

00582
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS

**“CONFIGURACIÓN ABSOLUTA Y ANÁLISIS
CONFORMACIONAL DE DOLABELANOS CON
ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LA ESPECIE *Trichilia trifolia*
(MELIACEAE)”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS
P R E S E N T A
BIOL. MARÍA DEL CARMEN/RAMÍREZ AHUMADA

TUTOR: DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

México, D.F.

2002

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.

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS



ACADEMIA NACIONAL
DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNAM

OF.CPCQ.685/01

BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado
Presente

Me es grato informarle que la alumna **MARÍA DEL CARMEN RAMÍREZ AHUMADA**, presentará su examen para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Configuración absoluta y análisis conformacional de Dolabelanos con actividad insecticida de la especie *Thichilia trifolia* (Meliaceae)", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Alfredo Ortega Hernández	Instituto de Química, UNAM
Primer vocal	Dr. John Thor Arnason	Universidad de Ottawa
Segundo vocal	Dra. Martha Sonia Morales Ríos	CINVESTAV
Tercer vocal	Dr. Carlos Cerda	CINVESTAV
Secretario	Dr. Rogelio Pereda Miranda	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dr. Gabriel Eduardo Cuevas González Bravo	Instituto de Química, UNAM
Segundo suplente	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM

Este oficio cancela al No.133 del 20 de enero de 2001.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 28 de agosto de 2001.


DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES
Coordinador del Programa

c.c.p.: Miembros del Jurado
Sección Escolar
Interesado
Expediente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dr. Raymundo Cea Olivares
Tel./Fax 55 50 91 96
pcquimicas@dgep.posgrado.unam.mx

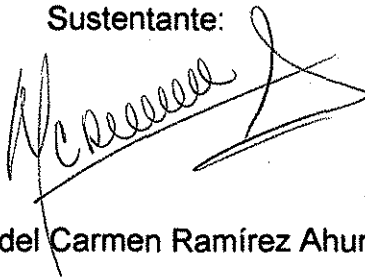
JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Primer vocal:	Dr. John Thor Arnason
Segundo vocal:	Dra. Martha Sonia Morales Ríos
Tercer vocal:	Dr. Carlos Cerda García-Rojas
Secretario:	Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer suplente:	Dr. Gabriel Cuevas González Bravo
Segundo suplente:	Dr. Andrés Navarrete Castro

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 124
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Sustentante:



Biol. María del Carmen Ramírez Ahumada

Tutor:

Dra. Rachel Mata Essayag

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El presente trabajo de tesis fue dirigido por la Dra Rachel Mata Essayag y codirigido por el Dr. Carlos Cerda García-Rojas, investigador del Departamento de Química del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

En primer término expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones y dependencias; a la Dirección General de Apoyo al personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma de México (PADEP) por el apoyo financiero otorgado a través de los proyectos IN-207300, 27987N, 108327 y 108316, respectivamente. A la DGAPA y DGEP por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de Posgrado.

Asimismo hago patente mi agradecimiento a los siguientes académicos por el apoyo brindado a lo largo de la realización de la presente investigación:

Al Dr. Víctor Parra de la Universidad de Yucatán por la recolección e identificación del material vegetal utilizado en el presente estudio.

Al Dr. John T. Arnason, Profesor de la Universidad de Ottawa, Canadá, por su asesoría durante la determinación de la actividad fagoinhibidora de los compuestos aislados durante la presente investigación.

A la Dra. Perla C. Castañeda López, al Dr. Daniel Chávez Velasco y a la M. en C. Laura A. Acevedo por su valiosa asistencia técnica.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz, al Q. Wilber Mathus (Instituto de Química, UNAM), a los QFB Rosa Isela del Villar Morales y Oscar S. Yáñez Muñoz (USAI, Facultad de Química, UNAM) y al M. en C. Atilano Gutiérrez (UAM, Iztapalapa) por el registro de los espectros de RMN. A la QFB Rocío Patiño (Instituto de Química, UNAM) por los registros de los espectros de IR, UV y DC y las determinaciones de rotación óptica. A las QFB Graciela Chávez y la Q.

Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de algunos de los espectros de IR y UV. Al IQ. Luis Velasco Ibarra, el M. en C. Javier Pérez Flores (Instituto de Química, UNAM) y a la Q. Georgina Duarte Lisci (USAI, Facultad de Química, UNAM) por el registro de los espectros de masas.

A los miembros del comité tutorial integrado por los doctores María Isabel Aguilar Laurents, Mariano Martínez Vázquez y Carlos Cerda García-Rojas por el estímulo y recomendaciones brindados durante la realización de este proyecto de tesis.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones que enriquecieron la versión final de la tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad y el apoyo para realizar mis estudios.

A los prestadores del Servicio Social del Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia y a mis compañeros de laboratorio, por su ayuda desinteresada.

De manera muy especial agradezco al Dr. Carlos Cerda García-Rojas, investigador del Departamento de Química del CINVESTAV-IPN, por su interés en el presente proyecto de tesis, por su importante colaboración en la realización de los cálculos de mecánica molecular y por sus invaluable enseñanzas y sugerencias a lo largo del presente trabajo de tesis.

Por último, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Rachel Mata Essayag, quién dio origen al presente proyecto, por su invaluable dirección y apoyo a lo largo de la presente investigación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres María Esther y Arturo

*Por su amor, su fortaleza, por dedicarme
su vida entera, los amo*

*A mis hermanos Arturo, Edgar, Octavio y Esther
Por su cariño, por confiar en mí y apoyarme siempre*

A mis sobrinos

Aranza, Ivonne e Iván

A Laura y Norma

*Por su comprensión,
su cariño y por llenar mi vida
con su amistad*

A Carmen y Miryam, mis ángeles guardianes

INDICE

Páginas

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABLAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ESPECTROS	xv
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
CAPITULO II. ANTECEDENTES	10
2.1 Antecedentes generales	10
2.1.1 Generalidades sobre el género <i>Trichilia</i>	10
2.1.2 Antecedentes sobre la especie <i>Trichilia trifolia</i>	21
2.1.3 Estudios biológicos de extractos y metabolitos obtenidos de especies del género <i>Trichilia</i>	25
2.2 Antecedentes sobre compuestos de tipo dolabelano	27
2.3 Generalidades sobre el gorgojo del arroz <i>Sitophilus oryzae</i>	47
CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
3.1 Hipótesis	49
3.2 Objetivo principal	49
3.3 Objetivos particulares	50

CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1 Material vegetal	51
4.2 Determinación del efecto fagoinhibidor de los extractos y compuestos puros obtenidos de la madera de <i>T. trifolia</i>	51
4.2.1 Preparación de los discos de harina (problema y control)	52
4.2.2 Procedimiento del bioensayo	52
4.3 Estudio químico de <i>T. trifolia</i>	53
4.3.1 Procedimientos experimentales generales	53
4.3.1.1 Métodos cromatográficos	53
4.3.1.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos naturales	55
4.3.2 Preparación del extracto orgánico de la madera de <i>T. trifolia</i>	56
4.3.3 Fraccionamiento biodirigido del extracto de la madera de <i>T. trifolia</i>	56
4.3.4 Aislamiento y caracterización de los dolabelanos bioactivos a partir de las fracciones activas de <i>T. trifolia</i>	58
4.3.4.1 Aislamiento y purificación de los compuestos 132 y 133 de la fracción primaria VII	58
4.3.4.2 Aislamiento de los compuestos 134 y 135 de la fracción primaria XII	62
4.3.4.3 Aislamiento del compuesto 136 de la fracción primaria XII	65
4.3.5 Aislamiento y purificación de los compuestos 3 , 4 , 5 de la fracción primaria XIII	67
4.3.6 Preparación de derivados a partir de los productos naturales aislados	68
4.3.6.1 Obtención del derivado metilado del compuesto 132	68
4.3.6.2 Obtención del derivado epoxidado del compuesto 132	69
4.3.6.3 Obtención del derivado acetilado del compuesto 134	69

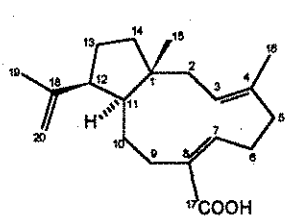
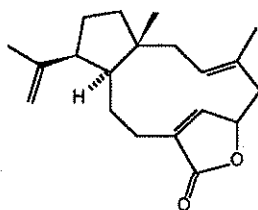
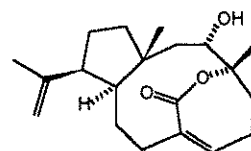
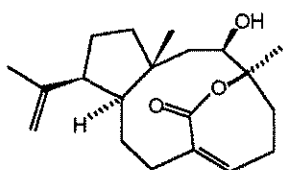
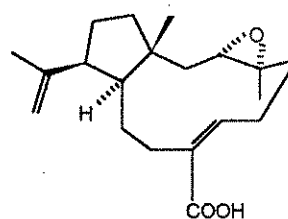
4.4 Cálculos de modelaje molecular	70
CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
5.1 Preselección y selección de la especie <i>Trichilia trifolia</i> como fuente potencial de agentes insecticidas	72
5.2 Obtención de los compuestos biodinámicos a partir del extracto activo de la madera de <i>T. trifolia</i>	74
5.3 Caracterización de los compuestos obtenidos de la madera de <i>T. trifolia</i>	76
5.3.1 Elucidación estructural de los compuestos 132, 133 y 136	78
5.3.2. Elucidación estructural de los compuestos 134 y 135	91
5.4 Evaluación del potencial insecticida de los compuestos aislados de <i>T. trifolia</i> sobre el gorgojo del arroz <i>Sitophilus oryzae</i>	103
CAPITULO VI. CONCLUSIONES	105
CAPITULO VII. PERSPECTIVAS GENERALES	107
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXO 1	126

RESUMEN

Como una parte de un programa dirigido al descubrimiento de nuevos agentes insecticidas a partir de meliáceas mexicanas, el presente proyecto de tesis doctoral describe la investigación química y la evaluación del potencial insecticida de los metabolitos secundarios aislados del extracto de la madera de *Trichilia trifolia*, recolectada en el estado de Yucatán, México.

La selección de la especie vegetal objeto de estudio se realizó con base en los resultados obtenidos durante la determinación de la actividad fago inhibidora, sobre *Sitophilus oryzae*, de una serie de extractos orgánicos que se elaboraron a partir de las diferentes partes vegetales de especies selectas del género *Trichilia* distribuidas en México, las cuales se preseleccionaron de acuerdo con el criterio quimiotaxonómico.

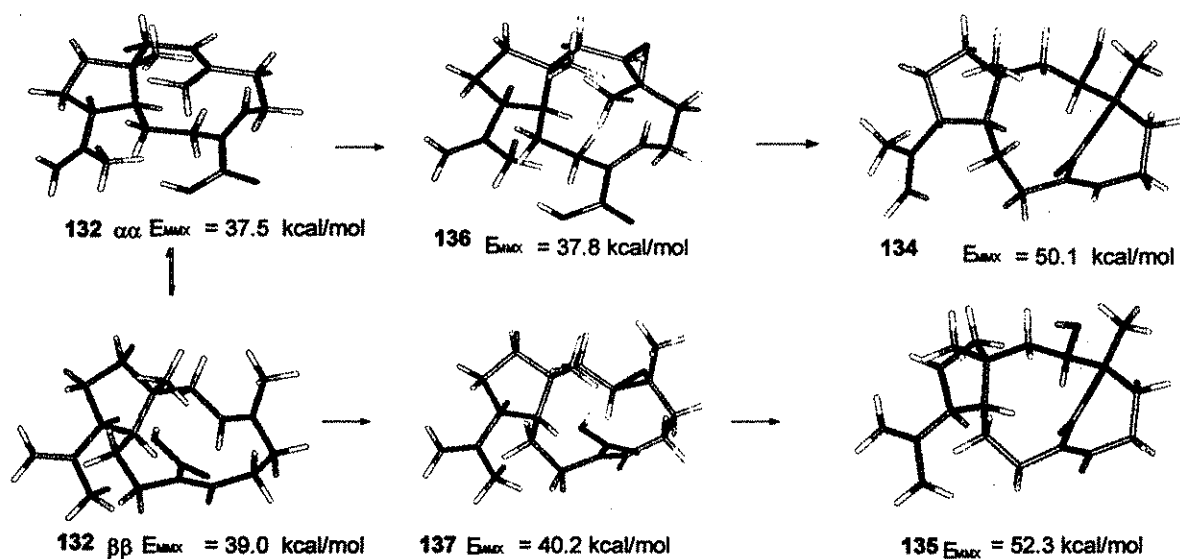
El fraccionamiento biodirigido del extracto activo de la madera de *T. trifolia*, empleando como bioensayo de monitoreo la actividad fago inhibidora sobre el insecto de prueba *Sitophilus oryzae* y como técnicas de separación, la cromatografía en columna y la cromatografía de líquidos de alta resolución, condujo al aislamiento de cinco diterpenoides novedosos del tipo dolabelano los cuales se caracterizaron como el ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-17-oico (132), (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-6,17-olida (133), (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxdolabela-7,18-dien-4,17-olida (134); (1*R*,3*R*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxdolabela-7,18-dien-4,17-olida (135) y el ácido (1*R*,3*S*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3,4-epoxidolabela-7,18-dien-17-oico (136).

**132****133****134****135****136**

De manera general, la elucidación estructural de los productos naturales se realizó mediante la aplicación de cálculos de mecánica molecular, métodos espectroscópicos, espectrométricos, químicos y de difracción de rayos X. Para determinar la estereoquímica absoluta de los compuestos **134** y **135**, se llevó a cabo un estudio de dicroísmo circular aplicando el método de Sneath para γ -lactonas α - β insaturadas. La configuración absoluta de los productos restantes se propuso con base en consideraciones biogenéticas.

La coexistencia de los dolabelanos **132**, **134**, **135** y **136** en conjunto con los cálculos de mecánica molecular permitieron proponer una secuencia metabólica para los dolabelanos aislados de *T. trifolia*. De esta manera, la búsqueda conformacional sistemática y la transformación química del ácido **132** para obtener

un compuesto idéntico al producto natural **136** permitieron sustentar parcialmente la ruta biosintética que se indica a continuación:



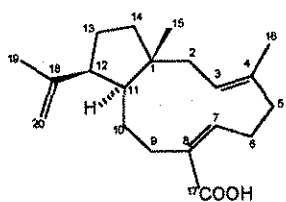
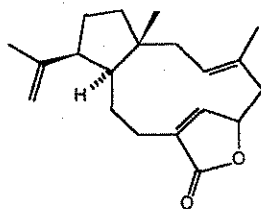
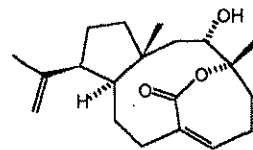
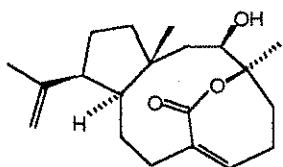
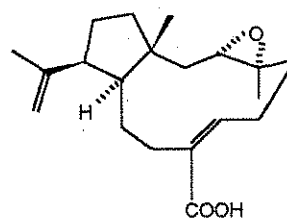
El potencial insecticida de los dolabelanos aislados se determinó mediante la evaluación de la actividad fagoinhibidora sobre el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*. Los resultados obtenidos en los bioensayos indican que los compuestos **132-134** presentan una importante actividad fagoinhibidora sobre el insecto de prueba lo cual sugiere que estos compuestos pueden jugar un papel de defensa en la planta objeto de estudio.

ABSTRACT

As a part of a research program to discover insecticidal agents from Mexican Meliaceae, it was found that an organic extract prepared from the wood of *Trichilia trifolia* induced feeding reduction on *Sitophilus oryzae*. Accordingly, this species was selected for fractionation.

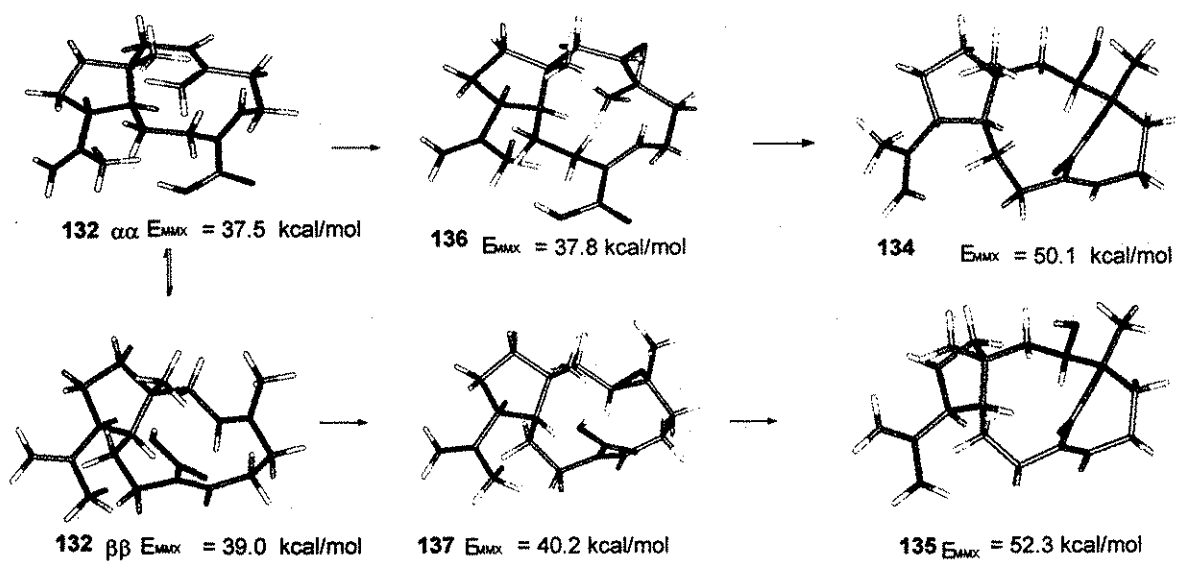
Activity-guided fractionation of the active extract led to the isolation of five novel dolabellane diterpenes, namely, (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid (**132**), (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (**133**), (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hydroxydolabella-7,18-dien-4,17-olide (**134**), (1*R*,3*R*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hydroxydolabella-7,18-dien-4,17-olide (**135**) and (1*R*,3*S*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-epoxydolabella-7,18-dien-17-oic acid (**136**). The isolates were identified through one and two dimensional NMR experiments, high resolution mass spectrometry and chiroptical methods. In the case of compounds **132** and **133** the structures were unequivocally confirmed by X-ray diffraction analysis. Comparison between experimental and calculated ¹H-¹H vicinal coupling constants, molecular mechanics modeling and NOESY data revealed that the 11-membered ring of **132** and **133** exists in a conformational equilibrium in solution, while in **134-136** this ring possesses a more rigid structure.

Regarding the absolute configuration of the isolates, compounds **134** and **135** were selected for the configurational analysis they possess a rigid structure and an inherently dissymmetric chromophore, since the C=C-C=O moiety is not planar. The CD spectrum of **134** displayed de K-band absorption at 245 nm with a positive value of $\Delta\epsilon = + 2.0 \times 10^5$, while the R-band was observed at 300 nm with

**132****133****134****135****136**

$\Delta\epsilon = - 4.6 \times 10^3$. Therefore, according to the rules for C=C-C=O systems, these values correspond to a positive chirality as shown by the minimum energy structure of **134**, where the C=C-C=O dihedral angle is $\Phi = + 136^\circ$. In the case of compound **135** the K-band absorption was observed at 236 nm with a negative value of $\Delta\epsilon = - 2.0 \times 10^5$, while the R-band was observed at 300 nm with $\Delta\epsilon = + 4.6 \times 10$. These values correspond to a negative chirality with the C=C-C=O dihedral angle at $\Phi = - 138^\circ$. Based on biogenetic considerations, compounds **132**, **133** and **136** should have the same absolute configuration than **134** and **135**.

Compounds **133-136** might be biogenetically derived from acid **132**. The biosynthetic pathway mapping for the lactonization of **132** to dolabellanolides **134** and **135** was assessed by molecular mechanics calculations and chemical transformations according to the following scheme:



Finally, based on the flour-disk bioassay, compounds **132-134** showed significant feeding reduction on *Sitophylus oryzae*. The bioassay results suggest that these compounds may have a defensive role in the host plant.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	rotación óptica	IPA	isopropanol
AcOEt	acetato de etilo	IR	Infrarrojo
°C	grado centígrado	J	Constante de acoplamiento
ccf	cromatografía en capa fina	KBr	Bromuro de potasio
CH ₂ Cl ₂	diclorometano	Kg	Kilogramo
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución	m	metro
cm	centímetro	mg	miligramo
δ	desplazamiento química	m	multiplete
DC	dicroísmo circular	L	litro
d	doblete	μ l	microlitro
dd	doble de doble	MeOH	metanol
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución	MHz	megahertz
EMIE	Espectro de masas por impacto electrónico	min	minuto
EtOH	etanol	mL	mililitro
eV	electron Volts	nm	nanómetro
g	gramo	pf	punto de fusión
Hz	Hertz	ppm	partes por millón
Hex	Hexano	q	quinteto

RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H COSY	Espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear
RMN 2D-NOEDS	Espectroscopía bidimensional diferencial por efecto nuclear de Overhauser (¹ H- ¹ H)
RMN ¹ H NOESY	Espectroscopía bidimensional por efecto nuclear de Overhauser (¹ H- ¹ H)
RMN ¹³ C-DEPT	Resonancia magnética nuclear de carbono 13 con desacoplamiento de los núcleos de hidrógeno
RMN 2D-HMBC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear (¹ H- ¹³ C)
RMN 2D-HMQC	Espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear múltiple (¹ H- ¹³ C)
s	singulete
sa	singulete ancho
T	Transmitancia
td	triplete dobleteado
t _R	tiempo de retención
TMS	tetrametilsilano

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Distribución del género <i>Trichilia</i> en México.....	10
Tabla 2.	Compuestos obtenidos de especies del género <i>Trichilia</i>	11
Tabla 3.	Ejemplos de limonoides con actividad insecticida obtenidos de plantas pertenecientes al género <i>Trichilia</i>	19
Tabla 4.	Compuestos de tipo dolabelano y sus fuentes naturales	29
Tabla 5.	Fraccionamiento preliminar del extracto CH ₂ Cl ₂ de la madera de <i>T. trifolia</i>	57
Tabla 6.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria VII	58
Tabla 7.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XII	62
Tabla 8.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XIV	65
Tabla 9.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XIII	67
Tabla 10.	Porcentajes de fago inhibición de los extractos de las especies seleccionadas	74
Tabla 11.	Porcentajes de fago inhibición de fracciones correspondientes al extracto de la madera de <i>T. trifolia</i>	75
Tabla 12.	Desplazamientos químicos de RMN ¹ H (500 MHz) de los dolabelanos 132-136	80
Tabla 13.	Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C (125 MHz) de los dolabelanos 132-136	81
Tabla 14.	Porcentajes conformacionales para el dolabelano 132	88
Tabla 15.	Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) para 134 y 135	98
Tabla 16.	Porcentaje de fago inhibición presentado por los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de la madera de <i>T. trifolia</i> ..	104

LISTA DE FIGURAS

Figura .1.	Ejemplos selectos de insecticidas naturales	8
Figura .2.	<i>Trichilia trifolia</i>	22
Figura .3.	Distribución en México de la especie <i>Trichilia trifolia</i>	23
Figura 4.	<i>Trichilia trifolia</i> : Madera (superior); hojas y frutos (inferior)	24
Figura 5.	Gorgojo del arroz <i>Sitophilus oryzae</i>	48
Figura 6.	Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción primaria VII B	59
Figura 7.	Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria VII H	60
Figura 8.	Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria XII F	63
Figura 9.	Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria XII H	64
Figura 10.	Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria XIV F	66
Figura 11.	Estructuras de los metabolitos secundarios aislados del extracto activo de la madera de <i>Trichilia trifolia</i>	76
Figura 12.	Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC de los compuestos 132-136	82
Figura 13.	Región del espectro de RMN ¹ H entre δ_H 4.9-4.5 donde aparecen H-20 y H-20' de la mezcla de epóxidos 136 y 137	83
Figura 14.	Vista estereoscópica del compuesto 132	84
Figura 15.	Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC del compuesto 133	85
Figura 16.	Vista estereoscópica del compuesto 133	86
Figura 17.	Estructuras de mínima energía para los confórmeros 132A y 132B mostrando el equilibrio conformacional y las correlaciones NOESY más importantes	87

**FALTA
PAGINA**

XIV

LISTA DE ESPECTROS

- Espectro 1. Espectro de RMN ^1H del compuesto **132**
- Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **132**
- Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto **132**
- Espectro 4. Espectro de RMN ^1H - NOESY del compuesto **132**
- Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H – HMBC del compuesto **132**
- Espectro 6. Espectro de masas modalidad IE del compuesto **132**
- Espectro 7. Espectro en el IR del compuesto **132**
- Espectro 8. Espectro de UV del compuesto **132**
- Espectro 9. Espectro de dicroísmo circular del compuesto **132**
- Espectro 10. Espectro de RMN ^1H del derivado metilado del compuesto **132**
- Espectro 11. Espectro de RMN ^{13}C del derivado metilado del compuesto **132**
- Espectro 12. Espectro en el IR del derivado metilado del compuesto **132**
- Espectro 13. Espectro de RMN ^1H del compuesto **133**
- Espectro 14. Espectro de RMN ^{13}C del derivado compuesto **133**
- Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto **133**
- Espectro 16. Espectro de RMN ^1H - NOESY del compuesto **133**
- Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H – HMBC del compuesto **133**
- Espectro 18. Espectro de masas modalidad IE del compuesto **133**
- Espectro 19. Espectro en el IR del compuesto **133**
- Espectro 20. Espectro de UV del compuesto **133**
- Espectro 21. Espectro de dicroísmo circular del compuesto **133**
- Espectro 22. Espectro de RMN ^1H del compuesto **134**

Espectro 23.	Espectro de RMN ^{13}C del derivado compuesto 134
Espectro 24.	Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto 134
Espectro 25.	Espectro de RMN ^1H - NOESY del compuesto 134
Espectro 26.	Espectro de RMN ^{13}C - ^1H – HMBC del compuesto 134
Espectro 27.	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 134
Espectro 28.	Espectro en el IR del compuesto 134
Espectro 29.	Espectro de UV del compuesto 134
Espectro 30.	Espectro de dicroísmo circular del compuesto 134
Espectro 31.	Espectro de RMN ^1H del derivado acetilado del compuesto 134
Espectro 32.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 135
Espectro 33.	Espectro de RMN ^{13}C del derivado compuesto 135
Espectro 34.	Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto 135
Espectro 35.	Espectro de RMN ^1H - NOESY del compuesto 135
Espectro 36.	Espectro de RMN ^{13}C - ^1H – HMBC del compuesto 135
Espectro 37.	Espectro en el IR del compuesto 135
Espectro 38.	Espectro de UV del compuesto 135
Espectro 39.	Espectro de dicroísmo circular del compuesto 135
Espectro 40.	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 135
Espectro 41.	Espectro de RMN ^1H del compuesto 136
Espectro 42.	Espectro de RMN ^{13}C del derivado compuesto 136
Espectro 43.	Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto 136
Espectro 44.	Espectro de RMN ^1H - NOESY del compuesto 136
Espectro 45.	Espectro de RMN ^{13}C - ^1H – HMBC del compuesto 136
Espectro 46.	Espectro de masas modalidad IE del compuesto 136

-
- Espectro 47. Espectro en el IR del compuesto **136**
- Espectro 48. Espectro de UV del compuesto **136**
- Espectro 49. Espectro de dicroísmo circular del compuesto **136**

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las plantas han evolucionado a través de 400 millones de años para combatir el ataque de insectos por lo que han desarrollado una serie de mecanismos de protección, tales como repelencia y acción insecticida. De tal forma que un gran número de especies vegetales contienen compuestos naturales con actividad insecticida y algunas de ellas han sido utilizadas por el hombre para proteger sus cultivos desde tiempos inmemoriales. Asimismo, algunos extractos de estas plantas han proporcionado valiosos insecticidas de contacto, los cuales tienen la ventaja de que su uso no origina resistencia en insectos en el mismo grado que la aplicación de insecticidas sintéticos (Benner, 1993).

Las plantas tropicales están expuestas a lo largo de todo el año al ataque de bacterias, hongos e insectos, por tanto confrontan condiciones de vida muy adversas para sobrevivir. Esta situación ha conducido al desarrollo de mecanismos de defensa eficientes tales como la producción de metabolitos secundarios que poseen propiedades insecticidas muy interesantes (Kubo, 1993). Estos productos naturales tienen la ventaja de que pueden ser utilizados como modelos para la síntesis química de compuestos más eficaces y potentes, o como productos comerciales mediante su extracción directa a partir de los organismos que los biosintetizan (Rembold, 1989).

Los primeros insecticidas empleados por el hombre fueron extractos de plantas, los cuales se aplicaban para la protección de cultivos tanto en el campo como después de la cosecha. Con el paso de los años, algunas plantas se explotaron de manera más amplia como fuentes de insecticidas comerciales, pero a partir de los años cuarentas los insecticidas sintéticos remplazaron en gran medida a los fitoquímicos y extractos de plantas como productos comerciales. En consecuencia, la investigación de productos naturales como una fuente de productos de importancia agroquímica disminuyó por algunos años. Sin embargo, en años recientes, esta tendencia se está revirtiendo debido a los diversos problemas que han surgido con el uso de insecticidas convencionales de origen sintético, entre los que destacan el desarrollo de resistencia por parte de plagas y los daños que causan al hombre, otros vertebrados y al medio ambiente en general (Benner, 1993; Baker, 1995, Rouse *et al.*, 1999, van Vliet *et al.*, 1999; McRae *et al.*, 2000). La resistencia puede ser definida como la habilidad de una cepa de insectos para tolerar las dosis de insecticida que podrían matar a la mayor parte de una población normal de una misma especie. Algunos de los casos mejor documentados de resistencia en insectos han sido observados con el DDT y otros insecticidas organoclorados persistentes. También se ha descrito la resistencia de numerosos insectos a insecticidas organofosforados. Estos procesos de desarrollo de resistencia han causado serios problemas de control en los últimos años. La resistencia se produce probablemente porque los insecticidas tienen una toxicidad inicial extremadamente alta y matan rápidamente a los organismos susceptibles,

mientras que un número reducido de individuos naturalmente resistentes sobreviven y quedan en libertad de reproducirse con poca competencia (Baker, *et al.*; Cremllyn, 1978; 1995; Chicuiltt y Tabashnik, 1995).

En lo que se refiere a la contaminación del medio ambiente, es bien conocido que el uso recurrente de algunos insecticidas y sus altos índices de persistencia en el ambiente han ocasionado graves problemas de toxicidad para el hombre y otros animales. Así, por ejemplo, en la literatura se ha descrito que algunos insecticidas como el DDT y el Aldrín son altamente tóxicos para algunas aves de rapiña y para los mamíferos. Es conocido que el águila blanca está desapareciendo a nivel mundial como una consecuencia de los efectos tóxicos del DDT (Arnason *et al.*, 1992; Aronson *et al.*, 2000; Cremllyn, 1978; Klocke, 1989; Morgan, 1985; Perkins, 1985; Sharon, 1981; Schmutterer, 1995; Wolff *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000).

Por los motivos antes expuestos, la búsqueda de nuevos agentes insecticidas de origen vegetal con una toxicidad potencial menor se encuentra ampliamente justificada. En este contexto, las plantas producen un rango muy diverso de metabolitos secundarios tales como terpenoides, alcaloides, policétidos, flavonoides y cumarinas, entre otros, que están involucrados en los mecanismos de protección de las plantas al ataque de insectos y otras plagas y que pueden constituir una fuente potencial muy valiosa para el desarrollo de nuevos agentes insecticidas.

Es importante mencionar que numerosos productos naturales con propiedades insecticidas son inocuos para el hombre y otros vertebrados sobre

todo en comparación con los efectos neurotóxicos de los insecticidas sintéticos convencionales. Al mismo tiempo, los insecticidas vegetales presentan una mayor especificidad en su acción biológica debido a sus singulares mecanismos de acción y a las diferencias en su metabolismo y excreción (Benner, 1993, Klocke, 1989; McRae *et al.*, 2000). La investigación de nuevos fitoquímicos con un potencial insecticida se ha enfocado a la búsqueda de principios bioactivos con mecanismos de acción no neurotóxicos tales como la acción inhibidora de la ingesta de alimentos, la regulación del crecimiento, la inhibición de la respiración y la fototoxicidad, por tan solo mencionar algunos. Estos mecanismos de acción de los insecticidas verdes cuya investigación se encuentra en pleno desarrollo, reducen de manera considerable el riesgo de inducir entre las poblaciones de insectos el fenómeno de la resistencia (Benner, 1989; Kubo, 1993; McRae *et al.*, 2000).

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 los insecticidas comerciales (Klocke,1989; Rembold, 1989). A continuación se describen los ejemplos más importantes. En primer lugar se encuentran las piretrinas naturales obtenidas de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) y otras especies del género. La flor seca y pulverizada se ha usado como insecticida desde hace mucho tiempo (Matsui y Yamamoto, 1971). El piretrum natural, que consiste de una mezcla de seis compuestos estrechamente relacionados, es todavía usado comercialmente pero ha sido sustituido en gran medida por los piretroides

sintéticos que presentan propiedades insecticidas y una fotoestabilidad considerablemente mayores que los productos naturales (Benner, 1993).

La rotenona (1) es un insecticida de origen natural muy conocido y, junto con otros rotenoides se obtiene a partir de especies de *Derris*, *Lonchocarpus* y *Tephrosia* (Leguminosae). Este compuesto es activo contra un amplio rango de insectos y su modo de acción implica la inhibición del proceso de respiración interfiriendo en el transporte de electrones mitocondrial (Benner, 1993).

Otro compuesto natural empleado como insecticida comercial es la nicotina (2). Este producto se encuentra en muchas especies del género *Nicotiana*, aunque *Nicotiana rustica* L. (Solanaceae) es la mejor fuente. La nicotina tiene la desventaja de que es un compuesto altamente tóxico para el hombre ya que afecta el sistema nervioso central al unirse a receptores de la acetilcolina (Benson, 1992).

Algunas especies de los géneros *Sabadilla* y *Veratrum* (Liliaceae) se usaron por muchos años como fuentes de insecticidas, sin embargo su aplicación comercial esta ahora muy limitada. Los ingredientes activos son una serie de alcaloides esteroidales y entre los más importantes se encuentra la veratridina (3). Los alcaloides del veratro afectan los canales de sodio (Benson, 1992) y presentan altos niveles de toxicidad tanto para mamíferos como para los insectos.

La quassina (4) se obtuvo originalmente de la madera de *Quassia amara* L., un pequeño árbol tropical miembro de la familia Simarubaceae. Un arbusto relacionado, *Aeschynomene excelsa*, representó posteriormente la fuente principal del

insecticida. Este compuesto es un insecticida débil y comercialmente se utiliza como ingrediente de algunos repelentes para perros y gatos (Benner, 1993).

La ryanodina (5), derivada de algunas especies de *Ryania* (Flacourtiaceae), especialmente *R. speciosa* Vahl, representa el primer ejemplo de un insecticida natural comercialmente exitoso. La ryanodina intoxica los músculos por unión a los canales de calcio en el retículo sarcoplásmico (Benner, 1993).

Un grupo de compuestos aún no comercializados, pero que han propiciado una extensa investigación en el campo de la síntesis de insecticidas, son las isobutilamidas insaturadas. Dentro de esta categoría de metabolitos secundarios destacan la pelitorina (6), aislada por primera vez de *Anacyclus pyrethrum* (Crombie, 1955); la afinina (7), derivada de *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake (Jacobson, 1970); y la piperida (8) obtenida a partir de *Piper nigrum* L. (pimienta negra) (Miyakado *et al.*, 1979). Las isobutilamidas causan la caída rápida y la muerte de insectos voladores pero son también inestables para usarse como productos comerciales por sí mismos. Se ha encontrado que estos compuestos actúan como bloqueadores de los canales de calcio (Benner 1993).

Uno de los insecticidas botánicos que tiene interés como producto por sí mismo, es el aceite obtenido a partir de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). El aceite contiene muchos compuestos pero el más conocido y uno de los más activos es la azadiractina (9). Este compuesto fue aislado por vez primera en 1968, pero su estructura no fue elucidada sino hasta 1985 (Ley, 1990). La azadiractina y congéneres modifican la ingesta de alimentos, el crecimiento

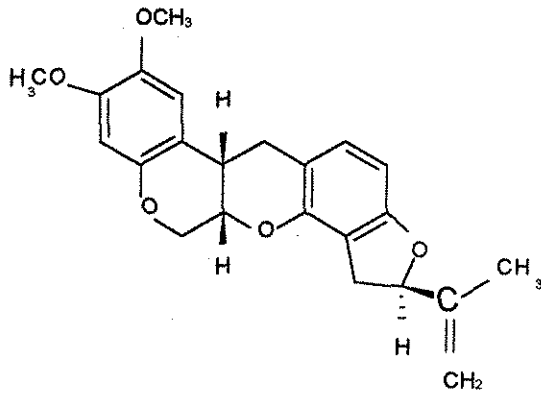
larvario y las funciones endocrinas de una gran variedad de insectos (Benner, 1993).

Otro limonoide obtenido a partir de las Meliaceas que ha demostrado una notable actividad insecticida es la tusendanina (10), obtenida a partir de *Melia toosendan* y de *Melia azederach*. Este compuesto fue recientemente identificado y es ampliamente comercializado como insecticida verde en China. De manera adicional, el extracto de esta planta es empleado en Cuba para eliminar diferentes especies de insectos (Schmutterer, 1995; Isman *et al.*, 1996). Este producto actúa como un inhibidor del crecimiento y su mecanismo de acción aún no está bien establecido. Sin embargo, es necesario aclarar que este compuesto al igual que la mayoría de los limonoides evaluados a la fecha no presenta un mecanismo de acción neurotóxico (Isman *et al.*, 1996).

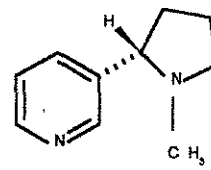
Como se desprende de los ejemplos antes presentados el reino vegetal constituye sin lugar a dudas una fuente potencial importante de productos naturales con propiedades insecticidas.

Considerando lo anterior y destacando la importancia de los limonoides de las Meliáceas como agentes insecticidas verdes, se inició un proyecto de investigación con la finalidad de determinar el potencial insecticida de extractos y productos derivados de especies selectas del género *Trichilia*. Este género se encuentra ampliamente distribuido en México y a la fecha no se han realizado estudios sistemáticos locales conducentes a la determinación de su potencial como una fuente de nuevos agentes insecticidas. En esta disertación se

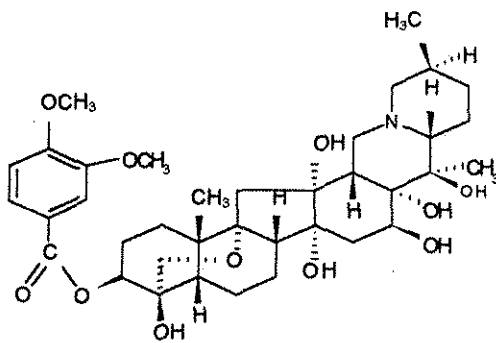
presentan los resultados relacionados con el estudio del género *Trichilia*, muy abundante en México



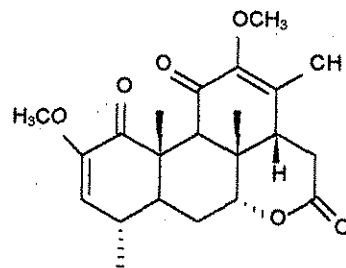
Rotenona (1)



Nicotina (2)

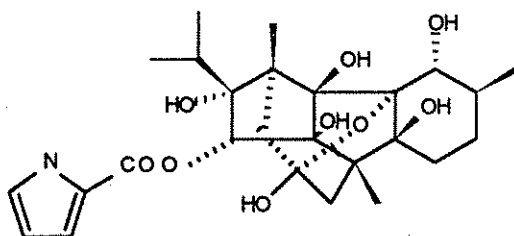
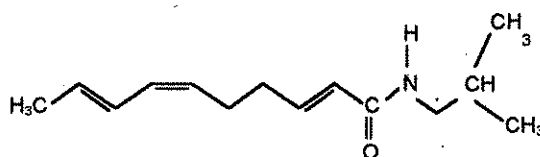
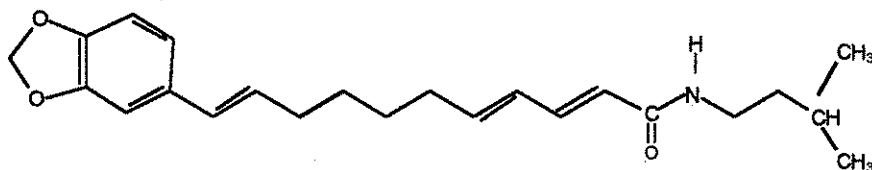
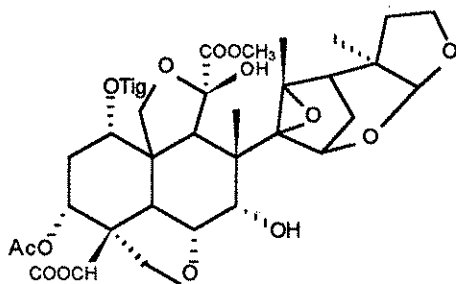
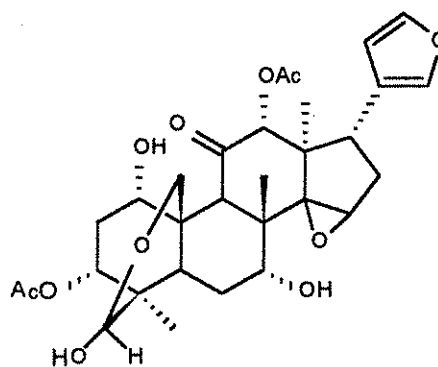


(-) Veratridina (3)



Cuasina (4)

Figura 1. Ejemplos selectos de insecticidas naturales.

**RIANODINA (5)****AFFININA (7)****PIPERCIDA (8)****AZADIRACTINA (9)****TUSENDANINA (10)****Figura 1. Ejemplos selectos de insecticidas naturales (Continuación).**

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES GENERALES

2.1.1 GENERALIDADES SOBRE EL GENERO *Trichilia*.

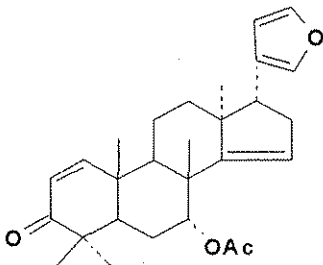
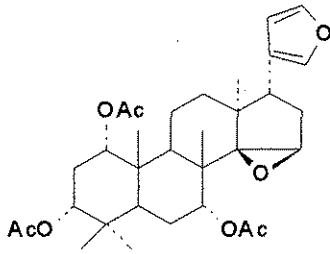
El género *Trichilia*, perteneciente a la familia de las meliáceas, está constituido por aproximadamente 70 especies, la mayoría de las cuales se distribuyen en la América tropical, cerca de 14 especies en África y dos especies en la región Indo-Malaya. En la tabla 1 se resumen las especies del género registradas para el territorio mexicano (Pennington, 1981).

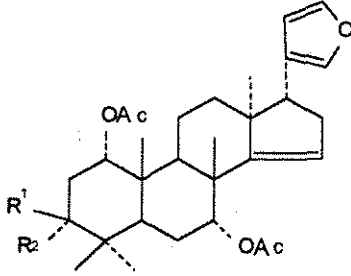
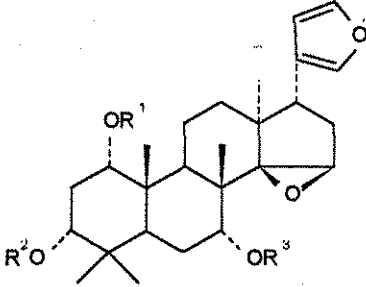
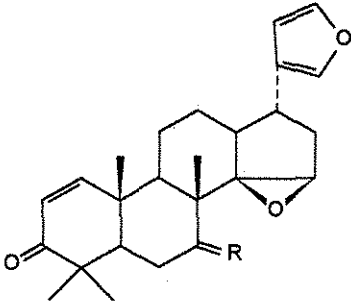
Tabla 1. Distribución del género *Trichilia* en México

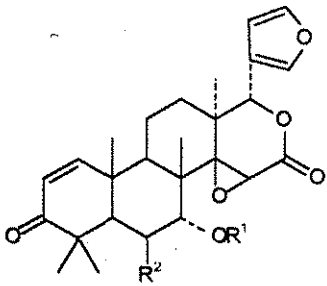
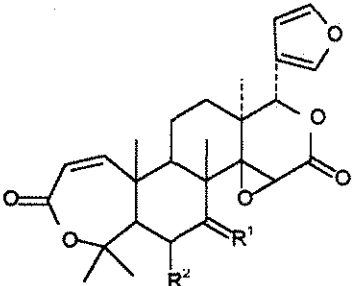
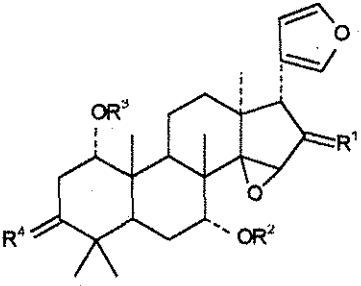
ESPECIE	DISTRIBUCION
<i>Trichilia americana</i>	Desde Sonora hasta el Pacífico en las pendientes de Chiapas
<i>Trichilia hirta</i>	Desde Sonora a Tamaulipas, llegando a Chiapas y Yucatán
<i>Trichilia martiana</i>	Costas del Pacífico, Caribe y Sureste Mexicano
<i>Trichilia glabra</i>	Bosque estacional siempreverde en la península de Yucatán y depresión central de Chiapas.
<i>Trichillia pallida</i>	Tabasco, Chiapas y Veracruz.
<i>Trichillia trifolia</i>	Caribe de México desde Tamaulipas al sur de la península de Yucatán.
<i>Trichilia havanensis</i>	Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Guerrero, Veracruz y Estado de México.
<i>Trichilia erythrocarpa</i>	San Andrés Tuxtla, Veracruz.
<i>Trichilia moschata</i>	Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas.
<i>Trichilia minutiflora</i>	Campeche y Yucatán

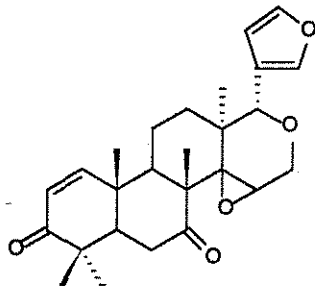
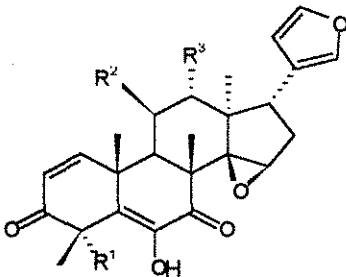
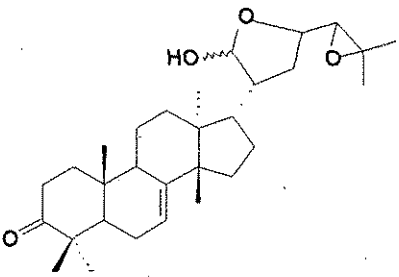
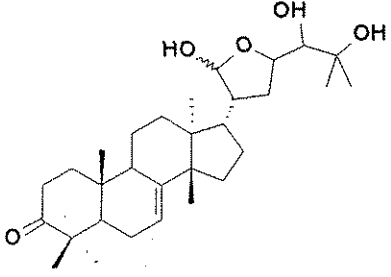
Tres de las especies del género *Trichilia*, encontradas en México, han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico *T. havanensis*, *T. trifolia* y *T. hirta*. Los compuestos de tipo limonoide obtenidos de las mismas se resumen en la Tabla 2.

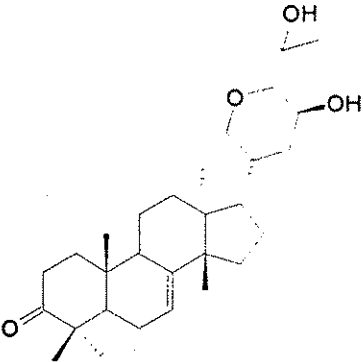
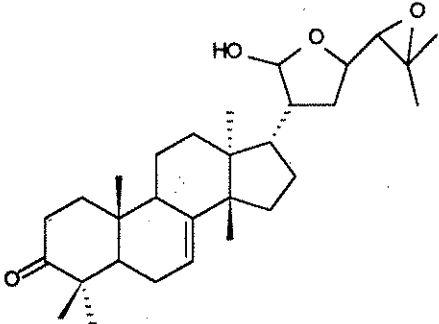
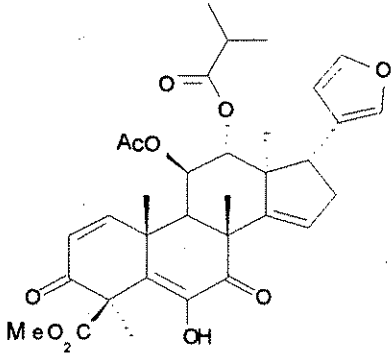
Tabla 2. Compuestos obtenidos de especies de *Trichilia*.

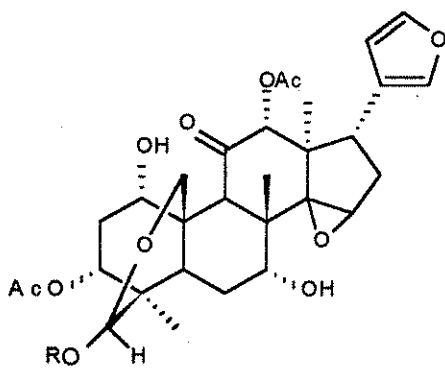
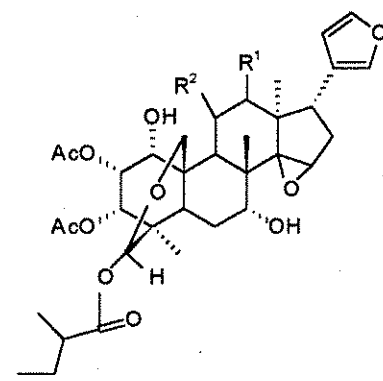
ESPECIE	COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Trichilia havanensis</i>	Azadirona (20) 	(Arenas y Rodríguez-Hahn, 1990)
	Triacetilhavanensina (21)  2	(Arenas y Rodríguez-Hahn, 1990)
	Triacetil-14,15-desoxihavanensina (22) 1-7-Diacetil-14,15-desoxihavanensina (23)	(Arenas y Rodríguez-Hahn, 1990)

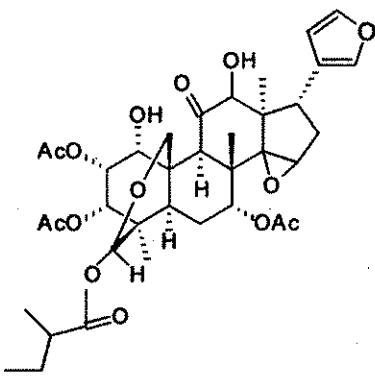
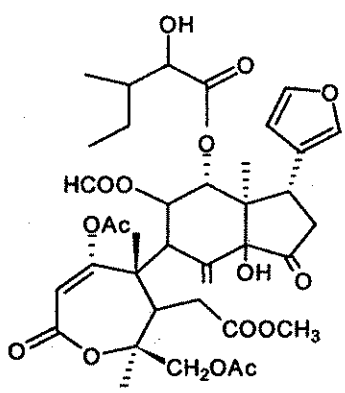
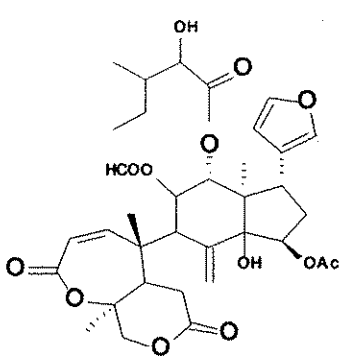
	 <p>(22) $R^1 = H$, $R^2 = OAc$ (23) $R^1 = H$, $R^2 = OH$</p>	
	<p>3-7-Diacetilhavanensina (24) 1,7-Diacetilhavanensina (25)</p>  <p>(24) $R^1 = H$, $R^2 = R^3 = Ac$ (25) $R^2 = H$ $R^1 = R^3 = Ac$</p>	(Chan <i>et al.</i> , 1973)
	<p>Acetiltriqlenona (26)</p> 	(Chan <i>et al.</i> , 1973)

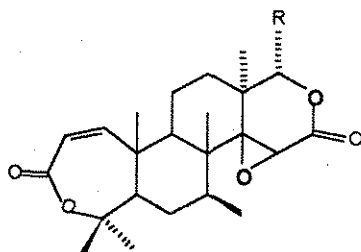
<p><i>Trichilia trifolia</i></p>	<p>Gedunina (27) Desacetilgedunina (28)</p>  <p style="text-align: center;"> R^1 R^2 (27) Ac H (28) H H </p>	<p>(Taylor, 1971)</p>
	<p>6β-acetoxibacunol (29) 6β-acetoxi-7-acetilobacunol (30)</p>  <p style="text-align: center;"> R^1 R^2 (29) α-OH, H OAc (30) α-OAc, H OAc </p>	<p>(Taylor, 1971)</p>
	<p>Trifolina (31)</p>  <p style="text-align: center;"> R^1 R^2 R^3 R^4 (31) O Oac Ac α-OH, H </p>	<p>(Taylor, 1971)</p>

	<p>7-Cetogedunina (47)</p> 	(Taylor, 1971)												
<i>Trichilia hirta</i>	<p>Hirtina (32) Desacethylhirtina (33)</p>  <table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(32)</td> <td>CO₂Me</td> <td>OAc</td> <td>OCOEt</td> </tr> <tr> <td>(33)</td> <td>CO₂Me</td> <td>OH</td> <td>OCOEt</td> </tr> </tbody> </table>		R ¹	R ²	R ³	(32)	CO ₂ Me	OAc	OCOEt	(33)	CO ₂ Me	OH	OCOEt	(Chan y Taylor, 1966)
	R ¹	R ²	R ³											
(32)	CO ₂ Me	OAc	OCOEt											
(33)	CO ₂ Me	OH	OCOEt											
	<p>Melianona (34)</p> 	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992)												
<i>Trichilia hirta</i>	<p>Melianodiol (35)</p> 	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992)												

	<p>Bourjotinolona A (36)</p>  <p>The structure shows a steroid nucleus with a ketone at C-3, a double bond at C-5, and a glucose molecule attached to the D-ring at C-13. The glucose is in its cyclic form with hydroxyl groups at C-2 and C-6.</p>	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992)
	<p>Sitosterol (37)</p>  <p>The structure shows a steroid nucleus with a ketone at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17 consisting of a pentene ring, a hydroxyl group, and a trimethylgermyl group.</p>	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992)
	<p>11-β-acetoxi-6-hidroxi-12α-(2-metilpropioniloxi)-3,7-dioxo-1,5,14,20,22-meliacapentaen-29-oato (39)</p>  <p>The structure shows a complex steroid nucleus with a ketone at C-3, a double bond at C-5, a ketone at C-7, a hydroxyl group at C-6, an acetate group (ACO) at C-11, a 2-methylpropionyl ester group at C-12, a furan ring at C-14, and a methyl ester group (MeO₂C) at C-29.</p>	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992)

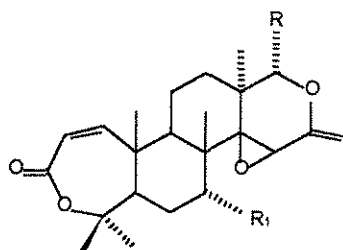
<p><i>Trichilia roka</i></p>	<p>Sendanina (40) Triquirokanina (41)</p>  <p>(40) R=Ac (41) R=COCH₂CH₂CH₃</p>	<p>(Nakatani <i>et al.</i>, 1981, 1984 y 1985 ; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i>, 1981</p>															
	<p>Triquilina A (42) Triquilina B (43) Triquilina C (44) Triquilina D (45)</p>  <table data-bbox="446 1596 785 1806"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>(42)</td> <td>OH</td> <td>O</td> </tr> <tr> <td>(43)</td> <td>OH</td> <td>O</td> </tr> <tr> <td>(44)</td> <td>O</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>(45)</td> <td>H</td> <td>O</td> </tr> </tbody> </table>		R ¹	R ²	(42)	OH	O	(43)	OH	O	(44)	O	OH	(45)	H	O	<p>(Nakatani <i>et al.</i>, 1981, 1984 y 1985 ; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i>, 1981</p>
	R ¹	R ²															
(42)	OH	O															
(43)	OH	O															
(44)	O	OH															
(45)	H	O															

	<p>7- Acetiltriquilina (46)</p> 	(Nakatani <i>et al.</i> , 1985)
<p><i>Trichilia</i> <i>prieuriana</i></p>	<p>Prieurianina (48)</p> 	(Gullo <i>et al.</i> , 1975)
<p><i>Trichilia</i> <i>dregeana</i></p>	<p>Rohitiuka-7 (49)</p> 	(Mullholland y Taylor, 1980)
<p><i>Trichilia</i> <i>elegans</i></p>	<p>7-deoxo-7β-acetoxikihadanina A (61) 7-deoxo-7β-acetoxikihadanina B (62) 7-deoxo-7β-hidroxikihadanina A (63) 7-deoxo-7β-hidroxikihadanina B (64)</p>	(Garcez, <i>et al.</i> , 2000)

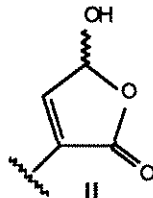
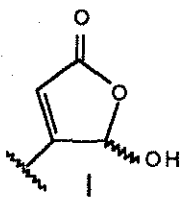


	R	R ₁
(61)	I	OAc
(62)	II	OAc
(63)	I	OH
(64)	II	OH

7-deoxo-7 α -hidroxikihadanina A (65)



	R	R ₁
(65)	I	OH



De manera adicional, otras especies del género han sido investigadas desde el punto de vista fitoquímico y biológico. La mayoría de los trabajos químicos publicados a la fecha describen el aislamiento y la caracterización de protolimonoides y limonoides. Cabe destacar que muchos de estos compuestos han demostrado propiedades insecticidas. En la Tabla 3 se indican los limonoides aislados a la fecha de las distintas especies del género estudiadas. Así mismo, se indican los insectos de prueba sobre los cuales se ha demostrado sus propiedades insecticidas. En la Tabla 2 se muestran las estructuras de los compuestos enumerados en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplo de limonoides con actividad insecticida obtenidos de plantas pertenecientes al género *Trichilia*.

COMPUESTO	INSECTO DE PRUEBA	REFERENCIA
1. Protolimonoides		
(34)	<i>Epilachna varivestis</i>	(Diógenes <i>et al.</i> , 1992).
2. Limonoides tipo Apo-eufof		
(20)	<i>Epilachna varivestis</i>	(Arenas y Rodríguez-Hahn, 1990)
(40)	<i>Heliothis zea</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera frugiperda</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i> , 1981)
(41)	<i>Heliothis zea</i> <i>Heliothis virescens</i> <i>Spodoptera frugiperda</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i> , 1981)

COMPUESTO	INSECTO DE PRUEBA	REFERENCIA
(42)	<i>Spodoptera eridania</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i> , 1981)
(43)	<i>Spodoptera eridania</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i> , 1981)
(44)	<i>Spodoptera eridania</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982; Nakanishi <i>et al.</i> , 1981)
(45)	<i>Spodoptera eridania</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1981, 1984 y 1985; Kubo y Klocke, 1982)
(46)	<i>Spodoptera eridania</i>	(Nakatani <i>et al.</i> , 1985)
3. Limonoides con Anillo-D-seco		
(27)	<i>Ostrinia nubilalis</i> <i>Epilachna varivestis</i> <i>P. gossypiella</i>	(Taylor, 1971)
(28)	<i>Epilachna varivestis</i> <i>P. gossypiella</i> <i>Heliothis zea</i>	(Taylor, 1971)
4. Limonoides con Anillos A-B-seco		
(48)	<i>Heliothis zea</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Epilachna varivestis</i>	(Gullo, <i>et al.</i> , 1975)
(49)	<i>Heliothis zea</i> <i>Spodoptera frugiperda</i> <i>Epilachna varivestis</i>	(Mullholland y Taylo, 1980)

*Las estructuras correspondientes se indican en la Tabla 2.

Publicaciones recientes describen también el efecto insecticida de algunos extractos derivados de distintas especies del género *Trichilia*. Los ensayos se llevaron a cabo sobre dos especies de insectos que afectan cultivos de importancia económica: *Ostrinia nubilalis* y *Peridroma saucia*. Las especies estudiadas incluyen *Trichilia glabra* (corteza), *T. hirta* (hojas), *T. americana* (corteza), *T. trifolia* (madera) y *T. pleana* (madera). Los resultados obtenidos indicaron que todos los extractos evaluados presentaron actividad contra *P. saucia*, mientras que *T. glabra* (madera y corteza), y *T. pleana* (corteza) mostraron buena actividad contra *Ostrinia nubilalis*. Por otro lado, los extractos foliares de *T. americana* y *T. glabra* causaron inhibición del crecimiento de las larvas de *O. nubilalis* (Arnason *et al.*, 1993; Kubo, 1991, 1993).

2.1.2 ANTECEDENTES SOBRE LA ESPECIE *Trichilia trifolia*

La especie es un árbol deciduo con una altura de 5 a 7 metros con la corteza café rojiza o café grisácea la cual se presenta como escamas características en forma de piezas rectangulares pequeñas y delgadas. Las flores son blancas e inconspicuas. Los frutos son pequeños y de color café (Figura 4). Florece principalmente de Agosto a Noviembre, pero en el Norte de Venezuela hay algunos registros de floración en otros meses. Esta especie es localmente conocida en México como huesito, aunque en otros países recibe otros nombres, tales como clavito, cachito, hallito, pimienta y cimaruco macho (Venezuela).

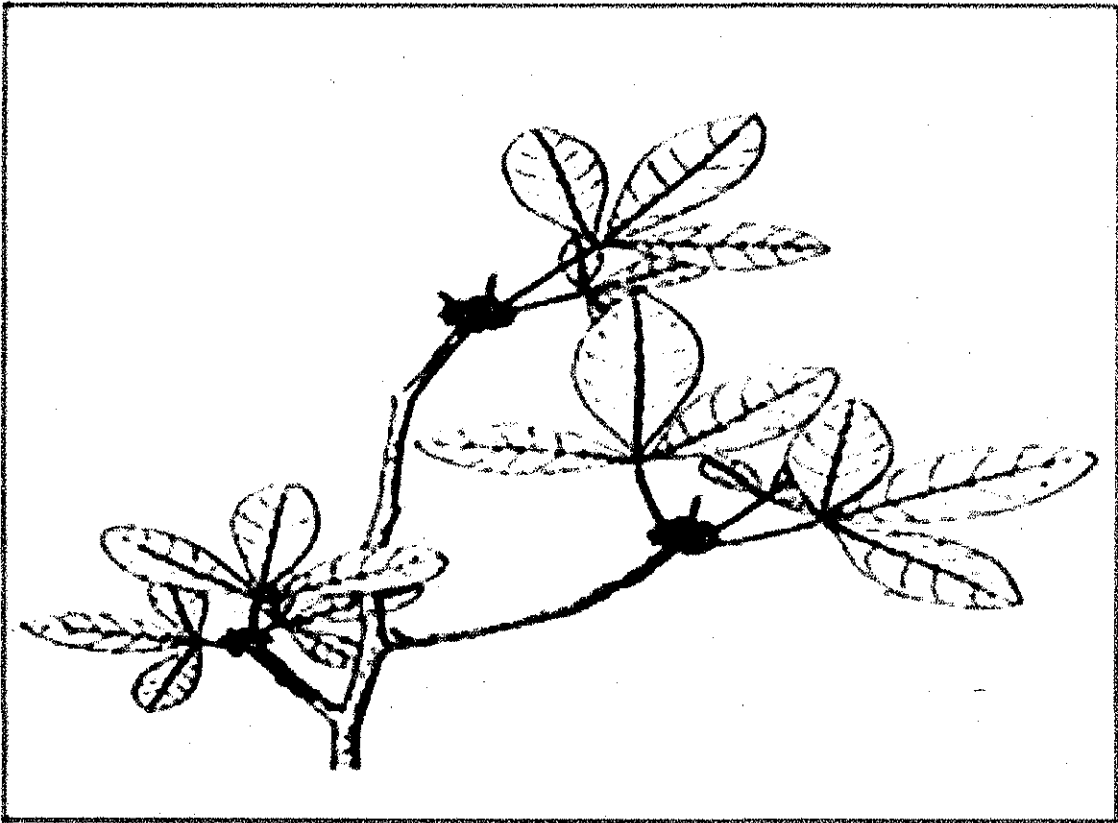


Figura 2. *Trichilia trifolia* L.

Esta especie usualmente forma parte del bosque tropical deciduo cerca de la costa especialmente en las vertientes del Pacífico de América Central, aunque también se extiende dentro de ciénagas y en bosques riparios de tierras bajas. Es abundante en tierras periódicamente inundadas en el sur de la Península de Yucatán (Pennington, 1981).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La especie *Trichilia trifolia* se distribuye desde Sinaloa en el noroeste de México y a lo largo de la vertiente del Pacífico de América Central a Panamá, Colombia y Norte de Venezuela. También se encuentra presente en las vertientes del Caribe de México desde Tamaulipas hasta el sur de la Península de Yucatán, y oeste de Cuba (Figura 3).

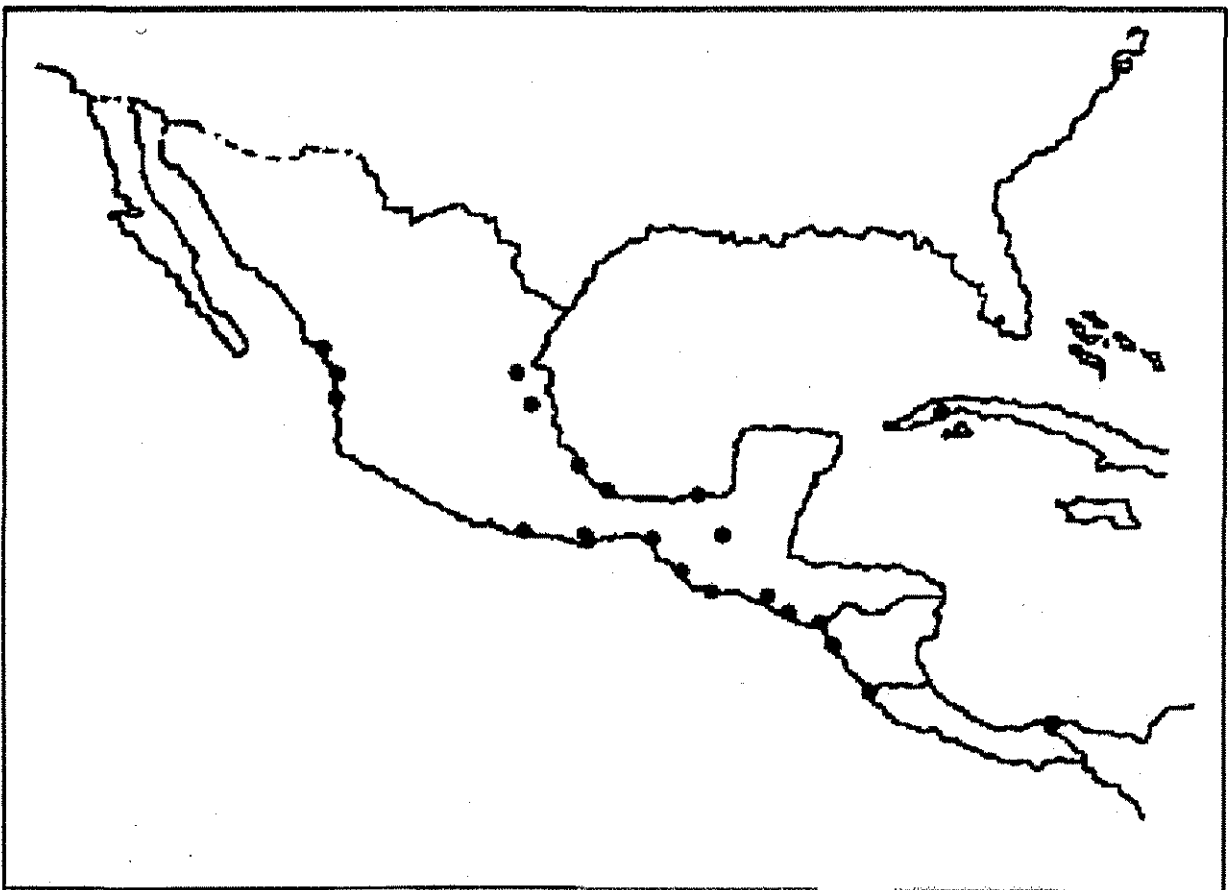


Figura 3. Distribución en México de la especie *Trichilia trifolia*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

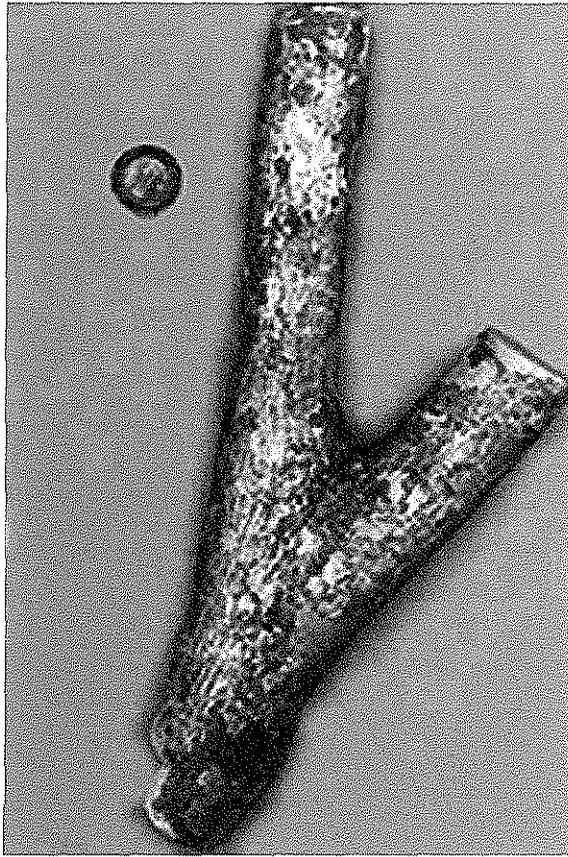


Figura 4. *Trichilia trifolia*: Madera (superior); Hojas y frutos (inferior).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.3. ESTUDIOS BIOLÓGICOS DE EXTRACTOS Y METABOLITOS OBTENIDOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Trichilia*.

Xie y colaboradores (1994) determinaron el potencial insecticida de los extractos crudos de nueve especies del género *Trichilia* empleando como insectos de prueba *Peridroma saucia* y *Spodoptera litura*. Esta investigación permitió determinar que el extracto de la madera de *T. hirta* y el extracto de corteza de *T. connaroides* fueron los más activos contra ambos insectos de prueba. Con esta investigación se pudo determinar que los extractos de madera y corteza son más activos que los extractos obtenidos a partir de las hojas.

Desde el punto de vista biológico, los terpenoides obtenidos a partir del género *Trichilia* han demostrado poseer una gran variedad de propiedades, mismas que podrían ser de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes pesticidas y medicinales (Champagne *et al.*, 1992; Das y Mahato, 1983; Klocke, 1989, *inter alia*). Entre las propiedades medicinales demostradas por estos compuestos destacan las siguientes: antiprotozoaria (Mac Kinnon *et al.*, 1997), antimicrobiana, citotóxica (Polonsky *et al.*, 1978), diurética (Duke, 1991), antifúngica (Jacobson *et al.*, 1971), antihelmíntica (Gilbert *et al.*, 1972) y antiulcérica (Duke, 1991). Sin embargo la actividad biológica más importante que han demostrado estos terpenoides es la insecticida (Arnason *et al.*, 1992 y 1993; Baldwin *et al.*, 1972; Isman *et al.*, 1996; Jain y Tripathi, 1993; Jiménez *et al.*, 1997; Kubo *et al.*, 1991 y 1993; Lavie *et al.*, 1967, *inter alia*). De acuerdo a dos revisiones recientes muchos de estos compuestos ejercen una actividad fago-inhibidora y

reguladora del crecimiento sobre un gran número de insectos (Assabgui *et al.*, 1997; Champagne *et al.*, 1992; Isman *et al.*, 1996 y 1997).

En relación a la actividad insecticida, en fechas recientes se ha descrito que estos compuestos afectan el desarrollo y/o crecimiento de aproximadamente 200 especies de insectos, que atacan principalmente los cultivos de importancia económica tanto agrícola como forestal (Arnason *et al.*, 1987; Champagne *et al.*, 1992; Govindachari *et al.*, 1996; Isman *et al.*, 1988, 1996; Mikolajczak *et al.*, 1987; Schmutterer, 1987, 1995). Estos compuestos actúan como repelentes, inhibidores de la reproducción, inhibidores de la oviposición, fago-inhibidores y como inhibidores o retardadores del crecimiento del insecto. Todos estos efectos traen como consecuencia trastornos en algunos procesos fisiológicos vitales para el insecto tales como la habilidad de caminar, volar, brincar, comer, ovipositar y copular (Champagne *et al.*, 1992; Rembold y Puhlman, 1993; Schmutterer, 1995).

Las investigaciones realizadas a la fecha, sobre el potencial insecticida de los limonoides no han permitido establecer claramente una relación estructura-actividad entre los diferentes grupos de limonoides evaluados, debido a que estos trabajos han sido desarrollados por diversos grupos de investigadores, los cuales han empleado diferentes especies de insectos y diferentes métodos para realizar las evaluaciones biológicas (Champagne *et al.*, 1992).

2.2 ANTECEDENTES SOBRE COMPUESTOS DE TIPO DOLABELANO

Los dolabelanos constituyen una clase biológicamente importante de diterpenoides, los cuales han sido aislados de algunos organismos marinos incluyendo liebres de mar, octocorales y algas. De manera adicional, algunos reportes han revelado su presencia en hepáticas y más recientemente en una especie de planta superior terrestre perteneciente a la familia Euphorbiaceae. El trabajo de Ireland y Faulkner (1976) describe por vez primera el aislamiento de un diterpenoide de tipo dolabelano. El aislamiento de este compuesto se realizó a partir de un extracto preparado con las glándulas digestivas de la liebre de mar *Dolabella californica*. A partir del descubrimiento de Ireland y Faulkner, se han aislado numerosos dolabelanos de otros organismos, principalmente marinos. En la Tabla 4 se presentan los diferentes dolabelanos aislados a la fecha.

La mayor parte de dolabelanos descritos en la literatura se han obtenido de algas marinas de los géneros *Glossophora*, *Dictyota* y *Dictyopteris* y de octocorales de los géneros *Eunicea* y *Cestipularia*. En el caso de plantas terrestres superiores la presencia de diterpenos de tipo dolabelano se limita a la especie *Chrozophora oblicua*, un miembro de la familia de las Euphorbiaceas. A partir de un extracto metanólico de las partes aéreas de la planta se obtuvieron 17 compuestos novedosos.

Debido a la presencia de un alto número de grupos funcionales y de varios centros estereogénicos en las moléculas, la elucidación estructural de los dolabelanos es un proceso complejo que requiere de la aplicación simultánea de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

métodos químicos (acetilaciones, metilaciones, formación de ésteres de Mosher, epoxidaciones, oxidaciones), quirópticos, espectrométricos y espectroscópicos, principalmente de resonancia magnética nuclear.

Se han descrito dos estudios acerca de la conformación en estado sólido mediante análisis de difracción de rayos X (Matsuo *et al.*, 1985, 1988), y cinco reportes sobre análisis conformacional en solución, los cuales están basados en datos de NOEDS (Matsuo *et al.*, 1984; Mohamed *et al.*, 1994, 1995; Tringali *et al.*, 1984).

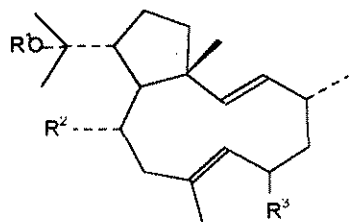
En la literatura se han encontrado reportes en donde se determina la configuración absoluta de dolabelanos aislados a partir de un octocoral (Look y Fenical, 1982), un alga (Tringali, *et al.*, 1984) y una hepática (Matsuo *et al.*, 1988).

La biosíntesis de estos productos no ha sido explorada experimentalmente. Ireland y Faulkner (1976) sugirieron que, como otros diterpenoides, estos productos se biosintetizan a partir del pirofosfato de geranilgeranilo

La presencia de un anillo de once miembros en la estructura de esos diterpenos los hace atractivos para estudios conformacionales, los cuales pueden contribuir a entender sus propiedades químicas y biológicas así como para reunir información para futuras estrategias sintéticas.

Tabla 4. Compuestos de tipo dolabelano.

COMPUESTO	REFERENCIA
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-10,18-diacetoxi-2,7-dolabeladieno (50)	(Ireland y Faulkner, 1977)
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-10-acetoxi-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (51)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-10-18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (52)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,6 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-6,10-diacetoxi-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (59)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,6 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-10-acetoxi-6,18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (60)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,6 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-18-acetoxi-6,10-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (61)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,6 <i>R</i> *,8 <i>S</i> *,7 <i>E</i> ,10 <i>S</i> *,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-6,10,18-trihidroxi-2,7-dolabeladieno (62)	
(1 <i>R</i> *,2 <i>E</i> ,4 <i>R</i> *,7 <i>E</i> ,11 <i>S</i> *,12 <i>R</i> *)-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (63)	



	R ¹	R ²	R ³
50	Ac	OAc	H
51	H	OAc	H
52	H	OH	H
59	H	OAc	OAc
60	H	OAc	OH
61	Ac	OH	OH
62	H	OH	OH
63	H	H	H

(Ireland y
Faulkner, 1977)

(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-8,10,18-triacetoxi-2,6-dolabeladieno
(53)

(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-10,18-diacetoxi-8-hidroxi-2,6-
dolabeladieno (54)

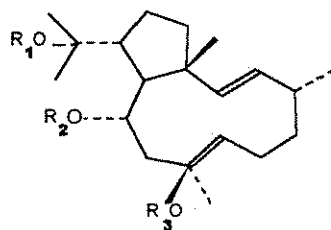
(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-8,18-diacetoxi-10-hidroxi-2,6-
dolabeladieno (55)

(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-8,10-diacetoxi-18-hidroxi-2,6-
dolabeladieno (56)

(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-18-acetoxi-8,10-dihidroxi-2,6-
dolabeladieno (57)

(1R*,2E,4R*,6E,8S*,10S*,11S*,12R*)-8,10,12-trihidroxi-2,6-dolabeladieno
(58)

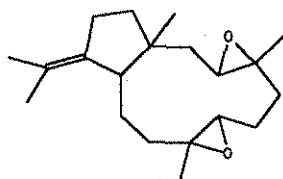
(Ireland y
Faulkner, 1977)



	R ₁	R ₂	R ₃
53	Ac	Ac	Ac
54	Ac	Ac	H
55	Ac	H	Ac
56	H	Ac	Ac
57	Ac	H	H
58	H	H	H

(Ireland y
Faulkner, 1977)

(1*R*^{*},3*R*^{*},4*S*^{*},11*R*^{*})-3,4,7,8-bisepoxidolabelan-12,18-eno (64)

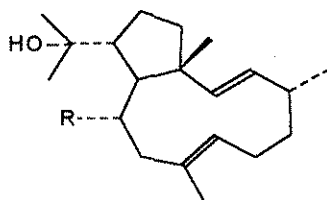


(Wright y Coll,
1990)

10-acetoxi-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (65)

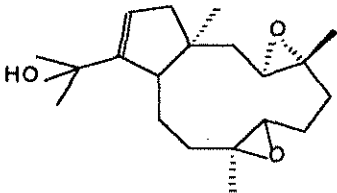
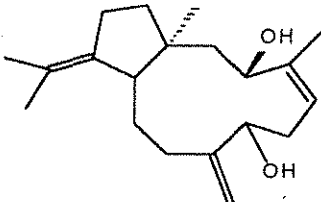
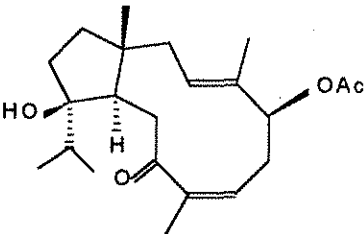
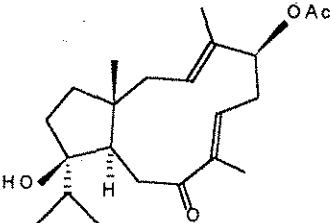
10,18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (66)

18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (67)

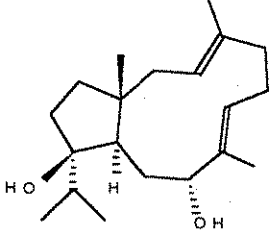
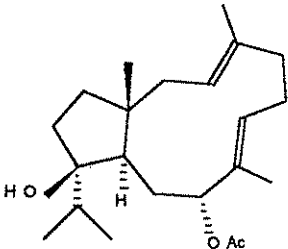
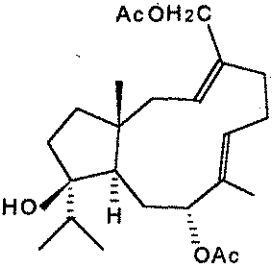


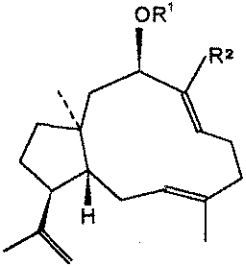
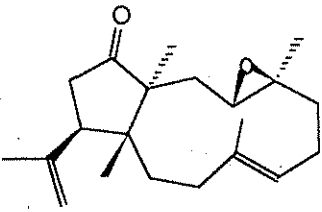
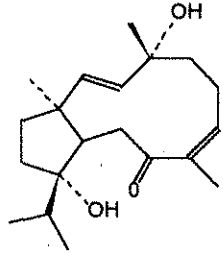
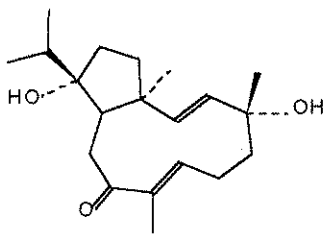
65	R=OAc
66	R=OH
67	R=H

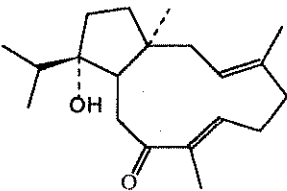
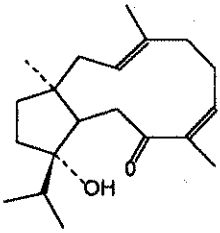
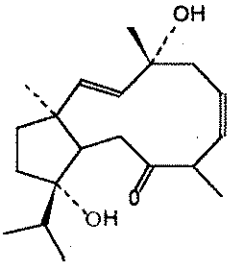
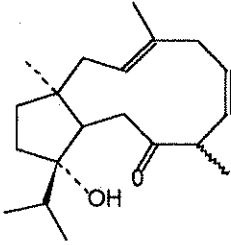
(Sun y Fenical,
1979)

(1 <i>R</i> [*] ,3 <i>R</i> [*] ,4 <i>S</i> [*] ,7 <i>R</i> [*] 8 <i>R</i> [*] ,11 <i>R</i> [*] ,12 <i>E</i>)-3,4-7,8-bisepoxi-dolabela-12-en-18-ol (68)	(Wright <i>et al.</i> , 1990)
	
(1 <i>R</i> [*] ,3 <i>R</i> [*] ,4 <i>Z</i> ,11 <i>R</i> [*])-dolabela-4,8(17),12(18)-trien-3,7-diol (69)	(Wright <i>et al.</i> , 1990)
	
(1 <i>R</i> [*] 3 <i>E</i> ,5 <i>S</i> [*] ,7 <i>Z</i> ,11 <i>R</i> [*] ,12 <i>R</i> [*])-5-acetoxi-12-hidroxi-dolabela-3,7-dien-9-ona (70)	(Köning y Wright; 1994)
	
(1 <i>R</i> [*] 3 <i>E</i> ,5 <i>S</i> [*] ,7 <i>E</i> ,11 <i>R</i> [*] ,12 <i>R</i> [*])-5-acetoxi-12-hidroxi-dolabela-3,7-dien-9-ona (71)	(Köning y Wright; 1994)
	

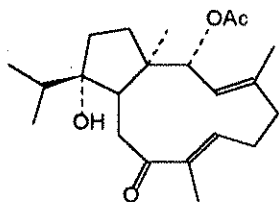
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<p>(1R*,3E,7E,9R*,11R*,12R*)-9-hidroxiolabela-3,7-dien-12-ol (72)</p> 	<p>(Köning y Wright; 1994)</p>
<p>(1R*,3E,7E,9R*,11R*,12R*)-9-acetoxidolabela-3,7-dien-12-ol (73)</p> 	<p>(Köning y Wright; 1994)</p>
<p>(1R*,3E,7E,9R*,11R*,12R*)-9,16-diacetoxidolabela-3,7-dien-12-ol (74)</p> 	<p>(Köning y Wright; 1990)</p>
<p>(1R*,3S*,4E,8E,11S*,12R*)-3-hidroxi-16-acetoxidolabel-4,8,18-trieno (75)</p> <p>(1R*,3S*,4E,8E,11S*,12R*)-3-acetoxidolabel-4,8,18-trien-16-al (76)</p> <p>(1S*,3R*,4E,8E,11R*,12S*)-3-acetoxi-16-hidroxiolabel-4,8,18-trieno (77)</p> <p>(1S*,3R*,4E,8E,11R*,12S*)-3,16-dihidroxiolabel-,4,8,18-trieno (78)</p> <p>(1S*,3R*,4Z,8E,11R*,12S*)-3-acetoxidolabel-4,8,18-trien-16-al (79)</p>	<p>(Tringali <i>et al.</i>, 1984)</p>

 <table data-bbox="443 556 762 793"> <thead> <tr> <th></th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>75</td> <td>H</td> <td>CH₂OAc</td> </tr> <tr> <td>76</td> <td>Ac</td> <td>CHO</td> </tr> <tr> <td>77</td> <td>Ac</td> <td>CH₂OH</td> </tr> <tr> <td>78</td> <td>H</td> <td>CH₂OH</td> </tr> <tr> <td>79</td> <td>Ac</td> <td>CHO</td> </tr> </tbody> </table>		R ¹	R ²	75	H	CH ₂ OAc	76	Ac	CHO	77	Ac	CH ₂ OH	78	H	CH ₂ OH	79	Ac	CHO	(Tringali <i>et al.</i> , 1984)
	R ¹	R ²																	
75	H	CH ₂ OAc																	
76	Ac	CHO																	
77	Ac	CH ₂ OH																	
78	H	CH ₂ OH																	
79	Ac	CHO																	
<p>(1<i>S</i>*,3<i>S</i>*,4<i>S</i>*, 7<i>E</i>,11<i>R</i>*,12<i>S</i>*)-3,4-epoxi-14-oxo-dolabel-18 dieno (80)</p> 	(Tringali y Piattelli, 1984)																		
<p>(1<i>S</i>*,2<i>E</i>,4<i>R</i>*,7<i>Z</i>,11<i>S</i>*,12<i>S</i>*)-4,12-dihidroxidolabela-2,7-dien-9-ona (81)</p> 	(Bheemasankara <i>et al.</i> , 1986)																		
<p>(1<i>S</i>*,2<i>E</i>,4<i>R</i>*,7<i>E</i>,11<i>S</i>*,12<i>S</i>*)-4,12-dihidroxidolabela-2,7-dien-9-ona (82)</p> 	(Bheemasankara <i>et al.</i> , 1986)																		

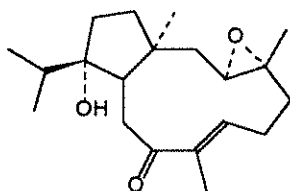
<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>,7<i>E</i>,11<i>S</i>[*],12<i>S</i>[*])-12-hidroxiolabela-3,7-dien-9-ona (83)</p> 	<p>(Bheemasankara <i>et al.</i>,1986)</p>
<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>,7<i>Z</i>,11<i>S</i>[*],12<i>S</i>[*])-12-hidroxiolabela-3,7-dien-9-ona (84)</p> 	<p>(Bheemasankara <i>et al.</i>,1986)</p>
<p>(1<i>S</i>[*],2<i>E</i>,4<i>R</i>[*],6<i>Z</i>,11<i>S</i>[*],12<i>S</i>[*])-4,12-dihidroxiolabela-2,6-dien-9-ona (85)</p> 	<p>(Bheemasankara <i>et al.</i>,1986)</p>
<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>,6<i>Z</i>,11<i>S</i>[*],12<i>S</i>[*])-12-hidroxiolabela-3,6-dien-9-ona (86)</p> 	<p>(Bheemasankara <i>et al.</i>,1986)</p>

(1R*,2R*,3E,7E,11S*,12S*)-2-acetoxi-12-hidroxiolabela-3,7-dien-9-ona
(87)



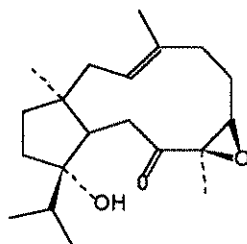
(Bheemasankara
et al.,1986)

(1S*,3S*,4R*,7E,11S*,12S*)-3,4-epoxi-12-hidroxiolabela-7-en-9-ona (88)



(Bheemasankara
et al.,1986)

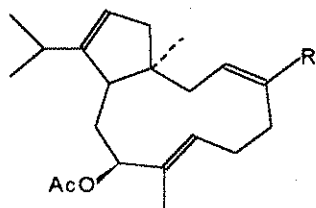
(1S*,3E,7R*,8R*,11S*,12S*)-7,8-epoxi-12-hidroxiolabela-3-en-9-ona (89)



(Bheemasankara
et al.,1986)

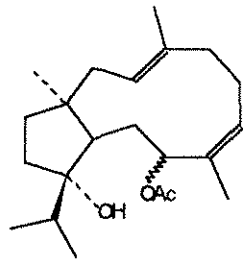
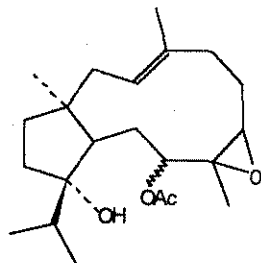
(1R*,3E,7E,9S*,11S*)-9-acetoxidolabela-3,7,12-trien-16-al (90)

(1R*,3E,7E,9S*,11S*)-9-acetoxidolabela-3,7,12-trien-16-oic acid (91)



90 CHO
91 COOH

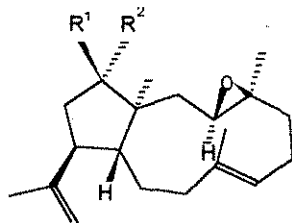
(Bheemasankara
et al.,1986)

(1*S*^{*},3*E*,7*E*,11*S*^{*},12*S*^{*})-9-acetoxidolabela-3,7-dien-12-ol (92)(Bheemasankara
et al.,1986)(1*S*^{*},3*E*,11*S*^{*},12*S*^{*})-9-acetoxi-7,8-epoxidolabela-3-en-12-ol (93)(Bheemasankara
et al.,1986)

3,4-epoxi-7,18-dolabeladieno (94)

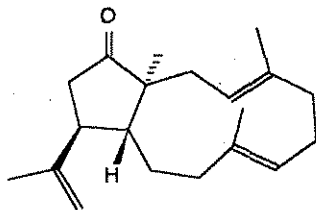
(Amico *et al.*,
1980)

3,4-epoxi-14-hidroxi-7,18-dolabeladieno (96)

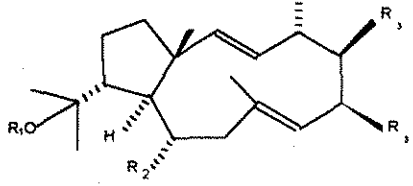
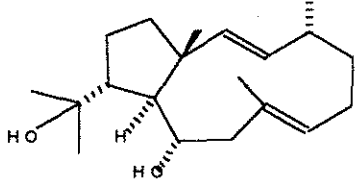
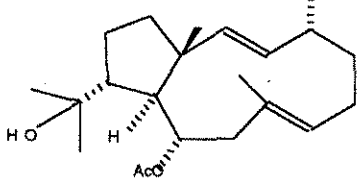
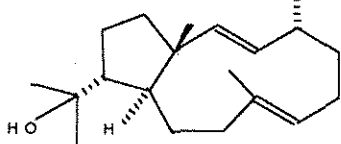


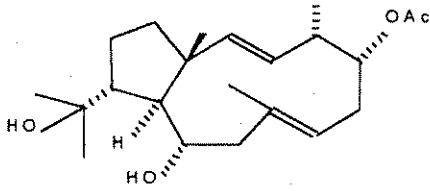
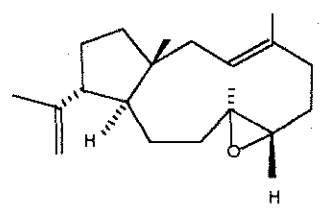
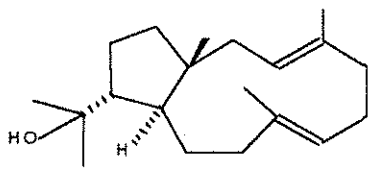
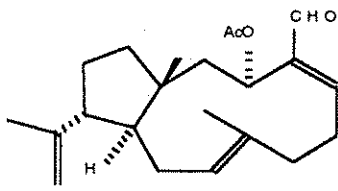
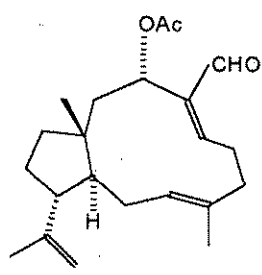
	R ¹	R ²
94	H	H
96	OH	H

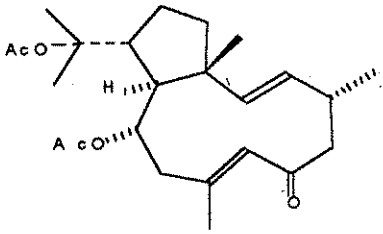
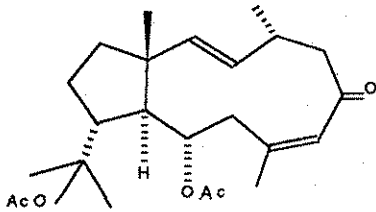
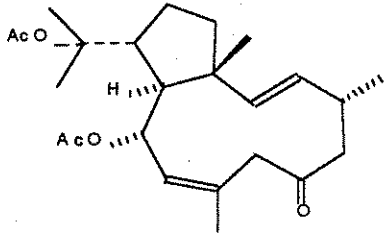
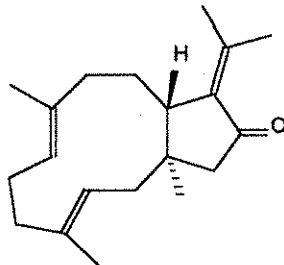
14-oxo-3,7,18-dolabelatrieno (95)

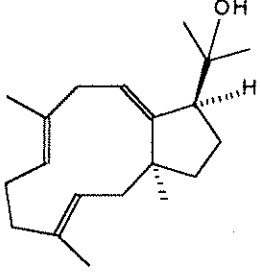
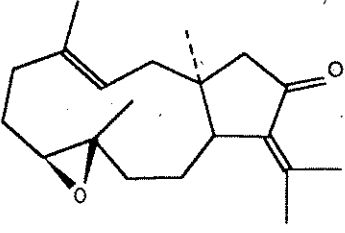
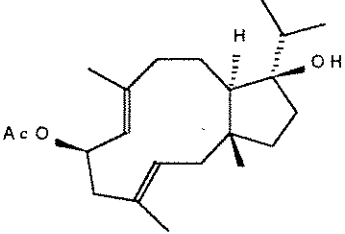
(Amico *et al.*,
1980)

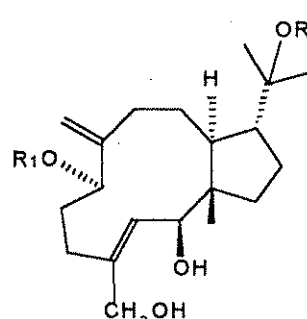
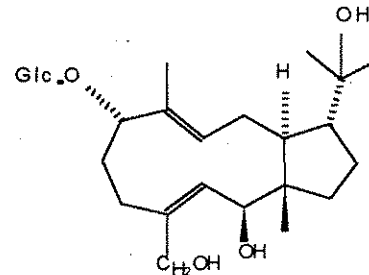
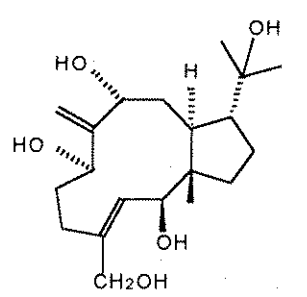
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>S</i>*,5<i>R</i>*,6<i>S</i>*,7<i>E</i>,10<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-5,6-diacetoxi-10,18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (97)</p> <p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>S</i>*,5<i>R</i>*,6<i>S</i>*,7<i>E</i>,10<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-5,6,10-triacetoxi-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (98)</p>  <table data-bbox="454 697 823 840"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>97</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>OAc</td> </tr> <tr> <td>98</td> <td>H</td> <td>OAc</td> <td>OAc</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	97	H	OH	OAc	98	H	OAc	OAc	<p>(De Rosa <i>et al.</i>, 1984)</p>
	R ₁	R ₂	R ₃										
97	H	OH	OAc										
98	H	OAc	OAc										
<p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>R</i>*,7<i>E</i>,10<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-10,18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (99)</p> 	<p>(Ireland y Faulkner, 1977; Piattelli <i>et al.</i>, 1995)</p>												
<p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>R</i>*,7<i>E</i>,10<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-10-acetoxi-18-hidroxi-2,7-dolabeladieno (100)</p> 	<p>(Ireland y Faulkner, 1977; Ireland <i>et al.</i>, 1976)</p>												
<p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>R</i>*,7<i>E</i>,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (101)</p> 	<p>(Ireland y Faulkner, 1977; Köning <i>et al.</i>, 1991)</p>												

<p>(1<i>R</i>*,2<i>E</i>,4<i>S</i>*,5<i>R</i>*,7<i>E</i>,10<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-5-acetoxi-10,18-dihidroxi-2,7-dolabeladieno (102)</p> 	<p>(Durán <i>et al.</i>, 1997)</p>
<p>(1<i>R</i>*,3<i>E</i>,7<i>S</i>*,8<i>S</i>*,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-7,8-epoxy-3,18-dolabeladieno (103)</p> 	<p>(Durán <i>et al.</i>, 1997)</p>
<p>(1<i>R</i>*,3<i>E</i>,7<i>E</i>,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-18-hidroxi-3,7-dolabeladieno (104)</p> 	<p>(Amico <i>et al.</i>, 1980)</p>
<p>(1<i>R</i>*,3<i>S</i>*,4<i>E</i>,8<i>E</i>,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-3-acetoxi-4,8,18-dolabelatrien-16-al (105)</p> 	<p>(Tringali <i>et al.</i>, 1984)</p>
<p>(1<i>R</i>*,3<i>S</i>*,4<i>Z</i>,8<i>E</i>,11<i>S</i>*,12<i>R</i>*)-3-acetoxi-4,8,18-dolabelatrien-16-al (106)</p> 	<p>(Tringali <i>et al.</i>, 1984, a y b)</p>

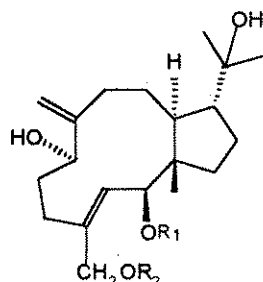
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>E</i>,4<i>R</i>[*],7<i>E</i>,10<i>S</i>[*],11<i>S</i>[*],12<i>R</i>[*])-10,18-diacetoxidolabela-2,7-dien-6-ona (107)</p> 	<p>(Lu y Faulkner, 1998)</p>
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>E</i>,4<i>R</i>[*],7<i>Z</i>,10<i>S</i>[*],11<i>S</i>[*],12<i>R</i>[*])-10,18-diacetoxidolabela-2,7-dien-6-ona (108)</p> 	<p>(Lu y Faulkner, 1998)</p>
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>E</i>,4<i>R</i>[*],8<i>Z</i>,10<i>S</i>[*],11<i>S</i>[*],12<i>R</i>[*])-10,18-diacetoxidolabela-2,8-dien-6-ona (109)</p> 	<p>(Lu y Faulkner, 1998)</p>
<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>,7<i>E</i>,11<i>R</i>[*])-13-cetodolabel-12,18-trieno (110)</p> 	<p>(Cáceres <i>et al.</i>, 1990)</p>

<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>,7<i>E</i>,10<i>Z</i>,,12<i>S</i>[*])18-hidroxi-3,7,10,12-dolabelatrieno (palominol) (111)</p> 	<p>(Cáceres <i>et al.</i>, 1990)</p>
<p>(1<i>S</i>[*],3<i>E</i>, 7<i>S</i>[*],8<i>S</i>[*],11<i>R</i>[*])-7,8-epoxi-13-cetodolabel-12,18-dieno (112)</p> 	<p>(Look y Fenical, 1982)</p>
<p>(+)-acetoxidontochismenol (113)</p> 	<p>(Matsuo <i>et al.</i>, 1985)</p>
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-3,8(17)-dolabeladien-2,7,16,18-tetrol-7-O-β-D-glucopiranosida (114)</p> <p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-3,8(17)-dolabeladien-2,7,16,18-tetrol-18-O-β-D-glucopiranosida (115)</p>	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1994)</p>

 <p style="text-align: center;"> R₁ R₂ 114 Glc H 115 H Glc </p>	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1994)</p>
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],8<i>E</i>,11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-3,8-dolabeladien-2,7,16,18-tetrol-7-O-β-D-glucopiranosida (116)</p> 	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1994)</p>
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],9<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-3,8(17)-dolabeladien-2,7,9,16,18-pentol (117)</p> 	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1994)</p>

(1*R*^{*},2*R*^{*},3*E*,7*R*^{*},11*R*^{*},12*S*^{*})-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,8(17)-dien-2,7,16,18-tetrol (118)

(1*R*^{*},2*R*^{*},3*E*,7*R*^{*},11*R*^{*},12*S*^{*})-2-O-acetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,8(17)-dien-2,7,16,18-tetrol (119)



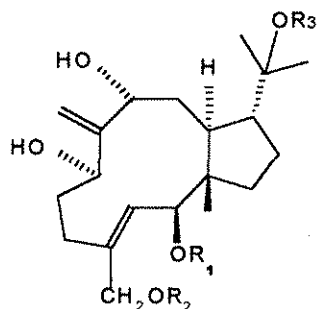
	R ₁	R ₂
118	H	HMG
119	Ac	HMG

(Mohamed *et al.*,
1995)

(1*R*^{*},2*R*^{*},3*E*,7*R*^{*},9*R*^{*},11*R*^{*},12*S*^{*})-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,8(17)-dien-2,7,9,16,18-pentol (120)

(1*R*^{*},2*R*^{*},3*E*,7*R*^{*},9*R*^{*},11*R*^{*},12*S*^{*})-2-O-acetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,8(17)-dien-2,7,9,16,18-pentol (121)

(1*R*^{*},2*R*^{*},3*E*,7*R*^{*},9*R*^{*},11*R*^{*},12*S*^{*})-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-18-O-acetildolabela-3,8(17)-dien-2,7,9,16,18-pentol (122)



	R ₁	R ₂	R ₃
120	H	HMG	H
121	Ac	HMG	H
122	H	HMG	Ac

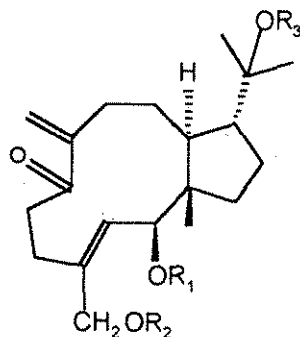
(Mohamed *et al.*,
1995)

(1*R**,2*R**,3*E*,11*R**,12*S**)-2-O-acetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-2,16,18-trihidroxidolabela-3,8(17)-dien-7-ona (123)

(Mohamed *et al.*,
1995)

(1*R**,2*R**,3*E*,11*R**,12*S**)-2,18-O-diacetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-2,16,18-trihidroxidolabela-3,8(17)-dien-7-ona (124)

(Mohamed *et al.*,
1995)



	R ₁	R ₂	R ₃
123	Ac	HMG	H
124	Ac	HMG	Ac

(1*R**,2*R**,3*E*,7*E*,11*R**,12*S**)-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-8,9-epoxidolabela-3,7-dien-2,16,18-triol (125)

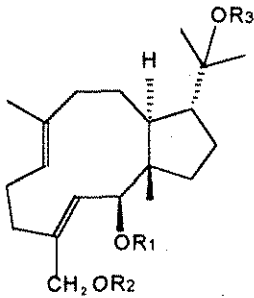
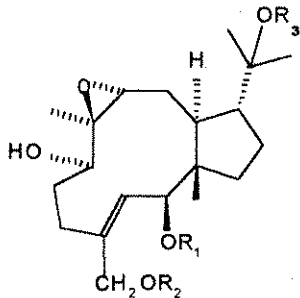
(Mohamed *et al.*,
1995)

(1*R**,2*R**,3*E*,7*E*,11*R**,12*S**)-2-O-acetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,7-dien-2,16,18-triol (126)

(1*R**,2*R**,3*E*,7*E*,11*R**,12*S**)-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-18-O-acetildolabela-3,7-dien-2,16,18-triol (127)

(1*R**,2*R**,3*E*,7*E*,11*R**,12*S**)-2,18-O-diacetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-dolabela-3,7-dien-2,16,18-triol (128)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

 <table data-bbox="462 595 770 766"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>125</td> <td>H</td> <td>HMG</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>126</td> <td>Ac</td> <td>HMG</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>127</td> <td>H</td> <td>HMG</td> <td>Ac</td> </tr> <tr> <td>128</td> <td>Ac</td> <td>HMG</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	125	H	HMG	H	126	Ac	HMG	H	127	H	HMG	Ac	128	Ac	HMG	Ac	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1995)</p>
	R ₁	R ₂	R ₃																		
125	H	HMG	H																		
126	Ac	HMG	H																		
127	H	HMG	Ac																		
128	Ac	HMG	Ac																		
<p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],8<i>S</i>[*],9<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-8,9-epoxidolabel-3-en-2,7,16,18-tetrol (129)</p> <p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],8<i>S</i>[*],9<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-2-O-acetil-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)-8,9-epoxidolabel-3-en-2,7,16,18-tetrol (130)</p> <p>(1<i>R</i>[*],2<i>R</i>[*],3<i>E</i>,7<i>R</i>[*],8<i>S</i>[*],9<i>R</i>[*],11<i>R</i>[*],12<i>S</i>[*])-16-O-(3-hidroxi-3-metilglutaril)18-O-acetil-8,9-epoxidolabel-3-en-2,7,16,18-tetrol (131)</p>  <table data-bbox="446 1606 777 1744"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>129</td> <td>H</td> <td>HMG</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>130</td> <td>Ac</td> <td>HMG</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>131</td> <td>H</td> <td>HMG</td> <td>Ac</td> </tr> </tbody> </table>		R ₁	R ₂	R ₃	129	H	HMG	H	130	Ac	HMG	H	131	H	HMG	Ac	<p>(Mohamed <i>et al.</i>, 1995)</p>				
	R ₁	R ₂	R ₃																		
129	H	HMG	H																		
130	Ac	HMG	H																		
131	H	HMG	Ac																		

Los compuestos de tipo dolabelano presentan diversas actividades biológicas entre las que se encuentran las siguientes: los compuestos aislados del alga *Dictyota dichotoma* muestran actividad antimicrobiana, además el (1S*,3S*,4S*, 7E,11R*,12S*)-3,4-epoxi-14-oxo-dolabel-18 dieno (80) presenta una citotoxicidad significativa y actividad contra el virus de la influenza y el adenovirus (Tringali *et al.*, 1984).

El (+)-acetoxiodontochismenol (101), obtenido a partir de la hepática *Odontoschisma denudatum*, presenta propiedades antifúngicas (Matsuo *et al.*, 1984), mientras que algunos de los dolabelanos obtenidos del octocoral *Eunicea caliculata* mostraron citotoxicidad leve contra células HeLa (Rodríguez *et al.*, 1995). Por último, la especie *Crozophora oblicua* es usada como hipoglucémico en la medicina tradicional por lo que los compuestos de tipo dolabelano obtenidos de esta planta podrían presentar esta actividad (Mohamed *et al.*, 1994, 1995).

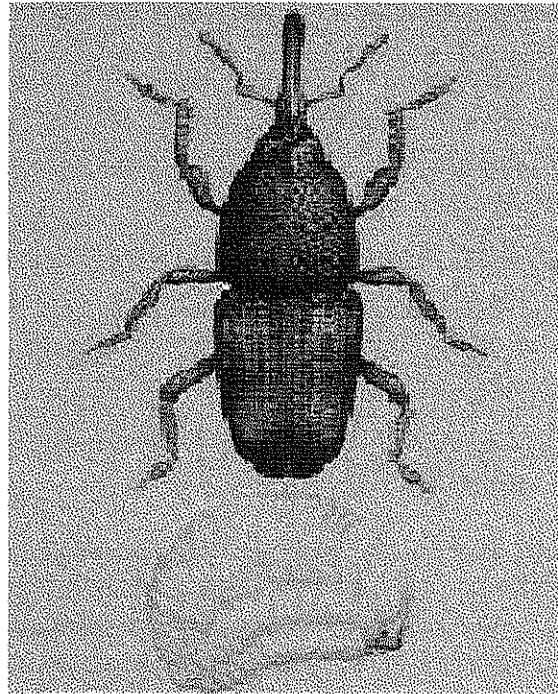
2.3 GENERALIDADES SOBRE EL GORGOJO DEL ARROZ *Sitophilus oryzae*.

Las plagas que infestan cereales constituyen uno de los principales enemigos de las cosechas en el campo y en los lugares de almacenamiento. Según el Instituto de Investigaciones Agrícolas de Francia las pérdidas causadas por estas plagas alrededor del mundo son de aproximadamente 1440 millones de toneladas de cereales almacenados cada año, lo cual equivale a una pérdida del 25% de la producción mundial.

El gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) [Figura 5] es considerado universalmente como una de las plagas primarias más destructivas del cereal almacenado y productos procesados. La invasión por el gorgojo del arroz puede causar calentamiento del grano y facilitar el establecimiento de colonias de hongos, y plagas secundarias de insectos y ácaros. Es moderadamente resistente al calor pero requiere una humedad relativa alta para su desarrollo. Las larvas se alimentan y se desarrollan dentro de la masa del grano por lo que no es visible desde afuera. Una infestación por gorgojo del arroz esta caracterizada por la presencia de agujeros irregulares en las semillas y un solo insecto puede destruir aproximadamente 30% del cereal total desde la etapa de huevecillo hasta adulto. Esta plaga infesta trigo, avena, centeno, cebada, arroz y maíz. Aunque no es común encontrarlos en los hogares, a veces infestan frijol, nueces, bellotas, alimento para aves, semillas de girasol y maíz.

El gorgojo presenta partes bucales masticadoras al final del hocico, su cabeza es alargada y mide entre 3 y 5 mm de largo. Los adultos son de un color café rojizo opaco con orificios de forma irregular sobre el tórax y la cubierta de las alas presenta cuatro puntos luminosos. Las larvas carecen de patas, son jorobadas y de color blanco o crema, con una cabeza pequeña y oscura. En la etapa de pupa presenta hocico como los adultos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*.

Las fases de desarrollo de huevo, larva y pupa tienen lugar en la masa del grano de cereal. Su alimentación se lleva a cabo dentro del grano, y los adultos cortan orificios de salida para emerger. Las hembras perforan un minúsculo orificio en el grano, depositan un huevo en la cavidad, y luego tapan el orificio con una secreción gelatinosa. El huevo eclosiona dando lugar a una larva joven, que se aloja en el centro de la masa del grano; esta larva se alimenta, crece y llega a la etapa de pupa en este lugar. Los nuevos adultos cortan orificios de emergencia hacia el exterior, entonces se aparean y empieza un nuevo ciclo. Las hembras ponen entre 300 y 400 huevos cuyo ciclo de vida requiere aproximadamente 32 días para completarse. Los adultos viven de 3 a 6 meses infestando los granos de cereal, sobre todo en zonas cálidas.

CAPÍTULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

El criterio de selección quimiotaxonómico, en conjunto con los resultados derivados de evaluaciones preliminares de inhibición de la alimentación empleando como insecto de prueba el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*, constituyen indicadores adecuados para la detección de especies del género *Trichilia* que proporcionen nuevos agentes insecticidas de origen natural, biodegradables y con una toxicidad potencial menor que los insecticidas sintéticos.

3.2 OBJETIVO PRINCIPAL

Establecer el potencial insecticida de los metabolitos secundarios aislados de la especie *Trichilia trifolia* (Meliaceae), mediante la evaluación de su efecto en la ingesta de alimentos empleando como insecto de prueba el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), para contribuir al desarrollo de nuevos agentes insecticidas de origen vegetal. Determinar la estructura química de los compuestos responsables de la actividad inhibidora de la alimentación.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.3.1. Evaluar el potencial insecticida de especies selectas del género *Trichilia* (*T. moschata*, *T. martiana*, y *T. trifolia*) mediante la determinación del efecto de sus extractos orgánicos sobre la ingesta de alimentos empleando como insecto de prueba al gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*. Esta actividad permitió la selección de la especie *T. trifolia* como un candidato idóneo para el descubrimiento de nuevos agentes insecticidas.

3.3.2. Aislar los principios responsables de la actividad insecticida a partir del extracto crudo derivado de la especie *T. trifolia*, mediante la aplicación de las técnicas fitoquímicas convencionales. Este proceso condujo a la obtención de los productos activos en forma pura y en cantidades apropiadas para su identificación química y para la evaluación de su potencial insecticida.

3.3.3. Determinar el efecto fagoinhibidor de los compuestos aislados de *T. trifolia* empleando como insecto de prueba el gorgojo del arroz. Esta actividad permitirá valorar cuantitativamente el efecto biológico de los productos puros.

3.3.4. Determinar la estructura química de los compuestos responsables de la actividad insecticida mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos y quiropticos, preparación de derivados químicos, cristalografía de rayos X y mecánica molecular.

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAL VEGETAL

La madera de *T. trifolia* empleada para la presente investigación se recolectó en el Estado de Yucatán, México, en Junio de 1996. La identificación y recolección de la planta se realizaron por el Dr. Víctor Parra de la Universidad Autónoma de Yucatán. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY, voucher J.C. Tun 643), México. El secado de la madera se llevó a cabo a temperatura ambiente y posteriormente se cortó en trozos pequeños.

4.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO FAGOINHIBIDOR DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS PUROS OBTENIDOS DE *Trichilia trifolia*.

La actividad inhibidora de la ingesta de los extractos y compuestos puros se determinó empleando como insecto de prueba el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*. Las evaluaciones se realizaron en el laboratorio del Dr. John T. Arnason (Universidad de Ottawa, Canadá) de acuerdo con el procedimiento de Xie y colaboradores (1996) que se describe a continuación:

4.2.1 PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE HARINA (CONTROL Y PROBLEMA).

Se colocaron 400 mg de harina de trigo en un contenedor de poliestireno y se adicionaron 2 ml de una suspensión conteniendo el compuesto, extracto o fracción de prueba. Se usaron dos concentraciones para cada compuesto (0.05 y 0.5 % w/w). Como control positivo se incorporó a la dieta margosan. Se tomaron alícuotas de 100 μ l de la suspensión y se colocaron en una caja Petri de 10 cm de diámetro. Las alícuotas se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente para obtener los discos de harina. Los discos se pesaron individualmente y se transfirieron a las cajas Petri para realizar los bioensayos.

4.2.2 PROCEDIMIENTO DEL BIOENSAYO

Los compuestos y extractos se disolvieron en etanol al 70%. La disolución resultante se adicionó a 400 mg de harina de trigo para dar una mezcla con una concentración de 0.5 y 0.05 % (w/w) con la cual se formaron los discos. Se colocaron cinco discos previamente pesados en una caja Petri con 25 insectos adultos (2-7 días de posemergencia). Después de 72 horas de incubación a una temperatura de 25 °C y en condiciones de humedad relativa de 85%, los discos se pesaron y se registró la diferencia en peso. El experimento se ejecutó en 4 réplicas para un total de 100 insectos y veinte discos por tratamiento. Los

resultados se analizaron usando el programa ANOVA Systat versión 4. (Analytical software, P.O. Box 12185 Talahassie F.L.)

4.3 ESTUDIO QUÍMICO DE *T. trifolia*.

4.3.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES

4.3.1.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230 ASTM). Para la cromatografía en capa fina (ccf) se emplearon cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck (0.2 mm de espesor; ccf analítica). La ccf analítica permitió monitorear el desarrollo de las cromatografías en columna abierta así como comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agente revelador se empleó una solución de sulfato cérico (Stahl, 1969) y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas por 2 min a 110 °C.

Los análisis mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizaron en un cromatógrafo Waters TM 600 (Milipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, M.A., USA), equipado con un detector de luz Ultravioleta/Visible (Waters TM, 996), una bomba modelo 600E con un sistema de entrega de disolventes múltiple y un sistema de bombeo de gradiente a baja presión, provisto de un inyector manual Rheodyne 7725i y una computadora Venturis 575. El programa de software Millennium 2001 (Waters) se empleó para

controlar el equipo cromatográfico así como para manejar y procesar la información cromatográfica.

El método de cromatografía de alta resolución a nivel analítico, nos conduce a optimizar las condiciones instrumentales necesarias para lograr la máxima resolución de la muestra y separar posteriormente a nivel preparativo. Los análisis se realizaron en una columna analítica de fase normal empacada con gel de sílice microporasil con un tamaño de partícula de 10 μm y un tamaño de poro de 125 Å. El diámetro interno de la columna es de 3.9 mm y la longitud de 300 mm. La concentración de las muestras problemas utilizadas en estos análisis fue de 0.1 mg en un volumen inyectado de 20 μl . La elución se realizó con un sistema isocrático y la fase móvil consistió en una mezcla ternaria constituida por hexano:isopropanol:metanol. La velocidad de flujo fue de 0.35 ml/min.

Una vez determinadas las condiciones a nivel analítico se realizó el escalamiento a nivel preparativo, lo que nos permitió la separación y purificación de los constituyentes presentes en las fracciones secundarias.

Se utilizó una columna de fase normal preparativa empacada con gel de sílice microporasil con un tamaño de partícula de 10 μm y un poro de 125 Å; el diámetro interno es de 19 mm y la longitud de 300 mm. Para estos análisis la fase móvil consistió de un sistema isocrático ternario de hexano:isopropanol:metanol (90:5:5 ó 95:2.5:2.5) con un flujo de 8.5 ml/minuto a una presión de 650 lb/pulg², el tiempo para cada corrida fue de 45 minutos. Todos los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

4.3.1.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES FÍSICAS, ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS NATURALES.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros en el IR se registraron en un aparato de rejilla Perkin Elmer modelo 599B o en un aparato Nicolet FT-5X usando pastilla de KBr. Las rotaciones ópticas se registraron en un polarímetro Digital Jasco DIP-360. Los espectros en el UV fueron obtenidos usando un espectrofotómetro de ultravioleta Shimadzu 160 en soluciones de metanol. Los espectros de dicroísmo circular se midieron en metanol en un espectropolarímetro Jasco 720 a 25° C. La espectrometría de masas en su modalidad de impacto electrónico se registró en un aparato JEOL-AX505HA, mediante introducción directa a una energía de ionización de 70 eV.

Los espectros de resonancia nuclear protónica ^1H (500 MHz), carbono-13 C^{13} (125 MHz) así como de resonancia magnética nuclear bidimensionales se obtuvieron en CDCl_3 y se registraron en un instrumento Bruker DMX500 o en un aparato Varian VXR-300S, los desplazamientos químicos están expresados en unidades de ppm (δ) referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

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

En general, los análisis espectroscópicos y espectrométricos se realizaron tanto en el Instituto de Química como en la Facultad de Química de la UNAM. Los

espectros de RMN de 500 MHz (^1H) y 125 MHz (^{13}C) se registraron en el laboratorio de RMN de la UAM.

4.3.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE LA MADERA DE *T. trifolia*.

La madera seca y molida (6.2 Kg) se extrajo con CH_2Cl_2 (12 L), vía maceración. El proceso se repitió tres veces, con intervalos de tres días entre cada extracción. El extracto resultante se concentró a presión reducida con lo cual se obtuvieron 130 g de extracto color café.

4.3.3 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO ACTIVO DE LA MADERA DE *T. trifolia*.

El extracto concentrado (130 g) se fraccionó de manera preliminar en una columna cromatográfica empacada con 1.3 Kg de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck, utilizando como sistemas de elución hexano, mezclas de Hex:AcOEt y mezclas de AcOEt:MeOH. Se recolectaron 223 fracciones de 500 ml cada una. El fraccionamiento cromatográfico se monitoreó mediante ccf y permitió la obtención de 14 grupos de fracciones primarias I-XIV. En la Tabla 5 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones resultantes.

De la fracción secundaria IX precipitaron espontáneamente 500 mg de cristales incoloros en forma de aguja, los cuales fueron identificados como β -sitosterol (1) por comparación con una muestra auténtica. Mientras que de la

fracción X se obtuvieron 30 mg de un sólido cristalino, el cual se identificó como vainilla (2) también por comparación con una muestra auténtica.

Tabla 5. Fraccionamiento preliminar del extracto CH₂Cl₂ de la madera de *T. trifolia*.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES RECOLECTADAS	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE FRACCIÓN	PESO (g)
Hexano	100%	1-6	1-6	I	2.500
Hexano	100%	7-36	7-41	II	6.900
Hex:AcOEt	97:3	37-55	42-43	III	8.600
Hex:AcOEt	97:3	37-55	44-51	IV	0.765
Hex:AcOEt	95:5	56-81	52-61	V	5.876
Hex:AcOEt	95:5	56-81	62-65	VI	0.890
Hex:AcOEt	95:5	56-81	66-81	VII	2.244
Hex:AcOEt	90-10	82-95	82-88	VIII	0.956
Hex:AcOEt	90-10	82-95	89	IX	2.546
Hex:AcOEt	90-10	82-95	90-96	X	1.637
Hex:AcOEt	80-20	96-126	97-99	XI	0.793
Hex:AcOEt	80-20	96-126	100-119	XII	4.000
Hex:AcOEt	80-20	96-126	120-135	XIII	3.700
Hex:AcOEt	70:30	127-155	136-176	XIV	6.000
Hex:AcOEt	60-40	156-171	136-176	XIV	6.000
Hex:AcOEt	1:1	172-191	177-223	XV	13.000
Hex:AcOEt	30-70	192-203	177-223	XV	13.000
AcOEt	100%	204-222	177-223	XV	13.000
AcOEt:MeOH	90-10	Lavado	Lavado	Lavado	

4.3.4 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DOLABELANOS BIOACTIVOS A PARTIR DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DE *T. trifolia*.

4.3.4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTO ÁCIDO (1R,3E,7Z,11S,12S)-DOLABELA-3,7,18-TRIEN-17-OICO (132) Y DE LA (1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-DOLABELA-3,7,18-TRIEN-6,17-OLIDA (133) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA VII.

La fracción primaria VII (2.244 g) se recromatografió en una columna abierta sobre 44 g de gel de sílice. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de Hex:AcOEt, y acetato de etilo puro. De esta columna se obtuvieron un total de 203 fracciones de 20 ml cada una. El monitoreo se realizó mediante el empleo de ccf, reuniéndose aquellas fracciones cromatográficamente similares. Este proceso permitió obtener 20 fracciones secundarias, las cuales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria VII.

ELUYENTE	PROPORCION (%)	FRACCIONES RECOLECTADAS	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE FRACCIÓN	PESO (g)
Hexano	100	1-16	1-26	VII A	0.050
Hex:AcOEt	97:3	17-182	27-28	VII B	0.133
Hex:AcOEt	97:3	17-182	29-35	VII C	0.351
Hex:AcOEt	97:3	17-182	36-49	VII D	0.151
Hex:AcOEt	97:3	17-182	50-65	VII E	0.113
Hex:AcOEt	97:3	17-182	66-82	VII F	0.464
Hex:AcOEt	97:3	17-182	83	VII G	0.025
Hex:AcOEt	97:3	17-182	84-133	VII H	0.431
Hex:AcOEt	97:3	17-182	134-135	VII I	0.008
Hex:AcOEt	97:3	17-182	136-139	VII I	0.008
Hex:AcOEt	97:3	17-182	140-162	VII J	0.024
Hex:AcOEt	97:3	17-182	163-194	VII K	0.244

Hex:AcOEt	97:3	17-182	195-202	VII L	0.213
Hex:AcOEt	95:5	183-194	195-202	VII L	0.213
AcOEt	100	195-202	195-202	VII L	0.213
AcOEt	100	195-202	195-202	VII L	0.213

De la fracción secundaria VII B (Tabla 1), se obtuvieron 133 mg de un sólido cristalino blanco, el cual se purificó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Este procedimiento permitió obtener 120 mg del compuesto **132**. Este compuesto presentó un tiempo de retención de 10 minutos (Figura 6).

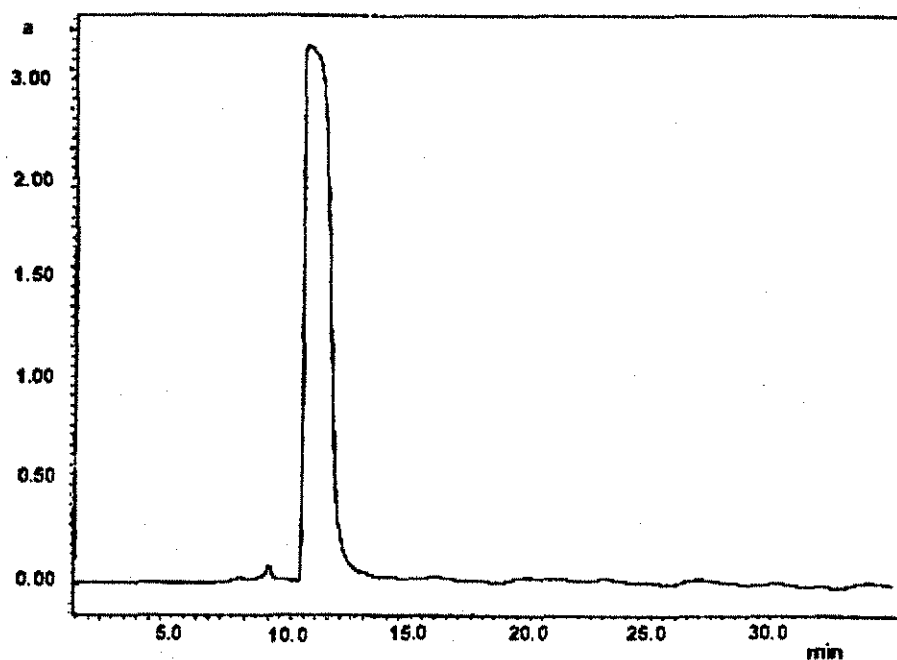
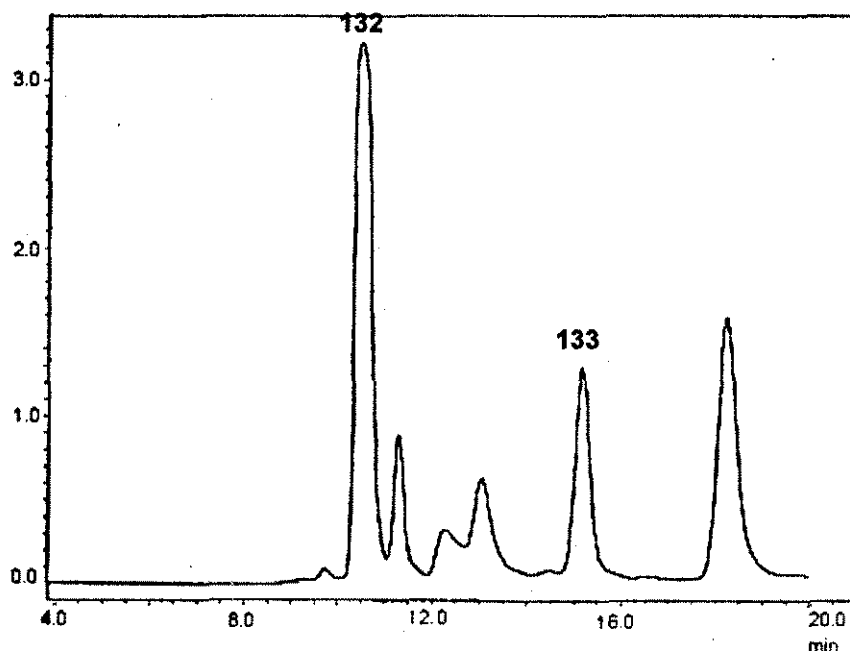


Figura 6. Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción primaria VII B.

Condiciones de análisis: Detector, UV (Waters 996 uv con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 214$ nm; columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125A, 10 μ M); Fase móvil, Hex-iPrOH-MeOH (90:5:5); Flujo 8.3 mL/min.

De manera adicional, de la fracción secundaria VII H se separaron y purificaron por CLAR 15 mg del compuesto **133**. Este compuesto presentó un tiempo de retención de 15.3 minutos en las condiciones empleadas. El compuesto se obtuvo en forma de cristales incoloros (Figura 7).



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria VII H. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 uv con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 209$ nm; columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, Hex-iPrOH-MeOH (90:5:5); Flujo 7.1 mL/min. Asignación de picos: compuesto **132** ($t_r = 10.4$ min), compuesto **133** ($t_r = 15.3$ min).

Ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-17-oico (**132**): p.f.=100-103°C; $[\alpha]_D^{25} = -131$ (MeOH); UV = 204.4 (Espectro 8), 225, DC (MeOH) = 213 nm ($\Delta\epsilon = -7.3 \times 10^5$) (Espectro 9); IR (KBr) ν_{\max} 3420, 3082, 2920, 1681, 1641, 1271, 882 cm^{-1} (Espectro 7); **EM-IE m/z** (intensidad relativa): 302 [M^+] (78), 287(8),

259(23), 257(8), 233(11), 219(9), 191(44), 189(18), 164(91), 136(89), 135(100), 121(98), 93(48), 79(33), 67(31), 41(29) [Espectro 6]. EM-IE de alta resolución (70 eV) m/z 302.2248 (calculado para $C_{20}H_{30}O_2$, 302.2246); RMN 1H y ^{13}C ; Tablas 12 y 13.

(1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-6,17-olida (**133**): p.f.=83-86°C; $[\alpha]_D = +32$ (MeOH); UV = 204 nm (Espectro 20); DC (MeOH) = 213 nm ($\Delta\epsilon = 3.5 \times 10^5$) (Espectro 21); IR (KBr) ν_{max} 3621, 2976, 1750, 1046 cm^{-1} (Espectro 19); EM-IE m/z (intensidad relativa): 300 [M^+] (28), 273(4), 257(8), 232(26), 205(6), 206 (6), 189(7), 165(15), 136(100), 121(68), 93(90), 79(18), 67(11), 55(8), [Espectro 18]. EM-IE de alta resolución (70 eV) m/z 300.2085 (calculado para $C_{20}H_{28}O_2$, 302.2195); RMN 1H y ^{13}C ; Tablas 12 y 13.

4.3.4.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LA (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-HIDROXIDOLABELA-7,18-DIEN-4,17-OLIDA (**134**) Y LA (1*R*,3*R*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-HIDROXIDOLABELA-7,18-DIEN-4,17-OLIDA (**135**) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA XII.

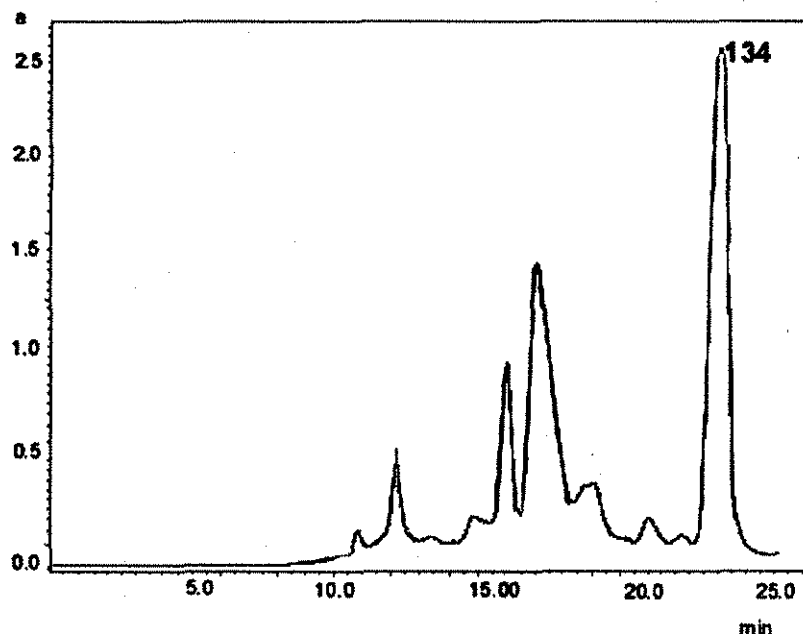
4 g de fracción primaria XII se recromatografiaron en una columna empacada con 40 g de gel de sílice. Para la elución de la columna se empleó hexano, mezclas de Hex:AcOEt y acetato de etilo al 100%. Se recogieron un total de 263 fracciones de 20 ml cada una las cuales se reunieron de acuerdo a su perfil en ccf. El proceso cromatográfico se resume en la Tabla 7.

Tabla 7. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XII.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES RECOLECTADAS	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE FRACCIÓN	PESO (g)
Hexano	100	1-19	1-43	XII A	0.018
Hex:AcOEt	97:3	20-34	1-43	XII A	0.018
Hex:AcOEt	9:1	35-224	44-57	XII B	0.016
Hex:AcOEt	9:1	35-224	58-79	XII C	0.083
Hex:AcOEt	9:1	35-224	80-85	XII D	0.065
Hex:AcOEt	9:1	35-224	86-129	XII E	0.360
Hex:AcOEt	9:1	35-224	130-153	XII F	0.222
Hex:AcOEt	9:1	35-224	154-171	XII G	0.093
Hex:AcOEt	9:1	35-224	172-200	XII H	0.307
Hex:AcOEt	9:1	35-224	201-244	XII I	0.291
Hex:AcOEt	8:2	225-249	245-263	XII J	1.162
AcOET	100%	264	264	Lavado	0.534

De la fracción secundaria XII F se separaron y purificaron por CLAR, 51 mg del compuesto **134**, el cual se obtuvo como cristales incoloros en forma de agujas muy finas (Figura 8).

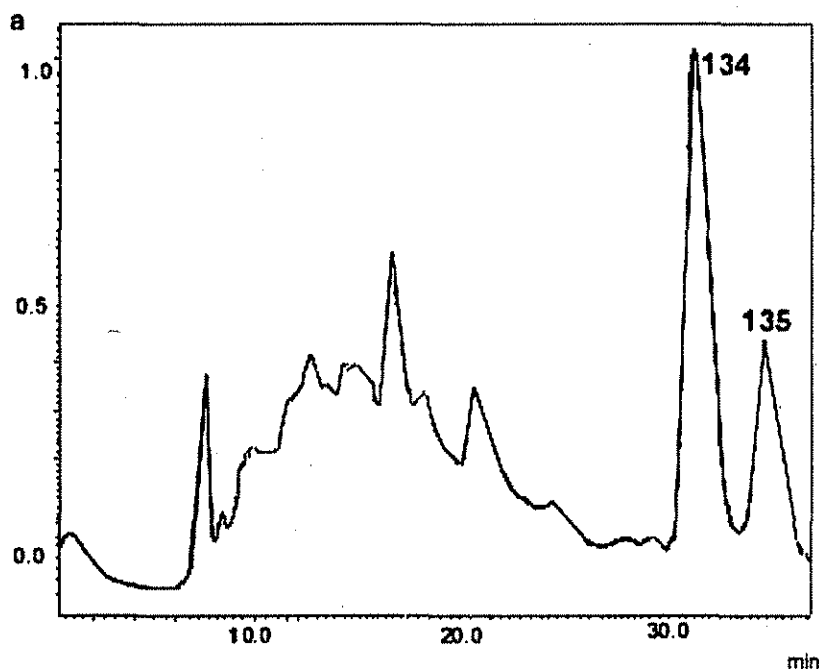
De la fracción secundaria XII H se separaron y purificaron 2.3 mg de cristales correspondientes al compuesto **135**. Para el aislamiento y la purificación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Figura 9). El producto se aisló como cristales incoloros en forma de aguja.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 8. Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria XII F. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 uv con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 225$ nm; columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, Hex-iPrOH- MeOH (90:5:5); Flujo 7.1 mL/min. Asignación de picos: compuesto **134** ($t_r = 25.5$ min).

(1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxiolabela-7,18-dien-4,17-olida **(134)**:
 p.f.=196-197°C; $[\alpha]_D = +16$ (MeOH); UV = 204, 228 nm (Espectro 29); DC (MeOH)
 = 245 nm ($\Delta\epsilon = -2.0 \times 10^5$) (Espectro 30); IR (KBr) ν_{\max} 3624, 2976, 1702, 1389;
 1046, 887 cm^{-1} (Espectro 28); EM-IE m/z (intensidad relativa): 318 [M^+] (15),
 300(20), 285(12), 274(63), 257(30), 246 (35), 231(21), 216(30), 204(34), 191(30),
 173(32), 161(40), 146(70), 135(100), 121(79), 107(79), 93(79), 79(52), 67(52),
 43(20) [Espectro 27]. EM-IE de alta resolución (70 eV) m/z 318.2192 (calculado
 para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, 302.2195); RMN ^1H y ^{13}C ; Tablas 12 y 13.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Cromatograma de líquidos correspondiente a la fracción secundaria XII H. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 uv con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 228$ nm; columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, Hex-iPrOH- MeOH (85:7.5:7.5); Flujo 7.1 mL/min. Asignación de picos: compuesto **134** ($t_r = 31.07$ min), compuesto **135** ($t_r = 34.8$ min).

(1R,3R,4S,7Z,11S,12S)-3-hidroxiolabela-7,18-dien-4,17-olida (135):
 p.f.=190-192 °C; $[\alpha]_D^{25} = -14.4$ (MeOH); UV = 204, 223 nm (Espectro 38); DC (MeOH) = 236 nm ($\Delta\epsilon = +2.0 \times 10^5$) (Espectro 39); IR (KBr) ν_{max} 3452, 2939, 1689, 1450, 1381, 755 cm^{-1} (Espectro 37); EM-IE m/z (intensidad relativa): 318 [M^+] (11), 300(16), 274(59), 257(30), 246(34), 217(31), 216(30), 189(34), 173(35), 161(49), 146(61), 135(100), 121(80), 107(70), 93(69), 81(54), 79(51), 67(51), 43(64) [Espectro 40]. EM-IE de alta resolución (70 eV) m/z 318.2197 (calculado para $C_{20}H_{30}O_3$, 302.2198); RMN ^1H y ^{13}C ; Tablas 12 y 13.

4.3.4.3 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL ACIDO (1R,3S,4S,7Z,11S,12S)-3,4-EPOXIDOLABELA-7,18-DIEN-17-OICO (136) A PARTIR DE LA FRACCIÓN PRIMARIA ACTIVA XIV.

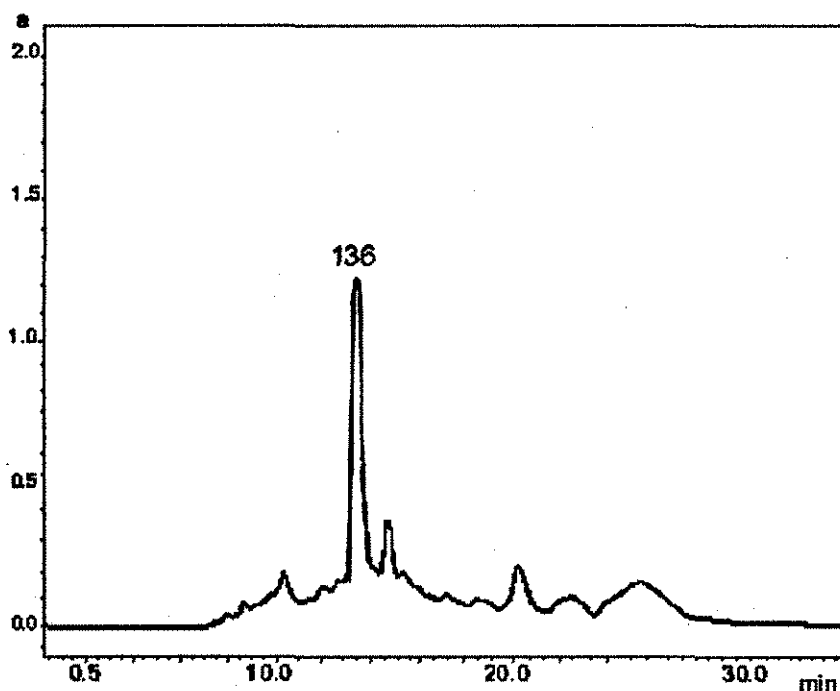
Se recromatografiaron 6g de la fracción primaria XIV por medio de una columna abierta empacada con 70 g de gel de sílice. Se usó hexano y mezclas de Hex:AcOEt como sistema de elución. Se obtuvieron un total de 396 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico. El proceso cromatográfico se resume en la Tabla 8:

Tabla 8. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XIV.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES RECOLECTADAS	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE FRACCIÓN	PESO (g)
Hexano	100	1-13	1-41	XIV A	0.019
Hex:AcOEt	95:5	14-41	1-41	XIII A	0.019
Hex:AcOEt	95:5	14-118	42-65	XIII B	0.009
Hex:AcOEt	92:8	119-131	66-153	XIII C	0.035
Hex:AcOEt	9:1	132-158	66-153	XIII C	0.035
Hex:AcOEt	85:15	159-200	154-209	XIII D	0.237
Hex:AcOEt	75:25	201-214	154-209	XIII D	0.237
Hex:AcOEt	7:3	215-284	210-237	XIII E	1.366
Hex:AcOEt	6:4	285-384	238-295	XIII F	1.200
AcOEt	4:6	385-393	296-379	XIII G	1.109
AcOEt	4:6	385-393	380-393	XIII H	0.176
AcOEt	100	Lavado	Lavado	XIII I	0.308

De la fracción secundaria XIV F se obtuvo 1 mg del compuesto 136. Para el aislamiento y la purificación se utilizó la técnica de cromatografía líquida de

alta resolución (CLAR) (Figura 10). El producto, que presentó un tiempo de retención de 13.21 min, se aisló como un sólido cristalino amorfo.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Cromatograma de líquidos de la fracción secundaria XIV F. **Condiciones de análisis:** Detector, UV (Waters 996 uv con arreglo de diodos); Longitud de onda $\lambda = 214$ nm; columna de gel de sílice (Waters, μ porasil, 300 x 19 mm, 125Å, 10 μ M); Fase móvil, Hex- iPrOH- MeOH (85:7.5:7.5); Flujo 7.1 mL/min.

Ácido (1R,3S,4S,7Z,11S,12S)-3,4-epoxidolabela-7,18-dien-17-oico (136):
 p.f.=102-105 °C; $[\alpha]_D = -78.5$ (MeOH); UV = 205 nm (Espectro 48); DC (MeOH) =
 222 nm (Espectro 49); IR (KBr) ν_{\max} 3417, 2933, 1711, 1688, 1247, 884 cm^{-1}
 (Espectro 47); EM-IE m/z (intensidad relativa): 318 [M^+] (12), 300(19), 274(62),
 257(32), 246(37), 217(31), 216(30), 189(34), 189(35), 173(37), 146(61), 135(100),
 121(85), 107(79), 93(80), 67(75), 55(50.7)43(93) , 41(44) [Espectro 46]. EM-IE de

alta resolución (70 eV) m/z 318.2452 (calculado para $C_{20}H_{30}O_3$, 302.2457); RMN 1H y ^{13}C ; Tablas 12 y 13.

4.3.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS ACIDOS OLEANÓLICO (3), URSÓLICO (4) Y VAINILLINICO (5) DE LA FRACCIÓN PRIMARIA XIII.

3.7 g de la fracción primaria XIII se recromatografiaron en una columna abierta empacada con 55 g de gel de sílice. Para la elución de la columna se empleó hexano y mezclas de Hex:AcOEt. Se recogieron un total de 227 fracciones, las cuales se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico. El proceso cromatográfico recién descrito se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XIII.

ELUYENTE	PROPORCIÓN (%)	FRACCIONES RECOLECTADAS	FRACCIONES COMBINADAS	CLAVE FRACCIÓN	PESO (g)
Hexano	100	1-20	1-30	XIII A	0.006
Hex:AcOEt	95:5	21-35	1-30	XIII A	0.006
Hex:AcOEt	9:1	33-120	31-51	XIII B	0.014
Hex:AcOEt	9:1	33-120	52-87	XIII C	0.038
Hex:AcOEt	9:1	33-120	88-130	XIII D	0.071
Hex:AcOEt	85:15	121-227	131-157	XIII E	0.064
Hex:AcOEt	85:15	121-227	158-216	XIII F	0.183
Hex:AcOEt	85:15	121-227	217-221	XIII G	0.953
Hex:AcOEt	85:15	121-227	222-227	XIII E	0.604
AcOEt	100	Lavado	Lavado	Lavado	0.326

La purificación de las fracciones XIII C, XIII E y XIII G por CLAR permitió la obtención de los compuestos 3, 4, y 5 respectivamente, los cuales se identificaron como el ácido oleanólico, ursólico y vainíllinico por comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los previamente descritos en la literatura.

4.3.6 PREPARACIÓN DE DERIVADOS QUÍMICOS A PARTIR DE LOS PRODUCTOS NATURALES AISLADOS.

4.3.6.1 OBTENCIÓN DEL DERIVADO METILADO DEL COMPUESTO 132.

Para obtener el derivado metilado del compuesto 132 se utilizó una solución etérea de diazometano preparada con una solución de hidróxido de potasio (5.0 g en 7.5 mL de agua), 25 ml de etanol y 21.9 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluen sulfonamida (Diazal, Aldrich) en 45 mL de éter etílico. El compuesto 1 (10 mg) se disolvió en 0.5 mL de éter y se le adicionaron 5 mL de la solución etérea de diazometano; la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Ester metílico del ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-17-oico (132a): p.f. = 122-124°C; $[\alpha]_D = -152$ (MeOH); UV = 204 nm; IR (KBr) ν_{\max} 3077, 2924, 2862, 1713, 1195, 884 cm^{-1} (Espectro 12); EM-IE *m/z* (intensidad relativa): 316(10), 299(11), 287(16), 273(27), 255(22), 241(21), 227(34), 213(34), 187(41), 173(49), 159(47), 147(71), 135(86), 121(100), 107(96), 91(87), 79(62), 67(39), 41(21) [Espectro 11]. EM-IE de alta resolución (70 eV) *m/z* 316.2406 (calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$, 316.2402); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 1.07, 1.55, 1.62 (3H cada uno, s, Me) 3.69 (3H, s, -OMe), 4.65 (1H, m, H-20 a), 4.80 (1H, m, H-20b), 1.39

(1H, m, H-14 a), 1.53 (1H, m, H-14b), 1.59 (2H, m, H-13), 2.69 (1H, q a, $J = 7.5$ Hz, H-12), 1.73 (1H, m, H-11), 1.46 (1H, m, H-10 a), 1.29 (1H, ddd, $J = 14.6, 7.4, 4.5$ Hz, H-10b), 2.46 (1H, ddd a, $J = 13.1, 7.6, 5.2$ Hz, H-9 a), 2.16 (1H, m, H-9b), 5.76 (1H, dd, $J = 11.8, 3.5$ Hz, H-7), 3.25 (1H, m, H-6 a), 2.31 (1H, m, H-10 b), 2.31 (1H, m, H-5 a), 2.18 (1H, m, H-5b), 5.22 (1H, dd a, $J = 11.5, 3.0$ Hz, H-3), 2.22 (1H, dd, $J = 12.0, 13.0$ Hz, H-2 a), 1.73 (1H, dd, $J = 13.0, 4.0$ Hz, H-2b).

4.3.6.2 OBTENCIÓN DEL DERIVADO EPOXIDADO DEL COMPUESTO 132.

La mezcla de epóxidos del ácido **132** se obtuvo tratando una solución en CH_2Cl_2 de 10 mg del producto natural con 5 mg de ácido meta-cloroperbenzoico. La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina para verificar su avance. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se evapora el disolvente y el residuo se purifica por cromatografía en columna. Los derivados resultantes se caracterizaron por medio de los espectros de RMN protónica. El compuesto mayoritario fue idéntico al producto natural **136**.

4.3.6.3 OBTENCIÓN DEL DERIVADO ACETILADO DEL COMPUESTO 134.

Para obtener el derivado acetilado del compuesto **134**, se utilizó 1 ml de piridina, 1 ml de anhídrido acético y 5 mg de **134**. La mezcla de reacción se mantuvo por 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó agua y se extrajo con AcOEt, se realizó una partición con HCl, seguida de un lavado con una

solución saturada de NaHCO_3 , se secó con Na_2SO_4 y se concentró a sequedad. El derivado resultante se caracterizó por medio de los espectros de RMN protónica (Espectro 45), IR (Espectro 25) y masas (Espectro 26).

(1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-acetiloxidolabela-7,18-dien-4,17-olida (**134a**): p.f. = 160-162 °C; $[\alpha]_D = -40$ (MeOH); UV = 204, 232 nm; IR (KBr) ν_{max} 2923, 2851, 1734, 1717, 1237, 1025, 800 cm^{-1} ; EM-IE m/z (intensidad relativa): 360 (5), 335(2), 319(6), 300(18), 285(28), 275(25), 257(72), 247 (20), 239(33), 229(54), 213(67), 199(46), 187(65), 173(72), 159(100), 145(93), 133(92), 121(90), 105(90), 91(88), 79(56), 67(47), 55(19), 43(39). EM-IE de alta resolución (70 eV) m/z 360.2305 (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$, 360.2300); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 0.74, 1.34, 1.62 (3H cada uno, s, Me), 2.07 (3H, s, -OAc), 4.74 (1H, d quint, $J = 2.5, 1.0$, H-20 a), 4.86 (1H, d quint, $J = 2.5, 1.2$, H-20 b), 1.37 (1H, t d, $J = 12.5, 7.5$, H-14 a), 3.04 (1H, m, H-12), 6.28 (1H, dd, $J = 8.4, 5.7$, H-7), 2.32 (1H, m, H-6a), 2.16 (1H, m, H-6b), 6.16 (1H, da, $J = 6.5$, H-3), 1.93 (1H, da, $J = 15.5$, H-2 a).

4.4 CÁLCULOS DE MODELAJE MOLECULAR

Las estructuras de mínima energía fueron generadas usando el campo de fuerza MMX como se encuentra implementado en el programa de modelaje molecular PCMODEL versión 6.00 (Serena Software, Box 3076), Bloomington, IN 47402-3076). El estudio conformacional de los anillos de cinco y once miembros se llevó a cabo considerando la rotación de ángulos diedros en aproximadamente 20° en aquellos enlaces que permiten tales movimientos acorde a los modelos

Dreiding. Como criterio de convergencia se utilizó la similitud entre las constantes de acoplamiento vicinales $^1\text{H}-^1\text{H}$ observadas en los espectros de RMN y los que se calcularon por extrépolación mediante la ecuación de Altona a partir de los ángulos diedros del modelo molecular de mínima energía (mínimo global).

El cálculo de la población conformacional expresada en fracción molar (n) se realizó con la relación entre la energía libre de Gibbs (ΔG) y la constante de equilibrio (K): $\Delta G = -RT \ln K$, donde $R = 1.988 \times 10^3 \text{ kcal/mol}^\circ\text{K}$ y $T = 298 \text{ }^\circ\text{K}$. Considerando que m es el número total de confórmers a ser considerados, n_i es la fracción del i -ésimo confórmer, $Kn_1 - n_2 = n_2/n_1$ y $Kn_2 - n_m = n_m/n_2$ y que $n_1 + n_2 + \dots + n_m = 1$, se puede sustituir la constante de equilibrio por las fracciones molares en la ecuación libre de Gibbs para cada confórmer en equilibrio y, de esta manera, se obtiene una serie de ecuaciones de acuerdo al número total de confórmers, que al ser despejadas permite calcular la fracción molar de cada uno de éstos. En este caso se considera que en los derivados del dolabelano el cambio de entropía asociado a una variación de la conformación del anillo de once miembros no es significativo debido a que se conserva el total de grados de libertad de la estructura al pasar de un confórmer a otro (e.g. de $\alpha\alpha$ a $\beta\beta$) por lo que se puede hacer la siguiente aproximación $\Delta G \approx \Delta H \approx \Delta E_{\text{MMX}}$. Por ejemplo, considerando tres confórmers en equilibrio, se aplican las siguientes ecuaciones (Arnó *et al.*, 1998; Pereda-Miranda *et al.*, 2001):

$$n_2 = 1 / \{ \exp [(E_2 - E_1) / RT] + \exp [(E_2 - E_1) / RT] + 1 \}$$

$$n_3 = n_2 \exp [(E_2 - E_3) / RT], \text{ y}$$

$$n_1 = 1 - n_2 - n_3$$

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PRESELECCIÓN Y SELECCIÓN DE LA ESPECIE *Trichilia trifolia* COMO FUENTE POTENCIAL DE AGENTES INSECTICIDAS.

Los estudios conducentes a la obtención de nuevos principios activos vegetales de utilidad tanto terapéutica como agroquímica comprenden varias etapas (Benner, 1993; Cox y Balick, 1994; Fang *et al.*, 1993; Prance, 1994; Farnsworth y Warner, 1990). En primer término es necesario realizar la preselección de las especies vegetales idóneas para la obtención de los compuestos activos. Para efectuar este proceso se siguen generalmente uno o más criterios, los cuales se pueden basar en la semejanza del metabolismo secundario entre especies vegetales filogenéticamente relacionadas (criterio quimiotaxonómico); en la observación de los efectos que ocasionan las interacciones, a veces complejas, entre dos organismos en su ecosistema natural (criterio ecológico); en el uso de numerosas especies vegetales con fines curativos en la medicina popular (criterio etnomédico); y por último, en el uso de plantas de interés agroquímico (criterio etnobotánico).

Una vez que las materias primas se preseleccionan con base en uno o más los criterios antes mencionados, se realizan pruebas biológicas de selección. Aquellas especies que presentan actividades biológicas significativas se consideran candidatos apropiados para la realización de estudios químicos conducentes a la obtención de biodinámicos responsables de actividad biológica

de interés terapéutico y/o agroquímico. Por último, los compuestos activos se identifican y se someten a una serie de bioensayos secundarios con la finalidad de obtener una mayor información acerca de sus propiedades biológicas (Benner, 1993; Cox and Balick, 1994; Farnsworth y Warner, 1990; Prance, 1994).

En el caso específico del presente estudio, la preselección de las especies se realizó con base en el criterio quimiotaxónomico, tomando en consideración los antecedentes de un gran número de especies de meliáceas como una fuente valiosa de compuestos de tipo limonoide con actividad insecticida (Arnason *et al.*, 1987; Champagne *et al.*, 1989, 1992; Isman *et al.*, 1988, 1996; Govindachari *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 1991, 1993; Macleod *et al.*, 1990; Mulholland *et al.*, 2000; Nakatani *et al.*, 1985, 1994; Nakatani, 1999; Rani *et al.*, 1999; Rembold y Puhlmann, 1993; Schmitterer, 1987, 1995; Zhou *et al.*, 1996).

Tras realizar una cuidadosa revisión bibliográfica se encontró que las especies del género *Trichilia* más abundantes en México son *Trichilia trifolia*, *Trichilia martiana*, y *Trichilia moschata*. Una vez ubicadas las localidades en donde crecen estas plantas se procedió a la recolección de las diferentes partes vegetales (madera y hojas) de cada especie. De las partes vegetales mencionadas se prepararon extractos en pequeña escala con el fin de realizar los ensayos biológicos preliminares conducentes a la determinación del potencial fagoinhibidor de cada extracto.

Para realizar los bioensayos, se utilizó como insecto de prueba el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*. Los resultados obtenidos del bioensayo indicaron que el extracto de la madera de *T. trifolia* presentaba la mejor actividad, inhibiendo la ingesta de alimentos en un 78.7 % con respecto al control (Tabla 10). Estos

resultados permitieron inferir que la madera de *T. trifolia* podía contener compuestos de utilidad para el desarrollo de nuevos agentes insecticidas.

Tabla 10. Porcentajes de fagoINHIBICIÓN de los extractos de las especies seleccionadas.

EXTRACTO	% FAGOINHIBICIÓN (DE) CONCENTRACIÓN 0.5 %
<i>Trichilia trifolia</i> (Madera)	78.71 (0.37)
<i>Trichilia trifolia</i> (Hojas)	43.88 (0.70)
<i>Trichilia martiana</i> (Madera)	43.12 (0.43)
<i>Trichilia martiana</i> (Hojas)	40.27 (0.53)
<i>Trichilia moschata</i> (Madera)	37.14 (0.29)
<i>Trichilia moschata</i> (Hojas)	31.60 (0.62)

DE = Desviación estándar.

5.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS BIODINÁMICOS A PARTIR DEL EXTRACTO ACTIVO DE LA MADERA DE *T. trifolia*.

Con base en los resultados anteriores se inició el estudio fitoquímico de la madera de *T. trifolia* con la finalidad de aislar los principios activos. La preparación del extracto en gran escala se realizó mediante un procedimiento de maceración utilizando diclorometano como disolvente. Posteriormente, el extracto activo fue sometido a un fraccionamiento preliminar utilizando una columna abierta de gel de sílice. Este proceso permitió la obtención de 15 grupos de fracciones primarias (I-XV) [Tabla 5 sección experimental]. Cada una de las fracciones primarias se ensayó a la concentración de 0.5% para determinar su efecto fagoINHIBIDOR.

Los resultados del ensayo biológico indicaron que la mejor actividad se concentraba en las fracciones VII, XII, y XIV (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de fago inhibición de las fracciones correspondientes al extracto de la madera de *T. trifolia*.

FRACCION	% FAGOINHIBICIÓN (DE) CONCENTRACIÓN 0.5 %
I	10.37 (0.24)
II	15.43 (0.61)
III	20.25 (0.42)
IV	35.92 (0.33)
V	21.03 (0.38)
VI	12.72 (0.52)
VII	80.50 (0.62)
VIII	13.73 (0.83)
IX	14.29 (0.16)
X	11.09 (0.31)
XI	12.55 (0.26)
XII	82.80 (0.44)
XIII	27.81 (0.11)
XIV	65.39 (0.23)
XV	9.30 (0.29)

DE = Desviación estándar.

Con la finalidad de aislar los constituyentes responsables de la actividad fago inhibidora, cada una de las fracciones activas se analizó por separado utilizando diversos procedimientos cromatográficos. Este proceso permitió el aislamiento de 133 mg del ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-17-oico (**132**), 15 mg de la (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-6,17-olida (**133**), 51 mg de la (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxi-dolabela-7,18-dien-4,17-olida (**134**), 2.3 mg de (1*R*,3*R*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxi-dolabela-7,18-dien-4,17-olida (**135**) y 1.0 mg del ácido (1*R*,3*S*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3,4-epoxi-dolabela-7,18-dien-17-oico (**136**). Las estructuras de los compuestos **132-136** se ilustran en la Figura 11.

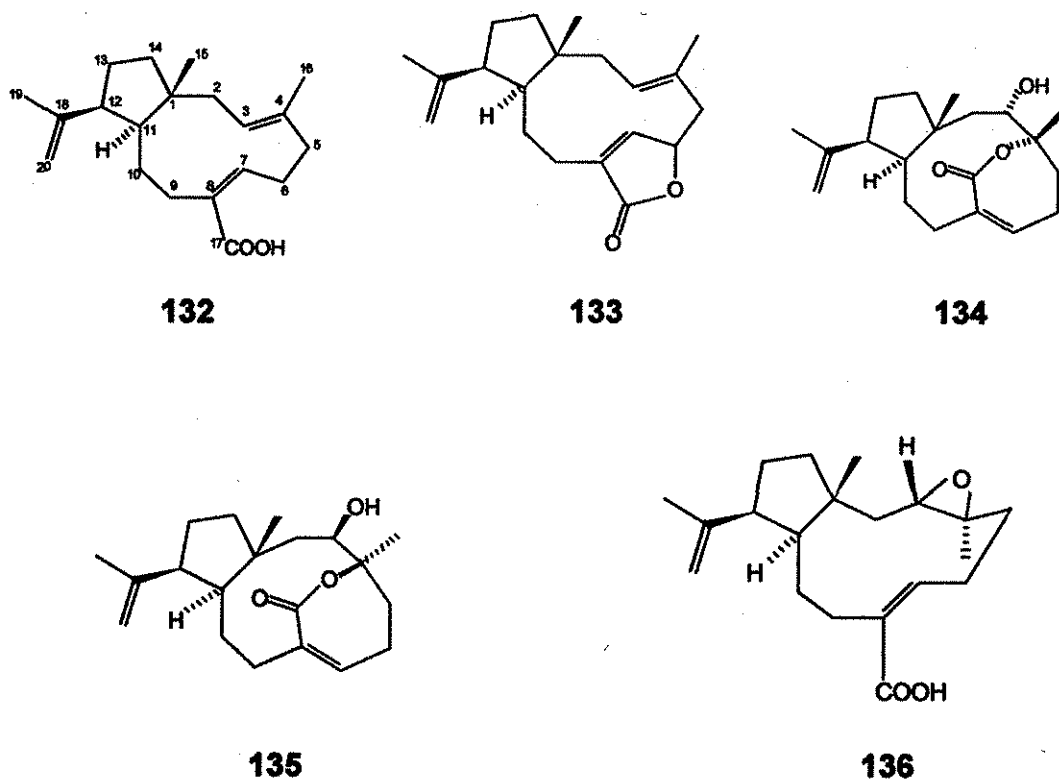


Figura 11. Estructuras de los metabolitos secundarios aislados del extracto activo de la madera de *T. trifolia*.

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS DE LA MADERA DE *T. trifolia*.

Los dolabelanos aislados de *T. trifolia* tienen como características estructurales comunes la presencia de dobles ligaduras en C-18/C-20 y C-7/C-8 y una fusión de los anillos de cinco y once miembros de tipo *trans*. El compuesto **132** presenta además una función carboxílica en C-8, mientras que el compuesto **136** contiene además de la función carboxílica en C-8, un grupo epóxido en C-3/C-4. Los productos **134** y **135** tienen en común la presencia de una lactona de siete

miembros y un hidroxilo secundario en C-3. Por último, el producto **133** contiene una γ -lactona α - β insaturada y una doble ligadura en C-3 / C-4.

La fórmula molecular de cada compuesto se estableció mediante espectrometría de masas de alta resolución. Este análisis permitió determinar que todos los compuestos contienen 20 átomos de carbono. Los espectros en el IR (Espectros 7, 19, 28, 37 y 46) permitieron detectar los principales grupos funcionales presentes en las moléculas y el análisis de los espectros de RMN unidimensionales y bidimensionales (COSY, HMQC y HMBC) (Espectros 5, 17, 36, 45) permitió establecer el núcleo base y la ubicación de los distintos grupos funcionales (Tablas 12 y 13) (Bheemasankara,1986; Ireland *et al.*, 1976; Mohamed,1994) .

La aplicación de cálculos de mecánica molecular en conjunto con el análisis de las constantes de acoplamiento protón-protón y de los espectros NOESY permitieron establecer la estereoquímica relativa de los sustituyentes en el núcleo dolabelano y la conformación en solución de los productos naturales. La configuración absoluta de los centros estereogénicos de los compuestos **134** y **135** se determinó mediante el análisis de los espectros de dicroísmo circular aplicando el método de Snatzke para γ -lactonas α , β -insaturadas (Snatzke, 1968; Legrand y Rougier, 1977). Cabe mencionar que la configuración absoluta de los productos naturales restantes se propuso con base en consideraciones biogénicas. En el caso de los productos **132** y **133**, sus estructuras se confirmaron de forma inequívoca mediante un análisis de difracción de rayos X.

La elucidación estructural de los compuestos **132-134** se discute con detalle en el artículo titulado "Structure, Conformation and Absolute Configuration of New Antifeedant Dolabellanes from *Trichilia trifolia*" publicado en la revista *Tetrahedron* en el año 2000 (Anexo 1). Por lo tanto, a continuación sólo se discutirán los aspectos más relevantes de la caracterización de los productos aislados. Dada la similitud estructural entre los compuestos **132**, **136**, y **133**, y entre **134** y **135**, la discusión relativa a cada grupo de dolabelanos se hará de manera simultánea.

5.3.1 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS **132**, **133** Y **136**.

Los espectros en el IR de los compuestos **132** y **136** presentaron bandas asociadas con la presencia de una función carboxilica conjugada (3420, 1680 y 1610 cm^{-1}). En el caso del compuesto **132** la presencia del grupo carboxilo se demostró químicamente mediante la obtención del ester metílico **132a** por tratamiento del producto natural con una solución etérea de diazometano. Los espectros de RMN confirmaron la presencia del grupo carboxilo conjugado y presentaron las características que se indican a continuación:

a) En primer lugar se observan las señales diagnósticas para un grupo isopropilideno, las cuales aparecen en los espectros de RMN ^1H (Tabla 12) centradas en $\delta_{\text{H}} \sim 4.60$ (1H, H-20a), ~ 4.80 (1H, H-20b), ~ 1.60 (3H, Me-19); en tanto que en los espectros de RMN ^{13}C , las señales correspondientes se observan en δ_{C} 111.3 (C-20), 23.2 (Me-19), 146.0 (C-18) (Tabla 13).

b) En δ_c 149.4 (C-7), 129.3 (C-8) y 173.4 (C-17) se aprecian las señales correspondientes al carboxilo conjugado. La señal del metino olefínico en δ_c 148 correlaciona en el espectro HMQC con la señal en δ_H 5.93 (H-7).

c) En el caso de **132**, se observan señales congruentes con la presencia de una doble ligadura trisustituída en $\delta_c \sim 125.1$ (C-3)/ δ_H 5.23 (H-3) y 135.2 (C-4). En los espectros del compuesto **136** estas señales se encuentran remplazadas por las de una función epoxídica [δ_H 2.83 (H-3) / δ_c 63.9 (C-3) y 61.8 (C-4)].

d) En la región de los metilos, se observa un singulete en $\delta_H \sim 1.1$ atribuible al metilo en C-1. De manera adicional, en el caso de **132**, se observa una señal para metilo sobre doble ligadura en δ_H 1.57 atribuible al metilo en C-4. En el caso del compuesto **136**, la señal para este metilo se observa desplazada diamagnéticamente en δ_H 1.25.

e) En el compuesto **132** se observa un multiplete en δ_H 1.73 atribuible al metino C-11. Este multiplete correlaciona en el espectro HMQC con la señal en δ_c 42.0. En el producto **136**, la señal de C-11 está desplazada paramagnéticamente en δ_H 1.85.

Tabla 12. Desplazamientos químicos de RMN¹H (500 MHz) de los dolablanos 132-136

PROTÓN	132 Espectro 1	133 Espectro 13	134 Espectro 22	135 Espectro 32	136 Espectro 41
2a	2.22 dd (12.0, 13.0)	2.09 dd (14.0, 8.0)	1.98 da (15.5)	1.26 dd (16.4, 8.0)	1.47 (14.2, 11.1)
2b	1.73 dd (13.0, 4.0)	1.91 dd (14.0, 8.0)	1.50 dd (15.5, 6.5)	1.78 da (16.4)	1.80 (14.2, 2.3)
3	5.23 dd a (11.5, 3.0)	5.10 tq (8.0, 1.0)	4.88 da (6.5) ^o	4.64 da (8.0)	2.91 dd (11.0, 2.3)
5a	2.31 m	2.78 dd (14.5, 3.3)	1.90 m (14.2, 6.3, 2.1) ^o	2.39 ddd (14.0, 11.7, 6.6)	2.26 m
5b	2.18 m	2.35 dd (14.5, 4.0)	2.44 td (14.2, 13.3, 5.5) ^o	2.07 ddd (14.0, 7.7, 2.6)	1.32 m
6a	3.32 m	5.22 tdd (3.8, 2.3, 1.5)	2.44 td (14.2, 13.3, 6.3, 5.4) ^o	2.23 dddd (14.8, 8.3, 6.6, 2.6)	3.44 dddd (15.5, 13.0, 11.7, 4.4)
6b	2.31 m	—	2.16 m (14.1, 8.3, 5.5, 2.1) ^o	2.51 dddd (14.8, 11.7, 7.7, 5.3, 3.1)	2.36 dsext a (15.5, 2.6)
7	5.93 dd (11.8, 3.5)	6.82 ta (1.5)	6.14 da (8.3, 5.4) ^o	6.24 ddd (8.3, 5.3, 2.0)	6.04 dd (11.7, 3.2)
9a	2.46 ddd a (13.1, 7.6, 5.2)	2.46 dddd (13.0, 3.5, 2.5, 1.5)	2.56 tdt (13.5, 3.0, 1.5)	2.80 dddd (13.7, 3.8, 3.1, 2.8, 2.0)	2.65 m
9b	2.16 m	1.95 ddd (13.0, 10.5, 6.0)	2.25 ddd a (13.5, 3.8, 2.5)	1.42 ddd (15.6, 5.4, 3.8, 3.6)	2.25 m
10a	1.46 m	1.39 m	1.88 m	1.24 ddt (15.6, 13.5, 2.8)	1.53 dd (14.0, 2.1)
10b	1.29 ddd (14.6, 7.4, 4.5)	1.39 m	1.45 m	1.86 ddd (11.9, 5.4, 2.8)	1.34 dd (14.0, 2.1)
11	1.73 m	1.69 m	1.72 m	1.82 m	1.85 ddd a (10.0, 7.0, 3.4)
12	2.69 qa (7.5)	2.63 td a (9.5, 8.0)	3.02 td a (11.0, 8.5)	2.97 dt (12.0, 9.2)	2.55 qa (7.8)
13a	1.60 m	1.60 m	1.64 m	—	1.56 m
13b	1.60 m	1.60 m	1.64 m	1.75 dddd (13.0, 12.5, 9.2, 6.7)	1.62 m
14a	1.48 m	1.46 m td (12.0, 8.0)	1.44 m	1.61 td (12.5, 7.9)	1.42 m
14b	1.55 m	1.42 m	1.37 td (12.5, 7.5)	1.37 da (12.5, 6.7)	1.62 m
15	1.07 s	0.87 s	0.95 s	0.78 s	1.27 s
16	1.57 s	1.61 s	1.33 s	1.37 s	1.32 s
19	1.64 s	1.78 s	1.64 s	1.69 m	1.59 s
20a	4.67 m	4.90 dq (2.5, 1.2)	4.74 dqint (2.5, 1.0)	4.89 dq (2.5, 1.2)	4.66 sa
20b	4.80 dq (2.5, 1.2)	4.75 dqint (2.5, 1.0)	4.88 dq (2.5, 1.2)	4.76 m	4.83 sa

^aMedidas en CDCl₃. ^oConstantes de acoplamiento en Hz. Los espectros correspondientes se incluyen en el anexo 1.

Tabla 13. Desplazamientos químicos de RMN ^{13}C (125 MHz) de los dolabelanos 132-136

Carbono	132 Espectro 2	133 Espectro 14	134 Espectro 23	135 Espectro 33	136 Espectro 42
1	46.0	46.3	43.3	43.3	43.1
2	43.4	41.3	48.0	38.7	43.8
3	125.4	129.1	70.7	70.0	63.9
4	135.2	128.9	85.0	85.4	61.8
5	39.8	40.4	35.6	37.6	38.7
6	25.9	80.4	23.4	23.4	25.9
7	149.4	148.0	133.3	136.3	147.6
8	129.3	134.3	140.3	139.5	129.6
9	32.5	26.3	34.8	35.9	32.8
10	25.5	21.9	27.2	20.1	23.2
11	42.0	42.2	49.3	45.1	41.7
12	50.8	50.3	51.0	47.0	51.4
13	28.4	28.5	27.7	28.1	27.5
14	42.2	41.1	42.8	37.2	42.8
15	24.0	25.4	19.8	23.1	24.5
16	15.5	20.1	22.6	23.4	15.7
17	173.4	173.6	171.9	169.8	171.0
18	146.8	145.9	147.0	147.4	145.8
19	23.2	23.4	22.9	23.3	23.2
20	111.3	112.3	113.6	113.2	111.3

^a Medidos en CDCl_3 . Los espectros correspondientes se incluyen en el anexo 1.

El análisis detallado de los espectros HMBC de **132** y **136** (Espectros 5 y 45) permitió determinar la disposición de los distintos grupos funcionales. En la Figura 12 se ilustran las correlaciones más importantes observadas en los espectros HMBC de ambos compuestos.

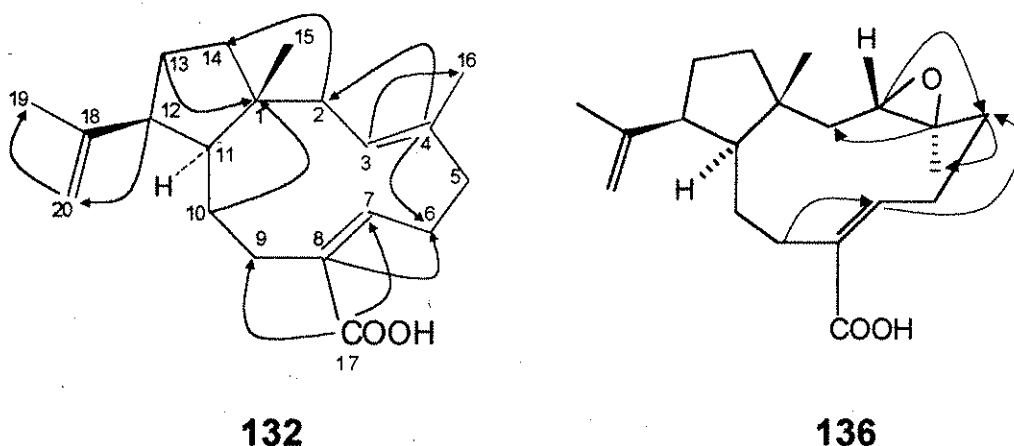
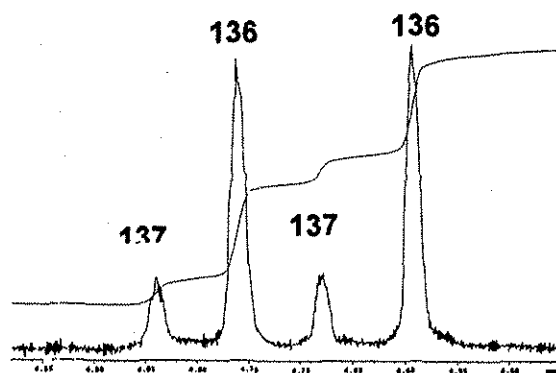
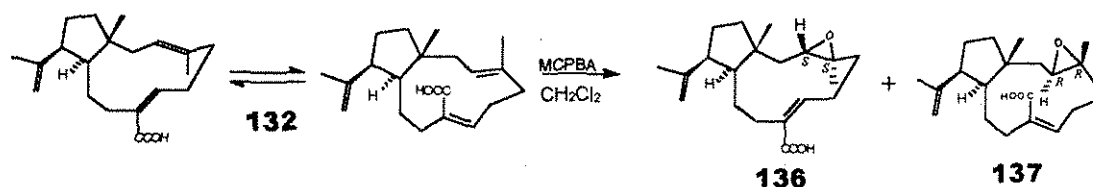


Figura 12. Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC de los compuestos **132** y **136**.

El tratamiento de **132** con ácido *m*-cloroperbenzoico permitió la obtención de una mezcla de epóxidos (**136** y **137**) en una proporción 8:2. La purificación y el posterior análisis espectroscópico del componente mayoritario permitió evidenciar que éste era idéntico al producto natural **136** (Figura 13). Cabe destacar que la proporción de los componentes de la mezcla se calculó a partir de las integrales de las señales correspondientes a cada compuesto. En la figura 13 a manera de ejemplo se ilustra la región del espectro de RMN H^1 en el rango entre δ_H 4.5 y 4.9 donde aparecen las señales atribuibles a los hidrógenos vinílicos en C-20. Cómo

se discute más adelante el epóxido minoritario **137** podría ser un diastereoisómero del producto natural **136**. Este conjunto de evidencias permitió identificar a los productos **132** y **136** como los ácidos dolabela-3,7,18-trien-17-oico y el 3,4-epoxidolabela-7,18-dien-17-oico, respectivamente.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 13. Región del espectro de RMN H^1 entre δ_{H} 4.5-4.9 donde aparecen H-20 y H-20' de la mezcla de epóxidos **136** y **137**.

La estructura propuesta para el compuesto **132** se confirmó a través de un análisis de difracción de rayos X. En la Figura 14 se presenta una vista estereoscópica del producto y de la misma se desprende que la fusión de los anillos de cinco y once miembros es *trans* y que la estereoquímica de las dobles

anillos de cinco y once miembros es *trans* y que la estereoquímica de las dobles ligaduras en C-3 y C-7 es *E* y *Z*, respectivamente. La fusión *trans* de los anillos explica la ausencia de una correlación entre los hidrógenos del metilo en C-1 y H-11 en los espectros NOESY de los producto **132** y **136** (Espectros 4 y 44).

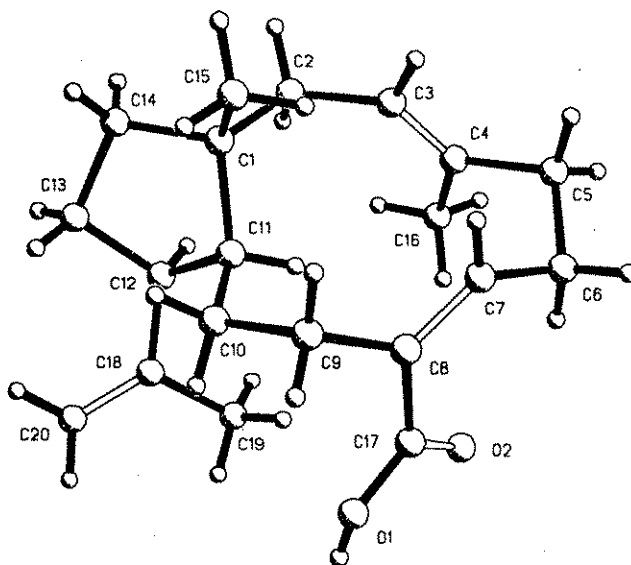


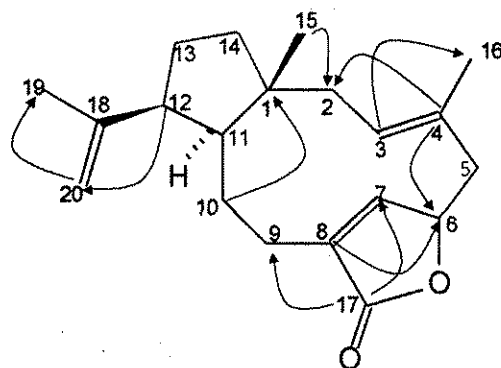
Figura 14. Vista estereoscópica del compuesto **132**.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En lo que se refiere al compuesto **133**, el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 14) fue muy similar al de **132**. La principal diferencia entre los dos espectros consiste en que la señal correspondiente al metileno C-6 se encuentra sustituida por una señal asignable a un metino unido a una función oxigenada [δ_{C} 80.4 (C-6)]. Esta última correlaciona con la señal en $\delta_{\text{H}} \sim 5.22$ (H-6) en el espectro HMQC. Asimismo, en el espectro de RMN ^{13}C , la señal del carbonilo aparece con un desplazamiento muy similar (δ_{C} 173.6) mientras que en el espectro de RMN ^1H el desplazamiento químico del protón vinílico H-7 δ_{H} (~ 6.82) se encuentra desplazado a campos más bajos (Tabla 13). Todas estas evidencias en conjunto

con la banda en el espectro de IR en 1750 cm^{-1} permitieron inferir que esta molécula contiene una γ -lactona α,β -insaturada en lugar del ácido α,β -insaturado del compuesto **132**.

El análisis cuidadoso del espectro HMBC permitió confirmar la disposición de la lactona, en particular las correlaciones C-4/H-6, C-17/H-7, C-17/H-9 y C-8/H-6 revelaron que el anillo lactónico está formado por los carbonos C-17, C-8, C-7 y C-6 (Figura 15).



133

Figura 15. Correlaciones importantes observadas en el espectro HMBC del compuesto **133**.

De nueva cuenta el análisis por difracción de rayos X del compuesto **133** permitió confirmar inequívocamente su estructura. En la figura 16 se muestra una vista estereoscópica del dolabelano **133**.

Con la finalidad de analizar con mayor detalle la conformación y estereoquímica de los anillos de cinco y once miembros de los compuestos **132**, **133** y **136** se llevó a cabo una búsqueda conformacional sistemática mediante

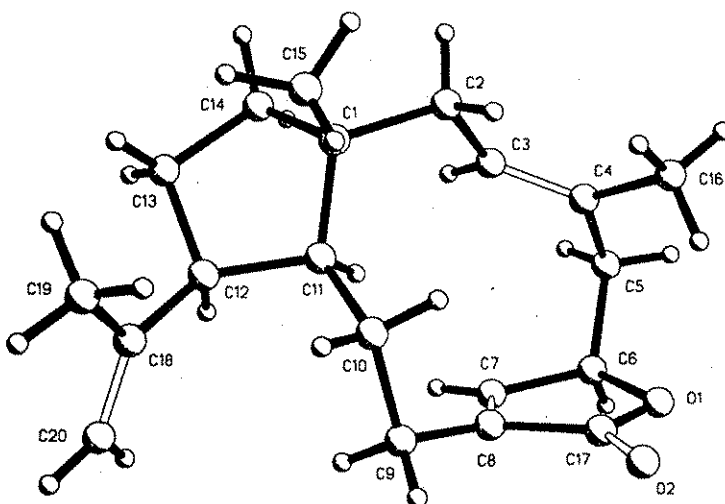


Figura 16. Vista estereoscópica del compuesto 133.

cálculos de mecánica molecular. Las estructuras de mínima energía se generaron utilizando el cálculo del campo de fuerza MMX, que es una versión derivada del MM2, desarrollado por Allinger e implementado en el programa PCModel v.6.0 (Serena Software, Bloomington, Indiana, EEUU.). Esta versión utiliza la ecuación de Altona para obtener los valores de las constantes de acoplamiento vecinales (Haasnoot *et al.*, 1980).

El análisis de las conformaciones teóricas permitidas para el anillo de once miembros del dolabelano **132** reveló que éstas se pueden agrupar en cuatro familias de acuerdo a la orientación del grupo metilo C-4 y del ácido carboxílico en C-8. Por analogía con el (-) *trans* cariofileno (Collado *et al.*, 1998) estos grupos de conformeros se designaron como $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ y $\beta\beta$. Los porcentajes conformacionales calculados para estos conformeros corresponden a 71.4 (**132-**

$\alpha\alpha$), 21.9 (**132- $\alpha\alpha$**), 5.6 (**132- $\beta\beta$**), 0.9 (**132- $\alpha\beta$**), 0.1 (**132- $\beta\alpha$**) [Tabla 14]. El estudio conformacional, en el caso de **132**, reveló que el conformero de menor energía, es decir el mínimo global, pertenece a la serie $\alpha\alpha$ (**132A**, $E_{MMX}=37.5$ kcal/mol), y su geometría es similar a la encontrada en el estado sólido. Las interacciones NOESY (Espectro 4) H-2a/H-12; H-3/H-7, H-15; H-7/H-9b, Me-15 y H-9b/H-15 apoyan su existencia. La presencia de una segunda conformación también perteneciente a la serie $\alpha\alpha$ **132B** ($E_{MMX}=38.2$ kcal/mol) se corroboró mediante las interacciones H-7/H-10b y H-10b/H-15 observadas en el espectro NOESY del producto natural. En ambas conformaciones el fragmento C(2)-C(3)-C(4)-C(5)-C(6)-C(7)-C(8) es geoméricamente idéntico y en conjunto constituyen la mayor parte de la población conformacional (Figura 17). Esta propuesta se

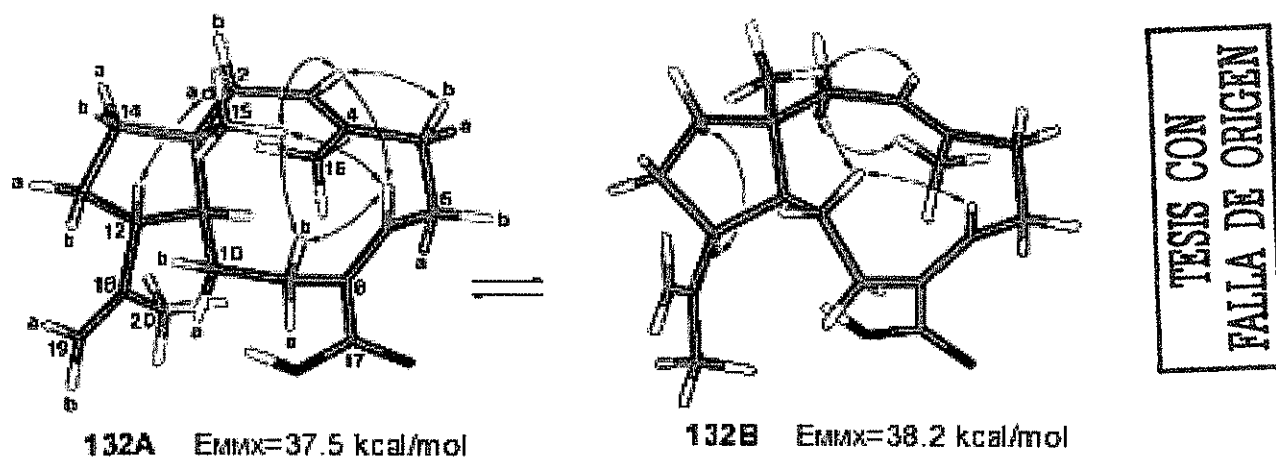
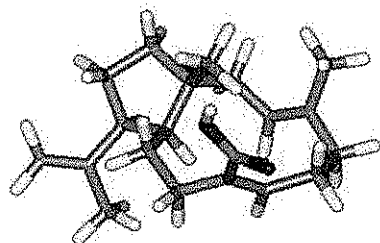


Figura 17. Estructuras de mínima energía para los conformeros **132A** y **132B**, mostrando el equilibrio conformacional y las correlaciones NOESY más importantes.

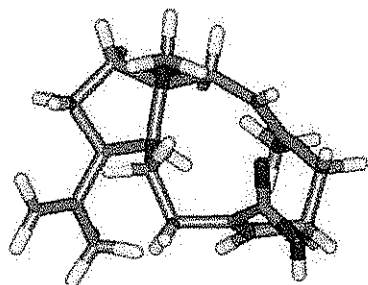
fundamenta en la observación de las constantes de acoplamiento trans-diaxiales $J_{2a,3} = 12.0$ y $J_{6a,7} = 11.8$ Hz. La exploración de los conformeros representativos de las series $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ y $\beta\beta$ (Figura 18) indicó que en el equilibrio conformacional de **132** también existe una participación, aunque en pequeña proporción, del conformero $\beta\beta$ **132C** ($E_{MMX} = 39.0$ kcal/mol). La contribución de este conformero es importante porque su presencia podría generar al epóxido minoritario **137** que se obtuvo al epoxidar el ácido **132**. Finalmente, la contribución de los conformeros representativos de las series $\alpha\beta$ (**132D**) y $\beta\alpha$ (**132E**) es mínima, ya que sus energías (E_{MMX}) calculadas fueron de 40.1 kcal/mol y 41.4 kcal/mol, respectivamente. En la Tabla 14 se presentan los porcentajes conformacionales calculados para **132** de acuerdo a la ecuación de $\Delta G = -RT \ln K$ y considerando $\Delta E \approx \Delta G$ (Pereda-Miranda *et al.*, 2001).

Tabla 14. Porcentajes conformacionales para el dolabelano **132**

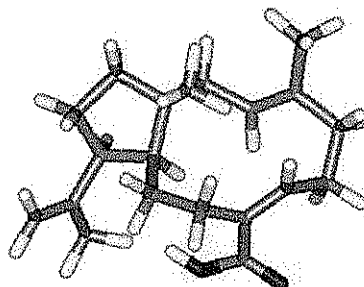
CONFORMERO	E_{MMX} (kcal/mol)	%
132A ($\alpha\alpha$)	37.5	71.42
132B ($\alpha\alpha$)	38.2	21.91
132C ($\beta\beta$)	39.0	5.68
132D ($\alpha\beta$)	40.1	0.89
132E ($\beta\alpha$)	41.4	0.10



132C ($\beta\beta$) $E_{MMX} = 39.0$ kcal/mol



132D ($\alpha\beta$) $E_{MMX} = 40.1$ kcal/mol



132E ($\beta\alpha$) $E_{MMX} = 41.4$ kcal/mol

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18. Estructuras de mínima energía para los conformeros **132C**, **132D** y **132E**.

En el caso del producto **133**, el espectro NOESY (Espectro 16) mostró las correlaciones H-3/H-5a H-5b, H-7, H-11 y H-15, las cuales, en conjunto con las constantes de acoplamiento $J_{2a,3} = J_{2b,3} = 8.0$ Hz, claramente indicaron la presencia de un equilibrio conformacional. De igual forma, los cálculos de mecánica molecular revelaron la presencia de los dos conformeros representados en la Figura 19. El conformero **133A** es muy similar a la estructura encontrada en el estado sólido (Figura 16) y es el más estable en solución con una $E_{MMX} = 47.8$ kcal/mol, mientras que el conformero **133B**, obtenido por rotación simultánea de

los enlaces C(2)-C(3) y C(4)-C(5), corresponde a la segunda conformación de mínima energía ($E_{MMX} = 48.5$ kcal/mol).

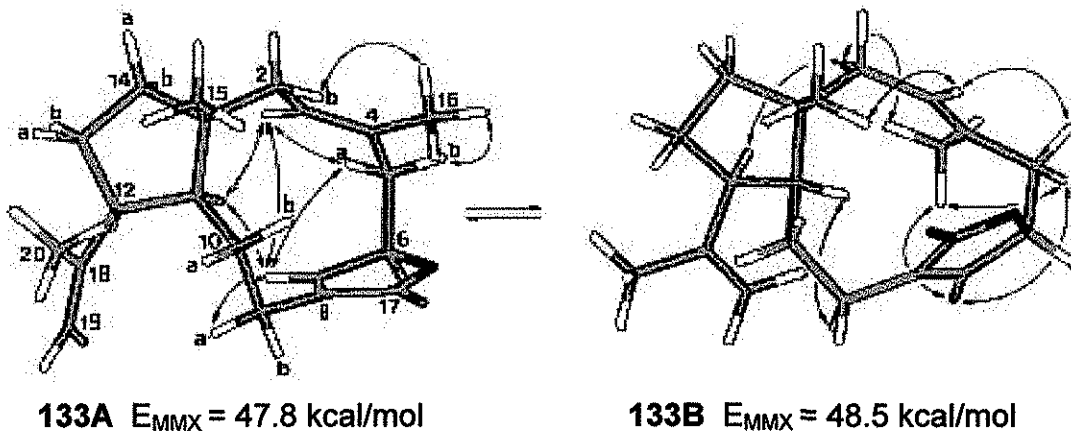
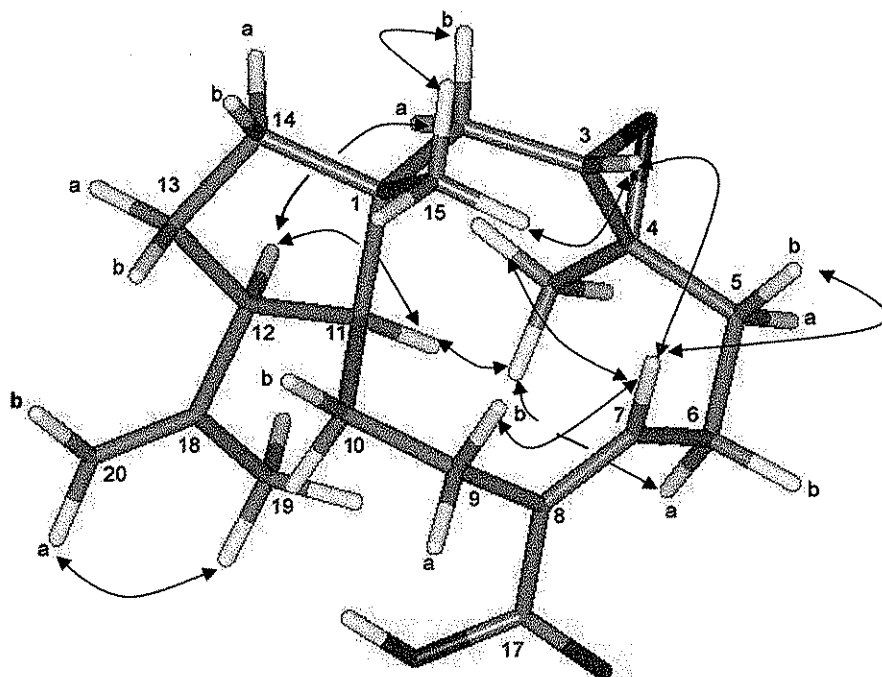


Figura 19. Estructuras de mínima energía de **133**, donde se ilustra el equilibrio conformacional y las correlaciones NOESY más relevantes.

El estudio conformacional llevado a cabo a través de los cálculos de mecánica molecular para el epóxido **136** dio como resultado la estructura de mínima energía que se muestra en la Figura 20. Este modelo, en conjunto con el análisis de las interacciones observadas en el espectro NOESY del compuesto **136** (Espectro 44), indicaron que el metilo en C-1 y el grupo carboxílico se encuentran ubicados en la misma cara de la molécula. Las correlaciones más relevantes que apoyan esta propuesta son las siguientes; H3/ H-15, H-7, H-7/H-5b, H-9b, H-16/H-11, H-6a y H-11/H-12.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

136 $E_{\text{MMX}} = 37.8 \text{ kcal/mol}$

Figura 20. Estructura de mínima energía para **136** mostrando las correlaciones NOESY más importantes.

5.3.2 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS **134** y **135**.

Los productos **134** y **135** presentaron la fórmula molecular ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$), la cual permite un índice de insaturación de seis. Los espectros en el IR presentaron bandas asociadas con la presencia de funciones carbinólica, olefínica y lactónica.

Los espectros de RMN (Tablas 13 y 14) resultaron muy similares a los de los dolabelanos **132**, **133** y **136** y confirman la presencia de los grupos funcionales evidenciados en los espectros de IR (Espectros 28, 37).

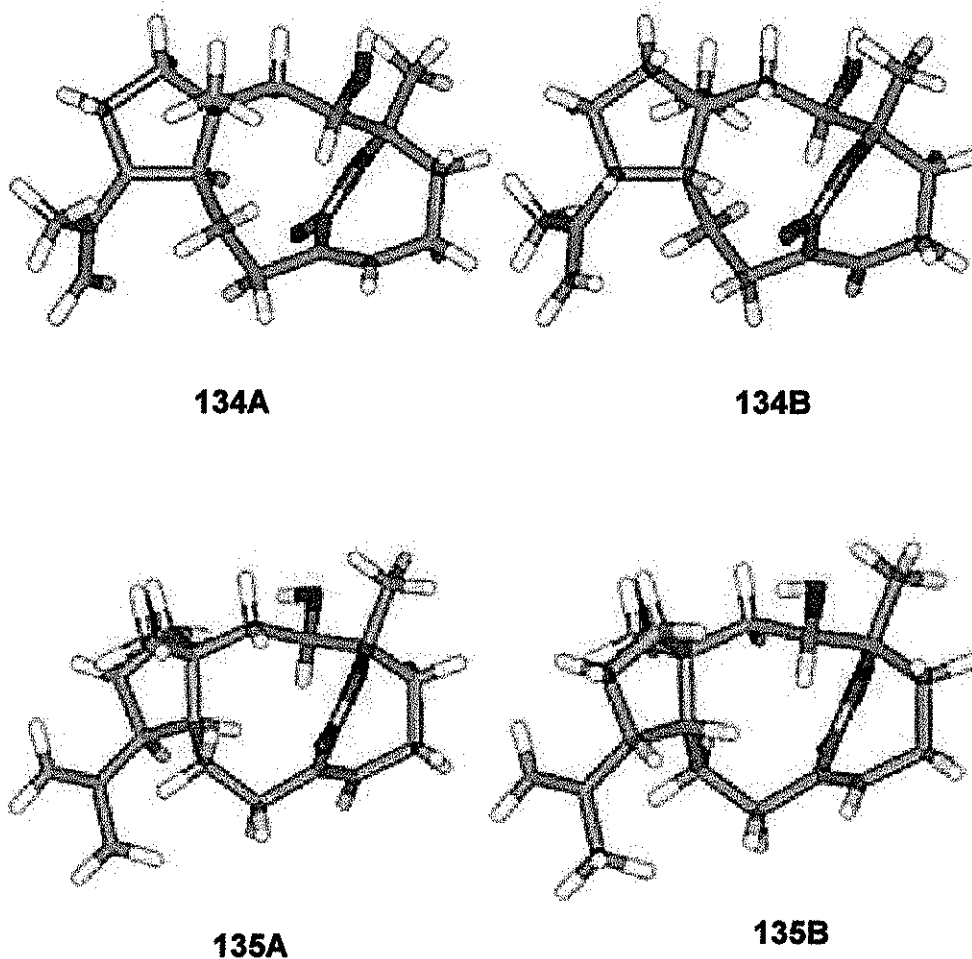
En el compuesto **132** las señales asociadas con la función carbinólica secundaria se encuentran en δ_H 4.68 (H-3) y δ_C 70.7 (C-3), mientras que las señales atribuibles a la función lactónica se encuentran en δ_C 85.0 (C-4) y δ_C 171.9 (C-17). Los espectros de RMN 1H presentaron además las absorciones diagnósticas para un grupo isopropilideno en C-12 y una doble ligadura trisustituida. La localización de los grupos funcionales fue confirmada mediante el análisis de los espectros HMBC (Espectros 36 y 45). Así las correlaciones entre C-17 /H-9a , H-9b y H-16 y C-4/H-2a, H-3, H-5b, H-6b, H-16 indicaron que la ϵ -lactona se encuentra ubicada entre C-4 y C-17. Cabe mencionar que la correlación a cuatro enlaces entre C-17 y H-16 es poco frecuente y la misma es factible debido al arreglo de tipo W presente en la entidad C(17)-O(4)-C(4)-C(16)-H(16). Por otro lado, las correlaciones C-1/ H-2a, H-2b; C-4/H-2a, H-3; C-3/H-2a, H-2b, H-5a, H-5b, H-16; y C-5/H-3, H-16 son consistentes con la disposición del hidroxilo secundario en C-3; las demás correlaciones fueron similares a las observadas en los espectros de los compuestos **132**, **133** y **135**.

La obtención del derivado monoacetilado (**134a**) al tratar a **134** con anhídrido acético y piridina, confirmó químicamente la presencia del grupo hidroxilo secundario en el producto natural. En el espectro de RMN 1H del derivado **134a** se observa el desplazamiento paramagnético del protón geminal a la función carbinólica (δ_H 6.16) y la aparición del singulete característico del metilo del grupo acetilo en δ_H 2.07. Lamentablemente no fue posible obtener un derivado similar para el compuesto **135** dado el bajo rendimiento del producto natural.

Los espectros del compuesto **135** (Espectros 32 y 33, Tablas 12 y 13) presentan una gran similitud con los correspondientes al compuesto **134**. Al igual que **134**, este compuesto presenta también un grupo hidroxilo en la posición C-3 y una ϵ -lactona α,β -insaturada ubicada entre los carbonos C-4 y C-17. Las diferencias más relevantes observadas entre los espectros de RMN de **134** y **135**, fueron las siguientes:

- i) En el espectro de RMN ^1H de **135**, la señal de H-9, se encuentra desplazada a campos más bajos.
- ii) En los espectros de RMN ^{13}C de **135** las señales de los carbonos C-2, C-7, C-10, C-11, C-12, C-14 y C-15 se encuentran desplazados hacia campos más bajos.

El conjunto de evidencias presentadas hasta este punto de la discusión permiten inferir que los compuestos **134** y **135** son diastereoisómeros que presentan como estructura la de la 3-hidroxiolabela-7,18-dien-4,17-olida, la cual permite 32 diastereoisómeros. La integración de los resultados obtenidos en los experimentos NOESY (Figura 25), cálculos de mecánica molecular y la comparación de las constantes de acoplamiento teóricas y experimentales (Tabla 15) permitieron reducir las posibilidades estructurales a cuatro diastereoisómeros (**134A**, **134B**, **135A** y **135B**), es decir, a dos enantiómeros en cada caso (Figura 21).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 21. Enantiómeros de los compuestos 134 y 135.

Cabe señalar que en el caso del producto 134 se utilizó el recurso de la simulación espectral utilizando el programa Laocoön (Bothner-by y Castellano; 1968) para determinar algunas constantes de acoplamiento. Este recurso fue particularmente útil para encontrar los valores experimentales de las constantes de acoplamiento vecinales del fragmento C-5-C-6-C-7. En la Figura 22 se muestra

comparativamente la región δ_H 2.53-1.80 del espectro determinado experimentalmente y del espectro obtenido por simulación.

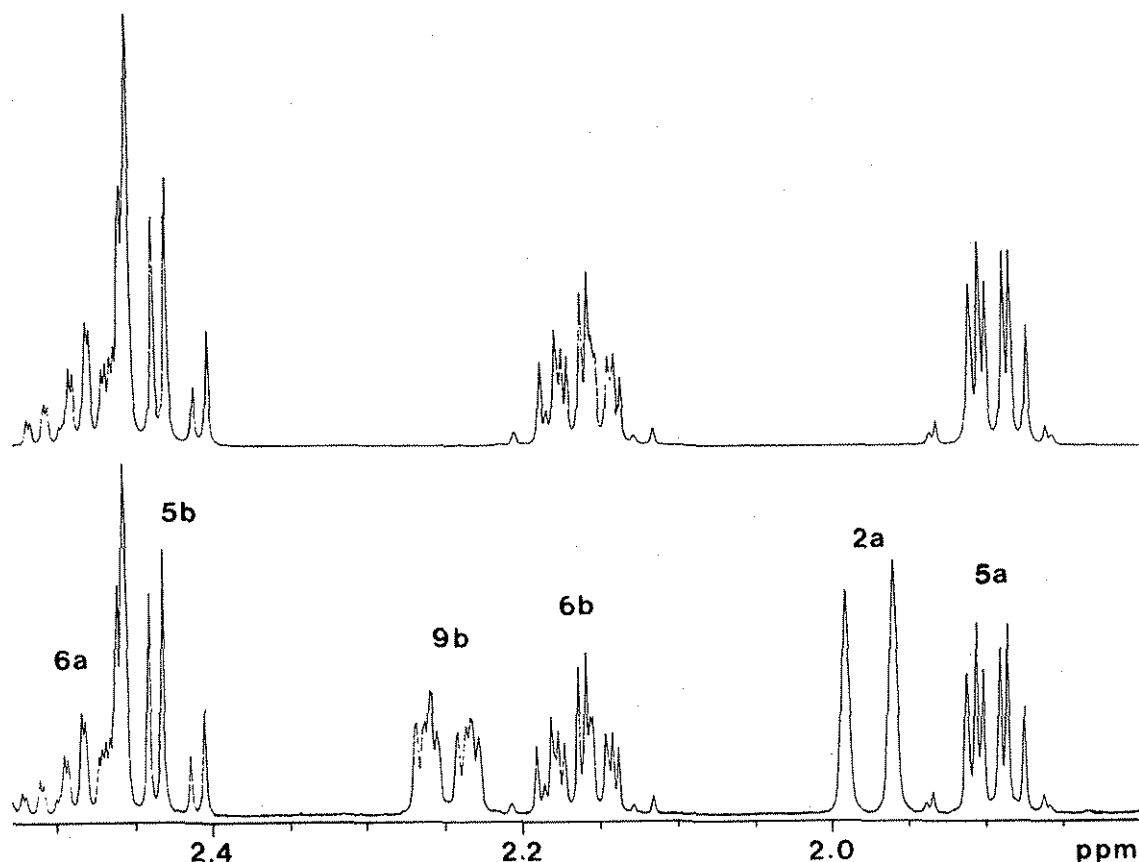
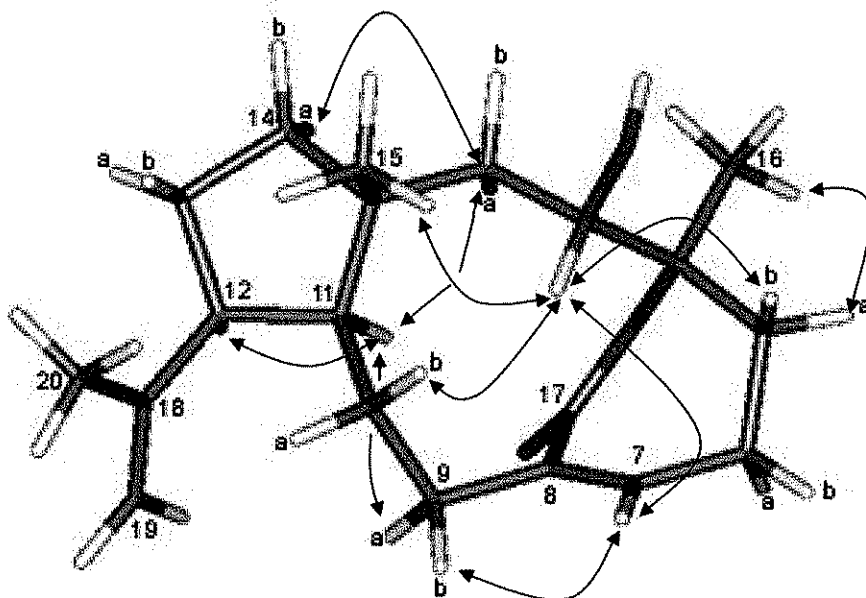
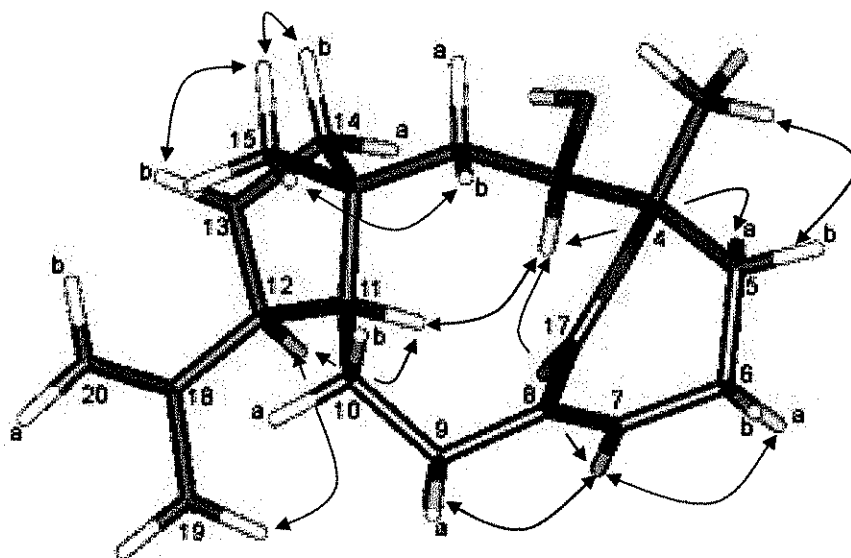


Figura 22. Región δ_H 2.53 -1.80 de los espectros RMN 1H experimental (inferior) y simulado (superior) del compuesto **134**.

La estereoquímica relativa y la conformación en solución del compuesto **134** fueron determinadas tomando en consideración las correlaciones observadas en su espectro NOESY (Espectro 25) en combinación con los cálculos de

mecánica molecular (Figura 23; $E_{MMX} = 51.9$ kcal/mol), el modelo establecido por mecánica molecular fue validado por comparación de las constantes de acoplamiento vecinales ^1H - ^1H observadas con las calculadas (Tabla 15). Como se representa en la Figura 23, las correlaciones H-3/H-5b, H-7, H-10b, H-15 y H-7/H-9b, observadas en el espectro NOESY de **134**, indican que esos átomos se encuentran ubicados en la misma cara β de la molécula, confirmando la configuración *Z* del doble enlace en C-7 y la estereoquímica relativa en C-3 y C-4. De manera adicional, las fuertes interacciones NOE H-11/H-2a, H-9a, H-12 permiten ubicar a estos núcleos en la cara α de la molécula. Esta información indica a su vez la estereoquímica *trans* entre C-15 y H-11 y la relación *cis* entre C-15 y el grupo isopropenil, tal como en los compuestos **132** y **133**. Las correlaciones recién descritas sólo son compatibles con el par de enantiómeros **134A** y **134B** (Figura 21).

Los resultados del estudio conformacional de **135** (Tabla 15, Figura 23) revelaron que este compuesto también posee una estructura rígida y que existe en una conformación preferida. Las correlaciones H-3/H-7, H-11 y H-5a, H-6a y H-9a presentes en el espectro NOESY (Espectro 35) de **135**, permiten ubicar a estos átomos en la cara α de la molécula y son congruentes con las estructuras **135A** y **135B**.

**134****135**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 23. Estructura de mínima energía para 134 y 135, mostrando las correlaciones NOESY más relevantes.

Tabla 15. Ángulos diedros selectos (ϕ_{MMX} en grados), constantes de acoplamiento calculadas (J_{calc} en Hz) y constantes de acoplamiento observadas (J_{obs} en Hz) para **134 y 135**.

H(x)-C-C-H(y)	134			135		
	ϕ_{MMX}	J_{calc}	J_{obs}	ϕ_{MMX}	J_{calc}	J_{obs}
2a,3	-107	2.8	2.5 ^a	+101	2.1	2.0 ^a
2b,3	+139	6.1	6.5	-146	7.3	8.0
5a,6a	-51	4.7	6.3 ^b	+44	6.2	6.6
5a,6b	+65	2.1	2.1 ^b	+160	12.1	11.7
5b,6a	-164	12.7	13.3 ^b	-69	1.5	2.6
5b,6b	-48	5.4	5.5 ^b	+46	5.8	7.7
6a,7	+131	6.5	5.4 ^b	-14	6.4	8.3
6b,7	+16	6.3	8.3 ^b	-128	6.1	5.3
9a,10a	+69	1.6	3.0	+65	2.2	3.6
9a,10b	+180	13.3	13.5	+179	13.3	13.5
9b,10a	-46	5.6	3.5	-51	4.7	3.8
9b,10b	+65	2.2	2.5	+63	2.5	2.8
10a,11	—	—	—	-131	5.9	5.4
10b,11	—	—	—	+114	3.0	2.8
11,12	-4	10.3	11.0	+9	10.1	11.9
12,13a	+38	6.8	8.5	+27	8.5	9.2
12,13b	+160	11.2	11.0	+147	9.2	9.2
13a,14a	-46	5.7	7.5	-43	6.4	7.9
13a,14b	—	—	—	+76	0.8	1.0 ^a
13b,14a	—	—	—	-160	12.1	12.5
13b,14b	-166	12.7	12.5	-41	6.8	6.7

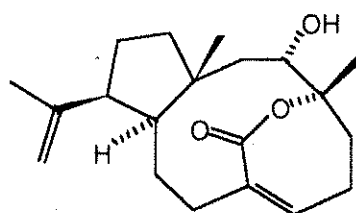
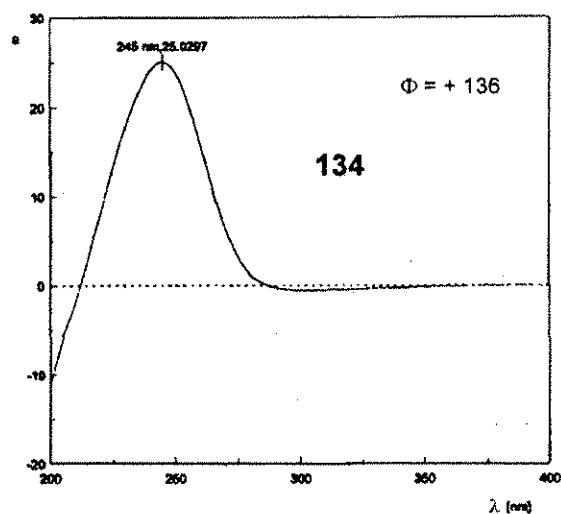
^aEstimado a partir de $W_{1/2}$.

^bDeterminado por simulación espectral.

El último paso en la elucidación estructural de los dolabelanos **134** y **135** fue la determinación de la configuración absoluta de los centros estereogénicos. Para la determinación de la configuración absoluta se aplicaron las reglas de dicroísmo circular para cetonas insaturadas propuestas por Snatzke (1968), las cuales se basan en la presencia de cromóforos inherentemente disimétricos en la molécula. Según Snatzke la fuerza rotatoria de tales cromóforos puede asumir valores aproximadamente 100 veces más grandes que los cromóforos inherentemente simétricos pero disimétricamente perturbados. Asimismo, estableció que las reglas para cetonas insaturadas pueden ser aplicables a lactonas insaturadas. Los compuestos **134** y **135** constituyen candidatos apropiados para la aplicación de la regla de Snatzke ya que poseen una estructura rígida y también un cromóforo inherentemente disimétrico, ya que la entidad C=C-C=O no es planar. Así, el espectro de dicroísmo circular (Figura 26) para **134** desplegó la banda de absorción *K* en 245 nm con un valor positivo de $\Delta\epsilon = + 2.0 \times 10^5$, mientras la banda *R* se observó en 300 nm con $\Delta\epsilon = - 4.6 \times 10^3$. Estos valores corresponden a quiralidades positivas como se muestra en la estructura de mínima energía de **134**, donde el ángulo diedro C=C-C=O es $\Phi = + 136^\circ$ (Figura 24). Del mismo modo, el espectro de dicroísmo circular del dolabelano **135** presenta una banda de absorción *K* en 236 nm con un valor negativo de $\Delta\epsilon = - 2.2 \times 10^5$, en tanto que la banda *R* se observó en 300 nm con $\Delta\epsilon = + 4.6 \times 10^3$. De acuerdo a las reglas de Snatzke, (Snatzke, 1968; Legrand y Rougier, 1977) estos valores corresponden a una quiralidad negativa, tal como se observa en la estructura de mínima energía

de **135**; en este caso el ángulo diedro de la entidad C=C-C=O es $\Phi = -138^\circ$.

Con base en los resultados discutidos con anterioridad, se puede concluir que la estereoquímica observada en el enantiómero **134A** corresponde a la estereoquímica absoluta de **134**, mientras que la estereoquímica del enantiómero **135A**, corresponde a la estereoquímica absoluta del compuesto **135**.

**134**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

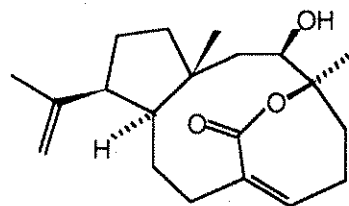
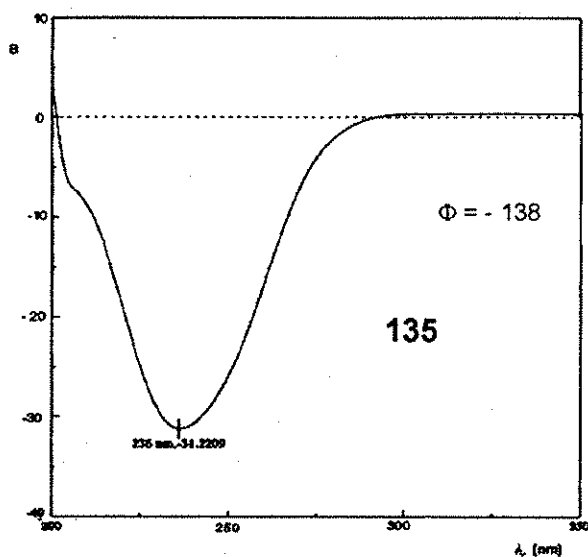
**135**

Figura 24. Espectros de dicroísmo circular para los compuestos **134** y **135** respectivamente.

Los compuestos **133-136** podrían derivar biogénicamente del ácido **132**. De esta manera la hidroxilación de **132** podría generar el ácido (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-6-hidroxidolabela-3,7,18-trien-17-oico, el cual, después de una lactonización interna conduciría al compuesto **133**. Por otro lado, los compuestos **134** y **135** pueden biosintetizarse a partir del ácido dolabelatrienoico **132- $\alpha\alpha$** y **132- $\beta\beta$** a partir de los epóxidos **136** y **137**, respectivamente. Así, el anillo de lactona en estos compuestos se puede formar por el ataque nucleofílico del carboxilato sobre el epóxido. Los cálculos de mecánica molecular generados en el proyecto permiten sustentar parcialmente esta propuesta (Figura 25 y 26).

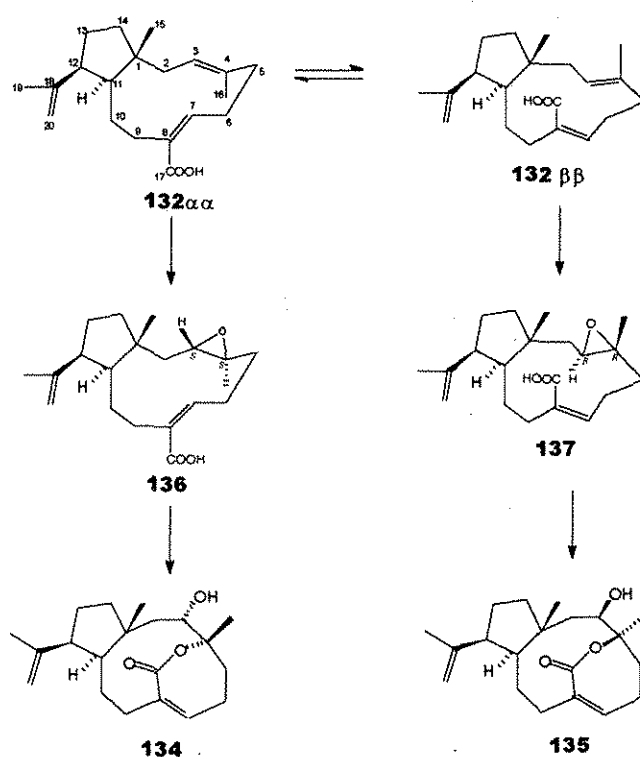


Figura 25. Ruta biosintética propuesta para los compuestos **134-137**.

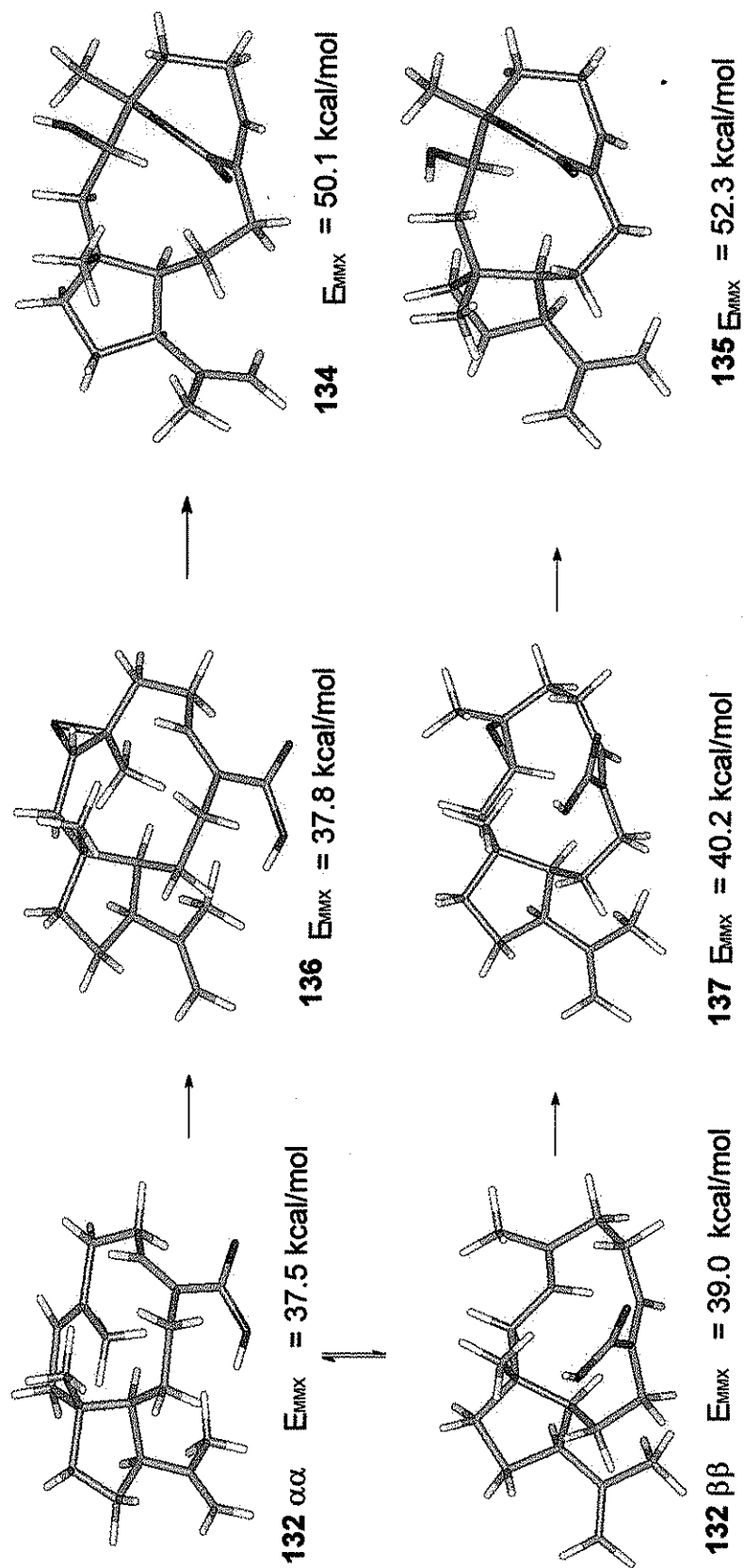


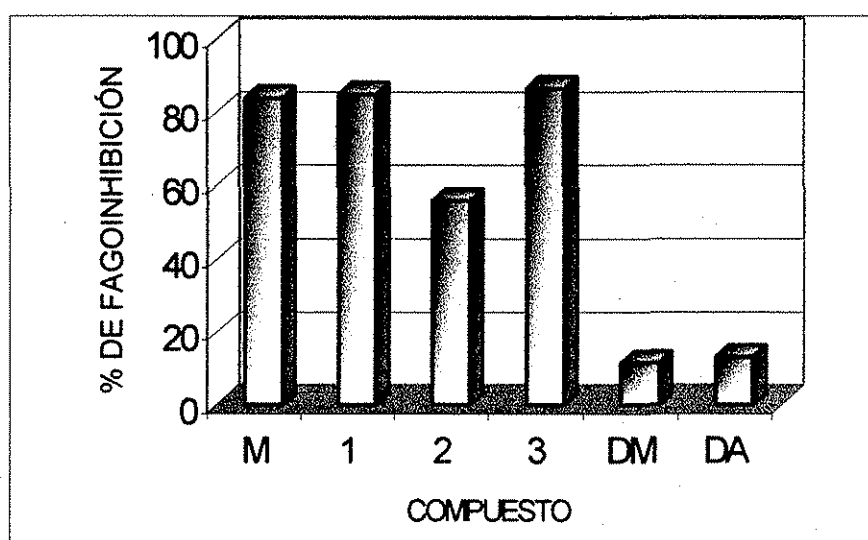
Figura 26. Cálculos de mecánica molecular para la ruta biosintética propuesta para los compuestos **134**, **135** y

136.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4 EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INSECTICIDA DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *T. trifolia* SOBRE EL GORGOJO DEL ARROZ *Sitophilus oryzae*.

Los productos naturales a una concentración de 0.5% provocaron una reducción en la ingesta de alimentos. El derivado metilado del compuesto 132 y el derivado acetilado del compuesto 134 presentaron una actividad menor que los productos naturales (Figura 27).



M: MARGOSAN 4.8 % (control positivo)

1: Compuesto 132

2: Compuesto 133

3: Compuesto 134

DM: DERIVADO METILADO DEL COMPUESTO 132

DA: DERIVADO ACETILADO DE COMPUESTO 134

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 27. Porcentaje de fagoINHIBICIÓN presentado por los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de la madera de *T. trifolia*.

Tabla 16. Porcentaje de fagoINHIBICIÓN presentado por los metabolitos secundarios obtenidos del extracto de la madera de *T. trifolia*.

COMPUESTO	FAGOINHIBICIÓN (DE) %
Margosan (4.8 %)	83.94 (0.84)
<i>Trichilia trifolia</i> (madera)	78.71 (0.37)
Compuesto 132	84.62 (0.28)
Compuesto 133	55.84 (1.42)
Compuesto 134	86.46 (0.53)
Derivado metilado del compuesto 132	11.52 (0.31)
Derivado acetilado del compuesto 133	13.11 (0.56)

DE = Desviación estándar.

Se utilizó Margosan como control positivo, el cual contiene 0.25 % de azadiractina como principio activo.

Es importante señalar que el insecto de prueba es una plaga que ha mostrado poca sensibilidad a una gran variedad de compuestos por lo que se considera que la actividad fagoINHIBIDORA presentada por los compuestos puros obtenidos en la presente investigación es relevante.

Por otro lado, a partir del resultado obtenido para el derivado metilado del compuesto **132**, es posible inferir que al esterificar la función carboxílica disminuye en gran medida la actividad por lo que se puede afirmar que el grupo funcional carboxilo se requiere para que el compuesto presente la actividad fagoINHIBIDORA. Asimismo, la disminución en la actividad del derivado acetilado del compuesto **134** indica que la función hidroxilo presente en el producto natural es importante para la bioactividad.

VI. CONCLUSIONES

1. Si bien es cierto que la selección de las materias primas idóneas para la obtención de principios activos mediante la realización de ensayos biológicos garantiza la obtención de compuestos bioactivos, la aplicación del criterio quimiotaxonómico no siempre conlleva a la obtención de los resultados esperados. Así, en el presente trabajo, el fraccionamiento biodirigido del extracto activo de *T. trifolia* condujo a la obtención de varios dolabelanos novedosos con propiedades insecticidas. Sin embargo, no fue posible demostrar la hipótesis quimiotaxonómica ya que no se obtuvieron compuestos de naturaleza limonoide.
2. El estudio químico biodirigido del extracto activo de la madera de la especie *T. trifolia* permitió el aislamiento de cinco compuestos de tipo dolabelano; el ácido (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabela-3,7,18-trien-7-oico (132), (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxi-dolabela-7,18-dien-6,17-olida (133), (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxi-dolabela-7,18-dien-4,17-olida (134), (1*R*,3*R*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hidroxi-dolabela-7,18-dien-4,17-olida (135) y el ácido (1*R*,3*S*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3,4-epoxi-dolabela-7,18-dien-17-oico (136). Todos los compuestos mencionados representan productos naturales novedosos. Asimismo también se aislaron productos ya descritos, los cuales se identificaron como vainillina, ácido vainillínico, β-sitosterol, ácido oleanólico y ácido ursólico.

3. Desde el punto de vista quimiotaxonómico, los resultados de la presente investigación no tienen precedentes, debido a que éste es el primer reporte acerca de la presencia de diterpenoides de tipo dolabelano en un miembro de la familia Meliaceae y el segundo en plantas superiores.
4. Es relevante mencionar que ésta es la primera descripción de la configuración absoluta de dolabelanos de plantas superiores. Los resultados del presente trabajo revelaron que los dolabelanos obtenidos de plantas superiores, hepáticas (Matsuo *et al.*, 1988) y algas (Tringali *et al.*, 1984) poseen la misma configuración absoluta, mientras que los dolabelanos provenientes de celenterados (Look y Fenical, 1982) presentan una configuración absoluta opuesta.
5. Los compuestos **132-136** son los primeros dolabelanos reportados que presentan el grupo isopropenilo con una orientación β .
6. Los resultados obtenidos en los bioensayos indican que los compuestos **132-134** presentan una importante actividad fago-inhibidora sobre el insecto de prueba (*Sitophilus oryzae*) lo cual sugiere que tales compuestos pueden desempeñar un papel de defensa en la planta objeto de estudio.

VII. PERSPECTIVAS GENERALES

1. Determinar el potencial insecticida de los compuestos **135** y **136** obtenidos de *T. trifolia* y ampliar el número de especies de insectos de prueba para los compuestos ya evaluados.
2. Aislar el epóxido minoritario **137** a partir de la mezcla de reacción.
3. Llevar a cabo la transformación biomimética del epóxido **136** a la lactona **134**.
4. Reinvestigar la especie *T. trifolia* con la finalidad de aislar los componentes minoritarios que pudieran validar la hipótesis biogenética propuesta. De esta manera, también sería factible aislar otros dolabelanos con propiedades insecticidas además de aislar una mayor cantidad del ácido **132**. Este ácido se requiere para llevar a cabo la reacción de epoxidación y aislar los productos **136** y **137**, los cuales constituyen intermediarios importantes para la transformación biomimética del ácido **132** en las lactonas **134** y **135**.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Amico, V., Oriente, G., Piattelli, Tringali, C. (1980) Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma*. *Tetrahedron* **36**, 1409-1414.

Arenas, C., Rodriguez-Hahn, L. (1990) Limonoids from *Trichilia havanensis*. *Phytochemistry* **29**, 2953-2956.

Arnó, M., Marín, M.L., Zaragoza, J.R. (1998) ^1H and ^{13}C assignments and conformational analysis of some tetracyclic compounds with a bicyclo[4.2.0] octane ring system. *Magnetic resonance in Chemistry* **36**, 579-586.

Aronson, K., Biller, A., Woolcott, C., Sterns, E., McCready, D., Lickley, L., Fish, E., Hiraki, G., Holloway, C., Ross, T., Hanna, W., SenGupta, S., and Weber, J. (2000). Breast adipose tissue concentrations of polychlorinated biphenyls and other organochlorines and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**, 55-63.

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

Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Towers, G.G.N. (1992). Phototoxins in plant-insect interaction. En: *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. Rosenthal, G.A. y Berenbaum, M.R. 2a. edición. Vol 2. Ecological and Evolutionary Processes. Editores Academic Press, Nueva York, pp 107-131.

Arnason, J.T., S. MacKinnon, A. D (1993) insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. En: *Phytochemical potential of tropical plants*. K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford eds. Plenum Press, Nueva York. Recent advances in *Phytochemistry* **27**, 107-131.

Assabgui, Lorenzetti, R., Terradot, F., Regnault-Roger, L.C., Malo, N., Wiriyaichitra, P., Sanchez-Vindas, P.E., San Román, Murray, L., Isman, B., Durst, T. y Arnason, J.T. (1997) Efficacy of Botanicals from the Meliaceae and Piperaceae. En: *Phytochemicals for Pest Control*. Paul A. Hedin (Eds.) American Chemical Society, Washington, D.C., pp 38-48.

Ayensu, E.S. (1978). *Medical plants of West Africa*. Reference Publications, Inc., Algonac, Michigan.

Baldwin, Mootoo, Játiva, M.A., Tinto, C., Reynolds, W. F. y McLean, S. (1972). Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana*: structure, elucidation by 2-D NMR spectroscopy. *Can. J. Chem.* **70**, 1260-1263.

Baker, J.E. 1995. Stability of malathion resistance in two hymenopterous parasitoids. *J. Econ. Entomol.* **88**, 232-236.

Banerji, B., Nigam, S.K. (1984). Wood constituents of Meliaceae. A Review. *Fitoterapia*, LV, 3-36.

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

Bheemasankara Rao, C., Pullaiah, K.C., Surapaneni, R.K. (1986) The Diterpenes of *Dictyota dichotoma* from the Indian Ocean. *J. Org. Chem.* **51**, 2736-2742.

Benson, J.A. (1992) In *Neurotox '91*, Molecular basis of drug and pesticide action, ed I.R. Duce, Elsevier, Londres, pp 57-70.

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.

- Bothner-by**, Castellano, A. A. (1968) *Computer Programs for Chemistry*. W. A. Benjamin, Inc., Nueva York.
- Burket**, U., Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*. Am. Chem. Soc., Washington, D. C., 1982.
- Brushan**, M.N., Kasturi, T.R. (1985) Applications of UV spectroscopy-plant growth substances En: Handbook of natural pesticides: Methods. Volume II. pp 191-218.
- Brushan**, M.N. (1985) Infrared spectroscopy En: Handbook of natural pesticides: Methods. Volume II. pp 219-279.
- Cáceres**., J.Rivera, M.E., Rodríguez, A.D. (1990) Palominol, A New Diterpene Based on the Dolabellane Skeleton from The Caribbean Gorgonian Octocorals *Eunicea caliculata* and *Eunicea laciniata*. *Tetrahedron*, 46, 341-348. **Mohamed K. M.**, Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K. (1994) Dolabellane Diterpene Glucosides from *Chrozofora oblicua*. *Phytochemistry* **37**, 495-500.
- Connolly**, Overton, J.D., K., Polonsky, J. (1970). En: Progress in phytochemistry (R. Reinhold y Liwschitz, eds) Vol II . Wiley (Interscience), Nueva York.
- Cox**, P.A., Balick, M.J. (1994). The Ethnobotanical Approach to Drug. *Discovery Scientific American*, 82-88.
- Cremlyn**, R. (1978) Pesticides preparation and mode of action. John Wiley and Sons. Great Britain pp 1-11, 39-105.
- Crombie**, L., (1955) *J. Chem. Soc.* 999-1006.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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

Chan, W., Taylor D.R. (1966) Hirtin and deacetylhirtin: new limonoids from *Trichilia hirta*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 206.

Chan, W. R., Gibbs, J.A. y Taylor, D.R.. (1973) J. Triterpenoids from *Trichilia havanensis*, Y. Acetates of havanansin and trichilenona, new tetracarbocyclic tetranortriterpenoids. *Chem. Soc., Perkin. trans.* **10**, 1047-50.

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, pp. 49-118.

Collado, I. G., Hanson J.R., Macías- Sanchez, A.J. (1998) Recent Advances in the Chemistry of Caryophyllene. *Natural Products Reports*, 187-203.

Dalziel, J.M. (1948) *Three useful plants of West Tropical Africa*. The Crown Agents for Colonies, Londres.

Das, S.K. (1975) *Medicinal, economic, and useful plants of India*. Prachi Gobeson, Calcutta.

Das, M.C., Mahato, S.B. (1983). Triterpenoids: Review. *Phytochemistry*. **22**, 1071-1095.

De Rosa, S., De Stefano, S., Macura, S., Trivellone, E., Zavodnik, N. (1984) *Tetrahedron* **40**, 4991-4995.

Diógenes, A. G., Cortez Paula, Vieira, C., Fernández, Joao B. (1992) Limonoids from *Trichilia hirta*. *Phytochemistry* **31**, 625-628.

Duke, J.A., Wayne, K.K. (1981) Medicinal plants of the world. Vol. 3. Computer Index.

Duke, S.O. (1991) Plants terpenoids as pesticides. En: Handbook of natural toxins, Vol. 6. Keeler, R.F. and Tu, A.T. Editores Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pp. 269-291.

Durán, R., Zubia, E., Ortega, M.J., Salvá J. (1997) *Tetrahedron* **53**, 8675.

Elieil, L.E., Wilen H.S. (1994) Stereochemistry of Organic Compounds. John Wiley & Sons Inc., New York, USA, pp. 113-147, 991-1023.

Fang, X. Rieser, M.J., Gu, Z., Zhao, G., McLaughlin. (1993). Annonaceae Acetogenins: Update Review. *Phytochemical Analysis* **4**, 27-48.

Farnsworth, N.R., Wagner, H. (1990). Economic and Medicinal Plant Research. **4**, 6 pp.

Furniss, B.S., A. Hannaford, P.W.G. Snith, A. Tatchell (1989). Vogel's textbook of practical organic chemistry, 5a. Ed. Longman Scientific & Technical G.B.

Garcez, F.R., Garcez, W.S., Roque, N.F., Castellano E.E., Zukerman-Schpector, J. (2000). 7 β -Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *Elegans*. *Phytochemistry*. **22**, 733-740.

Gilbert, B., Da Rosa, M., Borojevic, R. Pellegrino, J. (1972). *Schistosoma mansoni* in vitro transformation of cercariae into schistosomula. *Parasitology* **64**, 333-339.

Govindachari, T.R.; Narasimhan, N.S.; Suresh, G. Partho, P.D. and Gapalakrishnan, G. (1996). Insect antifeedant and Growth-Regulating Activities of Salanin and Other C-secolimonoids from Neem Oil in Relation to Azadirachtin. *J. Chem. Ecol.* **22**, 1453-1461.

Gullo, V.P., Miura, Y., Nakanishi, K. (1975) Structure of prieurianin, a complex tetranortriterpenoid. Nuclear magnetic resonance analysis at nonambient temperatures and x-ray structure determination. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **9**, 345-6.

Harborne, J.B. (1988) Introduction to Ecological Biochemistry. 3a. ed. Academic Press, Londres, 356 pp.

Haasnoot, C.A.G., De Leeuw, F.A.M., Altona, C. (1980) The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron.* **36**, 2783-2792.

Ireland, C., Faulkner, D.J., Finer, J., Clardy, J. (1976) A novel Diterpene from *Dollabella californica*. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 4664.

Ireland, C., Faulkner, D.J. (1977) Diterpenes from *Dolabella californica*. *J. Org. Chem.* **42**, 3157-3162.

Isman, M.B., Matsura, H., MacKinnon, S., Durst, T., Neil, G.H., Arnason, J.T. (1996) Phytochemistry of the Meliaceae. En: Phytochemical Diversity and Redundance in Ecological Interctions, Vol 30. Romeo, J.T. Saunders, J.A., Barbosa, P., editores, Plenum Press, Nueva York y Londres, pp 155-178.

Isman, M.B., Gunning P.J., Spollen, K.M. (1997) Tropical Timber Species as Sources of Botanical Insecticides. En: *Phytochemicals for Pest Control*. Editor, Paul A. Hedin. American Chemical Society, Washington, D.C., pp 27-37.

Jacobson, M.,(1970). En *Naturally occurring pesticides*, ed. M. Jacobson and D.G. Crosby. Marcel Dekker Inc., Nueva York pp 153-6.

Jacobson, M.,(1971). En *Naturally occurring insecticides*, ed. M. Jacobson and D.G. Crosby. Marcel Dekker Inc., Nueva York pp 139-176.

Jacobson, M. (1988) In *Focus on phytochemical pesticides*. Vol. 1 : The neem Tree (Jacobson, M. ed), P. 133 CRC Press, Boca Ratón.

Jain, D.C., Tripathi, A.K. (1993). Potential of natural products as insect antifeedants. *Phytoteraphy Research* **7**, 327-334.

Jiménez, A., Pereda-Miranda, R., R. Bye, Linares, E., Mata, R. (1993) Ratibinolide III, a sesquiterpene lactone glycoside from *Ratibida latipalearis*. *Phytochemistry* **34**, 1079-1082.

Jiménez, A., Mata, R., Pereda, R., Caldeón, J., Isman, M.B., Nicol, R., Arnason J.T. (1997). Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis* (Meliaceae). *J. Chem. Ecol.* **23**,1225-1234.

Juaristi, E. (1998) *Fisicoquímica Orgánica*. CINVESTAV., México, pp. 236-246

Kadota, S., Marpang, L., Kikuchi, T., Ekimoto, H. (1989) Antagonists of Platelet Activating Factor from *Swietenia mahogani* Jacq. *Tetrahedron letters* **30**, 1111-1114.

Kadota, S., Marpang, L., Kikuchi, T., Ekimoto, H. (1990 a) Constituents of the seeds of *Swietenia mahogani* Jacq. I. Isolation, Structures, and ^1H and ^{13}C -Nuclear

Magnetic Resonance Signal Assignments of New Tetranortriterpenoids Related to Swietenine and Swietenolide. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 639-651.

Kadota, S., Marpang, L., Kikuchi, T., Ekimoto, H. (1990 b) Constituents of the seeds of *Swietenia mahogani* Jacq. II. Structures of Swietemahonin A, B,C,D,E,F, and G and Swietemahonolide. *Chem. Pharm. Bul.* **38**, 894-901.

Khalid, S.A., Duddeck, H., González Sierra, M. (1989). Isolation and Characterization of Antimalarial Agent of The Neem Tree *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.* **52**, 922-927.

Khan, M.W. , Alam, M.M., Khan, A.M., Saxena S. (1974). *Act. Bot. Ind.* **2**, 120.

Kingston, David G.I, Madhusudana R. (1985). Chromatographic methods for isolation and identification of naturally occurring pesticides. En: Handbook of natural pesticides: Methods. Volume II. pp 83-102.

Klocke, J.A. (1989) Plant compounds as source and models of insect- control agents. En: Economic and medicinal plant research (H. Wagner, H. Hikino, N.R. Farnsworth eds. Academic Press, Londres, vol 3, pp. 103-114.

König, G.M., Wright A.D., Sticher, O. (1991) *Phytochemistry.* **30**, 3679-3682.

König, G.M., Wright A.D. (1994) New Dolabellanes from the Marine Alga *Dictyota pardalis* f. *Pseudomata*. *Tetrahedron.* **50**, 8011-8018.

Kubo I., Klocke; I. (1982) An insect growth inhibitor from *Trichilia roka* (Meliaceae) *Experientia*, **38**, 639-40.

Kubo, I. (1991) Screening techniques for plant-insect interactions. En : Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity. K. Hostettmann ed. Academic Press, Londres, vol. 6. pp. 179-193.

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, Nueva York. Recent advances in *Phytochemistry* **27**, 133-151.

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

Ley, S.V. (1990)., Recent advances in the chemistry of insect control II, ed. L. Crombie, Royal Society of Chemistry, pp 90-8.

Look, S. A., Fenical, W.J. (1982) Diterpenoids from the Caribbean Gorgonian Octocoral *Eunicea calyculata* . *J. Org. Chem.*, 4129-4134.

Lu, Q., Faulkner, D.J. (1998) *J. Nat. Prod.* **61**, 1096.

MacKinnon, T.D., Arnason J.T. (1997) Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and geunin derivates. *J. Nat. Prod.* **60**, 336-341.

Macleod, J.K., Moeller, P., Molinski, T.F., Koul, O. (1990). Antifeedant activity against *Spodoptera litura* larvae and (¹³C) NMR spectral assignments of the meliatoxin. *J. Chem. Ecol.* **16**, 2511-2518.

McRae, T., Smith, C.A.S., Gregorich, L.J. (2000) Environmental Sustainability of Canadian Agriculture: Agri-Environmental Indicator Project. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ont.

Mandava, N.B., (1985) Handbook of natural pesticides: Methods. Volume I C.R.C. Press. E.U.A. pp 3-5.

Mata, R. (1993) Chemical studies and biological aspects of some mexican plants used in traditional medicine: En: Phytochemical potential of tropical plants. K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford eds. Plenum Press, Nueva york. Recent advances in *Phytochemistry* **27**,41-64.

Matsui, M., Yamamoto, I. (1971) In Naturally occurring pesticides, ed. M. Jacobson and D.G. Crosby. Marcel Dekker Inc., Nueva York pp 153-156.

Matsuo, A., Yoshida, K., Uohama, K., Hayashi, S., Connolly J.D. (1984) (+)acetoxodontochismenol, a new dolabellane diterpenoid from the liverwort *Odontoschisma denudatum*. *Chem. Lett.*, 599-602.

Matsuo, A., Yoshida, K., Uohama, K., Hayashi, S., Connolly J.D. (1985) X-Ray Crystal Structures and conformations of 6 β ,12 β -dihidroxi-3E,7E-dolabelladiene 6-*p*-bromobenzoato and acetoxodontochismenol 3s,4s-epóxide. *Chem. Lett.*, 935-938.

Mikolajczak, K.L., Reed, D.K. (1987) Extractives of seeds of the Meliaceae effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.) and *Artemia salina* Leach. *J.Chem. Ecol.* **13**, 99-111.

Mohamed K. M., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K. (1994) Dolabellane Diterpene Glucosides from *Chrozofora oblicua*. *Phytochemistry* **37**, 495-500.

Mohamed K. M., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K. (1995) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Dolabellane Diterpenes from *Chrozofora oblicua*. *Phytochemistry* **39**, 151-161.

Morgan, E.D., Wilson, I.D. (1985). Methods and Techniques for Isolation of Pesticides. En: Handbook of Natural Pesticides: Methods. Isolation and identification. N.B. Mandaba (Eds) CRC Press. II. pp 3-81.

Nakanishi, K. (1980) Isolation and structures of two insects antifeedants: applications of droplet counter-current chromatography 2- D-¹H NMR and a new circular dichroic correlation. *Chem. Nat. Prod. Proc. Sino-Am. Symp.* (Pub. 1982) 9-18.

Miyakado, M., Nakayama, I., Yoshioka, H. Nakatani (1979) N., *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1609-11.

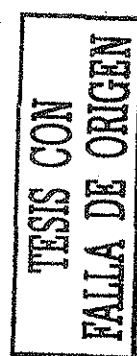
Morton, J.F. (1981) Atlas of medicinal plants of middle America-Bahamas to Yucatán. C.C. Thomas, Springfield, Illinois.

Mullholland, D.A., Taylor T. (1980). Limonoids from the seed of the natal mahogany, *Trichilia dregeana*. *Phytochemistry* **19** (11), 2421-5.

Mullholland, D.A., Parel, B., Coombes, P.H. (2000) The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of southern and eastern Africa and Madagascar. *Curr. Org. Chem.*, 41011-1054.

Nakanishi, K., Cooper, R., Nakatani, M. (1981) Isolation and structures of two insects antifeedants: applications of droplet counter-current chromatography 2- D-¹H NMR and a new circular dichroic correlation. *Pr. Nauk. Inst. Chem. Org. Fiz. Politech. Wroclaw.* **22**, 1091-102.

Nakatani, M., James J.C., Nakanishi K. (1981) Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the Southern army worm. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1228-30.



Nakatani, M., Okamoto M., Iwashita T. (1984) Isolation and Structures of three seco-limonoids, insects antifeedants *Trichilia roka* (Meliaceae). *Heterocycles*, **10** 2335-40.

Nakatani, M., Okamoto M., Iwashita T., Naoki H. (1985) Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. *Phytochemistry*, **24**, 195-6.

Nakatani, M., Huang, R.C., Okamura, H., Naoki, H., Iwagawa, T. (1994). Limonoids antifeedant from Chinese *Melia azedarach*. *Phytochemistry*, **36**, 39-41.

Novelo, M., J.G. Cruz, L. Hernández, R. Pereda-Miranda (1993) Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1728-1736.

Oliver-Beveer, B. (1986). Medicinal plants in Tropical West Africa. Caombridge Iniversity Press, Cambridge.

Pavia, D.L., Lapman, Kriss, G.M., G.S., Engel, R. (1995) Organic laboratory techniques a microscale approach. Ed. Saunder Co, Philadelphia, pp. 345.

Pennington, T.D., (1981) Meliaceae. Flora Neotropica Monograph. No. 28. The New York Botanical Garden. Bronx, Nueva York. Pag. 26-233.

Pereda-Miranda, R., Hernández, L., Villavicencio, M.J., Novelo, M., Ibarra, P. (1993) Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro(-pyrones) from *Hyptis pectinata*. *J. Nat. Prod.* **56**, 583-593.

Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A., Wickramaratne, B.M., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D. (1993) Tricolorin A, major phytogrowth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used mexican plants. En: *Phytochemistry of medicinal plants*, J.T. Romeo, J.T. Arnason, R. Mata eds. Plenum Press, Nueva York. *Recent advances in Phytochemistry* **29**, 53-89.

Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Cerda-García-Rojas, C.M. (2001) Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6-dihydro- α -pyrona from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **57**, 47-53.

Perkins, J.H. (1985). Naturally occurring pesticides and the pesticide crisis 1945 to 1980. En: *Handbook of Natural Pesticides: Methods. Theory, Practice and Detection*. N.B. Mandaba (Eds.) CRC Press, I, pp 297-325

Perusquia, M., Hernández, R. Jiménez, M.A., Pereda, R., Mata, R. (1997). Contractile response induce by a limonoid (Humilinolide A) on spontaneous activity of isolated smooth muscle. *Phytoterapy Research II*, en prensa.

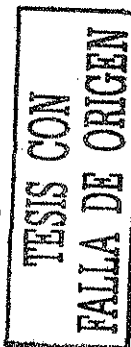
Perry, L.M. (1980) *Medicinal plants of East and Southeast Asia*, MIT Press, Cambridge, M.A.

Pettit, G.R., Barton, D.H.R., Herald, C.L., Polonsky, J., Schmidt, J.M. y Conolly, J.D. (1983) *J. Nat. Prod.* **46**, 379.

Piattelli, M., Tringali, C., Neri, P., Rocco, C. (1995) *J. Nat. Prod.* **58**, 697-704.

Pillmoor, J.B., K. Wright, A.S. Terry (1993) Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pesticide Science* **39**, 131-140.

Polonsky, J., Varon, Z., Arnoux, B., Pascard, C., Pettit, G.R. y Schmidt, M.J. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 7731.



Polonsky, J., Marazano Ch., Arnoux, B., Pettit, G.R., Schmidt, M.J., Ochi, M., and Kotsuki, H. (1979) *Experientia* **35, 987.**

Prance, G.T. (1994) Ethnobotany and the search for new drugs. Ciba Foundation Symposium 185. (Eds) John Wiley and Sons. New York.

Ramírez, M.C., Toscano, R.A., Arnason, J.T., Omar, S., Cerda-García-Rojas, C., Mata, R. (2000) Structure, Conformation., and Absolute Configuration of New Antifeedant Dolabellanes from *Trichilia trifolia*. *Tetrahedron* **56, 5085-5091.**

Rani, M., Suhag, P., Kumar, R., Singh, R., Kalidhari, S.B. (1999) Chemical components and biological efficacy of *Melia azerach* stems. *Aromat. Plant. Sci.* **21, 1043-1047.**

Rembold, H. (1989) The azadirachtins-their potencial for insect control. En : Economic and medicinal plant research. H. Wagner, H. Hikino, N.R. Farnsworth eds. Academic Press, Londres , vol 3, pp. 57-72.

Rembold, H., Puhlman, I. (1993) Phytochemistry and biological activity of metabolites from tropical Meliaceae. En: Phytochemical Potential of Tropical Plants. K.R. Downnum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (Eds.) Plenum Press. New York. 27, pp 153-165.

Rodríguez, A.D., González E., González, C.(1995) *J. Nat. Prod.* **58, 226-232**

Rojanapo, W., Suwanno, S., Somarjee, R., Glinskwi, F., Thebtaranoni, T. (1985) *J. Sci. Soc. Thailand.* **II, 18.**

Rojas, A., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Mata, R. (1992) Scening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from mexican medicinal plants. *J. of Ethnopharmacology* , **35.**

Rouse, J.D., Bishop, C.A., Struger J. (1999) Nitrogen Pollution: An Assessment of the Impact on Amphibians. *Env. Health Perspectives* **197**,1–6.

Ruth, M.J. (1985) Mass Spectrometry En: Handbook of natural pesticides: methods. Volume II. pp 323-438.

Shriner, R.L., Fuson, R.C., Curtin, D.Y. (1980). Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. Ed. Limusa.

Segura-Correa, R., Anaya, A.L., Mata, R., Hernández, B., Soriano, M., R. Villena, Bye, R., Linares, L. (1993) New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1567-1575.

Schmutterer, H. (1987) Insect growth-disrupting and fecundity-reducing ingredients from the neem and chinaberry trees. En: Handbook of Natural Pesticides. Insect Growth Regulators. E.D. Morgan y N.B. Mandava (Eds.) CRC Press, IIIB, pp 119-170.

Schmutterer, H. (1995) The Neem Tree. *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceus Plants. Sources of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes. V.C.H. Weinheim. Cap.1 and 8,pp.

Sharon, M.S. Mc Ewen, F.L., Harris, C.R. (1981). Movement and Insecticides in the Environment and biodegradability. En: Handbook of Pest Management in Agriculture. D. Pimentel (Eds) III, pp 143-166.

Snatzke, G. (1968) Circular dichroism and optical rotatory dispersion-Principles and application to the investigation of the stereochemistry of natural products. *Angewandte Chemie International Edition* 7. pp.

Sun, H.H., Fenical, W. (1979) Diterpenoids of the Brown seaweed *Glossophora galapagensis*. *Phytochemistry*, Vol 18, pp. 340-341.

Taylor, D.A. (1983) Biogenesis, Distribution and Systematic Significance of Limonoids in The Meliaceae, Cneoraceae and Allied Taxa. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **22**, 353-375.

Taylor, D. A. H. (1984) The Chemistry of the Limonoids from Meliaceae. *Fortschritte. J. Chem. Org. Naturst.* 455, 1-102.

Taylor, D.R. (1971) New Limonoids from *Trichilia trifolia*. *Rev. Latinoamer. Qim.* **2**, 87-92.

Tringali, C., Oriente, G., Piatelli, M. (1984a) Structure and Conformation of Two New Dolabellane-based diterpenes from *Dictyota sp.* *J. Nat. Prod.* **47**, 615-619.

Tringali, C., G., Piatelli, M. (1984b) Structure and Conformation of New diterpenes based on the Dolabellane skeleton from *Dictyota* species. *Tetrahedron* **40**, 799-803.

van Vliet, L.J.P., Zebarth, B.J., Derksen, G. (1999). Risk of Surface Water Contamination from Manure Management on Corn Land in South Coastal British Columbia. Technical Report No. 151 (Draft). Pacific Agri-Food Research Centre, Research Branch, Agriculture and Agri-Food Canada, Agassiz, B.C.

Watt, J.M., Breyer- brandwick, M.G. (1962) The Medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa 2nd. Edn. E&S. Livingston, Londres.

Weber J.W. (1985) Optical rotatory dispersion and circular dichroism. En: Handbook of natural pesticides: Methods. Volume II. pp 439-458.

Weisleder, D. (1985) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. En: Handbook of natural pesticides: Methods. Volume II. pp 297-322.

Wright, A.D., König G.M., Sticher O. (1990) Two new dolabellane derivatives from the brown Alga *Dictyota pardalis*. *Tetrahedron* . Vol 46, 11, pp. 3851-3858.

Wright, A.D., Coll J.C., Price I.R. (1990) Tropical Marine Algae, VII. The chemical composition of marine algae from north queensland waters. *J. Nat. Prod.* 53, 845-861.

Wolff, M., Zeleniuch-Jaquotte, A., Dubin, N., Toniolo, P. (2000). Risk of breast cancer and organochlorine exposure. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**, 271-277.

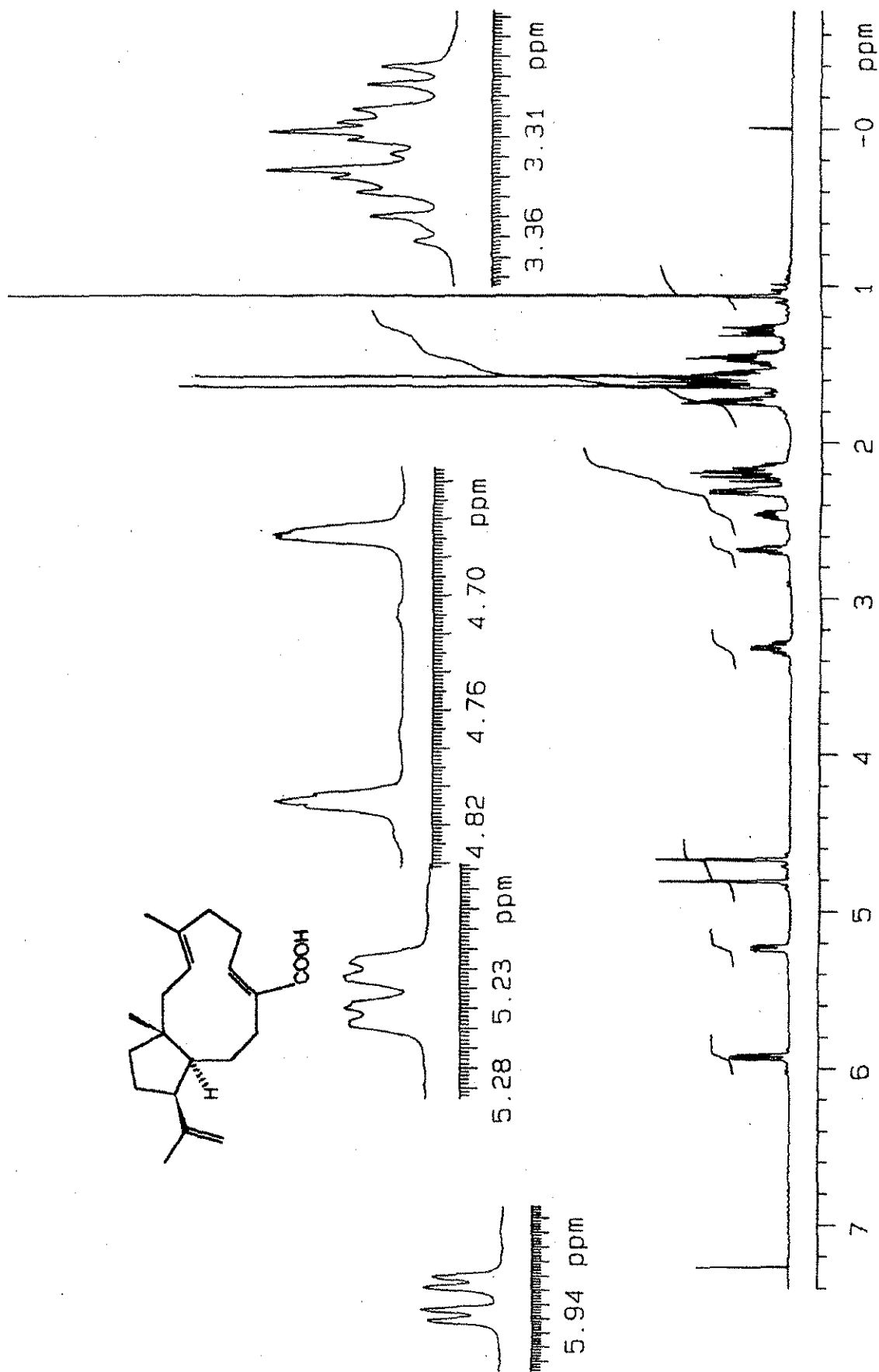
Xie, Y.S., Gunning, P., Mackinnon, S., Isman, M.B., Arnason, J.T., Towers, G.H.N., Sánchez, P., Hasbun, C. (1994). Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. *Biochem. Syst. and Ecol.* **22**, 129-136.

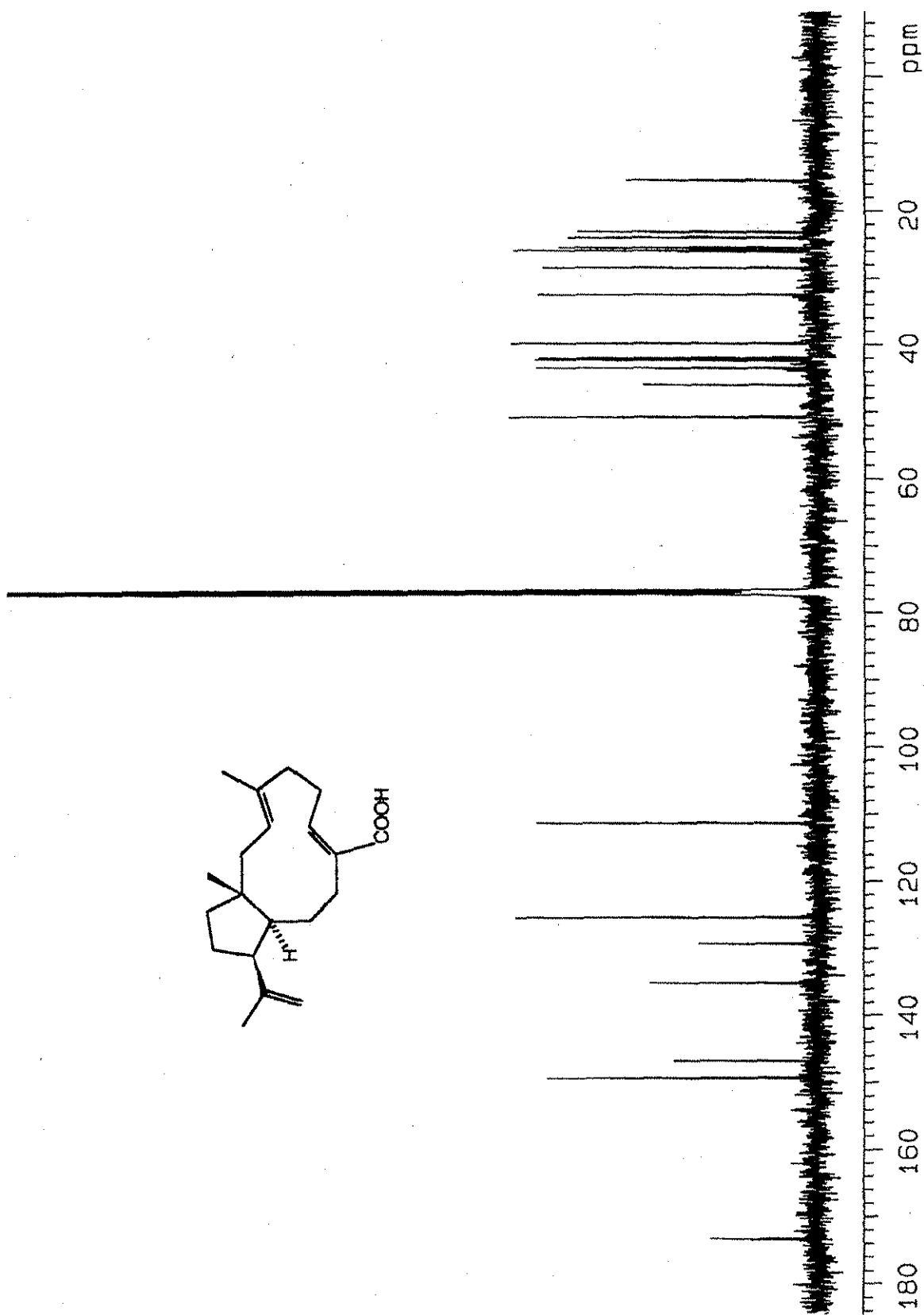
Xie, Y.S., Bodnaryk, R.P., Fields, P.G., (1996) A rapid and simple flour disk method for testing substances active against stored product insects. *Can. Entomol.* **128**, 865-875.

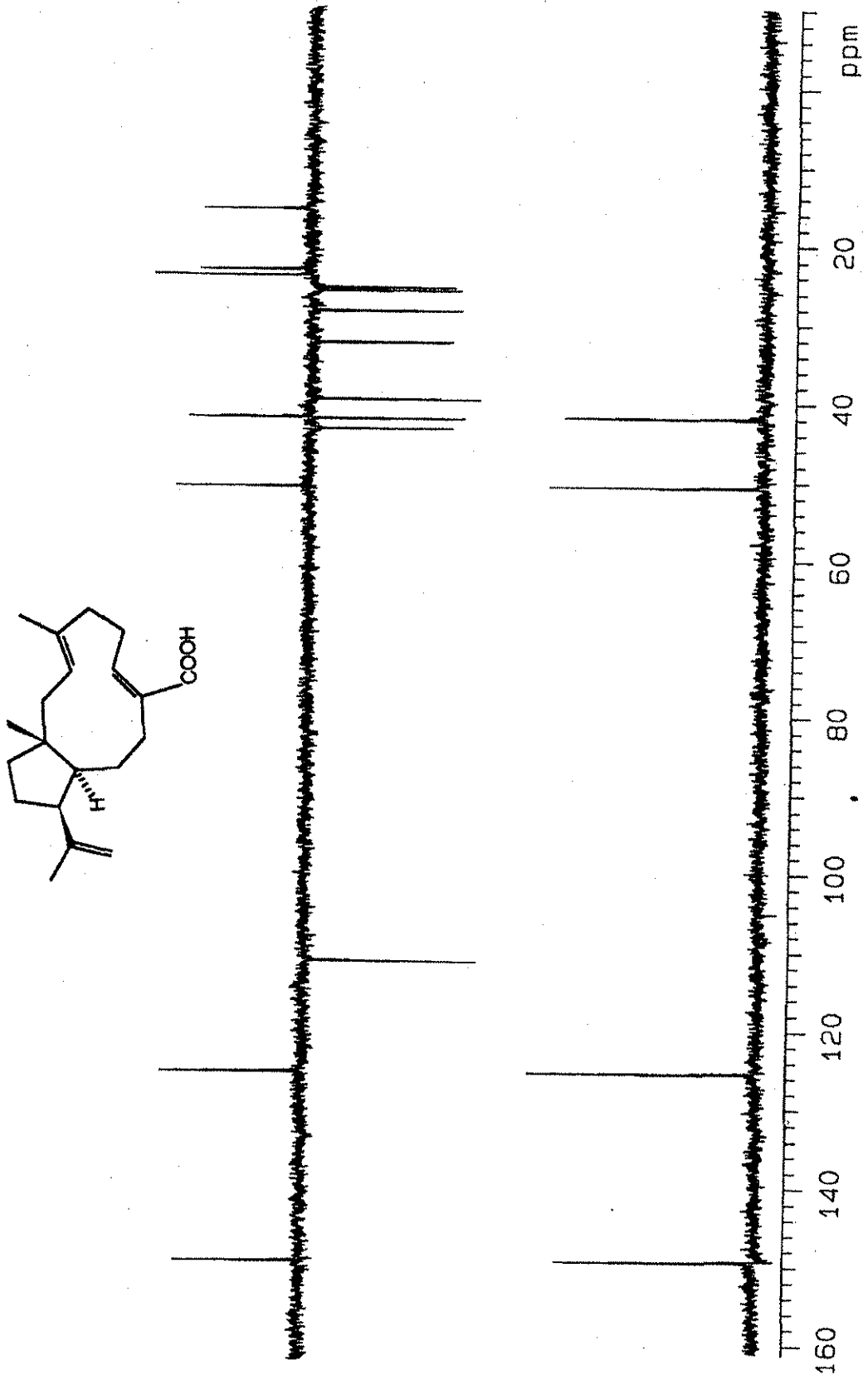
Zheng, T., Holford, T., Mayne, S., Tessari, J., Ward, B., Carter, D., PH, O., Boyle, P., Dubrow, R., Archibeque-Engle, S., Dawood, O., and Zahm, S. (2000). Risk of female breast cancer associated with serum polychlorinated biphenyls and 1,1-dichloro-2,2'-bis(p-chlorophenyl)ethylene. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**, 167-174.

Zhou, J.B., Okamura, H., iwagawa, T., Nakatani, M. (1996). Limonoids Antifeedants from *Melia toosendan*. *Phytochemistry*, **41**, 117-120.

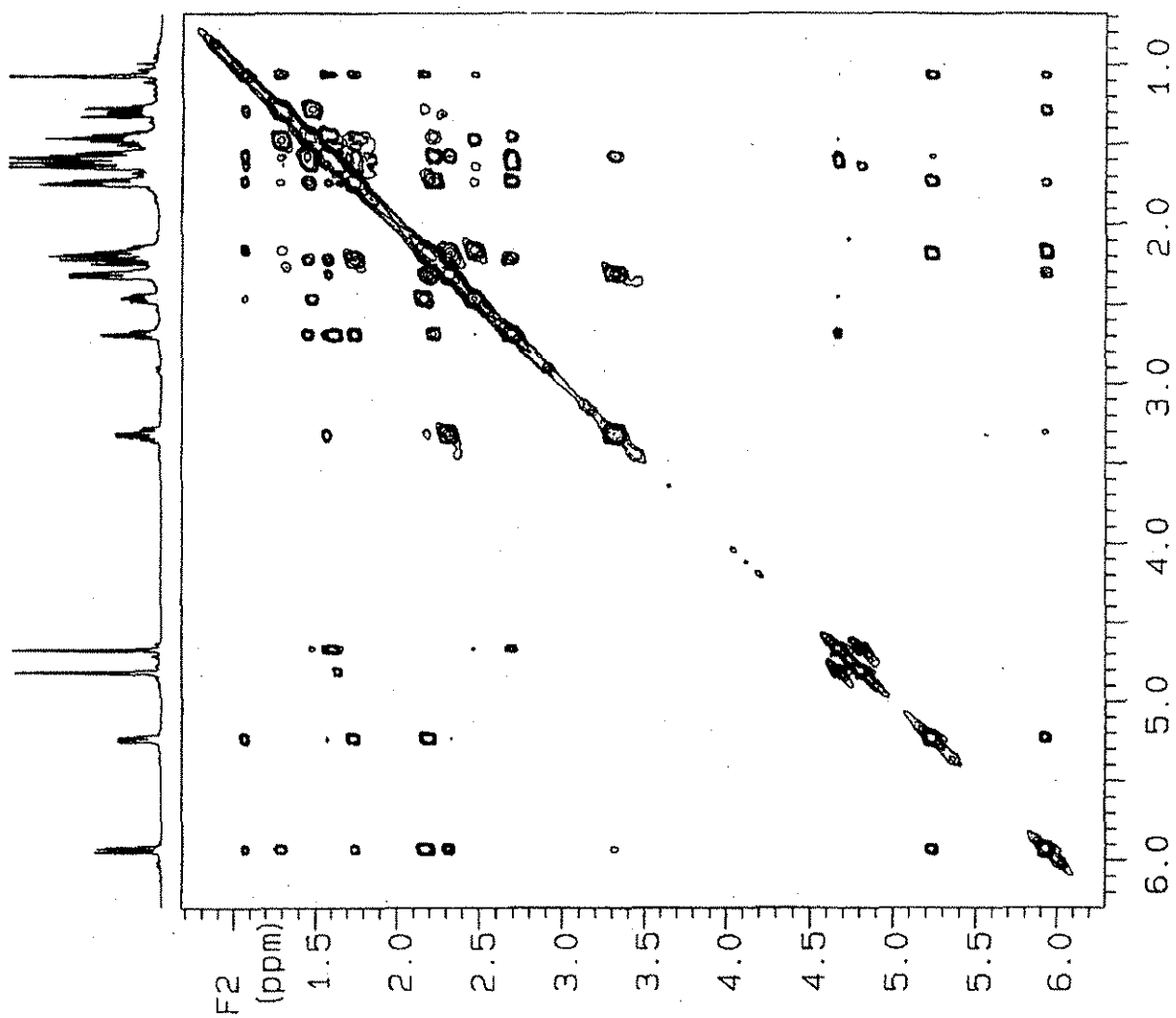
ANEXO 1

Espectro 1. Espectro de RMN ^1H del compuesto 132

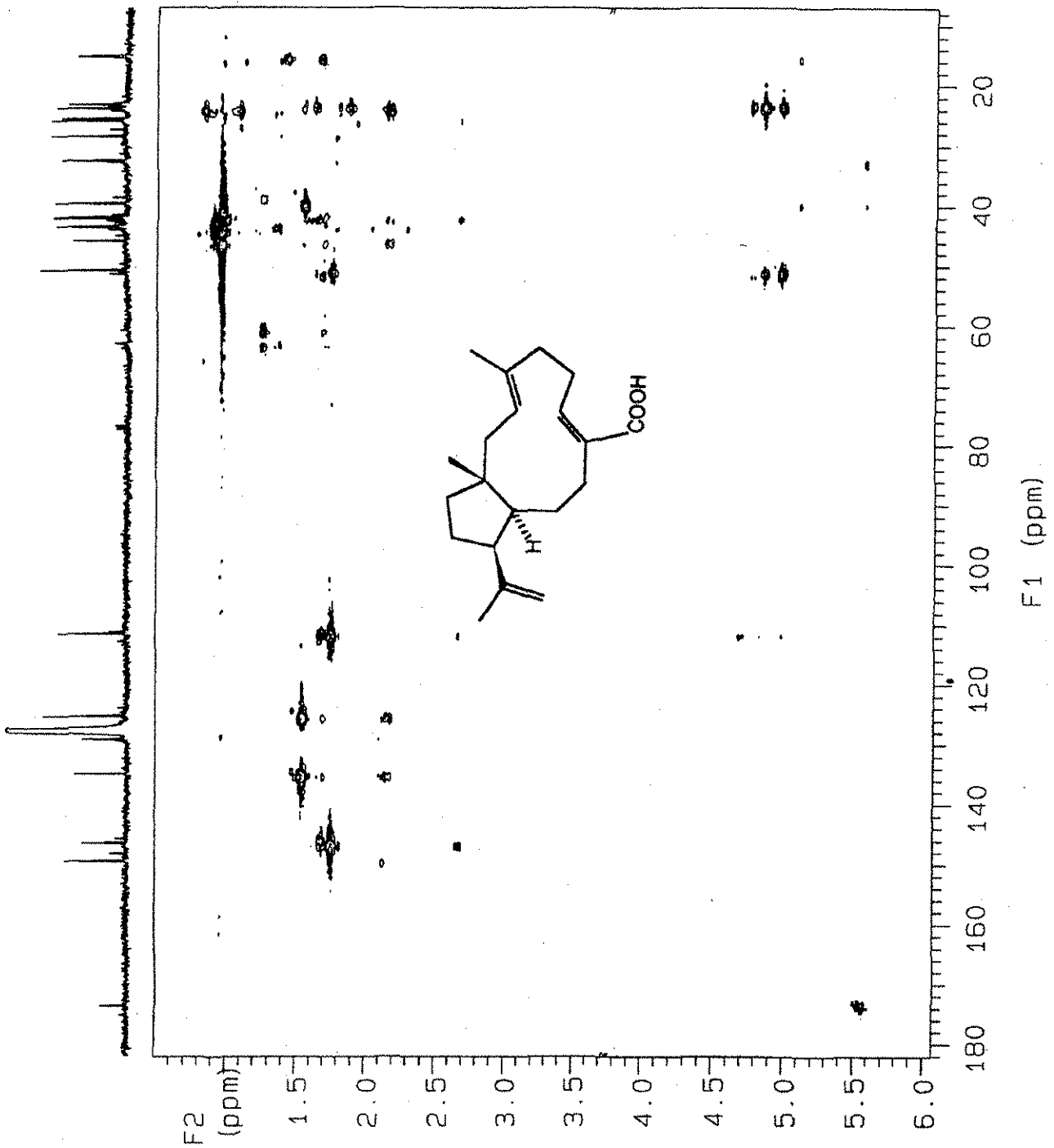
Espectro 2. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 132



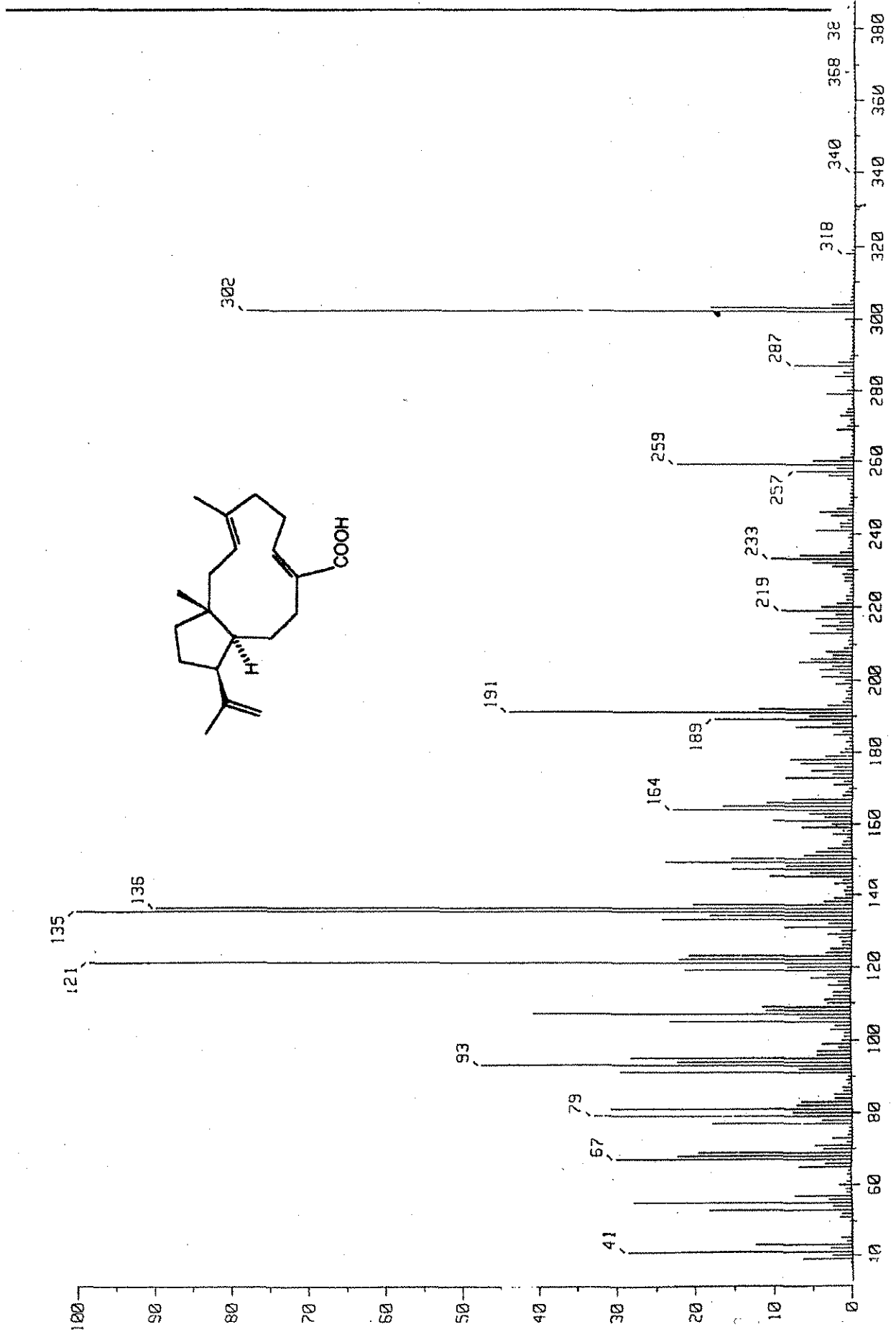
Espectro 3. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT del compuesto 132



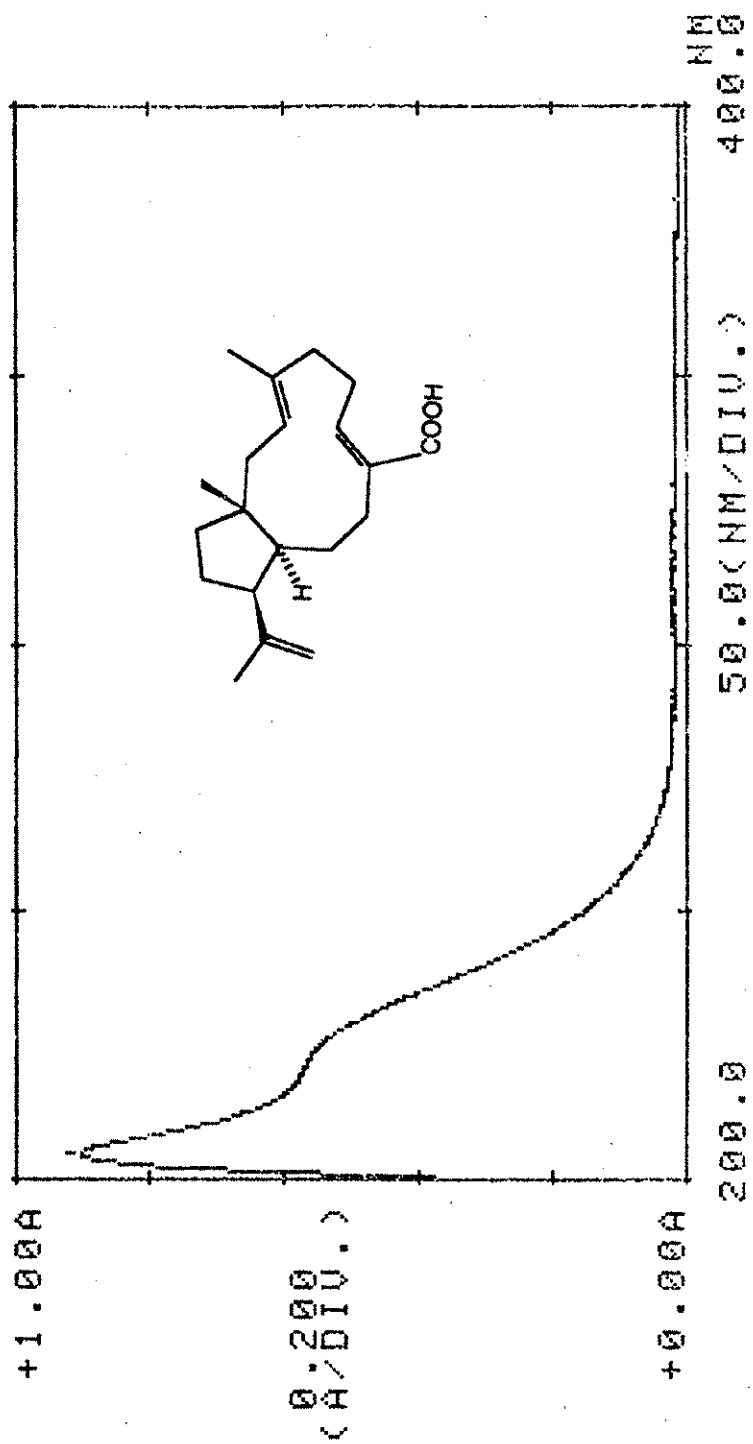
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H -NOESY del compuesto 132



Espectro 5. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H - HMBC del compuesto 132

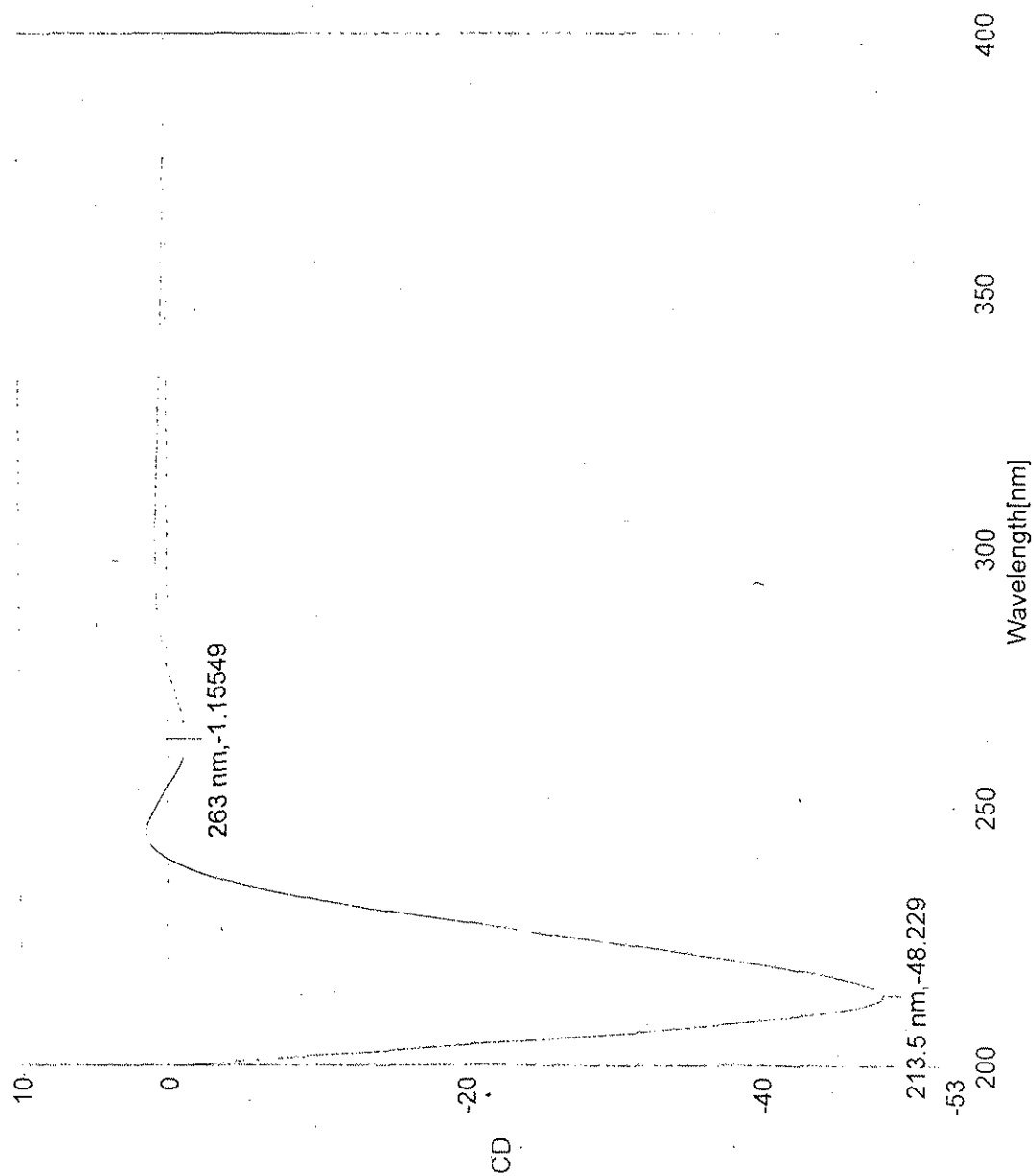


Espectro 6. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 132



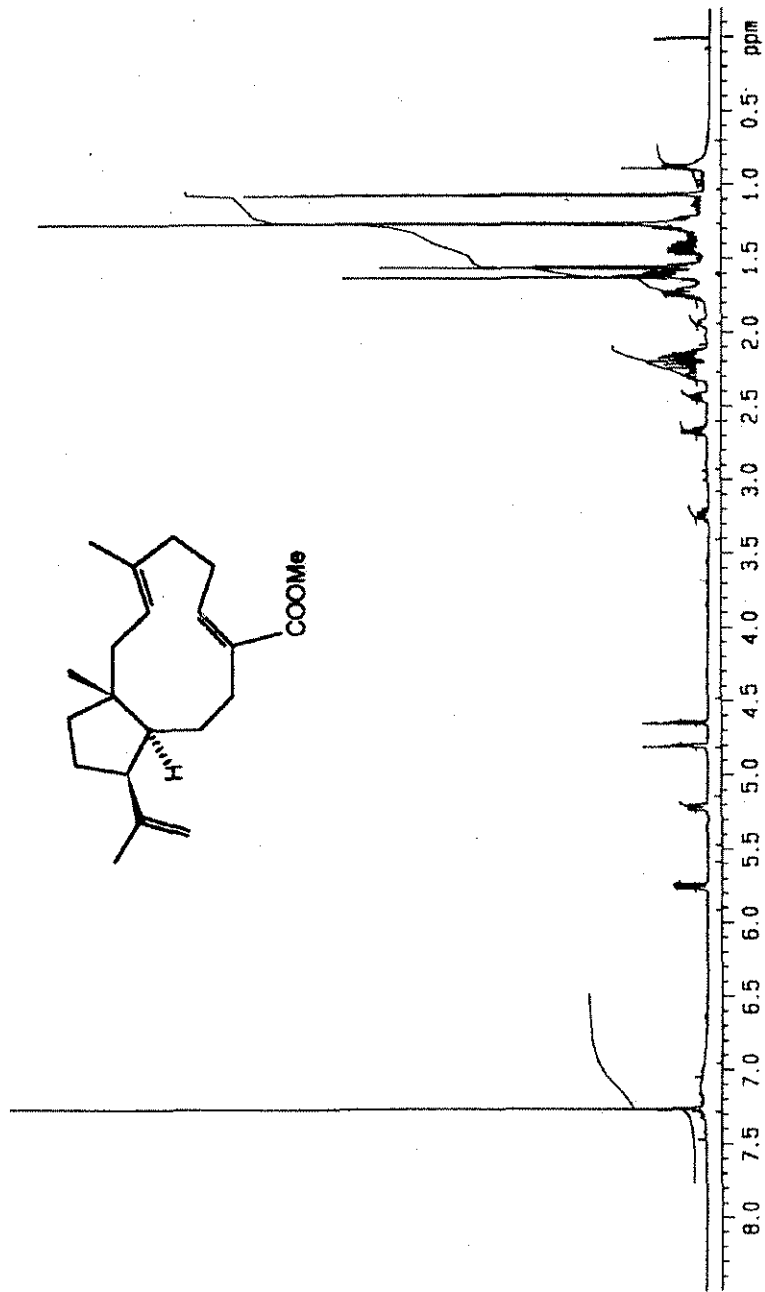
Espectro 8. Espectro de UV del compuesto 132

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



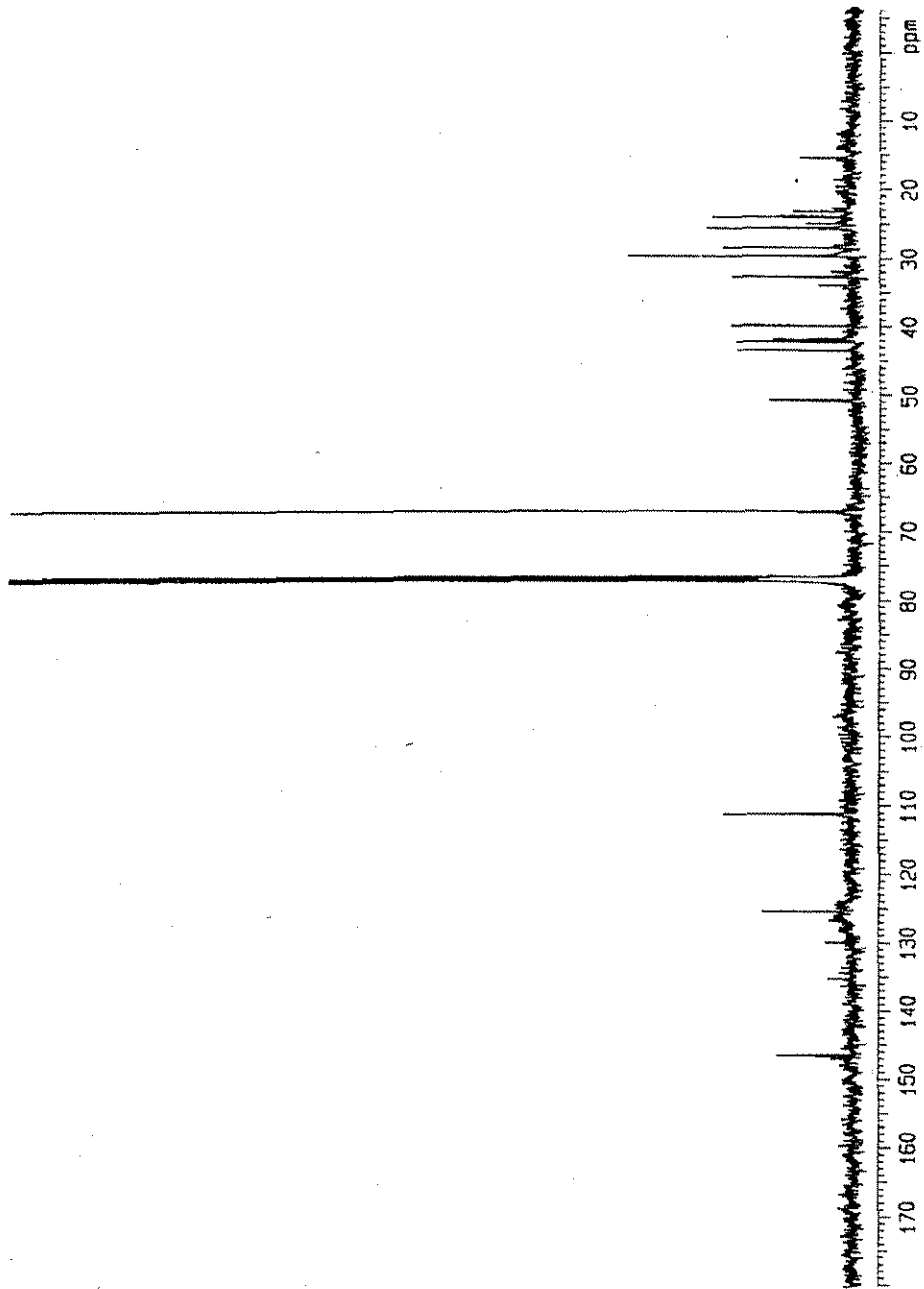
Espectro 9 Espectro de dicroísmo circular del compuesto 132

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



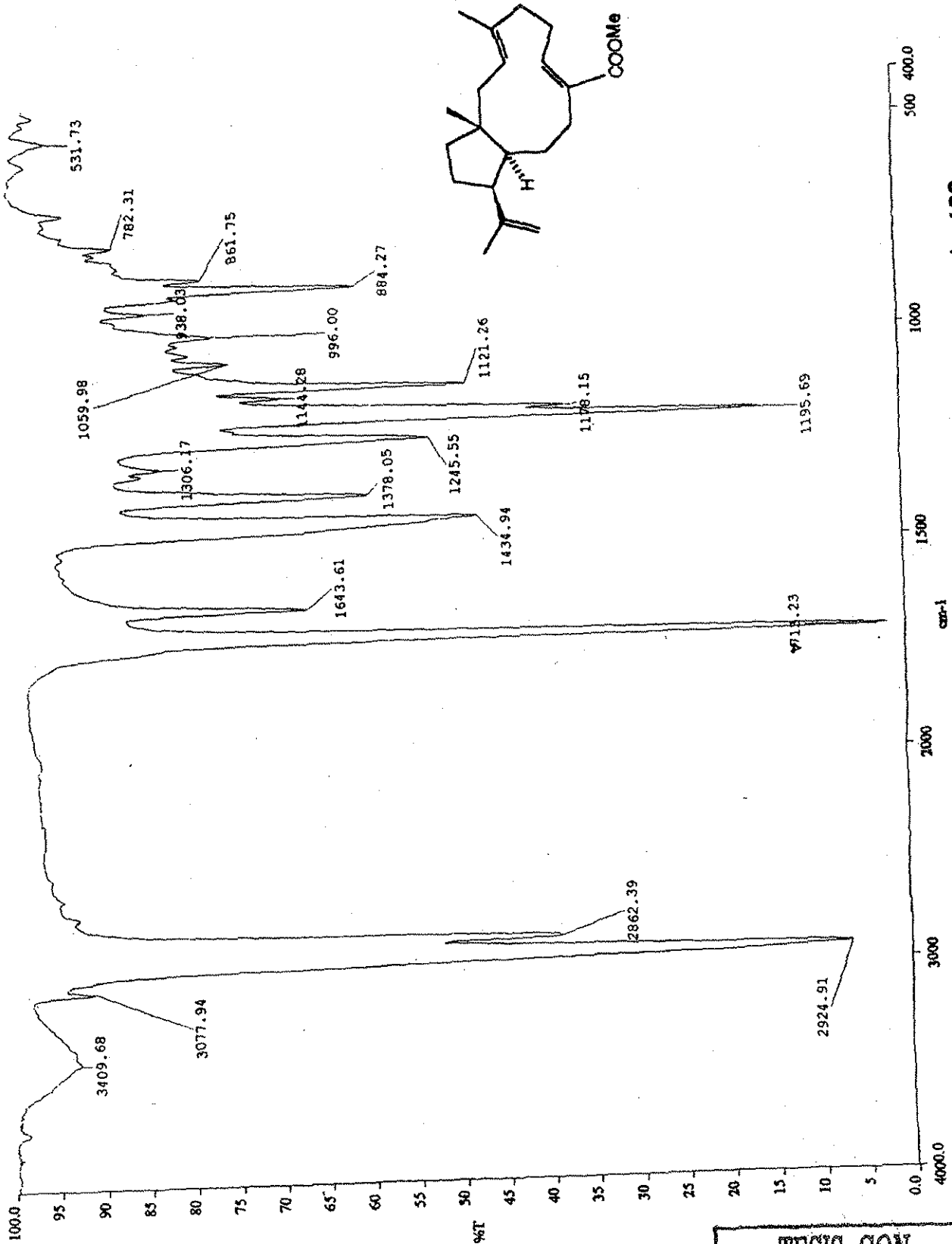
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H del derivado metilado del compuesto 132

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



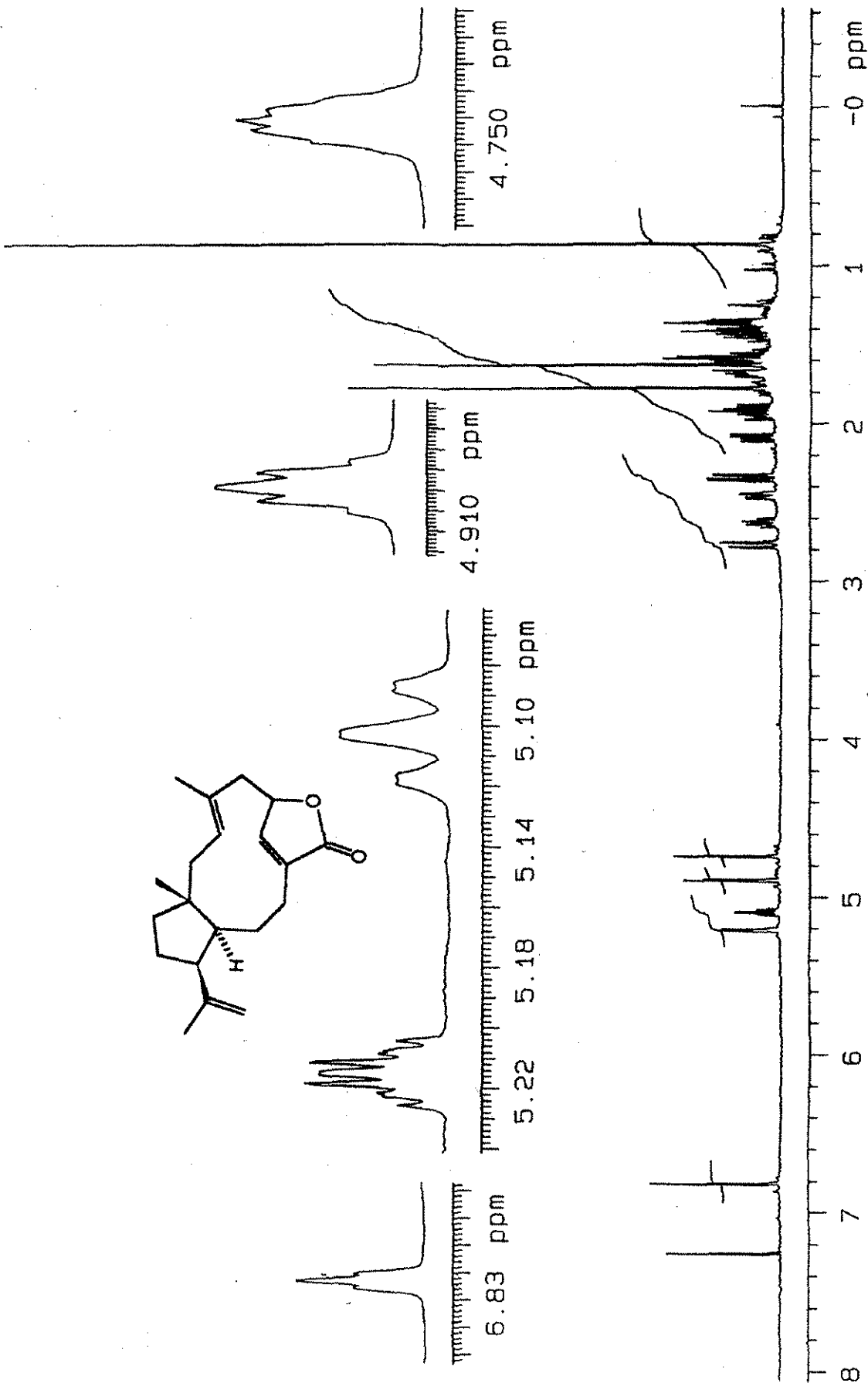
Espectro 11 Espectro de RMN ^{13}C del derivado metilado del compuesto 132

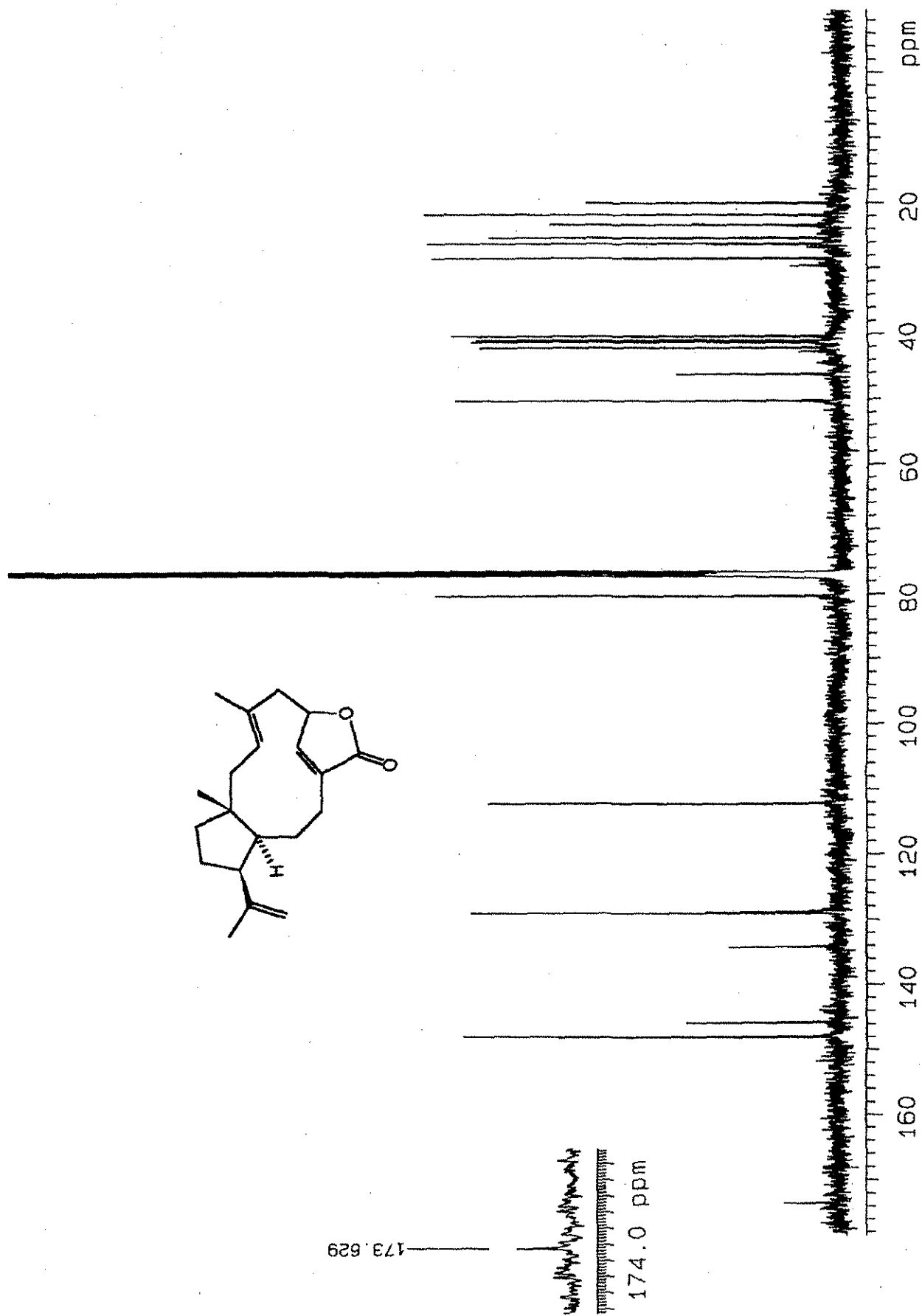
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



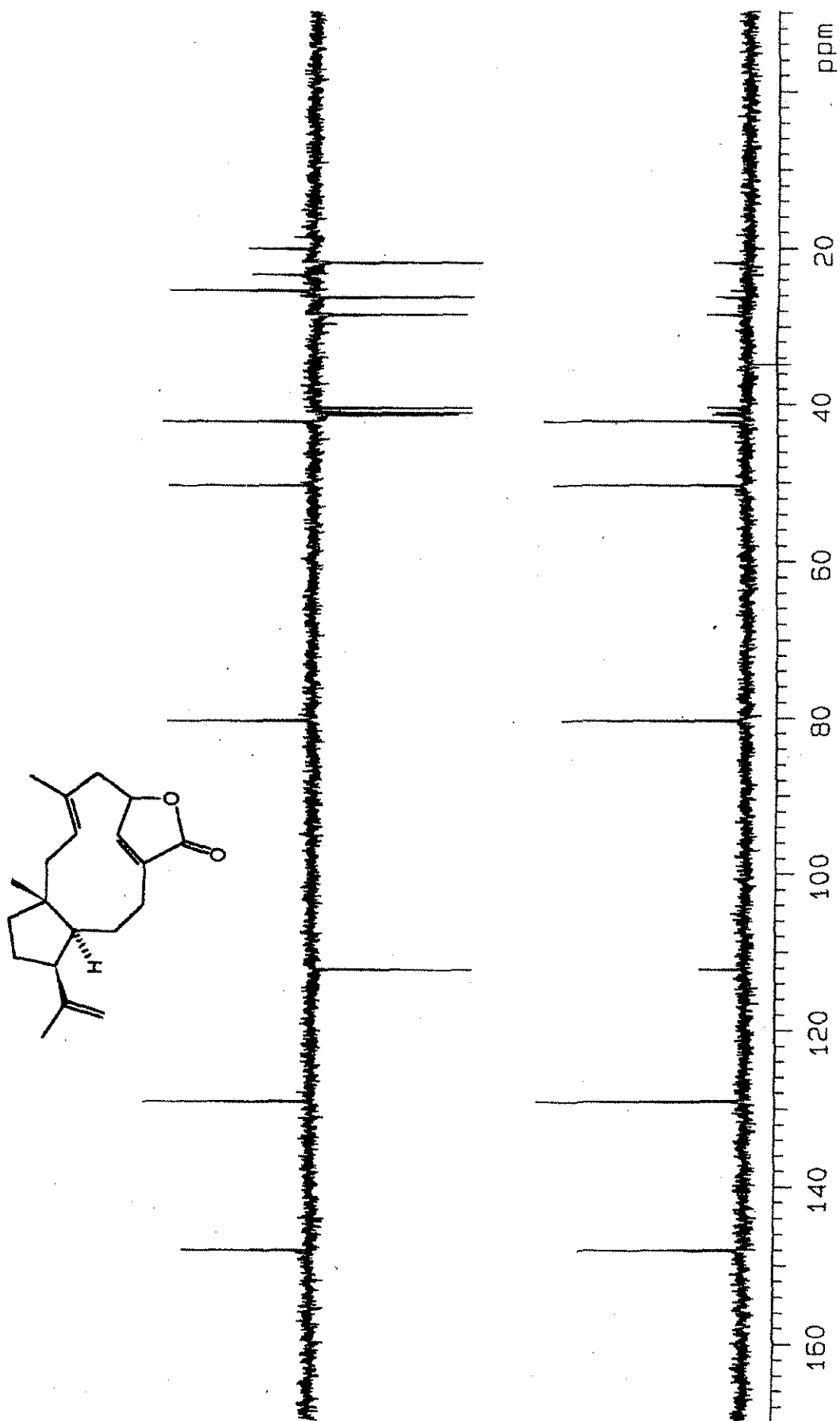
Espectro 12. Espectro en el IR del derivado metilado del compuesto 132

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

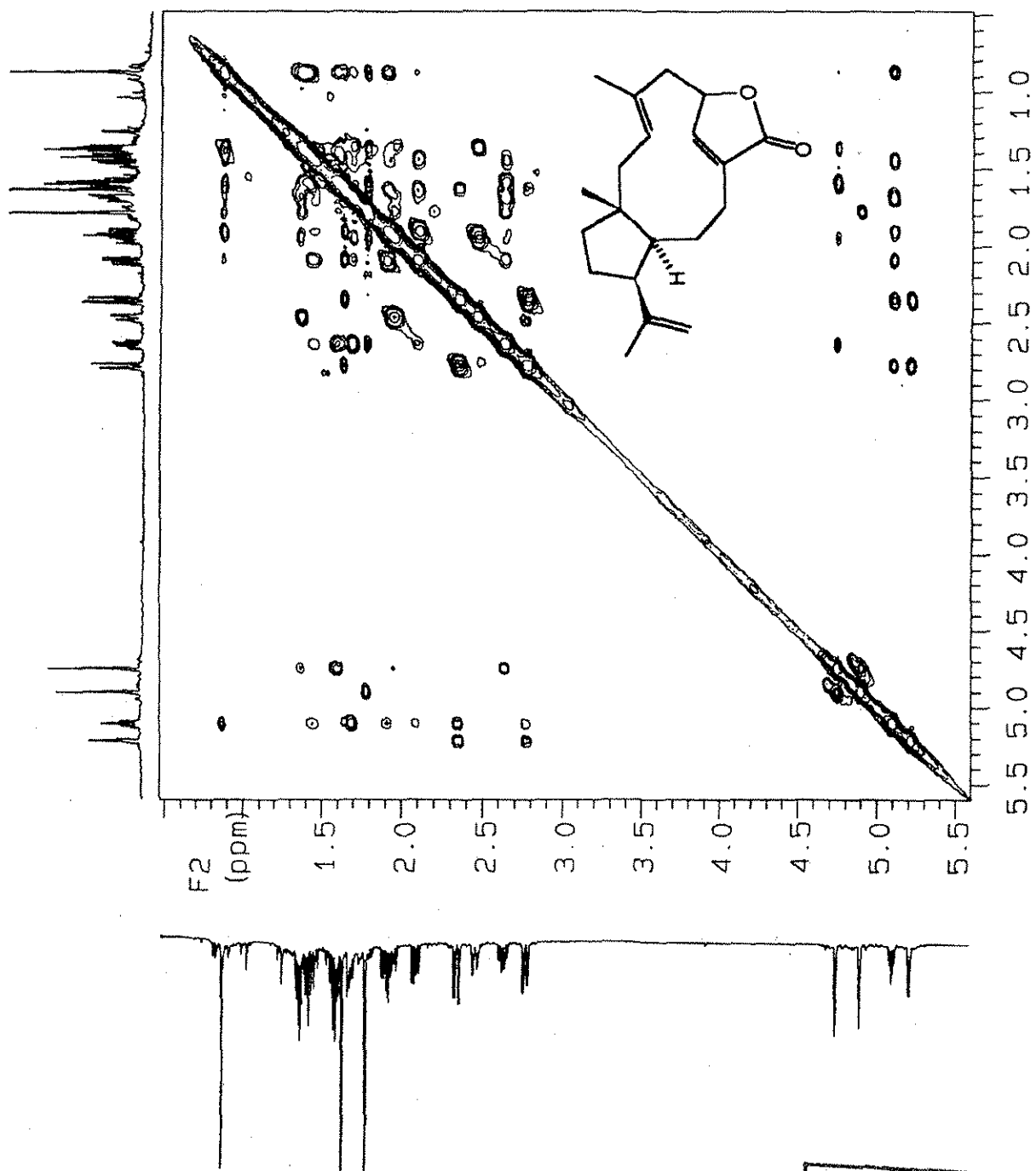
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H del compuesto 133



Espectro 14. Espectro de RMN ¹³C del compuesto 133

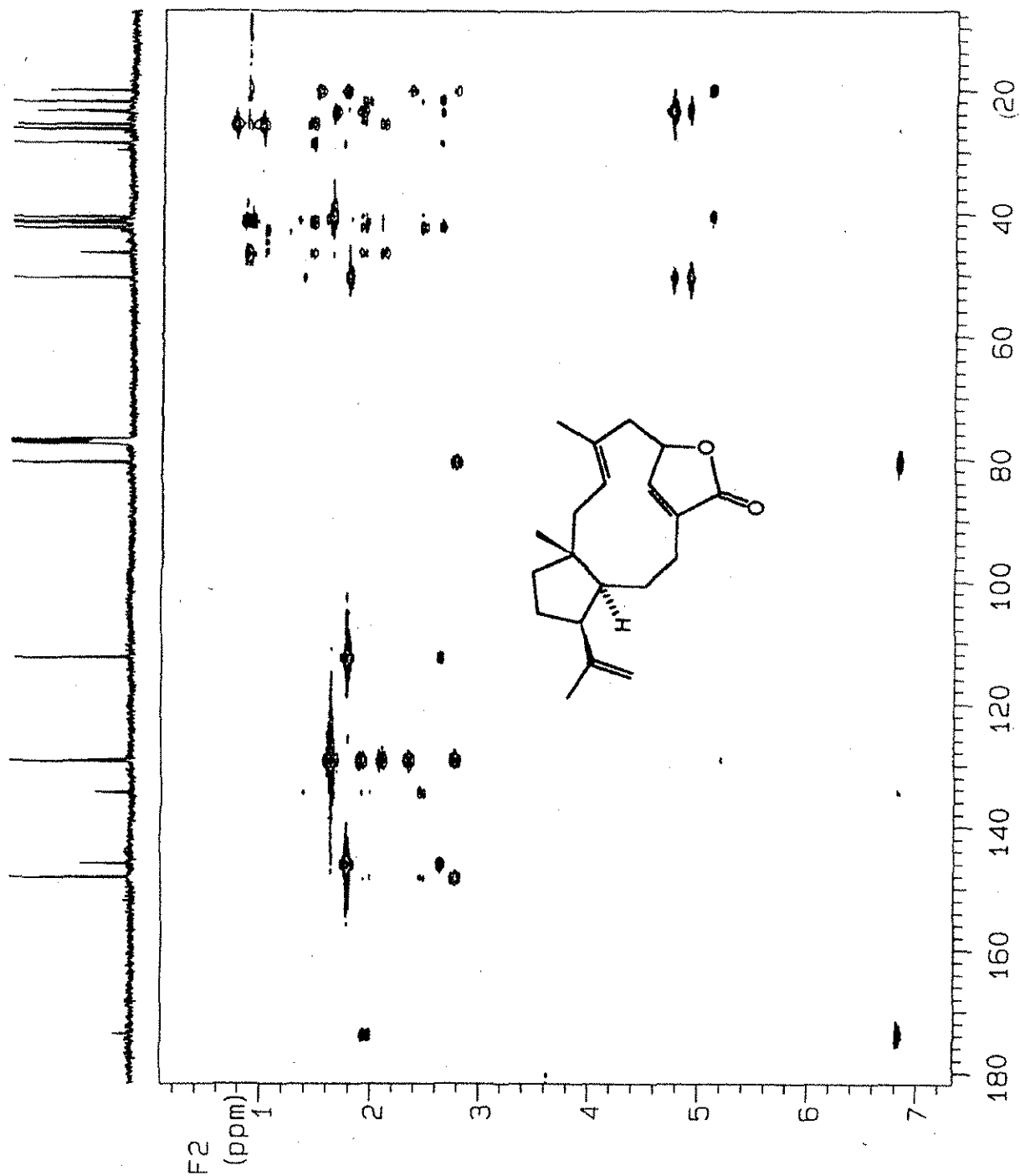


Espectro 15. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del compuesto 133



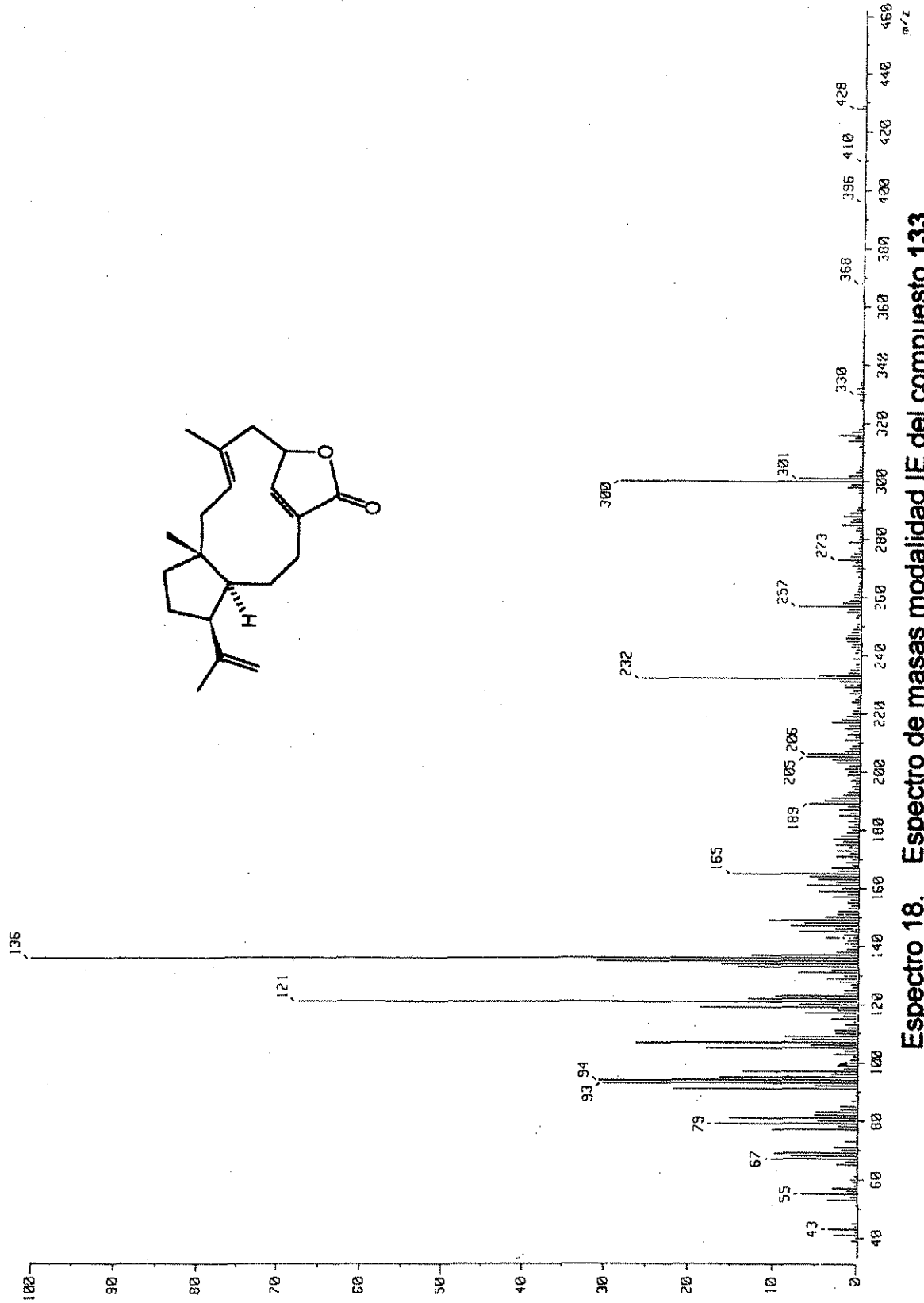
Espectro 16. Espectro de RMN ^1H -NOESY del compuesto 133

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



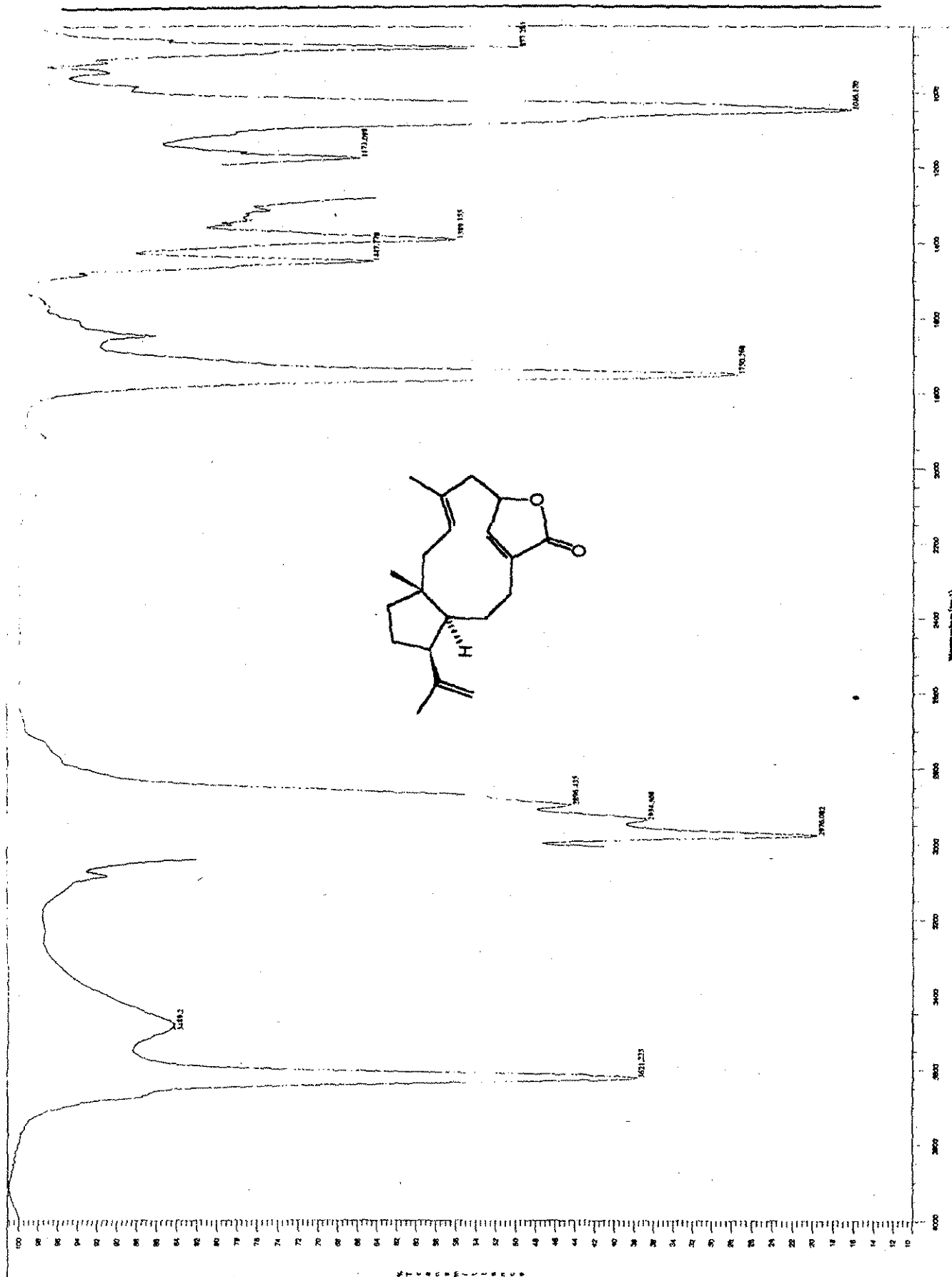
Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H - HMBC del compuesto 133

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



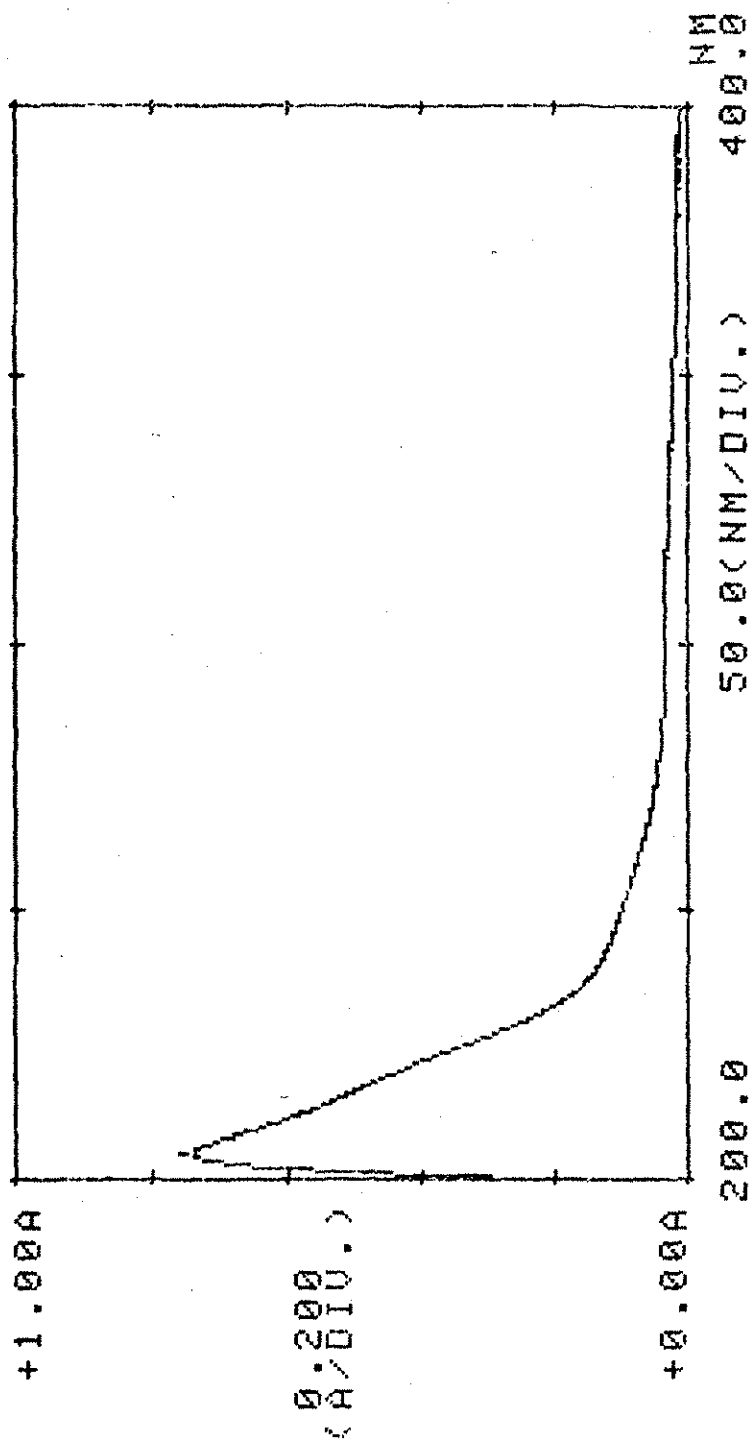
Espectro 18. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 133

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

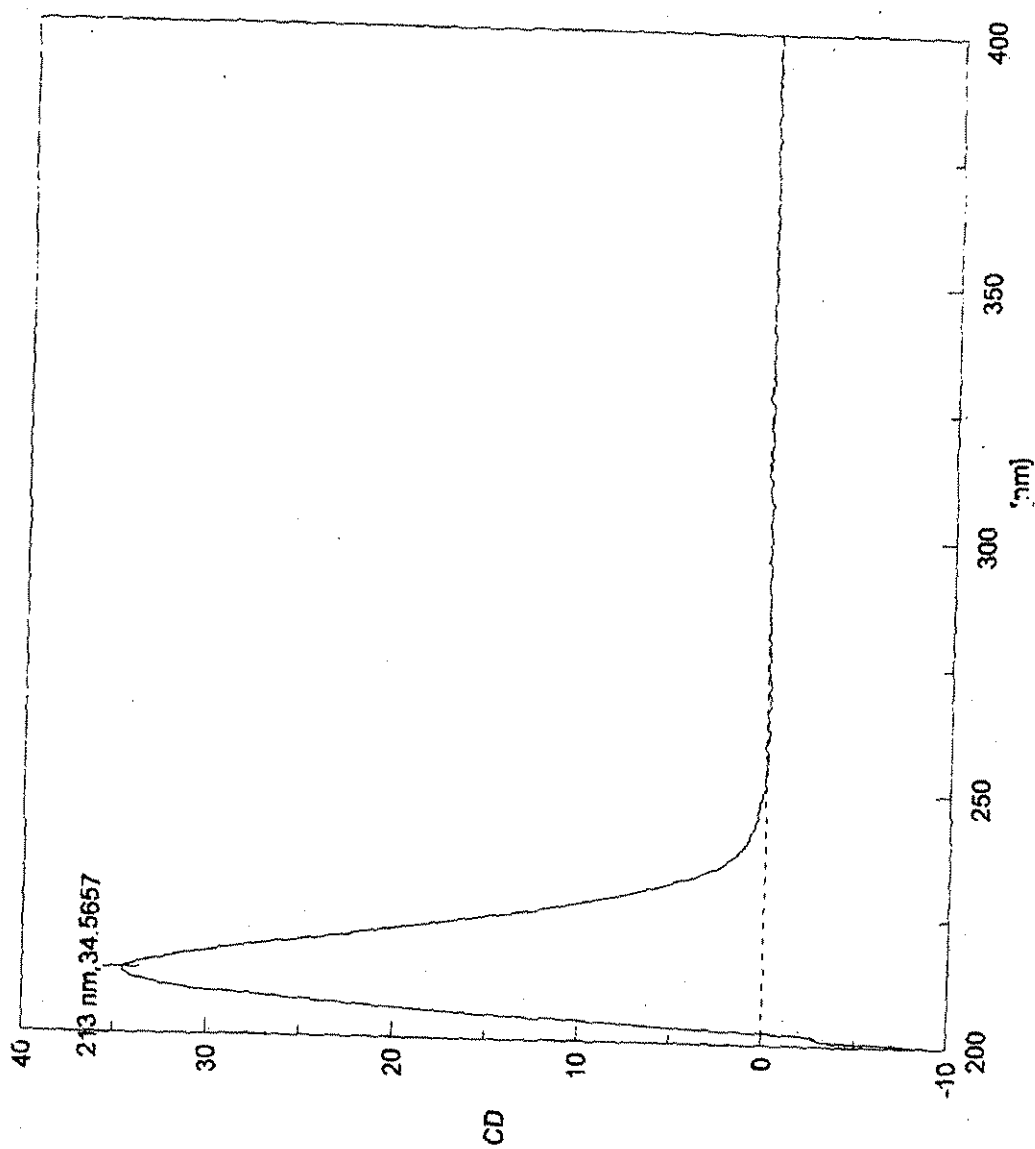


Espectro 19. Espectro en el IR del compuesto 133

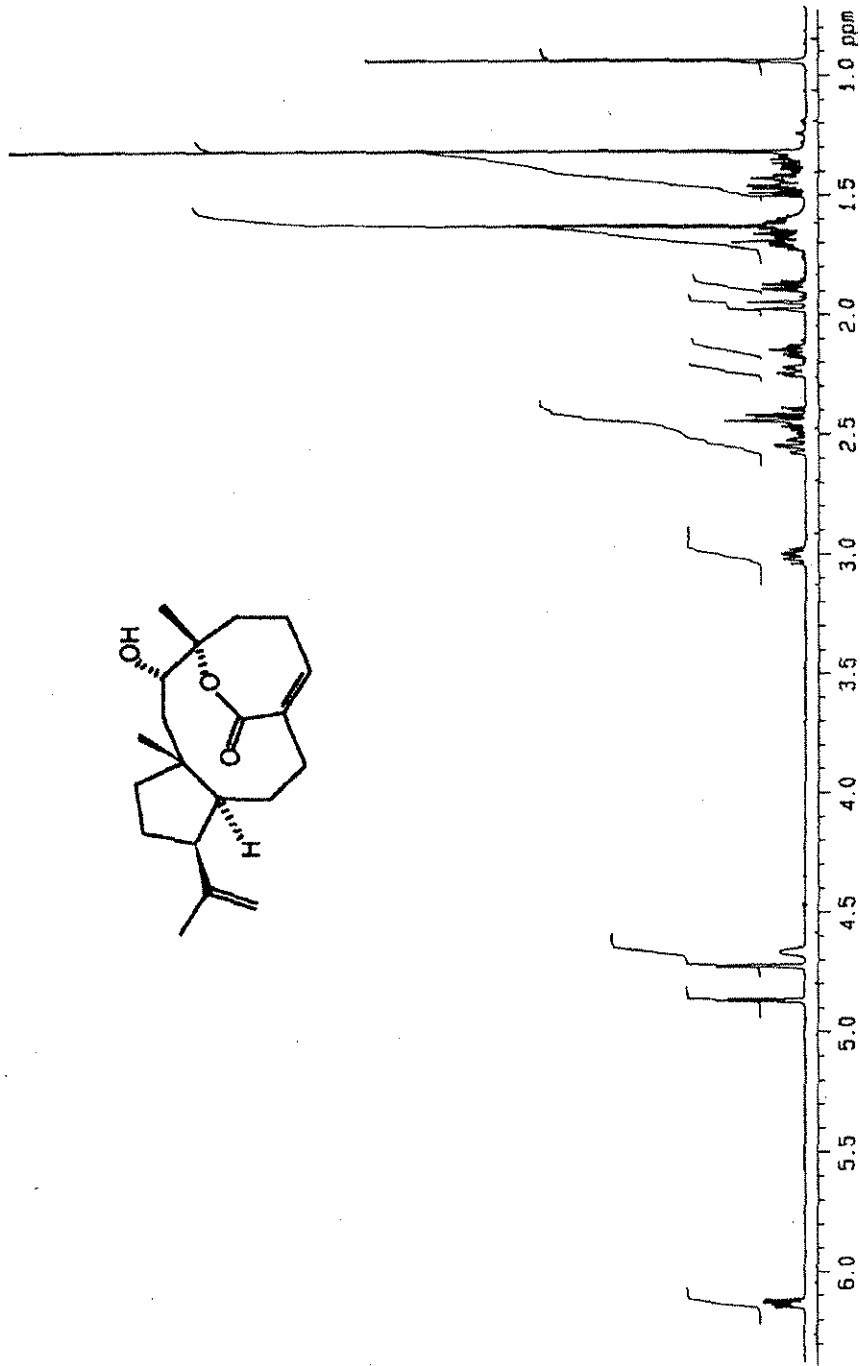
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



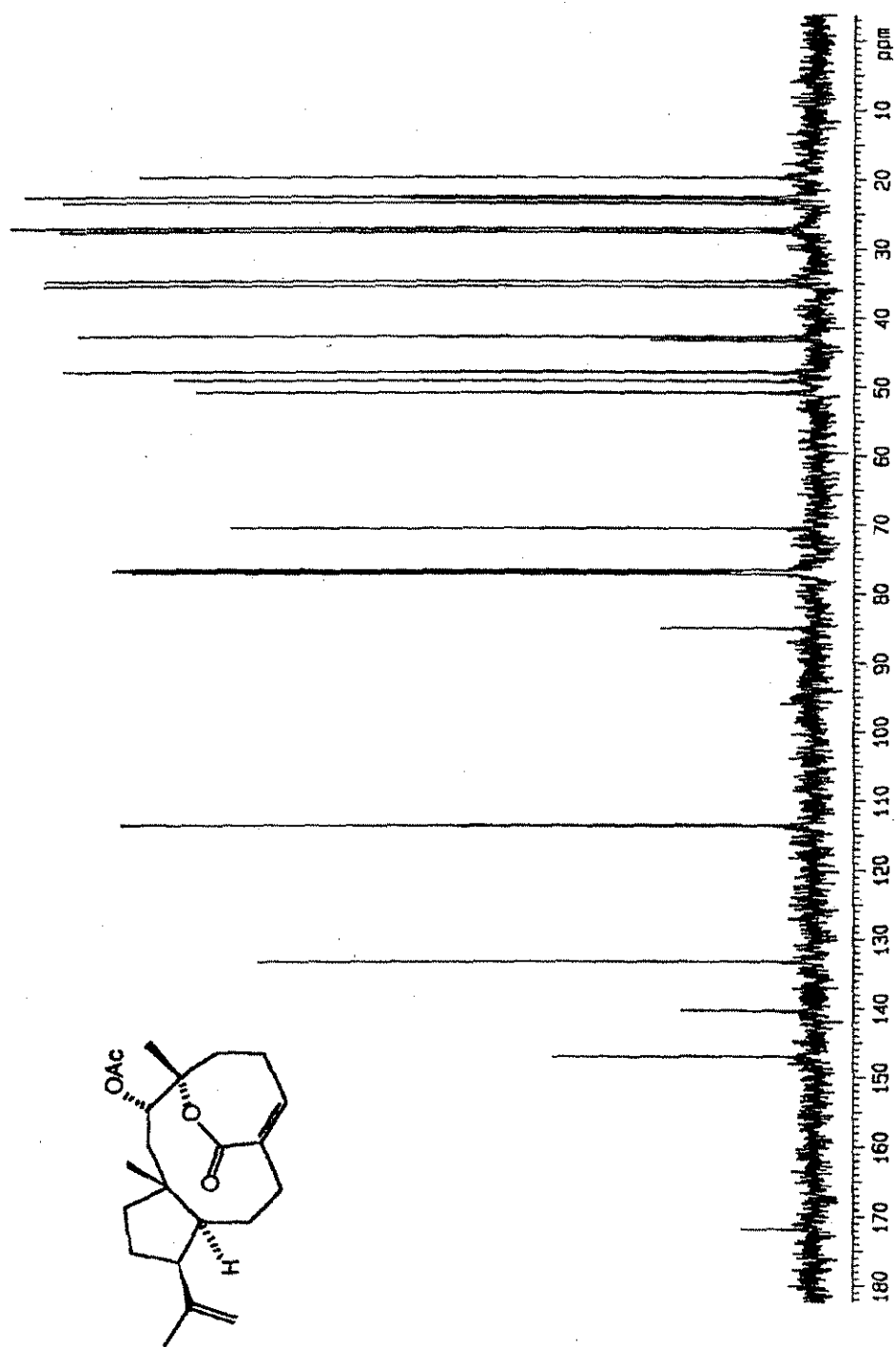
Espectro 20. Espectro de UV del compuesto 133

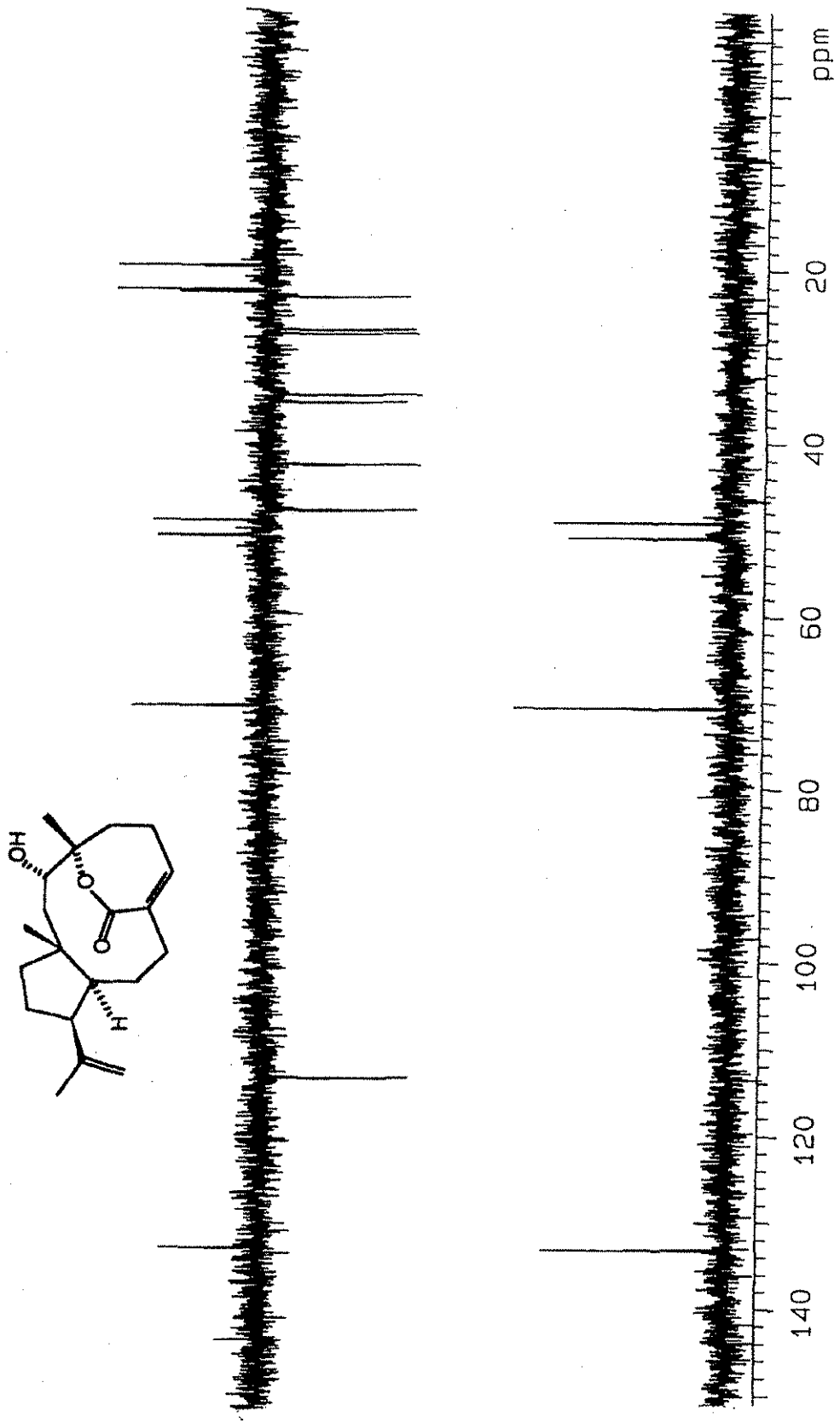


Espectro 21. Espectro de dicroísmo circular del compuesto 133

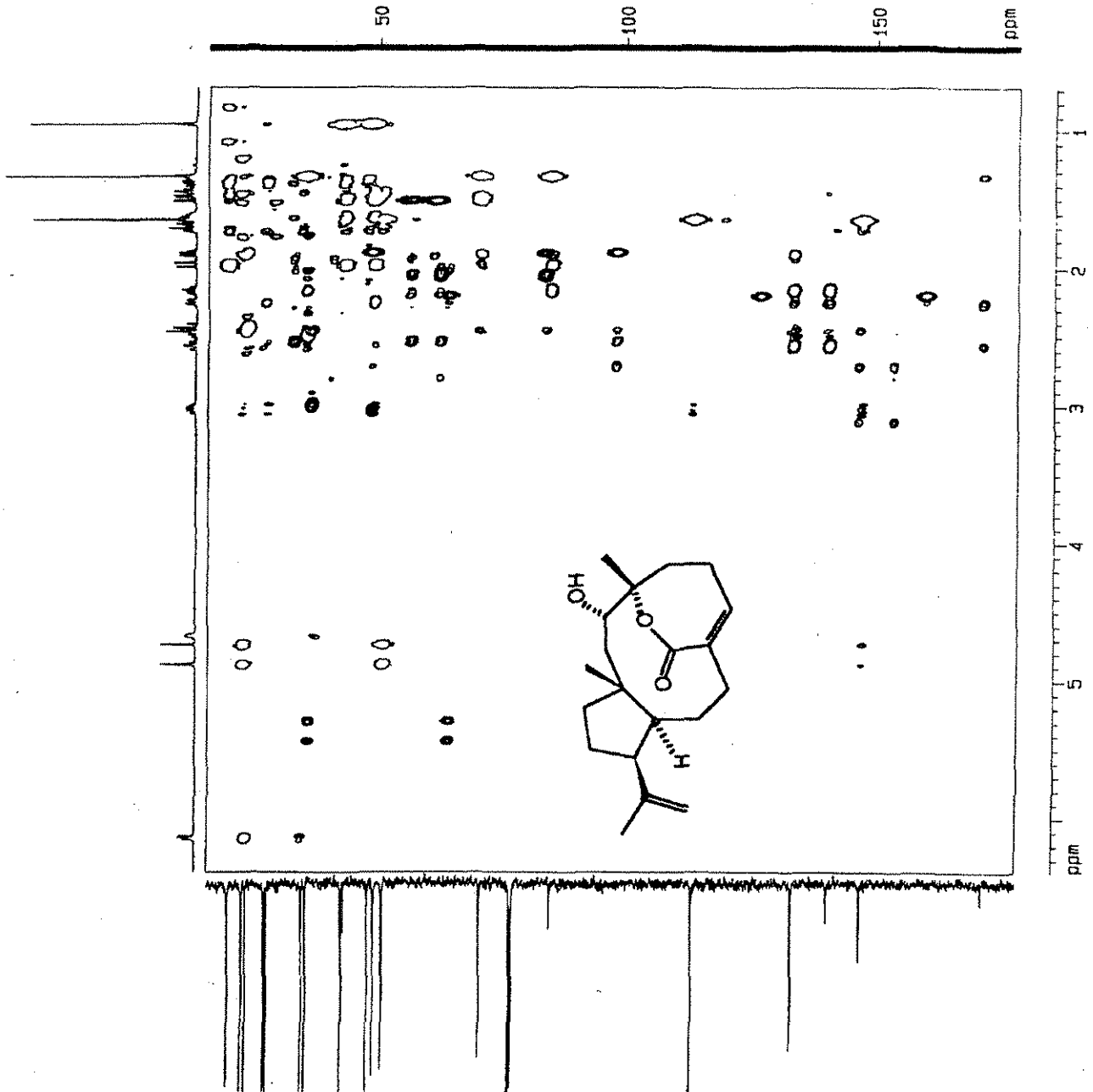


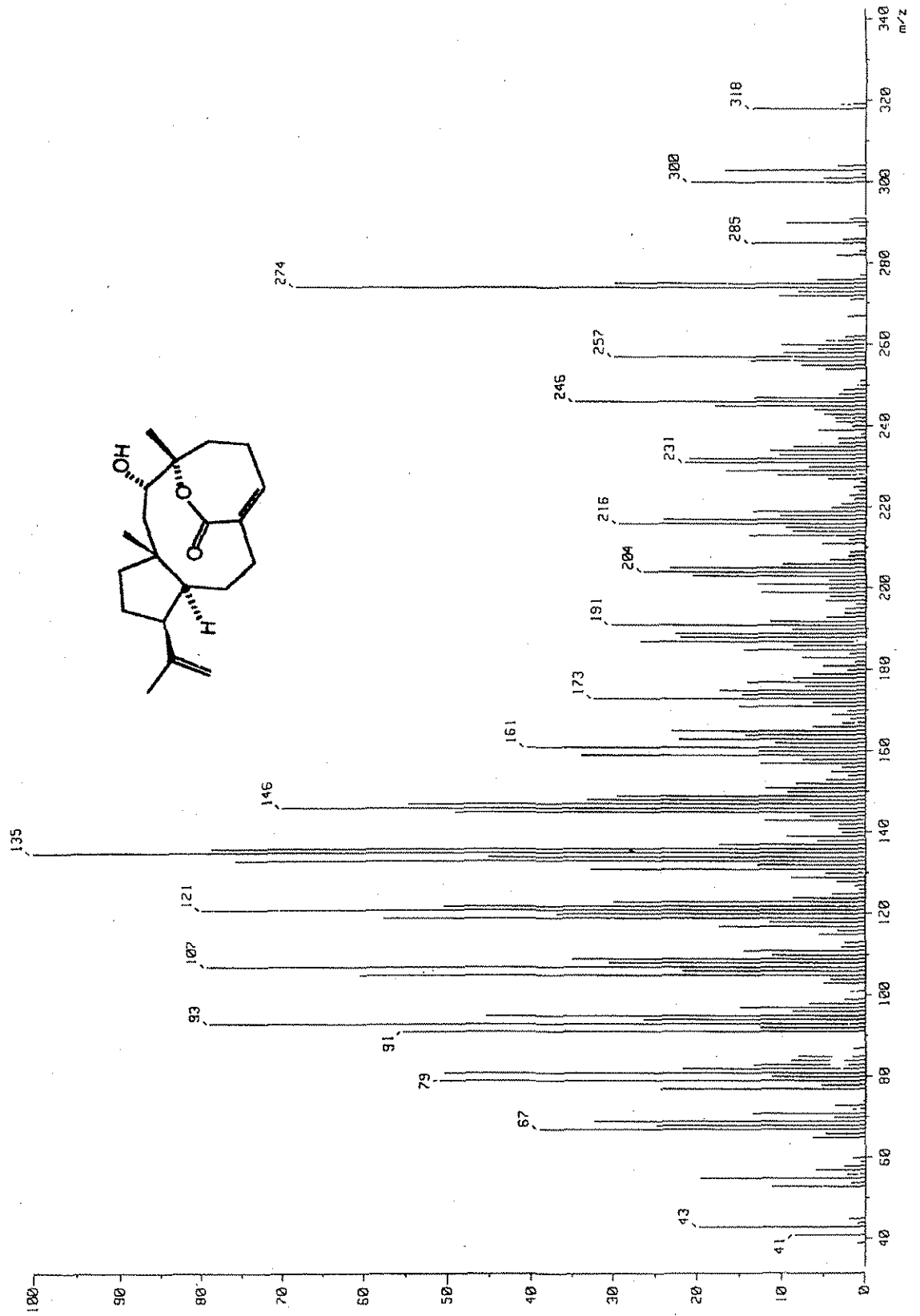
Espectro 22. Espectro de RMN ^1H del compuesto 134

Espectro 23. Espectro de RMN ^{13}C del derivado compuesto 134

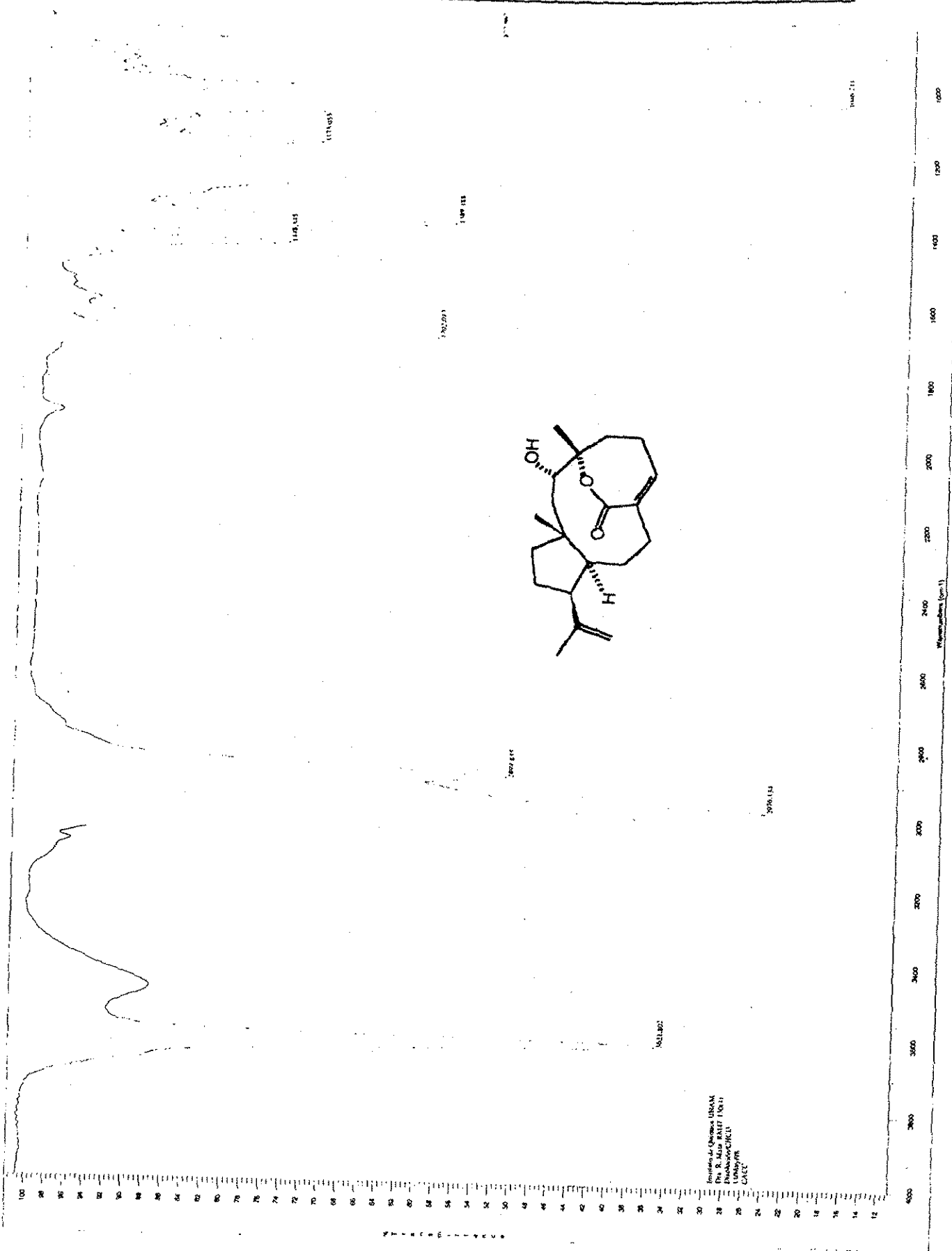


Espectro 24. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del compuesto 134

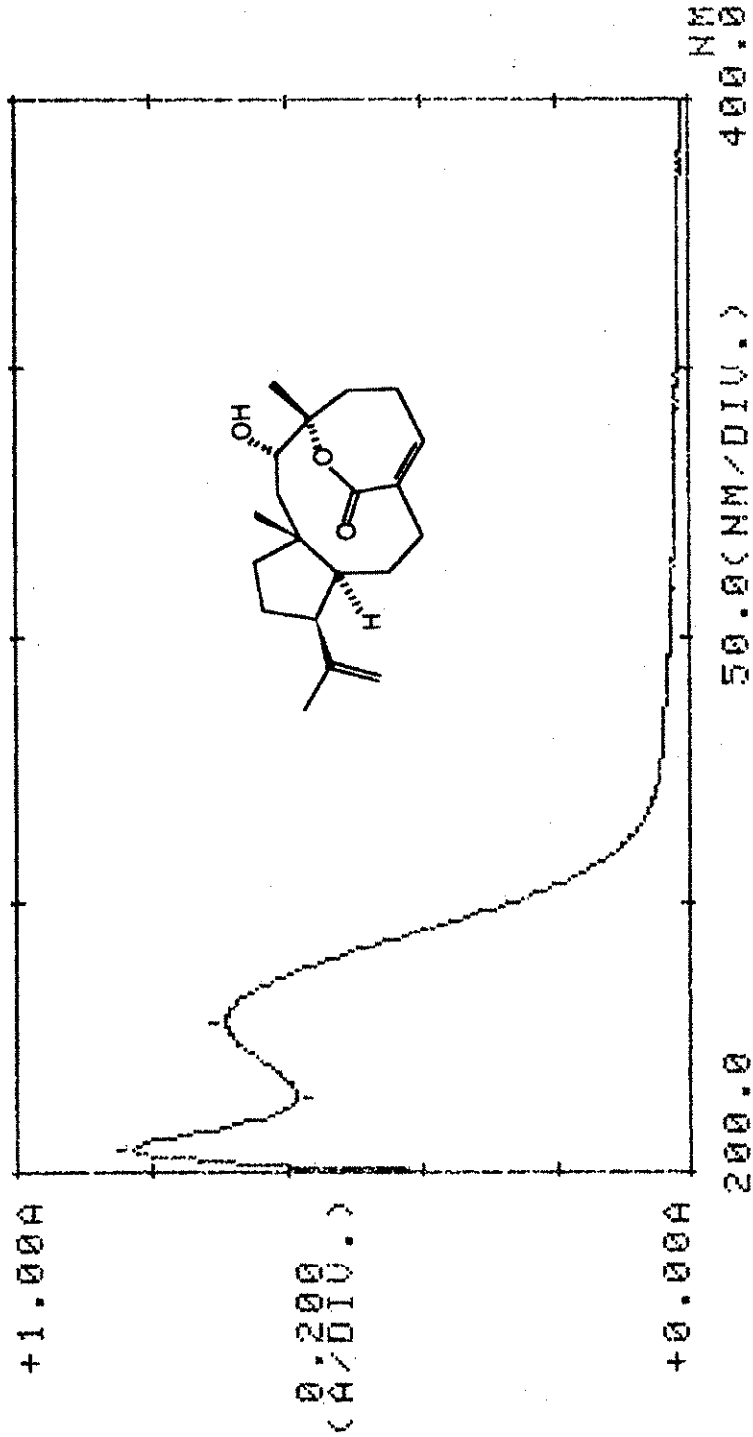
Espectro 26. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H - HMBC del compuesto 134



Espectro 27. Espectro de masas modalidad IE del compuesto 134

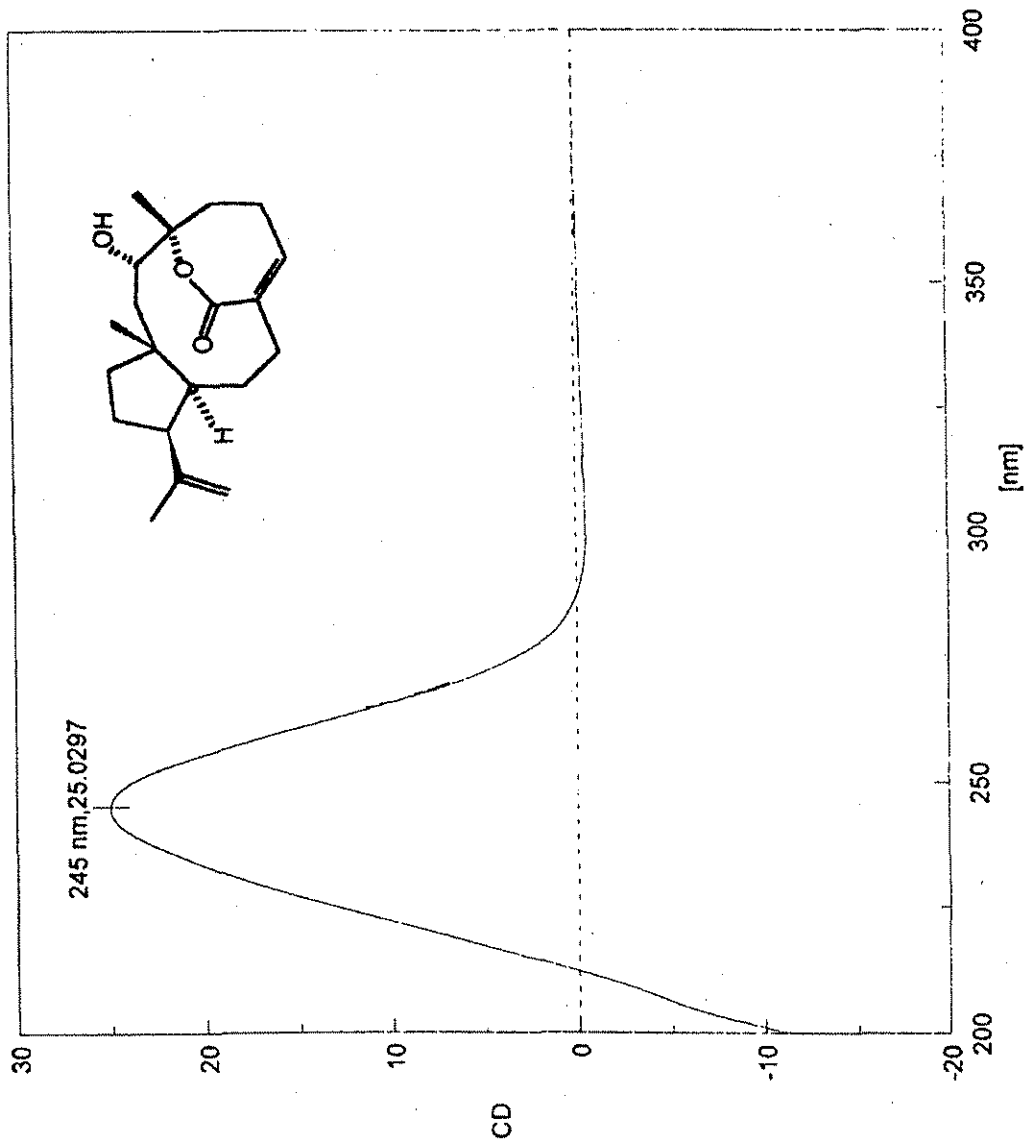


Espectro 28. Espectro en el IR del compuesto 134



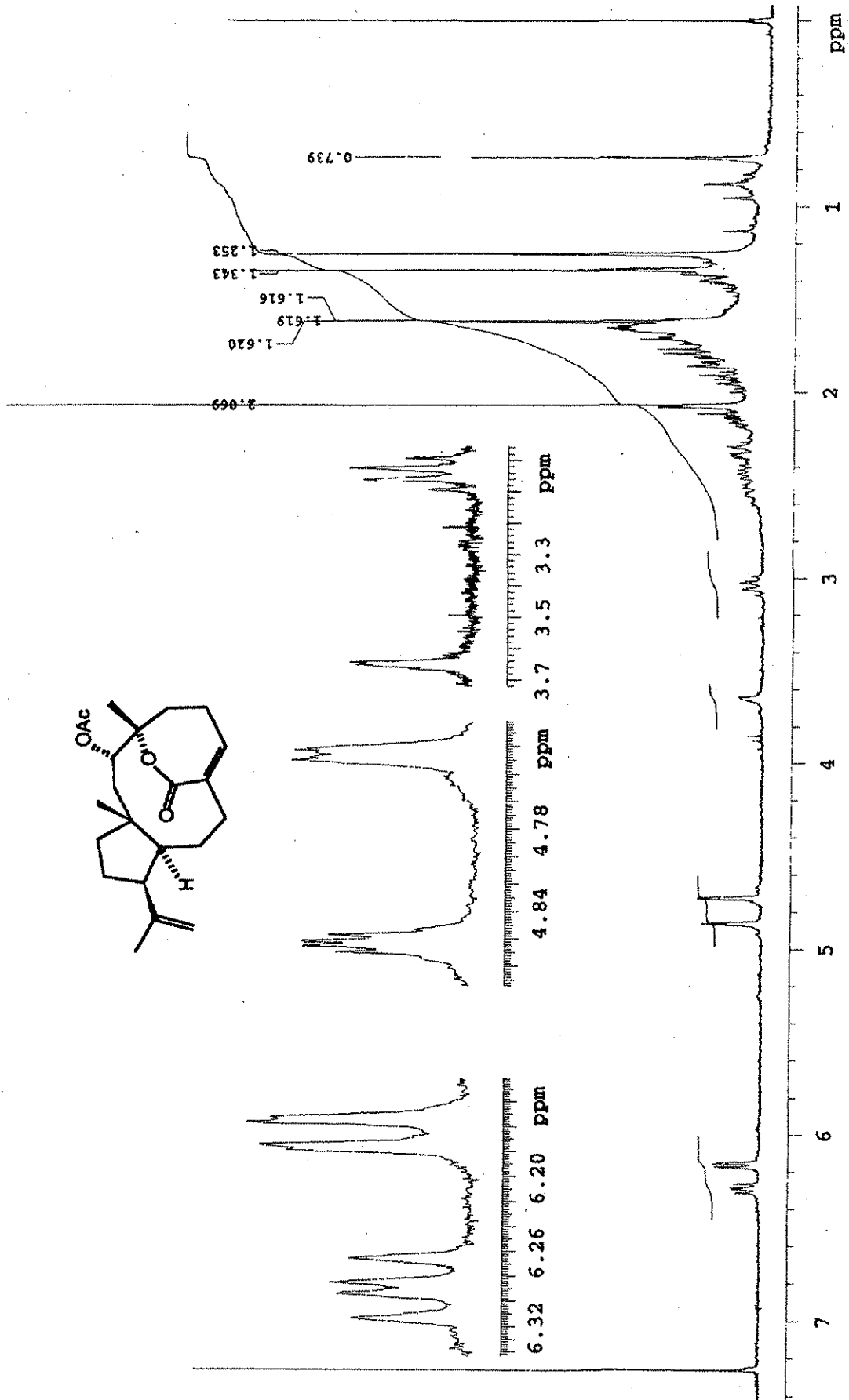
Espectro 29. Espectro de UV del compuesto 134

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



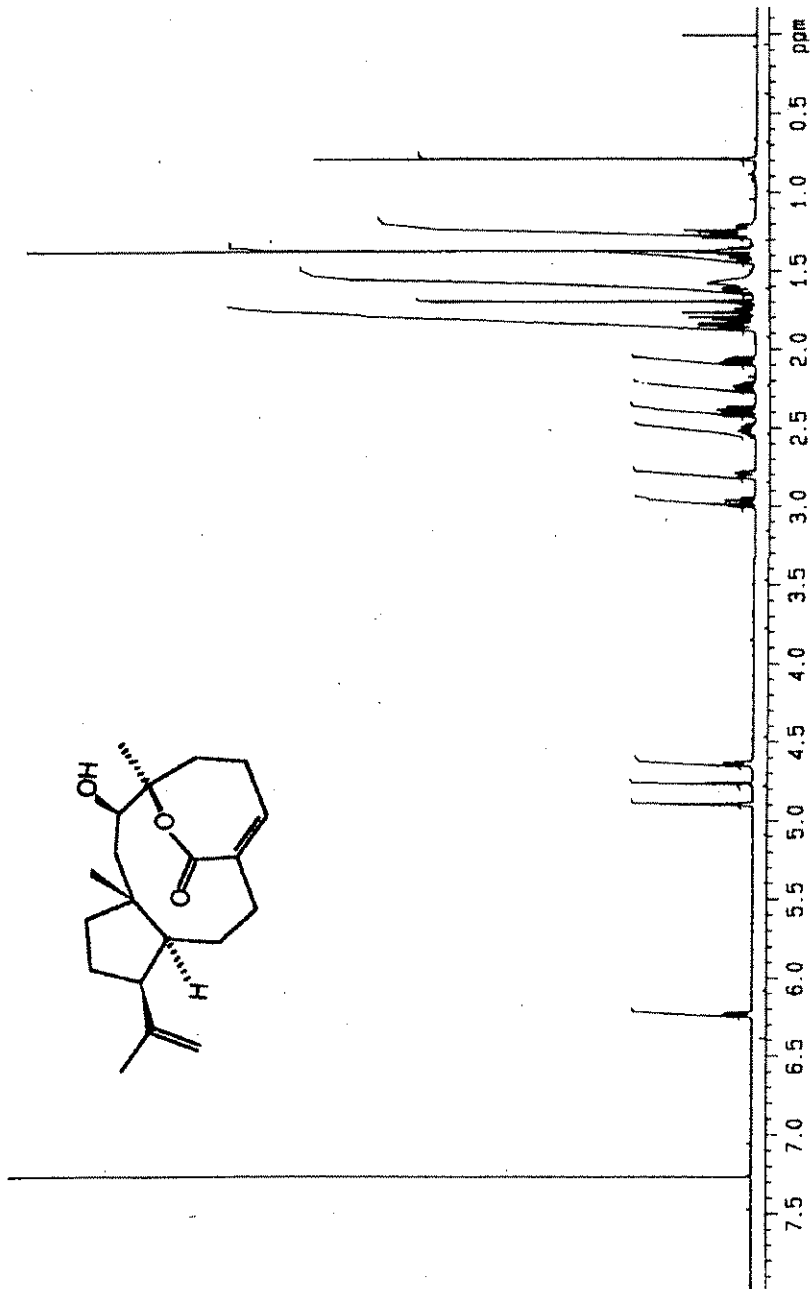
Espectro 30. Espectro de dicroísmo circular del compuesto 134

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



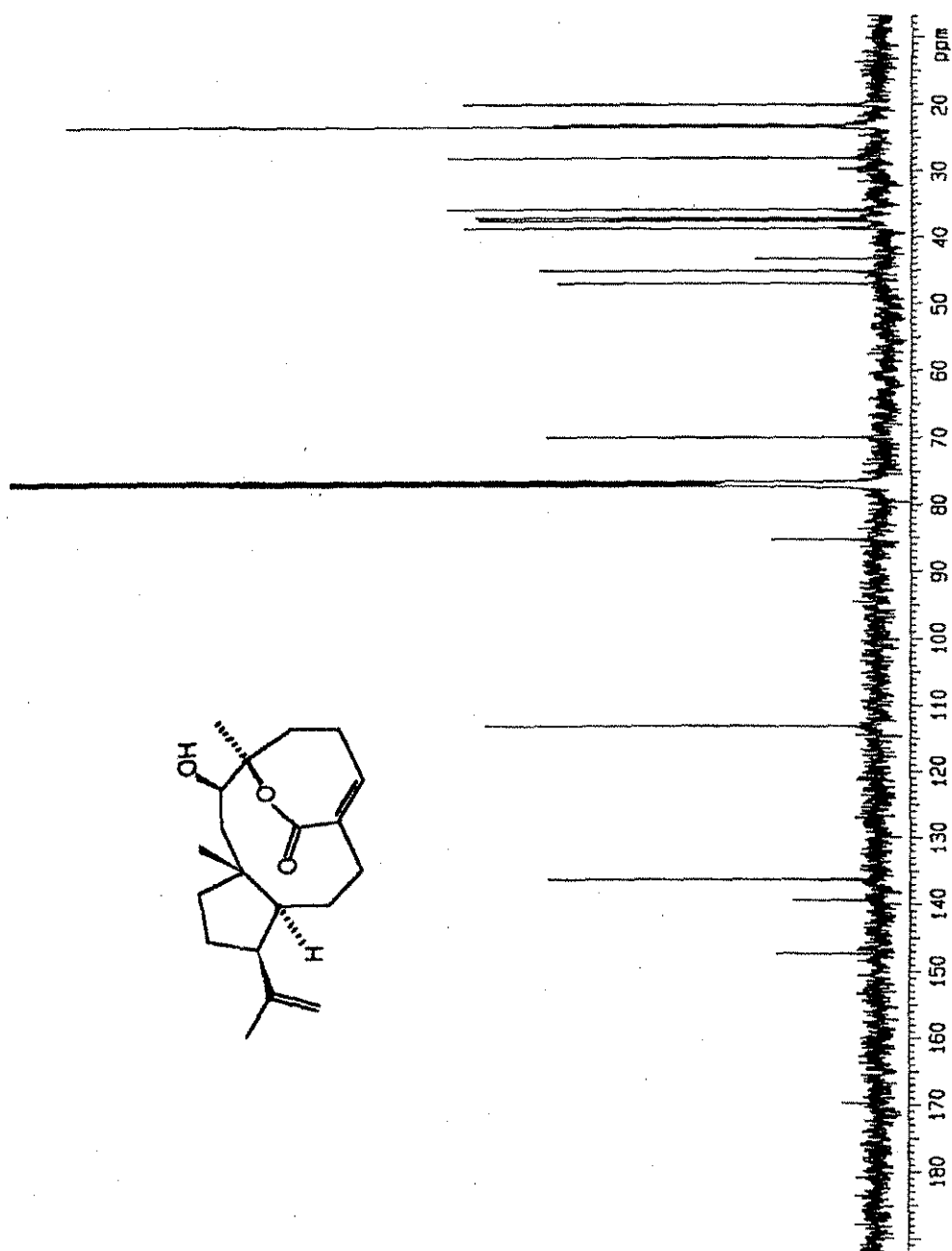
Espectro 31. Espectro de RMN ¹H del derivado acetilado del compuesto 134

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

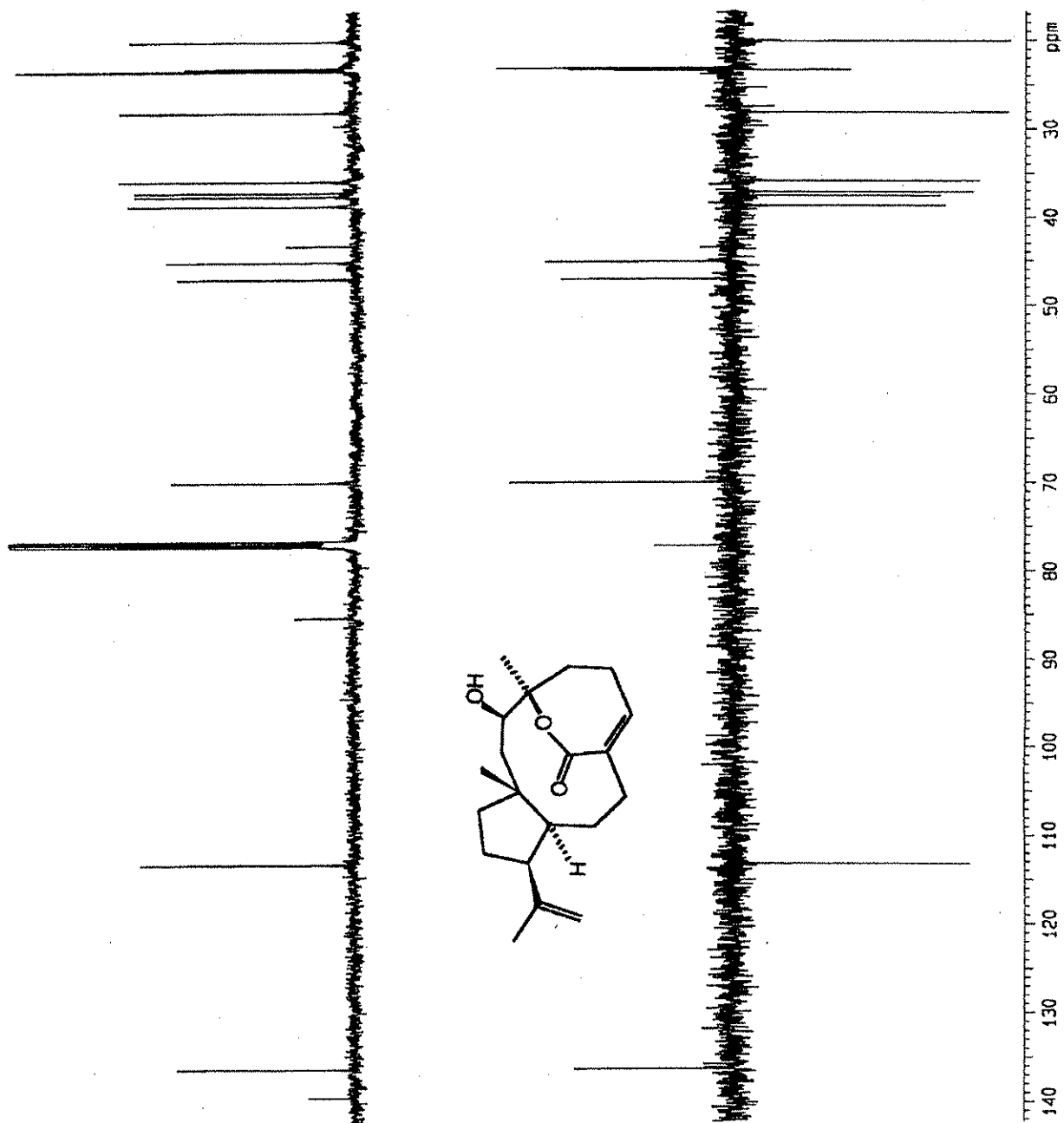


Espectro 32. Espectro de RMN ¹H del compuesto 135

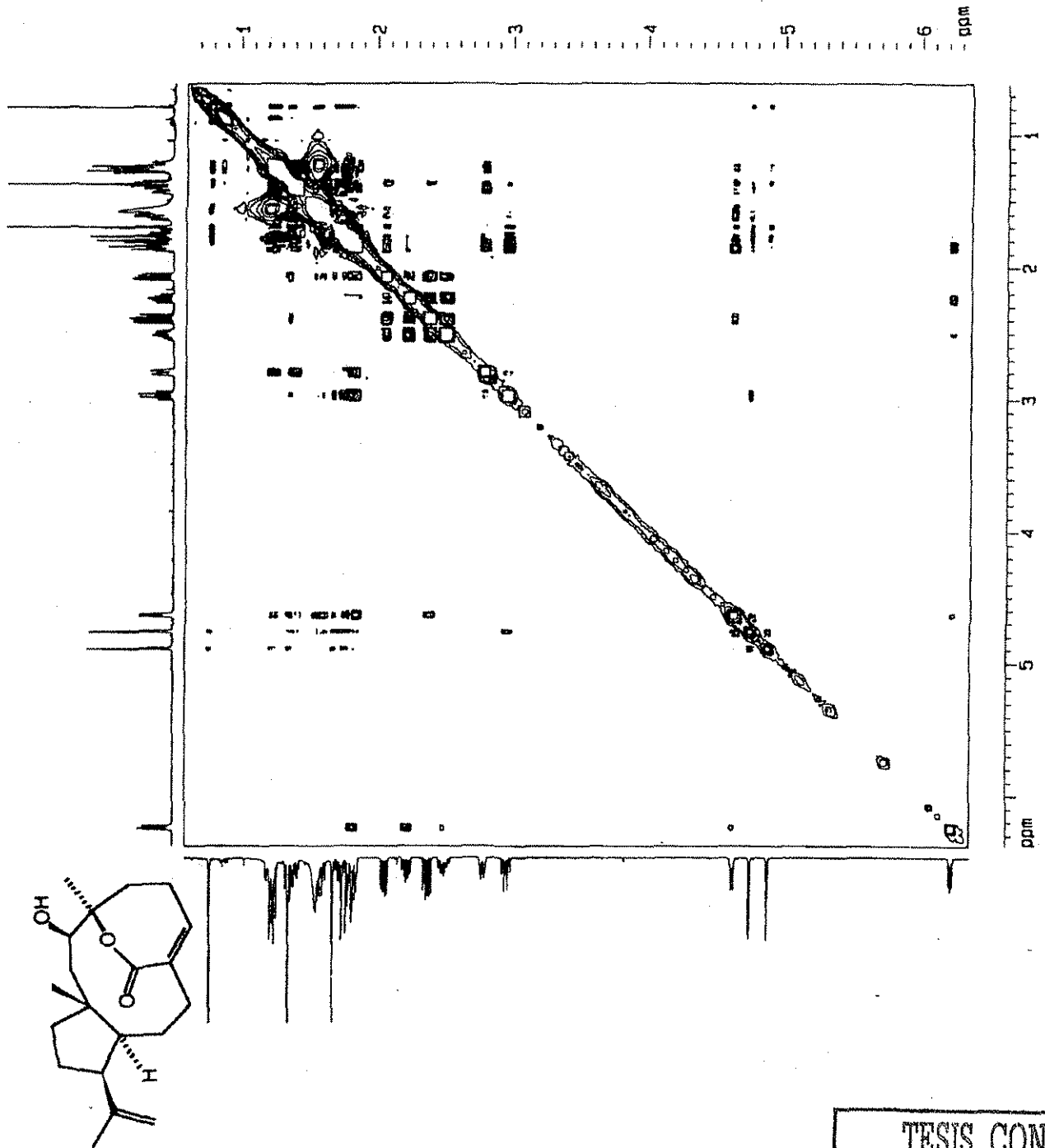
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

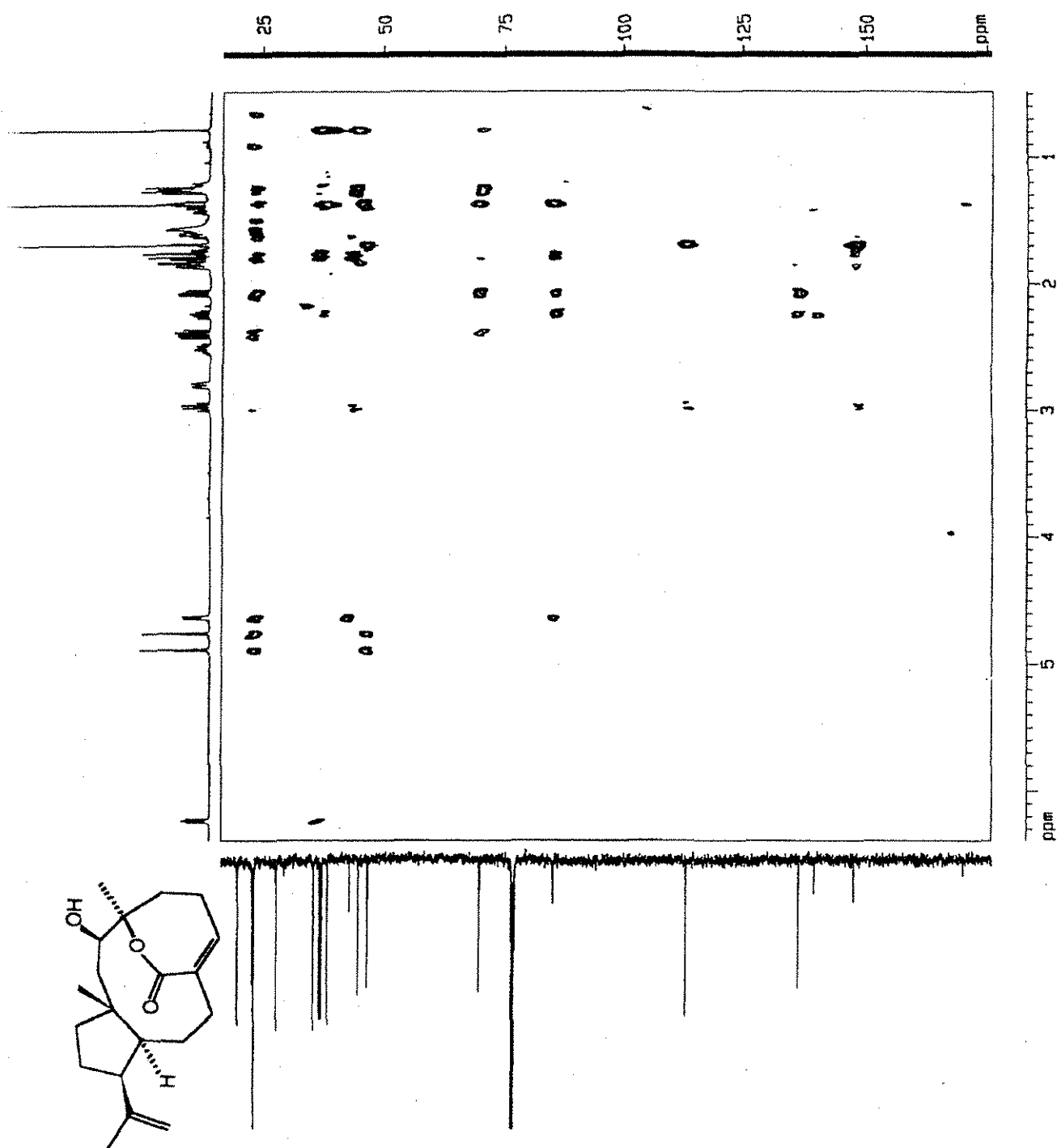
Espectro 33. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 135

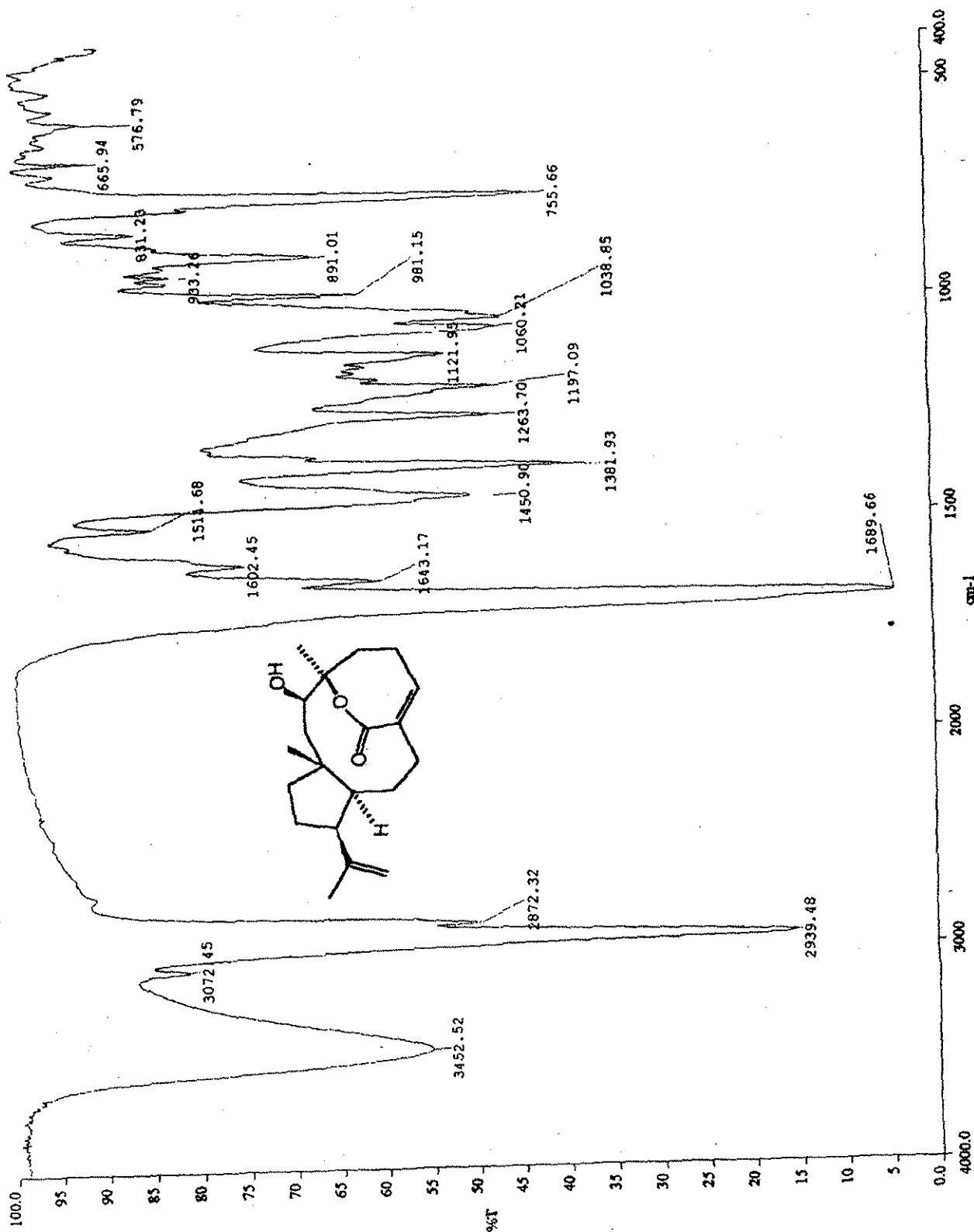
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 34. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT del compuesto 135

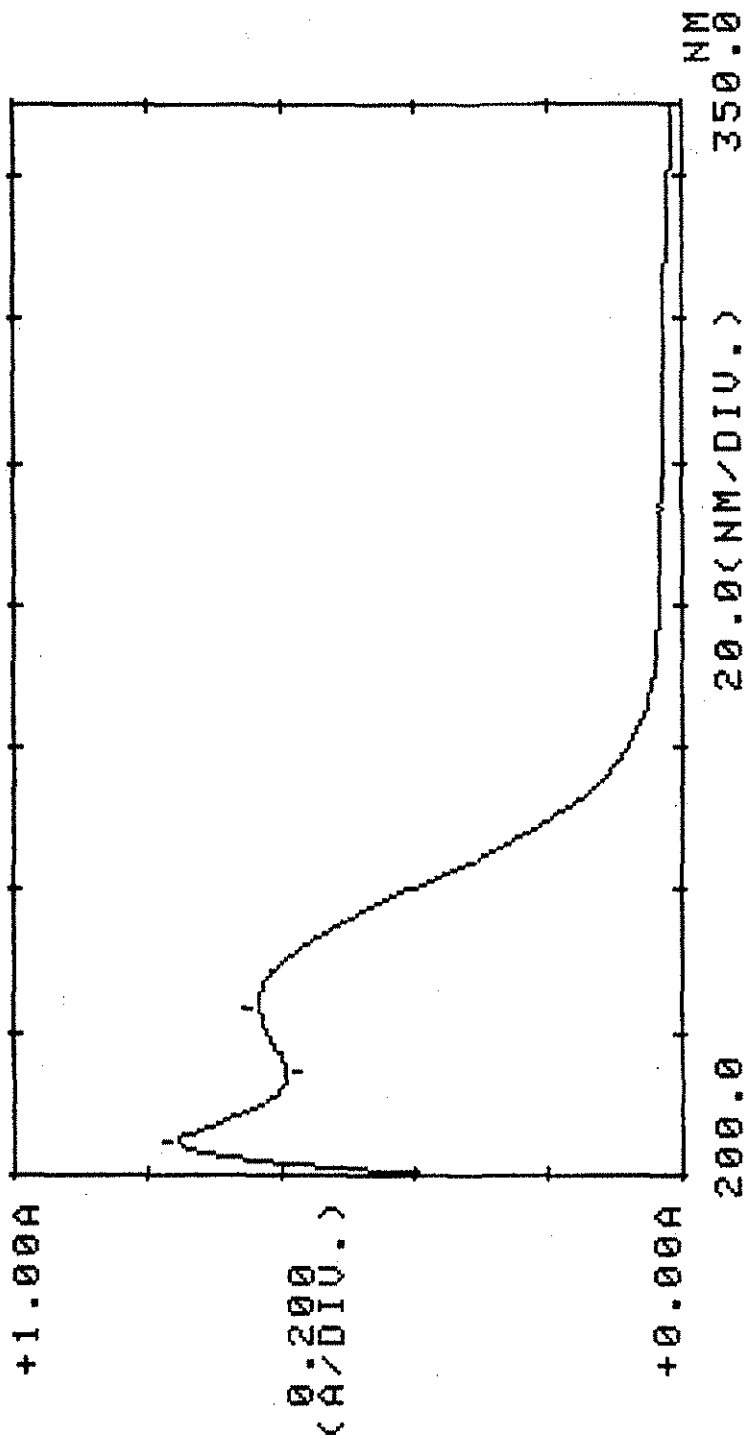
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 35. Espectro de RMN ^1H -NOESY del compuesto 135TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

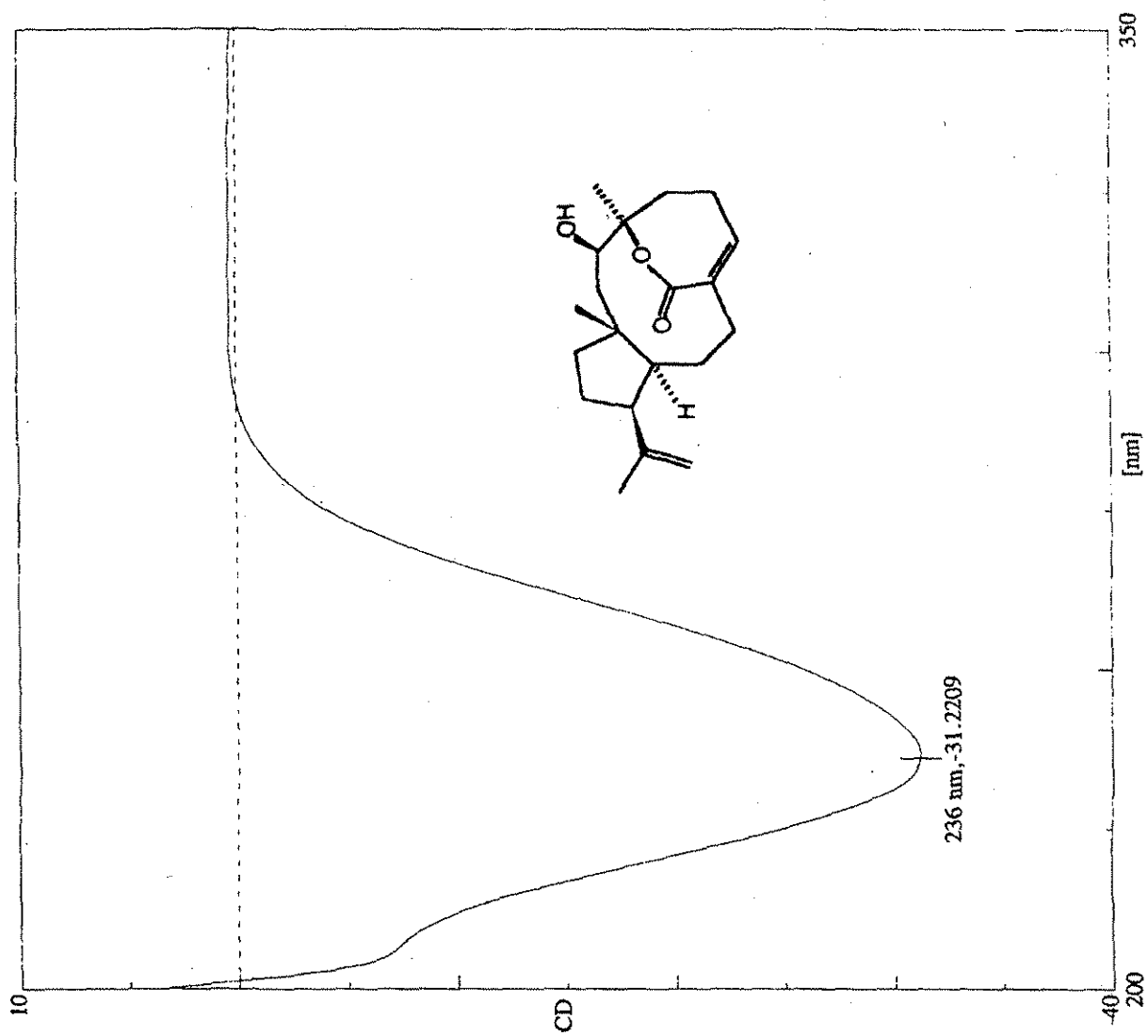
Espectro 36. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H - HMBC del compuesto 135



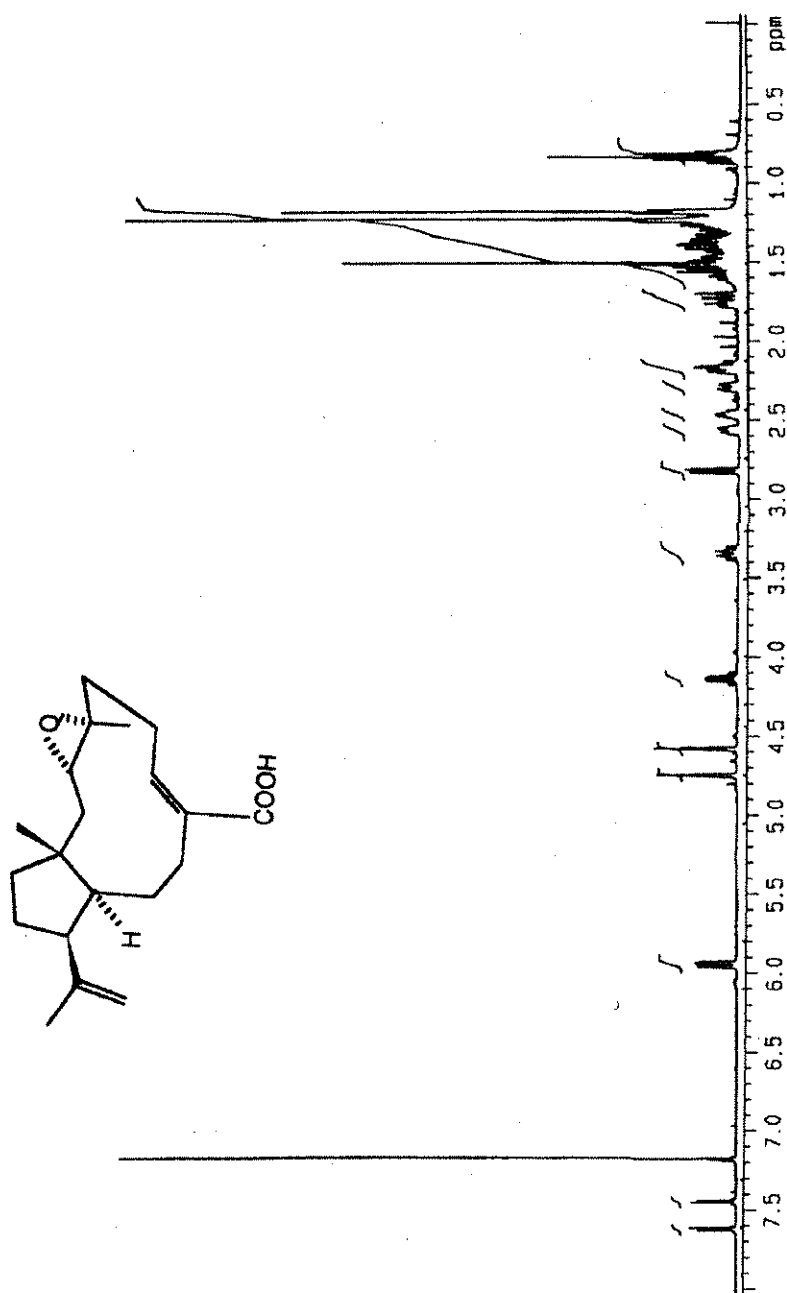
Espectro 37. Espectro en el IR del compuesto 135



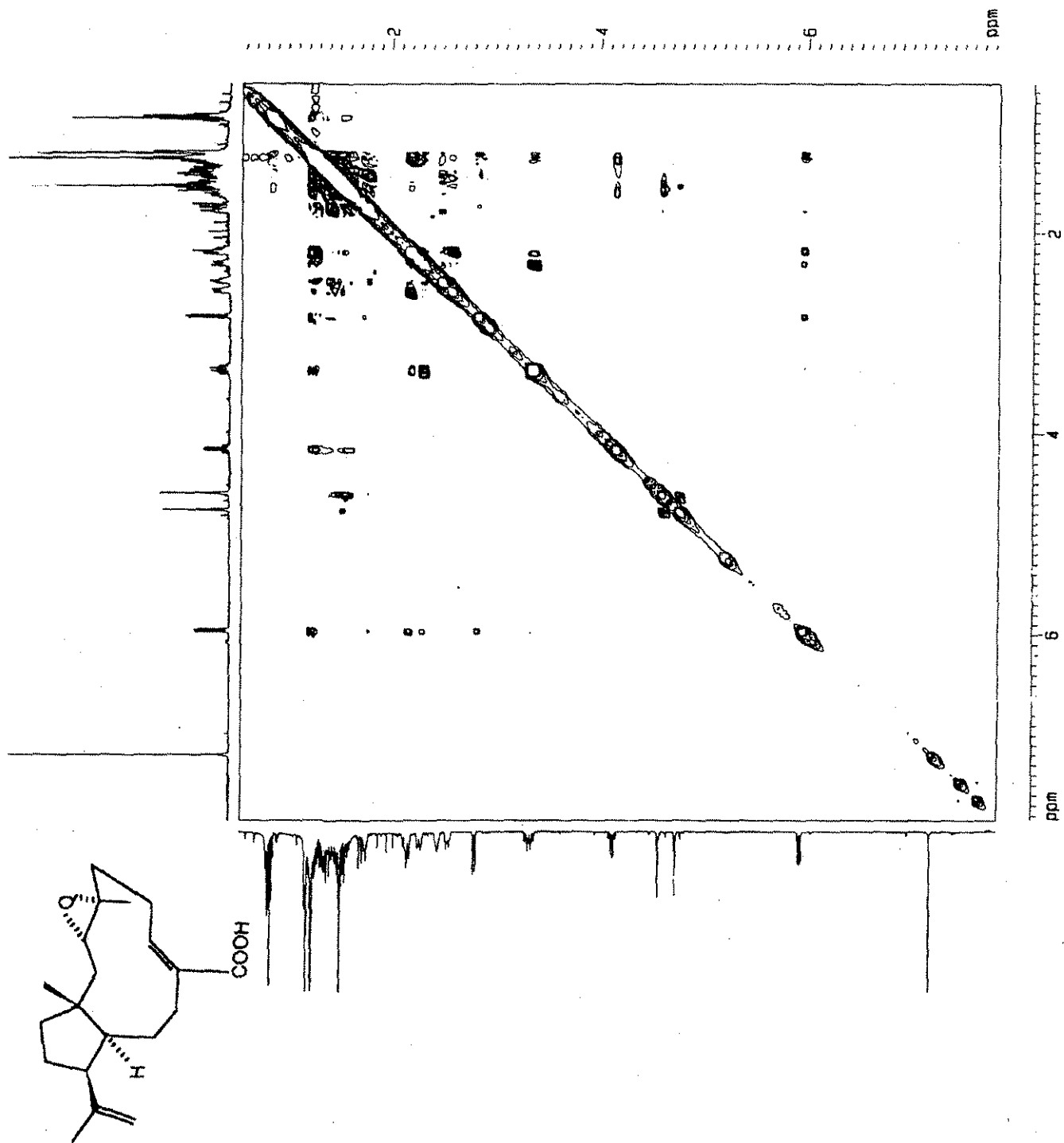
Espectro 38. Espectro de UV del compuesto 135

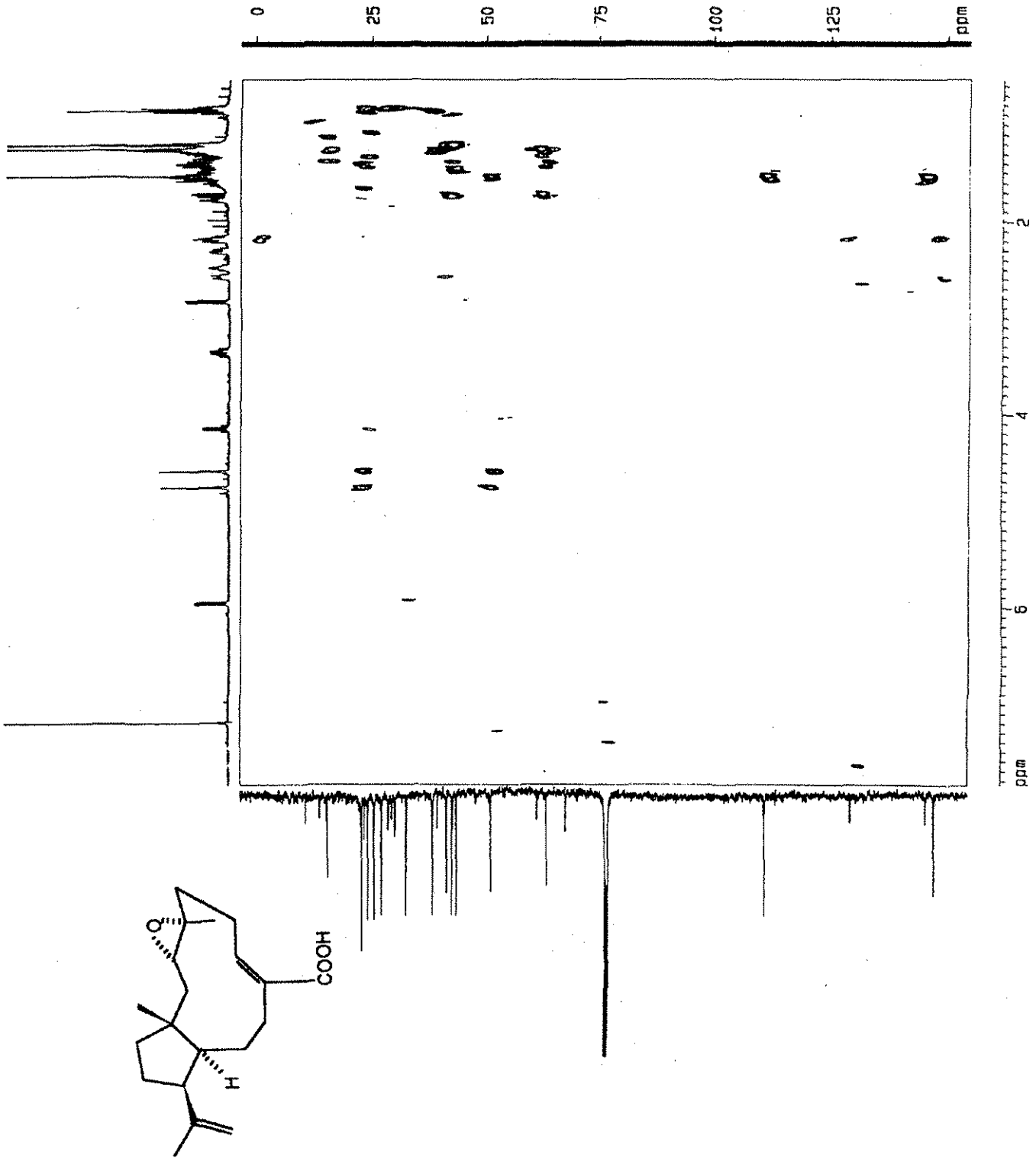


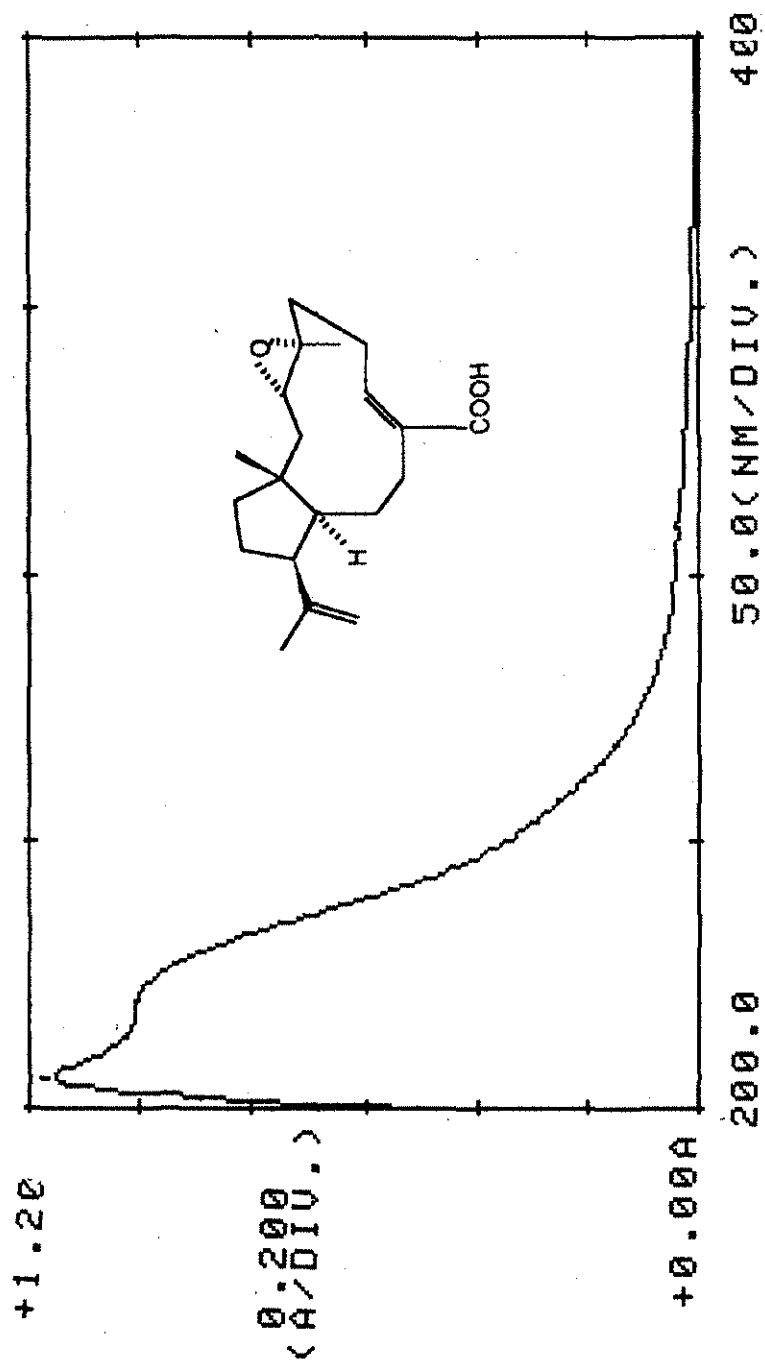
Espectro 39. Espectro de dicroísmo circular del compuesto 135



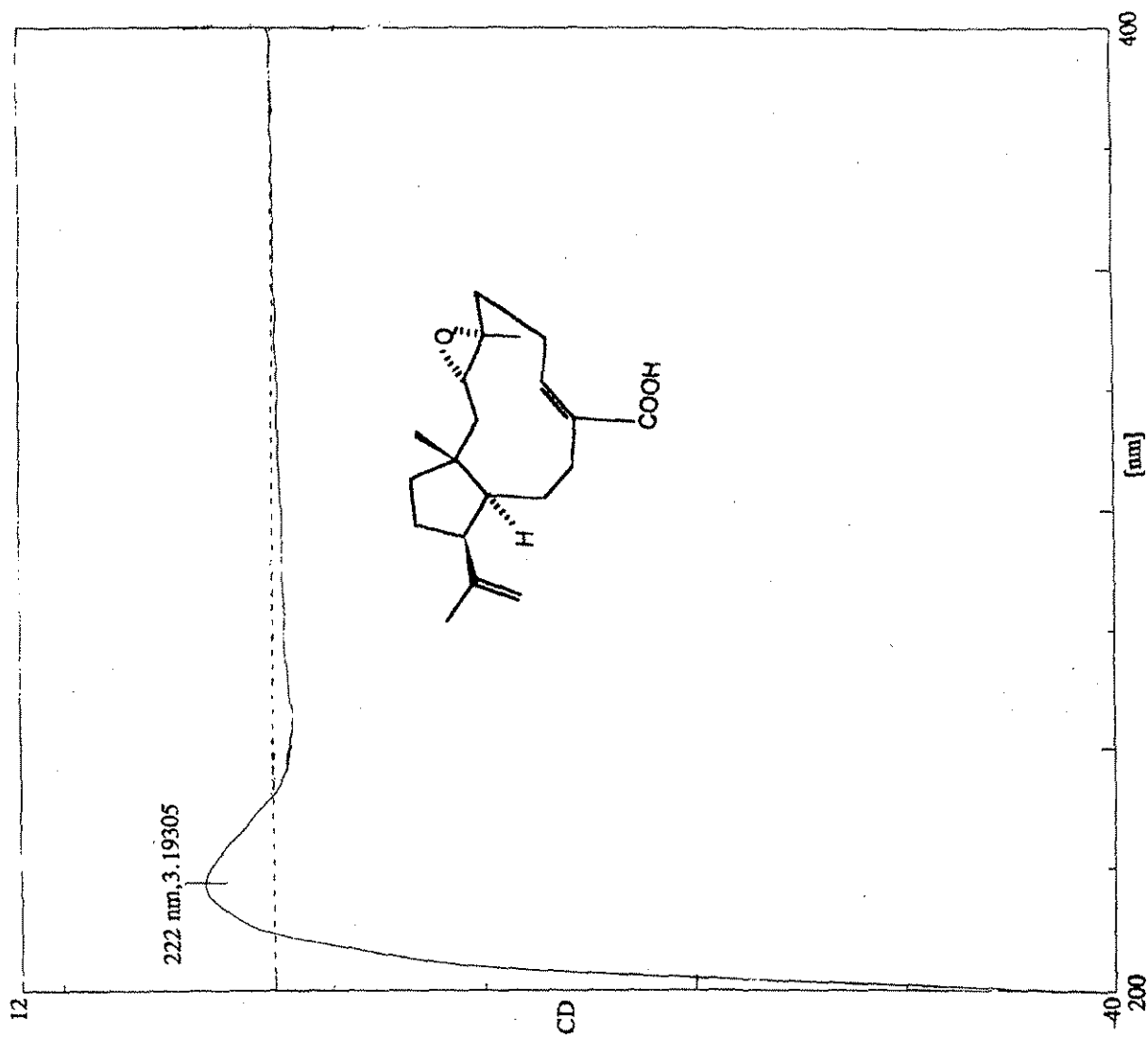
Espectro 41. Espectro de RMN ^1H del compuesto 136

Espectro 44. Espectro de RMN ^1H -NOESY del compuesto 136

Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C - ^1H - HMBC del compuesto 136



Espectro 48. Espectro de UV del compuesto 136



Espectro 49. Espectro de dicroísmo circular del compuesto 136

170

**ARTICULOS DERIVADOS DEL PRESENTE
TRABAJO**

ARTICULOS PUBLICADOS A LA FECHA



Structure, Conformation and Absolute Configuration of New Antifeedant Dolabellanes from *Trichilia trifolia*[☆]

María del Carmen Ramírez,^a Rubén A. Toscano,^b John Arnason,^c Semir Omar,^c
Carlos M. Cerda-García-Rojas^{d,*} and Rachel Mata^{a,*}

^aFacultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Mexico D.F., Mexico

^bInstituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, Mexico D.F., Mexico

^cDepartment of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada

^dDepartamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, Mexico D.F. 07000, Mexico

Received 28 March 2000; accepted 16 May 2000

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Abstract—The structures of three new dolabellane diterpenoids, (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid (**1**), (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (**2**) and (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hydroxydolabella-7,18-dien-4,17-olide (**3**), isolated from the wood of *Trichilia trifolia*, were elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy. The stereochemistry of **1** and **2** was confirmed by X-ray diffraction analysis, while that of **3** was ascertained from NOESY data. Comparison between experimental and calculated ¹H–¹H vicinal coupling constants and the analysis of molecular mechanics structures revealed that the 11-membered ring of **1** and **2** exists in a conformational equilibrium in solution, while in **3** this ring possesses a more rigid structure. The absolute configuration of **3** was established from its Cotton effects. Dolabellanes **1**–**3** caused significant feeding reduction by the rice weevil *Sitophilus oryzae*. © 2000 Published by Elsevier Science Ltd.

Introduction

The genus *Trichilia*, which consists of about 230 species mainly distributed in lowland tropical America, is distinguished by the production of structurally diverse limonoids, many of which are biologically active against insects.^{1–4} According to a recent review,² the probability of finding additional botanical insecticides from *Trichilia* appears high. Therefore, as a continuation of a program directed toward the discovery of insecticidal agents from Mexican Meliaceae,⁵ we have now investigated the wood of *Trichilia trifolia* L., locally known as ‘huesito’.⁶ Previous chemical studies on the seeds of this plant led to the isolation of several limonoids.⁷ In addition, it was demonstrated that an EtOH extract of this species significantly reduced the larval weight of the variegated cutworm, *Peridroma saucia*.⁸ As a part of the present investigation, it was found that the initial CH₂Cl₂ extract prepared from the wood of this species induced significant feeding deterrence against the rice weevil (*Sitophilus oryzae*). Subsequently,

fractionation of the active extract led to the isolation of three novel dolabellane diterpenes, namely, (1*R*,3*E*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid (**1**), (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide (**2**) and (1*R*,3*S*,4*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3-hydroxydolabella-7,18-dien-4,17-olide (**3**). In this paper, we describe the structure elucidation, the absolute configuration, detailed conformational analysis guided by molecular mechanics and the feeding deterrence activity against the rice weevil *S. oryzae* of compounds **1**–**3**.

Results and Discussion

Compound **1** was isolated as colorless crystals. Its molecular formula was determined as C₂₀H₃₀O₂ by HRMS in conjunction with the NMR data. Upon treatment with diazomethane, **1** readily formed the methyl ester **4**. This result, as well as the strong absorption at 1681 cm⁻¹ in the IR spectrum, was consistent with the presence of an α,β-unsaturated carboxylic acid. The UV absorption bands and the ¹³C NMR signal at δ_C 173.4 supported the conjugated functionality. The ¹H and ¹³C NMR spectra of **1**, shown in Tables 1 and 2, respectively, were quite similar to those of edunol⁹ and related compounds¹⁰ suggesting that **1** possessed the same basic dolabellane skeleton. The structure of dolabellane **1** was ascertained from the correlations found in the ¹H–¹H COSY, HMQC and HMBC contour

[☆] Taken in part from the Ph.D. thesis of María del Carmen Ramírez.

Keywords: dolabellanes; diterpenes; *Trichilia trifolia*; conformation; configuration; X-ray crystal structures; antifeedants.

* Corresponding authors. Tel.: +52-5622-5289; fax: +52-5622-5329; e-mail: rachel@servidor.unam.mx or ccerda@mail.cinvestav.mx

Table 1. ^1H NMR chemical shifts (measured in ppm at 500 MHz from CDCl_3 solutions with TMS as the internal standard), multiplicities and coupling constants (coupling constants are in Hz) of dolabellanes 1–3 (assignments are supported by COSY, HMQC and HMBC experiments)

	1	2	3
	2.22 dd (12.0, 13.0)	2.09 dd (14.0, 8.0)	1.98 br d (15.5)
	1.73 dd (13.0, 4.0)	1.91 dd (14.0, 8.0)	1.50 dd (15.5, 6.5)
	5.23 br dd (11.5, 3.0)	5.10 tq (8.0, 1.0)	4.68 br d (6.5) ^a
	2.31 m	2.35 dd (14.5, 4.0)	1.90 m (14.2, 6.3, 2.1) ^b
	2.18 m	2.78 dd (14.5, 3.3)	2.44 td (14.2, 13.3, 5.5) ^b
	3.32 m	5.22 tdd (3.8, 2.3, 1.5)	2.48 m (14.1, 13.3, 6.3, 5.4) ^b
	2.31 m	–	2.16 m (14.1, 8.3, 5.5, 2.1) ^b
	5.93 dd (11.8, 3.5)	6.82 br t (1.5)	6.14 br dd (8.3, 5.4) ^b
	2.46 br ddd (13.1, 7.6, 5.2)	1.95 ddd (13.0, 10.5, 6.0)	2.56 tdt (13.5, 3.0, 1.5)
	2.16 m	2.46 dtdd (13.0, 3.5, 2.5, 1.5)	2.25 br ddd (13.5, 3.8, 2.5)
	1.46 m	1.39 m	1.68 m
	1.29 ddd (14.6, 7.4, 4.5)	1.39 m	1.45 m
	1.73 m	1.69 m	1.72 m
	2.69 br q (7.5)	2.63 br td (9.5, 8.0)	3.02 br td (11.0, 8.5)
	1.60 m	1.60 m	1.64 m
	1.60 m	1.60 m	1.64 m
	1.48 m	1.42 m	1.37 td (12.5, 7.5)
	1.55 m	1.46 m td (12.0, 8.0)	1.44 m
	1.07 s	0.87 s	0.95 s
	1.57 s	1.61 s	1.33 s
	1.64 s	1.78 s	1.64 s
	4.67 m	4.75 dq (2.5, 1.0)	4.74 dq (2.5, 1.0)
	4.80 dq (2.5, 1.2)	4.90 dq (2.5, 1.2)	4.88 dq (2.5, 1.2)

^a Upon D₂O addition.

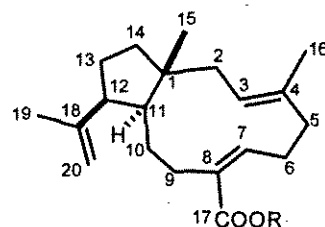
^b Data obtained by spectral simulation with a correlation coefficient of 0.56 Hz.

prots. Altogether, this evidence suggested that compound **1** might possess a dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid structure. Subsequently, an X-ray crystallographic analysis confirmed the structure and stereochemistry as depicted in Fig. 1. Compound **1** crystallizes with two chemically identical but crystallographically different molecules, which differ mainly in the orientation of the carboxylic acid moiety. The 5- and 11-membered rings are joined in a *trans* fashion and the stereochemistry of the double bonds at C-3 and C-7 is *E* and *Z*, respectively. The conformation in the solid state results in the 5-membered ring adopting an

envelope conformation with the C-12 atom lying out of the plane. The conformation of the cycloundecadiene ring is such that the vinylic methyl group (C-16) and the carboxylic group (C-17) are both oriented towards the same side of the molecule, with their directions varying from being parallel by 29.7°. The structure shows significant strain in the crystalline lattice as indicated by deviation from planarity of the double bonds. The C=C–C torsion angles are $\Delta(3,4)=169^\circ$, $\Delta(7,8)=168^\circ$. The molecules are packed in the crystal forming centrosymmetric dimers as frequently found in compounds containing a carboxylic acid unit.

Table 2. ^{13}C NMR chemical shifts of dolabellanes 1–3. (Measured in ppm at 125.7 MHz from CDCl_3 solutions with TMS as the internal standard. Assignments are supported by DEPT, HMQC and HMBC experiments)

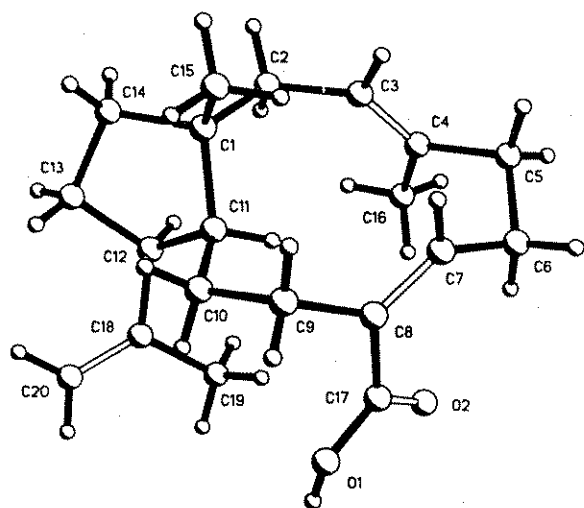
Carbon	1	2	3
1	46.0	46.3	43.3
2	43.4	41.3	48.0
3	125.4	129.1	70.7
4	135.2	128.9	85.0
5	39.8	40.4	35.6
6	25.9	80.4	23.4
7	149.4	148.0	133.3
8	129.3	134.3	140.3
9	32.5	26.3	34.8
10	25.5	21.9	27.2
11	42.0	42.2	49.3
12	50.8	50.3	51.0
13	28.4	28.5	27.7
14	42.2	41.1	42.8
15	24.0	25.4	19.8
16	15.5	20.1	22.6
17	173.4	173.6	171.9
18	146.8	145.9	147.0
19	23.2	23.4	22.9
20	111.3	112.3	113.6



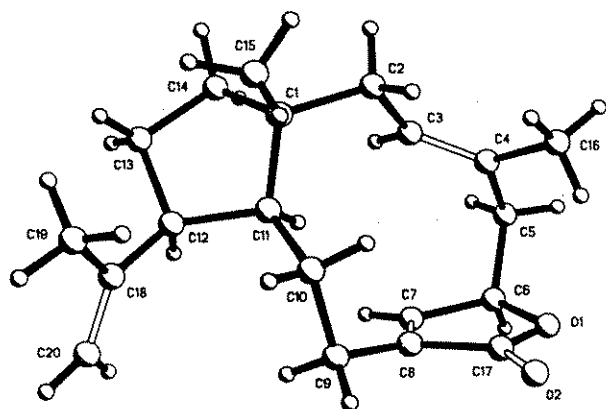
1: R = H
4: R = Me

The molecular formula of **2** was established as $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$ by HRMS. The IR spectrum showed the presence of an α,β -unsaturated γ -lactone. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **2** (Tables 1 and 2) were similar to those of **1**. ^1H – ^1H COSY, HMQC and HMBC experiments confirmed this assumption. The structure of **2** was unambiguously assigned as (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-dolabella-3,7,18-trien-6,17-olide by X-ray crystallography (Fig. 2). Compound **2** also crystallizes with two chemically identical but crystallographically different molecules, the conformations of which are similar but very different from those of **1** (Fig. 1).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

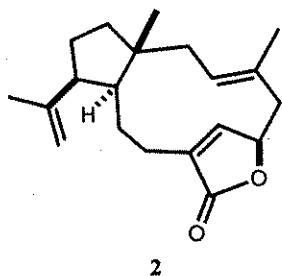


1



2

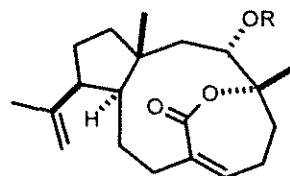
Figure 1. X-Ray diffraction structures of 1 and 2.



2

Dolabellane 3 had the molecular formula $C_{20}H_{30}O_3$, as determined by HRMS and ^{13}C NMR, signifying six sites of unsaturation. A direct comparison between the NMR spectra of 3 (Tables 1 and 2) with those of 1 and 2 indicated the structural similarity of these compounds and revealed the presence of two features unique to 3, namely, a

secondary carbinol functionality and an α,β -unsaturated ϵ -lactone moiety. The carbinol group was supported by the presence of one oxygen-bearing methine at δ_H 4.68 (br m), which became a broad doublet upon addition of D_2O . In the HMQC spectra, this signal correlated with that at δ_C 70.7. The IR absorption band at 3624 cm^{-1} and the formation of the monoacetyl derivative 5 confirmed the presence of a free hydroxyl group. The ^{13}C NMR signals at δ_C 85.0 and 171.9 as well as the IR band at 1702 cm^{-1} were consistent with the presence of an α,β -unsaturated ϵ -lactone moiety. The dolabellane skeleton in 3 and the allocation of the functional groups were confirmed by an HMBC experiment. Thus, an unusual four-bond correlation was found between C-17 and the protons of Me-16, which is feasible due to the perfect W-type arrangement present in the C(17)–O(4)–C(4)–C(16)–H(16) moiety. This correlation, together with those of C-4/H-2a,H-3,H-5b,H-6b,H-16 and C-17/H-9a,H-9b indicated that the ϵ -lactone was positioned between C-4 and C-17. On the other hand, the correlations C-1/H-2a,H-2b; C-4/H-2a,H-3; C-3/H-2a,H-2b,H-5a,H-5b,H-16; and C-5/H-3,H-16 were in agreement with the disposition of the secondary hydroxyl at C-3. The stereochemistry and conformation in solution of 3 was determined taking into account the correlations found in its NOESY spectrum in combination with a molecular mechanics¹¹ model (Fig. 2; $E_{MMX}=51.9\text{ kcal/mol}$), which was validated by comparing the calculated^{12,13} and the observed vicinal coupling constants (Table 3). As represented in Fig. 2, the correlations H-3/H-5b,H-7,H-10b,H-15 and H-7/H3,H9b indicated that these atoms were located in the β -side of the molecule, supporting the Z configuration of the C-7 double bond and the stereochemistry at C-3 and C-4. The strong NOE interactions H-11/H-2a,H-9a,H-12 located these atoms in the α -side of the structure, revealing not only the *trans* stereochemistry between C-15 and H-11, but also the *cis* relationship between C-15 and the isopropenyl side chain, as in 1 and 2.



3 : R = H
 5 : R = Ac

The conformation in solution of 1 and 2 were also analyzed employing the same methodology. For dolabellane 1, the strong NOESY interactions between H-3/H-7,Me-15; H-7/H-9b,Me-15; and H-9b/Me-15, together with the *trans*-diaxial couplings $J_{2a,3}=12.0$ and $J_{6a,7}=11.8$ Hz, indicated that the C(2)–C(3)–C(4)–C(5)–C(6)–C(7) fragment of 1 was quite rigid, in contrast with the rest of the structure, where the averaged couplings (ca. 7.5 Hz) observed for H-9a, H-10b and H-12 evidenced the presence of a dynamic conformational behavior. The search for the minimum energy conformations by means of molecular mechanics indicated the presence of an equilibrium between two relevant conformations (1a and 1b, Fig. 3), whose geometry in the C(2)–C(3)–C(4)–C(5)–C(6)–C(7)–C(8) fragment is

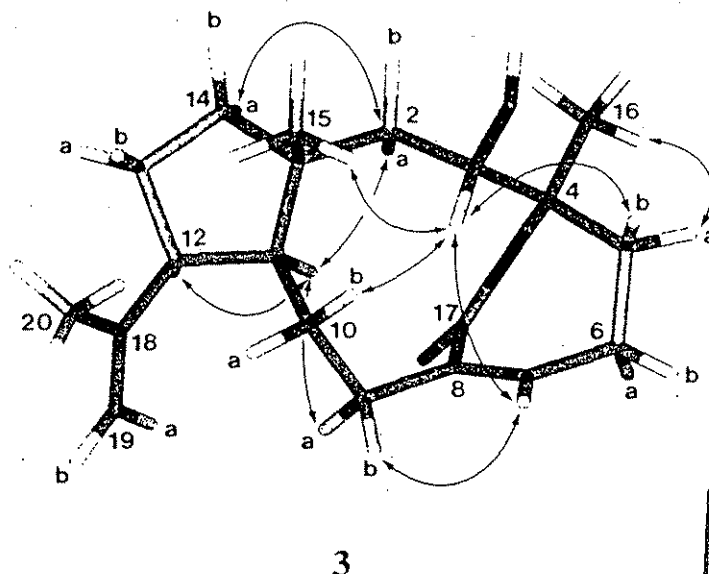


Figure 2. Minimum energy structure of **3**, showing relevant NOESY correlations.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

identical. The minimum energy conformation **1a** ($E_{\text{MMX}}=37.8$ kcal/mol) was in close agreement with the conformation found in the solid state. The presence of the second minimum conformation **1b** at ($E_{\text{MMX}}=38.7$ kcal/mol) was experimentally supported by strong NOESY interactions between H-7/H10b and H-10b/Me-15 (Fig. 3).

In the case of dolabellane **2**, its NOESY spectrum displayed the correlations H-3/H-5a, H-7, H-11 (located in the α -side of the molecule) and H-3/H-5b, H-15 (located on the β -side). These data, together with the coupling constants $J_{2a,3}=J_{2b,3}=8.0$ Hz, clearly indicated the presence of a conformational equilibrium. This was in agreement with the conformational search, also achieved by molecular mechanics, which exhibited the presence of two relevant conformers represented in Fig. 3. Structure **2a**, which was very similar with that found in the solid state, corresponded

to the most stable conformation in solution with $E_{\text{MMX}}=47.8$ kcal/mol, while **2b**, obtained by simultaneous rotation of the C(2)–C(3) and C(4)–C(5) bonds, corresponded to the second minimum conformation ($E_{\text{MMX}}=48.5$ kcal/mol).

Regarding the absolute configuration of the dolabellanes isolated in the present study, compound **3** was selected for the configurational analysis because, as revealed by the conformational analysis reported herein, it possesses a rigid structure and also an inherently dissymmetric chromophore, since the C=C–C=O moiety is not planar. This molecular arrangement was also evidenced by the low molar absorptivity of the *K*- and *R*-bands in the UV spectrum. According to Sznatzke,¹⁴ the rotatory strength of such chromophores can assume values approximately 100 times greater than inherently symmetric but dissymmetrically perturbed chromophores. In addition, he stated that the rules for unsaturated ketones can be applicable to unsaturated lactones.¹⁴ The CD spectrum of **3** displayed the *K*-band absorption at 245 nm with a positive value of $\Delta\epsilon=+2.0\times 10^5$, while the *R*-band was observed at 300 nm with $\Delta\epsilon=-4.6\times 10^3$. Therefore, according to the rules for C=C–C=O systems,^{14,15} these values correspond to a positive chirality as shown by the minimum energy structure of **3**, where the C=C–C=O dihedral angle is $\Phi=+136^\circ$.

Compounds **2** and **3** might be biogenetically derived from acid **1**. Thus, hydroxylation of **1** would give (1*R*,3*E*,6*R*,7*Z*,11*S*,12*S*)-6-hydroxydolabella-3,7,18-trien-17-oic acid, which upon internal lactonization would lead ultimately to compound **2**. On the other hand, the lactone ring in compound **3** can be envisaged as arising via nucleophilic attack of the acid group on to the epoxide moiety in intermediate (1*R*,3*S*,4*S*,7*Z*,11*S*,12*S*)-3,4-epoxydolabella-7,18-dien-17-oic acid, biosynthesized by epoxidation of the C-3/C-4 double bond of compound **1**. According to the molecular model of this intermediate, it is possible that the *Z* configuration of the C-7/C-8 double bond could facilitate and also direct the lactonization process. Therefore,

Table 3. Selected dihedral angles (ϕ_{MMX} in degrees), calculated coupling constants (J_{calc} in Hz) and observed coupling constants (J_{obs} in Hz) for dolabellane **3**

H(x)–C–C–H(y) x,y	ϕ_{MMX}	J_{calc}	J_{obs}
2a,3	–107	2.8	2.5 ^a
2b,3	+139	6.1	6.5
5a,6a	–51	4.7	6.3 ^b
5a,6b	+65	2.1	2.1 ^b
5b,6a	–164	12.7	13.3 ^b
5b,6b	–48	5.4	5.5 ^b
6a,7	+131	6.5	5.4 ^b
6b,7	+16	6.3	8.3 ^b
9a,10a	+69	1.6	3.0
9a,10b	+180	13.3	13.5
9b,10a	–46	5.6	3.5
9b,10b	+65	2.2	2.5
11,12	–4	10.3	11.0
12,13a	+38	6.8	8.5
12,13b	+160	11.2	11.0
13a,14a	–46	5.7	7.5
13b,14b	–166	12.7	12.5

^a Estimated from $W_{1/2}$.

^b Determined by spectral simulation.

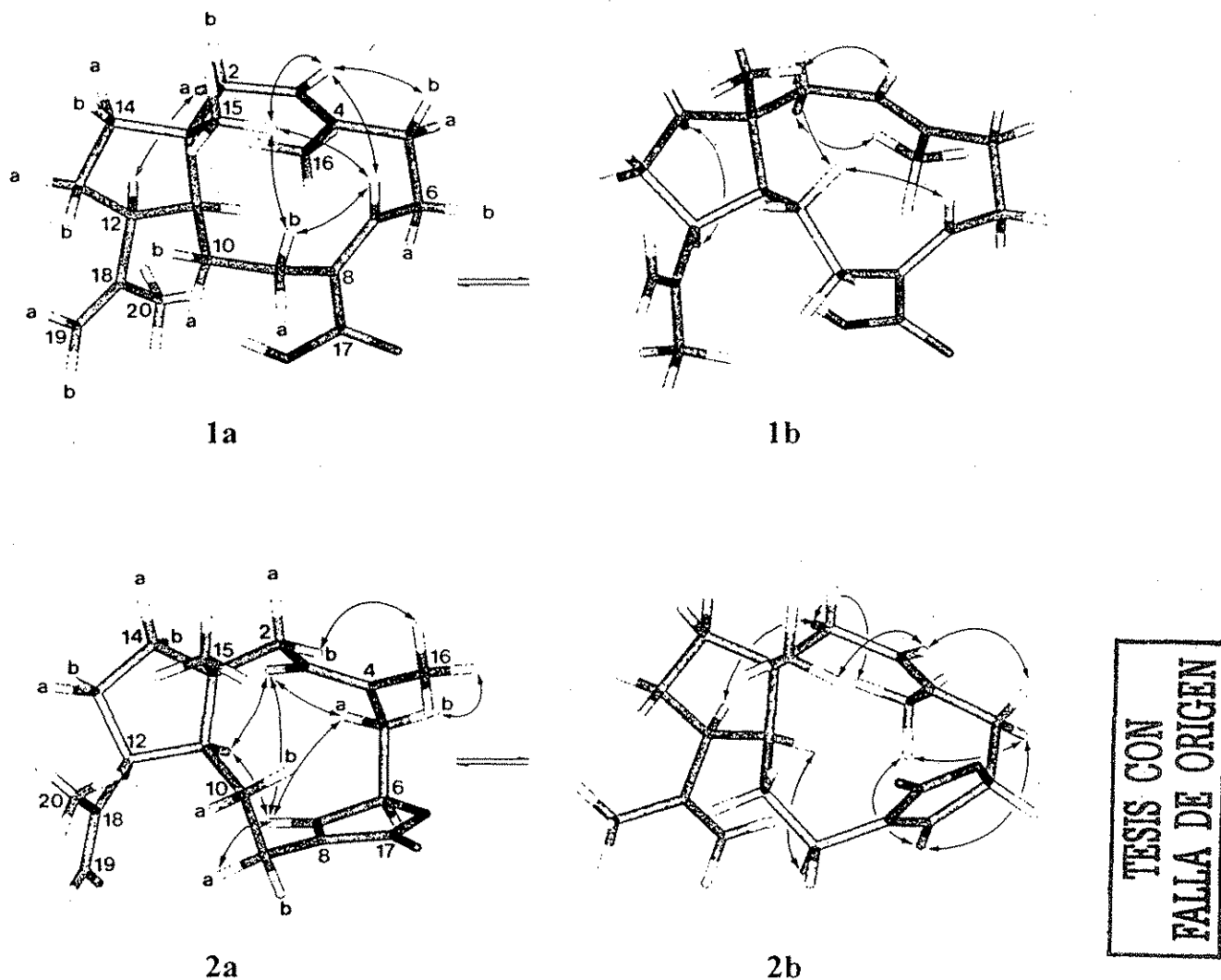


Figure 3. Minimum energy structures of **1** and **2**, showing the conformational equilibrium and relevant NOESY correlations.

based on biogenetic considerations, **1** and **2** should have the same absolute configuration as **3**. It is relevant to mention that this is the first description of the absolute configuration of higher plant dolabellanes. Interestingly, our results revealed that higher plants, liverworts and algae dolabellanes possess the same absolute configuration. On the other hand, there seems to be an antipodal relationship between coelenterate and higher plant dolabellanes. Compounds **1**–**3** are the first dolabellanes reported so far¹⁶ to have the isopropenyl group at C-12 in the β -configuration. From a chemotaxonomic point of view, the results of

the present investigation represent the first report on the presence of dolabellane diterpenes in a member of the Meliaceae family and the second from higher plants.

Finally, based on the flour-disk bioassay,¹⁷ compounds **1**–**3** showed significant ($P=0.05$) feeding reduction with *S. oryzae* (Table 4). However, compounds **4** and **5** were inactive suggesting that the carboxyl and hydroxyl functionalities in **1** and **3**, respectively, are important structural requirements for the observed activity. The bioassay results suggest that these compounds may have a defensive role in the host plant.

Table 4. Antifeedant activity of the extract from the wood of *T. trifolia* and dolabellanes **1**–**5**. Means followed by * are significantly different from control in Bonferroni contrasts. Values in parentheses indicate standard deviation. P (significance level)=0.05

Treatment	Mean diet consumed (mg/day)
Control	7.61 (1.59)
Extract	1.62 (0.37)*
1	1.17 (0.28)*
2	3.36 (1.42)*
3	1.03 (0.53)*
4	6.74 (0.68)
5	6.61 (0.20)

Experimental

General methods

Melting points were measured on a Fisher-Johns apparatus and are uncorrected. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. UV spectra were obtained on a Shimadzu 160 UV spectrophotometer in MeOH solutions. CD spectra were measured on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25°C in MeOH. IR spectra were recorded

NaBr discs on a Nicolet FT-5X-IR spectrophotometer. ^{13}C (125 MHz) and ^2D NMR spectra (all ^1H and ^{13}C) were recorded either on a Bruker DMX500 or on a Bruker VXR-300S instrument using TMS as the internal standard. Mass spectra were recorded on a JEOL JMS-AX505 HA instrument, at an ionization energy of 70 eV. HPLC was carried out with a Waters HPLC instrument equipped with a Waters 996 UV photodiode array detector at 209–214 nm, using a silica gel column (19 mm \times 300 mm) at a flow rate of 6.7 mL/min. Control of the equipment, data acquisition, processing, and management of chromatographic information were performed by the Millennium 2000 software program (Waters). Column chromatography: silica gel 60 (Merck, 70–230 mesh); TLC: silica gel 60 F_{254} (Merck).

Plant material

The wood of *T. trifolia* was collected in Yucatán, México in June 1996. A voucher specimen (J.C. Tun 643) is deposited in the Herbarium of the Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), México.

Extraction and isolation

The air-dried and milled wood (6.2 kg) was extracted with CH_2Cl_2 (12 L \times 3). Evaporation of the solvent in vacuo afforded 130 g of a brown residue. The concentrated extract was subjected to Si gel (1300 g) column chromatography using 10:0 \rightarrow 0:10 gradient mixtures of hexane–EtOAc as the eluent. Fractions were pooled based on their TLC profile to yield 14 primary fractions, designated as I–XIV. Fraction VII (2.15 g), eluted with hexane–EtOAc (95:5) was further chromatographed on Si gel (44 g) using hexane–EtOAc (97:3) as eluent. Five tertiary fractions were obtained (VIIA–VIIE). Fractions VIIB (133 mg) and VIID (431 mg) were purified by HPLC [hexane–*i*-PrOH–MeOH (90:5:5)] to yield **1** (304 mg) and **2** (15 mg), respectively. Primary fraction XII (4 g), eluted with hexane–EtOAc (8:2), was subjected to column chromatography on Si gel (60 g) using a gradient of hexane–EtOAc (10:0 \rightarrow 0:10) to yield twelve fractions XIII–XXI. Fraction XIIG (360 mg) gave 10 mg of pure vanillin after purification by HPLC (hexane–*i*-PrOH–MeOH 90:5:5). Fraction XIIH (316 mg) was repeatedly chromatographed on HPLC (hexane–*i*-PrOH–MeOH 90:5:5) to give **3** (51 mg).

(1R,3E,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid (1), colorless crystals; mp 100–103°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -131$ ($c=1$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.14), 225 (3.92) nm; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) -7.3×10^5 (213), $+2.6 \times 10^4$ (245), -1.8×10^4 (263); IR (KBr) ν_{max} 3420, 3082, 2920, 1681, 1641, 1271, 882 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Tables 1 and 2); EIMS m/z 302 [M^+ (78)], 287 (8), 259 (23), 257 (8), 233 (11), 219 (9), 191 (44), 189 (18), 164 (91), 136 (89), 135 (100), 121 (98), 93 (48), 79 (33), 67 (31), 41 (29); HRMS m/z 302.2248 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, 302.2246).

(1R,3E,6R,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-4,17-olide (2), colorless crystals; mp 83–86°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +32$ ($c=1$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (3.86) nm; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) $+3.5 \times 10^5$ (213); IR (KBr) ν_{max} 3621, 2976, 1750, 1046 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Tables 1 and

2); EIMS m/z 300 [M^+ (28)], 273 (4), 257 (8), 232 (26), 206 (6), 205 (6), 189 (7), 165 (15), 136 (100), 121 (68), 93 (90), 79 (18), 67 (11), 55 (8); HRMS m/z 300.2085 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$, 300.2089).

(1R,3S,4R,7Z,11S,12S)-3-hydroxydolabella-7,18-dien-4,17-olide (3), colorless crystals; mp 196–197°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +16$ ($c=1$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (3.82), 228 (3.74) nm; CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) $+2.0 \times 10^5$ (245), -4.6×10^3 (300); IR (KBr) ν_{max} 3624, 2976, 1702, 1389, 1046, 887 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR (Tables 1 and 2); EIMS m/z 318 (15), 300 (20), 285 (12), 274 (63), 257 (30), 246 (35), 231 (21), 216 (30), 204 (34), 191 (30), 173 (32), 161 (40), 146 (70), 135 (100), 121 (79), 107 (79), 93 (79), 79 (52), 67 (52), 43 (20); HRMS m/z 318.2192 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$, 318.2195).

(1R,3E,7Z,11S,12S)-dolabella-3,7,18-trien-17-oic acid methyl ester (4). Methylation of **1** (20 mg) with an excess of ethereal diazomethane afforded **4** (12 mg); mp 122–124°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -152$ ($c=1$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.06), 227 (3.81) nm; IR (KBr) ν_{max} 3077, 2924, 2862, 1713, 1195, 884; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.07 (3H, s), 1.29 (1H, ddd, $J=14.6, 7.4, 4.5$ Hz), 1.39 (1H, m), 1.46 (1H, m), 1.53 (1H, m), 1.55 (3H, s), 1.59 (2H, m), 1.62 (3H, s), 1.73 (1H, m), 1.73 (1H, dd, $J=13.0, 4.0$ Hz), 2.16 (1H, m), 2.18 (1H, m), 2.22 (1H, dd, $J=12.0, 13.0$ Hz), 2.31 (1H, m), 2.46 (1H, br ddd, $J=13.1, 7.6, 5.2$ Hz), 2.69 (1H, br q, $J=7.5$ Hz), 3.25 (1H, m), 3.69 (3H, s), 4.65 (1H, m), 4.80 (1H, m), 5.22 (1H, br dd, $J=11.5, 3.0$ Hz), 5.76 (1H, dd, $J=11.8, 3.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 15.4 (C-16), 23.2 (C-19), 24.0 (C-15), 25.5 (C-6), 25.6 (C-10), 28.4 (C-13), 32.7 (C-9), 39.8 (C-5), 41.8 (C-11), 42.2 (C-14), 43.4 (C-2), 46.0 (C-1), 50.7 (OMe), 50.9 (C-12), 111.1 (C-20), 125.4 (C-3), 129.9 (C-8), 135.2 (C-4), 146.4 (C-7), 146.9 (C-18), 174.0 (C-17); HRMS m/z 316.2406 (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$, 316.2402).

(1R,3S,4R,7Z,11S,12S)-3-acetyloxylabella-7,18-dien-4,17-olide (5). Acetylation of **3** (5 mg) using Ac_2O –pyridine at 25°C for 24 h gave **5** (3 mg); mp 162–164°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -40$ ($c=1$, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.12), 232 (3.52) nm; IR (KBr) ν_{max} 2923, 2851, 1734, 1717, 1237, 1025, 800; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.74 (3H, s), 1.34 (3H, s), 1.37 (1H, td, $J=12.5, 7.5$ Hz), 1.62 (3H, s), 1.93 (1H, br d $J=15.5$ Hz), 2.07 (3H, s), 2.16 (1H, m), 2.32 (1H, m), 3.04 (br q, $J=10.7$ Hz), 4.73 (1H, dq, $J=2.5, 1.0$ Hz), 4.86 (1H, dq, $J=2.5, 1.2$ Hz), 6.16 (1H, br d, $J=6.5$ Hz), 6.28 (1H, dd, $J=8.4, 5.7$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 18.3 (C-15), 21.2 (OAc), 22.7 (C-16), 22.7 (C-19), 22.7 (C-6), 26.0 (C-10), 27.7 (C-13), 33.9 (C-9), 37.0 (C-5), 41.9 (C-14), 44.0 (C-1), 47.7 (C-2), 48.8 (C-11), 50.2 (C-12), 70.0 (C-3), 85.0 (C-4), 113.3 (C-20), 133.2 (C-7), 140.2 (C-8), 147.0 (C-18), 170.2 (OAc), 171.0 (C-17); HRMS m/z 360.2305 (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$, 360.2300).

X-Ray crystallographic analysis of **1** and **2**¹⁸

X-Ray data were collected on a Siemens P4/PC diffractometer using graphite monochromated $\text{MoK}\alpha$. Data sets were corrected for Lorentz-polarization effects but not absorption correction was applied, space groups were assigned on the basis of systematic absences. For both

compounds the structures were solved by direct methods using the program SIR92¹⁹ and the structure refinements were performed by full-matrix least-squares with anisotropic temperature factors for the non-hydrogen atoms and isotropic temperature factors for the hydrogen atoms, using the SHELXL-97 program.²⁰

Molecular modeling calculations

Minimum energy structures were generated using the MMX force-field as implemented in the PCMODEL molecular modeling program V 6.00 (Serena Software, Box 3076, Bloomington, IN 47402-3076). The systematic conformational search for the 5- and 11-membered rings was carried out considering dihedral angle rotations of ca. 20° in those bonds which allowed such movement, according to a Dreiding model. The E_{MMX} values as well as the comparison between the observed and calculated ¹H-¹H vicinal coupling constants were used as the convergence criterion. The π -system calculations were set for the Restricted Hartree-Fock and Full Self Consistent Field options.

Feeding inhibition assay on the weevil rice *S. oryzae*

The antifeedant activity of the extract and pure compounds was determined by a choice test using *S. oryzae* as previously described.¹⁷ The extract and compounds were dissolved in 70% ethanol and added to wheat flour disks¹⁷ to give final concentrations of 0.5% or 0.05 (w/w). The disks were allowed to dry. Then 10 weighed disks were placed in a Petri dish with 25 adult insects (2-7 days post emergence). After 72 h the disks were re-weighed. Four replicates were prepared for each concentration. The same procedure was used for negative controls containing only solvent. The results were analyzed by the Systat version 4.1 statistical software (Analytical software, PO Box 12185 Tallahassee FL).

Acknowledgements

This work was supported by grants from CONACYT (convenio 27978N), DGAPA (IN207300) and PADEP (No 108327). We are indebted to Dr Víctor Parra, Departamento de Botánica, Universidad Autónoma de Yucatán, for collecting and identifying the plant material. We thank Isabel Chávez, Beatriz Quiroz, Luis Velasco-Ibarra, Javier Pérez-Flores, and Rocío Patiño, Instituto de Química, UNAM, for recording some NMR, MS, UV, IR, and CD spectra. The technical support of Laura Acevedo is also acknowledged. M. C. Ramírez acknowledges the fellowship awarded by DGEP-UNAM to carry out graduate studies.

References

1. Champagne, D. E.; Koul, O.; Isman, M. B.; Scudder, G. G. E.; Towers, G. H. N. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 377-394.
2. Isman, M. B.; Gunning, P. J.; Spollen, M. *Phytochemicals for Pest Control*; ACS Symposium Series 658; Hedin, P. A., Hollingworth, R. M., Masler, E. P., Miyamoto, J., Thompson, D. G., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997, pp 27-37 (Chapter 3).
3. Assabgui, R.; Lorenzetti, F.; Terradot, L.; Regnault-Roger, C.; Malo, N.; Wiriyachitra, P.; Sánchez-Vindas, P. E.; San Román, L.; Isman, M. B.; Durst, T.; Arnason, J. T. *Phytochemicals for Pest Control*; ACS Symposium Series 658; Hedin, P. A., Hollingworth, R. M., Masler, E. P., Miyamoto, J., Thompson, D. G., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997, pp 38-48 (Chapter 4).
4. MacKinnon, S.; Chauret, D.; Wang, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; Jiménez, A.; Bernard, C.; Krisnamurthy, H. G.; Poveda, L. J.; Sánchez-Vindas, P. E.; Arnason, J. T.; Durst, T. *Phytochemicals for Pest Control*; ACS Symposium Series 658; Hedin, P. E., Hollingworth, R. M., Masler, E. P., Miyamoto, J., Thompson, D. G., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1997, pp 49-57 (Chapter 5).
5. Jiménez, A.; Villarreal, C.; Toscano, R. A.; Cook, M.; Arnason, J. T.; Bye, R.; Mata, R. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1981-1988.
6. Pennington, T. D. *Flora Neotropica*; Monograph No 28; Lutey, J. L., Mori, S. A., Eds.; The New York Botanical Garden: New York, 1981, pp 105-111.
7. Taylor, D. R. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1971**, *2*, 87-92.
8. Arnason, J. T.; MacKinnon, S.; Durst, A.; Philogene, B. J. R.; Hasbun, C.; Sanchez, P.; Poveda, L.; San Roman, L.; Isman, M. B.; Sataook, C.; Towers, G. H. N.; Wiriyachitra, P.; McLaughlin, J. L. *Phytochemical Potential of Tropical Plants*; Downum, K. R., Romeo, J. T., Stafford, H. A., Eds.; Plenum: New York, 1993, pp 107-131 (Chapter 5).
9. Rodríguez, A. D.; González, E.; González, C. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 226-232 (and references cited therein).
10. König, G. M.; Wright, A. D. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8011-8018.
11. Burket, U.; Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*; ACS Monograph 177; American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
12. Haasnoot, C. A. G.; de Leeuw, F. A. A. M.; Altona, C. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2783-2792.
13. Cerda-García-Rojas, C. M.; Zepeda, L. G.; Joseph-Nathan, P. *Tetrahedron Comp. Methodol.* **1990**, *3*, 113-118.
14. Sznatzke, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1968**, *7*, 14-25.
15. Legrand, M.; Rougier, M. J. Application to the optical activity to stereochemical determinations. *Stereochemistry Fundamental and Methods*; In *Determination of Configurations by Dipole Moments, CD or ORD*, Kagan, H. B., Ed.; Georg Thieme: Stuttgart, 1977; Vol. 2, pp 123-127.
16. Rodríguez, A. D.; González, E.; Ramírez, C. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11683-11729.
17. Xie, Y. S.; Bodnaryk, R. P.; Fields, P. G. *Can. Entomol.* **1996**, *128*, 865-875.
18. Crystallographic data for the structures reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK. Fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.
19. Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Burla, M. C.; Polidori, G.; Camalli, M. *J. Appl. Cryst.* **1994**, *27*, 435.
20. Sheldrick, G. M. *Program for Refinement of Crystal Structures*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 1997.