnason, J. T.; Philogene, B. J.R. ; Morand, P. (Eds.) A. C. S. Symp. Ser. 387.

Champagne, D. E.; Koul, O.; Isman, B. M.; Scudder, G. G. E.; Towers, G. H. N. (1992) Biological activity of limonoids from the rutales. *Phytochemistry*, **31**, 377-394.

Chan, W.R.; Holder, N.L.; Taylor, D. R. (1968) Extractives of *Cedrela odorata* L. Part II. Structures of the *Cedrela* tetracyclic triterpenes. *J. Chem. Soc.*, 2485-2489.

Chang, K.C.; Tang, T.S.; Tah, H. T. (1976) *Phytochemistry*, **15**, 429-430.

Chang, W. R.; Magnus, K.E.; Mootoo, B.S. (1967) Extractives from *Cedrela odorata* L. The structure of methyl angolensate. *J. Chem. Soc.* 171-177.

Chou, C.H.; Waller, G.R. (1989) *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. Institute of Botany. Academia Sinica Monograph. Serie 9. Taipei, 49-118.

Connolly, J.D.; McCridle, R. Overton, K.H. Warnock, W.D.C. (1968) Tetranortriterpenoids-VII, the constitution and stereochemistry of swietenolide. *Tetrahedron*, **24**, 1507-1515.

Connolly, J. D. Overton, K.; Polonsky, J. (1970). En: *Progress in Phytochemistry*. (R. Reinhold y Liwschitz, eds). Vol. II, pp. 385-455. Wiley (Interscience), New., York.

Connolly, J. D.; Labbé, C.; Rycroft, D.S. (1979) Tetranortriterpenoid and related compounds. Part 22. New apotirucallol derivatives and tetranortriterpenoid

---

from the wood and seeds of *Chisocheton paniculatus* (Meliaceae). *J.C.S.Perkin*, 1, 2959-2964.

Connolly, J. D.; Hill, R.A. (1986) Triterpenoids, *Natural Product Reports*, 3, 421-503.

Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Pezzuto, J. M. (1991) *J. of Ethnopharmacology*, 32, 117-133.

Cremlyn, R J. (1991) Agrochemicals preparation and mode of action. John Wiley & Sons, 301-373.

Das, M. C.; Mahato, S. B. (1983). Triterpenoids: Review. *Phytochemistry* 22, 1071-95.

Djerassi, C.; Halpern, O.; Halpern, V.; Riniker, B. (1958) Optical Rotatory Dispersion Studies. XVII. *J. Ame. Chem. Soc.*, 80, 4001-4005.

Duke, S. O; (1991) Plant terpenoids as pesticides. pp.269-291. En: Richard F. Keeler; Anthony, T. Tu (Eds.) *Handbook of Natural Toxins*. 6, Marcel Dekker Inc. N.Y.

Einhelling, F.A. (1985) Allelopathy-A natural Protection, allelochemical. 161-200. En: Mandava N. Bhushan (Eds.) U. C. R. P. Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Ferguson, G.; Gunn, P. A.; Marsh, W. C.; MaCrimble, R. (1973) Triterpenoids from *Guarea glabra* (Meliaceae): a new skeletal class identified by chemical, spectroscopic, and X-Ray evidence., *J. Chem. Soc. Chem.Comm.* 5, 159-169.

Ferguson, G.; Gunn, P. A.; Marsh, W. C.; MaCrindle, R. *et al.*, (1975) Tetrarortriterpenoids and related substances. Part XVII. A new skeletal class of triterpenoids from *Guarea glabra* (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perk. Trans.* **1**, 5, 491-491.

Fischer, N. H. (1986) The Function of Mono and Sesquiterpenes as Plant Germination and Growth Regulator. pp. 203-218. In: Alan, R. Putnam and Chung-Shin Tang (Eds.). *The Science of Allelopathy*. John Willey and Sons, U:S:A:

Fischer, N. H. (1991) Plant Terpenoids as Allelopathy Agents. pp. 377-398. In: J. B. Harborne and F. A. Tomas-Barberan (Eds.) *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. Proceeding of the Phytochemistry Society of Europe*. Clarendon Press, Oxford.

Furlan, M.; Roque, N. F. & Filho, W. W. (1993) Cicloartane derivatives from *Guarea trichillioides*. *Phytochemistry*, 932, **6**, 1519-1522.

Furlan, M.; Lopes, M. N.; Fernandes J. B.; Pirani, J. R.; (1996) Diterpenes from *Guarea trichillioides*.; *Phytochemistry*, **41**, 4, 1159-1161.

Fuzzati, N.; Dyatmiko, W.; Rahman, A.; Achmad, F.; Hostettman, K. (1996) Triterpenoids, lignans and benzofuran derivative from the bark of *Agليا Eleagnoideae*. *Phytochemistry*, **42**, 51, 395-398.

Guang-Yi, L.; Gray, A. Y.; Waterman, P. G. (1988) Tirucallane and aleanane triterpenes from the resin of *Aucoblmea klaineana*. *Phytochemistry*, **27**, 7, 2283-2286.



Greca, D.; Mangoni, L.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtiera, L. (1990) *Phytochemistry*, **29**, 6, 1797-1798.

Harborne J. B. (1988) Introduction to Ecological Biochemistry. 3a. de. Academic Press, London, 365 pp.

Hasegawa, S.; Bennett, R.D.; Herman, Z.; Fung, C. H.; Ou, P. (1989) Limonoid glucosides in citrus, *Phytochemistry*, **28**, 6, 1717-1720.

Housely, J. R.; King, F.E.; King, T. J.; Taylor, P. R. (1962) The chemistry of Hordwood extractives. Part XXXIV. Constituents of *Guarea* Species. *Journal Chemical Society*. 5095-5104.

Inada, A.; Konishi, M.; Murata, H.; Nakanishi, T. (1994) Structures of a New Limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*. *J. Nat. Prod.*, **57**, 10, 1446-1449.

Inoue, M.; Nishimura, L.; Hai-Hang, L.; Mizutani, J. (1992) Allelochemicals of *Polygonum sachalinense* FR. SCHM (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **4**, 18, 1833-1834.

Itokawa, H.; Kishi, E.; Monta H.; Takeya, K. (1992) Citotoxic quassinoids and tirucallane-Type triterpenes from woods of *Eurycoma longifolia*. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 4, 1053-1055.

Jacobson, M. (1971) Naturally occurring insecticides. Jacobson, M. Crosby, D.G. (EDS) Marcel Dekker, Inc. New York, 139-176.

Jain, D.C.; Tripathi, A. K. (1993) Potential of Natural Products as Insect Antifeedants. *Phytotherapy Research*, **7**, 327-334.

Klocke, J. A. (1989) Plant compounds as sources and models of insect-control agents. En: *Economic and medicinal plant research*. Vol 3

Klocke, J. A.; Balandrin, M. F.; Barnby, M. A.; Yamasaki, R. B. (1989).. Limonoids, phenolics and furanocoumarins as insect antifeedants, repellents and growth inhibitory compounds, En: Arnason, B., Philogene, R. y Moreland, P. (Eds.). *Insecticides of plant origin*. U.S.A., pp. 137-149.

Kraus, W.; Crame, R.; Sawitzki, G. (1981) Tetranortriterpenoids from the seeds of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **20**, 117-120.

Kubo, I. (1993) insect control agents from tropical plants. En: phytochemical potential of tropical plants. K. R. Downum, J. T. Romeo, H.A. Stafford eds. Plenum Press, new York. *Recent Advances in Phytochemistry*, **27**:133-151.

Kubo, I. (1991) Screening techniques for plant-insect interactions. En: *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*. Hostteman, K. eds. CA Academic Press, London, **6**, 179-193.

Kubo, Y.; Klocke, J.A. (1983) En: *Plant Resistance to insects*, ACS. Symposium Serie 208, American Chemical Society. Washington, D.C. 329-346.

Kundu, A.; Pays, B.; Chatterjee, A. (1985) Aphananin, a triterpenenoid *Aphanamixus polystachya*. *Phytochemistry*, **24**, 9, 2123-2125.

Lavie, D.; Jain, M. K.; Shpan-Gabrielith, S. R. (1967) A locust phagorepellent from the *Melia* species. *Chemical Communications*, 910-911.

Lavie, D.; Levy, E.C.; Zelnik, R. (1972) The constituents of *Carapa guianensis* Aubl. and their biogenetic relationship. *Biorganic Chemistry*, **2**, 59-64.

Lavie, D.; Levy, E.C.; Jain, M.K. (1971) Limonoids of biogenetic interest from *Melia azadirachta* L. *Tetrahedron*, **27**, 3927-3939.

Lins, A. P.; Braggio, M. M.; D'arc-Felicio, J.; Giuriatti, A. M.; Felicio, J. C. (1992) Chemical and Pharmacological aspects of *Guarea guidona*. *Rev. Latinoamericana de Quím.* **23/1** y **22/4**, 30-33.

Lieberman, H. R. (1983). Estimating LD<sub>50</sub> using the probit technique: a basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology*. **6**, 111-6.

Lyons, C. W.; Taylor, D. R. (1975) The stereochemistry of Melianone and sapelin F. Correlation with bourjotinolone A. *J.C.S. Chem. Comm.*; 517-518.

Mata, R. (1993) Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. En: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Downum, K.R.; Romeo, J.T.; Stafford, H. A. (Eds.) Plenum Press, N. Y. *Recent Advances in Phytochemistry*, **27**, 41-64.

Merrien, A.; Polonsky, J. (1971) The natural occurrence of melianodiol and its diacetate in *Samadera madagascariensis* (Simaroubaceae) model experiments on melianodiol directed towards simarolide. *Chemical Communications*, 261-263.

Mulholland, D.A.; Taylor, D.A.H. (1980) Limonoids from the seed of the natl Mahogany *Trichilia dregeana*, *Phytochemistry*, **19**, 2421-2425.

Mulholland, D.A.; Taylor, D.A.H. (1988) Protolimonoids from *Turrea nilotica*, *Phytochemistry*, **27**, 4, 1220-1221.

Nakanishi, K. (1975) Structure of the insect antifeedant azadirachtin. En:Recent advances in phytochemistry. Vol 9.(Eds.) Plenum Press, N.Y. & London.

Neto, J. O.; Agostinho, S.M. M.; Da-Silva, V.D. et al., (1995) Limonoids from seeds of *Toona ciliata* and their chemosystematic significance. *Phytochemistry*, **38**,2, 397-401.

Olugbade, T. A. (1991) Tetracyclic triterpenoids from *Trichilia prieriana* leaves. *Phytochemistry*, **30** 2, 698-700.

Pennington, T.D. (1981) *Guarea grandifolia*. En: Flora Neotropica, No. 28,359. (Eds) The New York Botanical Bronx, N.Y.

Polonsky, J. (1973) Triterpenoids, structure, biogenesis and distribution. En: Recent advances in phytochemistry, Vol.6. (Eds.) Runeckles a. Mabry, T.J. Academic Press.

Purushothaman, K.K.; Duraiswamy, K.; Connolly, J.D. y Rycroft, D.S. (1985) Triterpenoids from *Walsura piscicilia* . *Phytochemistry*. **24**, 10, 2349-2354.

Putnam, A. R.; Chung-Shin, T. (1986) Allelopathy State of the Science. In: Alan R. Putnam and Chung-Shin Tang (Eds.) *The Science of Allelopathy*. John Willey and Sons, U. S.A. Cap. 1,8,10.

Rao, M.M.; Meshulam, H. Zelnik, R. Lavie, D. (1975) Structure and stereochemistry of limonoids of *Cabralea eichleriana*. *Phytochemistry*, **14**, 1071-1075.

Rembold, H. (1989) *The Azadirachtins- their potential for insect control*. En: Economic and Medicinal Plant Research. Wagner, H.; Hikino, H.; Farnsworth N. R. Eds. Academic Press, London, Vol. 3, pp 57-72.

Rodgers, B. P. (1993). Potential of biopesticides in Agriculture. *Pesticide Science* **39**,117-20

Segura-Correa, R.; Mara, R.; Anaya, A. L.; Hernández- Bautista, B.; Villena, R.; Soriano-García, M.; Bye, R.; Linares, E. (1993) Tetranortriterpenoids of *Swietenia humilis*. *Journal of Natural Products*, **56**, 9,1567-1574.

Serit, M.; Ishida, M.; Hagiwara, N.; Kim, M. *et al.*, (1992) Meliaceae and Rutaceae limonoids as termite antifeedants evaluated using *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera:rhinotermitidae) *J. Chem. Ecol.*, **18** , 4, 593-603.

Singh, S.; Garg, H.S.; Khanna, N.M. (1976) Dysobinin, a new tetranortriterpene from *Dysoxylum binectariferum*. *Phytochemistry*, **15**, 2001-2002.

- Sondengam, B. L. Kanga, C.S.; Kimbus, S. F.; Connolly, J.D. (1981) Proceranone, a new tetranortriterpenoid from *Carapa prucera*. *Phytochemistry*, **20**, 173-174.
- Soriano-García, M.; Jiménez. M.A.; Mata, R.; Segura-Correa, R. (1996) Humilinolide D. *Acta crystallographica*. C25, 1527-1529.
- Su, R.; Kim, M.; Kawaguchi, H. *et al.*, (1990) Triterpenoids from the fruits of *Phellodron chenense* Schneid the stereostructure of Niloticin. *Chem. Pharm. Bull*, **38**, 6, 1616-1619.
- Taylor, D.A.H. (1969) Limonoids from *khaya nyasica* Stapf. ex. Bak. *PJ. Chem. Soc.*, 2439-2442.
- Taylor, D.A.H. (1979) A limonoid, pseudrelone B, from *Pseudocedrela kotschyii*. *Phytochemistry*, **18**, 1574-1576.
- Taylor, D.A.H. (1981) Ekerbergin, a limonoid extractive from *Ekerbergia capensis*. *Phytochemistry*, **20**, 9, 2263-2265.
- Taylor, D.A.H. (1984) The chemistry of the limonoids from Meliaceae. En: *Fortschritte d Chem. org. Naturst*, **45**, 1-102.
- Tinto, W.F.; Jagessar, P.K.; Ketwaru, P. (1991) *Constituents of Trichilia Schombuergkii*. *J. Natural Products*. **54**, 4, 972-977.
- Torsell, K.B.G. (1983) A mechanism and biosynthetic approach to secondary metabolism. En: *Natural Product Chemistry*, (Eds.) John Wiley & Sons, Limited, N.Y. 198-210.

Vanucci, C.; Lange, C.; Llommet, G.; Dupont, B.; Davoust, D., Vauchot, B.; Clement, J. L.; Brunck, F. (1992) An insect antifeedant limonoid from seed of *Khaya ivorensis*. *Phytochemistry*, 31, 3003-3004.

Worsham, A. D. (1989) Current and Potential Techniques Using Allelopathy as an Aid in Weed Management, pp. 275-291. In: C. H. Chou, G. R. Waller (Eds.). *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph. Serie 9. Taipei, ROC.

Zhang, M.; Ying, B.; Kubo, Y. (1992) Nagilactones from *Podocarpus nagi* and their effects on the feeding and growth of *Tobacco budworm*. *Journal of Natural Products*, 55, 8, 1057-1062.

Zelink, R. (1971) Meliaceae. Triterpenoids from *Cabralea Eichleriana*. *Phytochemistry*, 11, 1866.