

10524
24a.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**PUBESAMIDAS A,B Y C, ALCALOIDES,
CUMARINAS Y FLAVONAS AISLADAS DE
Casimiroa pubescens (RUTACEAE).
EVALUACION DE SU ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA, ANTIOXIDANTE
Y CITOTOXICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

NADIA MARGARITA GONZALEZ LUGO

ASESOR: M. EN C. AIDA NELLY GARCIA ARGAEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

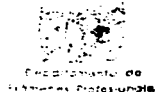


**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E**

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Pubesamidas A, B y C, Alcaloides, Cumarinas y Flavonas aisladas de Casimiroa pubescens (RUTACEAE). Evaluación de su actividad Antiinflamatoria, Antioxidante y Citotóxica".

que presenta la pasante: Nadia Margarita González Lugo
con número de cuenta: 9506168-7 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Junio de 2003

PRESIDENTE	Q. Mario A. Morales Delgado	<i>Mario A. Morales D.</i>
VOCAL	M. en F. C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	M. en C. Aída Nelly García Argáez	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	Q. Arcadia Hernández Beltrán	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. Benjamín Velasco Bejarano	<i>[Firma]</i>

JURADO ASIGNADO.

Presidente: Q. Mario A. Morales Delgado
Vocal: M. en F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza
Secretario: M. en C. Aída Nelly García Argáez
Primer suplente: Q. Arcadia Hernández Beltrán
Segundo suplente: M. en C. Benjamín Velasco Bejarano

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. Aída Nelly García Argáez, con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (Proyecto: 34992-N); y del Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura, (PROBETEL).

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

Gracias por haberme permitido vivir, crecer y madurar, por haberme dado la capacidad de ser lo que soy, por su paciencia, cariño y comprensión, por apoyar todas mis locuras. Este trabajo es uno de los primeros logros que obtenemos juntos. Gracias por creer y confiar en mí. Los quiero mucho.

A mi hermana: Por los momentos buenos y malos que hemos compartido juntas; por tus consejos, gracias por estar conmigo siempre.

A mis familiares que de alguna u otra forma me han ayudado.

A la Dra. Aída Nelly García Argáez y al Dr. Mariano Martínez Vázquez por transmitirme parte de sus conocimientos, por su ayuda incondicional y por su apoyo, gracias por todo.

A mis amigochas, Briza, Marlene y Sara; por todos los momentos que vivimos; por los consejos, regaños, alegrías, tonterías y angustias que compartimos, gracias por brindarme su amistad.

A mis amigos de la generación 98, en especial a: Tania, César, Anaíd, Lety, Silverio, Adolfo, Miriam Núñez y Yolanda, por todos los momentos compartidos.

A mis compañeras y amigas del laboratorio 1-4: Ibeth, Hortensia Parra, Evita, Diana, Rosalba, Hortensia Rosas, Moni, Claudia y Mariana; porque con ustedes la vida entre los disolventes fue más divertida. Gracias por su apoyo.

A mis cuates, Mariana, Rodrigo y Estelita.

A todos los que me han ayudado a salir adelante.

A todos los maestros de la carrera, por su ayuda y su aguante hacia mí.

Al H. Jurado por sus comentarios durante la revisión del presente trabajo y por el tiempo dedicado al mismo. Gracias.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

INDICE GENERAL.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	4
II: ANTECEDENTES	7
II.1 Familia Rutaceae	7
II.2 Género <i>Casimiroa</i>	9
II.3 <i>Casimiroa pubescens</i> Ram.....	12
II. 3. 1. Ubicación taxonómica:	12
II. 3. 2. Descripción: (Martínez, 1951).	12
II. 3. 3. Nombre común.....	13
II. 3. 4. Distribución.....	13
II.4 Quimiotaxonomía.....	14
II. 4. 1. Consideraciones generales en Quimiotaxonomía.....	15
II. 4. 2. Marcadores químicos en Rutaceae.....	18
II. 4. 3. Química del género <i>Casimiroa</i>	23
III. ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO <i>Casimiroa</i>	26
IV. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	31
IV. 1. Mediadores de la inflamación.	33
IV. 2. Potencial antiinflamatorio de flavonoides.	44
V. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.	46
VI. ACTIVIDAD CITOTÓXICA. Compuestos anticancerígenos.....	51
VII. OBJETIVOS.	56
VII. 1. Objetivo general.	56
VII. 2. Objetivos particulares.....	56
VIII. HIPOTESIS	58
PARTE EXPERIMENTAL.....	59
IX. PARTE EXPERIMENTAL.....	60
IX. 1. Condiciones generales para el trabajo experimental.	60
IX. 2. Preparación del material vegetal.	63
IX. 3. Extracción.....	63

IX. 4. Separación de compuestos.....	64
IX. 4 a. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	64
IX. 4. b. Cromatografía en columna.....	65
IX. 5. Identificación de compuestos.....	71
IX. 5 a. Determinación de compuestos por CG-MS.....	71
IX. 5 b. Purificación de compuestos. Determinación de compuestos por sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	71
IX. 5. c. Identificación a partir de la formación de derivados.....	74
IX. 6. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos purificados.....	75
IX. 6.a Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	75
IX. 6 b. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos aislados.....	78
IX. 6 c. Evaluación de la actividad antioxidante.....	80
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
X. 1. Separación e identificación de compuestos.....	82
X. 2. Aspectos quimiotaxonómicos.....	96
X. 3 Actividad biológica.....	98
X. 3 a. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.....	98
X. 3. b. Actividad antioxidante.....	101
X. 3. c. Actividad citotóxica.....	103
XI. CONCLUSIONES.....	106
XII. B I B L I O G R A F I A.....	109
XIII. APENDICE.....	118
XIII. 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	118
XIII.2 Generalidades de las cumarinas.....	127
Definiciones.....	127
Clasificación de cumarinas.....	128
Biosíntesis de cumarinas.....	129
Ruta del shikimato-corisinato.....	130
Furano y piranocumarinas.....	134
XIII. 3. Generalidades de los flavonoides.....	137
XIII. 4. Generalidades de la biogénesis de la tiramina.....	141

INDICE DE ESPECTROS	I
INDICE DE FIGURAS.	III
INDICE DE CUADROS.	V
INDICE GENERAL.	A

INDICE DE ESPECTROS

- Espectro 1.** Espectro de RMN-¹H de Isopimpinina.
- Espectro 2.** Espectro de RMN-¹³H de Pubesamida A.
- Espectro 3.** Espectro de RMN-¹³C de Pubesamida A.
- Espectro 4.** Espectro de IR de Pubesamida A.
- Espectro 5.** Espectro de EM-IE de Pubesamida A.
- Espectro 6.** Espectro de COLOC de Pubesamida A.
- Espectro 7.** Espectro DEPT de Pubesamida A.
- Espectro 8.** Espectro de RMN-¹H de Skimmianina.
- Espectro 9.** Espectro de RMN-¹H de Casimiroina.
- Espectro 10.** Espectro de RMN-¹H de Zapotina.
- Espectro 11.** Espectro RMN-¹H de Zapoterina
- Espectro 12.** Rayos-X de Zapoterina
- Espectro 13.** Espectro de RMN-¹H de β-Sitosterol
- Espectro 14.** Espectro de RMN-¹H de 8-geraniioxipsoraleno
- Espectro 15.** Espectro de RMN-¹H de 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona.
- Espectro 16.** Espectro de RMN-¹³C de 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona.
- Espectro 17.** Espectro de COLOC de 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona.
- Espectro 18.** Espectro de RMN-¹H de tetrapubesamida A.
- Espectro 19.** Espectro de RMN-¹³C de tetrapubesamida A.
- Espectro 20.** Espectro de IR de tetrapubesamida A.
- Espectro 21.** Espectro de EM de tetrapubesamida A.
- Espectro 22.** Espectro de COSY de tetrapubesamida A.

- Espectro 23.** Espectro de NOESY de tetrapubesamida A.
- Espectro 24.** Espectro de HETCOR de tetrapubesamida A.
- Espectro 25.** Espectro de RMN-¹H de Pubesamida C.
- Espectro 26.** Espectro de RMN-¹³C de Pubesamida C.
- Espectro 27.** Espectro de IR de Pubesamida C.
- Espectro 28.** Espectro de EM de Pubesamida C
- Espectro 29.** Espectro de DEPT de Pubesamida C.
- Espectro 30.** Espectro de COSY de Pubesamida C.
- Espectro 31.** Espectro de HETCOR de Pubesamida C.
- Espectro 32.** Espectro de RMN-¹H de Pubesamida B.
- Espectro 33.** Espectro de RMN-¹³C de Pubesamida B.
- Espectro 34.** Espectro de IR de Pubesamida B.
- Espectro 35.** Espectro de EM de Pubesamida B.
- Espectro 36.** Espectro de DEPT de Pubesamida B.
- Espectro 37.** Espectro de COSY de Pubesamida B.
- Espectro 38.** Espectro de HETCOR de Pubesamida B.
- Espectro 39.** Espectro de RMN-¹H de Tetra-acetilidaucosterol.

INDICE DE FIGURAS.

Fig 1. Subfamilias de la familia Rutaceae ¹⁰	8
Fig. 2. Liberación y metabolismo del ácido araquidónico y sitios de acción de fármacos antiinflamatorios	36
Fig. 3. Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos. (PGH sintetasa*, enzima bifuncional)	39
Fig. 4 Biosíntesis de leucotrienos	40
Fig. 5. Isoformas de ciclooxigenasa, COX-1 Y COX-2.....	43
Fig. 6 Metodología General.....	59
Fig. 7. Metodología del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón.....	77
Fig. 8. Metodología para la evaluación de la citotoxicidad en el ensayo de sulforrodamina B.....	79
Fig. 9. Metodología para la evaluación de la actividad antioxidante por medio de la reducción del radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).....	81
Fig. Estructura de los compuestos determinados por CLAR.....	82
Fig. 10. Patrón de fragmentación del compuesto 12.....	94
Fig.11. Patrón de fragmentación del compuesto 10.....	94
Fig. 12 Correlaciones principales en COLOC para 2	95
Fig. 13. Estructura de la cumarina	127
Fig. 14. 4-metilio-5-metilcumarina y umbeliferona	128
Fig. 15. Ruta biosintética del shikimato-corismato.	131
Fig. 16. Formación de fenilalanina y tirosina . Formación de la fenilalanina. Enzimas: i, Corismato mutasa, ii, prefenato deshidratasa, iii, fenilpiruvato aminotransferasa, iv, prefenato aminotransferasa, v, arogenato deshidratasa.....	132
Fig. 17. Formación de cumarinas a partir de L-fenilalanina.....	133
Fig. 18. Ruta biosintética de la umbeliferona	134
Fig. 19. Formación de furano y piranocumarinas a partir de la umbeliferona.....	135
Fig. 20. Formación del psoraleno a partir de la umbeliferona	136
Fig. 21. Ruta de la Malonil CoA.Enzimas: i: chalcona sintetasa, ii: reductasa, iii: chalcona isomerasa.....	139

Fig. 22. Ruta biogénica de los flavonoides.	140
Fig. 23. Tiramina. Amina relacionada con la fenilalanina.....	142

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Extractos obtenidos de <i>Casimiroa pubescens</i>	64
Cuadro 2. Número de fracciones obtenidas en CC de los distintos extractos.....	66
Cuadro 3. Resumen de la CC del extracto hexánico (Lote 2) de las semillas de <i>C. pubescens</i>	67
Cuadro 4. Resumen de la CC del extracto acetónico (Lote 2) de las semillas de <i>C. pubescens</i>	67
Cuadro 5. Resumen de la CC del extracto hexánico (Lote 3) de las semillas de <i>C. pubescens</i>	68
Cuadro 6. Resumen de la CC del extracto de acetato de etilo (Lote 3) de las semillas de <i>C. pubescens</i>	69
Cuadro 7. Resumen de la CC del extracto metanólico (Lote 3) de las semillas de <i>C. pubescens</i>	70
Cuadro 8. Compuestos aislados del extracto hexánico (Lote 2) de <i>Casimiroa pubescens</i>	72
Cuadro 9. Compuestos aislados del extracto acetónico (Lote 2) de <i>Casimiroa pubescens</i>	72
Cuadro 10. Compuestos aislados del extracto hexánico (Lote 3) de <i>Casimiroa pubescens</i> . ..	73
Cuadro 11. Compuestos aislados del extracto de acetato de etilo (Lote 3) de <i>Casimiroa pubescens</i>	73
Cuadro 12. Compuestos aislados del extracto metanólico (Lote 3) de <i>Casimiroa pubescens</i>	74
Cuadro 13. Constituyentes de las fracciones 55 y 58 del extracto hexánico de <i>C. pubescens</i> del segundo lote.	84
Cuadro 14. Estructuras de los compuestos aislados ya informados en la literatura.	86
Cuadro 15. Datos espectrales de RMN- ¹ H de 2, 10, 11 y 12.....	90
Cuadro 16. Datos espectrales de RMN- ¹³ C de 2, 10, 11 y 12.....	91
Cuadro 17. Experimento de HETCOR de 2, 10 y 11.....	92
Cuadro 18. Estructuras novedosas aisladas de semillas de <i>C. pubescens</i>	93
Cuadro 19. Resultados del modelo de edema inducido con TPA.....	98
Cuadro 20. Resultados de Curva Dosis-Respuesta de la actividad antiinflamatoria del compuesto 9.	99

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 21. Curva Dosis-Respuesta de la actividad antiinflamatoria del compuesto 9 en el modelo de edema inducido con TPA.....	100
Cuadro 22. Resultados de la prueba de DPPH.....	101
Cuadro 23. Resultados de la prueba de Citotoxicidad.....	105

PAGINACIÓN DISCONTINUA

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

AcOEt	acetato de etilo
ba	banda ancha
bf	banda fuerte
c	cuarteto
°C	grados centígrados
¹³ C-DEPT	espectros de engrandecimiento de transferencia de polarización de menor distorsión de ¹³ C
CC	cromatografía en columna
CCF	cromatografía en capa fina
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CHCl ₃	cloroformo
CH ₂ Cl ₂	cloruro de metileno
COSY	correlación espectroscópica homonuclear ¹ H- ¹ H bidimensional
d	doblete
da	doblete ancho
D ₂ O	agua deuterada
dd	doble doblete
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
δ	desplazamiento químico
c	coeficiente de extinción molar
EM	espectrometría de masas

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

EMIE	espectrometría de masas por impacto electrónico
eV	electronvolts
Exto.	extracto
FAB ⁺	bombardeo con átomos rápidos
FAB ⁺ EM	espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM
H ₂ O	agua
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
HETCOR	correlación espectroscópica heteronuclear ¹³ C- ¹ H bidimensional
Hex	hexano
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
Hz	hertz
IR	infrarrojo
J	constante de acoplamiento
m	señal múltiple
m/z	relación de masa / carga de iones
M ⁺	ión molecular
MeOH	metanol
OH ⁻	grupo hidroxilo
MeO ⁻	grupo metoxilo
p.f.	punto de fusión
P.M.	peso molecular
PMNs	polimorfonucleares
PND	desacoplamiento de hidrógeno

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.

ppm	partes por millón
RMN	resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN- ¹ H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno
s	señal simple - singulete
sa	señal ancha
t	triplete
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TMS	tetrametil silano
UV	ultravioleta
μl	microlitros
μm	micrómetros
%	porciento

I. INTRODUCCIÓN

Mucho antes de que se iniciaran las investigaciones sobre los productos naturales y los organismos vivos que los sintetizan; los humanos, en diversas partes del mundo, ya preparaban extractos, tinturas y otras preparaciones de plantas y animales. Algunas de estas preparaciones naturales les servían como remedios para aliviar malestares de ciertas enfermedades o para la cacería y la guerra¹.

Las plantas constituyen una fuente muy rica de sustancias, debido a que sintetizan una gran variedad de compuestos; y la flora mexicana es una de las más diversas del mundo, ya que en México se cuenta con una gran variedad de climas desde el tropical hasta el frío en las altas montañas, así como una gran variedad de suelos, desde los más fértiles hasta los más áridos. En su territorio se han establecido diversos tipos de vegetación, algunos caracterizados por la presencia de numerosas especies de árboles y arbustos. Dentro de esta gran diversidad de especies se encuentran plantas que se han utilizado con fines medicinales desde tiempos antiguos hasta la actualidad. La salud es primordial para el ser humano por lo que se han buscado en la naturaleza especies que puedan prevenir o aliviar enfermedades. Las plantas se usan de manera tradicional a partir de tés, infusiones, de aplicación local o a través de baños de temazcal, hasta la forma industrializada para la obtención de medicamentos. Es por ello de gran importancia conocer aquellas fuentes naturales donde se pueden aislar e identificar sustancias activas que sean de beneficio para la humanidad.

Actualmente, los compuestos aislados de fuentes naturales juegan un papel muy importante en la medicina moderna, muchos de ellos, son fármacos clínicamente útiles para el tratamiento de enfermedades, otros, proveen compuestos básicos que pueden ser modificados químicamente para hacerlos más efectivos o menos tóxicos, o pueden ser utilizados como modelos o prototipos para producir fármacos sintéticos, no muy fáciles de obtener por otros métodos^{2,3}.

Se ha estimado que en los países desarrollados aproximadamente un 80% de los medicamentos usados en el cuidado de la salud primaria, proviene de plantas; muchas de estas plantas constituyen el recurso más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional en nuestro país, lo que motiva el estudio de dichas especies⁴.

En México, debido principalmente a la dificultad de acceder a medicamentos proporcionados por los Centros de Salud Pública, a las condiciones económicas y al estado de marginación en que se ubica la mayor parte de la población rural, las plantas medicinales constituyen una alternativa viable para resolver los problemas de salud de varios grupos étnicos⁵.

Por lo anterior el estudio de las plantas medicinales desde varios aspectos aporta un conocimiento valioso para su mejor aprovechamiento. Así el estudio de la composición química en metabolitos secundarios de *Casimiroa pubescens* y el conocimiento de la actividad biológica de estos compuestos representa un aporte importante al conocimiento del género y de pruebas potencialmente útiles medicinalmente.

De este modo, en el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico a las hojas y semillas de *C. pubescens* para conocer la composición química de la especie, también se propone evaluar la actividad biológica de algunos de los metabolitos secundarios aislados.

II: ANTECEDENTES

II.1 Familia Rutaceae

La familia *Rutaceae* pertenece al orden de los Rutales, y está integrada por alrededor de 150 géneros y más de 1500 especies, algunas de ellas de relevancia económica⁶. Esta familia está dividida en siete sub-familias (fig 1), como se puede observar en la figura 1, en donde: Aurantioideae, Rutoideae y Toddalioideae, son llamadas sub-familias mayores.⁷

Debido a la importancia comercial de algunas especies, estas se han estudiado desde el punto de vista químico. Por otro lado también se han realizado trabajos quimiotaconómicos con el objeto de relacionar la presencia de algunos metabolitos secundarios característicos dentro de diferentes grupos de taxa de la familia.

En las Rutaceas, se han utilizado como marcadores químio-taxonómicos a los aceites esenciales, los alcaloides, las cumarinas, los flavonoides, los limonoides así como a las ceras. El uso específico de estos compuestos ha permitido apoyar exitosamente propuestas de clasificaciones preexistentes^{8,9}.

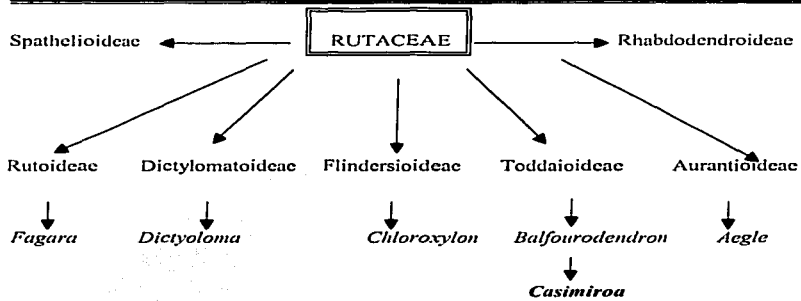


Fig 1. Subfamilias de la familia Rutaceae ¹⁰

II.2 Género *Casimiroa*

El género *Casimiroa* (Rutaceae) fue establecido por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza en su obra *Novorum Vegetabilium Descriptiones*, publicada en México en 1825⁷.

El género *Casimiroa* está conformado por árboles ó arbustos mexicanos y centroamericanos que viven en climas cálidos, de corteza morena-grisácea, salpicada de numerosas lenticelas; de hojas alternas, pecioladas, digitadas, con 3 a 5 folíolos, rara vez 1 ó 7. Hojuelas lanceoladas, subelípticas, ovales u obovadas, con peciolulos cortos o largos, glabras o más o menos vellosas, con numerosas glándulas visibles por transparencia: enteras u obscuramente aserrado-crenadas, con nervaduras prominentes en el envés y anastomosadas cerca del borde, acuminadas, con el ápice generalmente retuso y la base por lo común cuneada o redondeada, a veces inequilátera. Flores pequeñas, blanco-verdosas, unisexuales, en panículas axilares o terminales, sépalos cuatro o cinco, hirsutos; pétalos cuatro o cinco, valvados y frecuentemente revolutos; estambres (estériles en la flor femenina) en igual número que los pétalos, con los filamentos subulados e insertados abajo del disco; anteras dorso fijas, elípticas u ovales, agudas en la base; ovario súpero, sésil, con uno o cinco lóculos, clara u obscuramente lobulado; óvulos axilares; el fruto es una drupa de 2 a 12 cm, con las semillas en número de una a cinco, con testa apergamina y reticulada⁷.

Las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *Casimiroa edulis* y varias formas de *C. sapota*. Las especies *C. pubescens*, *C.*

pringlei, *C. greggii*, *C. watsonii*, *C. tetrameria*, *C. calderoniae* y *C. emarginata* se encuentran en forma silvestre. Las especies silvestres, generalmente, no presentan problemas taxonómicos, pero las cultivadas y especialmente la determinación botánica de *C. edulis* y *C. sapota* han sido objeto de mucha confusión. Inclusive se ha mencionado que *C. sapota* forma un complejo difícil de desentrañar por la presencia de numerosas formas, ya que algunas de éstas no están bien definidas⁷⁻¹².

Se considera que el género *Casimiroa* está conformado por diez especies.

C. tetrameria Millps.

C. pringlei (Wats.) Engl.

C. watsoni Engler

C. edulis Llave et Lex.

C. pubescens Ramírez

C. sapota Oerst f. *typica*

C. emarginata St. et Steyerl.

C. microcarpa Lundell

C. calderoniae Chiang & Medrano

C. greggii (Watson) Chiang

Debido a su valor comercial y a las propiedades medicinales que se le atribuyen a *C. edulis*, ésta es la especie del género a la que se le han realizado una mayor cantidad de estudios fitoquímicos. Por el contrario, una extensa investigación bibliográfica reveló que sólo *C. greggii* y *C. pringlei* han sido estudiadas. Los resultados de esta búsqueda indican que los

metabolitos secundarios (cumarinas, flavonoides, alcaloides y limonoides) aislados y caracterizados a partir de estas especies, están dentro de los diferentes tipos de compuestos que caracterizan a toda la familia Rutaceae¹³⁻¹⁴. Como puede verse son muy pocas las investigaciones realizadas en las especies del género *Casimiroa* y tampoco se han realizado estudios sistemáticos en estas como para poder efectuar estudios con fines comparativos.

II.3 *Casimiroa pubescens* Ram.**II. 3. 1. Ubicación taxonómica:**

Reino: Plantae

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rutales*

Familia: *Rutaceae*

Género: *Casimiroa*

Especie: *Casimiroa pubescens*. An. Inst. Med. N. II. 19. 1896.

II. 3. 2. Descripción: (Martínez, 1951).

Casimiroa pubescens. Arbolillo de 2 a 3 metros de altura, inerte y ramoso, con las ramas casi erguidas y rugosas; ramillas pubescentes; hojas alternas, tiesas, gruesas y coriáceas, compuestas de 3 folíolos ovales u ovado-oblongos, a veces elípticos u obovados, de borde entero y finamente ciliado, en seco ligeramente revoluto, principalmente cerca de la base; superficie finamente aterciopelada pubescente en ambas caras, sobre todo en el envés, donde a veces se nota casi lanosa; nervaduras paralelas y unidas en arco cerca del borde; ápice frecuentemente emarginado u obtuso-redondeado; base obtusa; el folíolo central de 5.5 a 10 cm de largo por 2 a 4.5 de ancho; los folíolos laterales algo menores; pecíolos rollizos, engrosados en la base, articulados y pubescentes, de 1.4 a 4 cm de largo; peciolulos también pubescentes, el de los folíolos centrales de 5 a 15 mm y los de los laterales de 4 a 7 mm. Inflorescencias axilares o terminales, pubescentes y cortas, con el raquis de 10 a 20 mm, con

muchas flores aglomeradas. Flores en botón globosas u obovadas, de unos 5 mm de largo y de color blanco verdoso. Pedicelos carnosos-pubescentes, de 3 mm. Cáliz de 5 sépalos, triangulares y pubescentes; pétalos 5 de 4 a 5 mm, elípticos y gruesos; estambres 5; anteras de 2.5 mm, sobre filamentos subulados de 3 mm; polen diminuto y esférico. Fruto esférico, en seco depresso-globoso, con la superficie finamente pubescente como la de un durazno, de 4 a 5 cm de diámetro, y lleva a veces una protuberancia o chichón en el ápice; es de color amarillo anaranjado en su madurez, con pulpa escasa, amarillenta y cremosa, dulce y comestible, posiblemente más agradable que cualquier otro zapote blanco, con 5 semillas muy desarrolladas; en seco la sección transversal del fruto se observa pentagonal. Las semillas miden de 23 a 28 mm de largo por 16 a 20 mm de ancho.

II. 3. 3. Nombre común.

Esta especie recibe los nombres vulgares de "zapote de rata" en Querétaro y de "zapote cimarrón" en Hidalgo.

II. 3. 4. Distribución.

En México se ha recolectado en los estados de Guanajuato, Hidalgo y Querétaro.

II.4 Quimiotaxonomía.

Una de las grandes metas de la sistemática de plantas es ayudar a construir un sistema filogenético verdadero que refleje las relaciones naturales entre todos los taxa de plantas. Sin embargo, esta no es una tarea fácil de alcanzar a juzgar por los diferentes sistemas de clasificación de las angiospermas que se han producido en los pasados 40 años^{15, 16}.

Es en este contexto que se inscribe la llamada **quimiotaxonomía**, la cual se puede entender como un método para clasificar a un grupo de plantas con base en los compuestos químicos que producen. De acuerdo a lo anterior estos compuestos químicos que son útiles para clasificar a un conjunto de plantas, se les considera como caracteres químicos¹⁷. Estas características están genéticamente controladas y tienen la ventaja sobre las morfológicas de que pueden ser exactamente descritas en términos de una estructura definida y una fórmula química configuracional. De este modo se ha definido la **quimiotaxonomía** como el estudio de la distribución de un grupo de compuestos o grupos de compuestos biogénicamente relacionados en una serie de plantas relacionadas o supuestamente relacionadas.

Para que un grupo de metabolitos secundarios sea considerado como marcadores quimiotaxonómicos es necesario que cumpla con los siguientes requisitos¹⁷⁻²⁰.

1. Tener una presencia recurrente en el taxón considerado.
2. Presentar una variabilidad genética, intrínseca baja.

3. Presentar características en su estructura química que sean útiles en la clasificación a diferentes niveles jerárquicos.
4. Que se conozcan las rutas biosintéticas de los metabolitos involucrados
5. Presentar una relativa facilidad de análisis.
6. Que se puedan analizar en la cantidad y tipo de material biológico disponible.
7. Ser químicamente estables.

II. 4. 1. Consideraciones generales en Quimiotaxonomía.

Son muchos los ejemplos en los cuales los caracteres químicos han sido utilizados con éxito por quimiotaxónomos expertos para elucidar relaciones naturales entre familias de plantas. Sin embargo como se ha hecho notar frecuentemente, la clasificación de las plantas debe realizarse utilizando caracteres químicos y de otros campos en conjunto. Las razones principales de esto son, por un lado, la escasez de características químicas disponibles para comparar a niveles de familia y superiores y por otro, lado la dificultad en seleccionar e interpretar correctamente a los caracteres químicos. Algunos de los factores que causan estas dificultades se discuten a continuación:

Una de las dificultades al usar caracteres químicos para encontrar relaciones entre taxa superiores tales como familia, ordenes, y arriba de estos, es el hecho de que pocas clases de compuestos poseen una amplia distribución en las plantas, por lo tanto se carece de caracteres para comparar. Una excepción son los flavonoides los cuales están presentes en todas las plantas vasculares, pero presentan la desventaja de que el mismo tipo de estructura tiende a ocurrir en grupos no relacionados (casos de convergencia química)¹⁹.

La habilidad para sintetizar el mismo compuesto químico puede ser originada independientemente en dos o más plantas no relacionadas. Si el camino biogénico para producir este compuesto es diferente en cada taxa, entonces el mismo compuesto químico representa caracteres diferentes.

Sin embargo si el camino biosintético es el mismo, especialmente si este compuesto es relativamente fácil de sintetizar por la planta a partir de un metabolito primario tal como un aminoácido de proteína; entonces, la única manera para decidir si la presencia de un cierto constituyente en dos taxa esta basado en una relación verdadera o en una convergencia, es investigar si este constituyente químico se correlaciona con otros caracteres en esos taxa. Si este constituyente se correlaciona con otros marcadores químicos o con otros tipos de caracteres, este constituyente es un marcador filogenético.

Otro punto a considerar es que los metabolitos secundarios son frecuentemente sintetizados en las plantas y a su vez le sirven para defenderse de factores del medio ambiente, tales como los depredadores. Cuando una planta produce un compuesto químico tóxico, el cual le confiere mejor protección contra plagas y enfermedades, esta planta tiene mayores posibilidades de sobrevivir; sin embargo, los insectos y microorganismos coevolucionan con las plantas y pueden encontrar un modo para detoxificar el veneno de la planta. La planta nuevamente evoluciona a producir un nuevo tipo de compuesto químico el que su enemigo no puede, todavía, metabolizar.

La variación química dentro de una familia ó a niveles superiores es un factor que no permite escoger una o dos especies en forma aleatoria como representativas de la química del grupo, por lo que es común, dentro de la quimiotaxonomía, utilizar el concepto de "tendencia a producir cierto tipo de compuestos". Esto indudablemente requiere de un buen conocimiento de la química de todo el grupo bajo estudio y de las rutas biosintéticas de los compuestos. Otro factor limitante es la carencia de datos químicos en ciertas taxa. Aunque algunas familias han sido ampliamente estudiadas, otras se han estudiado para cierto tipo de compuestos y de algunas otras se conocen pocos o ningún estudio químico. Aunado a esto en los últimos años se han efectuado principalmente, estudios fitoquímicos bioactivamente dirigidos pero no con fines quimiotaxonómicos. Esto significa que hay una tendencia a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica, consecuentemente la presencia de sustancias conocidas generalmente no se informa (información que sería de gran utilidad en quimiotaxonomía).

A niveles bajos de jerarquía taxonómica, tal como el de género o inferiores, los metabolitos secundarios de plantas son muy útiles y el número de caracteres disponibles para realizar comparaciones es mucho mayor.

La quimiotaxonomía de plantas en el amplio sentido de la palabra, utilizando micro y macromoléculas, ha contribuido sustancialmente al propósito final de la sistemática de plantas: "la generación del sistema natural".

II. 4. 2. Marcadores químicos en Rutaceae

Dentro de la familia Rutaceae, Hegnauer, R., 1964 y Cronquist, A., 1981 han mencionado como marcadores taxonómicos^{13, 14}; a los aceites esenciales, los alcaloides, las cumarinas, flavonoides y limonoides. Aunque también algunos autores²³ han utilizado las ceras, como caracteres químicos. El uso específico de ceras, flavonoides, alcaloides, limonoides y cumarinas como marcadores químicos de la familia de las Rutáceas se analizan a continuación:

Norbdy y Nagy en 1977 emplearon las ceras de las hojas y de la cáscara de los frutos de 49 cultivares de *Citrus* (Rutaceae). En estos estudios los autores encontraron que los perfiles químicos de alcanos exhibían diferencias significativas para cada cultivar. También encontraron que cada perfil químico obtenido de la cáscara de los frutos se correspondía con los obtenidos de las ceras de las hojas. Los autores indicaron que las ceras de hojas son eficaces como marcadores taxonómicos y que se requiere de muestras de poblaciones naturales que hayan sido recolectadas con suficiente cuidado tal que las variaciones cuantitativas dentro y entre poblaciones deben ser tratadas como un dato estadístico y no como datos individuales²³.

Skorupa, 1998²⁴, con objeto de proporcionar evidencias químicas a la taxonomía del género *Pilocarpus* (Rutaceae), informaron sobre la distribución de hidrocarburos en las ceras epicuticulares de hojas, principalmente los n-alcenos de 11 especies endémicas de este género, recolectadas en poblaciones silvestres de Brasil. La mayoría de las especies presentaron como

componentes principales a n-alcános de 29 y 31 átomos de carbono. A través del análisis de conglomerados presentó dendogramas con estos dos grupos, así como las relaciones de afinidad entre los taxa, los que ayudaron a definir la taxonomía del género²⁴. Estos investigadores encontraron que *P. jaborandi* presenta un patrón diferente de hidrocarburos de ceras, debido a la presencia de relativamente altas cantidades del 1-fenil-5-vinil, 5,9-dimetil-decano.

Los flavonoides son los constituyentes secundarios más ampliamente utilizados en estudios taxonómicos. Esto se debe en parte a su presencia ubicua en las plantas superiores y a su gran diversidad estructural. También son sustancias químicas estables, fácilmente estudiadas en muestras pequeñas de plantas o aún en delgados fragmentos de material de herbario. Una razón más que completa su popularidad con los taxónomos de plantas es su facilidad de análisis por procedimientos relativamente simples, ya que pueden ser detectados por cromatografía en papel, cromatografía en capa fina bidimensional y cromatografía líquida de alta resolución.

Los flavonoides se han empleado como caracteres taxonómicos a casi todos los niveles de la sistemática. Un ejemplo de ello, lo constituye el género *Citrus* (Rutaceae), en el cual, Albach y Redman²⁵ evaluaron 48 variedades que representaban 18 especies de *Citrus* reconocidas y 49 híbridos de 18 cruza diferentes. El análisis se realizó a través de cromatografía en capa fina y los resultados mostraron una consistencia cualitativa y cuantitativa de la composición de flavanonas para cada especie y para cada cruza. Inclusive las reglas que gobiernan la herencia de las flavanonas de *Citrus* se dedujeron a partir de la

composición de híbridos conocidos. Estas reglas acopladas con la composición de los datos se usaron para evaluar las probables relaciones de diferentes variedades y especies de cítricos²⁵.

Sin embargo, en un estudio más ambicioso, los flavonoides sirvieron para apoyar el arreglo taxonómico propuesto por Swingle, en 1943, para la subfamilia Aurantioideae²⁶. En esta clasificación, el autor dividió a la subfamilia en dos tribus: la tribu Clauseneae (subtribus Micromelinae, Clauseninae y Merrillinae) y la tribu Citreae (subtribus: Triphasiinae, Citrinae y Balsamaocitrinae). Este apoyo fue posible, principalmente, por el análisis de la variabilidad estructural de los flavonoides involucrados, realizado por Grieve y Scora en 1980.

Por otro lado, los alcaloides se han propuesto como marcadores taxonómicos pero tienen asociados una serie de problemas al ser utilizados con este fin. Entre estos se mencionan que tienen una distribución limitada por lo que no se puede utilizar a niveles más altos de clasificación. Las investigaciones generalmente se restringen a una clase particular de alcaloides ya que presentan estructuras muy diversas. Waterman²⁷ trabajó con los alcaloides de Rutaceae y él notó que los datos en gran medida son inconsistentes con la clasificación de la familia generada por los trabajos clásicos. Ante este problema, procedió a reunir la información de los alcaloides y otros metabolitos secundarios para proponer una "nueva hipótesis taxonómica" de las subfamilias de las Rutaceae y los grupos cercanos de las Rutales.

Dreyer y colaboradores²⁸ propusieron el uso de los triterpenos del tipo limonoide como marcadores quimiotaxonómicos, principalmente por la sensibilidad de estos compuestos en

cromatografía en capa fina al reactivo de Ehrlich's y su relativamente fácil aislamiento a través de la cristalización

Los limonoides, son triterpenos con 26 átomos de carbono que se encuentran presentes en el orden de los Sapindales. Debido a la presencia de estos compuestos triterpenoides, así como de otros caracteres¹⁴, Cronquist menciona que las Rutaceae se encuentran agrupadas con las familias Simaroubaceae, Meliaceae, Cnecoraceae, Ptaeroxlaceae.

Dreyer y col.^{28, 29} encontraron una marcada correlación entre los niveles de oxidación de los limonoides y su distribución en las tres principales subfamilias. Esto es, limonoides con un grupo metilo intacto en C-19 se encuentran en especies de la subfamilia Toddalioideae. Mientras que en la subfamilia Aurantioideae se encuentran pequeñas cantidades de este tipo de limonoides y una gran cantidad de limonoides con el metilo en C-19 oxidado. Por último las plantas de la subfamilia Rutoideae contienen limonina y sus productos de oxidación como la rutaevina y la diosfenol-limonina. De este modo las tres principales subfamilias pueden ordenarse de acuerdo al incremento en la capacidad de oxidación de los limonoides de la Toddalioideae a la Aurantioideae y hasta la Rutoideae.

Las cumarinas se han estudiado con fines taxonómicos en las Rutaceae^{30, 31}. Tal vez entre las características más útiles para ser usadas en taxonomía es su distribución y su variabilidad estructural en los diferentes taxa. Las cumarinas se han utilizado en un nivel superior a la familia Rutaceae, obteniéndose dos observaciones de naturaleza positiva. Primero entre aquellas familias que generalmente se consideran que constituyen el orden

natural de los Rutales (Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Bursceraceae, Cneoraceae y posiblemente, Anacardiaceae), las cumarinas se les han encontrado solamente en las familias Meliaceae y Rutaceae.

Dentro de las Rutáceas parece ser que no hay variación significativa en la distribución del tipo de cumarinas entre las tres principales subfamilias. El número total de cumarinas aisladas se encuentra en una proporción de 6:1:3 entre Rutoideae, Toddalioideae y Aurantioideae. El aislamiento de cumarinas lineares, angulares y dihidrofurano y piranocumarinas muestra poca desviación a esta proporción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. 4. 3. Química del género *Casimiroa*.

Debido a las propiedades medicinales que se le atribuyen a *Casimiroa edulis* resulta ser la especie del género más estudiada tanto desde el punto de vista químico como farmacológico. Por otro lado, además de *C. edulis* solamente se han realizado estudios parecidos a *C. greggi* y *C. pringlei*. Como un hecho interesante los metabolitos secundarios aislados y caracterizados de estas especies son de los mismos tipos que caracterizan a toda la familia Rutaceae.

De frutos y hojas de *C. greggi* se han aislado: β -sitosterol, y los flavonoides cerrosillina y 5,6-dimetoxiflavona³². En un estudio de hojas³³ se aisló cerrosillina B; y de la raíz se aislaron los flavonoides zapotina, 5,6,2'-trimetoxiflavona y 5,6,2',3',4',6'-hexametoxiflavona y las cumarinas sesclina, O-geranilostenol³⁴ y 3(α,α -dimetilherniarina).

Solamente se ha informado de un estudio de la parte aérea de *C. pringlei*³⁵ en el que se aislaron cumarinas y flavonoides. Nueve compuestos de estructura conocida: el 8-geraniloxipsoraleno, bergapteno, el xanthotoxol, la felopterina, la 5,6-dimetoxiflavona, 5,6,3'-trimeoxiflavona, 5,6,3',5'-tetrametoxiflavona (cerrosillina), la 5,6,3',4',5'-pentametoxiflavona (cerrosillina B) y la 5,6,3',4',5',6'-hexametoxiflavona. Se aislaron dos nuevas furanocumarinas: la 8-[(6,7-dihidroxi-3,7-dimetil-2-octenil)oxi]-psoraleno y la 8-[(4-acetoxi-3-metil-butil)oxi]psoraleno. Y también se aislaron cuatro flavonas de estructura novedosa que no habían sido descritas en la literatura: la 5,3',5'-trimetoxiflavona, la 5,6,2',3',6'-pentametoxiflavona, la 5,2',3',4',6'-pentametoxiflavona y la 5,2',3',5',6'-pentametoxiflavona.

Al estudiar la parte aérea de *Casimiroa edulis* se han aislado los hidrocarburos cerotato de carnaubilo y hentriacontano³⁶; así como los alcaloides casimiroina, eduleína, 1-metil-2-fenilquinol-4-ona³⁶⁻³⁹; y las cumarinas isopimpinelina y el éster metílico de la escopoletina³⁶.

De la raíz se han extraído la cumarina bergapteno³⁹; los flavonoides zapotina y 5-6-dimetoxiflavona^{39, 41}; los alcaloides γ -fagarina, casimiroina, dictamina, eduleína, edulitina, edulinina, zapotinina³⁹⁻⁴².

En la corteza se han encontrado los flavonoides 5-6-dimetoxiflavona, casimiroina, zapotina^{37, 39}; los alcaloides γ -fagarina, eduleína, edulitina, edulinina, skimmianina y dictamnina; y la cumarina escopoletina^{36, 37-39, 42}.

Los folíolos presentaron el flavonoide rutina y los alcaloides: histamina y N α -metil-histamina^{37, 43, 44, 47}.

En las semillas de *C. edulis* se han encontrado triterpenos como la zapoterina, 7 α -obacunol y la obacunona; esteroleos como el β -sitosterol y el daucosterol^{40, 41, 45, 46, 87, 89}. También se han logrado aislar las cumarinas como felopterina, 5-geranil-oxipsoralen, 8-geranil-oxipsoraleno, 8-geranil-5 metoxi-oxipsoraleno, y la 9-hidroxi-4-metoxi-furano-(3,2)-benzopirán-7-ona^{36, 40, 47, 48, 87}. Así mismo se han detectado los flavonoides zapotina y zapotinina^{40, 87} los alcaloides quinolínicos casimiroina, casimiroedina, edulitina, y edulinina^{36, 39, 40, 42, 45, 47, 48}. El alcaloide N-benzoiltiramina⁴⁶; los alcaloides histámnicos N,N-dimetilhistamina, N-metil-histamina y la histamina^{37, 40, 43, 44, 47, 50}.

De acuerdo con estos datos, cabría esperar que las demás especies del género *Casimiroa* produjeran alcaloides, cumarinas y flavonoides, ya que como se ha mencionado constituyen los quimio-marcadores de la familia. Sin embargo, es factible suponer que existan diferencias estructurales entre estos metabolitos.

Como puede verse son muy pocas las especies del género *Casimiroa* estudiadas fitoquímicamente. Por lo que, resulta interesante proporcionar datos químicos acerca de *C. pubescens*, ya que esta especie se distribuye en el centro del país y se dice que las semillas al igual que las de *C. edulis* contienen una sustancia de propiedades soporíferas⁵⁷.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *Casimiroa*.

Las plantas curativas -en la medicina mexicana- eran clasificadas dentro de una particular interpretación de los fenómenos biológicos. Poco o nada sabemos de los principios fisiológicos del saber médico de aquella cultura, aunque parte de la herbolaria medicinal prehispánica nos llegó a través de los primeros investigadores de la flora azteca durante la Colonia, tales como Francisco Hernández y Bernardino de Sahagún, quienes recogen en sus manuscritos datos sobre las propiedades que los habitantes indígenas de entonces atribuían a las plantas.

Bernardino de Sahagún, en su obra *Historia General de las Cosas de Nueva España*, escrita entre 1540 y 1580, dedica unas líneas a los zapotes (que es la forma como se castellanizó el sonido *tzápotl*) y señala:

"Hay un árbol que se llama tzápotl: es liso, tiene la corteza verde, las hojas redondas, la madera blanca, blanda y liviana. La fruta de estos árboles es como manzanas grandes, de fuera son verdes o amarillas y por dentro blancas y blandas; son muy dulces, tienen tres o cuatro cuescos dentro, blancos y si se comen muchos dan cámaras (*diarrea*). Hay otros zapotes que se llaman *cochitzápotl*".

El protomédico Francisco Hernández recoge en su monumental *Historia de las Plantas de Nueva España*, escrita a partir de 1570, una descripción más precisa de un zapote medicinal y sobre todo del uso que se hacía de las plantas:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *Casimiroa*.

“Del *cochitzápotl* o *izápotl* somnífero. Es un árbol grande, desaliñado con hojas como de cidro, ralas y en grupos de tres, con tallos llenos de lunares blancos, flores amarillas y medianas y fruto de forma y tamaño de membrillo al que nuestros españoles llaman zapote blanco, comestible, de sabor agradable pero no del todo saludable como alimento y con huesos de almendra venenosa y mortífera. La corteza del árbol es seca y un poco dulce con cierto amargor; las hojas machacadas y aplicadas a los pezones de las nodrizas curan las cámaras de los infantes; los huesos quemados y hechos polvo curan las úlceras pútridas quemando y consumiendo por completo la carne viciada, limpiando la úlcera, creando carne nueva y produciendo la cicatrización con rapidez admirable; los frutos comidos concilian el sueño, de donde les viene el nombre”.

La descripción de Hernández⁵⁷, si bien intenta establecer algunas características de la especie, adquiere importancia por estar combinada con las indicaciones terapéuticas de la época, particularmente por la ingeniosa descripción de la curación de las diarreas de los lactantes y que de alguna manera refleja una eficaz vía de administración oral seguida por las indígenas mexicanas. En su apunte establece el uso de hojas, semillas y frutos con diferentes propósitos; mientras las hojas se utilizan para el tratamiento de la diarrea infantil, las semillas (que al interior son consideradas venenosas) tienen utilidad como medicamento local cutáneo; finalmente, ambos autores coinciden en que los frutos llamados *cochitzápotl* producirían sueño, sin señalar con esto ningún detalle en particular, hecho que no deja de extrañar sobre todo porque el nombre de la planta se fundamentaría en esta propiedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *Casimiroa*.

En 1896 el doctor José Ramírez dio a conocer una nueva especie, *Casimiroa pubescens* conocida popularmente como "zapote de rata" y que se creyó tenía propiedades semejantes a la de *C. edulis*.

En el año de 1957 no deja de ser importante referirse al primer estudio del zapote, en donde se hace hincapié sobre la "continuada mención de los efectos farmacológicos de la planta", información de la que se parte con el propósito de esclarecer dichos efectos. Habiéndose aislado N-benzoiltiramina y considerándose entonces a la tiramina como un principio activo del ergot, se sugirió que los efectos del zapote eran debidos a la presencia de esta sustancia, sin proporcionar algún estudio farmacológico al respecto. Por otra parte, no parece haberse tomado en cuenta que la población hace uso discriminado de las hojas y semillas de la planta, mientras se dedicaban grandes esfuerzos al estudio de la corteza⁵⁷.

Una de las actividades mejor evaluadas y comprobadas de *Casimiroa edulis* es su actividad hipotensora, la cual se ha observado con diferentes tipos de extractos preparados con varias partes de la planta y en especial con las semillas. Se comprobó esta actividad por vía intravenosa, utilizando diversas especies de animales de experimentación (gato, perro, cobayo, conejo y rata).

Otras dos actividades bien estudiadas y comprobadas son su efecto estimulante sobre el útero, observado con extractos acuosos y etanólicos de la planta, demostrado en tejido aislado de útero de gato, cobayo, conejo y adulto humano. La actividad emética del extracto etanólico fue evaluada en perros por vía oral.

ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *Casimiroa*.

El extracto etanólico de la semilla también presentó actividad relajante de los músculos esqueléticos y estimulante de los músculos lisos, procedente de varias especies animales (cobayo, conejo y gato). Por otro lado el fruto presentó actividad analgésica, depresora del sistema nervioso central e hipotérmica.

Los extractos etanólicos-acuosos preparados a partir de las partes aéreas de la planta y evaluados en ratas, mostraron actividad antiinflamatoria y diurética mientras que el extracto metanólico-etanólico de semillas, administrado por vía intravenosa, mostró actividad hipotensiva y un efecto cronotrópico negativo en ratas.

En lo que respecta a la toxicidad de los extractos se observó el efecto del extracto alcohólico sobre la presión arterial en perros a una dosis de 0.2 g/kg de peso, que ocasiona analgesia, depresión del sistema nervioso central, paro respiratorio y la muerte por sobredosis.

La administración del extracto a perros, a la dosis de 1g/kg de peso, causa vómito enfriamiento, inactividad, parálisis y muerte por paro respiratorio. Por otra parte, la aplicación oral de zapote blanco a conejas gestantes reveló en la autopsia un abundante sangrado vaginal.

Tratando de determinar la LD₅₀ en ratas se encontró que a la dosis de 2 a 2.5 g/kg de peso de rata, se observaban síntomas de toxicidad tales como pérdida de la coordinación muscular, así como: pérdida del equilibrio, entre otros⁵⁸.

ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS DEL GÉNERO *Casimiroa*.

En 1897, en el Instituto Médico Nacional de México un gran número de investigadores dedicaron varios años de trabajo intentando dilucidar las propiedades medicinales del zapote blanco. Ramírez (1897) describió la obtención de un glucósido al que llamaron **casimirosa** (glucósido mayoritario presente en las semillas del árbol de *C. edulis* con propiedades hipnóticas y sedantes de los centros cerebrales)⁵⁹, sustancia presente en los extractos obtenidos con mezclas de alcohol-agua de las semillas de *C. edulis*. Los efectos biológicos causados por este glucósido fueron: parálisis de la motilidad, lentitud de las contracciones cardíacas, pérdida del equilibrio, aumento de la secreción intestinal y gástrica, respiración frecuente, pérdida de la sensibilidad y muerte por asfixia⁶⁰.

IV. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

La palabra inflamación deriva del latín "*flamma*", que significa fuego o "*inflammare*", prenderse o encenderse. En Grecia fue usada la palabra "*phlogosis*", que significa área inflamada⁶¹. Se entiende por inflamación el conjunto de mecanismos involucrados en la respuesta de cuerpo frente a una agresión, encaminados a eliminar al agente agresor y reparar el daño⁶².

El proceso de inflamación, como parte que es del mecanismo de defensa inmune, es normal y, en consecuencia es benéfico para el organismo. No obstante, en algunas condiciones se prolonga en forma indebida dando lugar a daño tisular y manifestaciones clínicas muy importantes⁶².

La inflamación se divide en tres fases: inflamación aguda, respuesta inmunitaria e inflamación crónica⁶³. La **inflamación aguda**, constituye la respuesta inicial a la lesión tisular, causada por factores endógenos (fractura de un hueso o necrosis de tejido), y por factores exógenos, los cuales incluyen varios tipos de daños, tales como, daños físicos o mecánicos (quemadura, cortadura), daños químicos (exposición a sustancias corrosivas), daño biológico (infección por microorganismos) y daño inmunológico (reacciones de hipersensibilidad). La **respuesta inmunitaria**, se origina cuando células inmunitariamente componentes se activan en respuesta a microorganismos o sustancias antigénicas extrañas liberadas durante la respuesta inflamatoria aguda ó crónica. La falta de una oportuna resolución del proceso inflamatorio por persistencia del antígeno o agente agresor dentro de

los tejidos da lugar a la **inflamación crónica** que llevará irremediablemente al daño permanente de los tejidos, por ejemplo la artritis reumatoide, gota, asma, tuberculosis, linfogranuloma venéreo, etc⁶². Las **características clínicas** clásicas que comprende la respuesta inflamatoria son rubor, calor, dolor, tumor y pérdida eventual de función del área afectada⁶¹. A continuación se describe brevemente el origen de cada una de estas manifestaciones.

La manifestación inicial del proceso es **rubor**, y se debe a la vasodilatación que, aumenta el flujo sanguíneo a la zona afectada. Este mecanismo tiene por objeto asegurar un adecuado suministro, al sitio de agresión, de factores plasmáticos como anticuerpos, mediadores de la inflamación, etc., y de células como polimorfonucleares o macrófagos. El incremento de flujo sanguíneo en la zona afectada trae como consecuencia el aumento local de temperatura o **calor**. El **tumor** o hinchazón, ocurre como consecuencia de la exudación de líquidos y la migración de células de los capilares hacia los tejidos. Al exudado plasmático sigue el proceso de infiltración celular, que en las primeras horas está dado por polimorfonucleares (PMNs) (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y luego por macrófagos y linfocitos. Finalmente, el **dolor** se debe a la activación del sistema de las cininas y de las prostaglandinas⁶².

IV. 1. Mediadores de la inflamación.

Se denominan así, a una serie de compuestos que actúan como mensajeros entre las células involucradas, ellos activan una apropiada respuesta inflamatoria cuando son liberados por algunos tejidos dañados⁶¹. Son producidos directa o indirectamente por las células antes mencionadas o se derivan de otros factores humorales. Se dividen en dos grupos principales, los primarios o proteínizados, que a su vez pueden ser de origen celular o humoral, y los secundarios, sólo de origen celular⁶².

* **Mediadores primarios de origen celular.** Se encuentran en los gránulos citoplasmáticos o lisosomas de las células fagocíticas y de los mastocitos. De los fagocitos salen por degranulación externa inducida por diferentes estímulos físicos, químicos u hormonales, la **elastasa** y **colagenasa**, ambos dañan tejidos. La **catepsina G**, actúa sobre los factores **C3** y **C5** del complemento generando **C3a** y **C5a**. La **lactoferrina**, induce la producción de radicales hidroxílicos⁶². De los mastocitos y basófilos se originan, por degranulación inducida inmunológicamente (IgE), por factores físicos o por factores químicos, los siguientes mediadores: la **histamina**, que representa el mediador de la inflamación de más rápida acción; cuando actúa sobre los receptores **H₁** es un potente vasodilatador, aumenta la permeabilidad capilar, induce la contracción del músculo liso y estimula los nervios sensoriales. Por otra parte, el **factor activador de las plaquetas**, el cual incrementa la permeabilidad vascular, produce edema, contracción del músculo liso e hipotensión sistémica. Por último, la **serotonina**, que influye aumentando la permeabilidad vascular y vasodilatación⁶³.

Mediadores primarios de origen humoral. Se derivan de los sistemas del complemento, coagulación y quininas⁶². Del **complemento**, por acción de la catepsina, se originan polipéptidos anafilotóxicos, como **C4a, C3a, C5a**, que incrementan la permeabilidad capilar y facilitan la liberación de histamina⁶⁴. Del **sistema de coagulación**, se origina la **fibrina** y el **plasmin**. Del **sistema de las cininas** activado por el factor de Hageman, se produce **bradícidina**, esta incrementa la permeabilidad capilar, produce vasodilatación y dolor, por estímulos sobre las terminaciones nerviosas^{61,62}.

* **Mediadores secundarios**, su síntesis empieza una vez que la respuesta inflamatoria se ha iniciado⁶¹. De los macrófagos se origina la **interleucina I (IL-1)**, uno de los mediadores más importantes, responsable de la inducción de fiebre, estimula la producción de proteínas de la fase aguda de la inflamación, tales como: la **proteína C reactiva (PCR)**, la cual aparece dentro de las primeras 24 horas del proceso inflamatorio agudo; ésta incrementa la fagocitosis y se adhiere a linfocitos y macrófagos; **fibrinógeno**, la formación de fibrina a nivel tisular, aísla los antígenos, formando a su alrededor un gel protector; **proteína A sérica del amiloide**, que adquiere importancia en procesos crónicos^{61,62}. De los polimorfonucleares, macrófagos y células endoteliales, se originan los **eicosanoides (PGs, LTs, TXs)**, importantes mediadores de la inflamación y punto clave en el tratamiento de la misma. De los macrófagos se produce el **factor de necrosis tumoral (TNF)**, también conocido como linfotoxina y caquexina⁶¹, potente mediador de la fase aguda de la inflamación, estimula la síntesis de PGE_2 y de proteínas de la fase aguda, tiene efecto citotóxico sobre células tumorales⁶⁴. Del metabolismo del oxígeno, activado por degranulación externa de los polimorfonucleares se originan: el **superóxido**, los **radicales hidroxílicos** ($\cdot OH$), el **peróxido de hidrógeno** (H_2O_2)^{62,64}.

Eicosanoides. Son productos de oxidación de ácidos grasos insaturados, poseen importantes actividades biológicas, algunas de las cuales tienen que ver con el proceso inflamatorio y la respuesta inmune. El ácido graso precursor más importante es el ácido araquidónico, compuesto de 20 átomos de carbono (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico)⁶³. El **ácido araquidónico** se deriva de alimentos o es sintetizado en el cuerpo a partir del ácido linoleico⁶⁵. Se almacena en los lípidos de membranas celulares y esterificado a fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Así, el paso limitante en la síntesis de eicosanoides, es la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana por fosfolipasas específicas, principalmente fosfolipasa A₂ (PLA₂) o fosfolipasa C (PLC) y diacilglicerol lipasa⁶³. En algunos tipos de células estas enzimas son dependientes de calcio y son activadas por el incremento en la concentración de calcio intracelular. De esta manera, la síntesis de eicosanoides puede iniciarse por una variedad de estímulos que incrementen el nivel de calcio intracelular. Esto ocurre a través de mecanismos de transducción de señal, mediado por receptores específicos (hormonas), ó a través de la perturbación de la integridad de la membrana celular (trauma físico, químico ó inmunológico), los cuales provocarán la activación de PLA₂. Una vez liberado el ácido araquidónico, es oxidado enzimáticamente para producir los eicosanoides, a través de cuatro rutas: ciclooxigenasa, lipooxigenasa, epoxigenasa P450 y vía radicales libres⁶³⁻⁶⁵, fig. 2.

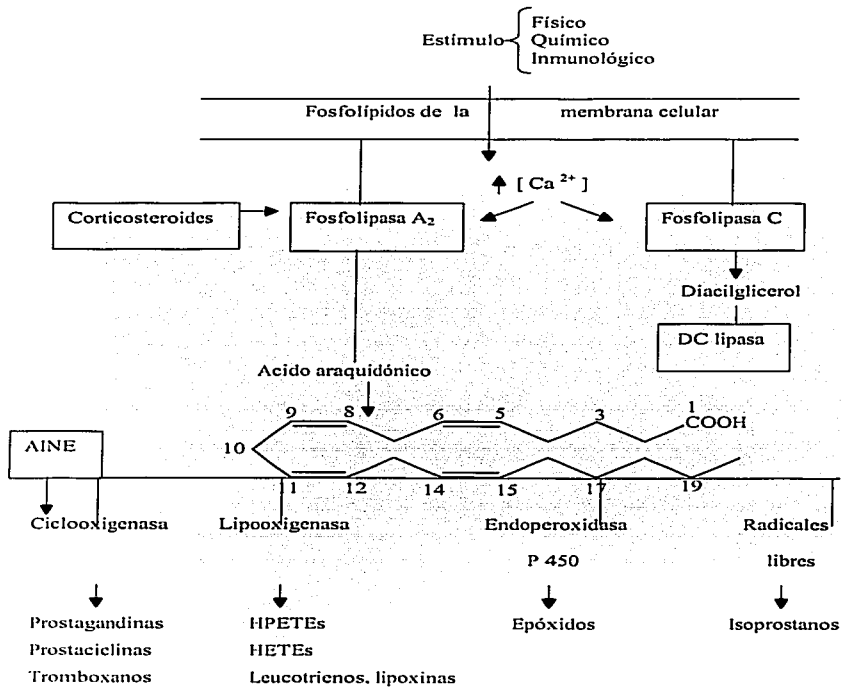


Fig. 2. Liberación y metabolismo del ácido araquidónico y sitios de acción de fármacos antiinflamatorios

Prostaglandinas (PGs). El nombre de prostaglandina deriva de "próstata", ya que en un principio se pensó que se originaban en la glándula prostática^{61,63}. Actualmente, se sabe que, estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en pequeñas cantidades en todos los tejidos y líquidos corporales⁶⁶. Son considerados como hormonas que actúan localmente, es decir, cerca de su área de síntesis. Presentan un amplio espectro de actividad biológica, influyen en la agregación plaquetaria, intervienen en procesos inflamatorios, inhiben las secreciones gástricas, influyen en los aparatos reproductores, estimulan las contracciones uterinas en el parto, entre otras⁶³⁻⁶⁵.

La estructura básica de una molécula de prostaglandinas es un ácido carboxílico de 20 átomos de carbono que contiene un ciclopentano entre C-8 y C-12 y un hidroxilo en C-15, figura 3. Las primeras prostaglandinas aisladas fueron llamadas E (soluble en Eter) y F (soluble en buffer de Fosfato) respectivamente. Las diferentes clases de prostaglandinas que existen se distinguen por los sustituyentes en el ciclopentano, designadas por letras, por ejemplo PGE₂ y PGH₂, etc, y el subíndice indica el número de dobles enlaces^{65,67}.

Las prostaglandinas se biosintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción inicial de la enzima prostaglandina endoperóxido sintetasa. Existen dos isoformas de esta enzima, la PGH sintetasa-1 también llamada COX-1, y la PGH sintetasa-2 comúnmente nombrada COX-2⁶⁸.

La PGH sintetasa, es una enzima bifuncional que tiene dos actividades distintas sobre el ácido araquidónico: (1) ciclooxigenasa y (2) peroxidasa⁶⁷. En la primera, ambas enzimas

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

(COX-1 y COX-2), promueven la captura de las dos moléculas de oxígeno, una para formar el anillo endoperóxido en C-9 y C-11, y otra para formar el grupo hidroperóxido en C-15 dando lugar a PGG₂. La segunda actividad involucra una reducción de peróxido para dar PGH₂ con un grupo hidroxilo en C-15, que es esencial para la actividad biológica⁶³. Ambos endoperóxidos son químicamente inestables, pero pueden ser transformados enzimáticamente a partir de PGH₂ en una variedad de productos que incluyen PGI₂, PGD₂, PGE₂, o TXA₂. (fig. 3). Las prostaglandinas que actúan como mediadores de la inflamación son PGE₂, PGI₂ y PGD₂, estas son responsables de la manifestación de rubor y edema que se presentan en la inflamación aguda^{62,63}. Además, causan vasodilatación y sensibilizan las terminaciones nerviosas aferentes a la acción de la histamina y bradicidina. A nivel de hipotálamo, la PGE₂, producida por estímulo de la IL-1, es la responsable de la producción de fiebre⁶².

TROMBOXANOS (TXs). Se derivan del ácido araquidónico por la vía ciclooxigenasa (fig.3). El TXA₂, como mediador de la inflamación, es un potente vasoconstrictor, sus niveles aumentan en la inflamación aguda y pueden actuar previniendo hemorragias⁶¹.

LEUCOTRIENOS (LTs). Se generan del ácido araquidónico por acción de la lipooxigenasa, que le agrega un endoperóxido en C-5 o C-12, generando los ácidos hidroperoxitetraenicos (HPETEs), los cuales se convierten rápidamente a ácidos hidroxicicosatetraenicos (HETEs) y leucotrienos⁶¹⁻⁶³ fig.4.

Como mediadores de la inflamación, el LTB₄ y 5-HETE, exhiben una fuerte atracción quimiotáctica para los polimorfonucleares que se acumulan en el sitio afectado⁶¹. Los leucotrienos, LTC₄, y LTD₄, incrementan la permeabilidad capilar⁶⁴.

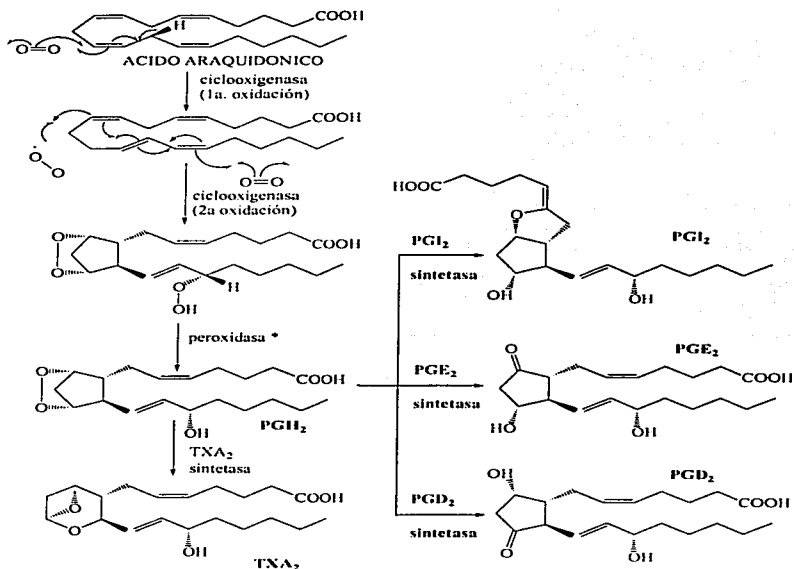


Fig. 3. Biosíntesis de prostaglandinas y tromboxanos. (PGH sintetasa*, enzima bifuncional)

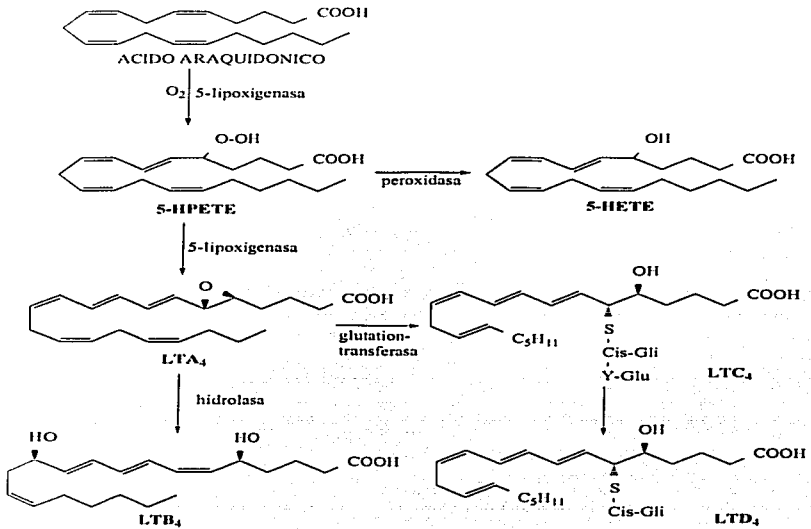


Fig. 4 Biosíntesis de leucotrienos

Agentes antiinflamatorios. Los fármacos que inhiben algunas enzimas que participan en la biosíntesis de eicosanoides, ejercen acción antiinflamatoria⁶².

Los corticosteroides pueden bloquear la síntesis de eicosanoides, porque estimulan la síntesis de lipocortina, un inhibidor proteico de la PLA₂, de esta manera, impiden la liberación del ácido araquidónico disminuyendo apreciablemente la producción de PGs, TX, y LTs que intervienen en el proceso inflamatorio^{62,68}.

La terapia con glucocorticoides, **fármacos antiinflamatorios esteroidales** (AIEs o SAIDs), usada en artritis reumatoide, en la medida de lo posible debería evitarse ya que está asociada a un amplio rango de efectos secundarios adversos que dependen de la dosis y duración del tratamiento, tales como osteoporosis, degeneración de la corteza suprarrenal, úlceras gástricas, glaucoma, hipertensión, obesidad, impotencia, entre otros^{61,68}. Algunos AIE son: Betametasona, hidrocortisona, parametasona, metilprednisolona, tramcinolona, cloprednol, prednisona, dexametasona.

Los fármacos **antiinflamatorios no esteroidales** (AINEs o NSAIDs), como la aspirina, bloquean la formación de PGs y TXs por inhibición de la enzima ciclooxigenasa, pero no inhiben los productos del ácido araquidónico vía lipoxigenasa⁶⁹.

Existen 2 formas de la enzima ciclooxigenasa conocidas como COX-1 y COX-2 (fig.16). La COX-1, es una enzima vinculada a la producción de las prostaglandinas fisiológicas en el riñón y en el estómago, su activación da lugar a la producción de

prostaciclina (PGI₂), que cuando es liberada por el endotelio vascular, es antitrombótica y por la mucosa gástrica, es citoprotectora. Mientras que la enzima COX-2, está ligada a la producción de prostaglandinas en el sitio de inflamación pero no en otros sitios^{68, 70}.

Los fármacos AINEs actuales inhiben preferentemente la COX-1 (Fig 2) y no son selectivos⁶⁹. Los inhibidores selectivos de la enzima COX-2 pueden tener mejores perfiles de seguridad gastrointestinales y renales⁷¹, muy útiles en la terapia de la inflamación crónica, ya que podrían ser antiinflamatorios sin los efectos secundarios que reducen la función renal o producen ulceraciones gástricas como por ejemplo, meloxicam, nimesulid y etodolac que inhiben preferentemente la COX-2⁷²⁻⁷³.

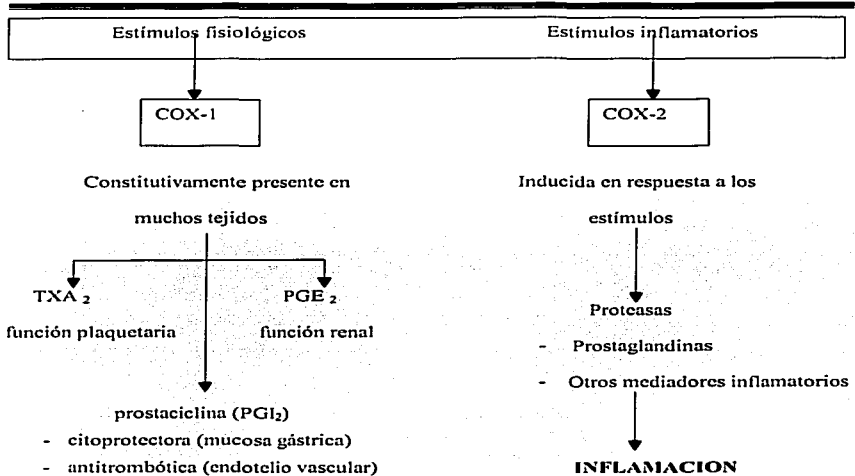


Fig. 5. Isoformas de ciclooxigenasa, COX-1 Y COX-2.

IV. 2. Potencial antiinflamatorio de flavonoides.

En años recientes se han hecho diferentes estudios para determinar el potencial antiinflamatorio de los flavonoides⁷⁴. Se ha observado que los flavonoides ejercen su actividad antiinflamatoria, ya que muchos pueden modular la síntesis de prostaglandinas, funcionan como inhibidores enzimáticos y también tienen propiedades antioxidantes⁶¹.

Algunos flavonoides pueden modular la síntesis de prostaglandinas por inhibición de las enzimas que participan en este proceso. Existen aquellos que pueden inhibir la enzima ciclooxigenasa, como por ejemplo la flavanona, hesperetina, flavona y galangina^{75,76}. Mientras que otras pueden inhibir la enzima lipooxigenasa, entre ellas se tienen a la fisetina, quercetina, ramnetina y miricetina⁷⁵. Además, la quercetina también es un buen inhibidor de la fosfolipasa A₂.

Otra de las enzimas que pueden inhibir los flavonoides es la enzima fosfodiesterasa, la cual cataliza la descomposición del AMPc y, como los fármacos que elevan los niveles de AMPc tienen acción antiinflamatoria, los flavonoides que fomentan niveles elevados de AMPc también actuarán de manera similar, como por ejemplo la amentoflavona⁶¹.

Los flavonoides también pueden manifestar propiedades antiinflamatorias a través de su acción antioxidante, que les permite actuar contra el daño tisular, debido a la formación de radicales libres generados como subproductos de las rutas ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Su

potencial antioxidante radica en su capacidad de captar radicales libres, como por ejemplo la catequina, rutina, morina, cianina y delina⁶¹.

V. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

Los antioxidantes sintéticos fueron hasta hace poco los más populares y ampliamente utilizados; sin embargo, este hecho ha ido cambiando debido a la preocupación existente respecto a su seguridad para la salud tanto humana como animal. Esta situación ha estimulado la investigación sobre sustancias de origen natural con actividad antioxidante; el creciente interés por sustituir en los alimentos a los antioxidantes sintéticos por naturales, junto con la línea de opinión de que lo natural es más recomendable y sano, ha llevado a la búsqueda de fuentes naturales como materia prima para la obtención de antioxidantes. Por tanto, su bajo costo, y la potencial riqueza de los vegetales en sustancias saludables abren un amplio campo de investigación en el sector de los antioxidantes, con perspectivas a nivel incluso curativo.

Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios por donación de un hidrógeno a los radicales libres, generándose un radical libre antioxidante de mayor estabilidad debido a la deslocalización del electrón desapareado en el anillo aromático. Entre los compuestos fenólicos podemos mencionar a los isoflavonoides y flavonoides que se encuentran generalmente en la naturaleza en forma de glicósidos y a los ácidos fenólicos. Además de capturar y estabilizar radicales libres activamente, otros factores como la absorción característica de luz ultravioleta y la capacidad para quelar metales contribuyen significativamente a la actividad antioxidante de los mismos. La inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa también es atribuida a estos compuestos.

V. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

Los antioxidantes sintéticos fueron hasta hace poco los más populares y ampliamente utilizados; sin embargo, este hecho ha ido cambiando debido a la preocupación existente respecto a su seguridad para la salud tanto humana como animal. Esta situación ha estimulado la investigación sobre sustancias de origen natural con actividad antioxidante; el creciente interés por sustituir en los alimentos a los antioxidantes sintéticos por naturales, junto con la línea de opinión de que lo natural es más recomendable y sano, ha llevado a la búsqueda de fuentes naturales como materia prima para la obtención de antioxidantes. Por tanto, su bajo costo, y la potencial riqueza de los vegetales en sustancias saludables abren un amplio campo de investigación en el sector de los antioxidantes, con perspectivas a nivel incluso curativo.

Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes primarios por donación de un hidrógeno a los radicales libres, generándose un radical libre antioxidante de mayor estabilidad debido a la deslocalización del electrón desapareado en el anillo aromático. Entre los compuestos fenólicos podemos mencionar a los isoflavonoides y flavonoides que se encuentran generalmente en la naturaleza en forma de glicósidos y a los ácidos fenólicos. Además de capturar y estabilizar radicales libres activamente, otros factores como la absorción característica de luz ultravioleta y la capacidad para quelar metales contribuyen significativamente a la actividad antioxidante de los mismos. La inhibición de enzimas prooxidantes como la lipooxigenasa también es atribuida a estos compuestos.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

Los radicales libres son moléculas inestables (perdieron un electrón) y altamente reactivas. Su misión es la de remover el electrón que les hace falta, de las moléculas que están a su alrededor para obtener su estabilidad. La molécula atacada (ausencia de un electrón) se convierte entonces en un radical libre y de esta manera se inicia una reacción en cadena que dañará muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.

Los procesos normales del organismo producen radicales libres como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio. También estamos expuestos a elementos del medio ambiente que crean radicales libres como la contaminación industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados y pesticidas, solo para nombrar los más comunes.

No todos los radicales libres son dañinos. Las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control (ejercido por los antioxidantes), las células sanas pueden ser dañadas.

Los radicales libres toman electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que al ser dañada, no podrá cumplir sus funciones como el intercambio de nutrientes y la limpieza de materiales de deshecho, haciendo imposible el proceso de regeneración y reproducción celular. En el interior de la célula, los radicales libres atacan el DNA (material genético) que provee la matriz para la replicación celular, impidiendo a la célula su reproducción.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

Los radicales libres contribuyen al proceso del envejecimiento cuando toman el electrón que les hace falta de las células del tejido colágeno de la piel. Como resultado, la piel pierde su elasticidad y luce seca y arrugada.

Los radicales libres también pueden contribuir al crecimiento anormal de las células, al perder éstas la capacidad de "reconocer" las células vecinas. Esa proliferación sin control se produce en los tumores benignos o malignos (cáncer).

Muchas enfermedades crónicas se han ligado directamente con los radicales libres, como la enfermedad cardiovascular, Alzheimer, accidente vascular cerebral, hepatitis, hipertensión, artritis reumatoide, lupus, diabetes mellitus, enfermedad periodontal, colitis ulcerativa, aterosclerosis, fallo renal crónico y muchas otras.

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres. Unos actúan a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas.

Son clasificados de acuerdo a su trabajo y a su localización. Pueden ser enzimas naturales, antioxidantes obtenidos en la dieta o antioxidantes farmacológicos.

En el ambiente intracelular tenemos antioxidantes naturales: catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. La enzima glutatión peroxidasa contiene selenio en forma

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

de selenio cisterna y ayuda en la prevención de la formación del radical hidroxilo, también regenera la vitamina C, que a su vez regenera la vitamina E.

En el plasma sanguíneo encontramos antioxidantes naturales (proteínas) como la transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina y albúmina. Estos antioxidantes naturales están disminuidos en los pacientes con diabetes.

Otros antioxidantes encontrados en el plasma sanguíneo o suero son la bilirrubina, ácido úrico, vitamina C, vitamina E, beta caroteno, melatonina, flavonoides y estrógenos. Los minerales selenio y zinc también juegan un papel importante en el organismo como antioxidantes.

Los flavonoides son compuestos polifenólicos encontrados en las plantas, así como en frutas y vegetales, que son excelentes antioxidantes. Comúnmente se encuentran también en el té (principalmente té verde) y en el vino.

La producción de antioxidantes naturales y los antioxidantes que se obtienen con la alimentación, no es suficiente para muchas personas. En algunas condiciones como la contaminación ambiental, el fumado, comida rica en alimentos procesados y otras, habrá una producción mayor de radicales libres que los que el cuerpo normalmente puede combatir y sobreviene la enfermedad y el envejecimiento.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE: Radicales libres.

La salud empieza en cada una de nuestras células, que están en un proceso constante de renovación, reparación, reproducción y autodestrucción⁷⁷.

Basados en esta capacidad se han desarrollado distintos métodos de evaluación de la que se denomina actividad antioxidante global, generalmente basados en la evaluación de la capacidad de captura de radicales libres o en la evaluación de su capacidad reductora, constituyendo el grupo de "métodos químicos". Estos métodos ofrecen información muy diversa a la que aportan aquellos basados en medidas biológicas o metabólicas que determinen o evalúan capacidades antioxidantes específicas. La información que aportan ambos métodos es complementaria, pero dada su particular naturaleza no tienen porque estar correlacionados los resultados de ambos métodos. De hecho, los métodos "químicos" permiten, en general, obtener buenas correlaciones entre la actividad antioxidante y la vida media de los productos, pero sólo permiten ligeras aproximaciones a sus efectos protectores de la salud, que son evaluados por los métodos biológicos.

VI. ACTIVIDAD CITOTÓXICA. Compuestos anticancerígenos.

El **cáncer** se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y de proliferación.

Cada célula proliferativa atraviesa un proceso secuencial de **crecimiento y diferenciación** con las siguientes fases:

* Fase G_1 : reposo presíntesis.

* Fase S: síntesis de ADN

* Fase G_2 : periodo postsíntesis de ADN, durante el cual se sintetiza ARN y proteínas.

* Fase M: mitosis.

Una vez terminada la división celular, la célula puede entrar en un estado de reposo proliferativo completo y permanente (fase G_0), entrar en el periodo de reposo relativo postmitótico (G_1) o perder totalmente su capacidad reproductora y sufrir un proceso de diferenciación. Las células en fase G_0 contribuyen a la masa tumoral, son resistentes a la terapia farmacológica, no están diferenciadas y perduran mientras las condiciones nutritivas lo permitan, en determinadas circunstancias pueden pasar a la fase G_1 contribuyendo a la actividad proliferativa.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA: Compuestos anticancerígenos.

Todas nuestras células tienen genes encargados de la regulación del crecimiento y cada vez que una célula al interactuar con un agente externo sufre daño en su armonía genética, estos genes y sus productos proteicos inducirán una reparación inmediata del daño y si no pueden influir en la reparación enviarán a la célula a la destrucción para evitar la expansión clonal del daño genético, estos son los llamados genes supresores de tumores o antioncogenes, entre los más estudiados están el p53 y el Rb.

El gen p53 es denominado el gran guardián del genoma humano, está implicado en el control del ciclo celular y ante cualquier alteración genética paraliza el ciclo celular hasta su restauración o eliminación celular. El Rb ante los daños genéticos paraliza el ciclo celular en G1. Estos genes supresores impiden que se clonen los errores genéticos inducidos por la interacción con agentes externos. Cuando estos genes y sus productos sufren daños por mutación o inhibitorios la célula pierde su protección y se pueden desarrollar tumores malignos.

Otra familia de genes relacionados con el control del ciclo celular la constituye los protooncogenes que controlan la proliferación y diferenciación celular, cuando ocurren mutaciones u otras alteraciones a este nivel el protooncogen pasa a oncogen y estos desencadenan señales mitogénicas que escapan a los controles de regulación normales de la célula y se induce la formación de tumores malignos. Los productos de los protooncogenes tienen diferentes funciones dentro de la célula, pueden ser factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y el PDGF, pueden funcionar como receptores de membrana (EGF-R), además existen receptores intracelulares que responden a las hormonas

esteroides, la célula interpreta la señal (transducción) y envía segundos mensajeros que pueden alterar la transcripción ya sea permitiendo que se expresen nuevos genes o modificando la expresión de los activados. Los protooncogenes pueden ser activados a oncogenes por mutaciones, por inserciones de genomas virales, translocaciones y amplificaciones. La alteración de los genes supresores y protooncogenes, que controlan la proliferación y diferenciación celular ha demostrado ser el primer eslabón del proceso de malignización, de igual forma dirigir la terapia actual contra el cáncer hacia el control y reparación de estas alteraciones genéticas constituyen las grandes nuevas metas de este siglo.

En los últimos años, los productos naturales, han contribuido de manera destacada al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Durante el período de 1983 a 1994, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA) aprobó 520 nuevos fármacos, de los cuales 157 (30%), fueron productos naturales o compuestos derivados de estos. Dicho porcentaje fue mayor en el caso de agentes anticancerígenos, donde los productos naturales y derivados representaron el 61% de los fármacos registrados en ese período⁷⁸. Algunos anticancerígenos de origen vegetal con aplicaciones clínicas son: Paclitaxel (Taxol®) aislado de *Taxus brevifolia* L., Vincristina (Oncovine ®) y Vinblastina obtenidas de *Catharantus roseus* G. Don., Podophyllotoxin de *Podophyllum peltatum* L. y Camptothecin de *Camptotheca acuminata* Decne⁷⁹.

Se ha demostrado recientemente que las cumarinas y algunos de sus derivados ejercen actividades citotóxicas en varias células tumorales de humanos. Por ejemplo, estas sustancias, sobre todo el ácido o-cumárico, muestran actividades citotóxicas contra la línea celular del

ACTIVIDAD CITOTÓXICA: Compuestos anticancerígenos.

mastocitoma P815 a una concentración > 100 mg/ml. Esta acción citotóxica no era debida a la inducción de macrófago contra P815 ni debida al descargo aumentado de las citoquinas TNF- γ y IL-2, sino a la apoptosis. De hecho, los efectos citotóxicos observados de la cumarina y sus compuestos relacionados fueron acompañados por característicos cambios morfológicos en la apoptosis: núcleos brillantemente condensados rojo-fluorescentes observados por microscopía de fluorescencia, la reducción de volumen de la célula, condensación de cromatina nuclear, fragmentación nuclear y cuerpos apoptóticos.

Los inhibidores de la topoisomerasa, agentes alquilantes, antimetabolitos y antagonistas hormonales, pueden inducir apoptosis en células tumorales. Sin embargo, estas sustancias también actúan en el ciclo celular de células normales. La apoptosis es caracterizada como un mecanismo patológico, en donde existe la muerte celular. Muchos carcinógenos pueden dañar ADN o interferir con enzimas necesarias para la replicación de ADN. Una célula puede responder a semejante lesión por retraso de división celular hasta la reparación de daño, por inducción de apoptosis o progresión a través del ciclo de la célula. La apoptosis parecía ser un método eficaz para prevenir la transformación maligna porque pudiera quitar células con lesiones genéticas.

Estudios recientes han demostrado que la apoptosis pueden estar involucrada en la muerte de la célula inducida por reactivos de la quimioterapia como cis-platino, citarabina, camptotecina, etoposida, teniposida, ansacrina y quercetina.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA: Compuestos anticancerígenos.

Pueden existir mecanismos diferentes con que los compuestos citotóxicos de origen natural pueden inhibir la actividad proliferativa de células tumorales. Éstos incluyen efectos en el ciclo de la célula, regulación de la expresión del oncogen, la inducción de apoptosis, así como la inducción de diferenciación celular. Estos hallazgos en el modo y mecanismos de los diferentes compuestos con acción citotóxica pueden ser de suma importancia para el desarrollo extenso de estas sustancias por la aplicación clínica⁸⁶.

VII. OBJETIVOS.**VII. 1. Objetivo general.**

✓ Realizar el estudio fitoquímico de las semillas de *Casimiroa pubescens* y evaluar la actividad citotóxica, antiinflamatoria y antioxidante de algunos de los compuestos aislados de dicha especie.

VII. 2. Objetivos particulares.

✓ Obtener el extracto hexánico, acetato de etilo, metanólico y acetónico de las semillas de *Casimiroa pubescens*.

✓ Aislar, purificar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en los extractos mediante la aplicación de la metodología convencional en estudios fitoquímicos.

✓ Evaluar la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de TPA, a los flavonoides mayoritarios aislados.

✓ Evaluar la actividad citotóxica en distintas líneas celulares cancerígenas de algunos compuestos aislados.

- ✓ Evaluar la actividad antioxidante de algunos compuestos mediante la técnica de DPPH.

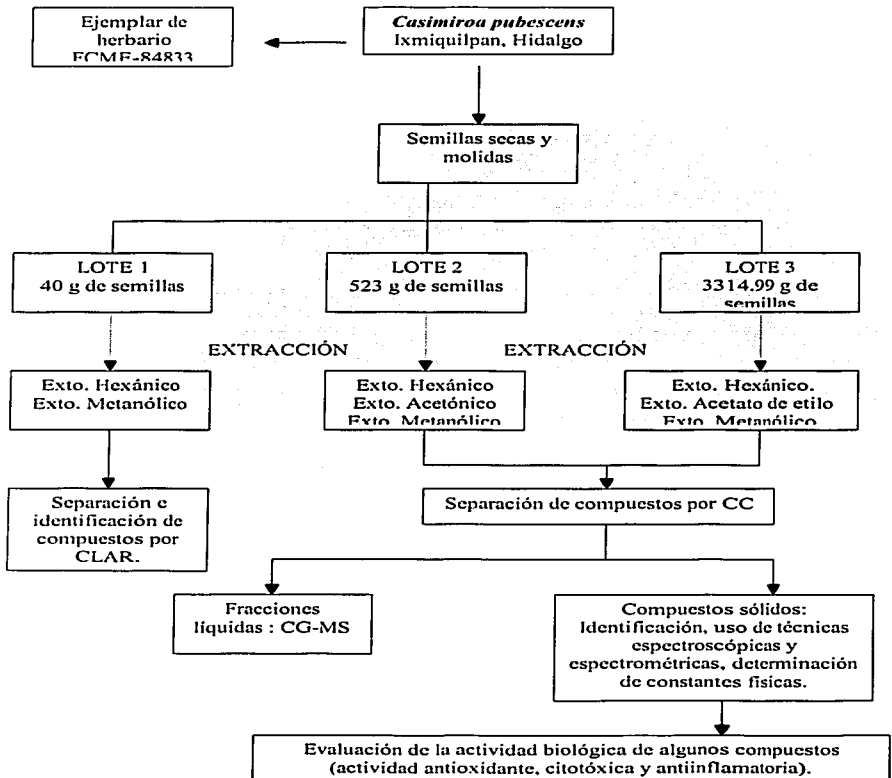
- ✓ Contribuir al conocimiento del perfil fitoquímico y quimiotaixonómico del género *Casimiroa*.

VIII. HIPOTESIS

Si se han encontrado en especies del género *Casimiroa* metabolitos secundarios de tipo alcaloide, flavonoide, limonoide, cumarínico y algunos de estos presentan diversas actividades biológicas, entonces, del estudio fitoquímico de *C. pubescens* se podrán aislar compuestos característicos del género y será posible evaluar la actividad biológica de algunos de estos.

PARTE EXPERIMENTAL..

Fig. 6 Metodología General.



IX. PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y METODOS

IX. 1. Condiciones generales para el trabajo experimental.

✓ **Análisis cromatográfico (Cromatografía en columna y en capa fina).**

Para el análisis cromatográfico en columna (CC) se utilizó, como fase estacionaria, Sílica Gel Kieselgel G, en columnas de vidrio de diferentes capacidades, de acuerdo a la muestra por analizar.

Para el análisis cromatográfico cualitativo (CCF) se utilizaron cromatofolios de Sílica Gel F₂₅₄ Merck (20 X 20 X 0.25 mm).

Para el análisis cromatográfico preparativo (CCP) se utilizaron cromatoplacas de Sílica Gel F₂₅₄ Merck (20 X 20 X 2 mm).

✓ **Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los productos naturales y sus derivados.**

Los puntos de fusión (p.f.) (°C) se determinaron en un aparato Fischer Jones y se reportan los valores sin corrección.

Los espectros en el Ultravioleta (UV) se determinaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV160U, las absorciones se dan en nm.

Los espectros en el Infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet Magna IR Spectrofotometer 750, en pastilla de KBr, en solución, o película en CHCl_3 , con 1 mg de muestra. Las absorciones se dan en cm^{-1} .

Los espectros de masas (EM) se elaboraron en un equipo Hewlett-Packard modelo 5945 A, JMS-SX 102 JEOL y JMS-AX505 mediante técnicas de impacto electrónico ó por ionización a 70 eV.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se determinaron a 200 y 300 MHz en el caso de $\text{RMN-}^1\text{H}$, y a 75 MHz para $\text{RMN-}^{13}\text{C}$, en espectrómetros analíticos Varian GEMINI-200, JEOL Eclipse-300, Varian UNITY-300, Bruker Avance-300, y SÜO Varian Unity Plus-500, utilizando como disolventes CDCl_3 y DMSO-d_6 , en todos los casos se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso para experimentos de desacoplamiento y por transferencia de polarización en ^1H y ^{13}C (DEPT). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm), las señales se indican de la siguiente manera: s=singulete, d=doblete, dd=doble doblote, t=triplete, c=cuarteto, m=multiplote y a=señal ancha, las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hertz (Hz).

La difracción de rayos X, se realizó en un difractómetro Siemens P4/PC y con el método de colección ω 20.

Cromatografía de gases.

A las fracciones líquidas que se obtuvieron por cromatografía en columna del extracto hexánico se les realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) se efectuó en un cromatógrafo de líquidos Waters, modelo Delta PREP 4000, con detector UV, modelo 486 a una longitud de onda de 310 nm. El flujo de disolvente se mantuvo a 1 ml/min a temperatura ambiente, utilizando una columna LUNA C18 (2). Largo: 15 cm.

Eluyente: Gradiente: metanol/agua 50/50 hasta metanol/agua 90/10 en 25 min.

Disolvente de la muestra: Metanol y acetato de etilo.

IX. 2. Preparación del material vegetal.

Casimiroa pubescens se recolectó a 40 km al noroeste de Ixmiquilpan en el Estado de Hidalgo en junio de 2000. Los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México con número de registro 84833 (FCME). La especie fue identificada por la M. en C. A. García.

De los frutos se separaron las semillas; se pusieron a secar a temperatura ambiente y posteriormente se molieron junto con su endocarpio.

IX. 3. Extracción.

Las semillas finamente molidas se extrajeron mediante un proceso de maceración con diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente (hexano, acetato de etilo, acetona y metanol), a temperatura ambiente, durante 48 horas con cada uno. Después de evaporar el disolvente por destilación a presión reducida, los extractos secos se pesaron, obteniéndose sus rendimientos (%) (Cuadro 1).

Para el análisis de los extractos por CLAR se utilizó un lote de 40g (lote 1) de semillas las que se extrajeron con hexano y metanol.

Para la obtención de compuestos a través de CC se extrajeron 2 lotes de semillas. El primer lote (523 g) se extrajo con hexano, acetona y metanol (lote 2) y el segundo lote (3314.99 g) se extrajo con hexano, acetato de etilo y metanol (lote 3).

El rendimiento de los extractos de los lotes se encuentra en la siguiente tabla:

	LOTE 1		LOTE 2		LOTE 3	
	40 g semillas		523.00 g semillas		3314.99 g semillas	
Disolvente	Exto. (g)	Exto. (%)	Exto (g)	Exto(%)	Exto (g)	Exto(%)
Hexano	0.40	1.0	35.4	6.7686	27.13	0.8184
Acetato de Etilo	*		*	*	91.99	2.7749
Metanol	2.40	6.0	**	**	62.21	1.8766
Acetona	*		27.25	5.2103	*	*

* No se obtuvieron esos extractos.

** No se obtuvo el rendimiento del extracto, por tener un alto contenido de agua.

Cuadro 1. Extractos obtenidos de *Casimiroa pubescens*

IX. 4. Separación de compuestos.

IX. 4 a. Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Los extractos hexánicos y metanólicos del lote 1 se sometieron a un análisis cualitativo mediante la técnica de CLAR y se observó a través de estándares⁸⁵ la presencia de heraclenol (19), isopimpinlina (1), heraclenina (18), felopterina (17) y skimmianina (3).

Para efectuar un análisis cuantitativo se prepararon disoluciones en acetato de etilo a concentraciones de 2.9, 2.6, 2.6, 2.7 y 3.4 mg/ml, de los compuestos 19, 1, 18, 17 y 3 respectivamente. De estas disoluciones se prepararon 5 diluciones de cada compuesto en el rango de 0.013 a 0.13 mg/ml. Las curvas de calibración se construyeron inyectando, por triplicado, las diluciones estándar.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software "Millenium" (Waters), este programa calcula la cantidad de cada compuesto presente en cada mililitro de disolución inyectada, sobre la base de las curvas de calibración de los estándares. La cantidad de cada compuesto presente en el extracto hexánico se suma con el correspondiente compuesto presente en el extracto metanólico y con esta suma se calculan los miligramos de cada compuesto presentes en cada gramo de planta seca.

La cantidad de compuesto (mg) por gramo de semilla se reporta a continuación.

SEMILLAS <i>C. pubescens</i>					
COMPUESTOS	1	3	15	16	17
(mg/g)	0.11	0.06	0.86	1.82	0.06

IX. 4. b. Cromatografía en columna.

El extracto hexánico, de acetato de etilo, acetonico y metanólico de los lotes 2 y 3 se separaron por CC de acuerdo a las condiciones mencionadas anteriormente. Las columnas

PARTE EXPERIMENTAL.

cromatográficas se eluyeron comenzando con hexano y aumentando la polaridad gradualmente con mezclas de hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol, hasta llegar a metanol. Se recolectaron fracciones de 100 ml cada una. En el cuadro 2 se presentan el número de fracciones obtenidas para cada una de las columnas cromatográficas efectuadas.

Cantidad de semilla extraída	LOTE 2	LOTE 3
	523.00 g semillas	3314.99 g semillas
Disolvente	Numero de fracciones (100 ml c/u)	
Hexano	169	139
Acetato de Etilo	*	146
Metanol	*	160
Acetona	174	*

* No se obtuvieron esos extractos.

Cuadro 2. Número de fracciones obtenidas en CC de los distintos extractos.

En los cuadros 3 a 7 se presentan las fracciones obtenidas de cada columna con su correspondiente eluyente.

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones
Hexano	100	1--98
Hex-AcOEt	70/30	99--134
Hex-AcOEt	50/50	135--145
Hex-AcOEt	10//90	146--152
AcOEt	100	153--57
AcOEt-McOH	50/50	158--163
McOH	100	164--169

Cuadro 3. Resumen de la CC del extracto hexánico (Lote 2) de las semillas de *C. pubescens*.

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones
Hexano	100	1 -- 9
Hex-AcOEt	90/10	10 -- 25
Hex-AcOEt	70/30	26 --38
Hex-AcOEt	50/50	39 -- 69
Hex-AcOEt	30/70	70 --91
Hex-AcOEt	10//90	92 -- 124
AcOEt	100	125 -- 139
AcOEt-McOH	70/30	140 -- 156
AcOEt-McOH	50/50	157 -- 165
McOH	100	166 -- 174

Cuadro 4. Resumen de la CC del extracto acetónico (Lote 2) de las semillas de *C. pubescens*.

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones
Hexano	100	1 -- 7
Hex-AcOEt	90/10	8 -- 49
Hex-AcOEt	80/20	50 -- 66
Hex-AcOEt	70/30	67 -- 86
Hex-AcOEt	50/50	87 -- 96
Hex-AcOEt	30/70	97 -- 110
Hex-AcOEt	20/80	111 -- 117
AcOEt	100	118 -- 131
AcOEt-MeOH	50/50	132 -- 138
MeOH	100	139

Cuadro 5. Resumen de la CC del extracto hexánico (Lote 3) de las semillas de *C. pubescens*.

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones
Hexano	100	1 -- 17
Hex-AcOEt	90/10	18 -- 36
Hex-AcOEt	80/20	37 -- 50
Hex-AcOEt	70/30	51 -- 71
Hex-AcOEt	60/40	72 -- 84
Hex-AcOEt	50/50	85 -- 95
Hex-AcOEt	40/60	96 -- 106
Hex-AcOEt	30/70	107 -- 116
Hex-AcOEt	20/80	117 -- 120
Hex-AcOEt	10/90	121 -- 135
AcOEt	100	136 -- 137
AcOEt-MeOH	90/10	138 -- 139
AcOEt-MeOH	70/30	140 -- 141
AcOEt-MeOH	50/50	142 -- 145
MeOH	100	146

Cuadro 6. Resumen de la CC del extracto de acetato de etilo (Lote 3) de las semillas de *C. pubescens*.

Eluyente	Proporción %	No. Fracciones
Hexano	100	1 -- 7
Hex-AcOEt	90/10	8 -- 15
Hex-AcOEt	80/20	16 -- 35
Hex-AcOEt	70/30	36 -- 58
Hex-AcOEt	60/40	59 -- 73
Hex-AcOEt	50/50	74 -- 85
Hex-AcOEt	40/60	86 -- 93
Hex-AcOEt	30/70	94 -- 117
Hex-AcOEt	20/80	118 -- 121
Hex-AcOEt	10/90	122 -- 129
AcOEt	100	130 -- 133
AcOEt-McOH	90/10	134 -- 143
AcOEt-McOH	80/20	144 -- 153
AcOEt-McOH	50/50	154 -- 157
AcOEt-McOH	30/70	158 -- 159
MeOH	100	160

Cuadro 7. Resumen de la CC del extracto metanólico (Lote 3) de las semillas de *C. pubescens*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. 5. Identificación de compuestos.

IX. 5 a. Determinación de compuestos por CG-MS.

Las fracciones líquidas (fracción 55 y 58 del extracto hexánico del lote 2) se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), los compuestos se determinaron a través de la base de datos del espectrómetro de masas. Los resultados se encuentran en el cuadro No. 13.

IX. 5 b. Purificación de compuestos. Determinación de compuestos por sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Las fracciones sólidas obtenidas de estas columnas cromatográficas se purificaron por CCF ó cristalización de acuerdo a la complejidad de cada fracción. Los compuestos obtenidos de cada una de las columnas se encuentran en los cuadros 8 a 12. A los compuestos puros se les determinaron sus características físicas y espectroscópicas. Las constantes físicas se encuentran en los cuadros 8 a 12 y los datos espectroscópicos y espectrométricos para cada compuesto, se encuentran en el apéndice. La identificación de cada compuesto se realizó a través de estos datos comparando con lo informado en la literatura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 8. Compuestos aislados del extracto hexánico (Lote 2) de *Casimiroa pubescens*.

COMPUESTO	DISOLVENTE DE ELUCION	ASPECTO	RENDIMIENTO (mg.%)	PUNTO DE FUSION(°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)
Isopimpinclina (1)	Hex 100%	Sólido blanco	11.3, 0.03	135	246
Pubesamida A (2)	Hex:AcOEt 7:3	Polvo amarillo	20.0, 0.06	88-91	391
Skimmianina (3)	AcOEt:MeOH 7:3	Polvo amarillo	82.6, 0.23	175-177	259

Cuadro 9. Compuestos aislados del extracto acetónico (Lote 2) de *Casimiroa pubescens*.

COMPUESTO	DISOLVENTE DE ELUCION	ASPECTO	RENDIMIENTO (mg.%)	PUNTO DE FUSION(°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)
Casimiroina (4)	Hex:AcOEt 1:1	Sólido blanco	8.6, 0.03	138-142	233
Zapotina (5)	Hex:AcOEt 7:3	Sólido blanco	24.1, 0.09	78-79	342
Zapoterina (6)	AcOEt 100%	Cristales blancos	16.7, 0.06	265-267	470

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 10. Compuestos aislados del extracto hexánico (Lote 3) de *Casimiroa pubescens*.

COMPUESTO	DISOLVENTE DE ELUCION	ASPECTO	RENDIMIENTO (mg.%)	PUNTO DE FUSION(°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)
β-sitosterol (7)	Hex:AcOEt 9:1	Sólido blanco	21.9, 0.12	132-135	414
8-geranioloxipsoraleno (8)	Hex:AcOEt 8:2	Polvo amarillo	10.6, 0.11	53-54	338
Isopimpinellina (1)	Hex:AcOEt 6:4	Sólido blanco	8.9, 0.09	135-136	246

Cuadro 11. Compuestos aislados del extracto de acetato de etilo (Lote 3) de *Casimiroa pubescens*.

COMPUESTO	DISOLVENTE DE ELUCION	ASPECTO	RENDIMIENTO (mg.%)	PUNTO DE FUSION(°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)
Pubesamida A (2)	Hex:AcOEt 6:4	Polvo amarillo	297.4, 1.03	88-91	391
5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona (9)	Hex:AcOEt.1:1	Sólido blanco	82.3, 0.29	128-131	372
Tetrahidropubesamida A (10)	Hydrogenación	Cristales blancos	20.5 de 70= 29.29	78-80	395
Pubesamida C (11)	Hex:AcOEt 3:7	Polvo amarillo	95.4, 0.15	83-84	393

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 12. Compuestos aislados del extracto metanólico (Lote 3) de *Casimiroa pubescens*.

COMPUESTO	DISOLVENTE DE ELUCION	ASPECTO	RENDIMIENTO (mg.%)	PUNTO DE FUSION(°C)	PESO MOLECULAR (g/mol)
Pubesamida B (12) en mezcla con (2)	Hex:AcOEt 7:3	Polvo amarillo	89.7, 0.18	88-89	391
Flavona no determinada impura (13)	Hex:AcOEt 6:4	Polvo amarillo	22.9, 0.05	96-98	235
Pubesamida A (2)	Hex:AcOEt 1:1	Sólido amarillo	12.0, 0.090	88-91	391
Tetra acetil daucosterol (14)	AcOEt:MeOH 8:2	Sólido blanco	13.0, 0.098	283-286	576.85

IX. 5. c. Identificación a partir de la formación de derivados.

Acetilación. Para formar el derivado acetilado del producto (2) se empleó 1ml de anhídrido acético y 1ml de piridina para 50 mg de producto. La mezcla de reacción se dejó por 12 horas a 40°C. La reacción se extrajo con cloruro de metileno (3 veces), posteriormente la fase orgánica se lavó con HCl al 10% (3 veces) para eliminar los residuos de piridina, finalmente se neutralizó con una solución de bicarbonato de sodio al 10%.

Hidrogenación.- 70 mg de cada compuesto (10) disueltos en CH₂Cl₂ (20 ml), se trataron con hidrógeno durante 48 horas, utilizando PtO₂ como catalizador. La mezcla de reacción se separó por cromatografía en capa preparativa (2 veces con hexano:AcOEt 6:4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. 6. Evaluación de la actividad biológica de los compuestos purificados.

De acuerdo a la naturaleza química y a la cantidad de los compuestos aislados, así como a lo informado en la literatura acerca de las actividades biológicas que presentan los distintos tipos de compuestos se efectuaron pruebas de actividad antiinflamatoria para la flavona 9; actividad citotóxica en líneas celulares a los compuestos 1, 2, 3, 9, 15, 16 y 17 y actividad antioxidante a los compuestos 2, 3, 9, 16 y 17.

IX. 6.a Evaluación de la actividad antiinflamatoria.

La evaluación de la actividad antiinflamatoria del compuesto 9 se realizó utilizando el método de inducción de edema por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), siguiendo la metodología propuesta en 1994 por Della ⁸⁰.

La disolución de TPA, se preparó disolviendo 2.5 µg de 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol en 10 µl de etanol.

El compuesto a evaluar se aplicó 10 minutos después de la inducción de la inflamación por TPA.

Las dosis evaluadas fueron las siguientes: 0.05, 0.10, 0.50, 1.0 mg/oreja.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se empleó indometacina como fármaco de referencia. La diferencia en peso entre ambas muestras se consideró como medida de edema. Se calculó el porcentaje de inhibición del edema, el cual está definido por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = (C_r - C_t) / (C_r) \times 100$$

en donde C_r y C_t corresponden respectivamente al peso de la muestra de oreja tratada con TPA y la tratada con TPA más el compuesto a evaluar⁸¹.

Los datos se analizaron por un análisis de varianza de la prueba de Dunnet. Se calculó para cada compuesto el valor de la dosis efectiva 50 (ED_{50}), mediante un análisis de regresión lineal construido al menos por tres puntos significativos, siendo cada punto el promedio del porcentaje de inhibición correspondiente a cada dosis⁸⁰ (figura 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

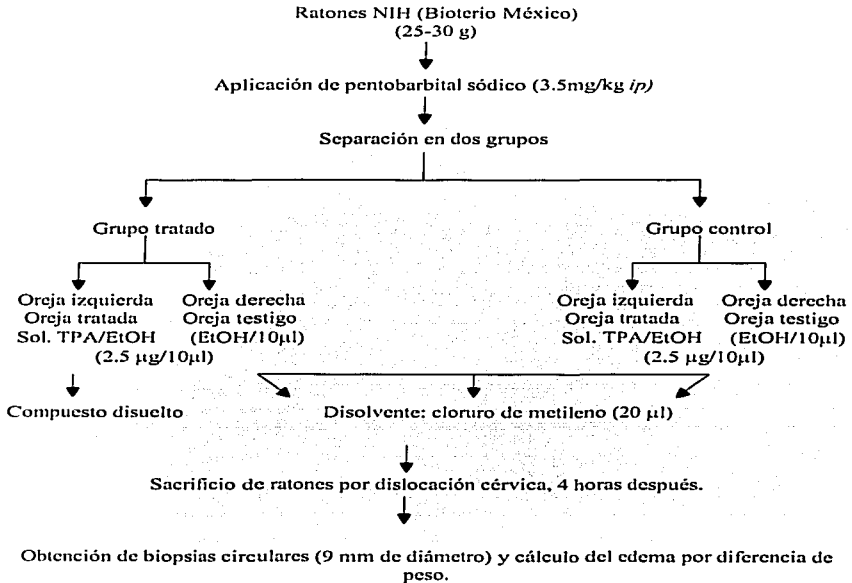


Fig. 7. Metodología del ensayo del edema inducido por TPA en oreja de ratón.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. 6 b. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos aislados.

Para la determinación de la actividad citotóxica de los compuestos 1, 2, 3, 9, 15, 16, y 17, se emplearon cinco diferentes líneas celulares cancerígenas: colon (HCT-15), mama (MCF-7), leucemia (K-562 CML), sistema nervioso central (U-251 Glio) y próstata (PC-3); las cuales fueron proporcionadas por el National Cancer Institute (EUA). La citotoxicidad de las células tumorales y de los compuestos a prueba, se determinaron usando el colorante de proteínas sulforrodamina B en ensayos de microcultivos, para medir viabilidad y el crecimiento celular⁸³ (figura 8).

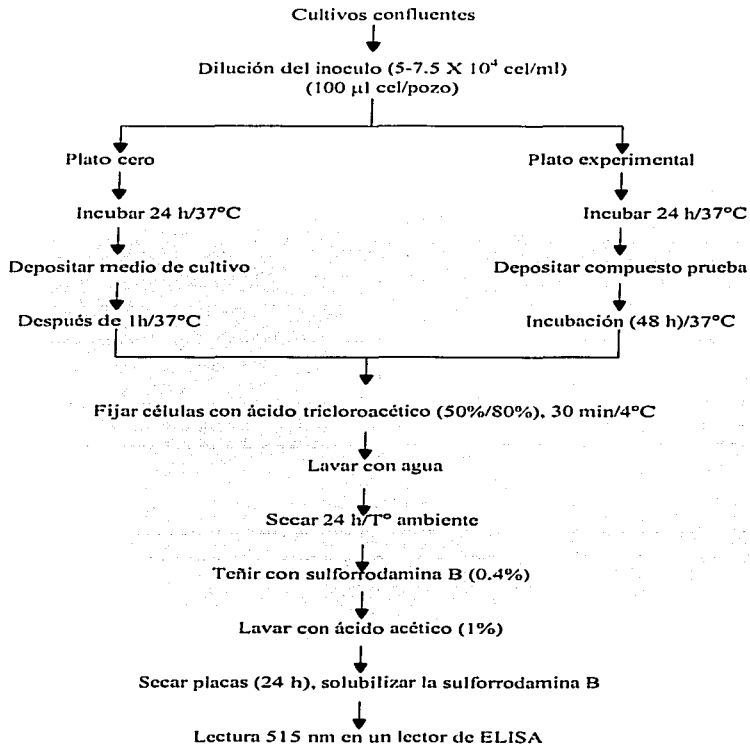


Fig. 8. Metodología para la evaluación de la citotoxicidad en el ensayo de sulforrodamina B.

IX. 6 c. Evaluación de la actividad antioxidante.

La evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos **2, 3, 9, 16** y **17**, se realizó a través del método del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo la metodología descrita por Blois⁸⁴ con algunas modificaciones, midiendo de manera indirecta la reducción del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), mediante una técnica colorimétrica (figura 9).

Finalmente, se lee la absorbancia a 515 nm en un lector de ELISA modelo EL 340, BIOTEK INSTRUMENTS.

El porcentaje de reducción del DPPH se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) 100$$

en donde:

C= absorbancia de la solución de DPPH 100 μM .

E= absorbancia de la mezcla DPPH 100 μM / compuesto problema.

La IC_{50} del α -tocoferol es de 17.07 μM usado como estándar.

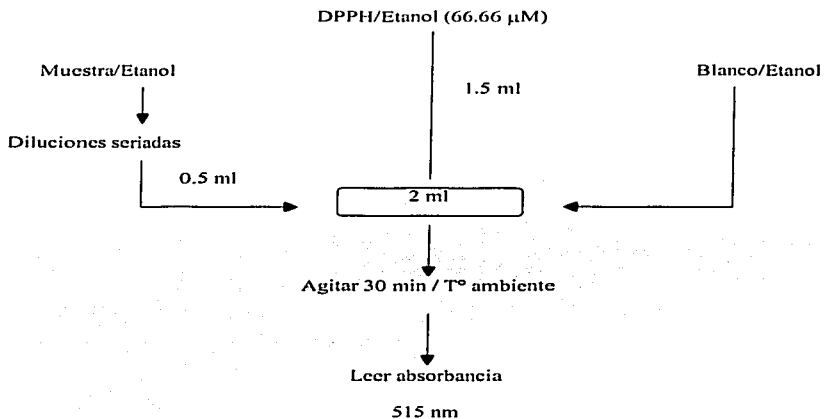


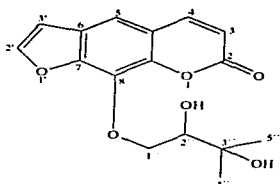
Fig. 9. Metodología para la evaluación de la actividad antioxidante por medio de la reducción del radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

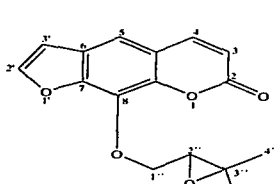
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. 1. Separación e identificación de compuestos.

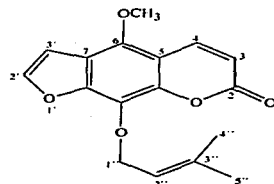
A través de un análisis por CLAR se detectaron en extractos hexánicos y metanólicos de semillas de *Casimiroa pubescens* las cumarinas: felopterina (15), heraclenina (16), heraclenol (17), isopimpinlina (1), así como el alcaloide skimmianina (3). La identificación de estos compuestos se realizó mediante la comparación de sus tiempos de retención con compuestos de referencia.



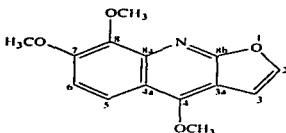
Heraclenol



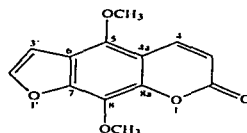
Heraclenina



Felopterina



Skimmianina



Isopimpinlina

Fig. Estructura de los compuestos determinados por CLAR.

Así mismo se calcularon los mg de compuesto por gramo de semilla. Los resultados del siguiente cuadro muestran que la heraclenina y la felopterina son los compuestos más abundantes (1.82 y 0.86 mg/g respectivamente).

SEMILLAS <i>C. pubescens</i>					
COMPUESTOS	1	3	15	16	17
(mg/g)	0.11	0.06	0.86	1.82	0.06

En especies del género *Casimiroa*, se ha informado de la presencia de furanocumarinas⁸⁷ por lo que estos hallazgos están descritos de acuerdo con lo descrito para el género.

Por otro lado de los diferentes extractos analizados fitoquímicamente se aislaron fracciones líquidas y compuestos sólidos. Las fracciones líquidas se analizaron a través de cromatografía de gases acoplada a masas. Un total de 13 compuestos se determinaron en estas fracciones, los que se presentan en el cuadro 17.

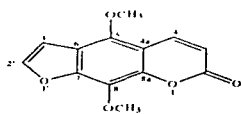
Cuadro 13. Constituyentes de las fracciones 55 y 58 del extracto hexánico de *C. pubescens* del segundo lote.

No.	Compuesto	%Area
1	Pentanal	3.28
2	Hexanal	47.34
3	5-metil-hexanal	1.31
4	2-heptanal	2.99
5	2-pentil-furano	6.61
6	1-etil-1-metil-ciclohexano	1.53
7	p-menta-1(7)-3 dieno	0.90
8	pantolactona	1.39
9	2-octenal	1.36
10	4,5- dimetil-2-hepten-3-ol	3.05
11	p-mentona	4.10
12	2-(1metiltil)-ciclohexanona	1.70
13	2,4-decadienal	24.45

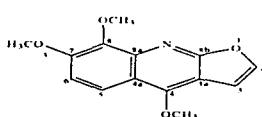
Estos compuestos, en general, son hidrocarburos de bajo peso molecular, con una función carbonilo ó alcohol en su molécula. Este tipo de compuestos no se habían informado para el género *Casimiroa*.

También, de los diferentes extractos realizados en el estudio fitoquímico de *Casimiroa pubescens* se aislaron, caracterizaron e identificaron los siguientes compuestos ya informados en la literatura^{38, 39, 40, 87, 88, 89, 90, 91}: isopimpinélica (1), skimmianina (3), casimiroína (4), zapotina (5), zapoterina (6), β-sitosterol (7), 8-geraniloxipsoraleno (8) y 5,6,2',3',4'-pentametoxiflavona. Así mismo se separó una sustancia que para su purificación se preparó el derivado acetilado y este producto resultó ser el derivado acetilado de daucoesterol (14) (Cuadro 14).

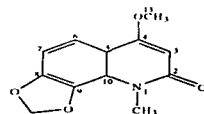
La identificación a través de sus constantes físicas y espectroscópicas de cada uno de ellos se realizó comparando los datos de cada compuesto con datos informados en la literatura⁸⁶⁻⁹¹. Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de cada uno de ellos se encuentran en el Apéndice, indicando además los espectros que se utilizaron para su identificación.



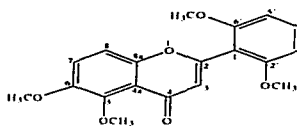
Isopimpinlina (1)



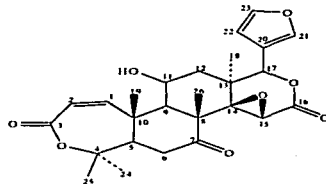
Skimianina (3)



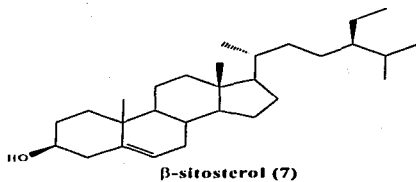
Casimirofina (4)



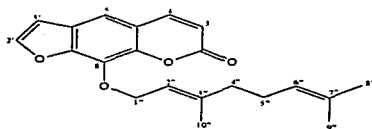
Zapotina (5)



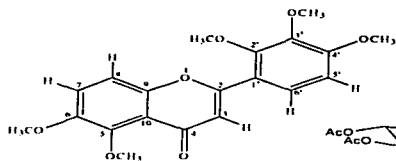
Zapoterina (6)



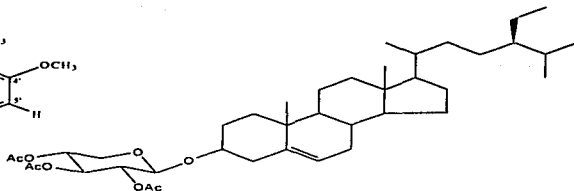
β -sitosterol (7)



8-geranyl oxipsoralen (8)



5, 6, 2', 3', 4'-pentamethoxyflavona (9)



Tri-acetil daucosterol (14).

Cuadro 14. Estructuras de los compuestos aislados ya informados en la literatura.

De forma similar del extracto de acetato de etilo se aislaron por vez primera los siguientes compuestos: pubesamida A (2), pubesamida B (12) en mezcla con pubesamida A y pubesamida C (11).

A partir del compuesto 12 se obtuvo el compuesto hidrogenado tetrahidropubesamida A (10).

Las estructuras de estos compuestos cuyas estructuras se elucidaron en base a sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas. La asignación estructural para cada uno de ellos se describe a continuación:

La presencia de un núcleo de N-Benzoitiramina en las pubesamidas A, B y C se dedujo fácilmente a través de sus absorciones en IR debidas a una amida secundaria (N-H y C=O), también por sus espectros de RMN-¹H y ¹³C. (Ver cuadros 15 y 16), y por los datos de sus espectros de masas de tal modo que las diferencias estructurales entre estos compuestos recaen en el residuo alquílico de la cadena lateral unida al átomo de oxígeno del anillo bencénico 1-4 di sustituido del núcleo de la N-Benzoitiramina.

La espectrometría de masas de alta resolución de la pubesamida A presentó su [M]⁺ a 391.2220 correspondientes para la fórmula C₂₅H₂₉O₃N. Los fragmentos m/z 240, 135, 120 y 105 se atribuyeron al residuo de la N-Benzoitiramina. La presencia de una unidad oximonoterpénica (C₁₀H₁₅O) en la cadena lateral se indicó por las diferencias de masas entre el compuesto y la unidad de N-Benzoitiramina (391-240=151). Esta unidad contiene una

unidad ó fragmento de isobutilidieno al final del residuo del monoterpeno (C-17/C-20), conjugado a un grupo carbonilo en C-16 como se deduce por sus señales en sus espectros de RMN-¹H y ¹³C [δ ¹H: 1.88 s (3H) H-19; 2.17, s, (3H), H-20 y 6.13 da (1H) H-17; δ ¹³C: 27.8, C-19; 20.6, C-20; 127.4 C-17; 153.0 C-18 y 191.4, C-16] y por el fragmento m/z 83 en EM. También se dedujo la presencia de un grupo metilvinílico en C-21 y un residuo metilénico en C-13 ambos unidos a un doble enlace trisustituido entre C-14/C-15, conjugado con el grupo carbonilo en C-16, lo cual se dedujo por: [δ ¹H: 2.22 s (3H), H-21; 6.08 s (1H), H-15; 2.59 t J = 7.1 (2H), H-13; δ ¹³C: 19.3, C-21; 126.2, C-15; 154.9, C-14 y 40.6, C-13]. Finalmente se observó la presencia de una unidad oximetilénica en el C-12 vecina al metileno vinílico en C-13 [δ ¹H 4.09 t J=7.1 (2H), δ ¹³C 65.9].

Todas las asignaciones estuvieron apoyadas en los experimentos de HETCOR (cuadro 17) y COSY. La estereoquímica **Z** del doble enlace entre los C-14/C-15 en el compuesto **2** se dedujo por experimentos de COLOC y NOESY; un análisis detallado de los datos espectrales de RMN, las absorciones en IR y la fragmentación por EM de los compuestos **2** y **12** demostraron claramente una relación isomérica **E** y **Z**, entre el doble enlace de los átomos C-14/C-15 de este modo **12** corresponde al isómero **E**. (Cuadros 15 y 16).

Un experimento adicional para apoyar la propuesta estructural de **2** y **12** fue la transformación espontánea durante el momento de adquisición de los datos de RMN (aproximadamente 10 horas) a partir de **2** para formar una mezcla de **2** y **12** con una proporción 1:1, estimado a partir de los valores de integración de la señal del grupo metilo en el C-21 en el espectro de RMN-¹H. De este modo el isómero menos estable **2** (**Z**) (Calor de

formación -55.14265 kcal/mol, determinado por cálculos MOPAC) se transformó en el isómero más estable **12** (E) (Calor de formación -57.28074 kcal/mol, determinado por cálculos MOPAC), probablemente esta transformación se debe a la acidez del CDCl_3 . De acuerdo con esto **12** podría ser un artefacto producido durante los procesos cromatográficos.

Cuando la mezcla **2** y **12** se trató con hidrógeno en presencia de PtO_2 se obtuvo la tetrahidropubesamida A (**10**), también **10** se obtuvo a partir de la hidrogenación del compuesto **2** ($[\text{M}]^+$ a 395.2537 para una fórmula $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{N}$). La única diferencia entre **2** y **10** reside en la cadena lateral monoterpénica (Cuadros 15 y 16). De este modo el espectro de RMN de **10** reveló las señales para 3 grupos metilos, 4 metilenos y 2 átomos de carbono metino en la región de sp^3 y la señal del grupo carbonilo en el C-16 a un δ 210.4 ppm. La correlación entre las señales de RMN- ^1H y ^{13}C de **10** se muestran en el cuadro 17.

El espectro de masas de **11** mostró su $[\text{M}^+]$ a 393.2333 para una fórmula $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$. La presencia de una unidad monoterpénica insaturada ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}$) en la cadena lateral se indicó por las diferencias de masas entre **11** y el residuo de la N-Benzoiltiramina. Como en **2** y **12** la presencia de un fragmento isobutilidénico al final del residuo monoterpénico fue evidente en **11**. (Cuadros 15 y 16). La presencia de un doble enlace adicional en C-15 y C-16 conjugada al fragmento isobutilidénico se dedujo por las señales de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C [δ ^1H : 5.63, d, J=15, H-15, 6.52, dd, J=11, 15, H-16; 5.82, d, J=11, H-17; δ ^{13}C : 136.6, C-15; 124.5, C-16; 124.3, C-17]. La presencia de un grupo hidroxilo y un grupo metilo en el carbono 14 se dedujeron por sus señales en los espectros de ^1H y ^{13}C [δ ^1H : 1.37 s, (3H), H-21; δ ^{13}C : 29.0 C-21; 72.7, C-14] y las señales a 40.9 y 65.4 se asignaron a los grupos metilenos en el C-13 y

C-12 respectivamente. Todas las asignaciones se apoyaron en experimentos COSY, HETCOR y COLOC (cuadros 15 y 16). Durante el tiempo de adquisición de los datos de RMN (aproximadamente 10 horas) **11** no sufrió una isomerización como **2**; sino que se produjo una reacción de hidrólisis generando la N-Benzoiltiramina. Como puede verse los derivados de la N-Benzoiltiramina, **2**, **11** y **12** son sensibles a condiciones ácidas suaves.

Cuadro 15. Datos espectrales de RMN-¹H de 2, 10, 11 y 12

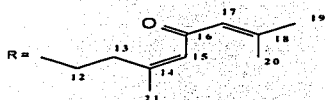
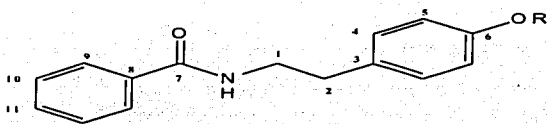
H	2	10	11	12
1	3.69 (t, J=6.9)	3.69 (t, J=6.9)	3.67 (t, J=6.9)	3.69 (t, J=6.9)
2	2.87 (t, J=6.9)	2.87 (t, J=6.9)	2.86 (t, J=6.9)	2.86 (t, J=6.9)
4	7.14 (d, J=8.7)	7.15 (d, J=8.7)	7.14 (d, J=8.7)	7.13 (d, J=8.7)
5	6.85 (d, J=8.7)	6.85 (d, J=8.7)	6.85 (d, J=8.7)	6.86 (d, J=8.7)
9	7.69 (da)	7.69 (da)	7.68 (da)	7.68 (da)
10	7.45 m	7.38 m	7.41 m	7.45 m
11	7.38 m	7.45 m	7.47 m	7.41 m
12	4.09 (t, J=7.1)	3.97 (t, J=6.9)	4.12 m	4.16 (t, J=6.6)
13a	2.59 (t, J=7.1)	1.78 m	2.14 (dd, J=15, 6)	3.06 (t, J=6.6)
13b	*	1.67 m	1.97 (dd, J=15, 8)	*
14	*	2-26 m	*	*
15	6.08 (ds)	2.41 m	5.63 (d, J=15)	6.08 m
16	*	*	6.52 (dd, J=11, 15)	*
17	6.13 (ds)	2.26 m	5.82 (d, J=11)	6.13 m
18		2.15 (hcp, J=6)		
19	1.88 s	0.90 (d, J=6)	1.73 s	1.89 s
20	2.17 s	0.91 (d, J=6)	1.76 s	2.15 s
21	2.22 s	0.97 (d, J=6)	1.37 s	2.01 s

Cuadro 16. Datos espectrales de RMN-¹³C de 2, 10, 11 y 12.

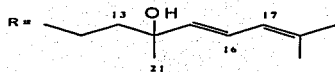
C	2	10	11	12
1	41.3	41.2	41.3	41.3
2	34.8	34.8	34.8	34.8
3	131.2	130.8	131.3	130.7
4	129.8	129.7	129.8	129.7
5	114.9	114.7	114.9	114.8
6	157.5	157.7	157.2	157.7
7	167.4	167.4	167.4	167.4
8	134.7	134.7	134.6	134.7
9	126.8	126.8	126.8	126.1
10	128.5	128.5	128.5	128.5
11	131.4	131.6	131.4	131.4
12	65.9	66.0	65.4	67.2
13	40.6	36.0	40.9	33.7
14	154.9	26.4	72.7	155.0
15	126.2	50.6	136.6	127.4
16	191.4	210.4	124.5	190.8
17	127.4	52.3	124.3	126.0
18	153.0	24.5	135.5	153.0
19	27.8	22.6	18.3	27.8
20	20.6	22.6	26.0	20.6
21	19.3	19.9	29.0	26.8

Cuadro 17. Experimento de HETCOR de 2, 10 y 11

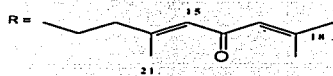
2	10	11
19.3/2.22	19.9/0.97	18.3/1.73
20.6/2.17	22.6/0.90 y 0.91	26.0/1.76
27.8/1.88	24.5/2.15	29.0/1.37
34.8/2.87	26.4/2.26	34.8/2.86
40.6/2.59	34.8/2.87	40.9/2.14 y 1.97
41.3/3.69	36.0/1.78 y 1.67	41.3/3.67
65.9/4.09	41.2 y 3.69	65.4/4.12
114.9/6.85	50.6/2.41	114.9/6.85
126.2/6.08	52.3/2.26	124.3/5.82
126.8/7.68	66.0/3.97	124.5/6.52
127.4/5.63	114.7/6.85	126.8/7.68
128.5/7.45	126.8/7.69	128.5/7.41
129.8/7.14	128.5/7.45	129.8/7.14
131.4/7.38	129.7/7.15	131.4/7.47
	131.6/7.38	136.6/5.63



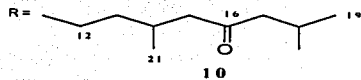
Pubesamida A



Pubesamida C



Pubesamida B



Tetrahidropubesamida A

Cuadro 18. Estructuras novedosas aisladas de semillas de *C. pubescens*.

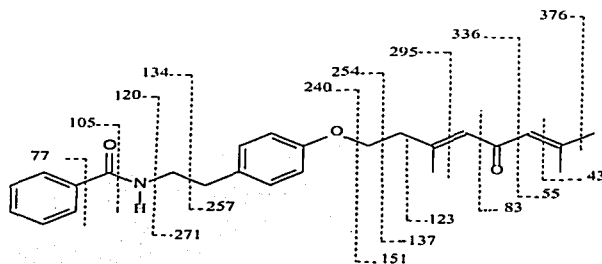


Fig. 10. Patrón de fragmentación del compuesto 12

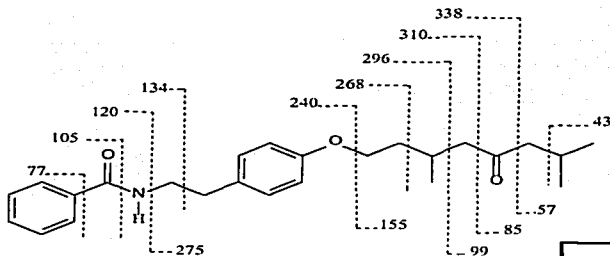


Fig. 11. Patrón de fragmentación del compuesto 10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

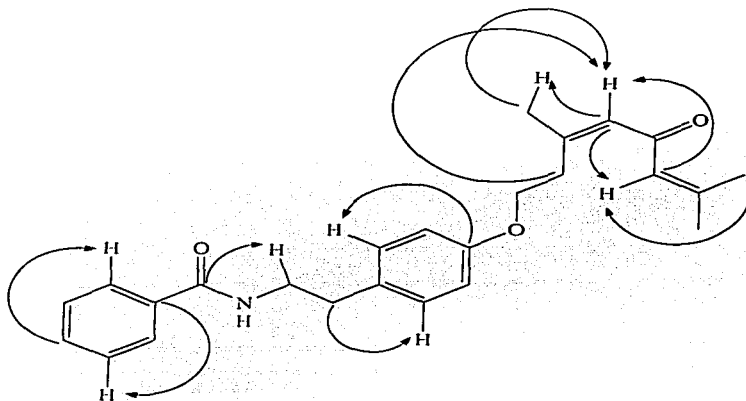


Fig. 12 Correlaciones principales en COLOC para 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. 2. Aspectos quimiotaconómicos.

En el presente trabajo se determinó mediante CLAR la presencia y la concentración de las furanocumarinas: felofterina (15) e isopimpinlina (1), heraclenol (17), heraclenina (16). Así mismo se aisló por cromatografía en columna: isopimpinlina (1) y 8-geraniioxipsoraleno (8). Estos hallazgos apoyan la propuesta biogénica que es general a la familia Rutaceae que supone que este tipo de compuestos derivan de la umbeliferona, ya que las furanocumarinas se postulan como formadas a partir de este intermediario.

Por otro lado la presencia de zapotina (5) y la 5,6,2',3',4'-pentametoxiflavona en *C. pubescens* junto con los informes en la literatura sobre las flavonas presentes en *C. edulis*, *C. pringlei* y en *C. greggii* tales como zapotina, zapotitina, 5,6-dimetoxiflavona^{32, 33, 34} cerrosillina y cerrosillina B³², entre otras, indican una presencia recurrente, en el género, de flavonas con núcleos 5,6-di sustituidos.

Así mismo la presencia de las pubesamidas A (2), B (12) y C (11), compuestos con un núcleo de N-Benzoiltiramida y una unidad terpénica parece un hecho singular. Sin embargo en un trabajo previo se aisló de un extracto hexánico de *C. edulis*⁴⁰, a la N-Benzoiltiramida. El extracto hexánico referido fue lavado con una solución acuosa de ácido clorhídrico; y de acuerdo con los datos presentados en este trabajo las pubesamidas son extremadamente sensibles al medio ácido de tal forma que pueden sufrir hidrólisis o transposiciones. Por lo que no es factible suponer que *C. edulis* también sintetizara este tipo de compuestos, los que, debido al tratamiento con ácido se hidrolizaron para producir la N-benzoiltiramida. Es así

que para proponer a este tipo de compuestos como recurrentes en la química del género *Casimiroa* es necesario realizar una búsqueda cuidadosa en las demás especies del género.

Finalmente, el limonoide zapoterina (6) y los alcaloides skimmianina (3) y casimirofina (4) se aislaron de *C. pubescens*. También se ha informado la presencia de estos compuestos en *C. edulis*. Este tipo de alcaloides y limonoides se han mencionado como característicos de la familia Rutaceae. Como puede verse son pocas las especies estudiadas del género *Casimiroa* (*C. edulis*, *C. greggii* y *C. pubescens*). Sin embargo se pueden observar semejanzas en cuanto a sus metabolitos secundarios, los que caracterizan al género.

X. 3 Actividad biológica.

X. 3 a. Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA.

En años recientes se ha informado sobre la actividad antiinflamatoria de flavonoides. Inclusive se sabe acerca de la acción específica de algunos flavonoides en los diversos procesos que involucran el complejo mecanismo de la inflamación.

De los compuestos aislados de *C. pubescens* se obtuvo la flavona 5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona (9) y se decidió evaluar su actividad antiinflamatoria.

Los resultados obtenidos mostraron que el compuesto 9 presentó acción antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA (Cuadro 19). Al aplicar dicho modelo, el TPA realiza su efecto inflamatorio por medio de la activación de la enzima proteinquinasa (PKC), la cual a su vez activa a la enzima PLA₂, de tal manera que los compuestos que presentan actividad antiinflamatoria en el ensayo del TPA posiblemente inhiben PKC y/o PLA₂⁹².

Resultados de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA.

Tratamiento	Edema (promedio+/-ES)	Inhibición del edema
Control	13.37+/-2.093	
Compuesto 9	2.77+/-0.603*	79.30%

Cuadro 19. Resultados del modelo de edema inducido con TPA.

Así mismo se evaluó la acción dosis-respuesta de esta sustancia en un rango de dosis de 0.01 a 1 mg/ oreja. Los resultados muestran una relación dosis-dependiente del compuesto frente al modelo del TPA. (Cuadro 20 y 21).

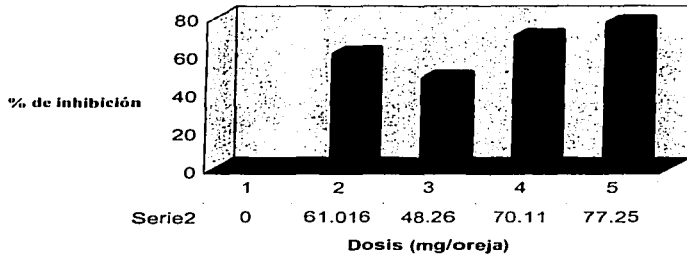
Tratamiento	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) (Promedio+/- ES)	% de inhibición
Control		11.21+/-1.01	-
Compuesto 9	0.01	11.75+/-0.99	Sin actividad
	0.031	4.37+/-1.33**	61.016**
	0.1	5.80+/-1.79*	48.26*
	0.31	3.35+/-1.62**	70.11**
	1	2.55+/-0.95**	77.25**

* p 0.05 t de Dunnet

** p 0.01 t de Dunnet

Cuadro 20. Resultados de Curva Dosis-Respuesta de la actividad antiinflamatoria del compuesto 9.

Actividad antiinflamatoria del compuesto 9 en el modelo de edema inducido con TPA



Cuadro. 21. Curva Dosis-Respuesta de la actividad antiinflamatoria del compuesto 9 en el modelo de edema inducido con TPA.

Estos resultados apoyan lo informado en la literatura sobre el potencial antiinflamatorio de los flavonoides.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. 3. b. Actividad antioxidante.

Basados en las variadas estructuras que presentan los antioxidantes naturales en particular algunos flavonoides y las cumarinas⁸², se decidió probar la posible acción antioxidante de los compuestos **2**, **3**, **9**, **16** y **17**, sin embargo, ninguno de estos presentó actividad antioxidante (Cuadro 22). Estos resultados son contradictorios en cuanto a lo informado en la literatura para las cumarinas ya que se ha mencionado que las cumarinas con estructura semejante a las estudiadas en este trabajo presentan actividad antioxidante⁹³, debido a la lactona presente en las furanocumarinas.

DPPH	Concentración	A₅₁₅	% Reducción
	100µM	0.608	
17	10 ppm	0.622	-2.192
	100 ppm	0.623	-2.356
	1000 ppm	0.597	1.863
16	10 ppm	0.598	1.699
	100 ppm	0.607	0.274
	1000 ppm	0.567	6.795
3	10 ppm	0.611	-0.493
	100 ppm	0.613	-0.712
	1000 ppm	0.784	-28.932
2	10 ppm	0.614	-0.436
	100 ppm	0.601	1.798
	1000 ppm	0.553	9.537
9	10 ppm	0.602	1.526
	100 ppm	0.620	-1.417
	1000 ppm	0.583	4.741

Cuadro 22. Resultados de la prueba de DPPH.

Por otro lado, es interesante hacer notar que el compuesto **9** (5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona) mostró una acción antiinflamatoria elevada en el modelo del TPA, pero no presenta acción antioxidante. Esto sugiere que la actividad antiinflamatoria de este compuesto posiblemente no está mediada por la enzima ciclooxigenasa y lipooxigenasa⁹².

X. 3. c. Actividad citotóxica.

Se realizaron pruebas de citotoxicidad a los compuestos **1, 2, 3, 9, 15, 16 y 17**, en distintas líneas celulares. Los resultados (Cuadro 23) muestran que la skimianina (**3**) y la **5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona (9)** no son citotóxicos.

Contrariamente las cumarinas **1, 15, 16 y 17** y el derivado de la N-benzoiltiramina **2** mostraron, en general, una elevada actividad citotóxica, con valores mayores al 65% de actividad. Se observó también la selectividad de los compuestos a las distintas líneas celulares.

La pubesamida A (**2**) fue selectiva para las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, de sistema nervioso central y de leucemia, con valores de citotoxicidad (89.32, 78.24 y 76.97% respectivamente); la isopimpinélica (**1**) fue selectiva para las líneas celulares de cáncer de mama y de sistema nervioso central con valores de 94.32 y 90.04 % respectivamente); el heraclenol (**17**) fue selectivo para las líneas celulares de cáncer de colon y de leucemia con valores de 76.63 y 73.77 % respectivamente; la felopterinina (**15**) fue selectiva a tres líneas celulares con valores muy altos para colon, leucemia y próstata, con valores de 116.21, 88.40 y 74.89 % respectivamente; por último, la heraclenina presentó altos valores de citotoxicidad en todas las líneas celulares evaluadas. Los valores en orden de mayor a menor actividad son 93.16, 92.44, 88.53, 78.08 y 76.31 %, que corresponden respectivamente a leucemia, mama, sistema nervioso central, próstata y colon.

Los resultados de citotoxicidad de cumarinas está de acuerdo con lo informado en la literatura⁹³ donde se menciona que estos compuestos y sus derivados son sustancias con doble actividad biológica; aumentando reactividad de la célula inmune y ejerciendo los efectos antitumorales. En células sensibles tumorales, estos compuestos causan cambios significantes en la regulación de respuestas inmunes, en el crecimiento de la célula y en la diferenciación. También se han informado los resultados positivos de las cumarinas para la disminución de carcinoma renal y de próstata. Estudios recientes sobre el modo de acción de las cumarinas y sus compuestos relacionados indican que los efectos antiproliferativos celulares observados de estas sustancias podrían deberse a diferentes mecanismos de acción, incluso a la inducción de apoptosis, al arresto del ciclo celular, a la regulación de la expresión del oncogen, así como por la posible inducción de diferenciación⁸².

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Compuesto	3	1	17	16	15	P-D	2	9
Linea celular								
U251	1.5320	0.7600	1.0800	0.8930	0.4950	0.4920	0.9300	1.6020
	1.6140	0.9570	1.1090	0.8140	0.5020	0.5190	0.9400	1.6290
Prom	1.5730	0.8585	1.0945	0.8535	0.4985	0.5055	0.9350	1.6160
t-b	1.5120	0.7635	1.0325	0.7775	0.4405	0.4415	0.8730	1.5570
t-tz	0.8410	0.0925	0.3615	0.1065	0.1759	0.1795	0.2020	0.8860
%gl	9.4240	90.0380	61.0660	88.5300	74.8950	74.7540	78.2440	4.6310
PC-3	1.4500	1.2980	0.8390	0.7940	0.7560	0.7230	0.9420	1.4730
	1.4040	1.2780	0.7690	0.7490	0.7570	0.8170	0.9050	1.4670
Prom	1.4270	1.2880	0.8040	0.7715	0.7565	0.7700	0.9235	1.4700
t-b	1.3660	1.1930	0.7420	0.6955	0.6985	0.7060	0.8615	1.4110
t-tz	0.9070	0.7340	0.2830	0.2365	0.0935	0.1010	0.4025	0.9520
%gl	15.9400	31.9740	73.7720	78.0820	88.4000	87.4690	62.6970	11.7700
K562	2.3460	1.0430	0.9400	0.5700			1.0100	2.3740
	2.3090	1.1300	0.8520	0.5450	0.989	0.777	0.8710	2.3570
Prom	2.3280	1.0865	0.8960	0.5575	0.949	0.9425	0.9405	2.3660
t-b	2.0340	1.0005	0.7520	0.4365	0.131	0.2265	0.7455	2.3070
t-tz	1.7280	0.6945	0.4460	0.1305	-0.147	-0.051	0.4395	2.0010
%gl	9.4840	63.6100	76.6310	93.1620	116.21	105.68	76.9710	-4.8210
HCT-15	2.1220	2.1140	1.0820	0.9210			1.4950	2.2420
	2.1460	2.0690	1.1040	0.9240	1.2430	0.5690	1.5160	2.3000
	2.2350	2.1160	1.1470	0.9260	1.2090	0.6140	1.6860	2.3040
Prom	2.1680	2.0997	1.1110	0.9237	1.2260	0.5915	1.5657	2.2820
t-b	2.1160	2.0342	1.0625	0.8752	1.1490	0.5100	1.5192	2.2290
t-tz	1.6050	1.5232	0.5515	0.3642	0.7870	0.1480	1.0082	1.7180
%gl	-4.4350	0.9000	64.1180	76.3070	47.6380	90.1530	34.4070	-11.7800
MCF-7	2.0120	0.4690	1.1830	0.4430			1.0450	1.9870
	1.9800	0.4810	1.2400	0.4990	1.455	0.787	0.9270	2.0890
	2.0760	0.4340	1.1320	0.4810	1.561	0.852	0.9410	2.0950
Prom	2.0230	0.4613	1.1850	0.4743	1.508	0.8195	0.9710	2.0570
t-b	1.9710	0.3958	1.1365	0.4258	1.431	0.738	0.9245	2.0040
t-tz	1.6660	0.0905	0.8312	0.1205	0.903	0.21	0.6192	1.6990
%gl	-4.4430	94.3240	47.8870	92.4430	50.763	88.55	61.1790	-6.5020
SiHa						0.4150	0.5170	
						0.4460	0.5360	
Prom						0.4305	0.5265	
t-b						0.3490	0.4310	
t-tz						-0.0190	0.0630	
%gl						103.2200	89.3220	

Cuadro 23. Resultados de la prueba de Citotoxicidad.

XI. CONCLUSIONES

A partir de los distintos extractos de las semillas de *Casimiroa pubescens* se aislaron e identificaron 15 metabolitos secundarios de los cuales 12 ya están descritos en la literatura: isopimpinellina, skimmianina, casimirofina, zapotina, zapoterina, β -sitosterol, 8-geraniloxipsoraleno, 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona, tetra-acetildaucosterol, heraclenol, heraclenina y felopterina.

Se aislaron 3 nuevos alcaloides: la pubesamida A, B y C de las cuales se presentan sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos.

Por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se determinó la presencia de 13 hidrocarburos de bajo peso molecular. Este tipo de compuestos no se habían informado para el género *Casimiroa*.

A partir de las pubesamidas A y B se obtuvo el derivado tetrahidropubesamida A, cuyos datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos se informan por vez primera.

La presencia de las furanocumarinas en las semillas de *Casimiroa pubescens* apoyan la propuesta biogenética que es general a la familia Rutaceae que supone que este tipo de compuestos derivan de la umbeliferona.

La presencia de los flavonoides zapotina y 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona, junto con los informes en la literatura, indican una presencia recurrente, en el género *Casimiroa*, de flavonas con núcleos 5, 6 di sustituidos.

La presencia de las cumarinas, los flavonoides, los alcaloides y el limonoide en *C. pubescens*, junto con lo informado en la literatura para *C. edulis* y *C. greggii* indican semejanzas en los metabolitos secundarios de estas especies del género.

La 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona presentó actividad antiinflamatoria dosis-dependiente en el modelo de edema inducido con TPA.

Los compuestos pubesamida A, pubesamida B, 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona, heraclenol y heraclenina no presentaron actividad antioxidante en el modelo de DPPH.

La skimmianina y la 5,6,2',3',4' pentametoxiflavona no presentaron actividad citotóxica.

Todos los siguientes compuestos presentaron actividad citotóxica con diferente selectividad de las distintas líneas celulares de cáncer. La heraclenina presentó actividad citotóxica frente a las cinco líneas celulares de cáncer en las que se probó.

La pubesamida A fue selectiva para las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino, de SNC y de leucemia. La isopimpineline fue selectiva para las líneas celulares de cáncer de

mama y de SNC. El heraclenol fue selectivo para las líneas celulares de cáncer de colon y de leucemia. La felopterina fue selectiva para las líneas celulares de cáncer de colon, leucemia y próstata.

XII. BIBLIOGRAFIA

1. Agosta, W. (1997), Medicines and drugs from plants. *J. Chem. Ed.*, **74**, 857-860.
2. Shu, Y-Z. (1998), Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective, *J Nat. Pro.*, **61**, 1053-1071.
3. Robers, J.E., Specdie, M.K., Tyler, V.E., (1996, *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*, Williams & Wilkins, U.S.A., 1-14, 138-139.
4. Houghton, P.J. (1999), Roots of remedies: plants, people and pharmaceuticals. *Chemistry and Industry*, 15-19.
5. Estrada, L.E. Jardín botánico de plantas medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 441 pp.
6. Waterman, P. (1983), Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales, *Academic Press London*, E.U.A., 1-266.
7. Martínez, M. (1951). Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología*. **22** (1) 25-181.
8. Lundell, C.L., (1968), Studies of Tropical American Plants, *V. Wrightia*, **4**, (2), 79-96.
9. Chiang, F., y González-Medrano, F., (1961). Nueva Especie de *Casimiroa* (Rutaceae) de la zona árida oaxaqueño-poblana. Boletín de la Sociedad Botánica de México, **41**, 23-26.
10. Chiang, F., (1984), Nota sobre la ortografía correcta de *Casimiroa calderoniae*, Chiang et Medrano, Boletín de la Sociedad Botánica de México , **46**, 89.
11. Chiang, F., (1989). *Casimiroa greggii*, formerly in *Sargentia* (Rutaceae), *Taxon*, **38**, (1), 116-119.

12. Martínez, M. (1969). Las Plantas Medicinales de México, Edit. Botas, Sta. Ed., México 349-355.
13. Hegnauer, R. (1964), *Chemotaxonomie der Pflanzen III*. Birkhauser Verlag. 174-239pp.
14. Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, 1262pp.
15. Harborne, J.B. and Turner, B.L., (1984), *Plant Chemosystematics*. Academic Press, 562 pp. London.
16. Cronquist, A., (1988). The evaluation and classification of flowering plants, Allen Press, Inc., N.Y., 535 pp.
17. Erdtram, H., (1963) in: *Chemical Plant Taxonomy*, Swain T., Ed. Academic Press, London, 89-125.
18. Dominguez, X.A., (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa, México, D.F.
19. Grayer, J.R., Chase, M.W., Simmons, M.S.J., (1999). *Biochem. Syst. and Ecology*, 27, 369-393.
20. Seaman, C.F., (1982), *The Botanical Review*, 48, 121-692.
21. Trease, G.E., Evans, W.C. (1988). *Tratado de Farmacognosia*. Nueva Editorial Interamericana, 12^{ava}. Edición, México, 846pp.
22. Fluck, H., (1963) in: *Chemical Plant Taxonomy*. Swain T., Ed., Academic Press, London, 167-184.

23. Norbdy, H.E., Nagy, S., (1977). Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Citrus* fruit. *Phytochemistry*, **8**, 127-143.
24. Skorupa, L.A., Salatino, M.L.F., and Salatino, A., (1998), Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae). Taxonomic meaning. *Biochem. Syst. and Ecology*, **26**, 655-662.
25. Albach, R.F., Redman, G.H., (1969). Composition and inheritance of flavanones in *Citrus* fruit, *Phytochemistry*, **8**, 127-143.
26. Grieve, C. M., Scora, R. W., (1980). Flavonoid distribution in the Aurantioideae (Rutaceae). *System. Bot.*, **5**, 39-53.
27. Waterman, P.G., (1975), Alkaloids of the Rutaceae: Their distribution and systematic significance, *Biochem. Syst. Ecol.*, **3**, 149-180.
28. Dreyer, D.L., Pickering, M.V., Cohan, P. (1972). Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry*, **11**, 705-713.
29. Dreyer, D.L. (1966). Citrus bitter principles-V. Botanical Distribution and Chemotaxonomy in the Rutaceae. *Phytochemistry*, **5**, 367-378.
30. Gray, A. I., Waterman, P.G. (1978). Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry*, **17**, 845-864.
31. Kinoshita, T., Wu, J-B., Ho, F-C. (1996). The isolation of a prenylcoumarin of chemotaxonomic significance from *Murraya paniculata* var *Omphalocarpa*. *Phytochemistry*, **43**, 125-128.
32. Domínguez, X.A. (1976). Estructura de la Cerrosillina B (5,6,3',4',5'-pentametoxiflavona) aislada de las hojas del chapote amarillo (*Sargentia greggii*). *Rev. Latinoamer. de Quím.*, **7**, 45-46.

33. Domínguez, X.A. (1972). Extractives from *Sargentia greggii*. *Phytochemistry*, **2**, 2649-2651.
34. Meyer, B. N., Wall, M.E., Wani, M.C. and Taylor, M.L.(1985). Plant antitumor agents, 21. Flavones, coumarins and alkaloid from *Sargentia greggii*. *J. Nat. Prod.*, **48** (6) 952-956.
35. Castellanos Bernal, S. V. (1998). Flavonoides y furanocumarinas aisladas de *Casimiroa pringlei*. Tesis FES Zaragoza, UNAM, México 124 pp.
36. Rizvi, S. H. et al. (1985). Alkaloids and coumarins of *Casimiroa edulis*. *J. Nat. Prod.*, **48** (1) 146.
37. Lara, O. y Márquez Alonso C. (1996). *Plantas Medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica*. Universidad Nacional Autónoma de México. 137 pp.
38. Sondheimer, F. et al. (1959). Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. V. Identity of Casimiroloid and Obacunone. *J. Org. Chem.*, **24**, 870.
39. Iriarte, J. et al. (1956). The Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. Part. II. The Bark. *J. Chem. Soc.*, 4170-4173.
40. Kincl, F. et al. (1956). The Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. Part. I. The Seed. *J. Chem. Soc.*, 4163-4169.
41. Sondheimer, F. et al. (1960). Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. VI. *Tetrahedron*, **9**, 139-144.
42. Toube, T. P. et al. (1967). The structures of edulitine and edulinine. XXIV. *Tetrahedron*, **23**, 2061-2065.
43. Lozoya, X. et al. (1978). *Archivos de Investigación Médica Mexicana*, **9**, 565.

44. Major, R.T. et al. (1958). N⁴, N¹-Dimethylhistamine a Hypothensive Principle in *Casimiroa edulis*. *J. Org. Chem.*, **23** 1564-1565.
45. Power, F.B. (1911). The Constituents of the seeds of *Casimiroa edulis*. *J. Chem.Soc.*, **99** 1993-2010.
46. Sondheimer, F. et al. (1959). Constituents of *Casimiroa edulis*. Llave et Lex. V. Identity of Casimiroloid and Obacunone. *J. Chem.Soc.*, **24**, 870.
47. Romero, M.L. et al. (1983). High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. *J. Chrom.* **283** 245-251.
48. Enriquez, R. G. et al. (1984). High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. II. Determination of furanocoumarins. *J. of Chrom.* **287** 209-214.
49. Djerassi, C. et al. (1956). Alkaloid Studies. XV. Casimiroedine. *J. Org. Chem.* **21**, 1510-1511.
50. Mechoulam, R. et al. (1967). The synthesis of zapotidine. *Tetrahedron*, **23**, 239-242.
51. Murray, R. (1982), The Natural Coumarins, John Wiley & Sons LTD, New York, 1-12. 102-105, 291-294pp.
52. Dewick, P.M. (1994). The Biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Products Reports*, **11**, 173-203. Dewick, P.M. (1993). The Biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Products Reports*, **10**, 223.
53. Standley, P.C. and Steyermark, J.A. 1946-1976. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, **24**, 398-404.
54. Floss, H.G. (1972). *Rec. Adv. Phytochem.*, **4**, 143(55)

55. Markham, K.R., (1982), *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1-35, 72-83.
56. Towers, G.H.N., Wat, C.K., (1979), *Planta Medica*, 37, 97.
57. Lozoya, X., Enriquez, R., (1981), *El Zapote Blanco*, Investigación sobre una planta medicinal mexicana. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 134 pp. México.
58. Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III, (1994), Instituto Nacional Indigenista, INI, México, 1413-1414.
59. Niembro, R.A., (1990), *Arboles y arbustos útiles de México*, LIMUSA Noriega, México, 54, 192.
60. Lozoya, X., (1982), *Flora Medicinal de México*, 1era. Parte, Plantas Indígenas, IMSS, México, 130-147.
61. Recent trends in research of inflammation and treatment of inflammatory diseases. (1991), PJB Publications Ltd..
62. Rojas-M, W., (1988) *Inmunología*, 7ª.ed., Corporación de la Investigación Biológica CIB, Colombia, 56-78.
63. Katzung, B.G., Furst, D.E.,(1998), *Basic & Clinical Pharmacology*, 7th ed., Appleto & Lnge, USA, 304-578.
64. Wicher, J.T., Evans, S.W., (1992), An overview of the inflammatory response. *Immunology and medicine. Biochemistry of inflammation*, Klower Academic Publishers, 1-90.
65. Goodman-Gilman A., Limbid, L.E., (1996), *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basics of Therapeutics*, 9th ed., Mc Graw-Hill, New York, 579-657.

66. Zubay, G.L., Parson, W.W., Vance, D.E., (1995), *Principles of Biochemistry*, Vol. 2, Metabolism. WCB, USA, 1995: 452-457.
67. Garret, R.H., Grisham, C.M., (1995), *Biochemistry*, Saunders Collage Publishing, 780-783.
68. Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.C., Walker, M.J.A., (1998), *Farmacologia Integrada*, Hoffman B.B., Harcourt Brace, España, 342-345.
69. Vane, J.R. and Botting, R.M., (1997), Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Advances in Experimental Medicinal and Biology*, Vol. 433. Recent advances in prostaglandin, tromboxane and leukotriene research, ed. Sinziger, H., Samuelson, B., Vane, J.R., Ramwell, P. and Wong, P.Y-K., Plenum Press, New York, 131-138.
70. Picot, D., Loll, P.J., Garavito, R.M., (1994), Th X-Ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ syntetase-1, *Nature*, 367, 243-248.
71. Vane, J., (1998), Towards a better aspirin, *Nature*, 367, 215-216.
72. Gorman, C., (1998), Aspirin without ulcers, *Time*, 39.
73. Lawton, G. (1999), New drugs dull the pain of aspirin, *Chemistry and Industry*, 292.
74. Pathak, D., Pathak, K., Singla, A.K., (1991), Flavonoids as medicinal agents - Recent advances, *Fitoterapia*, LXII, 371-389.
75. Michel, F., Merckklein, L., Rey, R., Crastes de Paulet, A., (1985), Comparative effects of some flavonoids on cyclooxygenase and lipoxigenase activitie in different cell systems or subfractions. En: *Studies in Organic Chemistry*, 23. Flavonoids and biflavonoids, ed. Farkas, L., Gábor, M., Kallay, F., Elsevier, Oxford, 389-401.

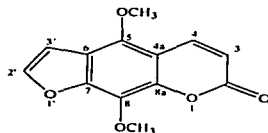
76. Bauman, J., Bruchhausen, F.V., Wurm, G., (1982), Flavonoids and arachidonic acid metabolism. Flavonoids and biflavonoids. *Studies in Organic Chemistry*, 11, Elsevier, Oxford, 411-419.
77. Giorgio, Prietta-Pier, (2000), Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1035-1042.
78. Cragg, G.M., et. Al., (1997), Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.* **60**, 52.
79. Pezzuto, A., (1996), Plant derived anticancer agents, *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 121-133.
80. Della, L. R., Tubaro, A., Sosa, S., Becker, H., Saar, St., I., (1994), *Planta medica*, **60**, 516.
81. Pavia, D., Lampman, G., Kriz, G., and Engel, R., (1995), Organic Laboratory Techniques: A microscale approach. Sandars Collage Publishing, USA, 345.
82. O' Kennedy, R., Douglas, R., (1997), Coumarins: biology, applications, and mode of action, John Wiley & Sons, New york, 348p.
83. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, P., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Capbell, H., Maya, J., Boyd, M., (1991), *Journal of the National Cancer Inst.*, **38** (11), 757-766.
84. Blois, M. S., (1958), *Nature*, 181, 119-120.
85. García-Argáez, A. N., Ramírez, A. T. O., Parra, D. H., Velázquez, G., Martínez-Vázquez, M., (2000), Antiinflammatory Activity of Coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model, *Planta medica*, **66**, 279-281.

86. Castellanos, Bernal. S. V., (1998), Flavonoides y furocumarinas aisladas de *Casimiroa pringlei*. Tesis de licenciatura, FES Zaragoza, UNAM, México, 124 pp.
87. Elgamal, M. H. A., Elewa, N.H., Elkhrisy, E. A. M., Duddeck, H., (1979), ¹³C NMR Chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some furocoumarins and furochromones; *Phytochemistry*, **18**, 139-143.
88. Chakravarty, A. K., Sarkar, T., Masuda, K., Shiojima, K., (1999), Carbazole alkaloids from roots of *Glycosmis arborea*; *Phytochemistry*, **50**, 1263-1266.
89. Rubinstein, I., Goad, J., Clague, A. D. H., Mulheim, J., (1976), The 220 MHz NMR Spectra of phytosterols, **15**, 195-200.
90. Kiribuchi, T., Yasumatsu, N., Funahashi, S., (1967), Synthesis of 6-o-Palmityl-β-D-Glucosyl β-sitosterol. *Agr. Biol. Chem.*, **1**, 10, 1244-1247.
91. García-Argáez, A. N., Toscano, A. R., Martínez-Vázquez, M., (2001), 11-β-hydroxyobacunone (Zapoterin), *J. Chem. Crystall.*, **11**, 727-730.
92. Fisher, S. M., Patrick, K. E., Lee, M.L. and Cameron, G.S., (1991), *Cancer Research*, **51**, 850-856.
93. Hoult, J. R. S., Payá, M., (1996), Pharmacological and Biochemical Actions of simple coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential, *Gen. Pharmac.*, **27**, 4, 713-722.

XIII. APÉNDICE.

XIII. 1. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Isopimpinina (1).- $C_{13}H_{10}O_5$, sólido blanco (14.2 mg), recristalizado de hexanoacetato de etilo, p. f. 135 °C, PM=246. **IR** (Pastilla de KBr): 2950.6 cm^{-1} (C-H de CH_3); 1726.9 cm^{-1} (-C=O de lactona); 1597.5 cm^{-1} (-C=C- aromático). **UV** $\lambda_{máx.}$ (nm) (EtOH): 223.0; 241.5; 248.5; 270.5; 312.5. **RMN¹H**, ($CDCl_3$, 300 MHz): 8.13 ppm (d, J= 10.0 Hz, H-4); 7.63 ppm (d, J=2.2 Hz, H-3''); 7.00 ppm (d, J=2.2 Hz, H-2'); 6.29 ppm (d, J=10.0 Hz, H-3); 4.18 ppm (s, CH_3 -O-); 4.17 ppm (s, CH_3 -O-). **RMN-¹³C**, ($CDCl_3$, 75 MHz): 160.5 ppm (C-2); 150.0 ppm (C-7); 145.1 ppm (C-2'); 144.3 ppm (C-5); 143.7 ppm (C-8a); 139.4 ppm (C-4); 128.24 ppm (C-8); 114.82 (C-6), 112.9 (C-3); 107.7 (C-4a); 105.1 (C-3'); 61.73 (CH_3 -O); 60.84 (CH_3 -O). **EM-IE** m/z^+ : 246 (M^+); 231 (M^+-15); 217 (M^+-29); 203 (M^+-43); 188 (M^+-58); 175 (M^+-71); 168 (M^+-78).

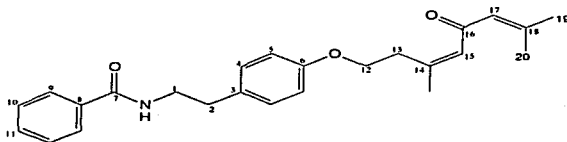


Isopimpinina (1)

Pubesamida A (2). $C_{25}H_{20}O_5N$, sólido amarillo, p.f. 88-91°C **EMAR**: m/z : 391.2220 (rel int.) ($[M]^+$, calcd para: 391.2226). **MS** m/z : (rel int.) 391 ($[M^+]$) (15), 254 (6), 151 (100),

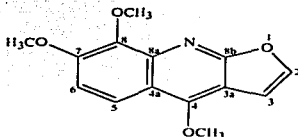
FALLA DE CALIBRACION

135 (16), 120 (44), 105 (47), 83 (86), 77 (16). **UV** λ max nm (CHCl₃) 269 (log ϵ =4.38) **IR** (KBr) ν max cm⁻¹ 3452, 1657, 1513, 1030. ¹H, ¹³C-RMN ver cuadros 15, 16 y 17.



Pubesamida A (2)

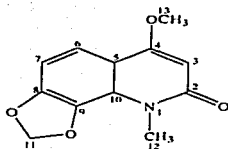
Skimmianina (3).-C₁₄H₁₃O₄N, sólido amarillento, (82.6 mg), recristalizado de metanol, p. f. 175-177 °C, PM= 259. **RMN-¹H**, (CDCl₃, 300 MHz): 8.03 ppm (d, J= 9.3 Hz, H-5); 7.58 ppm (d, J= 3.0 Hz, H-2); 7.25 ppm (d, J= 9.3 Hz, H-6); 7.04 ppm (d, J= 3.0 Hz, H-3); 4.43, 4.12 y 4.03 ppm (singuletes de CH₃O-). **RMN-¹³C** (CDCl₃, 75 MHz): 164.4 ppm (C-8b); 157.17 ppm (C-4); 152.1 ppm (C-8a); 143.0 ppm (C-2); 142.0 ppm (C-7); 141.5 ppm (C-8); 118.2 ppm (C-5); 114.9 ppm (C-3a); 112.1 ppm (C-6); 104.6 ppm (C-3); 102.0 ppm (C-4a); 61.7 ppm (CH₃O-C8); 59.0 ppm (CH₃O-C4); 56.8 ppm (CH₃O-C7). **EM-IE** m/z⁺: 259 (M⁺); 244 (M⁺-CH₃); 230 (M⁺-2CH₃).



Skimmianina (3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

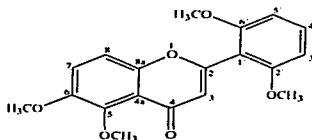
Casimiroína (4).- $C_{12}H_{15}NO_4$, sólido blanco (8.6 mg), recristalizado de hexano-acetato de etilo, p. f. 138-142 °C, PM=233. **RMN-¹H**, ($CDCl_3$, 200 MHz): 7.56 ppm (d, J= 8.6 Hz, H-6); 6.78 ppm (d, J= 8.6 Hz, H-7); 6.04 ppm (s, H-11a, H-11b); 5.91 ppm (s, H-3); 3.91 ppm (s, H-13); 3.85 ppm (s, H-12). **RMN-¹³C** ($CDCl_3$, 75MHz): 118.1 ppm (C-6); 104.34 101.0 ppm (C-3); 94.58 ppm (C-11); 55.85 ppm (C-12, C-13). **EM-El** m/z^+ : 233 (M^+), (M^+-CH_3); 204 (M^+-29).



Casimiroína (4)

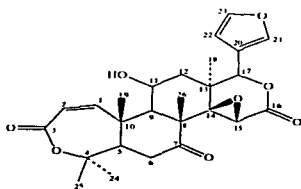
Zapotina (5).- $C_{19}H_{18}O_6$, sólido blanco (24.1 mg) recristalizado de hexano-AcOEt, p. f. 78-79 °C, PM=342. **RMN-¹H** ($CDCl_3$, 300MHz): 7.39 ppm (t, J=8.0 Hz, H-4'); 7.29 ppm (d, J=8.0 Hz, H-7); 7.20 ppm (d, J=8.0 Hz, H-8); 6.63 ppm (d, J=8.0 Hz, H-3'); 6.63 ppm (d, J=8.0 Hz, H-5'); 6.29 ppm (s, H-vinílico, H-3); 4 señales singulete a 3.99, 3.98, 3.93 y 3.80 ppm de CH_3O de los C-5, C-6, C-2' y C-6'). **RMN-¹³C** ($CDCl_3$, 754MHz) : 178.2 ppm (C-4); 158.8 ppm (C-2); 158.5 ppm (C-2'); 157.9 ppm (C-6'); 152.7 ppm (C-5); 149.7 ppm (C-4a); 147.9 ppm (C-6); 132.0 ppm (C-4'); 119.2 ppm (C-8a); 118.9 ppm (C-7); 115.2 ppm (C-3); 113.8 ppm (C-8); 111.1 ppm (C-1'); 103.9 ppm (C-3'); 103.9 ppm (C-5'); 61.8 ppm (CH_3-O en el C-5); 57.2 ppm (CH_3-O en el C-6); 56.0 ppm (CH_3-O en el C-5'); 56.0 ppm

(CH₃-O en el C-6'). **EM-EI** m/z': 327 (M⁺-CH₃); 312 (M⁺-2CH₃); 297 (M⁺-3CH₃); 137 (C₈H₁₁O₂)⁺.



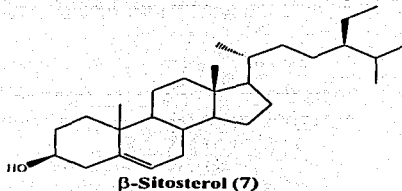
Zapotina (5)

Zapoterina (6).- C₂₆H₃₀O₈, cristales blancos (16.7 mg), recristalizado de MeOH, con p.f. de 265-267 °C. PM=470.15. **RMN¹H**: 7.45 ppm (m, H-21); 7.43 ppm (t, J=1.8 Hz, H-23); 6.71 ppm (d, J=12.0 Hz, H-1); 6.41 ppm (d, J=1.8 Hz, H-22); 5.96 ppm (d, J=12.0 Hz, H-2); 5.61 ppm (s, H-17); 4.66 ppm (d, J=6.0 Hz, H-11); 3.74 ppm (s, H-15); 3.08 ppm (dd, J=14.0, 14.0 Hz, H-6β); 2.59 ppm (dd, J= 14.0, 4.8 Hz, H-5); 2.40 (dd, J= 4.8, 14.0 Hz, H-6α); 1.98 ppm (s, H-9); 1.73 ppm (dd, J=6.0, 15.0 Hz, H-12α); 1.68 ppm (dd, J= 15.0, 6.0 Hz); 1.82 ppm (s, CH₃-29); 1.57 ppm (s, CH₃-28); 1.56 ppm (s, CH₃-18); 1.46 ppm (s, CH₃-19); 1.06 ppm (s, CH₃-30). **RMN⁻¹³C**: 207.98 ppm (C-3); 168.48 ppm (C-7); 168.08 ppm (C-16); 156.4 ppm (C-1); 143.5 ppm (C-23); 141.5 ppm (C-21); 121.3 ppm (C-2); 120.3 ppm (C-20); 110.1 ppm (C-22); 84.9 ppm (C-4); 78.9 ppm (C-17); 66.4 ppm (C-11); 65.0 ppm (C-14); 57.0 ppm (C-5); 54.0 ppm (C-15); 51.1 ppm (C-9); 44.5 ppm (C-8); 44.3 ppm (C-10); 44.2 ppm (C-12); 40.3 ppm (C-6); 36.2 ppm (C-13); 31.9 ppm (C-19); 26.4 ppm (C-18); 20.5 ppm (C-30); 19.9 ppm (C-28); 18.4 ppm (C-29).



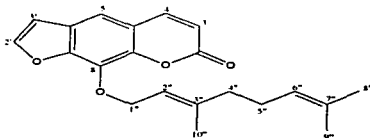
Zapoterina (6)

β -sistosterol (7).- $C_{29}H_{50}O$, sólido blanco (21.9 mg), recristalizado de MeOH p.f. 132-135 °C, PM =414. **RMN-¹H** ($CDCl_3$, 300 MHz): 5.36 ppm (sa, 1H, J=8.1 Hz, H-6), 3.52 ppm (sa, 1H, H-3), señales de metilo a 1.01, 0.85, 0.82, 0.80, 0.68 ppm. Los datos espectroscópicos concuerdan con lo informado en la literatura⁸⁹



β -Sitosterol (7)

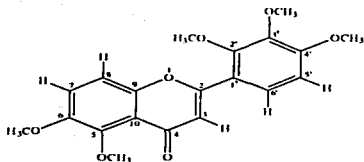
8-geraniloxipsoraleno (8). $C_{21}H_{22}O_4$, sólido amarillo, (10.6 mg), recristalizado de hexano-acetato de etilo, p.f.=53-54°C, PM=338, **IR**= ν max cm^{-1} : 1710, 1600, 1560, 1490, 1380, 1360. **RMN-¹H**: δ 1.53 (3H, s), 1.63 (3H, s), 1.69 (3H, s), 2.0 (6H, d), 4.69 (2H, da, J=8.5 Hz), 5.43 (2H, t, J=9.5 Hz, 6 Hz).



8-Geraniloxipsoraleno (8)

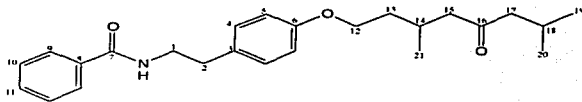
5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona. (9) $C_{20}H_{20}O_7$, sólido blanco (82.3 mg) recristalizado con éter isopropílico, p.f. de 129-131^oC. IR (KBr) ν max 2987.1 y 2940.1 cm^{-1} (-C-H de CH_2 y CH_3); 1644.2 cm^{-1} (-C=O de cetona conjugada); 1595.6 cm^{-1} (-C=C-aromático); 1472.4 cm^{-1} (-C-H alifático), 1285.6 cm^{-1} (-C-O-C-). EM-IE. 373.1288 ($M^+ + 1$), calculado 372.1278, m/z (%) 372 (M^+ , 63), 357 (100), 341 (10), 327 (13), 192 (10), 180 (8), 177 (6). UV λ nm ($CHCl_3$) (e) 316 (32 000), 274 (25 155), 252 (25 000). -RMN-¹H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7.51 (d, J=9.0 Hz, H-6'), 7.30 (d, J=9.3 Hz, H-7), 7.25 (d, J=9.3 Hz, H-8), 6.84 (s, H-3), 6.79 (d, J=9.0 Hz, H-5'), 3.98 (CH_3 -O-C₅), 3.95 (CH_3 -O-C₂), 3.94 (CH_3 -O-C₄), 3.93 (CH_3 -O-C₆), 3.91 (CH_3 -O-C₃), RMN-¹³C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 178.4 (C-4), 160.6 (C-2), 156.5 (C-4'), 153.3 (C-2'), 151.7 (C-9), 149.9 (C-6), 147.8 (C-5), 142.7 (C-3'), 124.2 (C-6'), 119.3 (C-7), 118.9 (C-10), 118.5 (C-1'), 113.3 (C-8), 110.9 (C-3), 107.4 (C-5'), 62.0 (CH_3 -O-C₃), 61.3 (CH_3 -O-C₆), 61.0 (CH_3 -O-C₄), 57.2 (CH_3 -O-C₂), 56.2 (CH_3 -O-C₅).

TESIS G.
FALLA DE ORIGEN



5, 6, 2', 3', 4'-pentametoxiflavona (9)

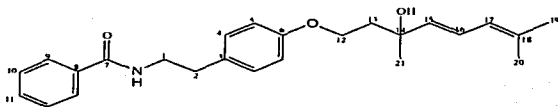
Tetrahidropubesamida A (10). Cristales blancos, (20.5 mg), recristalizado de éter isopropílico, p.f.= 78-80°C, PM=395. ¹H, ¹³C RMN, ver cuadros 15, 16 y 17.



Tetrahidropubesamida A (10)

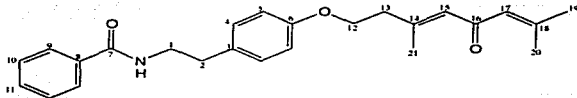
Pubesamida C. (11) C₂₅H₃₁O₃N, sólido amarillo, recristalizado de éter isopropílico, p.f. 84°C. EMAR: *m/z*: 393.2333 ([M]⁺, calcd para (393.2304). MS *m/z*: (rel. int.) 393 ([M]⁺) (6), 375 (30), 272 (8), 254 (94), 232 (16), 202 (14), 193 (30), 168 (76), 166 (98), 135 (100), 120 (68), 105 (89), 93 (42), 77 (37), 55 (20). UV λ max nm (MeOH) 230 (log ε=4.52) y 202 (log ε=4.37) IR (KBr) ν max cm⁻¹ 3455, 1655, 1512, 1486 y 1286. ¹H, ¹³C RMN ver cuadros 15, 16 y 17.

FALLA DE ORIGEN



Pubesamida C. (11)

Pubesamida B (12). $C_{25}H_{29}O_3N$, sólido amarillo, recristalizado de éter isopropílico p.f. 89-92°C, **MS** m/z : (rel int.) 391 ($[M^+]$) (5), 295 (10), 271 (8), 257 (2), 254 (5), 151 (100), 137 (11), 134 (6), 123 (12), 120 (43), 105 (60), 83 (86), 77 (22), 55 (13), 43 (8). **IR** (KBr) ν max cm^{-1} 3317, 1634, 1537, 1242. **1H** , **^{13}C RMN** ver cuadros 15, 16 y 17.

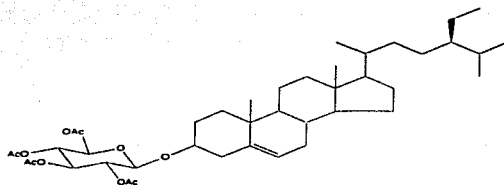


Pubesamida B (12).

Tetra-acetil daucosterol (14). Sólido blanco, (13.0 mg), recristalizado de acetato de etilo metanol, p.f.= 283-286°C, $PM=688.97$, **RMN- 1H** ($CDCl_3$): d 0.8±0.9 (s, CH_3 -26, CH_3 -27 y CH_3 -29), 0.94 (d, $J=6.5$ Hz, CH_3 -21), 1.01 (s, CH_3 -19), 1.27 (s, CH_3 -20), 1.70 (s, CH_3 -18), 2.28 (m, H-4), 2.40 (m, H-4), 3.28 (m, glc-2), 3.31 (m, glc-5), 3.40±3.50 (m, glc-3 y glc-4), 3.58 (m, H-3), 3.77 (dd, $J=11, 4.4$ Hz, glc-6a), 3.86 (dd, $J=11, 3.3$ Hz, glc-6b), 4.41 (d, $J=7.3$ Hz, glc-1), 5.37 (da, $J=4.5$ Hz, H-6). **NMR- ^{13}C** ($CDCl_3$): d 12 (18 y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

29), 18.5 (21), 18.7 (27), 19 (19), 19.5 (26), 20.8 (11), 22.8 (28), 24.5 (15), 28.0 (23), 28.7 (16), 28.9 (25), 31.6 (2, 7), 31.7 (8), 34.0 (22), 36.0 (20), 36.5 (10), 37.0 (1), 38.5 (12), 39.5 (4), 42.1 (13), 45.7 (24), 50.0 (9), 55.8 (17), 56.5 (14), 61.7 (glc-6), 70.0 (glc-4), 73.3 (glc-2), 75.4 (glc-5), 76.2 (glc-3), 78.9 (3), 100.9 (glc-1), 121.9 (6), 141.6 (5), y 28), 26.0 (3 0 y 3 0), 30.3±30.8 (4 0 ±130 y 4 0± 15 0), 33.1 (140 y 16 0), 35.0 (20), 35.2 (2 0), 64.8 (1), 67.3 (3, glc-6 0), 68.1 (2), 69.9 (glc-4 0), 71.8 (glc-5 0), 73.5 (glc-20), 75.0 (glc-30), 100.0 (glc-1 0), 177.2 (1 0 y 1 0).



Tetra-acetil daucosterol (14).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XIII.2 Generalidades de las cumarinas.

Definiciones.

Cumarina es el nombre trivial aceptado para el compuesto cuya estructura se encuentra en la figura 13; y es también el nombre genérico para el grupo de lactonas de origen natural que poseen como esqueleto fundamental una unidad de cumarina, $C_9H_6O_2$.

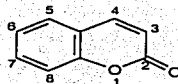


Fig. 13. Estructura de la cumarina

A excepción de la cumarina y de la 4-metilio-5-metileumarina (fig. 13 y 14a), todas las cumarinas naturales tienen unidos átomos de oxígeno en una o más de las seis posiciones disponibles del núcleo, ya sea como fenoles, éteres, o grupos glicosídicos. Casi todas las cumarinas naturales se encuentran oxigenadas en el carbono 7 y por consecuencia se ha propuesto que la 7-hidroxycumarina (umbeliferona) (fig. 14b) es la precursora de cumarinas más complejas⁵¹.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Fig. 14. 4-metil-5-metilcumarina y umbeliferona

Una característica común de muchas cumarinas es la presencia de cadenas de isoprenoides, generalmente de una, dos o tres unidades. Estas cadenas están enlazadas a través de átomos de carbono ó de oxígeno al núcleo cumarínico. Frecuentemente la cadena isoprenoide corresponde a lo que se llama grupo prenilo (3-metilbut-2-enilo), el cual se puede encontrar en su forma simple o en una variedad de formas donde el esqueleto ha sufrido modificaciones¹⁵.

Clasificación de cumarinas

Por su estructura las cumarinas se han clasificado de varias formas, sin embargo la clasificación más aceptada es la siguiente:

Simples.- Son aquellas que contienen solamente el anillo de la cumarina con sustituyentes hidroxilados, alcoxilados, alquilados y sus glicósidos, excepto en el anillo pirano, por ejemplo la umbeliferona (fig. 14)

Furanocumarinas.- Dentro de este grupo se encuentran las furanocumarinas lineales o angulares con sustituyentes en una o ambas posiciones remanentes en el núcleo benzóico.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

incluyendo las dihidro-furanocumarinas, un ejemplo de este tipo de cumarinas es el psoraleno.

Piranocumarinas.- Estas sustancias presentan un anillo de 6 miembros enlazado al núcleo cumarínico de forma lineal o angular y son análogos de las furanocumarinas, por ejemplo la seselina.

Cumarinas substituidas en el anillo pirano.- Como las 4-hidroxi-cumarinas, 3-fenil-cumarinas o 3-4-benzocumarinas.

Biosíntesis de cumarinas

En especies de la familia Rutaceae se han encontrado aproximadamente 200 cumarinas y evidencias experimentales han demostrado que estas se sintetizan por las mismas rutas biosintéticas observadas en otras familias de plantas^{51, 52}.

Las cumarinas pertenecen al grupo de compuestos denominados fenilpropanoides y son metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corisinato.

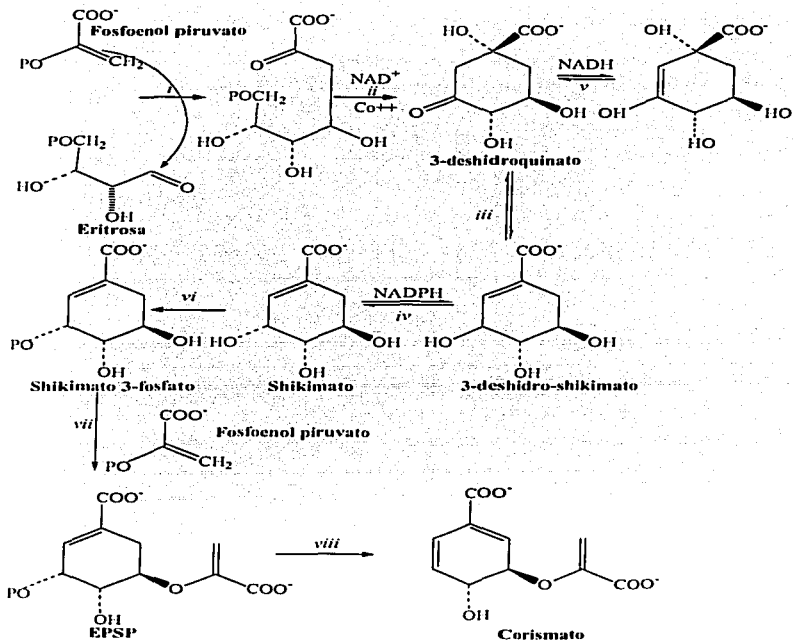
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ruta del shikimato-corisinato

El ácido shikímico es un intermediario importante en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, los cuales dan origen a numerosos metabolitos secundarios como las cumarinas. Varias etapas de esta ruta característica de plantas superiores y microorganismos han sido experimentalmente comprobadas^{51, 52}.

Esta vía tiene sus orígenes en el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos carboxílicos, los que proveen la eritrosa y al ácido fosfoenol-pirúvico, respectivamente. La asociación de estos metabolitos da origen al ácido shikímico (como shikimato), el que a su vez por condensación incorpora otra molécula de ácido fosfoenol pirúvico para generar al ácido corísmico (como corisinato) fig. 15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Enzimas *i* = DAHP sintetasa, *ii*=deshidroquinato sintetasa, *iii*=3-deshidroquinasa, *iv*=shikimato deshidrogenasa, *v*=quinato deshidrogenasa, *vi*=shikimato quinasa, *vii*=EPSP sintetasa, *viii*=corismatosintetasa.

Fig. 15. Ruta biosintética del shikimato-corismato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

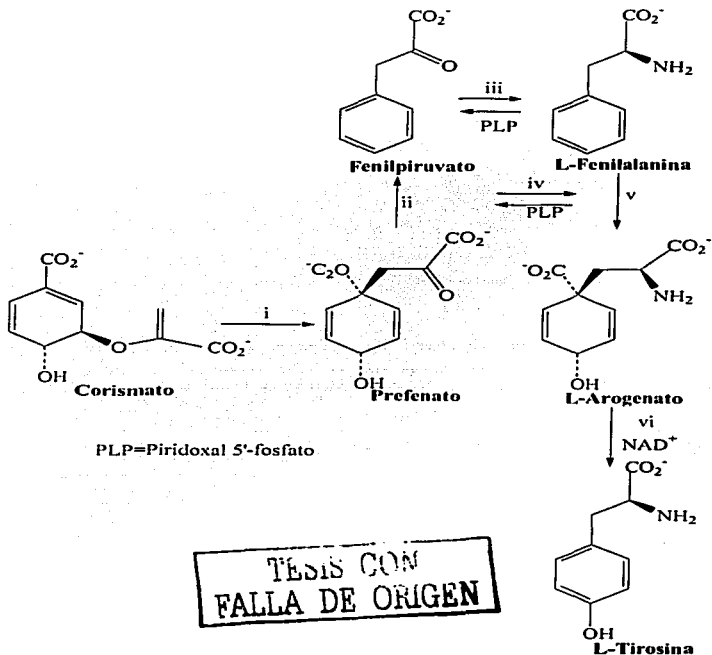


Fig. 16. Formación de fenilalanina y tirosina . Formación de la fenilalanina. Enzimas: i, Corismato mutasa, ii, prefenato deshidratasa, iii, fenilpiruvato aminotransferasa, iv, prefenato aminotransferasa, v, argenato deshidratasa.

El corimato es el intermediario clave para la formación de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina⁵³⁰, fig. 16.

Estos aminoácidos al llevar a cabo una trans-eliminación pierden el grupo amino y forman los ácidos trans-cinámico y p-cumárico respectivamente, fig. 17.

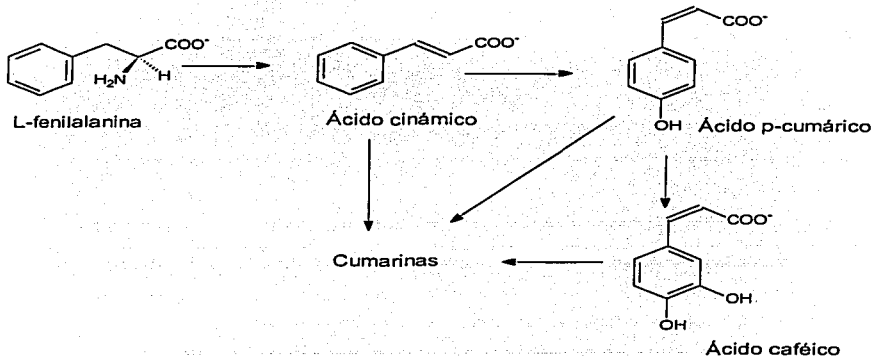


Fig. 17. Formación de cumarinas a partir de L-fenilalanina

Algunas de las transformaciones de los ácidos cinámico y para cumárico implican orto-hidroxilaciones, glucosilación e isomerización cis-trans. Otra serie de transformaciones implica las epoxidaciones y transposiciones tipo NIH. La mayoría de las reacciones involucradas en las rutas biogénicas se han demostrado con marcadores radiactivos.

Como ya se mencionó la umbeliferona se considera la estructura inicial en la biogénesis de varias cumarinas naturales. En la figura 18 se ilustra la biogénesis de la cumarina y de la umbeliferona a partir del ácido p-cumárico.

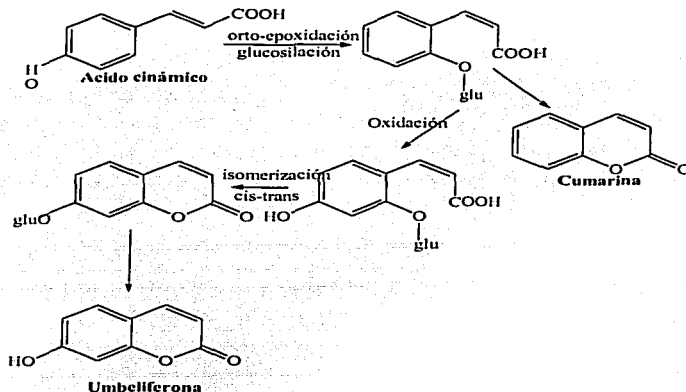


Fig. 18. Ruta biosintética de la umbeliferona

Furano y piranocumarinas

Las furano y pirano cumarinas se forman biogenéticamente cuando al núcleo cumarínico se adiciona un grupo prenilo y este interacciona con un grupo orto-fenólico de tal modo que se generan diferentes cumarinas naturales con un anillo heterocíclico adicional, fig. 19.

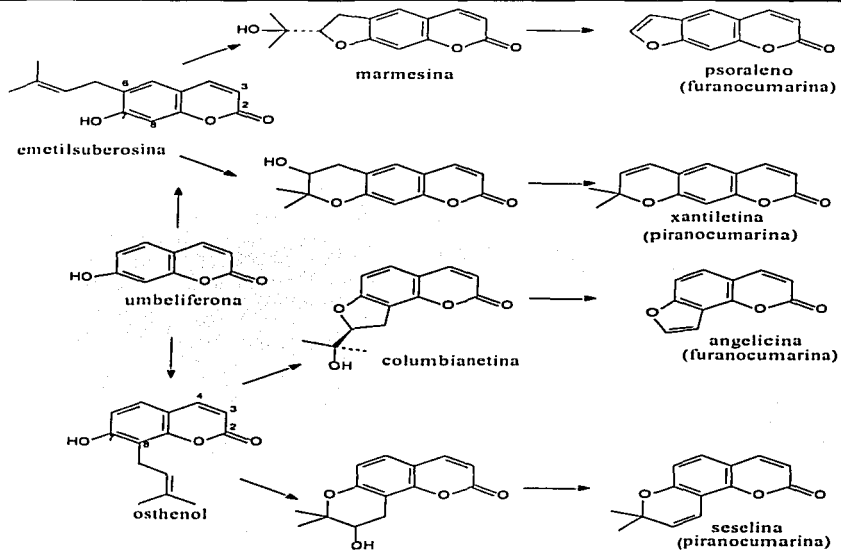


Fig. 19. Formación de furano y piranocumarinas a partir de la umbeliferona

La umbeliferona al prenilarse ya sea en los carbonos 6 u 8 da origen a la demetilsuberósina y al osthenol respectivamente, los que Floss, H.⁵⁴, considera como precursores de las furanocumarinas lineales y angulares.

Así, cuando la prenilación nuclear de la umbeliferona ocurre en el átomo C-6, se pueden formar furanocumarinas lineales como la marmesina y el psoraleno. Sin embargo, si la alquilación ocurre en el C-8 se forman cumarinas angulares como angelicina y seselina entre otras, fig. 20.

La epoxidación de la cadena prenilada lateral y su posterior hidrólisis da origen a un diol. Esta ruta se ha comprobado experimentalmente mediante marcadores radiactivos. Por ejemplo, en el caso de la marmesina, un diol constituye su precursor y la posterior ciclización produce furanocumarinas lineales, por lo que se le considera como precursora de este tipo de estructuras.

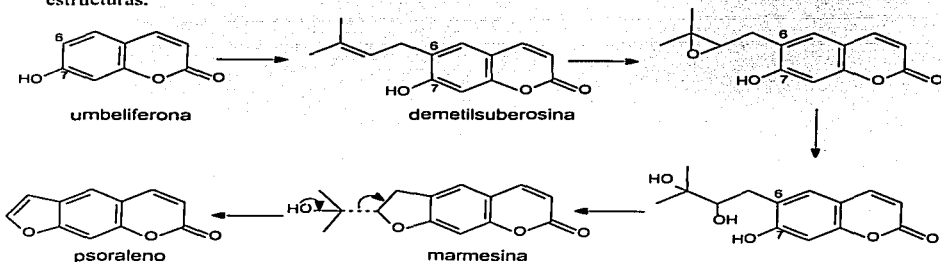


Fig. 20. Formación del psoraleno a partir de la umbeliferona

XIII. 3. Generalidades de los flavonoides.

Se denominan flavonoides a varias clases de compuestos, que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos $C_6C_3C_6$) que se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales y que son biosintetizados en parte a partir del ácido shikímico y en parte a partir de la acetilcoenzima A vía malonil CoA (biosíntesis mixta).

Se estima que alrededor del 2% de todo el carbón fotosintetizado por plantas es convertido a flavonoides o a compuestos estrechamente relacionados. Los flavonoides constituyen uno de los grupos más grandes de la naturaleza que presentan fenoles. Son virtualmente ubicuos en plantas verdes y son comúnmente encontrados en cualquier trabajo que involucre extractos de plantas. Por esta razón es muy importante que los químicos, bioquímicos y biólogos sepan cómo reconocer, aislar e identificar estos productos naturales en todas sus diferentes formas⁵⁵.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo.

Como se mencionó anteriormente los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto: el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima

A y el anillo B y la cadena de 3 átomos de carbono provienen de la ruta del ácido shikímico. Un tricétido se cicliza y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. Estas a su vez son los precursores de las demás clases de flavonoides. Es importante recalcar que este proceso de biosíntesis sustenta el hecho de que en la mayoría de flavonoides el anillo A está oxigenado en la posición meta, es decir como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA; y por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es orto-oxigenado, fig. 21.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos de flavonoides son solubles en agua y alcohol. Los flavonoides altamente hidroxilados son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que los poco hidroxilados lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Los flavonoides altamente metoxilados son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural.

Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos.

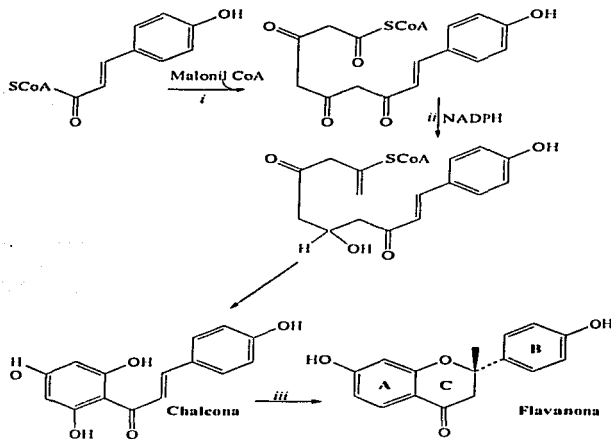


Fig. 21. Ruta de la Malonil CoA. Enzimas: i: chalcona sintetasa, ii: reductasa, iii: chalcona isomerasa

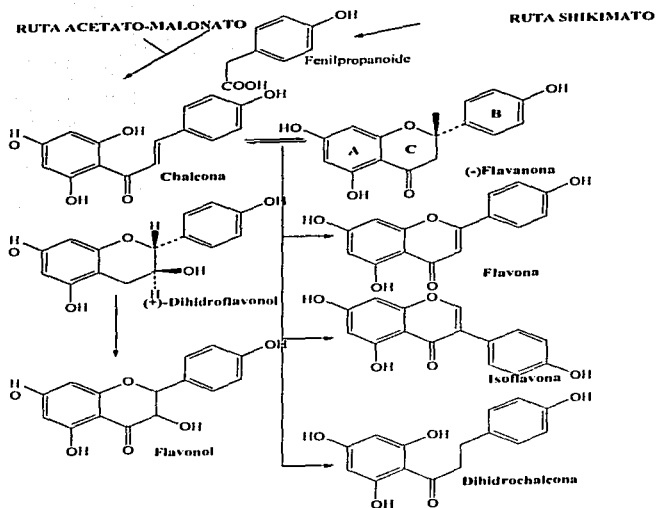


Fig. 22. Ruta biogénica de los flavonoides.

XIII. 4. Generalidades de la biogénesis de la tiramina.

El ácido shikímico es el precursor de los constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos diferentes a los formados por la ruta de la malonilCoA. Hay en muchos casos dos patrones estructurales claros que permiten reconocer los compuestos aromáticos derivados biosintéticamente desde el ácido shikímico, y son: el patrón de oxigenación, y la presencia de anillos aromáticos ligados a cadenas de tres átomos de carbono (patrón C₆C₃).

Mientras que en los metabolitos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA, los grupos oxigenados se hallan en disposición *meta* entre sí, en el caso de los originados a partir del ácido shikímico, los grupos oxigenados están en disposición *orto* ó *diorto* entre sí. Algunos autores se refieren a los patrones de oxigenación aromática de tres tipos: resorcinol, catecol y pirogalol. Los metabolitos tipo resorcinol son *meta*-oxigenados, los del tipo catecol son *orto*-oxigenados, y los del tipo pirogalol son *diorto*-oxigenados.

El descubrimiento de Davis y col. acerca del papel central del ácido shikímico en procesos metabólicos que llevan a aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina), y a los compuestos C₉ derivados de estos, representó un avance notable en el conocimiento sobre biosíntesis en organismos vivos.

La figura 15 esquematiza el proceso de formación del ácido shikímico. La formación del ácido shikímico ocurre a partir de precursores de 3 y 4 átomos de carbono como son el fosfoenolpiruvato (FEP) y la critrosa-4-fosfato (E4P) a través de la serie de etapas descritas.

Este precursor es convertido posteriormente en los aminoácidos fenilalanina o tirosina (Figura 16), los cuales por acción de amoniasas dan origen bien sea al ácido cinámico o p-hidroxicinámico (también llamado ácido p-cumárico por otros autores). Estos dos ácidos aromáticos son los precursores directos de los fenilpropanos naturales⁵⁶.

Se sabe que algunos alcaloides provienen de la biogénesis de la fenilalanina y de sus derivados hidroxilados (fig. 16)

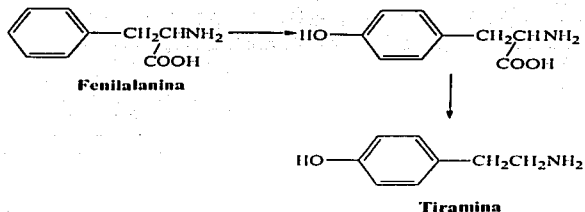


Fig. 23. Tiramina. Amina relacionada con la fenilalanina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECTROS

Dr. Mariano Martínez / Nadia González

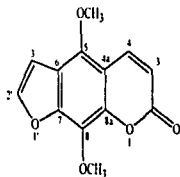
Serv: Cq 84-74

Solvente: CDCl₃

Alícuota: 1

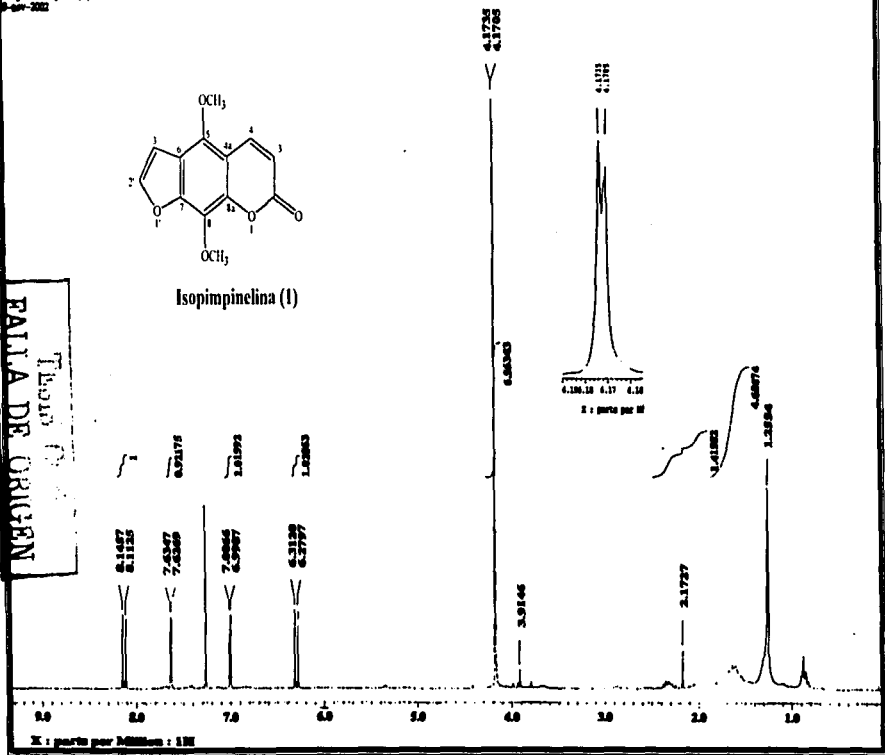
Temperatura: 300 JecI (5)

9-00-202



Isopimpinina (I)

TEND
 PALA DE ORIGEN



Espectro 1. Espectro de RMN-¹H de isopimpinina.

111

Dr. Mariano Mts.

Mtra Aida

CP11

MS

Solvent: CDCl₃

Temp. 27.0 C / 300.1 K

SWH=300 *up500*

PULSE PROGRAM

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 59.4 degree

Acq. time 3.683 sec

Width 5000.0 Hz

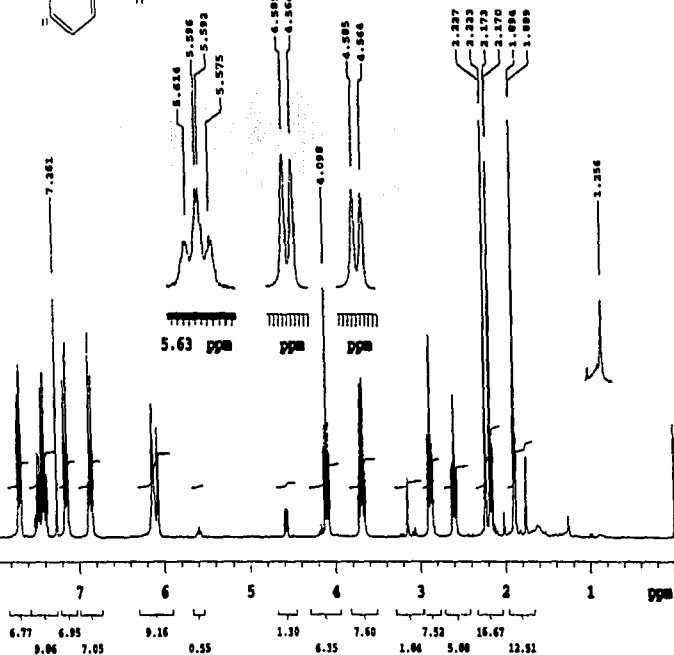
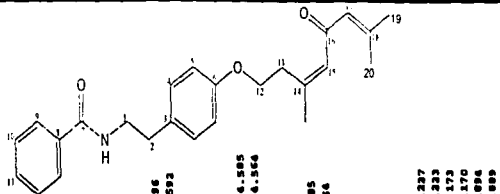
128 repetitions

COUNTS HI 359.8468510 Hz

DATA PROCESSING

SI size 32768

Total time 7 minutes



FALLA DE ORIGEN

TESIS COM

145

Espectro 2. Espectro de RMN-1H de pusbamida A.

Dr. MARIANO WIL.
Mtra. Aida
CP11
M2

Solvent: CCl₄
Temp. 27.0 c / 300.1 K
UNIT: 300 "up200"

PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 129.8 degree
Acq. time 0.399 sec
Width 19002.4 Hz
5500 repetitions
OBSERVE C13, 75.4216903 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479261 MHz
Power 48 dB
on during acquisition
off during delay
MULTI-16 modulated

Line broadening 2.5 Hz
FT size 32768
Total time 7.3 hours

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 ppm

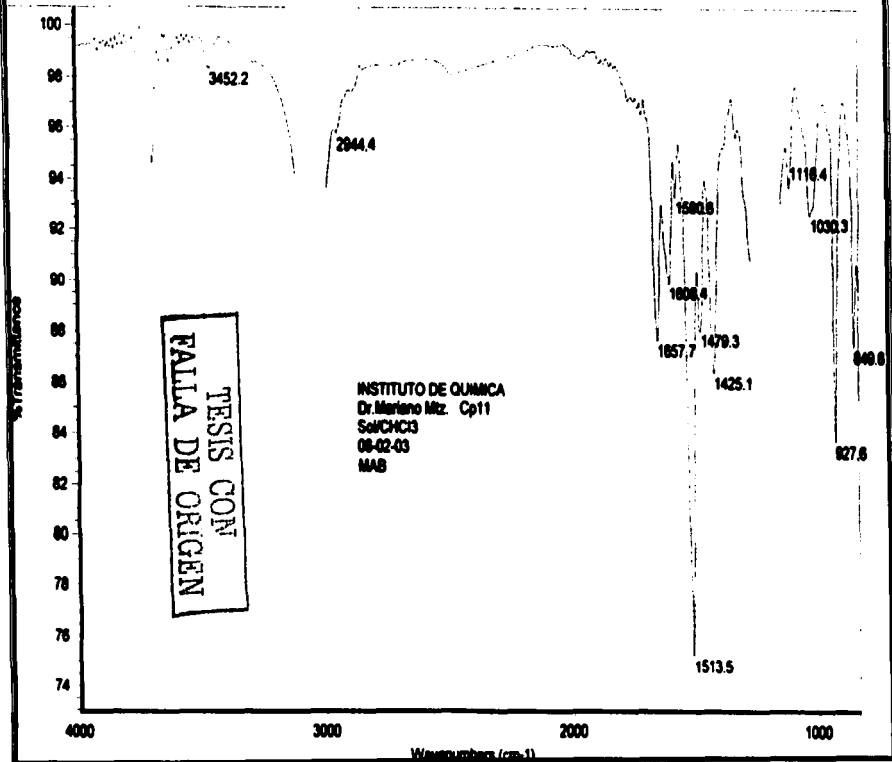
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

146
Espectro 3. RMN-¹³C de Pubesamida A



Instituto de Química, UNAM

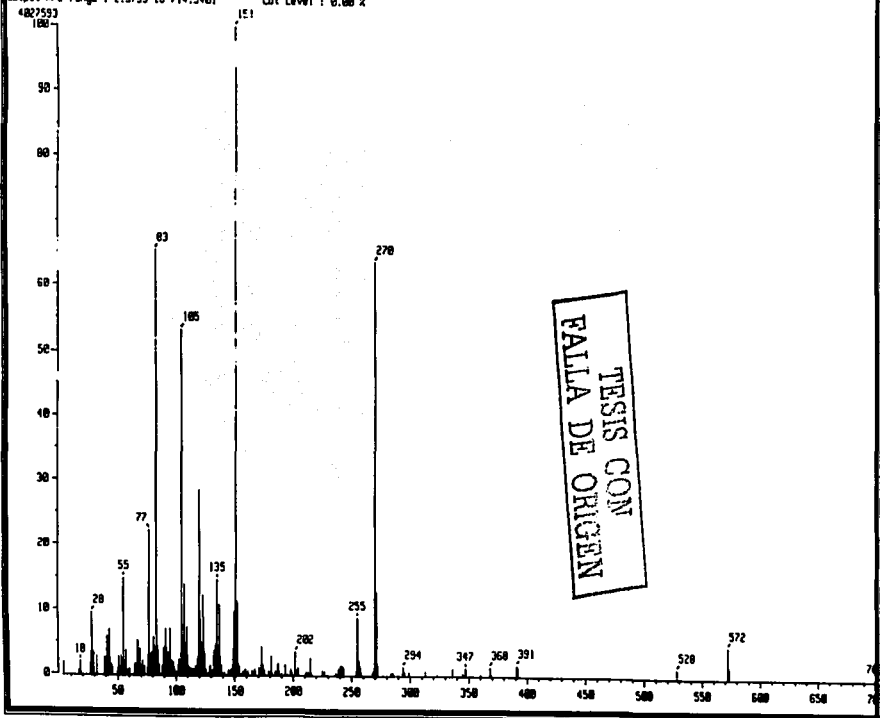
Laboratorio de Infrarrojo



Espectro 4. Espectro de IR de pulesamida A.

147

Mass Spectrometry
Date : Dr-Martinez-Morales-053 Date : 15-Nov-97 09:56
Sample: EM p183
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : E+
Spectrum Type : Normal Ion (M+-Linear)
RT : 1.63 min Scan# : (51,63) Temp : 312.2 deg.C
SP : w/z 151.8000 Int. : 384.10
Output file range : 2.3739 to 714.5401 Cut Level : 0.00 %



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Espectro 5. Espectro de EM-IE de pubesamida A.

148

Instituto de Química UNAM HR

D- Mariano-Mtz / N-Gonzales

Clave: COLOC-1-75

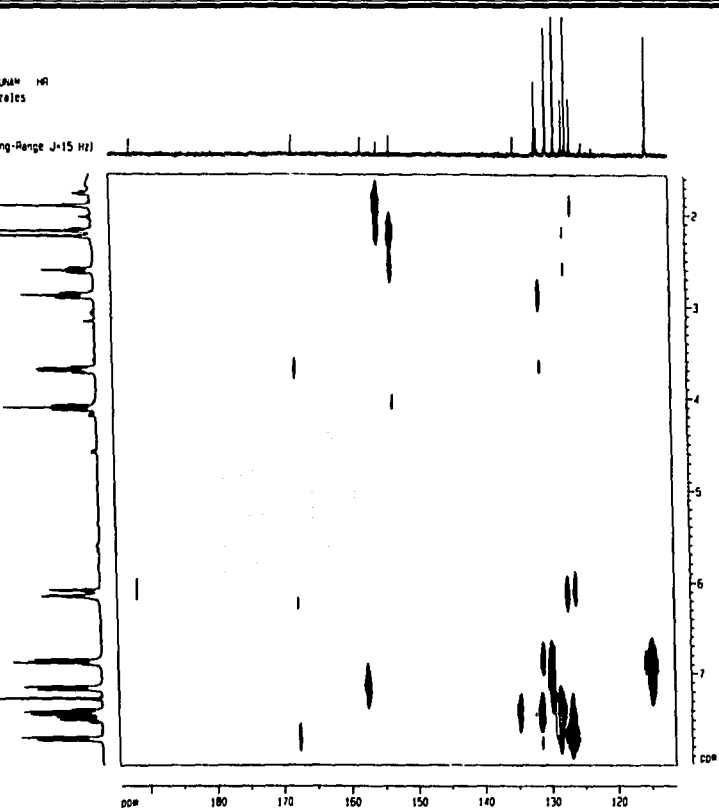
Solvent: CDCl₃

Experimento: COLOC (long-Range J-15 Hz)

Braker Avance 75 MHz

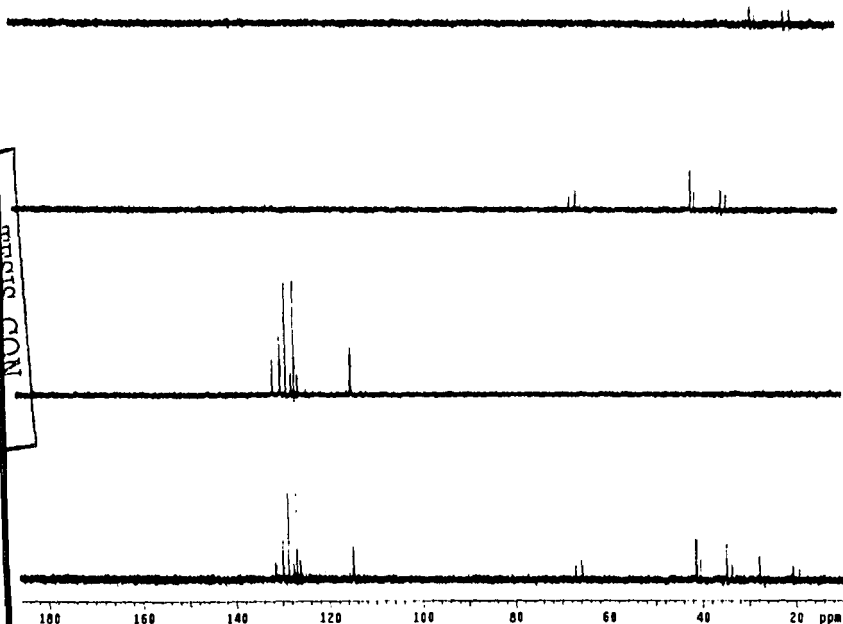
ed-26-2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



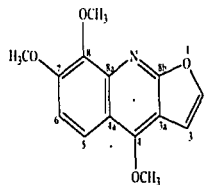
Espectro 6. Espectro de COLOC de pubesamida A.

Instituto de Química, UNAN 42
Dr. Mariano Ríos, Rector G.
Clave: Cp-11
Varian-Omega 100MHz-1
Laboratorio: DEPT, editado
Disolvente: CDCl₃
03-02-83

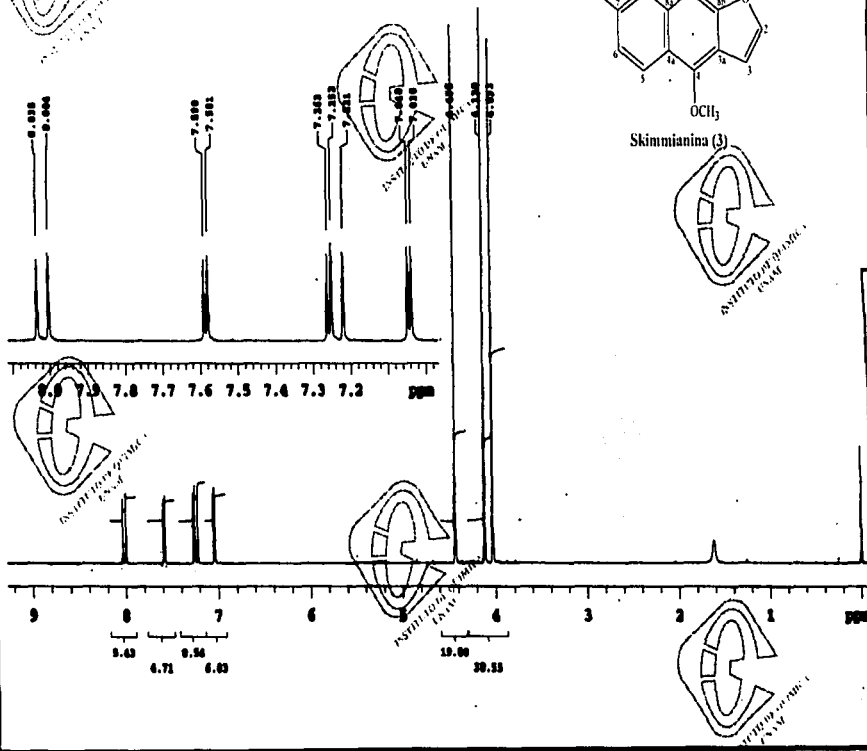


Espectro 7. Espectro de DEPT de pubesamida A.

Dr. Enrique-Elia Soto Jr.
Instituto CICEI
Caracas, VZ
Teléfono: 299.877.886



Skimmianina (3)



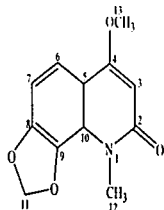
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 8. Espectro de RMN-¹H de skimmianina.

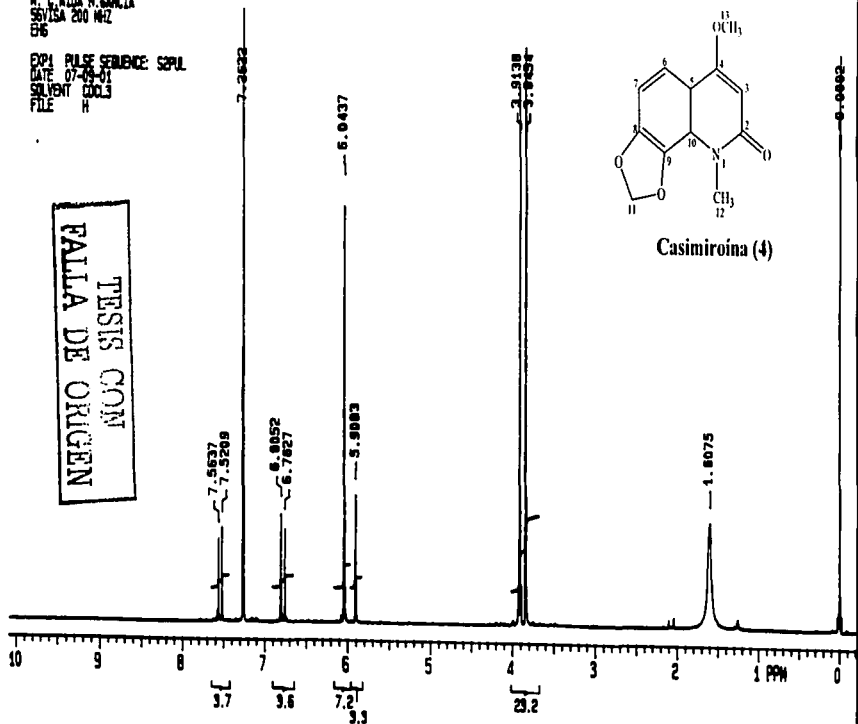
DR. MARIANO MARTINEZ
M. C. ALDA N. GARCIA
SERVISA 200 MHz
98

EXP. PULS. SCIENCE: SPUL
DATE: 07-28-01
SOLVENT: CDCl3
FILE: H

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Casimiroina (4)

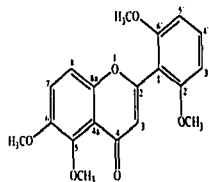


Espectro 9. Espectro de RMN-1H de casimiroina.

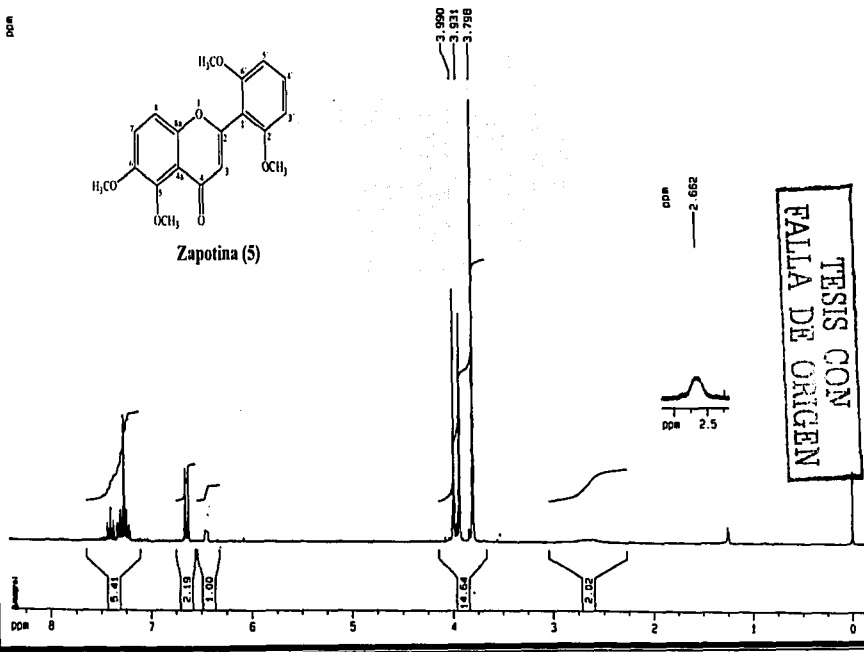
152

Instituto de Quimica UNAM HR
Dr. Mariano-Mtz /N-Gonzalez
Clave: CpAceton-26#
Solvent: CDCl3
Experimento: Hidrogeno
BRUKER-AVANCE-300-MHZ (6)
26-11-02

ppm



Zapotina (5)

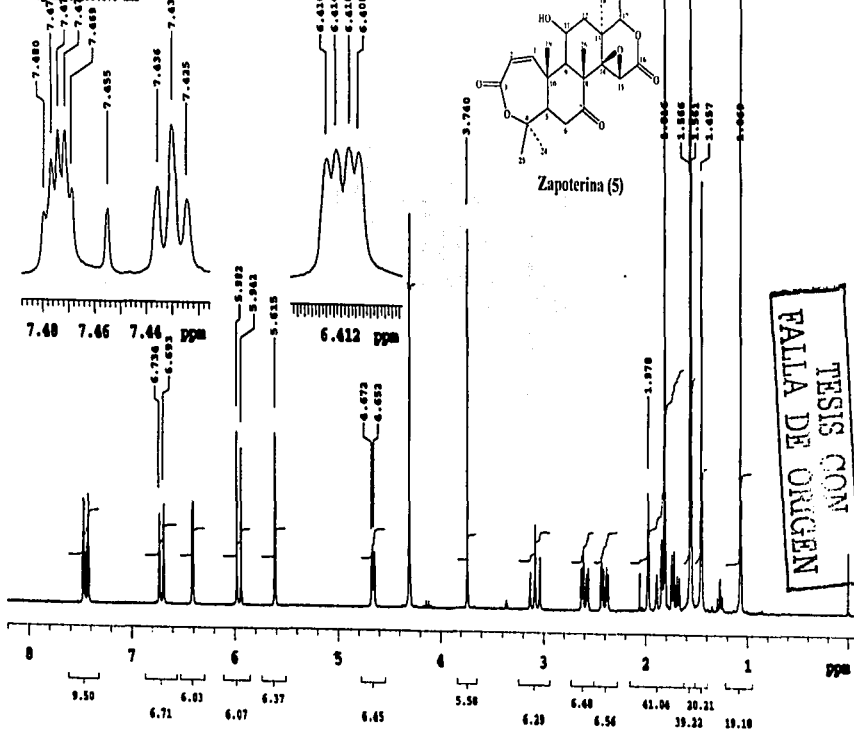


Espectro 10. Espectro de RMN-¹H de zapotina.

153

Dr. Mariano-Rtz GMM143 hr
 Disolvente: CDCl₃/Metanol
 OBSERVE H1

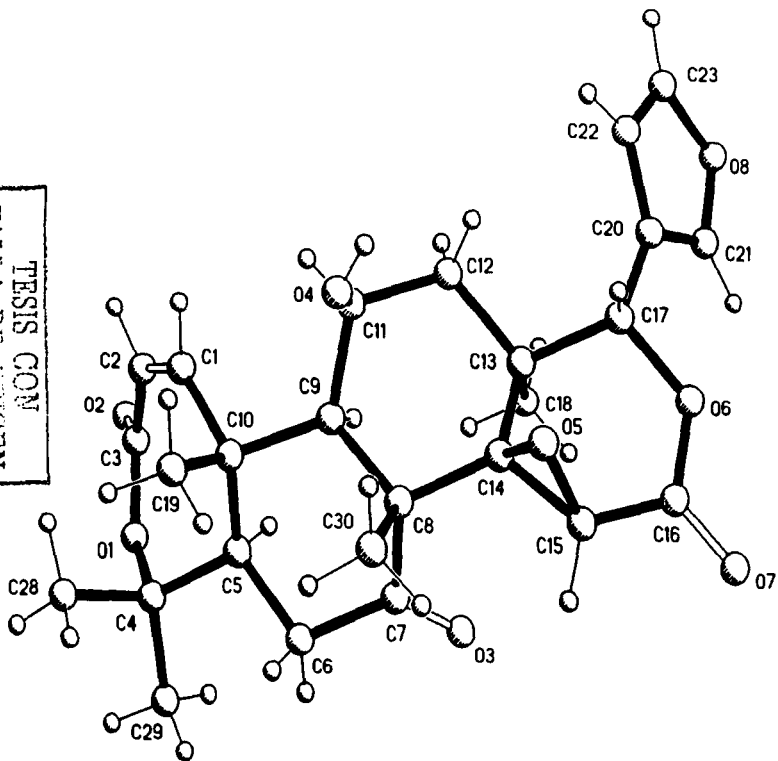
TEMPERATURA: 39.979 Hz



Espectro 11. Espectro de RMN-¹H de zapoterina.

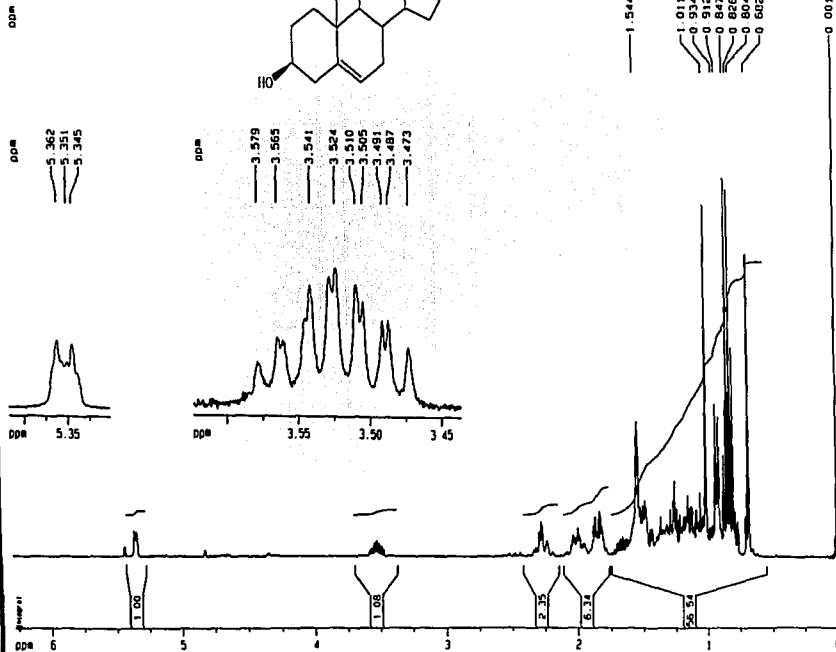
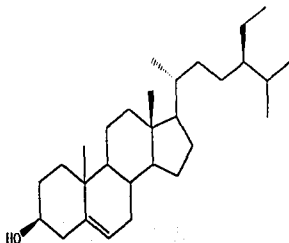
151

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



Espectro 12. Rayos-X de zapoterina.

Instituto de Química CIQAM UNAM
 Dr. Mariano Méz A. González
 Clave: QOAC02-26
 Solvente: CDCl₃
 Hidrógeno
 BRUKER-AVANCE-300-MHz (6)
 25/11/2002

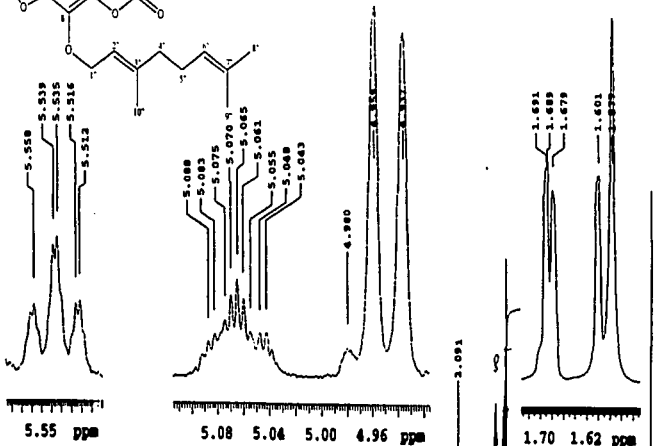
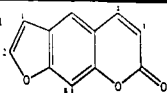


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

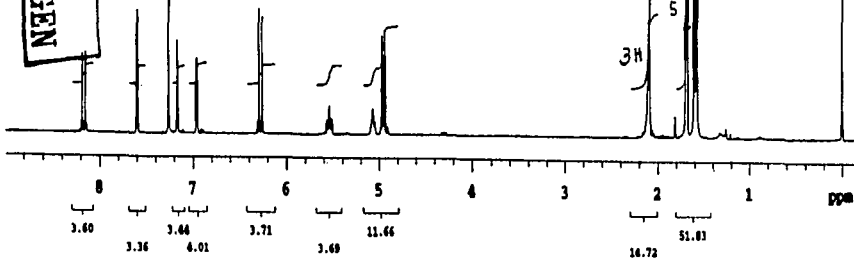
Espectro 13. Espectro de RMN-1H de β -sitosterol.

156

Instituto de Química, UNAM
 Dr. Mariano Méndez / MM-González
 Clave: CpRM-28
 Hidrogeno
 CDCl₃
 Varian-Duffy-300-MHz (4)
 Septiembre 3 de 2002

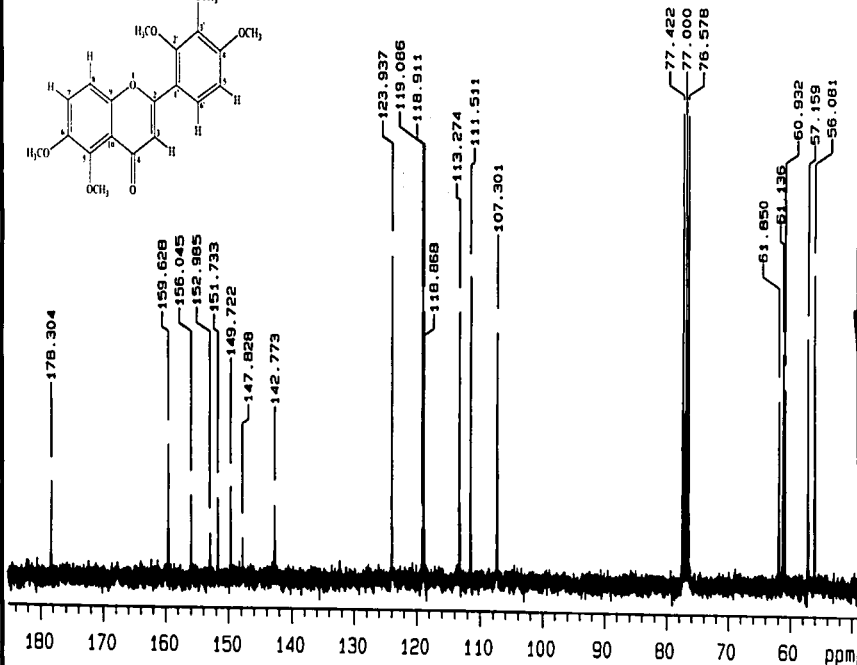
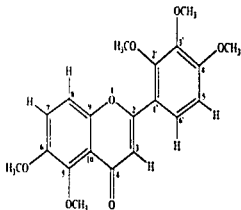


TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN



Espectro 14. Espectro de RMN-¹H de 8-geraniloxipsoraleno.

Instituto de Química UNAM IH
 Dr-Mariano-Mtz/ N-Gonzalez
 clave: CpAcOEt-93
 Experimento: Carbono-13
 Solvent: CDCl_3
 Varian-Unity-75 MHz (4)
 Ene-27-2003

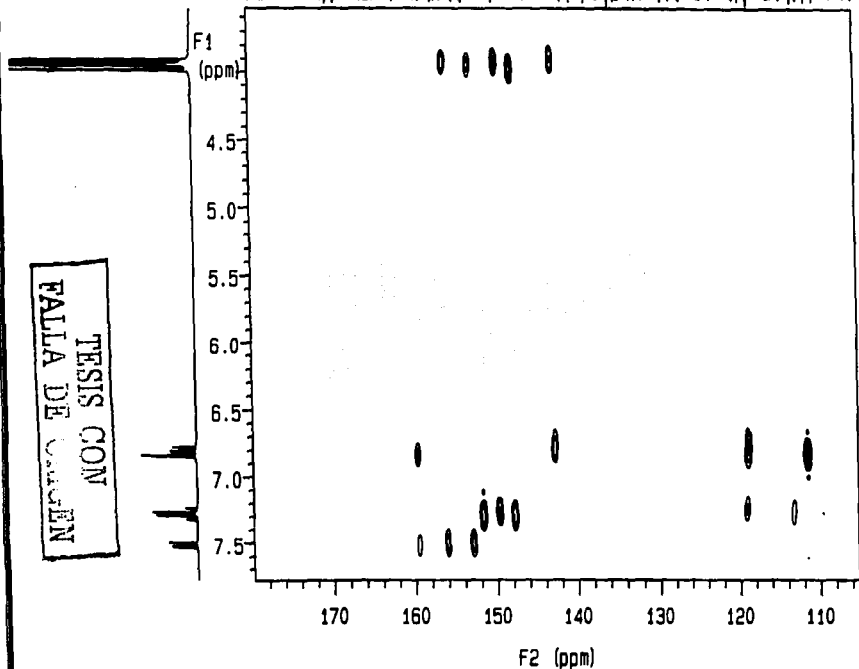


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Espectro 16. Espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ de 5,6,2',3',4' pentametoxilavona.

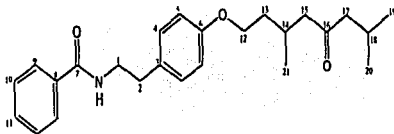
b5!

Instituto de Quimica. UNAM HR
Dr-Mariano-Mtz/ N-Gonzalez
clave: CpEAcOEt-93
Experimento: Carbono-13/COLOC
Solvent: CDCL3
Varian-Unity-75 MHz (4)
Ene-27-2003

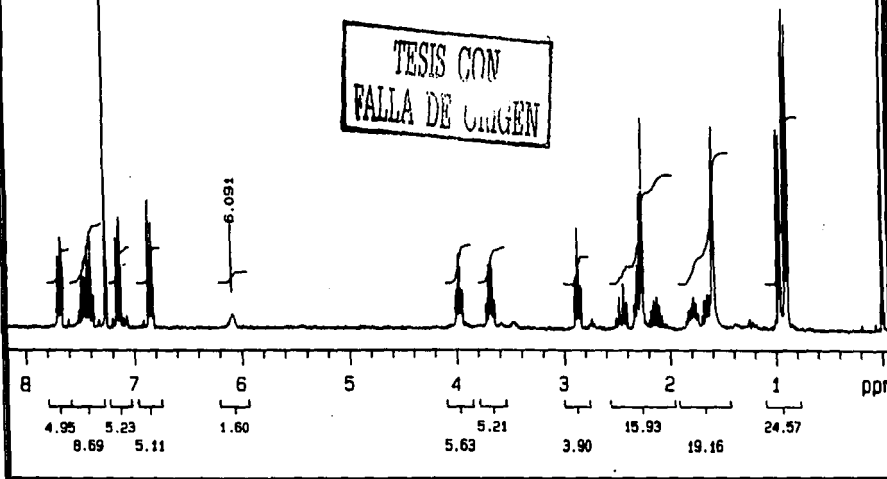


Espectro 17. Espectro de COLOC de 5,6,2',3',4' pentametoilavona.

Instituto de Quimica. UNAM HR
Dr-Mariano-Mtz / N. Gonzalez
Clave: CpEChid-2
Experimento: Hidrogeno
Solvent: CDCl3
Varian-Uniti-300-MHz
Julio 26 de 2002



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 18. Espectro de RMN-¹H de tetrapubesamida A.

Instituto de Química UNAM MX

Dr. Mariano-Mtz / M. González

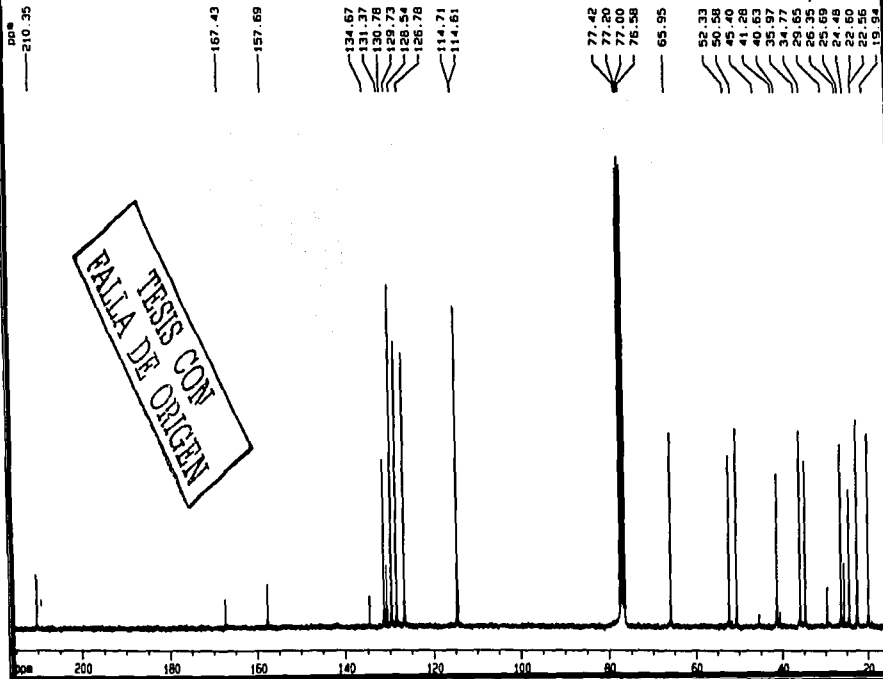
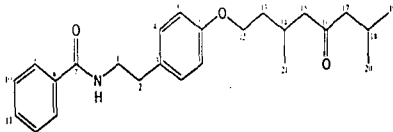
Clave: CoEACHimorg-2

Solvent: CDCl₃

CARBONO-13

BRUKER-avance-75 4-MHZ (S)

Julio 30 de 2002



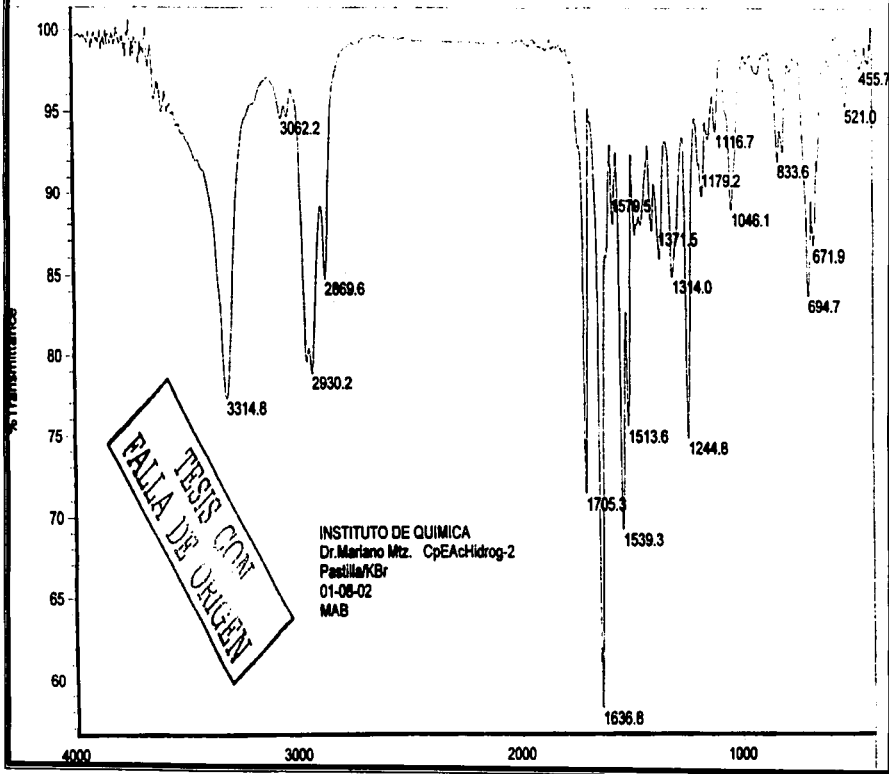
Espectro 19. Espectro de RMN-¹³C de tetrapubesamida A.

1691



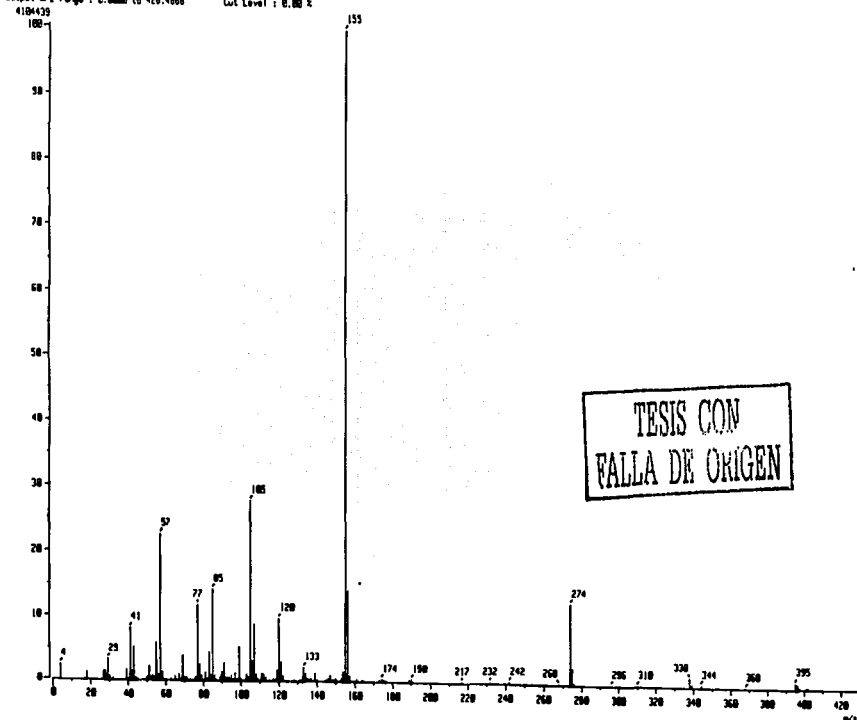
Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo



Espectro 20. Espectro de IR de tetrapesamida A.

Mass Spectrum
Date : 25-Apr-1992 17:45
Sample: Melli-2-GC/2-Hisprog-2
Note : JP 26-julio-2002
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion (F+Linear)
RF : 1.01 mm Scan# : 145,771-134,531 Temp : 222.4 deg.C
BP : w/z 155,0000 Int. : 300.00
Output m/z range : 0.0000 to 420.4000 Cut Level : 0.00 z



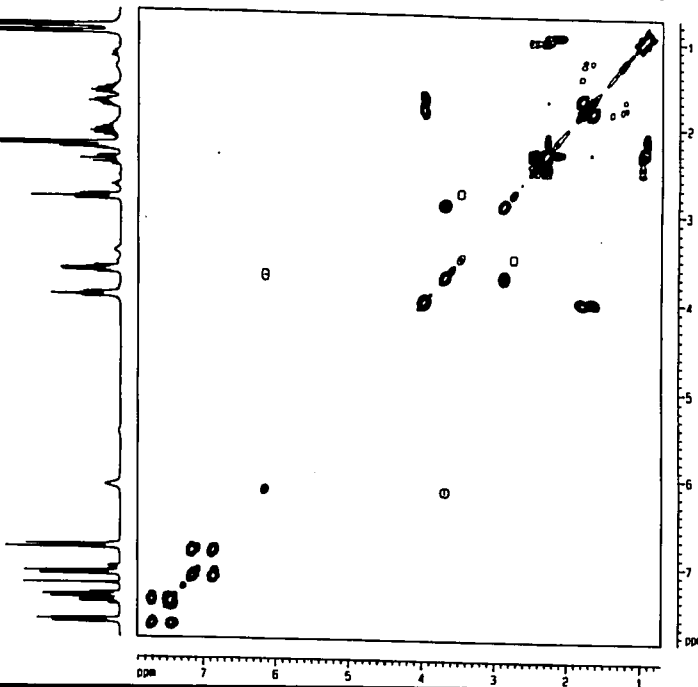
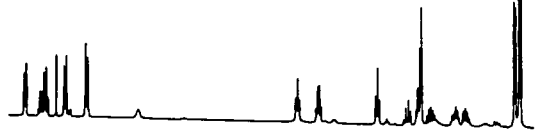
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 21. Espectro de EM-IE de tetrapubesamida A.

169

Instituto de Quimica (IAM) HR
Dr. Mariano-Mtz / N. Gonzalez
Clave: CoEchHydrog-2
Solvent: CDCl3
COSY
BRUKER-AVANCE-300-MHz (6)
Julio 30 de 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

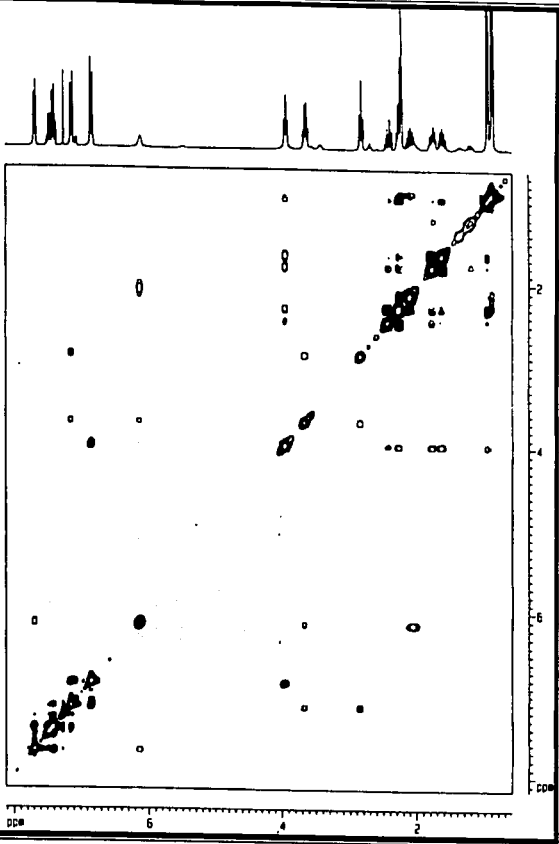


Espectro 22. Espectro de COSY de tetrapubesamida A.

165

INSTITUTO DE QUÍMICA - UNLP
C-449-100-02 / 10-000000
Clave: C449-100-02
Nombre: CQ 1
Método: CQ 1
SOLVENTE: DMSO-d6
CONCENTRACION: 100 mg/ml
Fecha: 20 de 2002

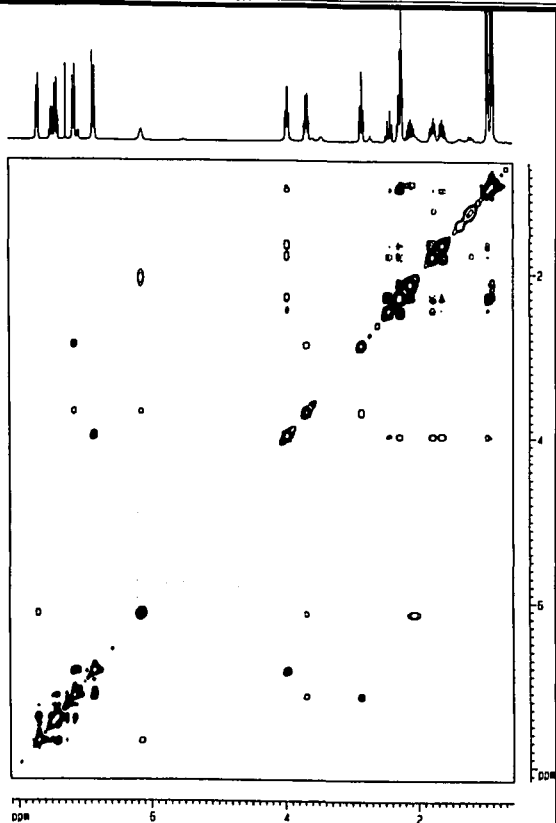
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 23. Espectro de NOESY de tetrapubesamida A.

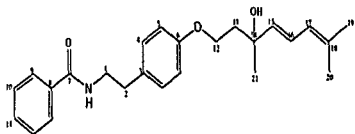
Instituto de Química UNAM - IQ
Dr. Alejandro Méndez y González
Clase: Caracterización I
Sistema: CDCl₃
Molécula: HETCOR
Fecha: 20/02/2012

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

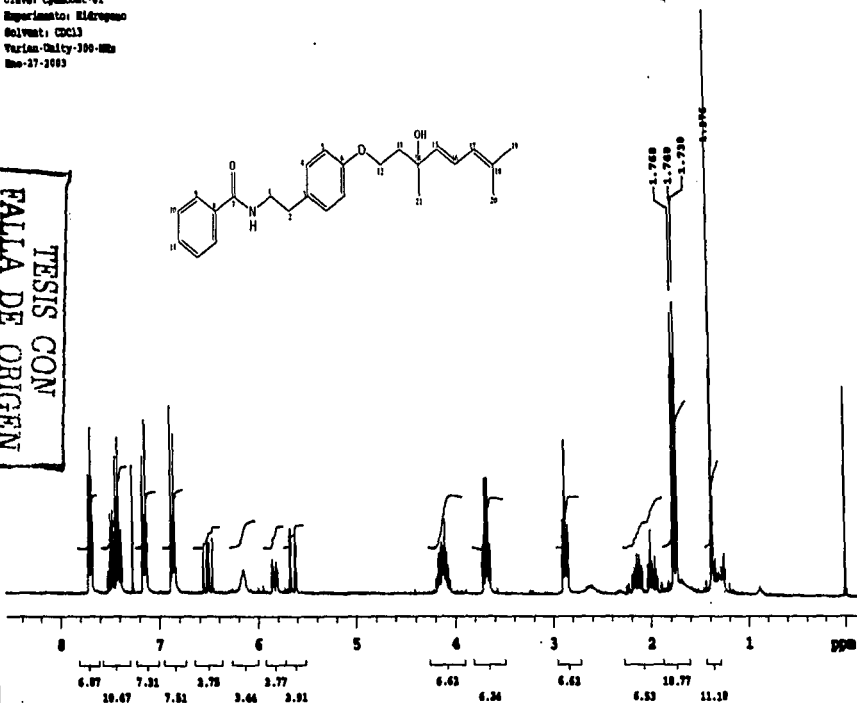


Espectro 24. Espectro de HETCOR de tetrapubesamida A.

Instituto de Química, UNAM MX
 Dr. Mariano Ruiz / B-Gonzales
 Clave: CQ1602-61
 Experimento: Eléctropeso
 Solvent: CDCl3
 Varian-Galcy-100-MHz
 Mo-27-2083

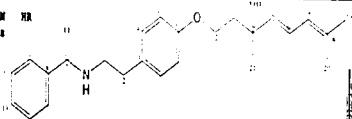


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

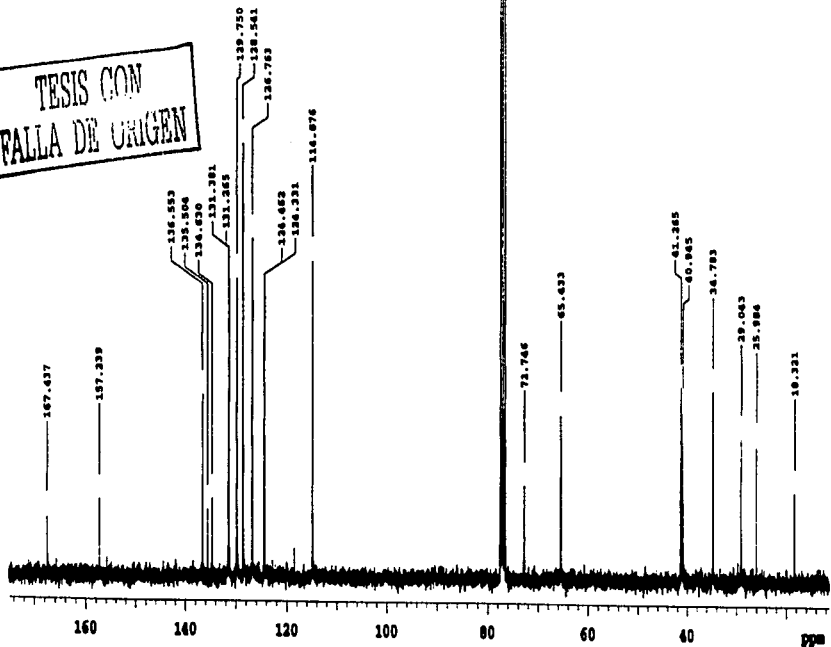


Espectro 25. Espectro de RMN-¹H de pubesamida C.

Instituto de Química, UNAM HR
Dr. Mariano Hita/ M-Gonzales
clave: CPhAcOHC-61
Experimento: Carbono-13
Solvent: CCl₄
Varian-Unity-75 MHz (6)
Ese-37-2093



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

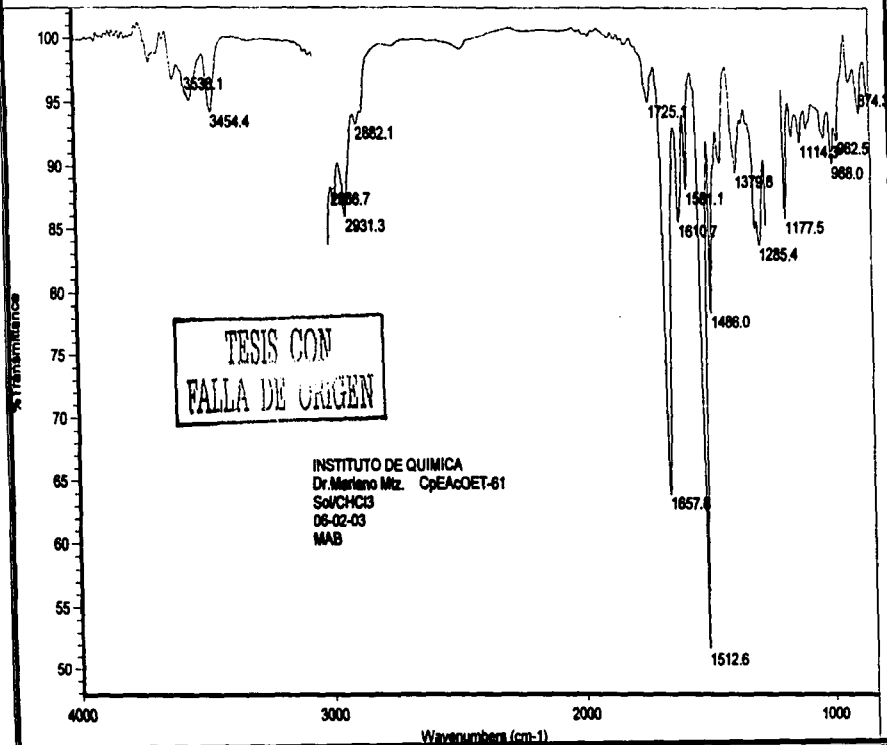


Espectro 26. Espectro de RMN-¹³C de pubesamida C.



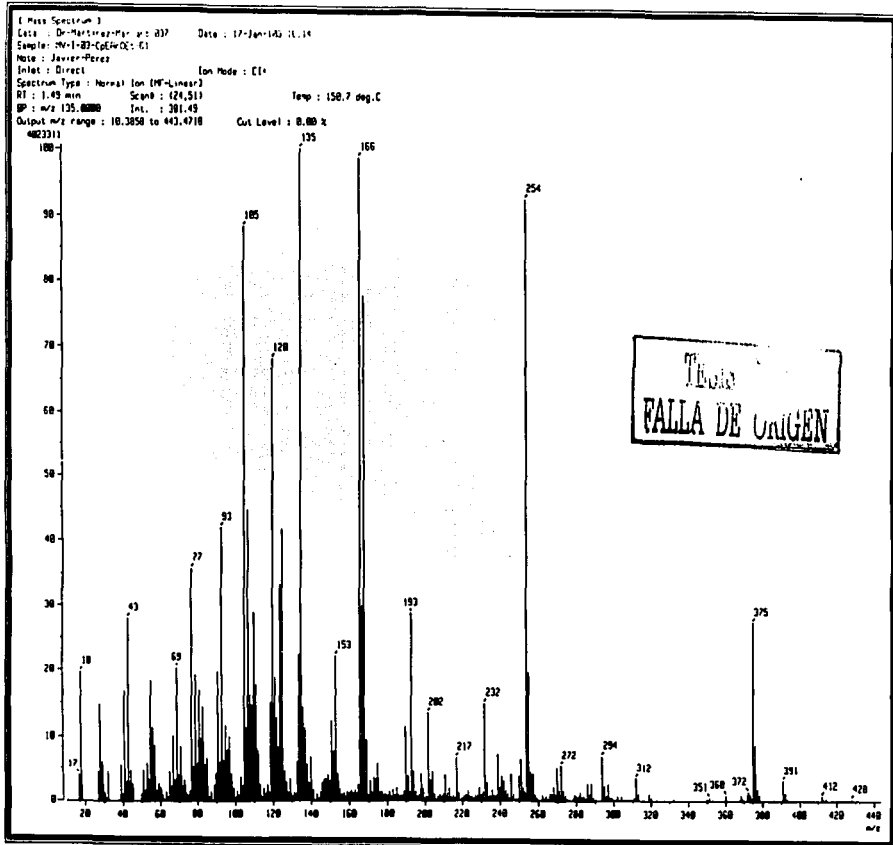
Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo



Espectro 27. Espectro de IR de pubesamida C.

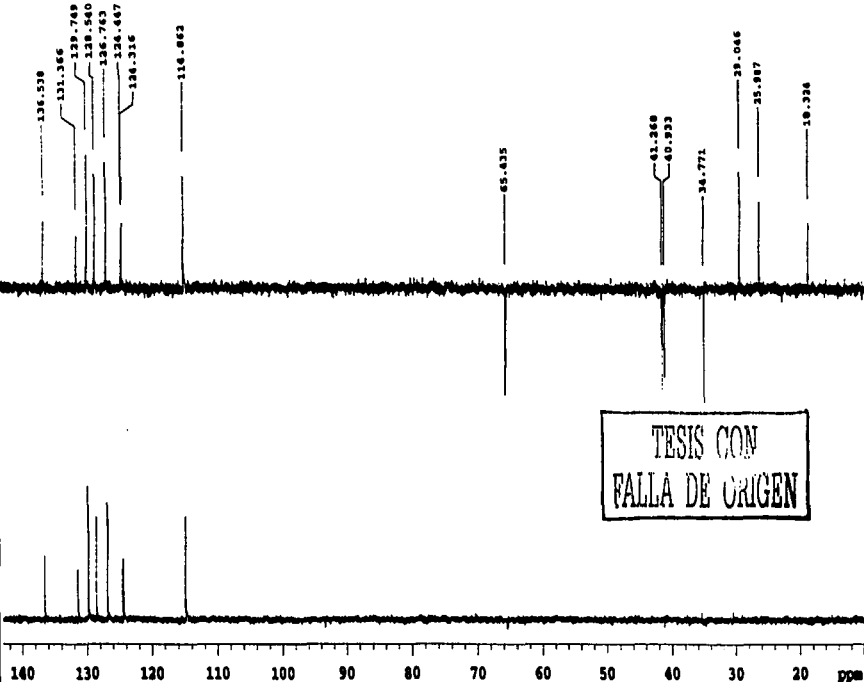
170



Espectro 28. Espectro de EM-IE de pubesamida C.

171

Instituto de Química, UNAM ER
Dr. Mariano-Rta/ N-Gocceles
Clave: CyMACOR-61
experimento: DEPT
Varian Unity 75 MHz (4)
Ene-27-2003

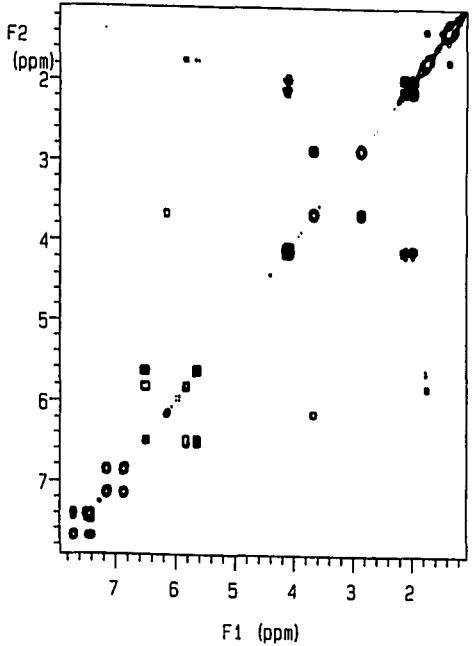
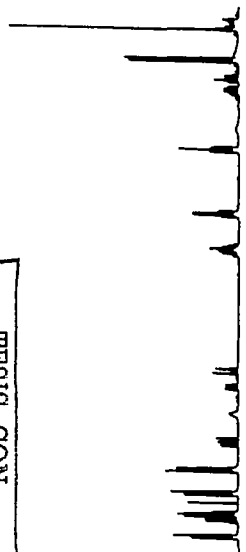


Espectro 29. Espectro de DEPT de pubesamida C.

172

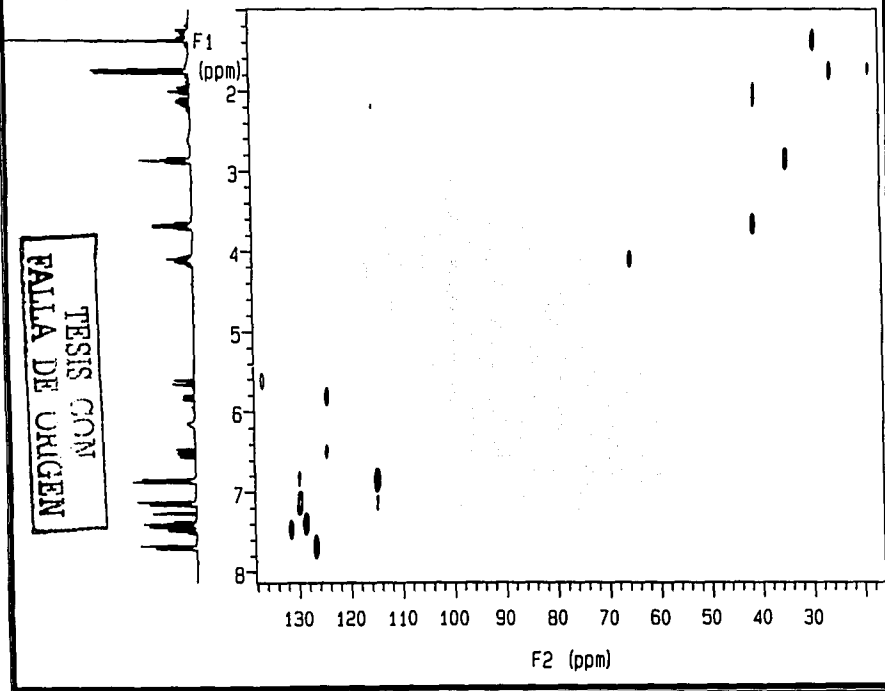
Instituto de Quimica UNAM HR
Dr- Mariano-Mtz / N-Gonzalez
Clave: CpEAcDEt-61
Experimento: COSY
Solvent: COC13
Version-Unity-300-MHz
Ene-27-2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 30. Espectro de COSY de pubesamida C.

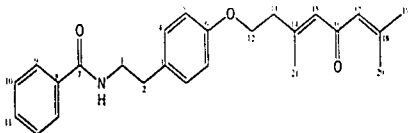
Instituto de Química UNAM
Dr-Mariano-Mtz/ N-Gonzalez
clave: CDAcOEt-61
Experimento: Hetcor
Solvent: CDCl3
Varian-Unity-75 MHz (4)
Ene-27-2003



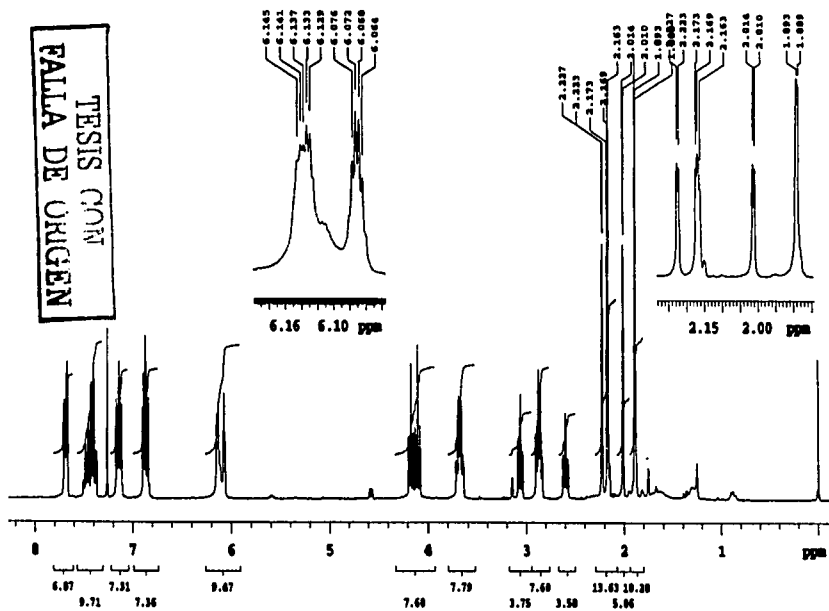
174

Espectro 31. Espectro de HETCOR de pubesamida C.

Dr. Mariano-Usa Cp8A75 hr
 Experimento: H1
 Solvent: CCL₄
 VARIAN-UNITY 300 Mc

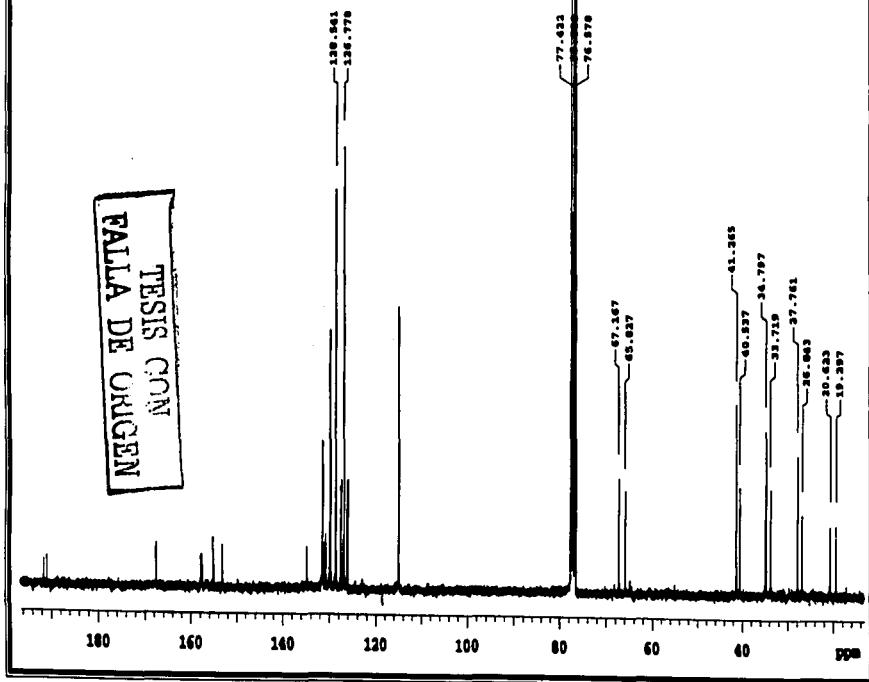
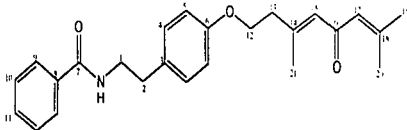


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Espectro 32. Espectro de RMN-1H de pubesamida B.

Dr-Mariño-Mta Cp8475 hr
Experimento: C13
Solvent: CDCl3
Varian-DMT77 75 MHz



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

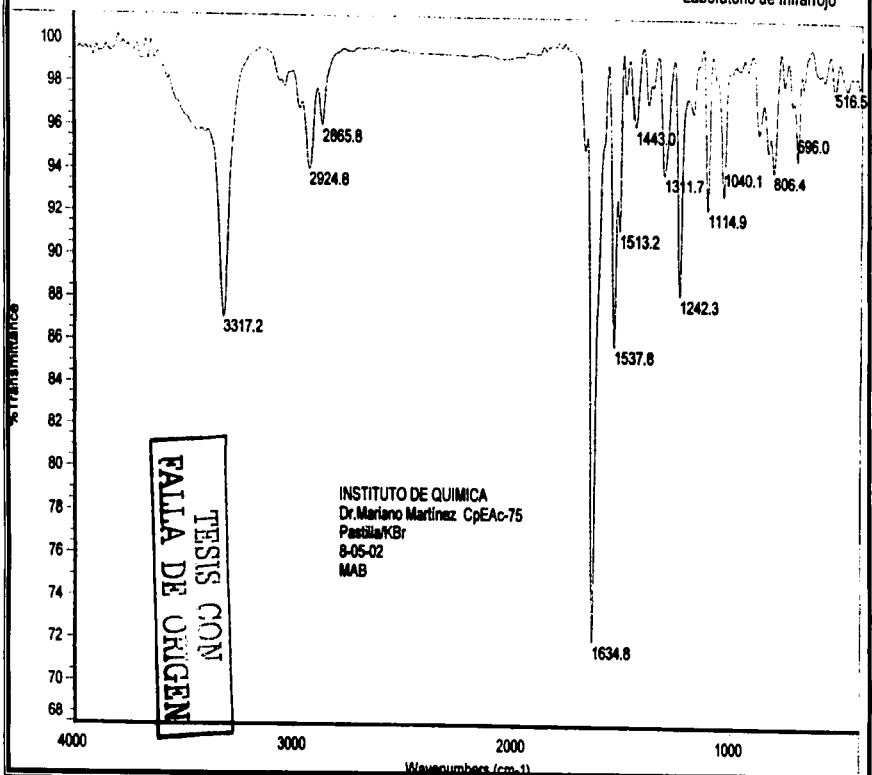
Espectro 33. Espectro de RMN-¹³C de pubesamida B.

176



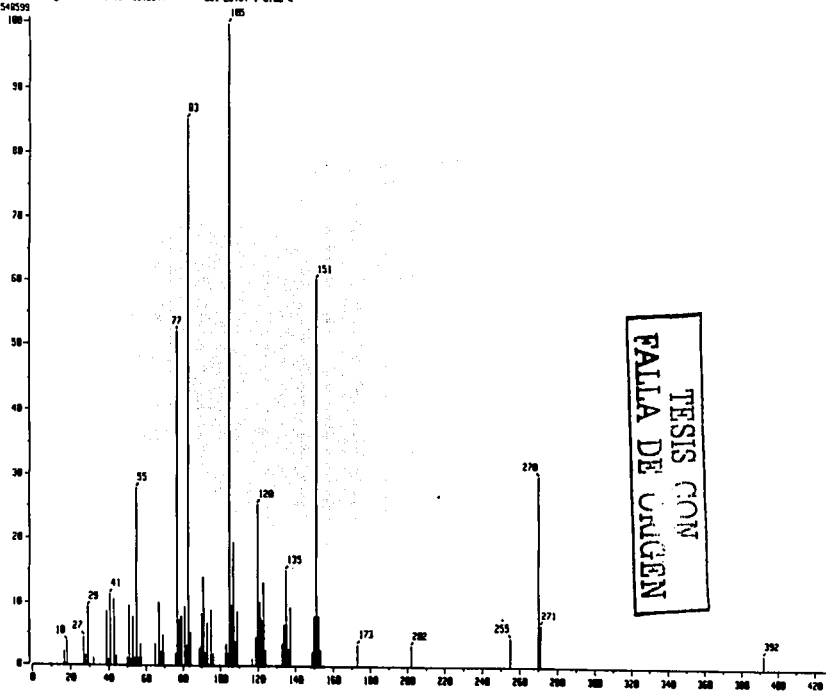
Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo



Espectro 34. Espectro de IR de pubesamida B.

[Mass Spectrum]
Date : D-Martinez-Mariano-064 Date : 29-Jan-02 12:55
Sample : QJCR-75
Note : -
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [W-Linear]
RT : 1.48 min Scan : (29,71)-(21,29) Temp : 185.3 deg.C
BP : m/z 185.0000 Int. : 52.82
Output m/z range : 0.0000 to 433.2344 Cut Level : 0.00 %

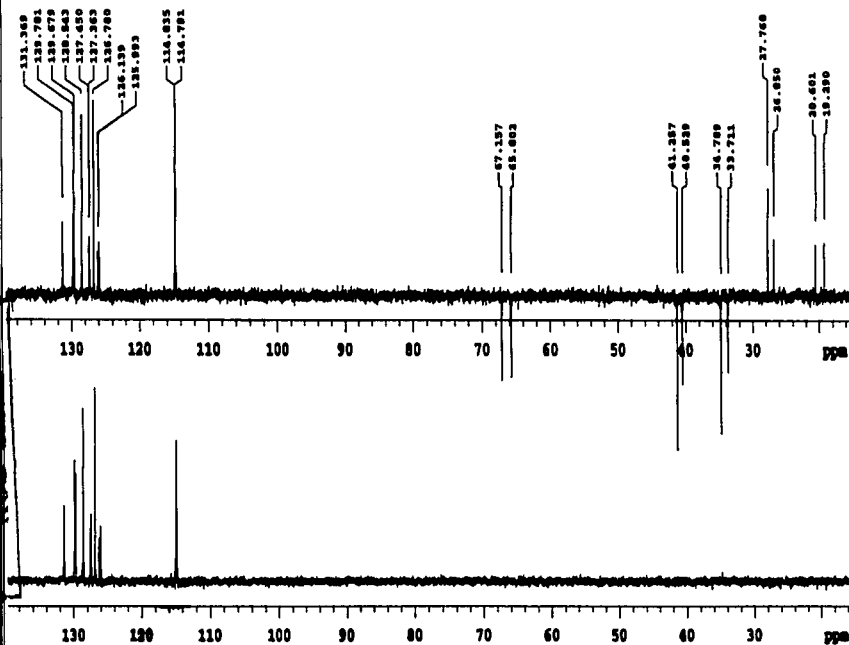


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 35. Espectro de EM-IE de pubesamida B.

178

Dr. Mariano-Hts Cp2A75 hr
experimento: DEPT

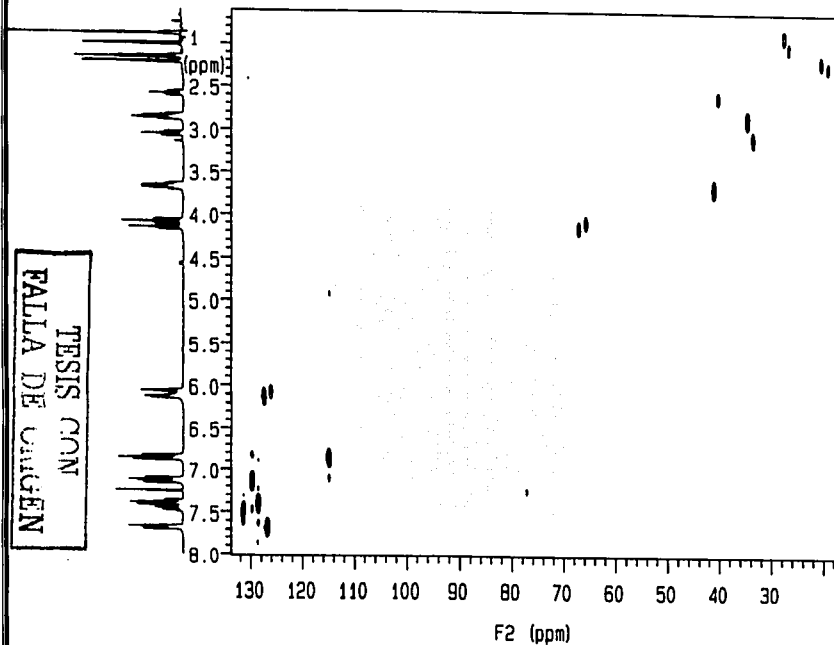


FALLA DE ORIGEN

TESIS CON

Espectro 36. Espectro DEPT de pubesamida B.

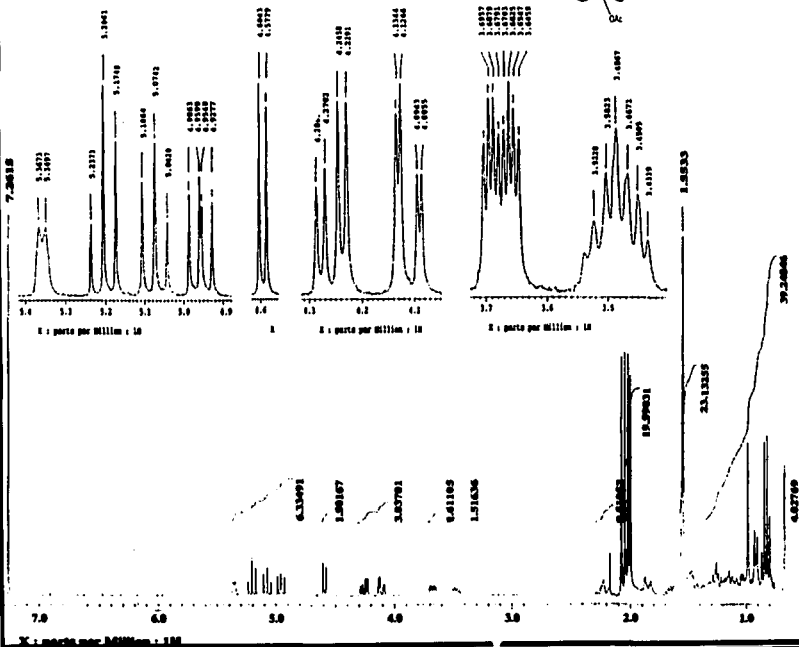
Dr-Mariano-Mtz CpE475 nr
Experimento: HETCOR



Espectro 38. Espectro de HETCOR de pubesamida B.

181

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM-ENHS
 Dr. Mariano Martínez/ Nadia O.
 Tave: CpEM-48-Acet
 Solvente: CDCl₃
 Integración: 1
 Eclipse 300 MHz Jeol (S)
 1-XI-02



TESIS CONT
 FALLA DE CONTEN

Espectro 39. Espectro de RMN-¹H de tetra-acetilcholesterol.

182