

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO QUIMICO BIODIRIGIDO DE LA
RAIZ DE *Karwinskia parvifolia*

Por

GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica

Octubre, 1996

TM

QK495

.R45

B4

c.1



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO QUIMICO BIODIRIGIDO DE LA
RAIZ DE *Karwinskia parvifolia***

Por

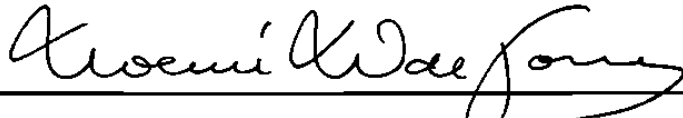
GLORIA ALEJANDRA BENAVIDES CORTEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica**

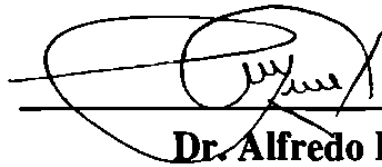
Octubre, 1996

**ESTUDIO QUIMICO BIODIRIGIDO DE LA
RAIZ DE *Karwinskia parvifolia***

Aprobación de la Tesis:



Dra. Noemí Waksman de Torres
Asesor de la Tesis



Dr. Alfredo Piñeyro López



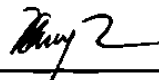
Dra. Myrthala Moreno Sepúlveda



Dra. Julia Verde Star



M.C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos



Dra. med. Ma. Esthela Morales Pérez
Secretario Académico del Area Básica
Subdirección de Estudios de Posgrado



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Noemi Waksman de Torres

Con todo respeto, admiración y cariño, por creer en mí e impulsarme a realizar la maestría.

Al Dr. Alfredo Piñeyro López

Con admiración y respeto por su disponibilidad y apoyo brindado en la realización de esta tesis en el Depto. de Farmacología y Toxicología.

A CONACYT

Por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.
Proyectos referencia 3122-M3906 y F 512-N0306.

A el comité evaluador de Tesis

Por su tiempo y sugerencias en la realización de esta tesis.

A Rosalba, Vero, Lucy, Ivonne y Adolfo

Con todo mí cariño, por que siempre que necesite de ayuda se daban tiempo.

A mis Padres

Con amor, por el apoyo y libertad que siempre me han dado para realizar todo aquello que he querido.

INDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL.	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS.	16
CAPITULO 2. MATERIAL Y METODO	17
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.	17
2.1.1. CLASIFICACION TAXONOMICA DE <i>K. parvifolia</i>.	17
2.2. MATERIAL Y EQUIPO.	19
2.3. METODOS.	22
2.3.1. EXTRACCION DE LA RAIZ DE <i>K. parvifolia</i>.	22
2.3.2. PREVALORACION BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE <i>Artemia salina</i>.	22
2.3.3. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS.	23
2.3.3.1. Aislamiento a partir del extracto obtenido del éter de petróleo.	23
2.3.3.2. Aislamiento a partir del extracto de acetato de etilo.	23
2.3.4. DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS DE INTERES.	28
2.3.5. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA.	28
2.3.6. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	28
2.3.6.1. Bioensayo de letalidad de larvas de <i>Artemia salina</i>.	28
2.3.6.2. Determinación de la actividad de los compuestos sobre la catalasa.	29
CAPITULO 3. RESULTADOS	31
3.1. EXTRACCION DE LA RAIZ DE <i>K. parvifolia</i>.	31
3.2. PREVALORACION BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE <i>Artemia salina</i>.	31
3.3. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EEP.	33
3.3.1. COMPUESTO A.	33
3.3.1.1. Determinación de la pureza.	33
3.3.1.2. Elucidación de la estructura.	33
3.3.2. COMPUESTO B.	51
3.3.2.1. Determinación de la pureza.	51

3.3.2.2. Elucidación de la estructura.	51
3.3.3. COMPUESTO E.	67
3.3.3.1. Determinación de la pureza.	67
3.4. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EA_cOEt.	67
3.4.1. COMPUESTO G.	67
3.4.1.1. Determinación de la pureza.	67
3.4.1.2. Elucidación de la estructura.	70
3.4.2. COMPUESTO H1.	70
3.4.2.1. Determinación de la pureza.	70
3.4.2.2. Elucidación de la estructura.	70
3.4.3. COMPUESTO H2.	86
3.4.3.1. Determinación de la pureza.	86
3.4.3.2. Elucidación de la estructura.	86
3.5. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	99
3.5.1. BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE <i>Artemia salina</i> .	99
3.5.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA CATALASA.	99
 CAPITULO 4. DISCUSION	 100
 4.1. OBTENCION Y PREVALORACION DE LOS EXTRACTOS.	 100
4.2. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EEP.	100
4.2.1. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO A.	101
4.2.2. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO B.	103
4.3. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EA _c OEt.	104
4.3.1. VERIFICACION DE LA IDENTIDAD DEL COMPUESTO G.	104
4.3.2. ELUCIDACION DE LOS COMPUESTOS H1 Y H2.	105
4.4. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA CATALASA.	107
4.4.1. BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE <i>Artemia salina</i> .	107
4.4.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA CATALASA.	108
 CONCLUSIONES.	 110
RECOMENDACIONES.	111
APENDICE.	112
REFERENCIAS.	114

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Toxinas aisladas del fruto de <i>K. humboldtiana</i> por Dreyer en 1975.	2
Fig. 2.	Distribución geográfica de <i>K. parvifolia</i> .	6
Fig. 3.	Karwinskiona, Eieuterogonzalona, baicaleina y quercetina aisladas por Domínguez en 1975.	7
Fig. 4.	Karwinaftol A, B y 2-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol. Mitscher y cols. 1985.	9
Fig. 5.	Compuestos 1 y 2 aislados por Fernández y cols. 1993.	10
Fig. 6.	Compuestos 3 y 4 aislados por Fernández y cols. 1995.	10
Fig. 7.	Cromatograma de la T544.	14
Fig. 8.	<i>K. parvifolia</i> . Fernández Nava.	18
Fig. 9.	Cromatogramas en CLAR (programa 3b). a) EEP, b) EAcOEt, c) EM.	32
Fig. 10.	Cromatograma del compuesto A en CLAR (programa 3a).	34
Fig. 11.	Espectro UV-Visible del compuesto A.	35
Fig. 12.	Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto A.	36
Fig. 13.	Espectro ^1H RMN del compuesto A (0-13 ppm).	37
Fig. 14.	Espectro ^1H RMN del compuesto A (0-5 ppm).	38
Fig. 15.	Espectro ^1H RMN del compuesto A (5.0-8.0 ppm).	39
Fig. 16.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto A (2.10-2.40 ppm).	40
Fig. 17.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto A (3.60-3.90 ppm).	41
Fig. 18.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto A (5.10-5.35 ppm).	42
Fig. 19.	Espectro ^{13}C RMN del compuesto A (0-200 ppm).	43
Fig. 20.	Ampliación del espectro ^{13}C RMN del compuesto A (110-165 ppm).	44
Fig. 21.	Espectro DEPT 135 del compuesto A.	45
Fig. 22.	Espectro COSY del compuesto A (0-8 ppm).	46
Fig. 23.	Espectro COSY del compuesto A (0.0-5.7 ppm).	47
Fig. 24.	Espectro COSY del compuesto A (6.0-8.5 ppm).	48
Fig. 25.	Espectro HMQC del compuesto A.	49
Fig. 26.	Compuesto A.	50
Fig. 27.	Cromatograma del compuesto B en CLAR (programa 3a).	52

Fig. 28.	Espectro UV-Visible del compuesto B.	53
Fig. 29.	Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto B.	54
Fig. 30.	Espectro ^1H RMN del compuesto B (0-13 ppm).	55
Fig. 31.	Espectro ^1H RMN del compuesto B (0.0-4.5 ppm).	56
Fig. 32.	Espectro ^1H RMN del compuesto B (4.5-8.5 ppm).	57
Fig. 33.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto B (2.1-2.7 ppm).	58
Fig. 34.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto B (3.5-4.2 ppm).	59
Fig. 35.	Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto B (5.0-5.5 ppm).	60
Fig. 36.	Espectro ^{13}C RMN del compuesto B (0-200 ppm).	61
Fig. 37.	Espectro DEPT 135 del compuesto B.	62
Fig. 38.	Espectro COSY del compuesto B (0-8 ppm).	63
Fig. 39.	Espectro COSY del compuesto B (0.0-5.5 ppm).	64
Fig. 40.	Espectro COSY del compuesto B (6.0-8.4 ppm).	65
Fig. 41.	Compuesto B.	66
Fig. 42.	Cromatograma del compuesto E en CLAR (programa 3a).	68
Fig. 43.	Cromatogramas del compuesto G y estandar T516 Recuadro con espectros sobrepuestos.	69
Fig. 44.	Espectro ^1H RMN del compuesto G.	71
Fig. 45.	Compuesto G.	72
Fig. 46.	Cromatogramas en CLAR (programa 3b). a) Compuesto H1, b) Mezcla H, c) Compuesto H2	73
Fig. 47.	Espectro UV-Visible del compuesto H1.	74
Fig. 48.	Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto H1.	75
Fig. 49.	Espectro ^1H RMN del compuesto H1 (0-17 ppm).	76
Fig. 50.	Espectro ^1H RMN del compuesto H1 (0.0-4.5 ppm).	77
Fig. 51.	Espectro ^1H RMN del compuesto H1 (4.5-8.0 ppm).	78
Fig. 52.	Espectro ^{13}C RMN del compuesto H1 (0-205 ppm).	79
Fig. 53.	Ampliación del espectro ^{13}C RMN del compuesto H1 (90-170 ppm).	80
Fig. 54.	Espectro DEPT 135 del compuesto H1.	81
Fig. 55.	Espectro COSY del compuesto H1 (0-8 ppm).	82
Fig. 56.	Espectro COSY del compuesto A (0.0-5.5 ppm).	83
Fig. 57.	Espectro COSY del compuesto H1 (5.5-8.0 ppm).	84
Fig. 58.	Compuesto H1.	85
Fig. 59.	Espectro UV-Visible del compuesto H2.	87

Fig. 60.	Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto H2.	88
Fig. 61.	Espectro ^1H RMN del compuesto H2 (0-17 ppm).	89
Fig. 62.	Espectro ^1H RMN del compuesto H2 (0.0-5.5 ppm).	90
Fig. 63.	Espectro ^1H RMN del compuesto H2 (5.5-8.0 ppm).	91
Fig. 64.	Espectro ^{13}C RMN del compuesto H2 (0-210 ppm).	92
Fig. 65.	Ampliación del espectro ^{13}C RMN del compuesto H2 (90-170 ppm).	93
Fig. 66.	Espectro COSY del compuesto H2 (0-8 ppm).	94
Fig. 67.	Espectro COSY del compuesto H2 (0.0-5.5 ppm).	95
Fig. 68.	Espectro COSY del compuesto H2 (5.5-7.7 ppm).	96
Fig. 69.	Espectro HMQC del compuesto H2.	97
Fig. 70.	Compuesto H2.	98

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Letalidad obtenida con diferentes especies de <i>Karwinskia</i> .	5
Tabla 2. Compuestos que producen el 50% de inhibición en la actividad de la catalasa	14

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Estudio químico preliminar.	11
Diagrama 2. Extracción de los componentes de la raíz.	25
Diagrama 3. Aislamiento de compuestos del extracto etéreo.	26
Diagrama 4. Aislamiento de compuestos del extracto de acetato de etilo.	27

ABREVIATURAS

C	Carbono
°C	Grados Centígrados
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCP	Cromatografía en Capa Preparativa
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono Trece
DEPT	Distorsionless Enhancement Polarization Transfer
DI ₅₀	Dosis Inhibitoria Media
DL ₅₀	Dosis Letal Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAcOEt	Extracto de acetato de etilo
EEP	Extracto de éter de petróleo
EM	Extracto de metanol
ENCB	Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
EUA	Estados Unidos de América
FAB	Fast Atom Bombardment
fig.	Figura
g	Gramo
H	Hidrógeno
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Hz	Hertz
IPN	Instituto Politécnico Nacional
J	Constante de acoplamiento

Kg	Kilogramo
L	Litro
m	Metro
m/e	Relación masa-carga
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min.	Minutos
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nm	Nanómetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
O	Oxígeno
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso Molecular
ppm	Partes por millón
R_f	Razón de velocidad de flujo de la muestra con respecto al eluente
T	Toxina
t_R	Tiempo de retención
U/mL	Unidades por mililitro
UV-Visible	Ultravioleta Visible
v/v	Relación volumen sobre volumen

CAPITULO 1

INTRODUCCION

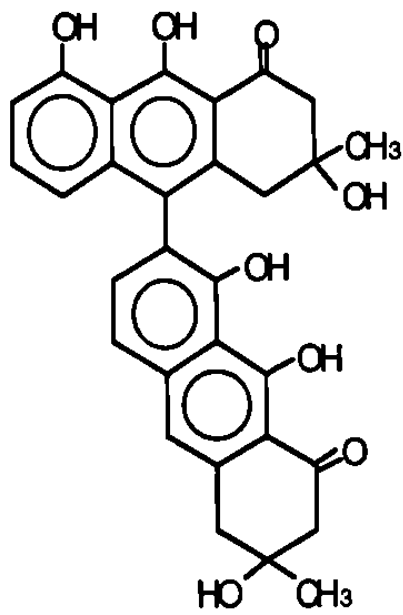
El género *Karwinskia*, perteneciente al orden de las Rhamnaceas, incluye diversas especies de árboles y arbustos cuya habitat natural se extiende desde el sur de los EUA a México, Centroamérica, norte de Colombia, Cuba, Haití y República Dominicana. En México se han encontrado hasta el momento 11 de estas especies⁽¹⁾.

La especie más conocida es la *K. humboldtiana*. Los efectos tóxicos de esta planta se conocen desde hace muchos años^(2,3,4,5,6).

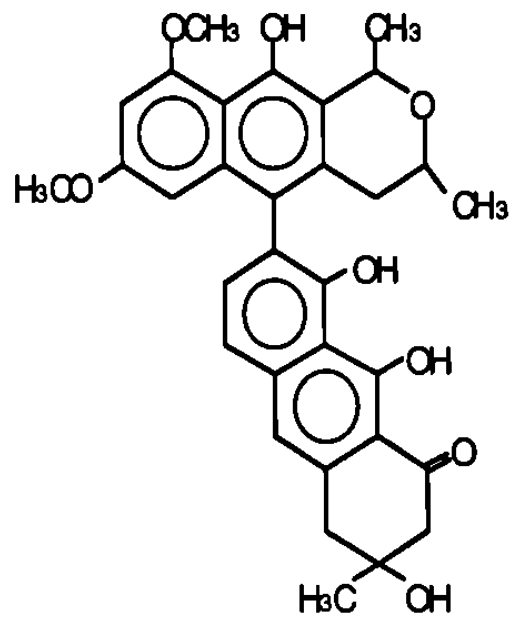
En el siglo XVIII Francisco J. Clavijero había ya registrado los efectos tóxicos y de fatales consecuencias que se tienen al ingerir frutos de *K. humboldtiana*⁽²⁾. Pero no es hasta mediados de los sesentas y principios de los setentas de este siglo cuando los químicos y toxicólogos, principalmente norteamericanos, se interesan por realizar estudios más profundos en plantas del género *Karwinskia*, particularmente *K. humboldtiana*.

Shaver en 1966 estableció que el componente neurotóxico se encuentra contenido en un polvo amarillento, lo cual fue confirmado por Kim y Camp en 1972⁽³⁾.

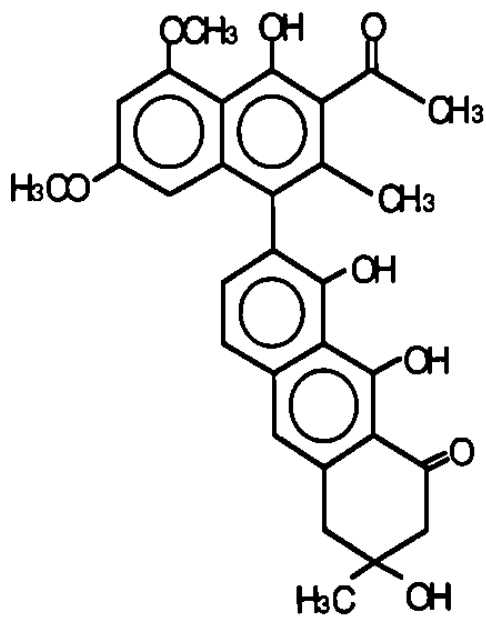
En 1975 Dreyer y cols. aislaron e identificaron 4 sustancias tóxicas en las semillas, a las cuales se les llamó T514, T544, T516 y T496 (fig. 1), de acuerdo a su peso molecular y químicamente las identificaron como antracenonas diméricas⁽⁴⁾.



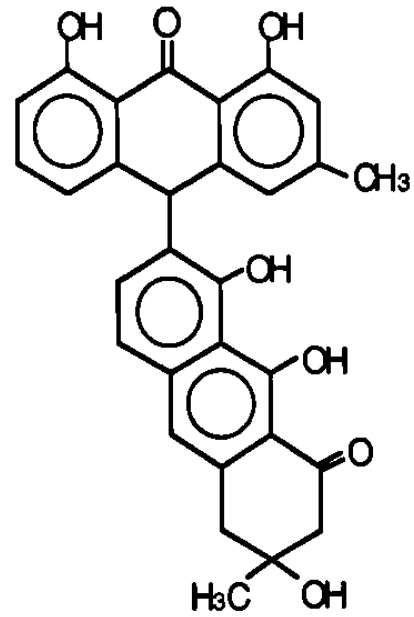
T 514



T 544



T 516



T 496

Fig. 1 Toxinas aisladas del fruto de *K. humboldtiana* por Dreyer en 1975.

Estas toxinas han sido consideradas como neurotoxinas, pero también existen reportes de lesiones extraneurales producidas por el fruto, las cuales consisten en necrosis miocárdial, degeneración grasa y necrosis del hígado⁽⁵⁾, así como hemorragia pulmonar⁽⁶⁾.

En el año de 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la UANL, se inició una línea de investigación, tendiente a aislar estos productos biológicamente activos, a partir del fruto de *K. humboldtiana*⁽⁷⁾. También se realizaron estudios “in vivo” de intoxicación aguda en diferentes especies de animales tanto con el fruto molido como con las toxinas purificadas de esta planta; de los cuales se demostró que la T544 (Tullidinol) es la responsable de la neurotoxicidad^(8,9). La toxina produce desmielinización y degeneración axonal principalmente en los sitios motores⁽¹⁰⁾. Las células de Schwann y axones son los sitios blanco del tullidinol⁽¹¹⁾.

Entre las sustancias antes mencionadas la llamada T514 o Peroxisomicina A1, resultó ser un producto de interés farmacológico, pues Piñeyro y cols. demostraron que presenta citotoxicidad selectiva “in vitro” entre células malignas y benignas de origen humano⁽¹²⁾; ello ha motivado que en los últimos años se hayan intensificado los estudios tendientes a establecer su posible uso como agente antineoplásico y se solicitó una patente, la cual ya fue otorgada⁽¹³⁾. Aún y cuando no se conoce su mecanismo de acción, se demostró que afecta selectiva e irreversiblemente los peroxisomas de células de levaduras⁽¹⁴⁾; además es un inhibidor “in vitro” no competitivo de la catalasa, enzima de origen exclusivamente peroxisomal⁽¹⁵⁾.

En base a lo anterior surgió el interés en el Departamento de Farmacología y Toxicología de obtener sustancias estructuralmente similares a la Peroxisomicina, realizando para ello estudios químicos y toxicológicos de otras especies del género *Karwinskia*, con los cuales se comprobó la presencia de las antracenas diméricas antes citadas. La

toxicidad hacia animales de experimentación fue una característica común a todos los frutos estudiados (Tabla 1)⁽¹⁶⁾. De los resultados de estos estudios se decidió analizar más profundamente varias de las especies, entre ellas la *K. parvifolia*, que resultó ser de las especies más tóxicas. Su nombre común es cacachila; su distribución geográfica es en los estados de Sinaloa y Sonora (fig. 2). Standley (1923), cita a *K. parvifolia* como sinónimo de *K. humboldtiana*; sin embargo, la primera se diferencia claramente de la segunda por tener hojas, sépalos, pétalos y frutos mucho más pequeños⁽¹⁾. En estudios realizados con los frutos de *K. parvifolia* se encontraron como componentes principales T514 (Peroxisomicina A1), T496 y un diastereoisómero de la T514 (Peroxisomicina A2)⁽¹⁷⁾. Recientemente V. Rivas en su tesis de grado de Maestría en Ciencias, aisló e identificó como componentes minoritarios, otro diastereoisómero de la T514 (Peroxisomicina A3), un isómero de posición de la T514 (Peroxisomicina B1) y la T516⁽¹⁸⁾. Esta planta resultó ser, además, una matriz mucho mejor que la *K. humboldtiana* para la extracción de la peroxisomicina A1 por lo cual actualmente se aísla esta sustancia de los frutos de *K. parvifolia*⁽¹⁹⁾.

Hasta el momento, existen varios estudios sobre la parte aérea del género *Karwinskia*, principalmente sobre los frutos de *K. humboldtiana* y *K. parvifolia*. Pero poco se sabe de la parte subterránea de estas especies. Existe un reporte en la literatura, donde se menciona que el cocimiento de la raíz de la Tullidora (*K. humboldtiana*), es el contraveneno para los efectos del fruto de la misma planta, si se administra luego de que se presente la parálisis⁽²⁰⁾. Domínguez en 1975, encontró que los extractos acuosos de la raíz de *K. humboldtiana*, son neurotóxicos a los ratones, provocando la muerte de éstos en forma igual a la producida por el fruto y no actúan de antídoto. Lo anterior se comprendió al aislar de estos extractos 2 de los compuestos neurotóxicos que lleva el fruto. Se consiguió extraer, aislar e identificar los compuestos neurotóxicos, a los cuales el Dr. Domínguez les llamó Karwinskiona (T544) y Eleuterogonzalona (T516); se obtuvieron también la flavona baicaleína y el flavonol quercetina, además de otros 2 flavonoides no identificados (fig. 3)⁽²¹⁾.

TABLA 1. LETALIDAD OBTENIDA CON DIFERENTES ESPECIES DE KARWINSKIA.

ESPECIES	2.5 g/Kg peso	
	% LETALIDAD	muerte/días
<i>K. humboldtiana</i>	100.0	2
<i>K. mollis</i>	71.4	2-5
<i>K. umbellata</i>	85.7	2-6
<i>K. subcordata</i>	14.3	2-4
<i>K. latifolia</i>	0.0	30
<i>K. parvifolia</i>	100.0	2-6
<i>K. calderonii</i>	21.4	4-11
<i>K. rzedowskii</i>	28.5	8-14
<i>K. venturensii</i>	0.0	30
<i>K. tehuacana</i>	28.5	8-21
<i>K. johnstonii</i>	100.0	1-2

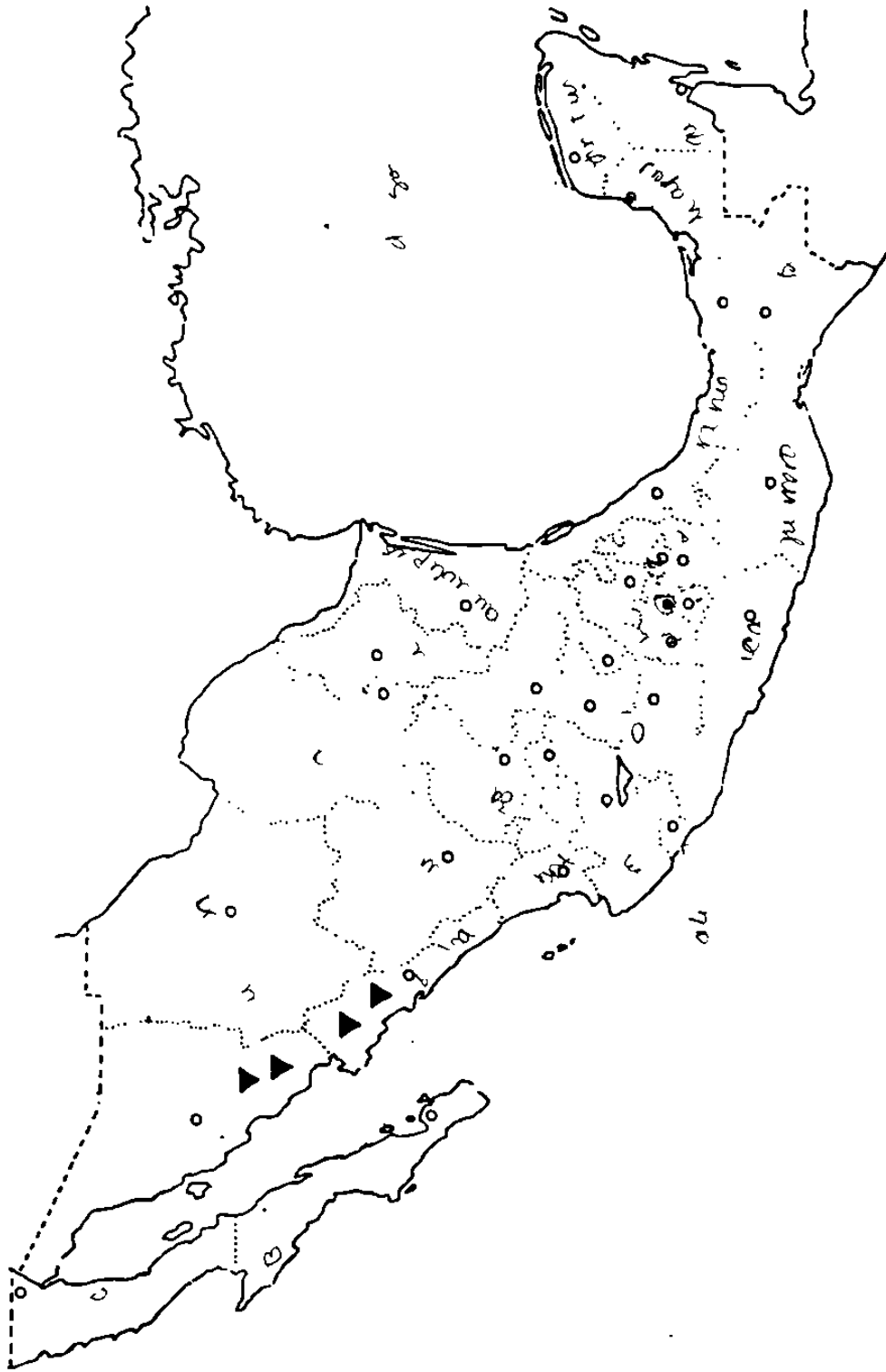
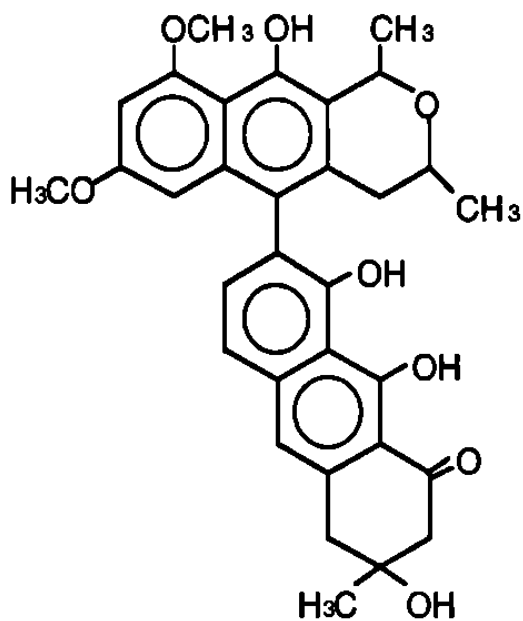
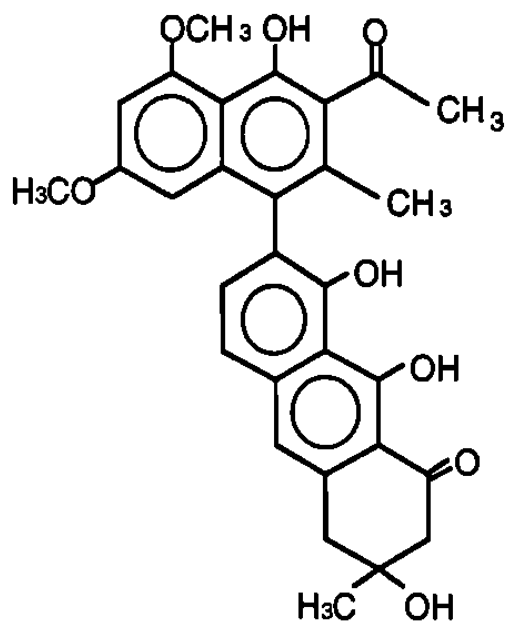


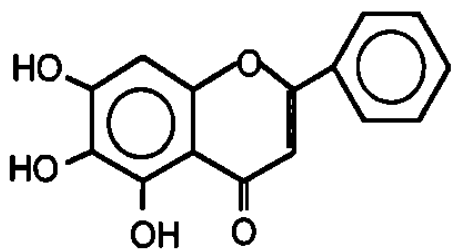
Fig. 2. Distribución geográfica de la *K. parvifolia* (▼).



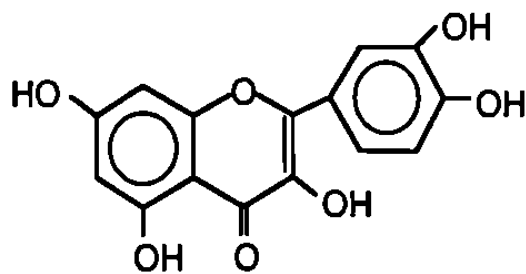
**Karwinskiona
(T544)**



**Eleuterogonzalona
(T516)**



Baicaleina



Quercetina

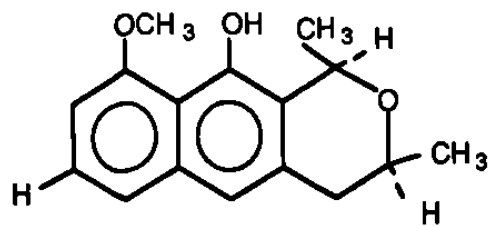
Fig. 3. Karwinskiona, Eleuterogonzalona, baicaleína y quercetina aisladas por Domínguez en 1975.

En otro estudio que se realizó en la raíz de *K. humboldtiana* en 1985 en la Universidad de Kansas, los investigadores aislaron de la raíz (la cual fue extraída con CH₂Cl₂ y 95% de etanol en Soxhlet) tres constituyentes activos: Karwinaftol A, Karwinaftol B y 2-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol (fig. 4); los dos dimetilbenzofuranos presentaron actividad antimicrobiana⁽²²⁾.

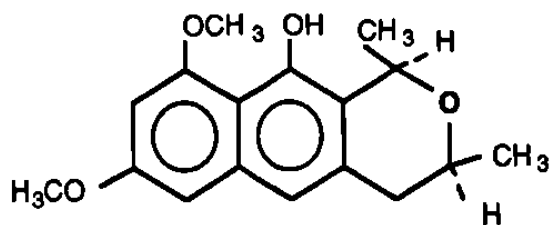
En 1993 investigadores de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, realizaron un Estudio Químico de la Raíz de tres plantas del Género *Karwinskia*. De los extractos realizados con CH₂Cl₂ sobre *K. umbellata*, *K. subcordata* y *K. humboldtiana*, aislaron como componente mayoritario el compuesto 1, el análogo C-7' desmetoxilado de la neurotoxina 2 (T544) (fig. 5). El aislamiento de 1 de la raíz de *K. humboldtiana* no había sido descrito, mientras que para las otras 2 especies no existen estudios previos⁽¹⁶⁾. Recientemente este mismo grupo, publicó un artículo en el cual, además de las tres especies estudiadas, incluyeron a *K. mollis* y *K. johnstonii*, para reportar la relación de compuestos 1 y 2 en las cinco especies de *Karwinskia*. Además aislaron 2 antraquinonas, 3 y 4 (fig 6)⁽²⁴⁾.

En el año de 1993, en el departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, Waksman y cols. realizaron un estudio químico preliminar de hojas, tallo y raíz de *K. humboldtiana* y *K. parvifolia*, con el propósito de conocer la composición de las distintas partes de las plantas en estudio, señalar cambios importantes en los metabolitos secundarios durante los distintos meses del año e identificar posibles fuentes alternas de peroxisomicina u otras antracenas estructuralmente relacionadas con ella. Ellos escogieron estas dos plantas por ser las más estudiadas y porque se cuenta con un vivero donde ambas crecen bajo las mismas condiciones.

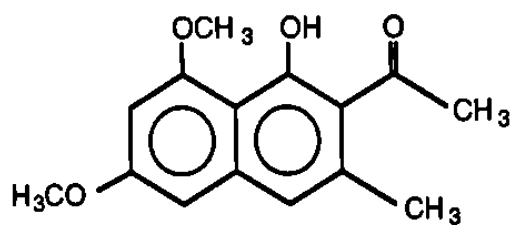
El análisis se realizó dentro de los 15 días siguientes a la recolección y la metodología utilizada se muestra en el diagrama 1.



Karwinaftol A



Karwinaftol B



2-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol

Fig. 4. Karwinaftol A, B y 2-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol. Mitscher y cols. 1985.

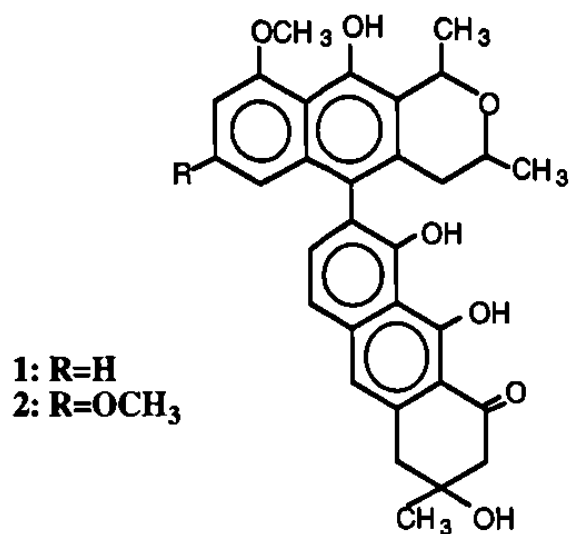


Fig. 5. Compuestos 1 y 2 aislados por Fernández y cols. 1993.

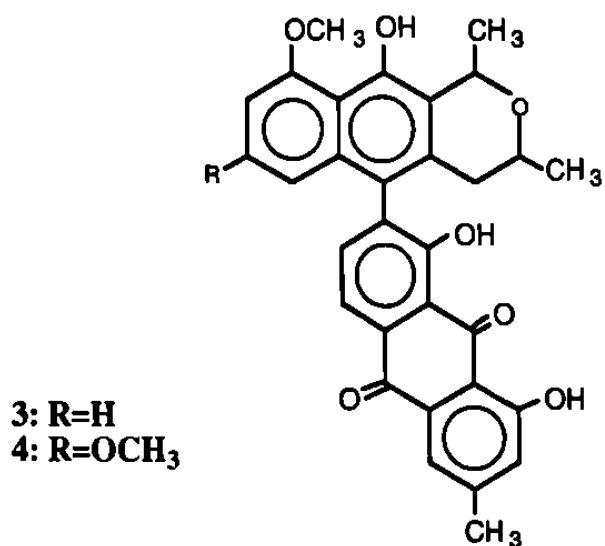


Fig. 6. Compuestos 3 y 4 aislados por Fernández y cols. 1995.

En el análisis de hojas, tallos y raíces de las plantas de *K. parvifolia* recolectadas en la misma fecha se encontró un patrón cromatográfico constante entre ellas; así mismo, dicho patrón fue repetitivo a lo largo de los distintos meses de estudio.

Además los resultados que arrojaron las raíces examinadas fueron los siguientes:

- Un producto con t_R idéntico a la peroxisomicina; sin embargo el análisis espectral, así como la cocromatografía, permitieron afirmar que se trata de otro compuesto que posiblemente debe tener mucha semejanza estructural con la T514.
- En las raíces de ambas especies se encontró como componente principal un compuesto, que en CCF tenía el mismo R_f , color y características de fluorescencia de la T544 (se debe hacer notar que en los frutos de *K. parvifolia* la T544 está ausente). Cuando se analizaron los extractos de raíces por CLAR, se encontró que no se trataba de una sola sustancia, sino de una mezcla de entre 2 y 4 componentes con características espectrales idénticas entre sí, de los cuales no se conoce la identidad.

Es preciso aclarar que este mismo resultado obtuvo Rivas cuando al analizar por CLAR el compuesto, obtenido del extracto clorofórmico del fruto de *K. johnstonii* caracterizado por CCF como T544, observó 4 compuestos, y al analizar de la misma forma el estándar que se dispone de la T544, aislado originalmente por Dreyer de frutos de *K. humboldtiana*, se observó que no era una sustancia pura sino que también estaba formado por una mezcla de 4 compuestos, con las mismas características que presentaban los compuestos encontrados tanto en los frutos de *K. johnstonii* como en las raíces estudiadas (fig 7).

En vista de la ausencia de datos fitoquímicos sobre la raíz de la *K. parvifolia* y en base a nuestros resultados preliminares nos pareció interesante hacer un estudio químico de la misma y probar la actividad biológica de los metabolitos mediante el bioensayo de letalidad de larvas de

Artemia salina. Este bioensayo es un método preliminar para detectar la toxicidad de productos naturales. Es una técnica sencilla y rápida, fácilmente adaptable a los laboratorios convencionales, resultando ser una herramienta muy útil para seguir una ruta biodirigida en la separación de los extractos de productos naturales. Esto nos ayudaría a tener una idea de la actividad de los extractos, así como de los compuestos aislados, ya que se ha observado una correlación entre la toxicidad celular y la toxicidad que se presenta en este bioensayo^(25,26).

Además se plantea determinar la actividad de los compuestos sobre la catalasa. Como ya se mencionó en la página 3, la Peroxisomicina A1 es un inhibidor no competitivo de la catalasa; además se ha encontrado una estrecha relación entre estructura y grado de inhibición; las estructuras de tipo antracenónico presentan el mayor porcentaje de inhibición, habiéndose encontrado que los compuestos de tipo antraquinónico, como el crisofanol y la emodina, no inhiben la actividad de la catalasa, utilizándolos como control negativo (Tabla 2)⁽¹⁵⁾. La determinación de la actividad de catalasa se realiza actualmente en forma rutinaria como parte del control de calidad de la Peroxisomicina A1.

Con este trabajo se pretende conocer los principales componentes activos de la raíz de *K. parvifolia*, para en un futuro contribuir también a establecer una posible vía fisiológica de transformación de estos productos.

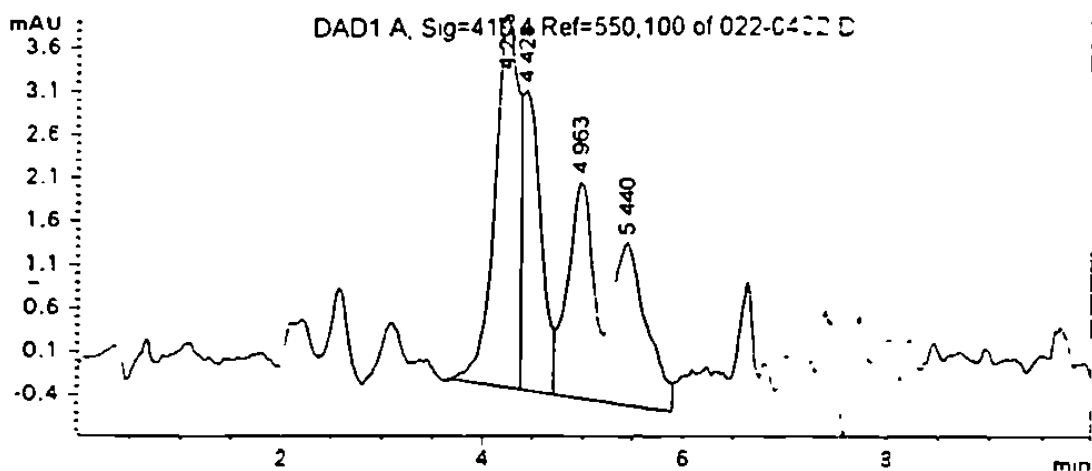


Fig. 7. Cromatograma de la T544.

TABLA 2. COMPUESTOS QUE PRODUCEN EL 50% DE INHIBICIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA.

COMPUESTO	ID50 (μM)
Peroxisomicina A1	3.34 ± 0.99
Peroxisomicina A2	3.64 ± 1.10
Flegmacina A1	6.27 ± 2.79
Flegmacina A2	8.65 ± 3.23
Peroxisomicina A3	9.07 ± 0.54
Peroxisomicina B1	17.59 ± 1.00
T544	40.08 ± 1.57
T516	69.77 ± 1.99
T496	99.50 ± 19.03
T510	120.00 ± 10.44
Aminotriazol	10000.00

OBJETIVO GENERAL

**Estudio fitoquímico y valoración biológica de
la raíz de *K. parvifolia*.**

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Extracción de los componentes de la raíz de *K. parvifolia*, con solventes no polares (éter de petróleo), poco polares (AcOEt) y polares (metanol).
- 2.- Evaluación de la actividad biológica de los extractos mediante el bioensayo de letalidad de las larvas de *Artemia salina*, según el método descrito por Jerry L.Mc.Laughlin.
- 3.- Aislamiento de los compuestos que resulten activos o de interés fisiológico, desde el punto de vista botánico, de los extractos de la raíz de *K. parvifolia*.
- 4.- Determinación de la pureza de los compuestos de interés.
- 5.- Determinación de constantes físicas y análisis espectroscópicos para la elucidación de la estructura de dichos productos.
- 6.- Prevaloración de la actividad biológica de los compuestos aislados.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

Se trabajó con la raíz de *K. parvifolia* proveniente del municipio de Choix en Sinaloa, la cual fue recolectada por Luján Rangel el 17 de diciembre de 1992. Esta planta fue identificada y clasificada por primera vez por Fernández Nava del I.P.N. Existe un ejemplar depositado en los herbarios E.N.C.B. y MEXU.

2.1.1. CLASIFICACION TAXONOMICA DE *K. parvifolia*:

Familia: Rhamnáceas

Nombre común: Cacachila

Distribución geográfica: Sinaloa y Sonora

Usos: A este taxón no se le conoce uso alguno. En el Noroeste de México se le teme mucho, ya que se ha visto que animales, principalmente ganado caprino, que consumen frutos de esta planta perecen, generalmente por asfixia, a los pocos minutos de haberlos ingerido.

Descripción botánica: Arbusto de 2-3 m de alto, ramas glabras. Hojas opuestas o subopuestas, láminas oblongo-lanceoladas, de 1.4-2.0 cm de largo, 1.0-1.2 cm de ancho, haz y envés glabros, margen crenado, con pequeñas manchas negras, ápice obtuso, base obtusa o redondeada; pecíolos delgados de 3-4 mm de largo, glabros; estípulas deltoides de aproximadamente 1 mm de largo, glabras, persistentes. Inflorescencias dispuestas en cimas axilares de 3 a 4 flores, pedúnculo floral ausente o de

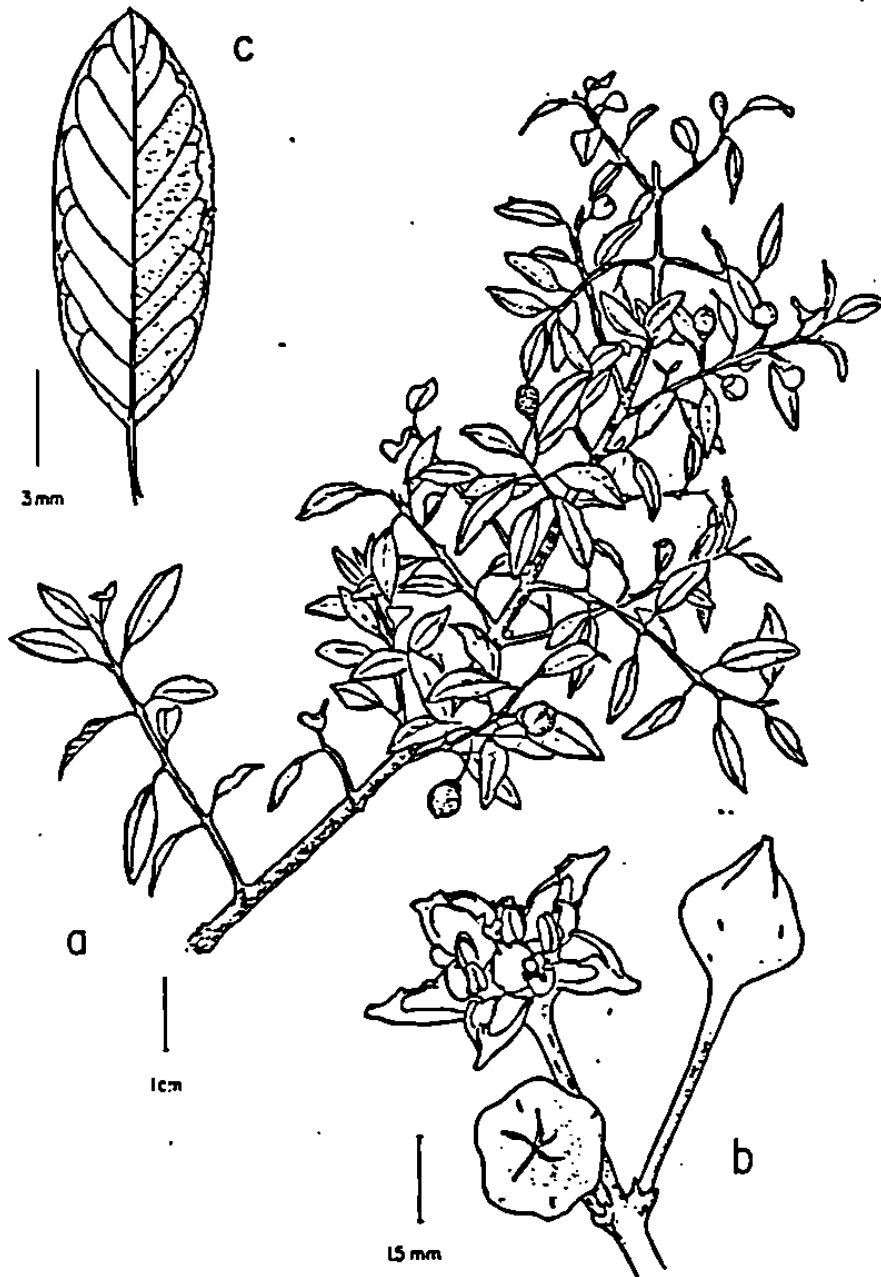


Fig. 8. *K. parvifolia*. Fernández Nava⁽¹⁾.

estar presente hasta de 2 mm de largo, con pequeñas motas negras sobre la superficie, glabro; pedicelos en la fructificación de 4-5 mm de largo; copa floral infundibuliforme, de 2 mm de largo, glabra; sépalos deltoides, de 0.5-1.0 mm de largo, carinados; glabros; pétalos blancos, unguiculados y cimbiformes, ligeramente más cortos que los estambres, persistentes, disco delgado, verde a café-oscuro, estigma 2-lobado, persistente en los frutos maduros. Frutos axilares, frecuentemente solitarios, verdes en la juventud, café-claros en la madurez, de 4.5-5.0 mm de largo; semilla 1 por lóculo (fig. 8).

2.2 MATERIAL Y EQUIPO:

Molino: Thomas-WILEY, LABORATORY MILL, modelo 4, malla 2 mm.

Extracciones: Eter de petróleo, acetato de etilo y metanol grado analítico.

Evaporaciones: Rotavapor Buchi a temperatura inferior a los 40 °C.

CCF: Cromatofolios AL de Sílica gel 60 F254, espesor de capa de 0.2 mm, Merck.

Eluentes: **1a.** Benceno-acetona 1:1

1b. Benceno-acetona 3:1

1c. Benceno-acetona 10:1

1d. Eter de petróleo-acetona 3:1

Revelador: KOH en etanol.

Lampara UV: GELMAN SCIENCES, INC. Modelo No. 51438 de 253.7 y 375.0 nm.

CCF de Fase Reversa: Cromatoplasmas de Sílica gel RP-18 F254 Merck.

Eluentes: **2a.** Metanol

2b. Metanol-agua 9:1

CCP: Sílica gel 60 G Merck, para cromatografía en placa, espesor de capa de 0.5 mm.

Eluente: Eter de petróleo-acetona 3:1

CC Flash: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck.

Eluente: Benceno-acetona 10:1, 3:1 (con 0.1% de ácido acético) y acetona.

CC gravitacional: Sílica gel 60 para CC, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, Merck.

Eluente Eter de petróleo-acetona 10:1, 8:1, 1:1 y acetona.

CC de baja presión: Columna Lobar Lichroprep RP-18 (0.040-0.063 mm), Merck.

Eluente: Metanol-agua 7:3.

Flujo: 1.3 mL/min.

CLAR Preparativo: Se realizó en un Cromatógrafo Waters Prep LC 2000. Columna de 8 mm X 100 mm Radial-Pak™ Liquid Chromatography cartridge, tipo 8MBC18 10m.

Condiciones:

A= Metanol.

B= Agua-acetonitrilo-ác. acético (70:30:1.6)

Flujo= 4 mL/min.

Tiempo	%A	%B	Curva*
	50	50	
1	50	50	8
12	60	40	8
14	60	40	10
15	100	0	10
20	100	0	10

*Ver apéndice.

CLAR Analítico: Cromatógrafo de líquidos HEWLETT-PACKARD Modelo 1090 con arreglo de diodos. Columna FR ODS de 100 x 2.1 mm con tamaño de partícula de 5 mm.

Condiciones:

Eluente A=Metanol

Eluente B=Agua-acetonitrilo-ác. acético
(70:30:1.6).

Flujo: 0.4 mL/min.

Temperatura: 26.9 °C.

Programa:3a. A-B 80:20 hasta el minuto 4, en el minuto 6 llega a 100:0 y se mantiene hasta los 8 minutos, regresando a 80:20 a los 10 minutos.

3b. A-B 65:35 hasta el minuto 4, en el minuto 6 llega a 100:0 y se mantiene hasta los 8 minutos, regresando a 65:35 a los 10 minutos⁽²⁷⁾.

Puntos de fusión: Se tomaron en un Electrothermal 9100.

Espectros UV-Visible: Fueron obtenidos usando un espectrofotómetro BECKMAN DU 7500 con arreglo de diodos y controlador de temperatura Peltier.

Espectros de Masas: Obtenidos en un espectrómetro HP 5985 por impacto electrónico, ionización FAB.

Espectros de RMN: Obtenidos en un aparato BRUKER (400.13 MHz ¹H, 100.62 MHz ¹³C), usando CDCl₃ como solvente.

Bioensayo de Letalidad de Larvas de *Artemia salina*:

- Huevecillos de Larvas de *Artemia salina*.
- Sal de mar "Instant Ocean".
- Lámpara de luz blanca.
- Recipiente pequeño rectangular de plexiglas.
- Pipeta lineal de 10 mL.
- Pipetas automáticas de 500, 50 y 5 mL.
- Vasos de precipitado de 10 mL.

Determinación de la actividad de los compuestos sobre la catalasa:

- Catalasa de hígado bovino Sigma (E.C.1.11.1.6).
- Peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) Sigma.
- Solución amortiguadora de fosfato de potasio (KH₂PO₄, K₂HPO₄) 50mM a un pH de 7.4.
- Cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor, 1mL de capacidad.
- Etanol grado analítico Merck.

2.3 METODOS

2.3.1. EXTRACCION DE LA RAIZ DE *K. parvifolia*.

DIAGRAMA 2.

Antes de la extracción se procedió a hacer una molienda de la raíz, la cual por ser muy dura primero se requirió hacer aserrín para poder pasarla por el molino y obtenerla pulverizada.

Una vez molida la raíz se hicieron las extracciones. Se utilizaron éter de petróleo, acetato de etilo y metanol en forma sucesiva para obtener los respectivos extractos (EEP, EAcOEt y EM). Todas las extracciones se realizaron mediante agitación mecánica y a una temperatura de 25°C.

2.3.2. PREVALORACION BIOLOGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE *Artemia salina*^(25,26):

- 1° Se preparó el agua de mar, disolviendo 38 g de sal en 1L de agua.
- 2° Se agregó el agua en el recipiente rectangular y en uno de los lados se depositaron los huevecillos de larvas de *Artemia salina* protegiéndolos de la luz.
- 3° Se dejaron 48 horas bajo luz blanca para que crecieran las larvas.
- 4° Se preparó una solución de cada uno de los extractos a ensayar con una concentración de 20 mg en 2mL de cloroformo. Se tomaron de esta solución 500, 50 o 5 mL y se añadieron a vasos de precipitado rotulados 1000, 100 y 10 ppm respectivamente. Se realizó por triplicado.
- 5° Se evaporó con nitrógeno el solvente. El material se disolvió con 50 mL de DMSO.
- 6° Se añadieron 5 mL de agua de mar y 10 larvas a cada vaso.
- 7° Se contó y registró en número de larvas sobrevivientes a las 24 horas.

- 8° Se analizaron los datos con el programa de computadora Finney para determinar la DL₅₀ y el intervalo de confianza del 95%.
- 9° Se hicieron diluciones adicionales en los casos necesarios.

Se considera una actividad positiva cuando los valores son menores a 1000 ppm.

2.3.3. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS.

2.3.3.1. Aislamiento a partir del extracto obtenido del éter de petróleo. Diagrama 3:

El extracto de éter de petróleo (EEP) primero se sometió a una columna Flash, para separar “a grosso modo” las fracciones de diferente R_f en CCF (eluyente 1c); las fracciones con mayor R_f se intentaron separar y purificar por medio de CC gravitacional, pero sólo se logró separación parcial de los compuestos y no se obtuvieron puros. Se utilizó entonces cromatografía en placa preparativa (CPP) y mediante el raspado de las diferentes bandas separadas y posterior elución con acetato de etilo con 0.1% de ác. acético se obtuvieron las fracciones, las cuales se evaporaron y se resuspendieron en el mínimo volumen de cloroformo para posteriormente precipitarlas con éter de petróleo; los compuestos mayoritarios obtenidos fueron 3, a los cuales se les designó como A, B y E.

2.3.3.2. Aislamiento a partir del extracto de acetato de etilo. Diagrama 4:

El extracto de acetato de etilo (EAcOEt) se sometió a una columna Flash para separar “a grosso modo” las fracciones de diferente R_f en CCF (eluyente 1b); las fracciones de R_f intermedio se sometieron a CC de baja presión, de la cual se obtuvieron por precipitación con éter de petróleo, un

compuesto que se denominó G y una mezcla H. La mezcla H se separó utilizando CLAR preparativo; las fracciones obtenidas se monitorearon por medio de CLAR analítico (eluyente 3b). Cabe aclarar que se realizaron varias corridas en CLAR preparativo y de acuerdo con el monitoreo se agruparon en 2 fracciones puras, que fueron evaporadas y precipitadas con éter de petróleo; a estas se les designó compuestos H1 y H2.

DIAGRAMA 2

EXTRACCION DE LOS COMPONENTES DE LA RAIZ

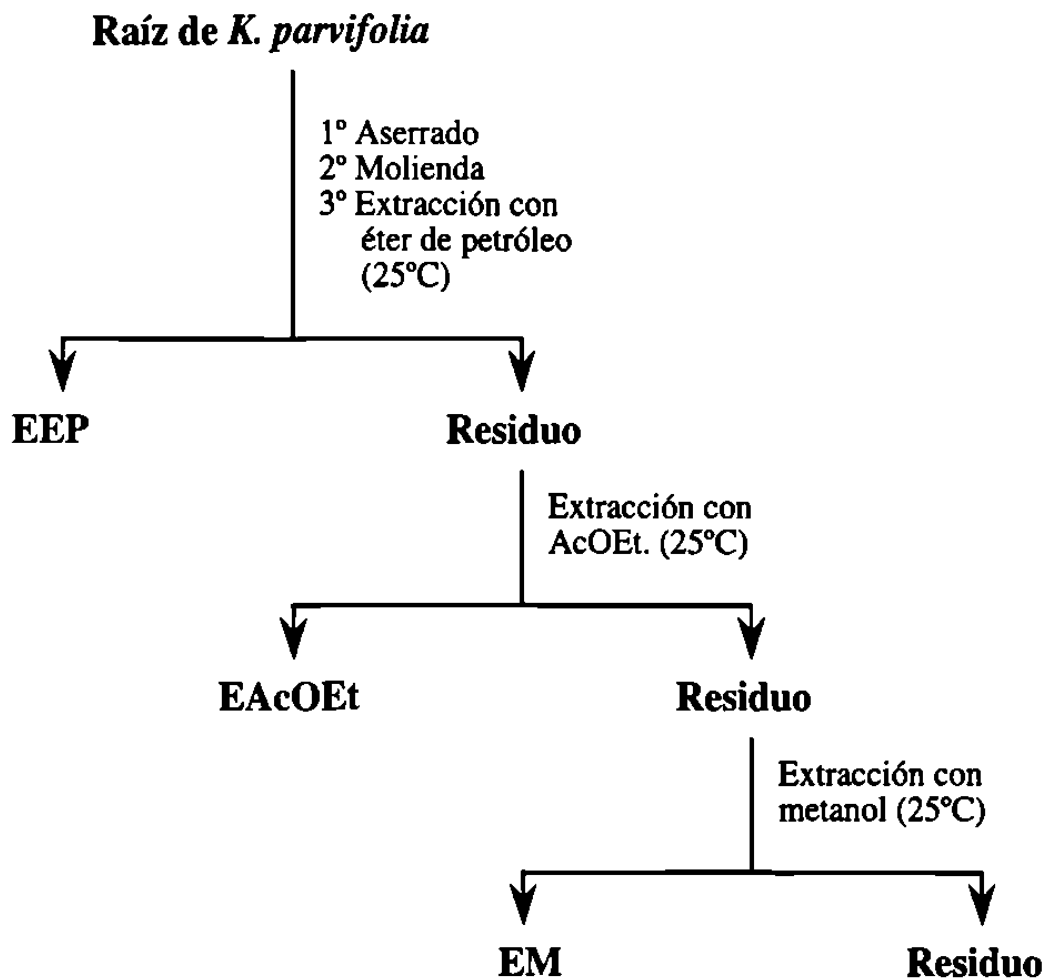


DIAGRAMA 3
AISLAMIENTO DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO ETereo

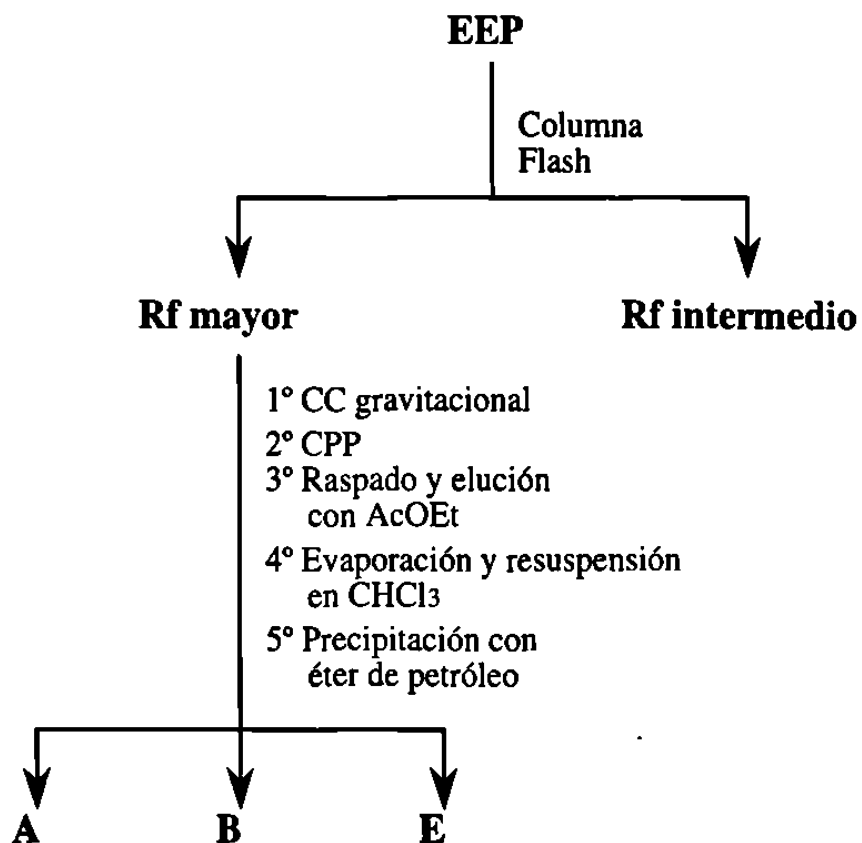
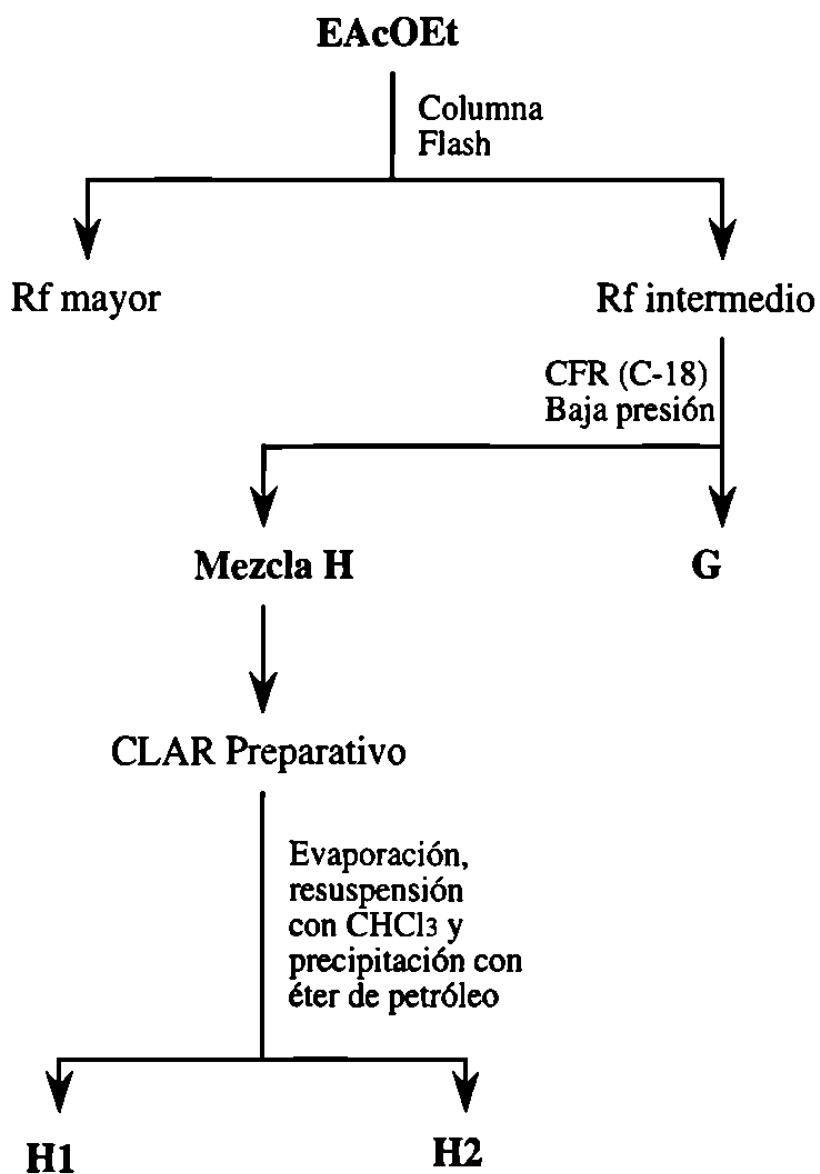


DIAGRAMA 4
AISLAMIENTO DE COMPUESTOS DEL
EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO



2.3.4. DETERMINACION DE LA PUREZA DE LOS COMPUESTOS DE INTERES.

- a. Determinación del punto de fusión.
- b. CCF utilizando el sistema 1c para los compuestos A, B y E; se observó al visible, UV y revelando la placa con KOH. El sistema 1b se utilizó para los compuestos G, H1 y H2.
- c. CCF de fase reversa utilizando el sistema 2a para los compuestos A, B y E. El sistema 2b para los compuestos G, H1 y H2.
- d. CLAR utilizando el sistema 3a para los compuestos A, B y E. El sistema 3b para los compuestos G, H1 y H2.

2.3.5. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA.

- a. Barrido UV-Visible.
- b. Espectro ^1H RMN.
- c. Espectro ^{13}C RMN.
- d. Espectro RMN de doble dimensión.
- e. Espectro de Masas.

2.3.6. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA.

2.3.6.1. Bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina*^(25,26):

Se llevó a cabo como se describe en 2.3.2., la diferencia está en la concentración que se utiliza para los compuestos ya puros.

Se preparó una solución de 2 mg por mL de solvente por cada uno de los compuestos a ensayar. Se tomaron de esta solución 500, 50 o 5 mL y se añadieron a vasos de precipitado rotulados 100, 10 y 1 ppm

respectivamente. Se realizó por triplicado.

Se considera actividad positiva cuando los valores son menores a 100 ppm de sustancias puras.

2.3.6.2. Determinación de la actividad de los compuestos sobre la catalasa⁽¹⁵⁾:

La actividad de la catalasa fue medida a través de un método espectrofotométrico basado en la medición de la disminución del peróxido de hidrógeno a 240 nm, pH de 7.4 y 25 °C⁽²⁸⁾.

A). Determinación de la actividad de la catalasa. En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 950 μ L de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a un pH de 7.4.
- 40 μ L de la solución de catalasa (dilución 1:70 de solución patrón de la enzima 10 mg/mL en solución amortiguadora de fosfato de potasio).
- Se agitó y leyó a 240 nm (Blanco).
- Se disparó la reacción agregando 10 μ L de H₂O₂ (dilución 1:5 de peróxido de hidrógeno al 30% en solución amortiguadora de fosfato de potasio).
- Se mezcló y leyó a 240 nm cada minuto durante 6 minutos.
- Lo anterior se hizo por triplicado para obtener el valor promedio.

La actividad enzimática de la catalasa se expresó como U/mL (μ M de peróxido de hidrógeno utilizado/min/mL). Las tasas de reacción enzimática se midieron en un espectrómetro Beckman DU 7500 equipado con paquete de cinética enzimática.

B). Determinación del grado de inhibición sobre la actividad de la catalasa. En una cubeta de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico se agregaron las siguientes soluciones:

- 930 μL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM a pH de 7.4.
- 40 μL de la solución de catalasa (dilución 1:70).
- 20 μL de la solución del compuesto a probar.
- Se agitó y leyó a 240 nm durante 6 min.
- Lo anterior se hizo por triplicado para cada compuesto o sustancia problema y en base a ello se calculó el grado de inhibición de la catalasa causado por la adición del compuesto.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1. EXTRACCION DE LA RAIZ DE *K. parvifolia*.

Una vez molida y pulverizada la raíz de *K. parvifolia* se pesó (997.00 g). Se realizaron las extracciones con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol sucesivamente para obtener los extractos (EEP, EAcOEt y EM) (fig. 9). El EEP y EAcOEt se rotaevaporaron y se recuperaron en mínima cantidad de cloroformo, posteriormente se precipitaron con éter de petróleo resultando un peso de 2.32 y de 2.97 g respectivamente. El EM se rotaevaporó y se pesó, resultando 32.68 g.

3.2. PREVALORACION BIOLOGICA DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE EL BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE *Artemia salina*.

De los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y metanol, que se obtuvieron de la raíz de *K. parvifolia*, se realizó el bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina* resultando:

EEP	DL ₅₀ = 301.73 ppm (743.89- 124.42 ppm)
EAcOEt	DL ₅₀ = 272.36 ppm (522.01-87.17 ppm)
EM	No activo.

Current Chromatogram(s)

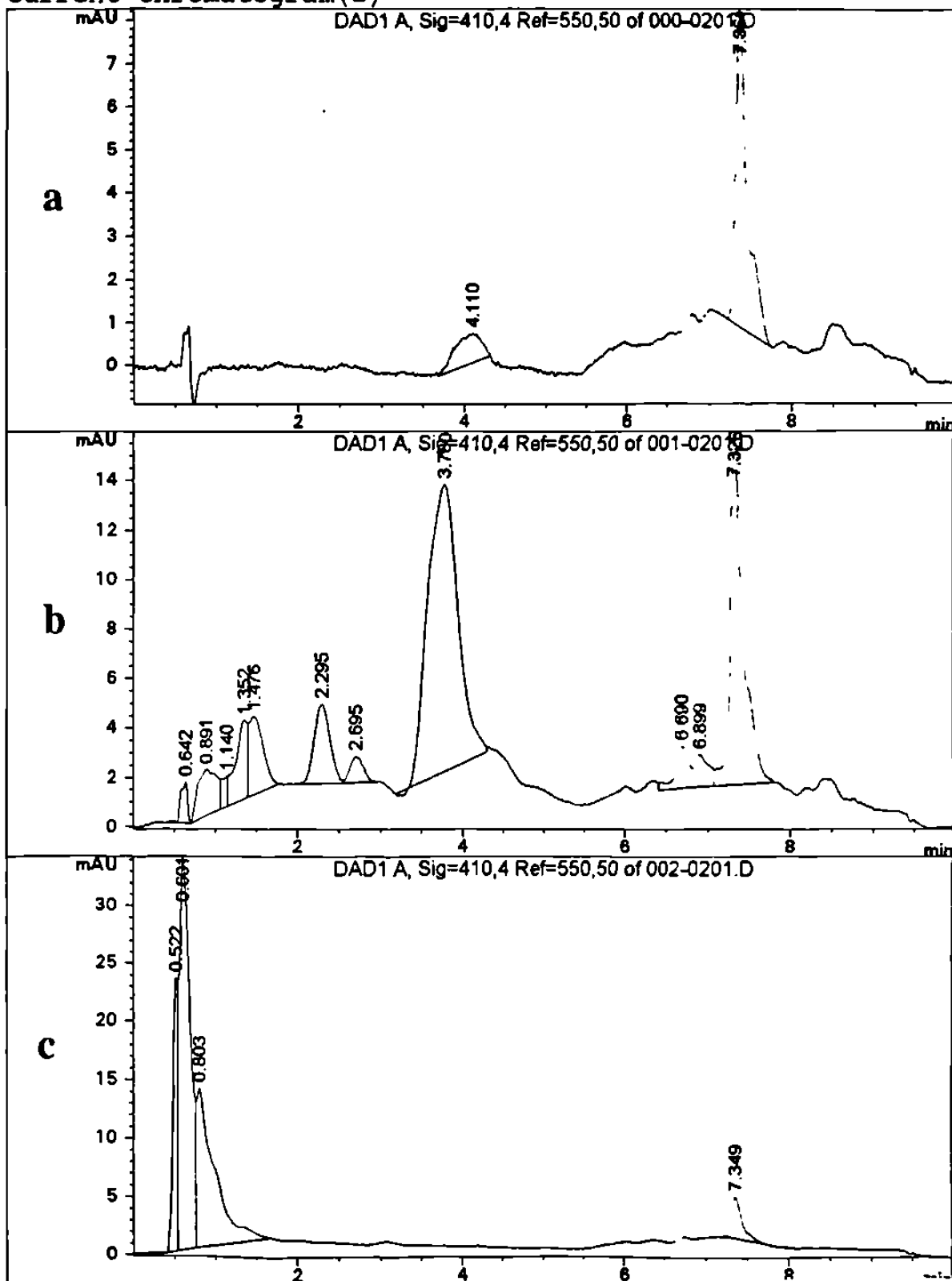


Fig. 9. Cromatogramas en CLAR (programa 3b).
a) EEP, b) EAcoEt, c) EM.

3.3. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EEP.

El extracto de éter de petróleo se fraccionó de acuerdo al diagrama 3, obteniéndose tres compuestos, los cuales se designaron A, B y E. Los pesos aproximados que se obtuvieron de éstos fueron: 50.5 mg de A, 24.0 mg de B y 53.0 mg de E.

3.3.1. COMPUESTO A.

3.3.1.1. Determinación de la pureza:

- a). Punto de fusión: 160 ± 2 °C.
- b). CCF: Se utilizó el sistema 1c.
R_f de 0.57. Se reveló con KOH.
- c). CCF de fase reversa: Se utilizó el sistema 2a.
R_f de 0.52.
- d). CLAR analítico: Utilizando el programa 3a.
t_R de 5.15 (fig. 10)

3.3.1.2. Elucidación de la estructura:

- a). Espectro UV-Visible en metanol Merck (fig. 11)
- b). Espectro de Masas por impacto electrónico (fig. 12)
- c). Espectro de ¹H RMN, usando CDCl₃ como solvente (figs. 13, 14, 15, 16, 17, 18)
- d). Espectro de ¹³C RMN, usando CDCl₃ como solvente (figs. 19, 20)
- e). Espectro DEPT 135 (fig. 21).
- f). Espectro COSY (figs. 22, 23, 24)
- g). Espectro HMQC (fig. 25).

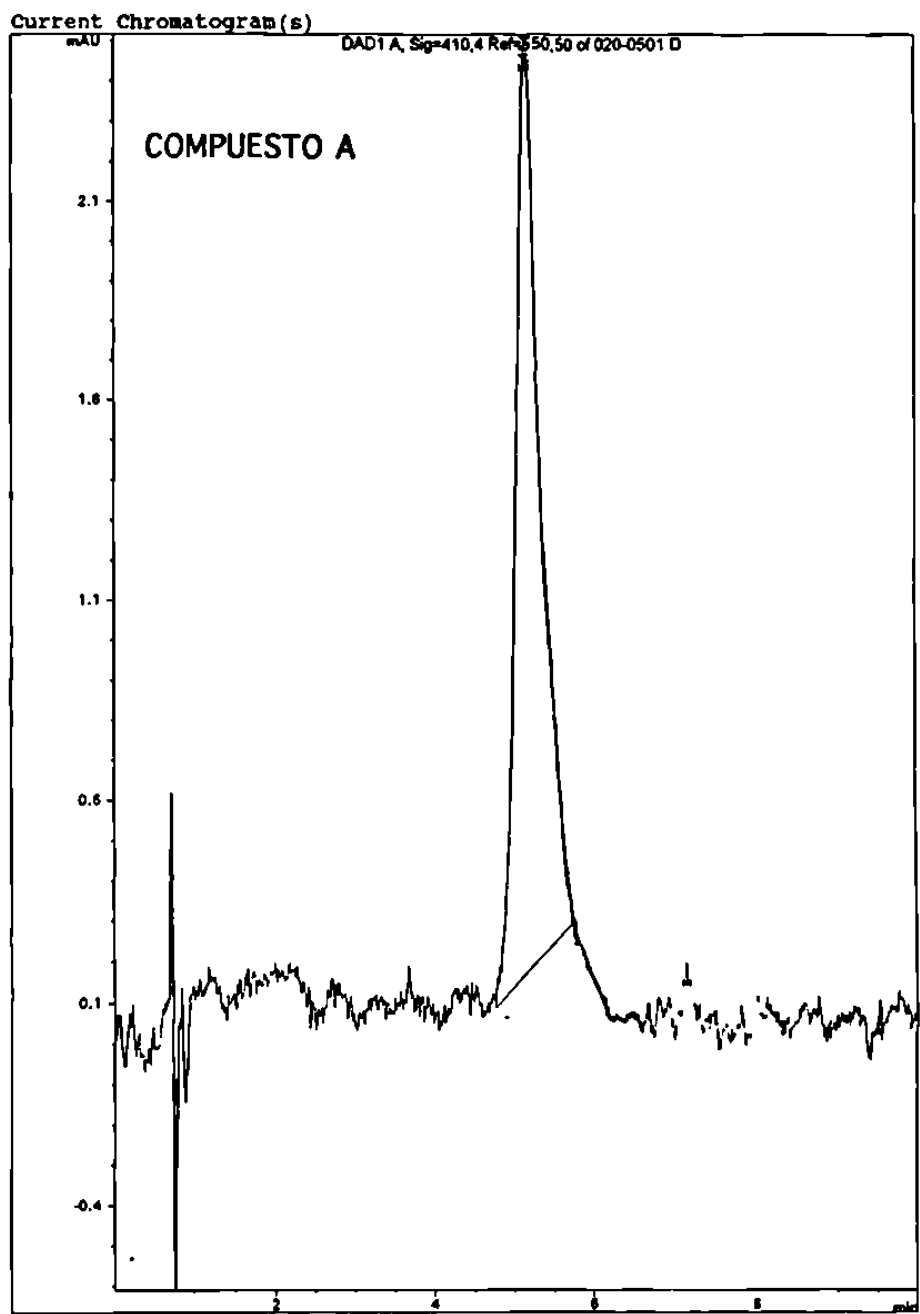


Fig. 10. Cromatograma del compuesto A en CLAR (programa 3a).

```

Wavelength Scan
ReadSamples Tabulate +-#Scans Scatter Method SaveClear Print Quit
Scan directory: VIEW      Autoprint: [No ]      Method name: A:\DEFAULT
Start Wl: 200.0 nm       Autosave: [No ]      Autosave name: [A:\JSCANS
End Wl: 800.0 nm        Scans per sample: 1    Sampling device: None
Overlay scans: [No ]    Interval: 10.00 [sec]  Read average time: 0.50 sec
  
```

B:\GBCP001

```

Zoom ZoomOut Trace Function Autoscale Annotate Print
  
```

Functions: Scan

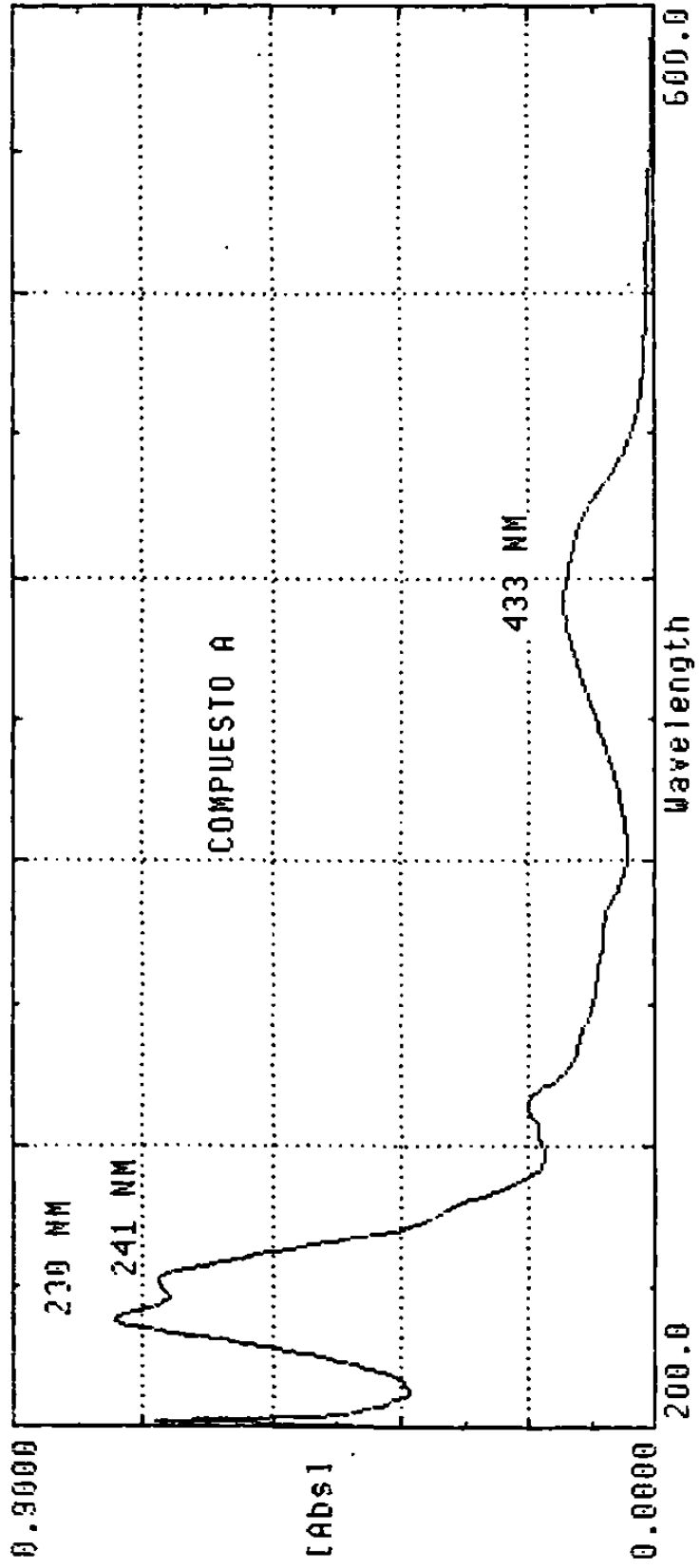


Fig. 11. Espectro UV-Visible del compuesto A.

SPEC: 083055a
 Samp: A-#757
 Comm: electron ionization
 Mode: EI +VE +HNR BSCAN (EXP) UP PROF
 Oper: McCarty
 Base: 226.0
 Norm: 10.00 mau
 Peak: -100>125
 Data:

30-AUG-95 DERIVED SPECTRUM #9 0M #9
 Start: 08:40:04 126 0SI 126

Inlet :
 Masses: 50 > 1000
 #peaks: 7298

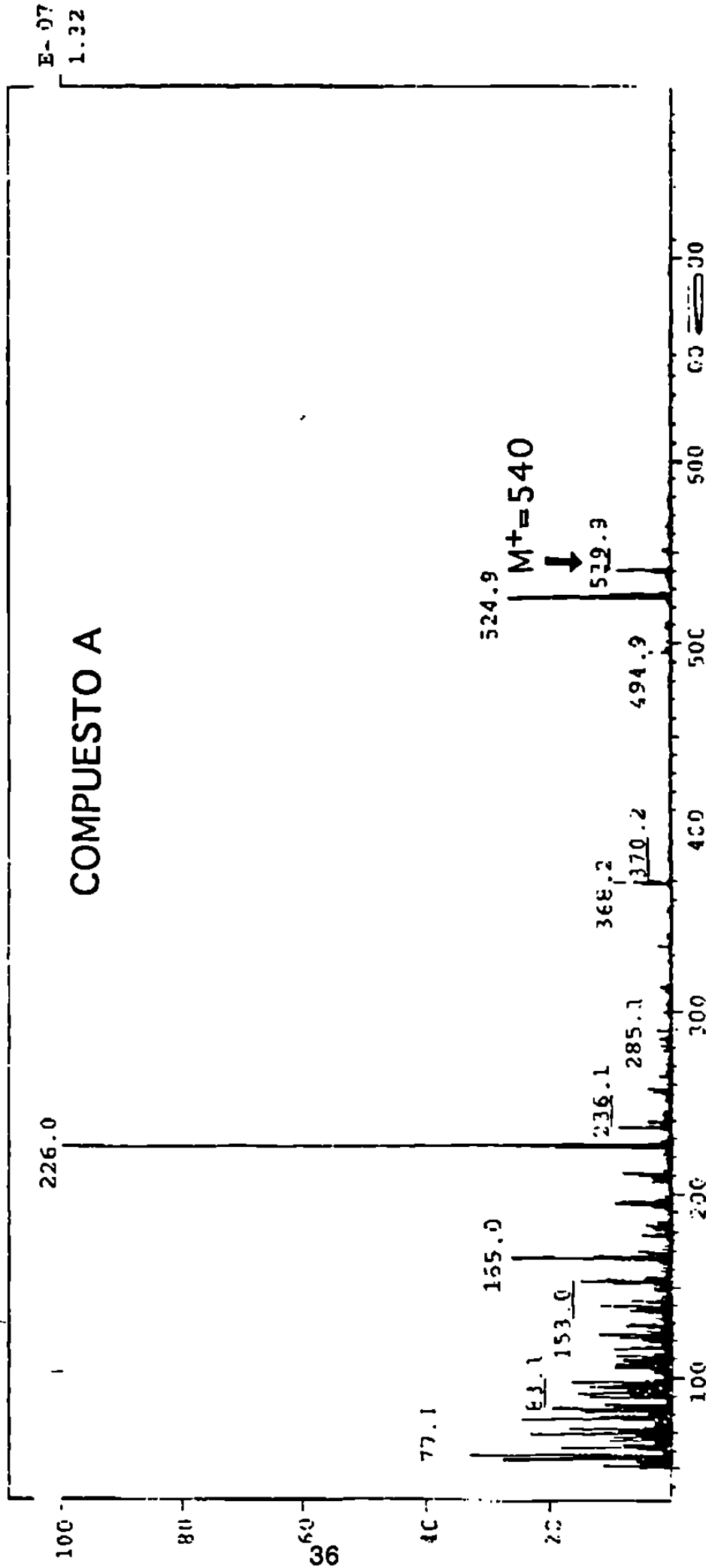


Fig. 12. Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto A.

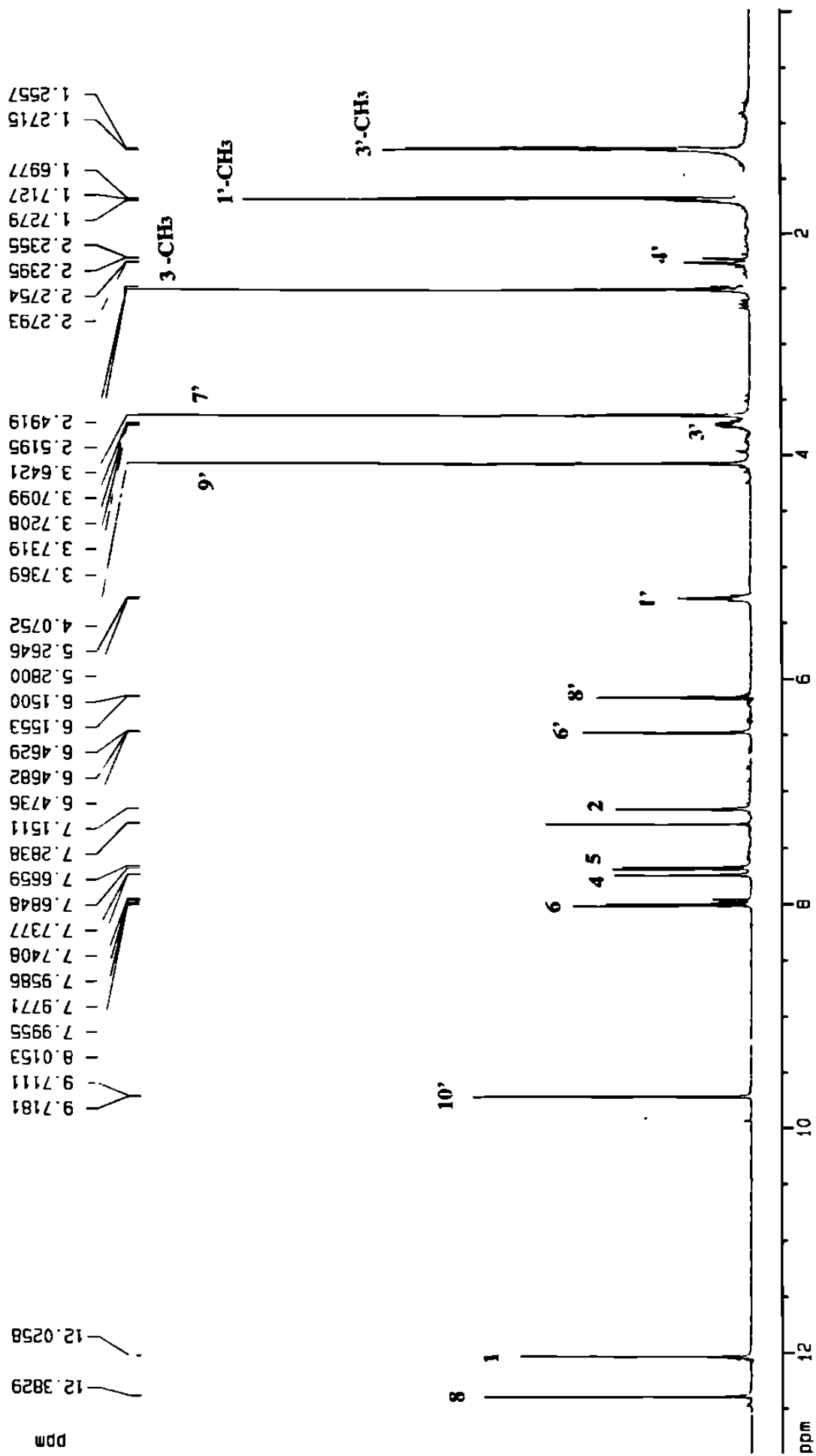


Fig. 13. Espectro ¹H RMN del compuesto A (0-13 ppm).

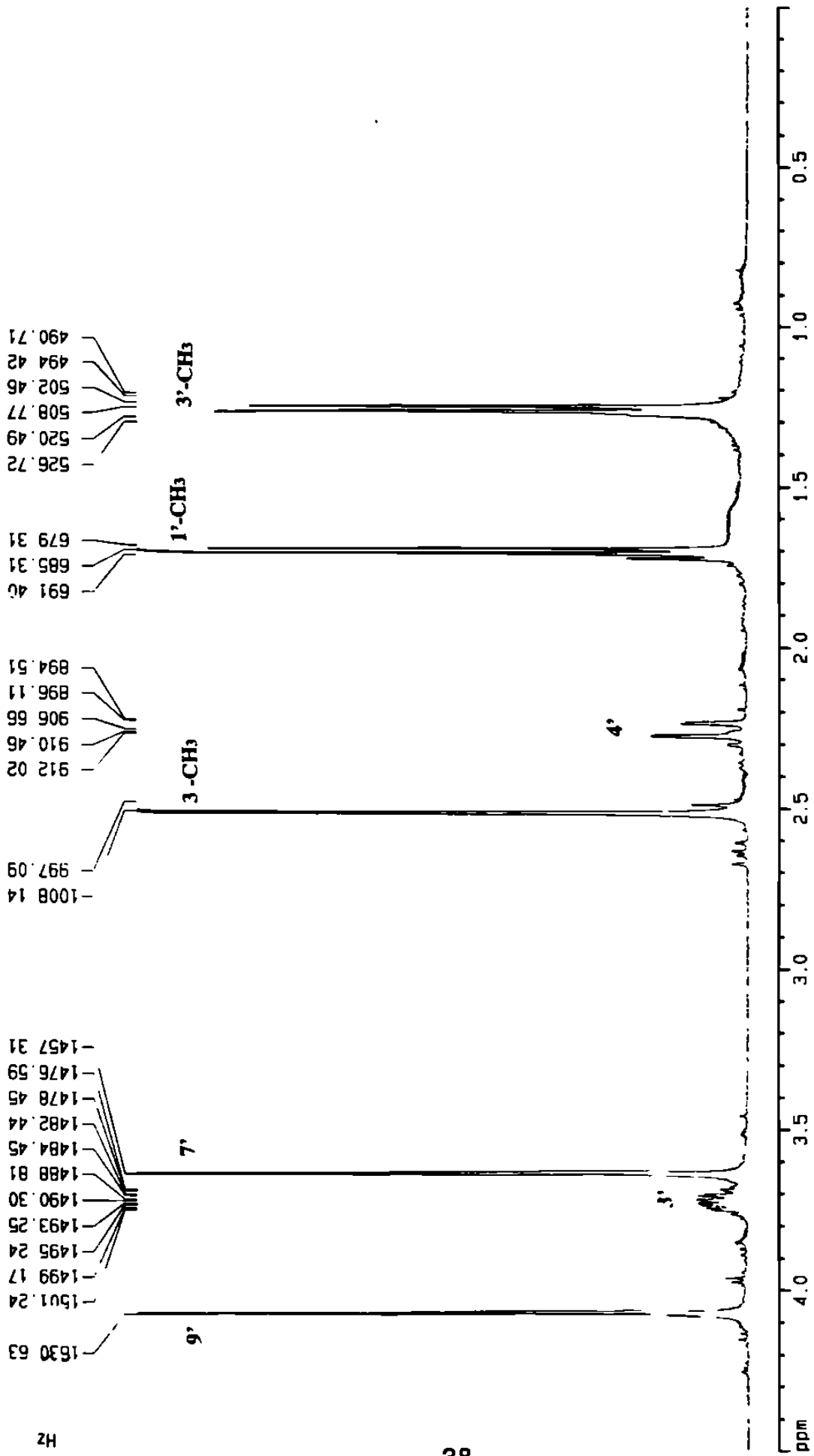


Fig. 14. Espectro ^1H RMN del compuesto A (0-5 ppm).

2100.44
2106.51
2112.70
2116.05
2118.82

2460.80
2462.93

2585.98
2588.10

2861.36

2914.45

2951.08

3067.34
3074.94
3096.08
3097.32
3184.49
3191.89
3199.24
3207.17

Hz

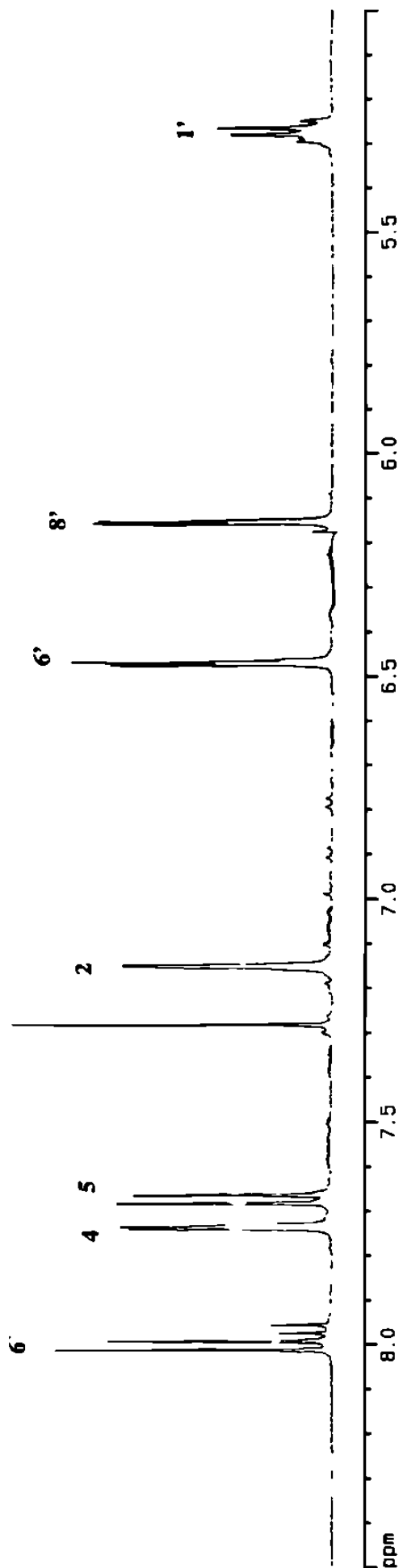


Fig. 15. Espectro ¹H RMN del compuesto A (5.0-8.0 ppm).

912.020
910.465
906.664
904.942
896.109
894.507

HZ

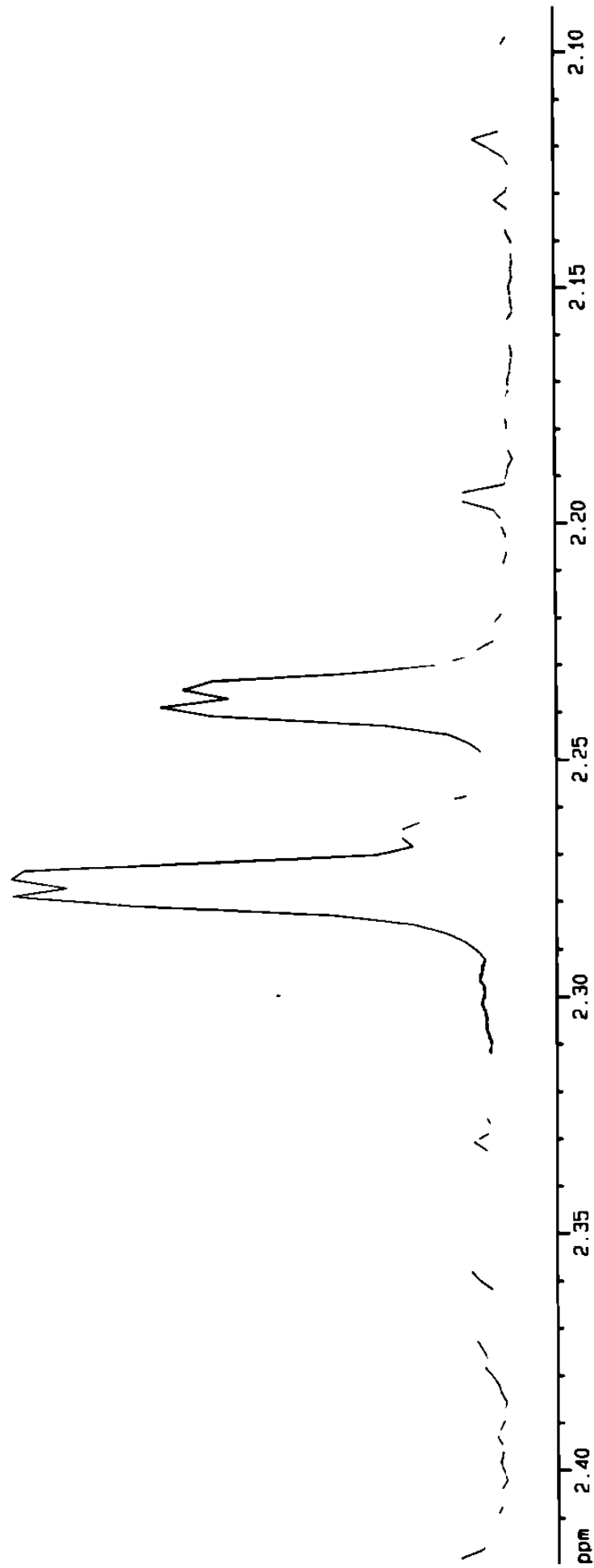


Fig. 16. Ampliación del espectro ^1H RMN del compuesto A (2.10-2.40 ppm).

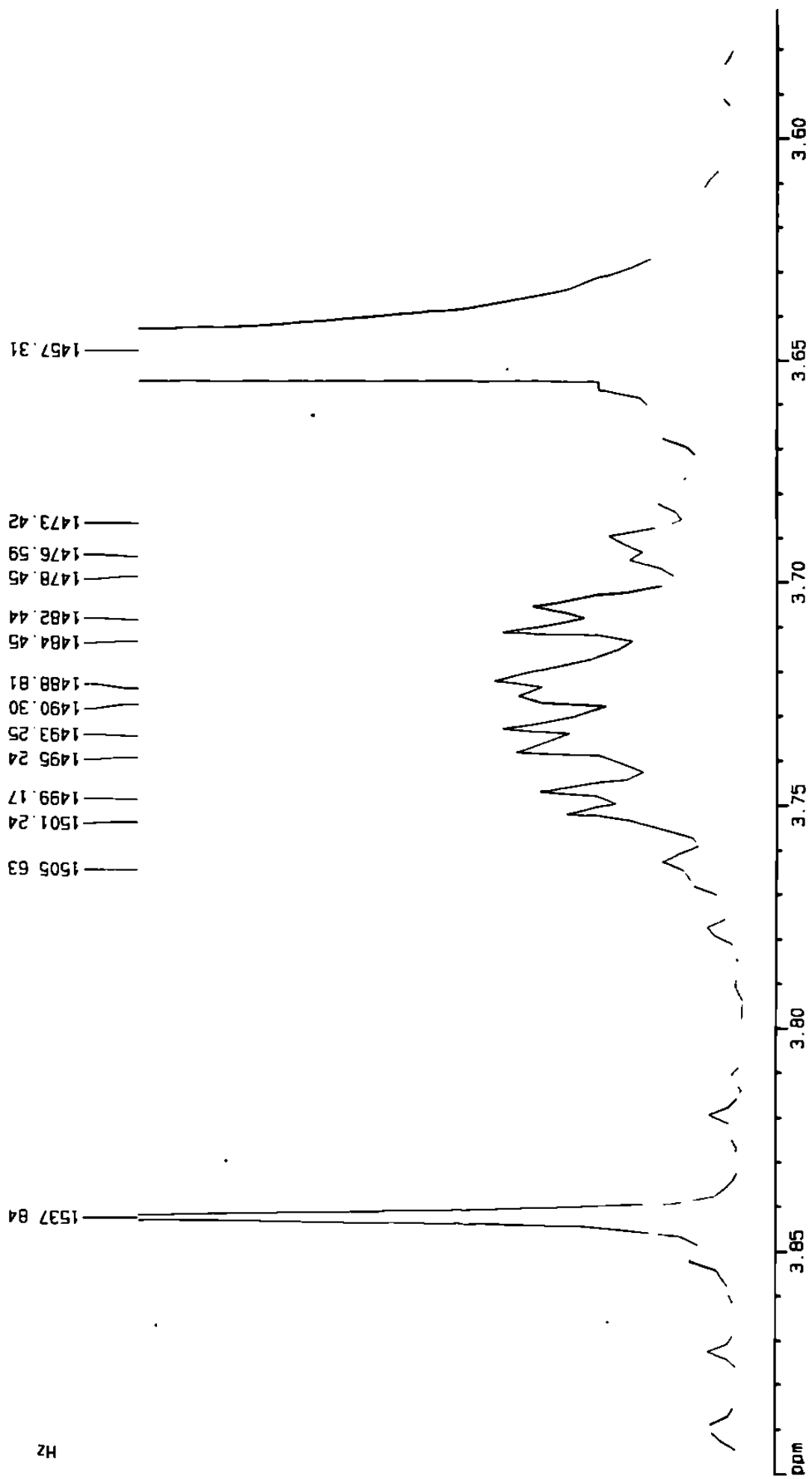


Fig. 17. Ampliación del espectro ¹H RMN del compuesto A (3.60-3.90 ppm).

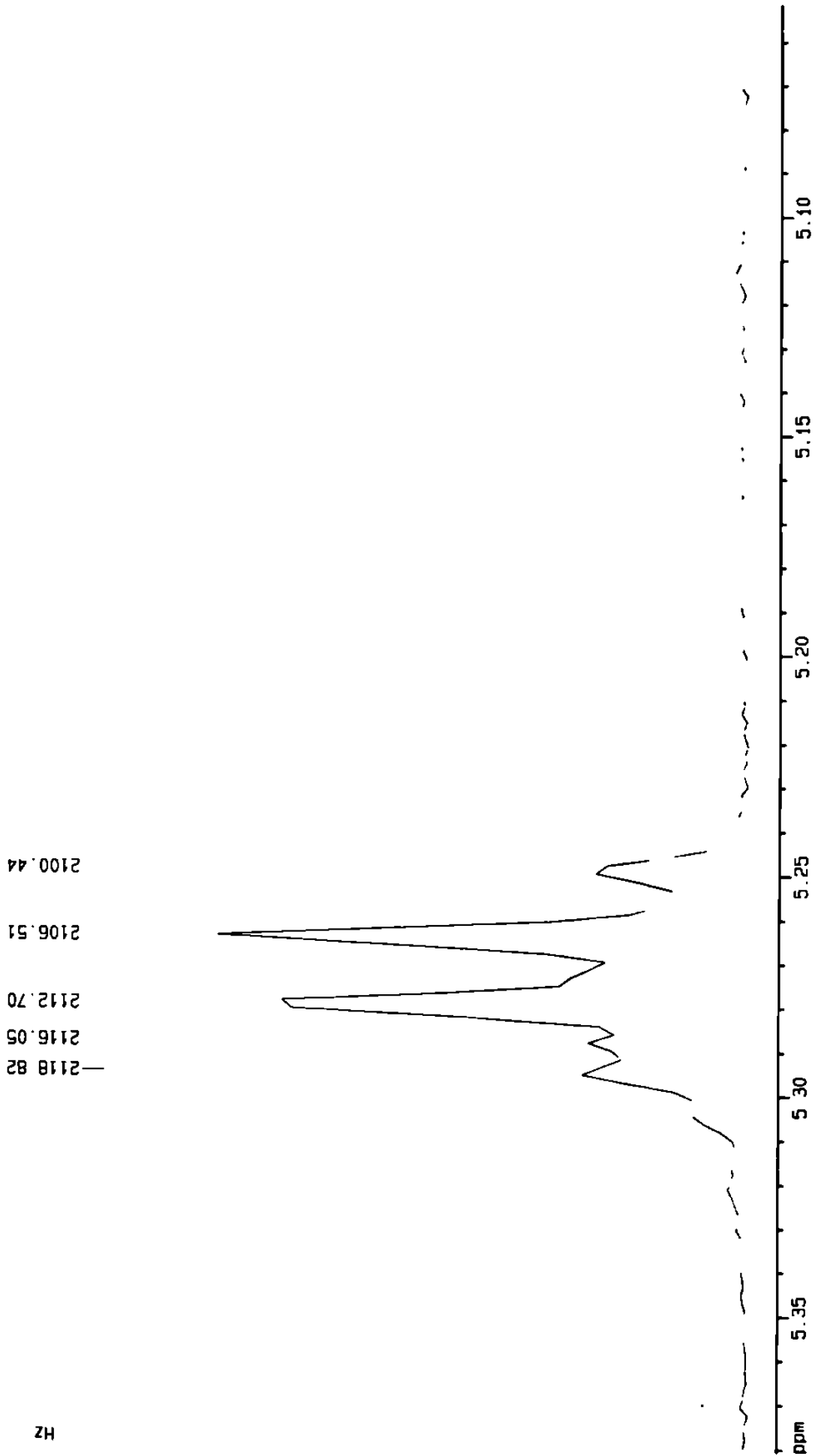


Fig. 18. Ampliación del espectro ¹H RMN del compuesto A (5.10-5.35 ppm).

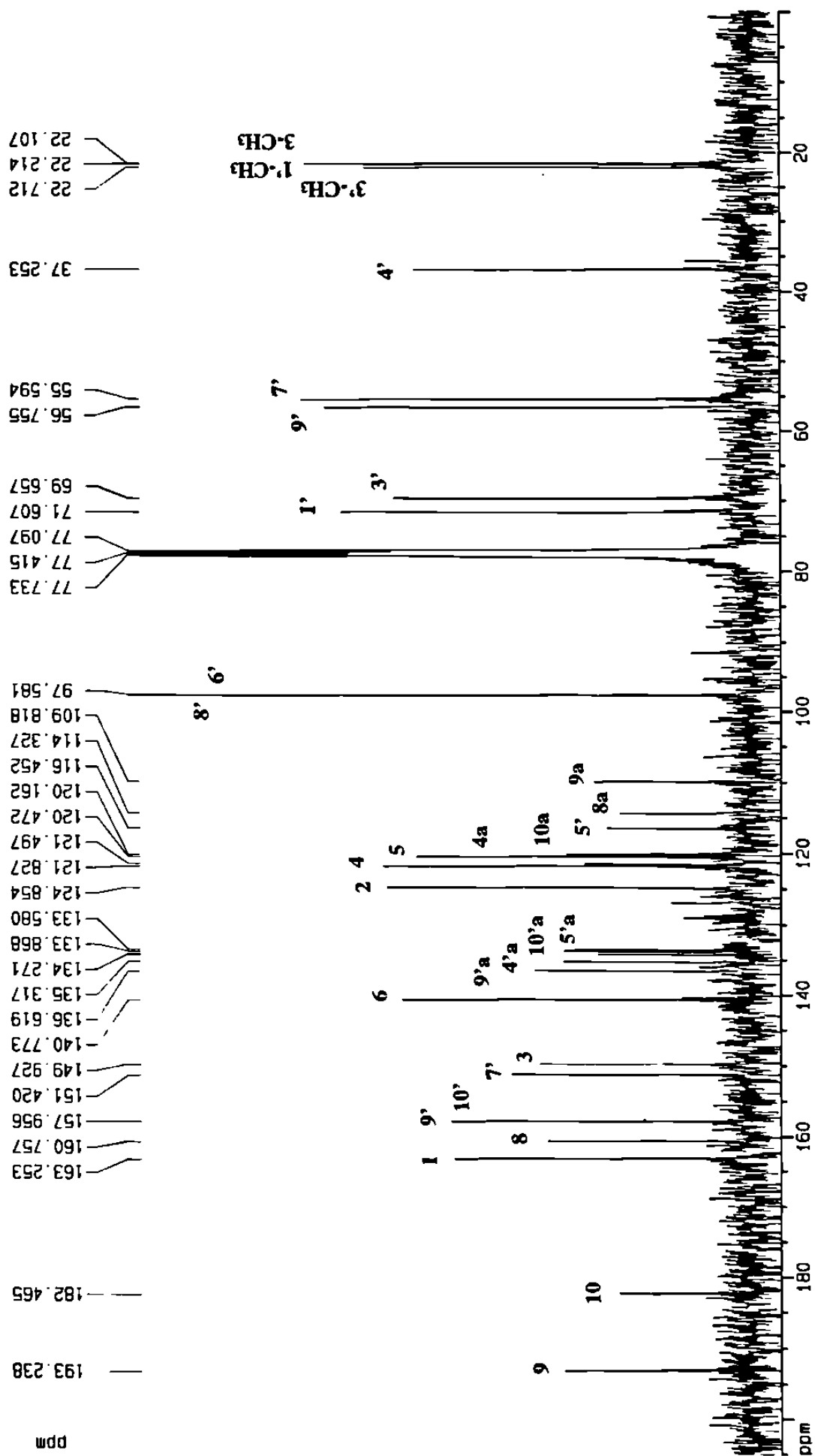


Fig. 19. Espectro ¹³C RMN del compuesto A (0-200 ppm).

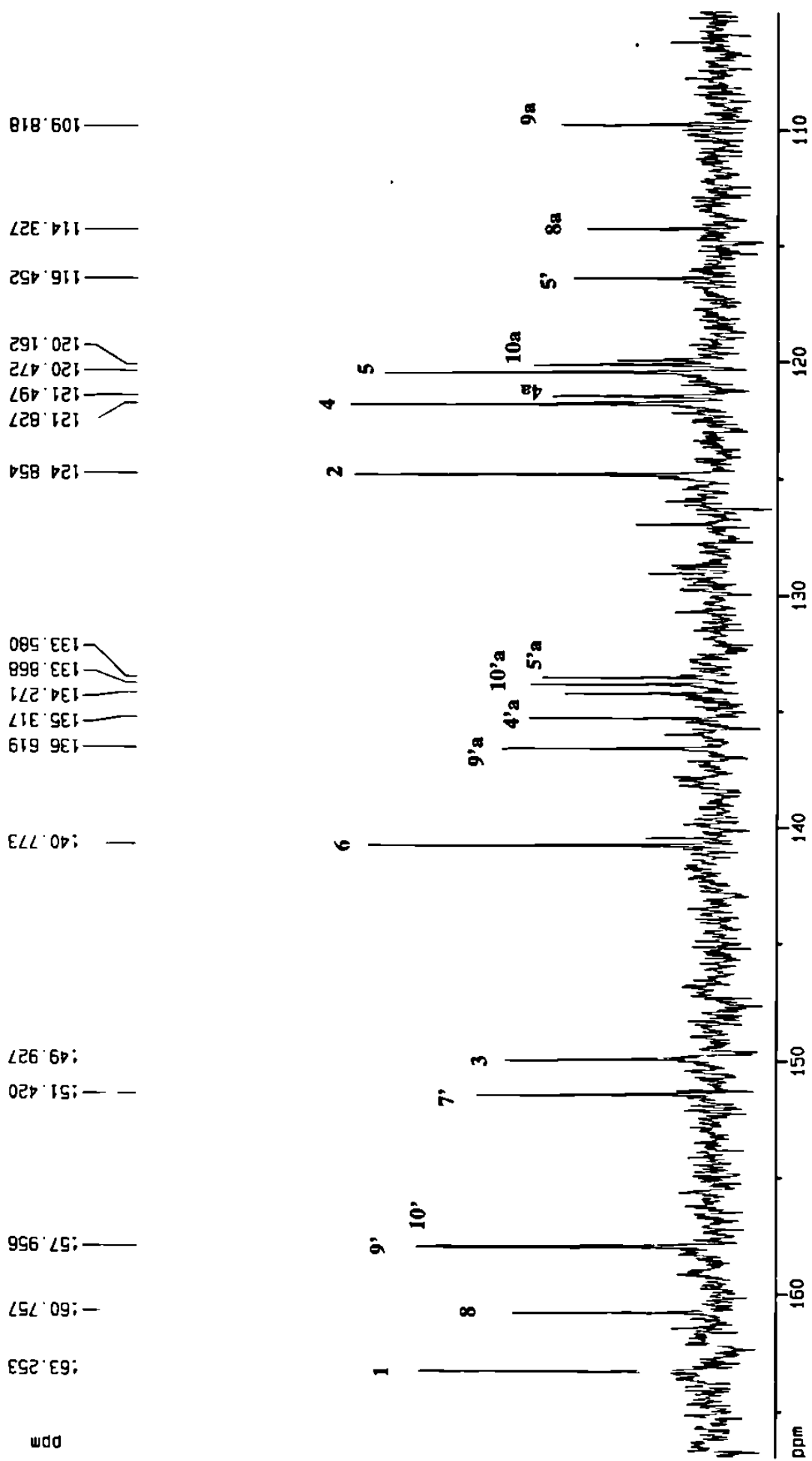


Fig. 20. Ampliación del espectro ^{13}C RMN del compuesto A (110-165 ppm).

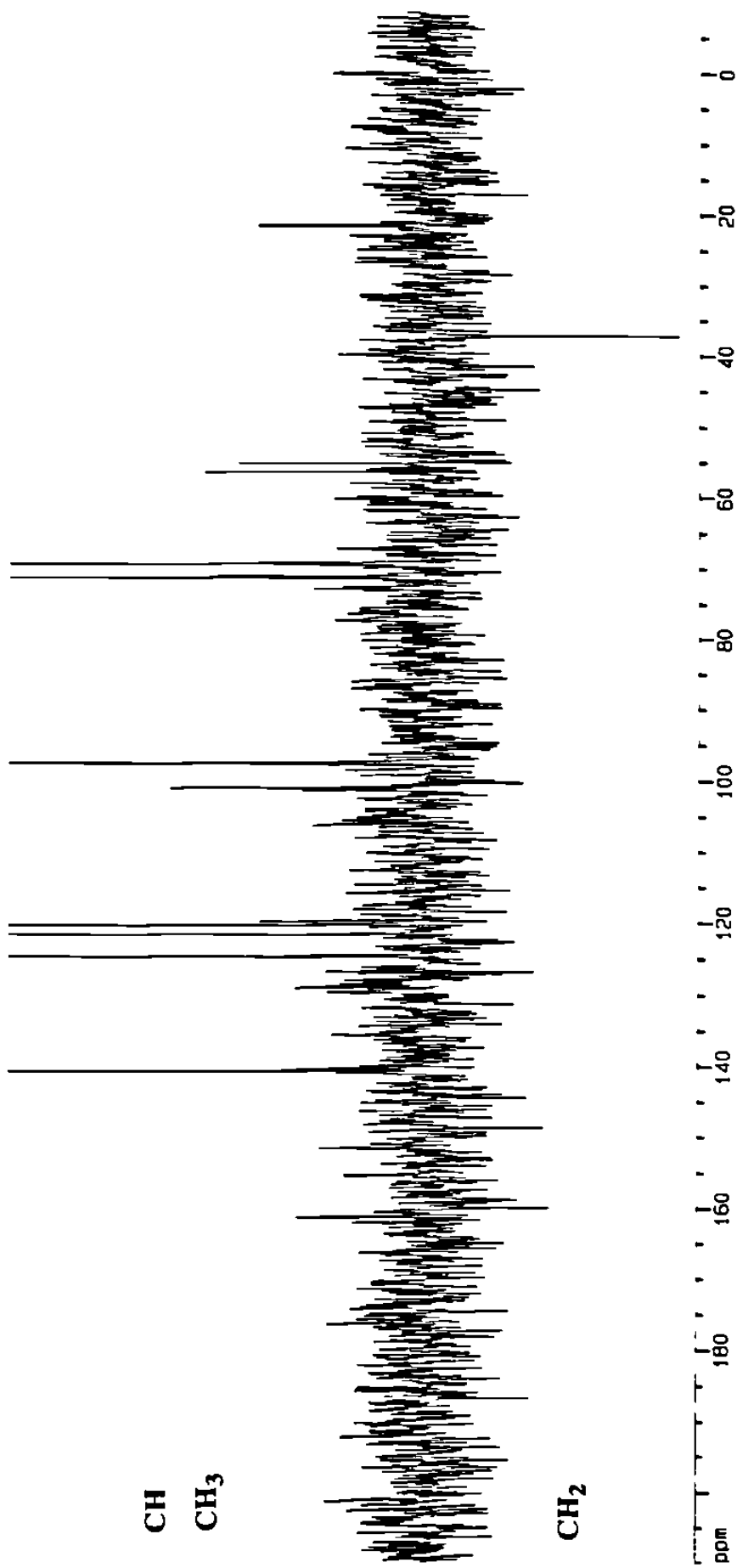


Fig. 21. Espectro DEPT 135 del compuesto A.

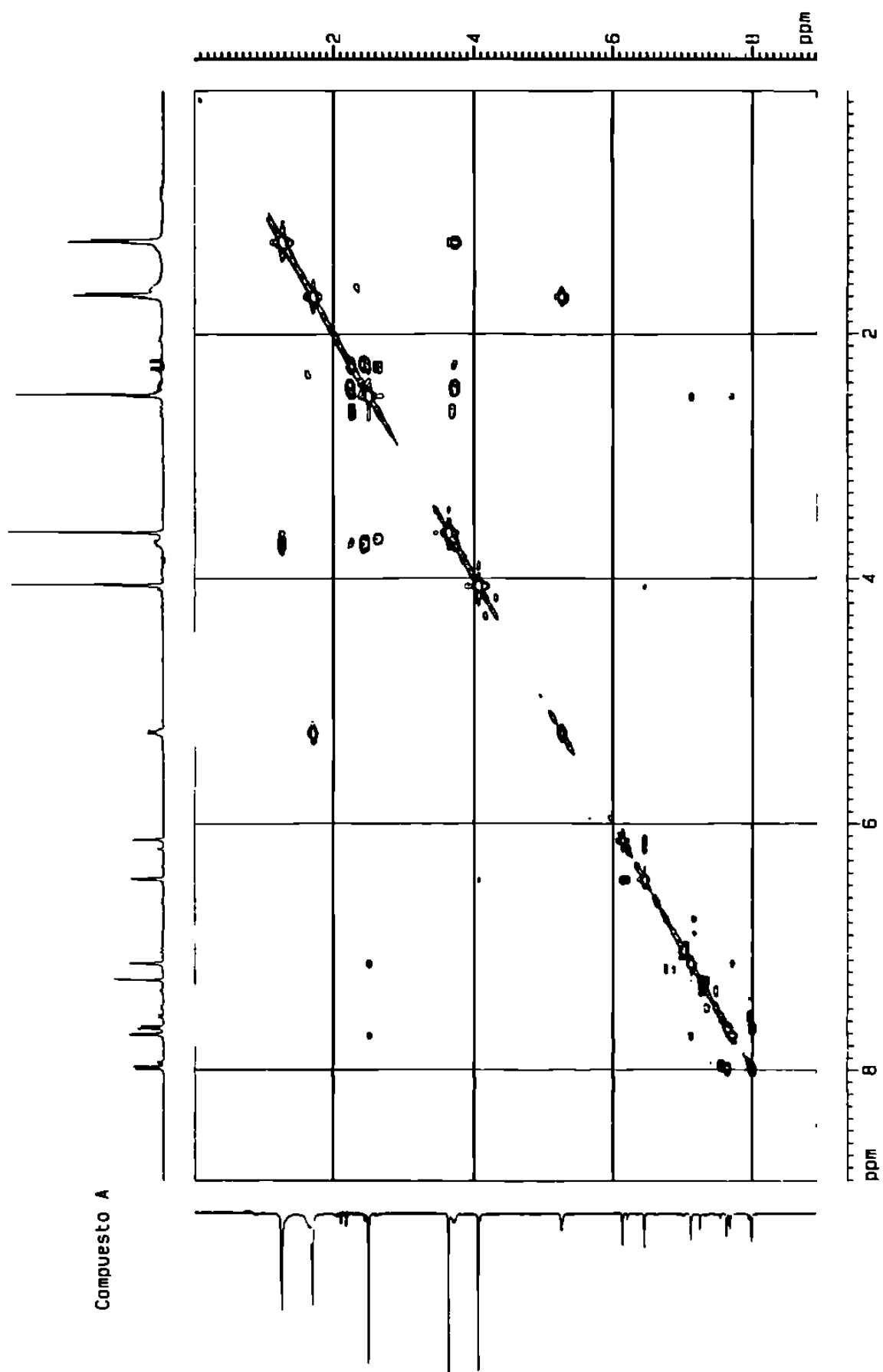


Fig. 22. Espectro COSY del compuesto A (0-8 ppm).

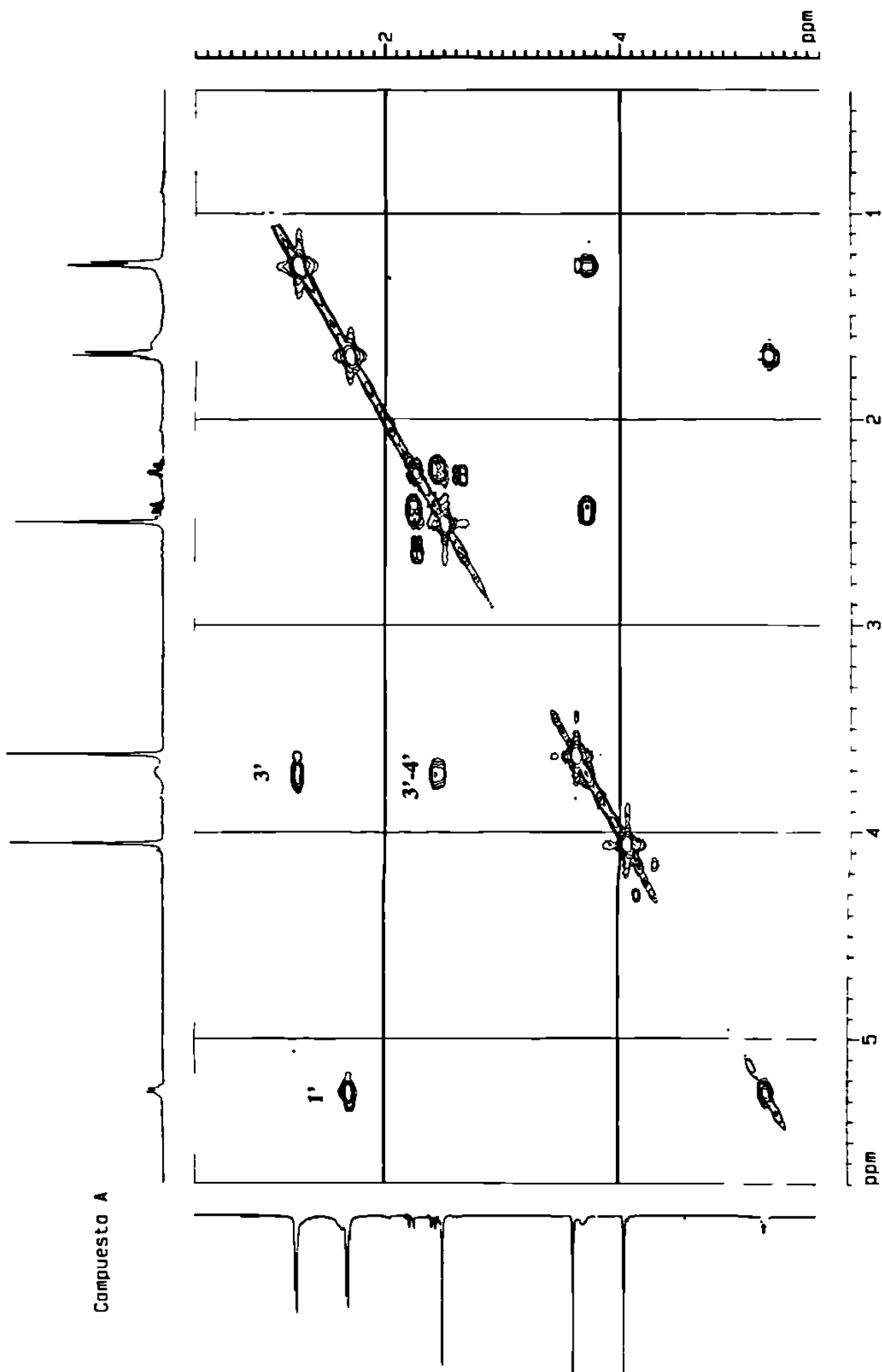


Fig. 23. Espectro COSY del compuesto A (0.0-5.7 ppm).

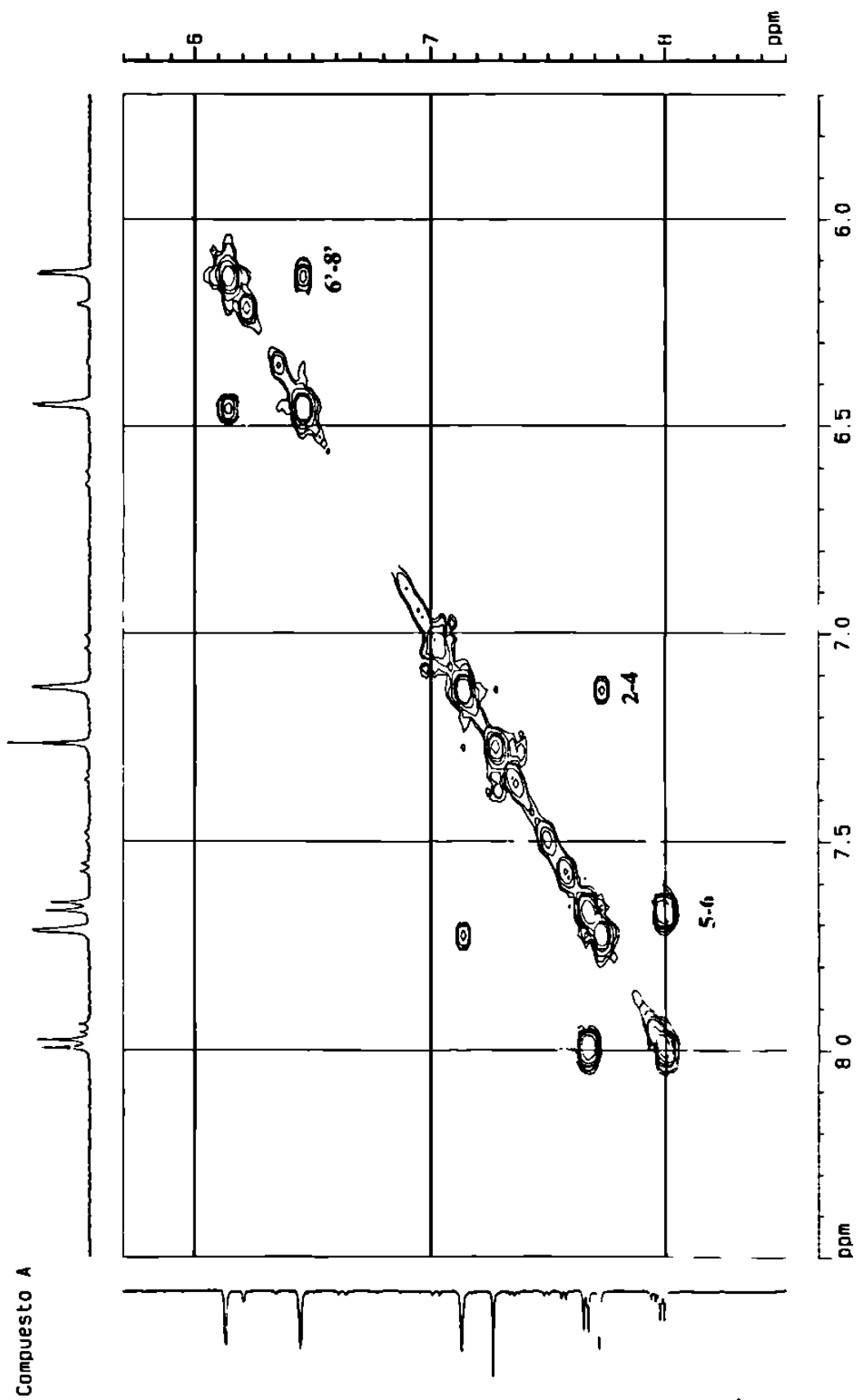


Fig. 24. Espectro COSY del compuesto A (6.0-8.5 ppm).

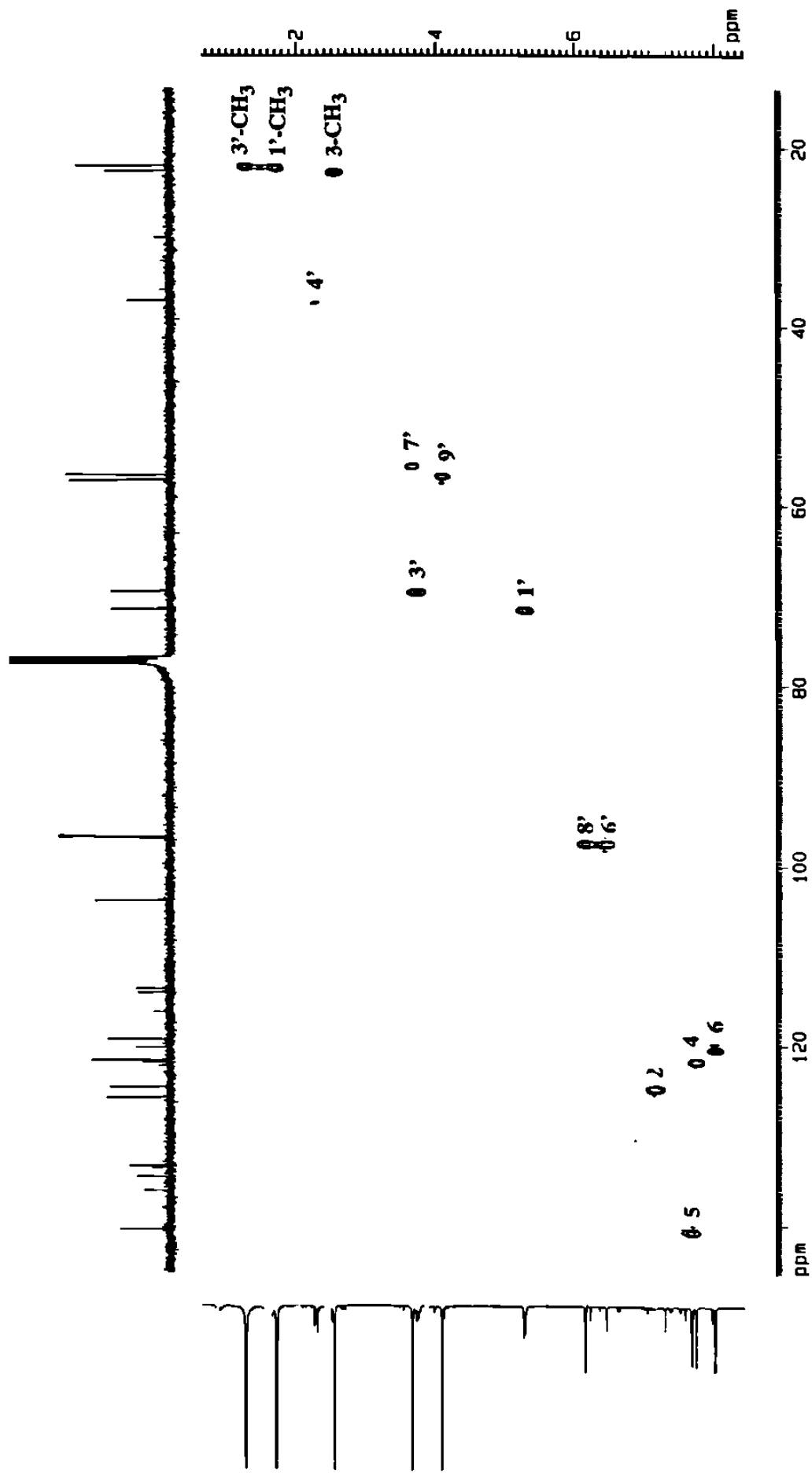


Fig. 25. Espectro HMQC del compuesto A.

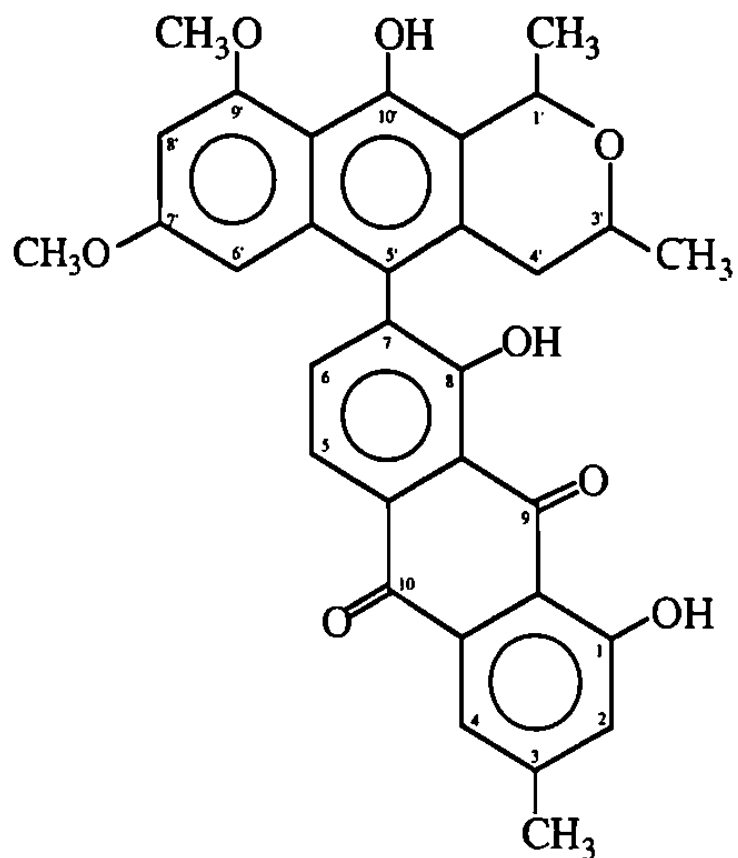


Fig. 26. Compuesto A (7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto (2',3'-c')pirano-5'-il)-3metil-1,8-dihidroxi-antraquinona).

La estructura propuesta para este compuesto A es 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-dihidroxi-antraquinona, la cual se muestra en la figura 26.

3.3.2. COMPUESTO B.

3.3.2.1. Determinación de la pureza:

- a). Punto de fusión: 173 ± 2 °C.
- b). CCF: Utilizando como eluente 1c.
 R_f de 0.61. Se reveló con KOH.
- c). CCF de fase reversa: Utilizando como eluente 2a.
 R_f de 0.45.
- d). CLAR analítico: Utilizando el programa 3a.
 t_R de 5.76 (fig. 27).

3.3.2.2. Elucidación de la estructura:

- a). Espectro UV-Visible en metanol Merck (fig. 28).
- b). Espectro de Masas por impacto electrónico (fig. 29).
- c). Espectro de ^1H RMN, usando CDCl_3 como solvente (figs. 30, 31, 32, 33, 34, 35).
- d). Espectro de ^{13}C RMN, usando CDCl_3 como solvente (fig. 36).
- e). Espectro DEPT 135 (fig. 37).
- f). Espectro COSY (fig. 38, 39, 40).

La estructura propuesta para el compuesto B es 7-(3',4'-dihidro-9'-metoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-dihidroxi-antraquinona, la cual se muestra en la figura 41.

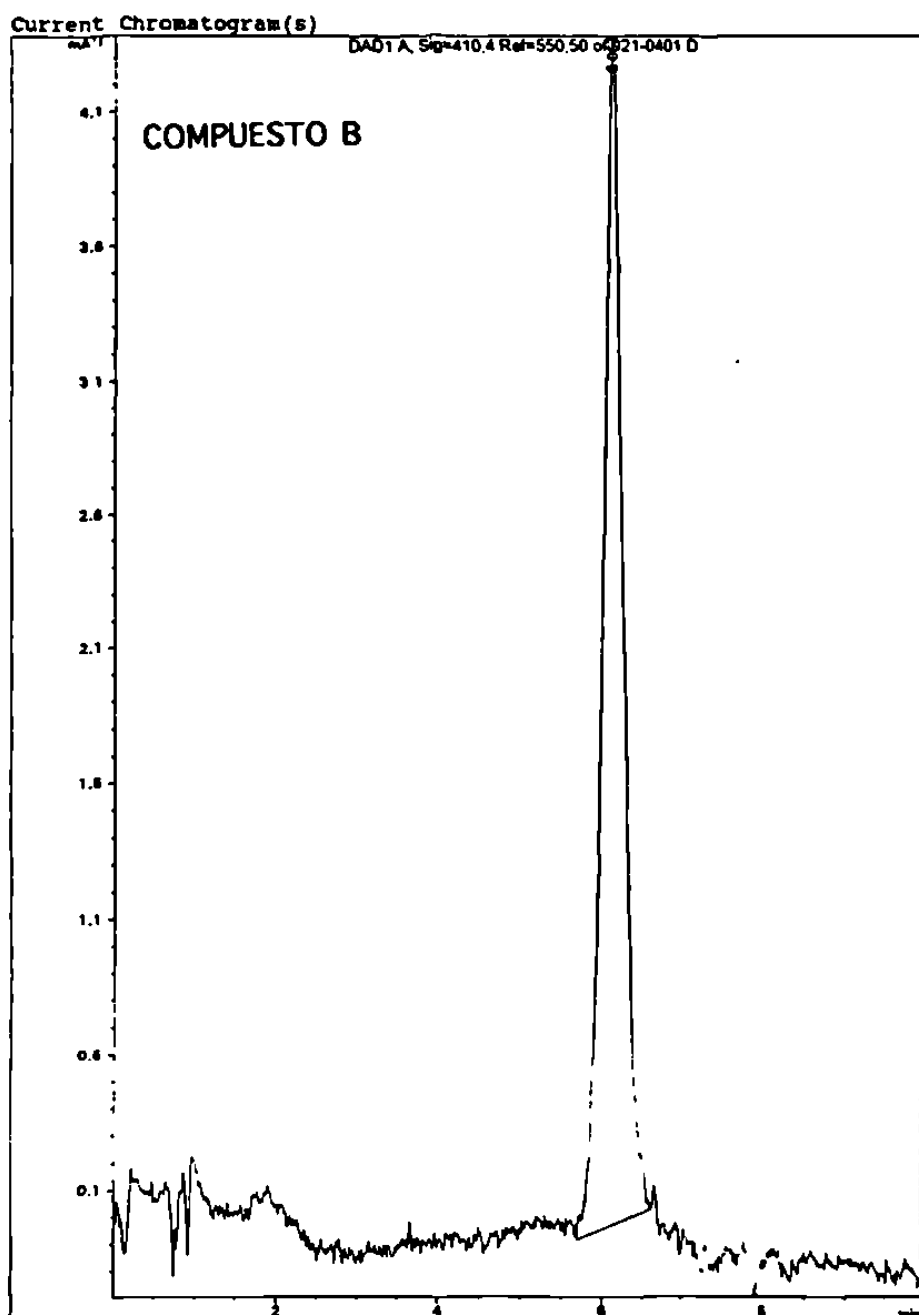


Fig. 27. Cromatograma del compuesto B en CLAR (programa 3a).


```

Wavelength Scan  HELP
#scans  Tabulate  +*Scans  Scatter  Method  SaveClear  Print  Quit
Scan directory: VIEW  Autoprint: [No ]  Method name: A:\DEFAULT
Start Wl: 200.0 nm  Autosave: [No ]  Autosave name: [A:\JSCANS
End Wl: 800.0 nm  Scans per sample: 1  Sampling device: None
Overlay scans: [No ]  Interval: 18.80 [sec]  Read average time: 8.50 sec

```

B:\GBCP002

```

Zoom  ZoomOut  Trace  Function  Autoscale  Annotate  Print

```

Functions: Scan

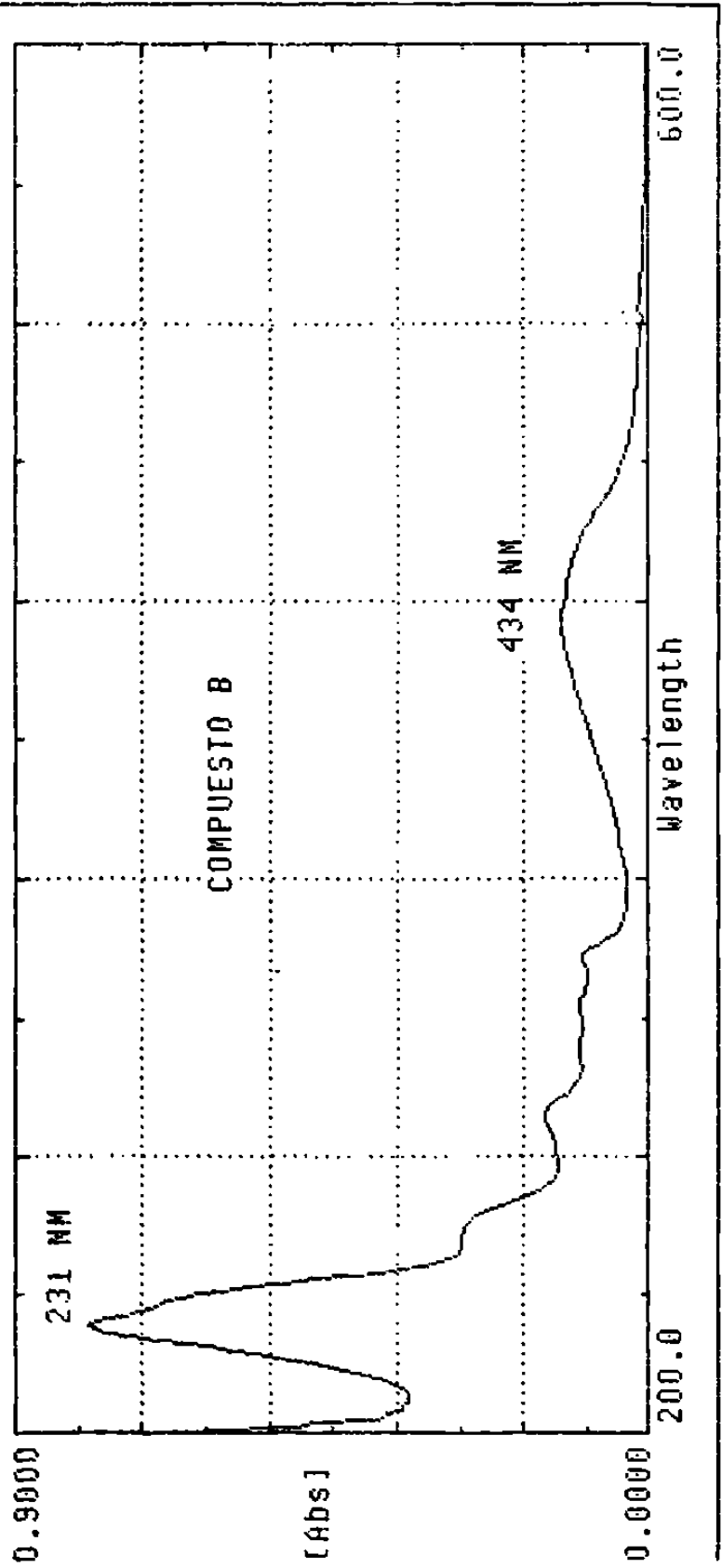


Fig. 28. Espectro UV-Visible del compuesto B.

SPEC: 083095b
 Samp: B-#798
 Conn: electron ionization
 Mode: EI +VE +HMR BSCAN (EXP) UP PROF
 Oper: McCarley
 Base: 494.9
 Norm: 494.9
 Peak: 10.00 umu
 Data: +59>68

30-Aug-95 DERIVED SPECTRUM #9
 Start: 09:10:01 115

Inlet :
 Masses: 50 > 100C
 #peaks: 5654

Inten : 3838310
 RIC : 120269743

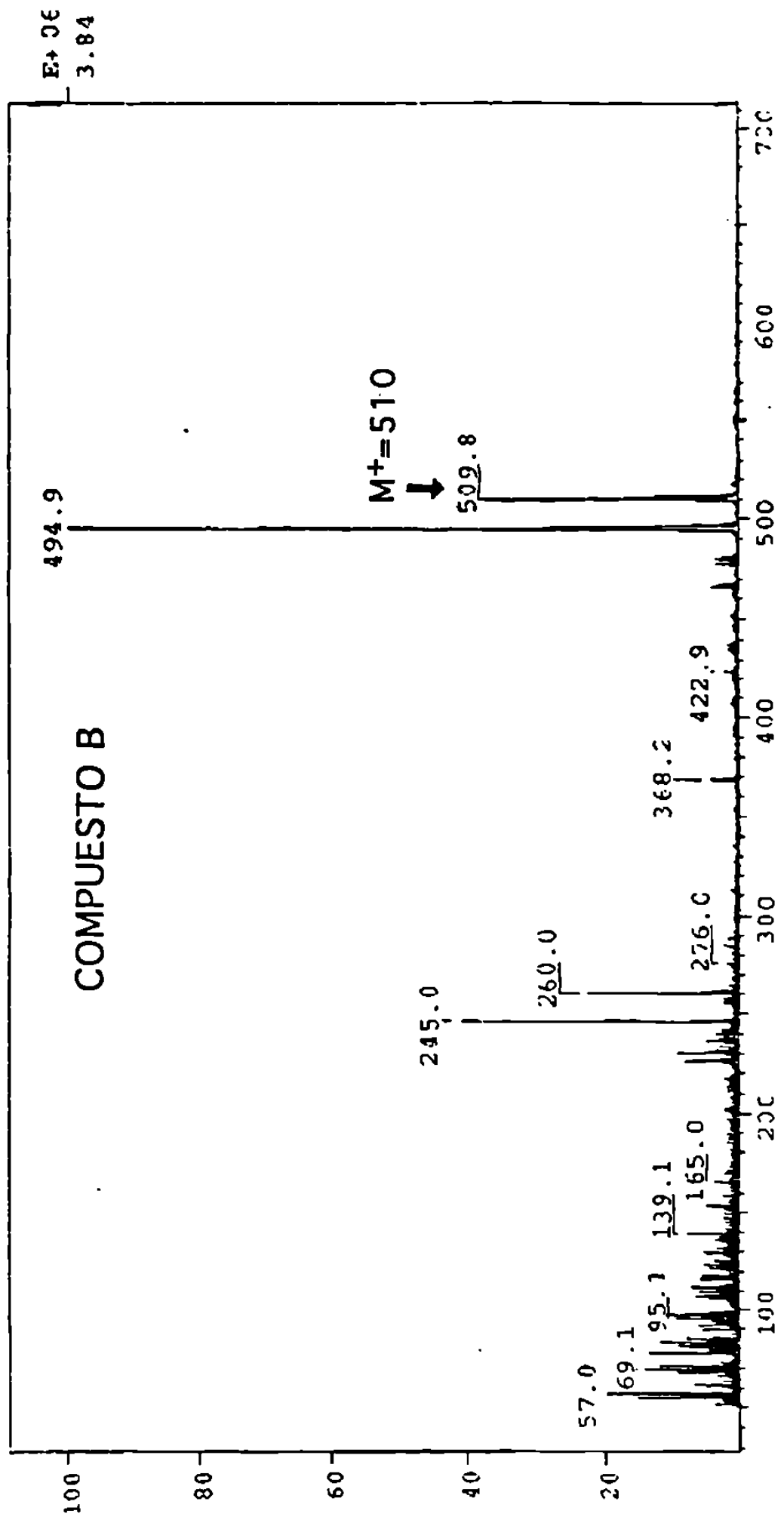


Fig. 29. Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto B.

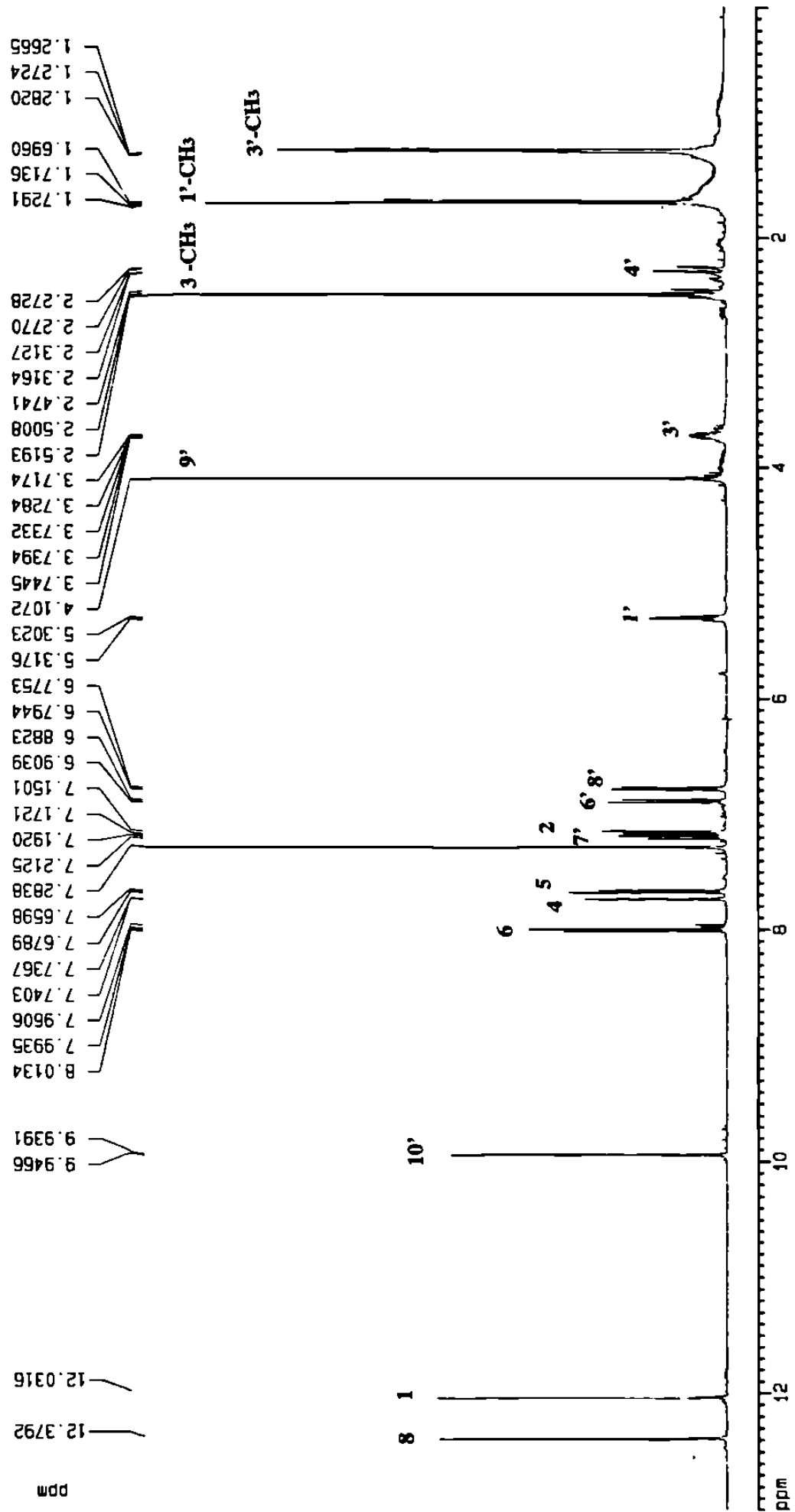


Fig. 30. Espectro 1H RMN del compuesto B (0-13 ppm).

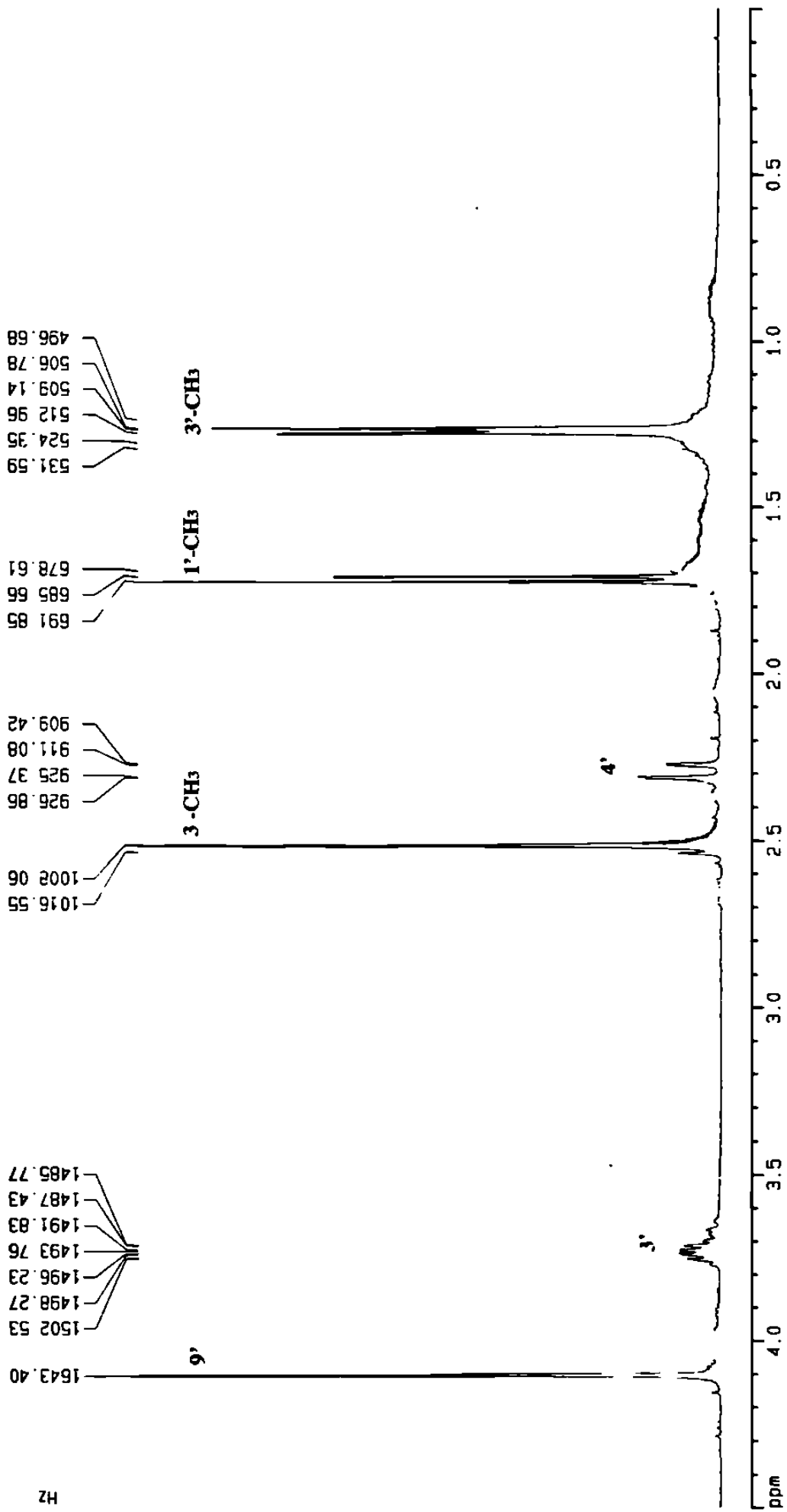


Fig. 31. Espectro ¹H RMN del compuesto B (0.0-4.5 ppm).

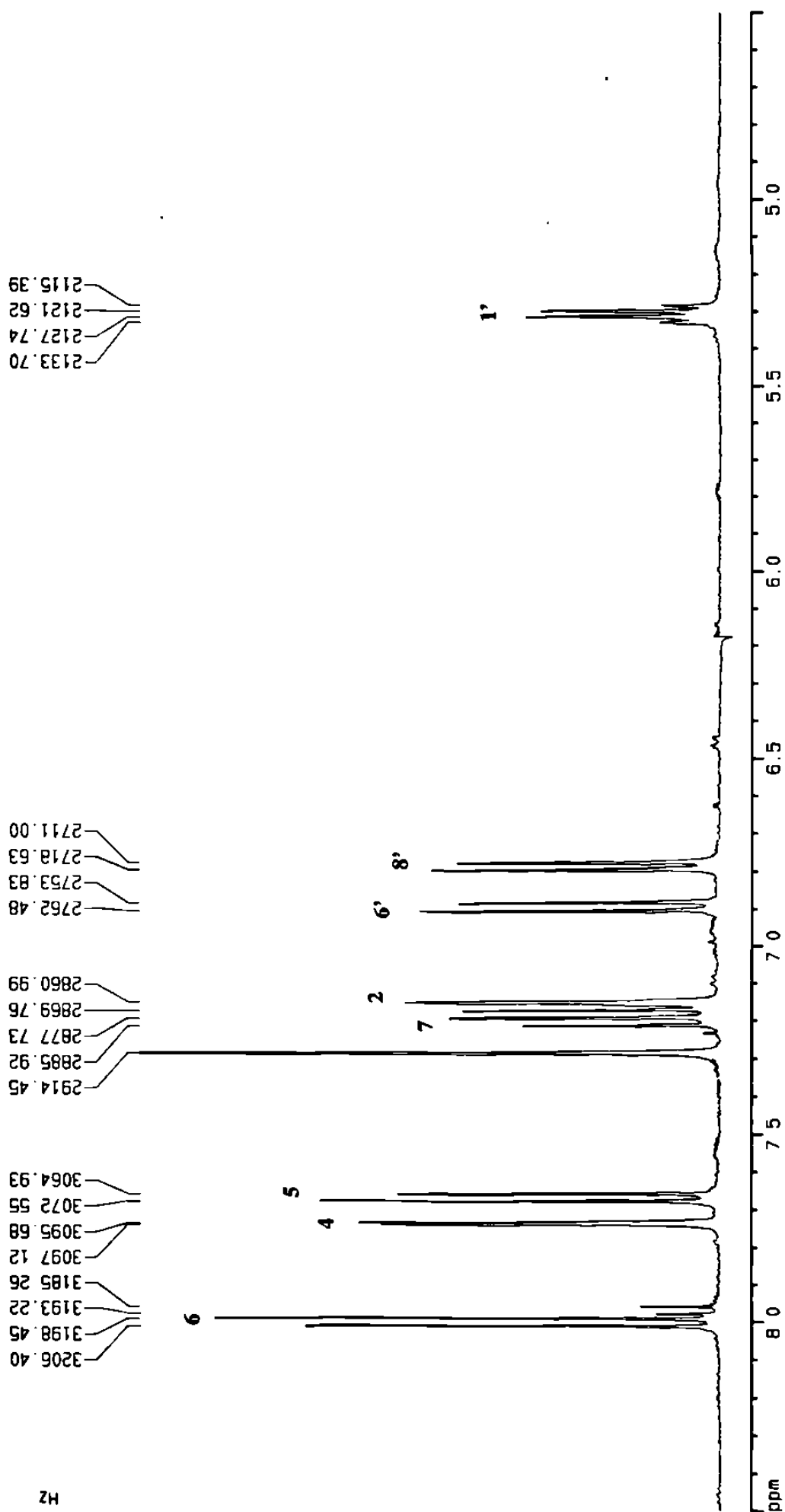


Fig. 32. Espectro 1H RMN del compuesto B (4.5-8.5 ppm).

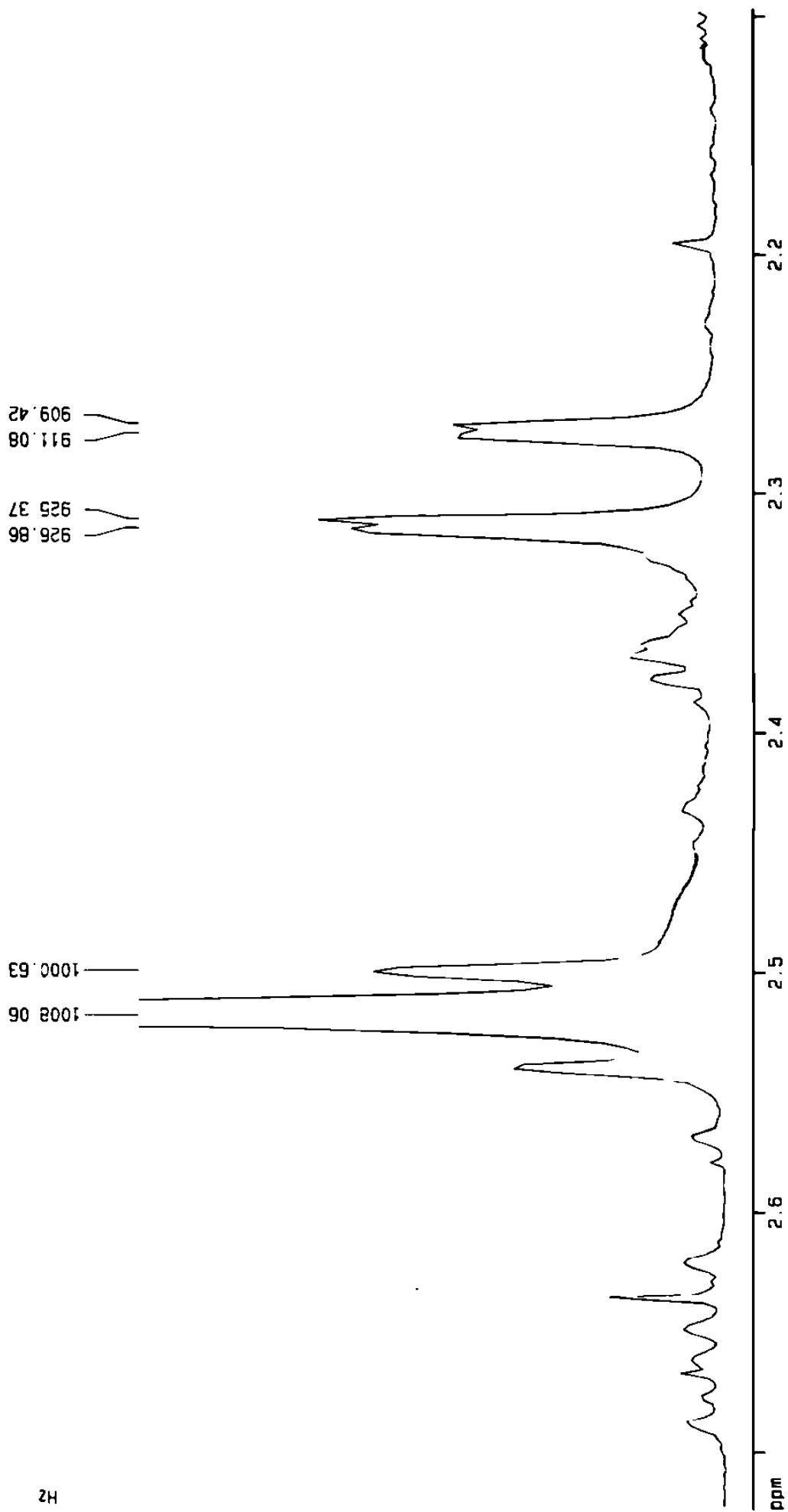


Fig. 33. Ampliación del espectro 1H RMN del compuesto B (2.1-2.7 ppm).

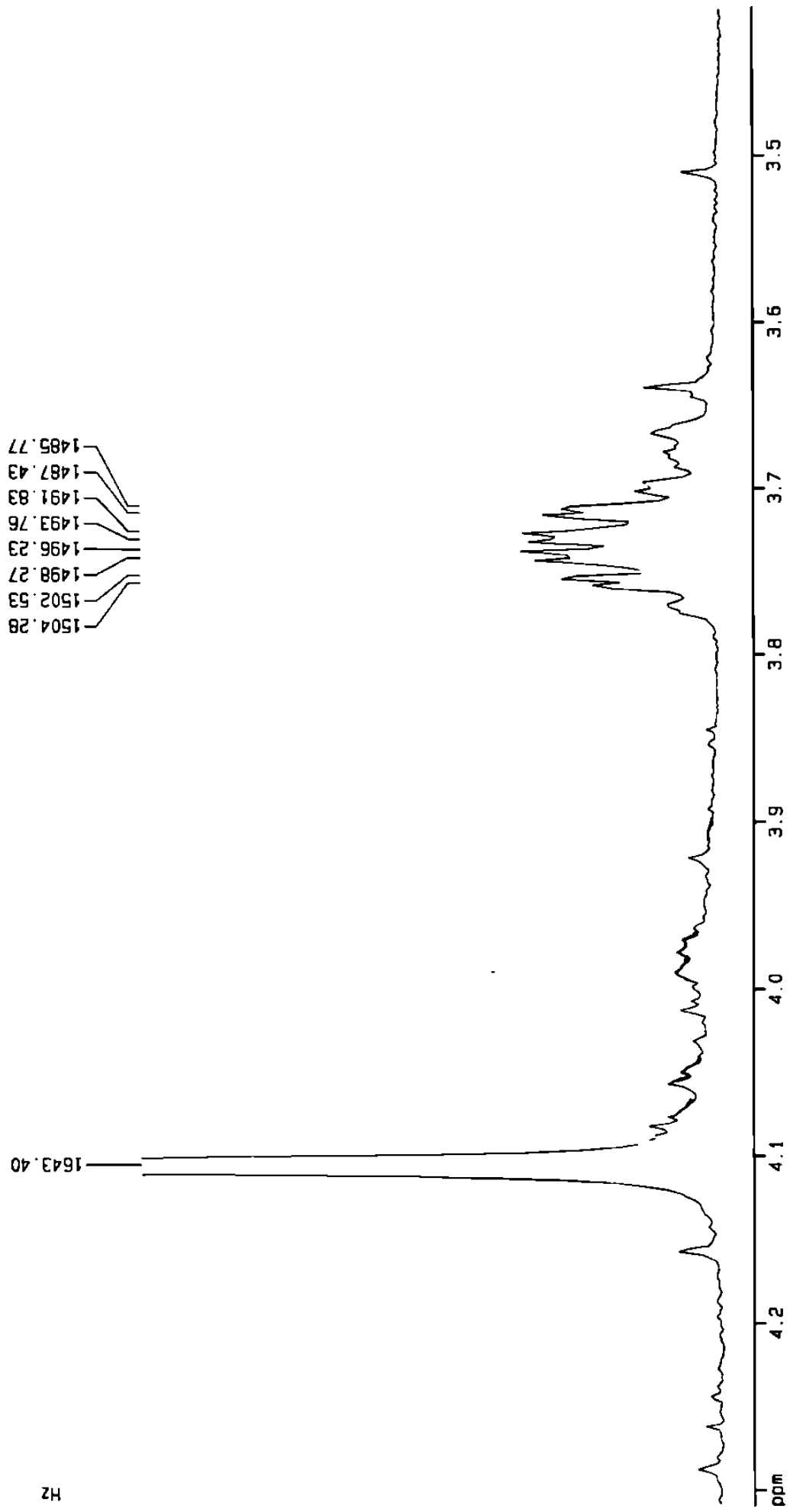


Fig. 34. Ampliación del espectro ¹H RMN del compuesto B (3.5-4.2 ppm).

2133.70
2127.74
2121.62
2115.39

H₂

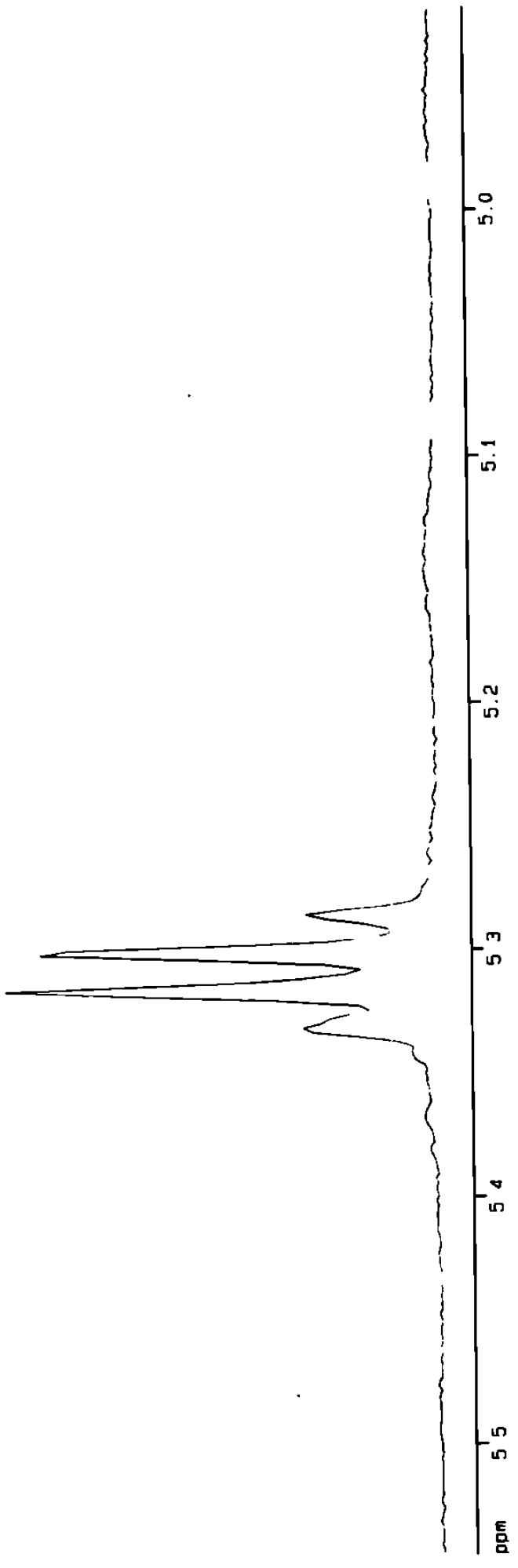


Fig. 35. Ampliación del espectro ¹H RMN del compuesto B (5.0-5.5 ppm).

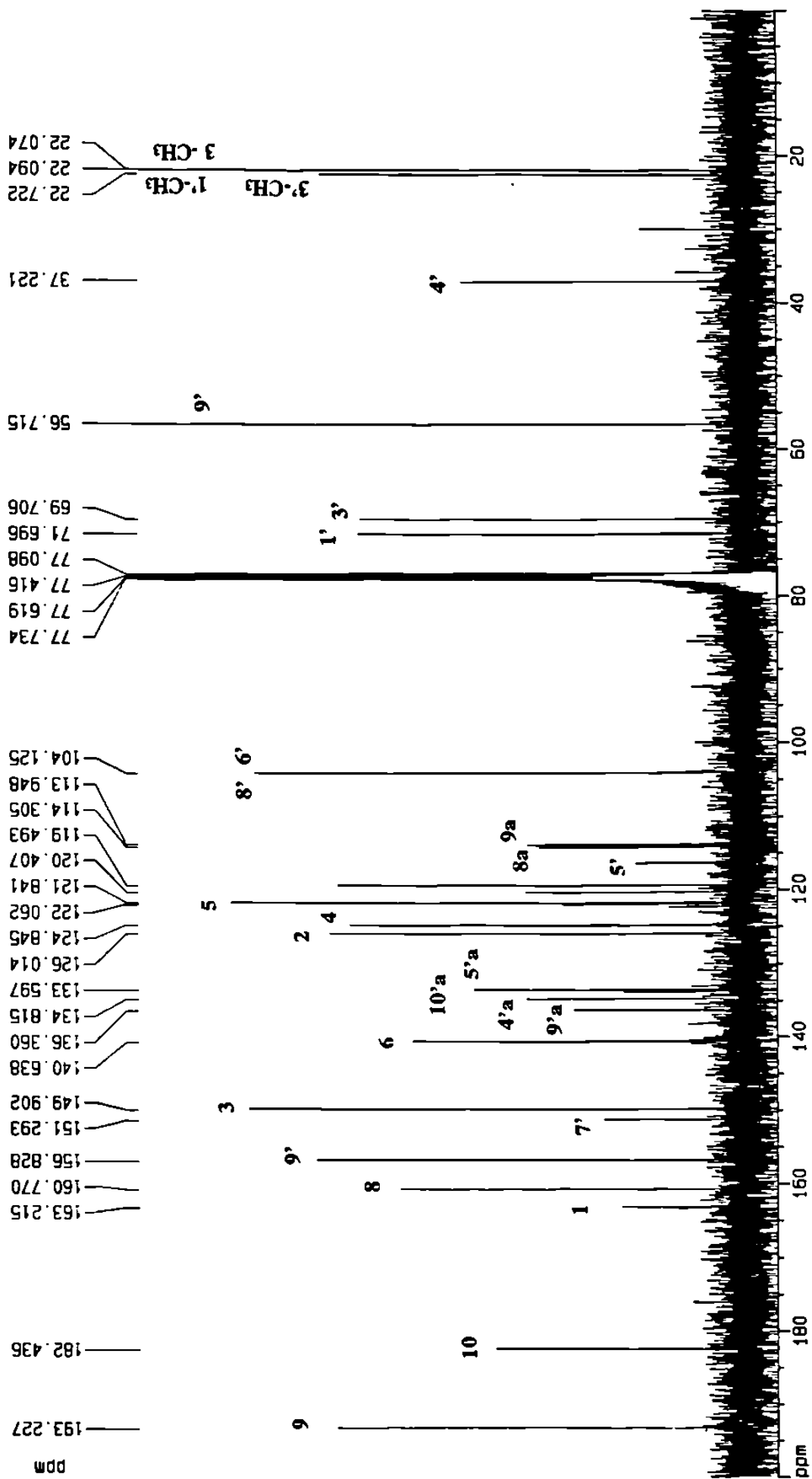


Fig. 36. Espectro ¹³C RMN del compuesto B (0-200 ppm).

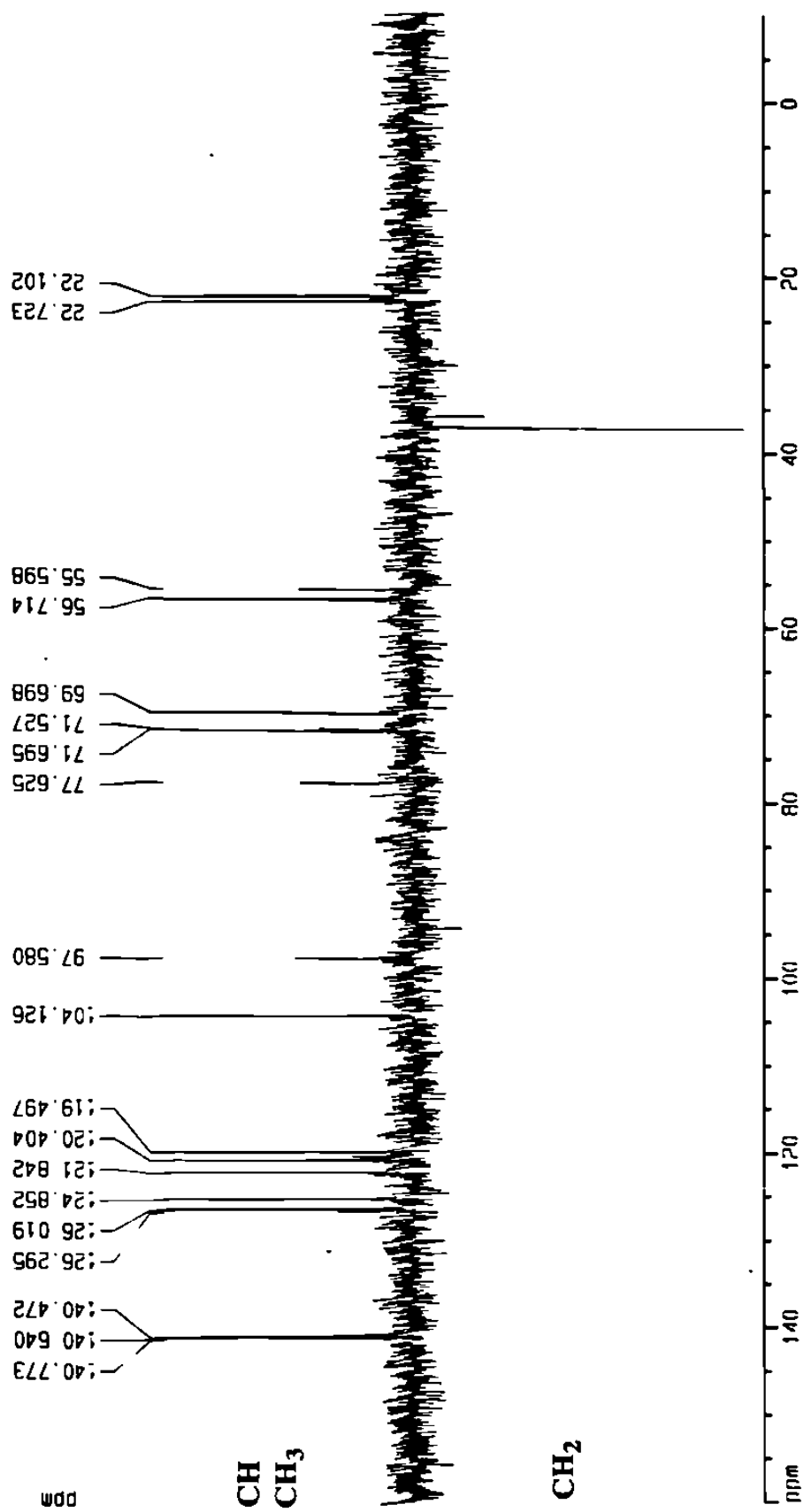


Fig. 37. Espectro DEPT 135 del compuesto B.

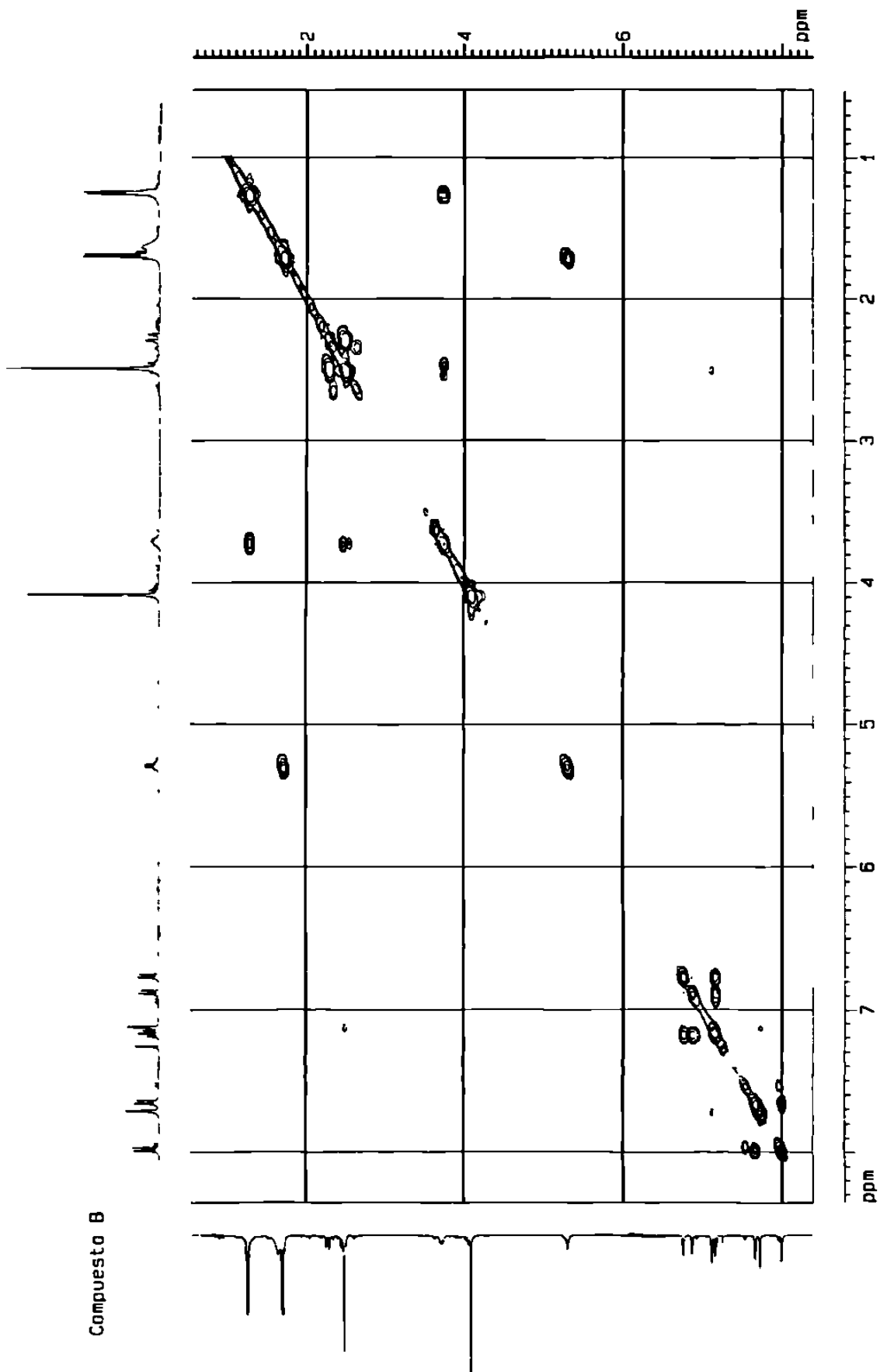


Fig. 38. Espectro COSY del compuesto B (0-8 ppm).

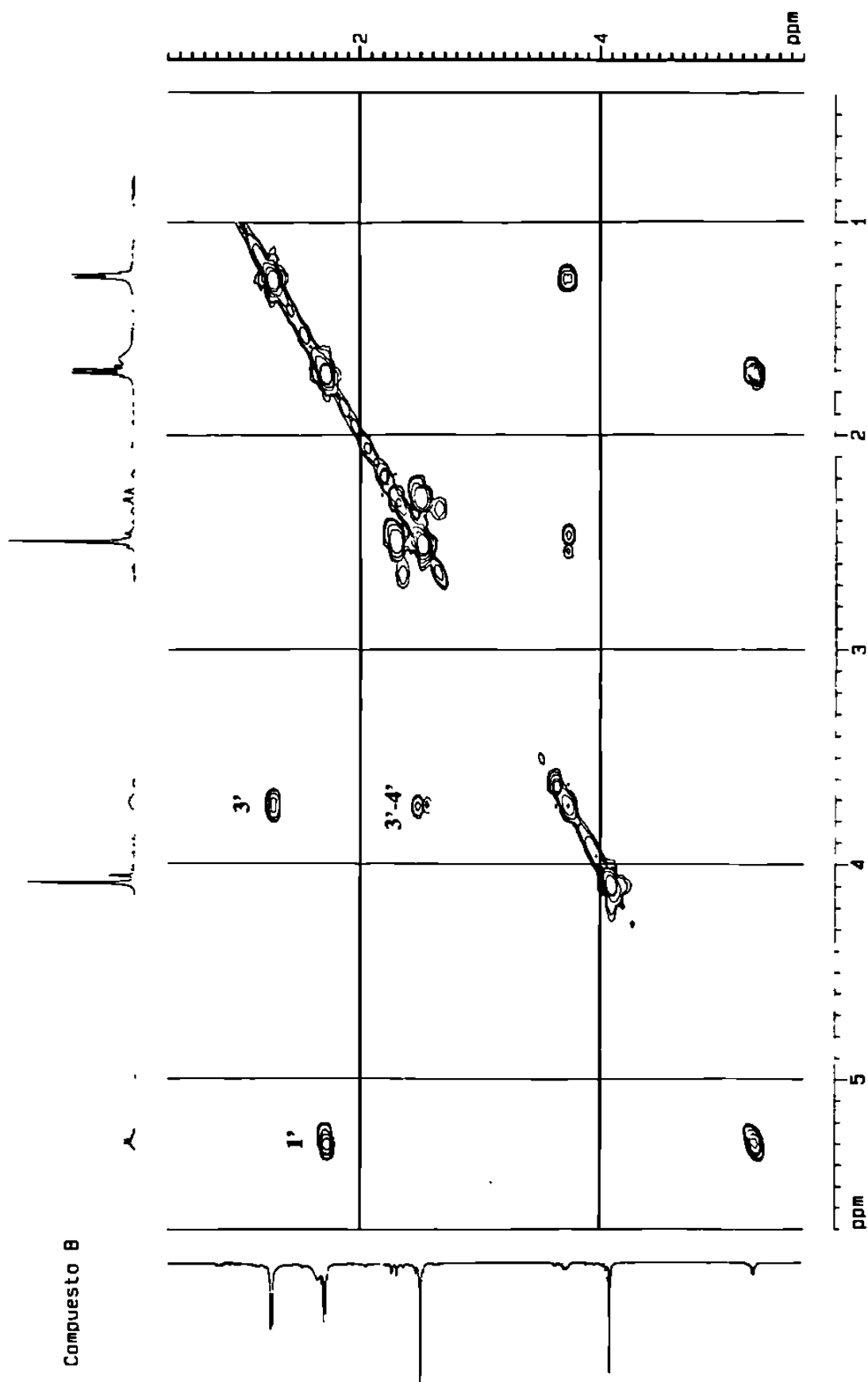


Fig. 39. Espectro COSY del compuesto B (0.0-5.5 ppm).

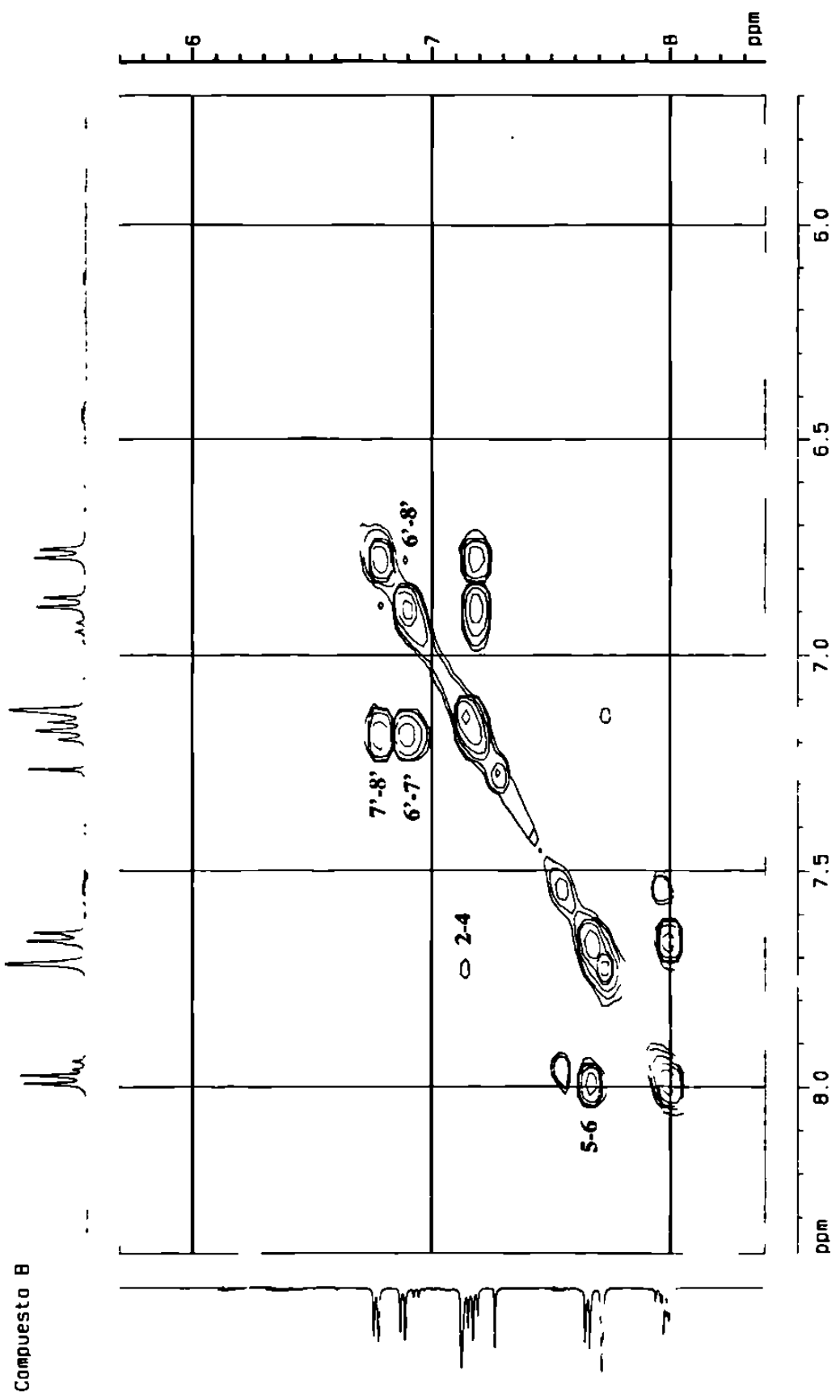


Fig. 40. Espectro COSY del compuesto B (6.0-8.4 ppm).

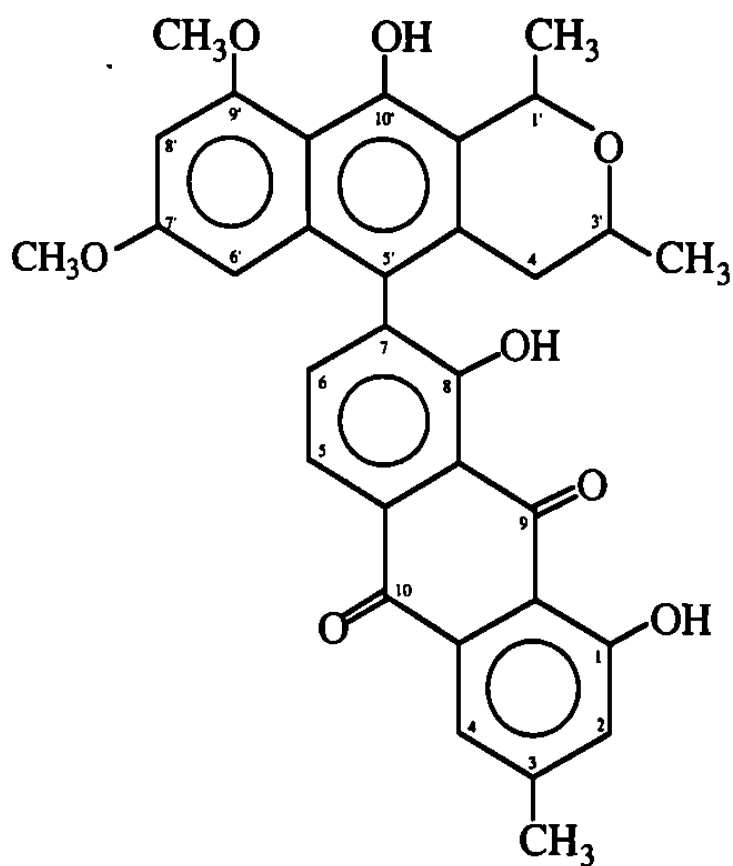


Fig. 41. Compuesto B (7-(3',4'-dihidro-9'-metoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto (2',3'-c')pirano-5'-il)-3metil-1,8-dihidroxi-antraquinona).

3.3.3. COMPUESTO E

3.3.3.1. Determinación de la pureza:

- a). Punto de descomposición: 240 °C.
- b). CCF: Usando como eluente 1c.
R_f de 0.42. No se reveló con KOH.
- c). CCF en fase reversa: Usando como eluente 2a.
R_f de 0.02
- d). CLAR analítico: Utilizando el programa 3a.
t_R de 7.98 y 8.07 (fig. 42).

3.4. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EAcOEt.

El extracto de acetato de etilo se fraccionó de acuerdo con el diagrama 4. Se obtuvieron 3 compuestos a los cuales se les designó G, H1 y H2. De los cuales se obtuvieron 25.0 mg de G, 25.6 mg de H1 y 30.4 mg de H2.

3.4.1. COMPUESTO G

3.4.1.1 Determinación de la pureza:

- a). Punto de fusión: 148 ± 2 °C.
- b). CCF: Usando como eluente 1b.
R_f de 0.28
- c). CCF en fase reversa: Utilizando como eluente 2b.
R_f de 0.53
- d). CLAR analítico: Utilizando el programa 3b.
t_R de 2.89 (fig. 43).

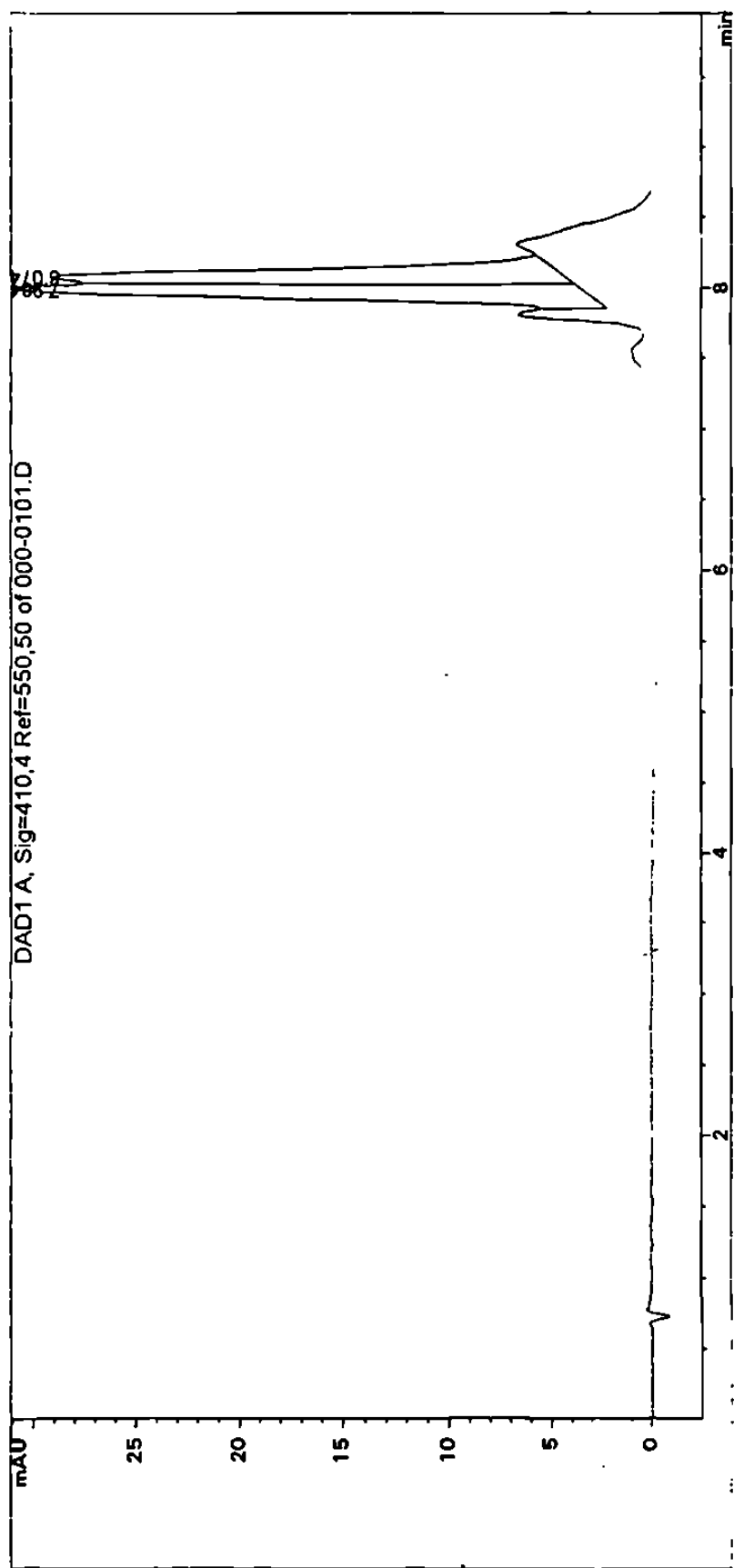
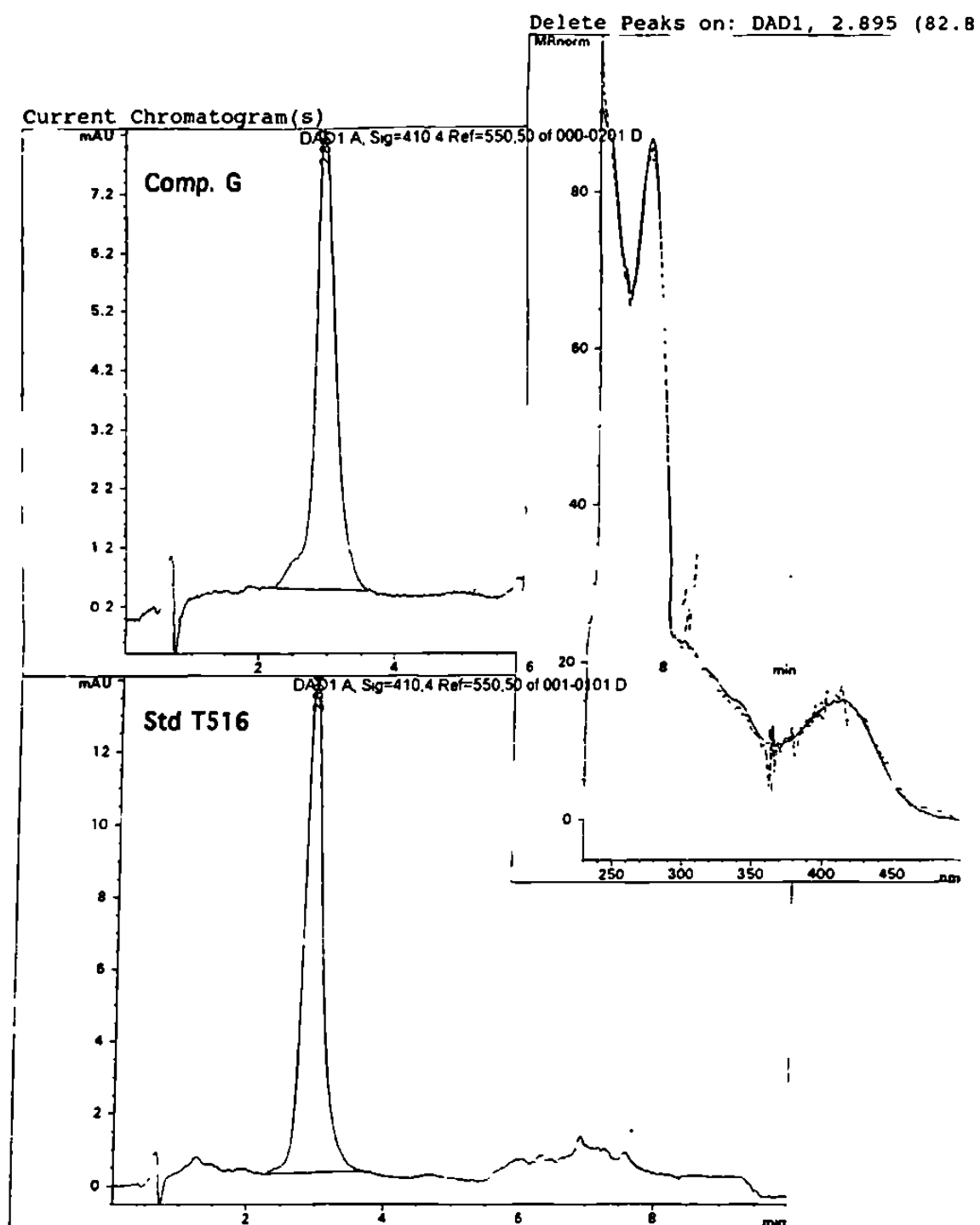


Fig. 42. Cromatograma del compuesto E en CLAR (programa 3a).



**Fig. 43. Cromatogramas del compuesto G y estandar T516.
Recuadro con espectros sobrepuestos.**

3.4.1.2. Elucidación de la estructura:

- Espectro de ^1H RMN en CDCl_3 (fig. 44).

La estructura propuesta para el compuesto G es la 7-(2'-acetil-6',8'-dimetoxi-3'-metil-1'-hidroxinaftol-4'-il)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracena que se muestra en la figura 45.

3.4.2. COMPUESTO H1.

3.4.2.1. Determinación de la pureza:

- a). Punto de descomposición: 175 °C.
Punto de carbonización: 225 °C.
- b). CCF: Utilizando como eluente 1b.
 R_f de 0.36
- c). CCF de fase reversa: Utilizando como eluente 2b.
 R_f de 0.47
- d). CLAR analítico: Utilizando el programa 3b.
 t_R de 3.79 (fig. 46).

3.4.2.2. Elucidación de la estructura:

- a). UV-Visible en metanol Merck (fig. 47).
- b). Espectro de Masas por impacto electrónico (fig. 48).
- c). Espectro de ^1H RMN, usando CDCl_3 como solvente (figs. 49, 50, 51).
- d). Espectro de ^{13}C RMN, usando CDCl_3 como solvente (fig. 52, 53).
- e). Espectro DEPT 135 (fig. 54).
- f). Espectro COSY (figs. 55, 56, 57).

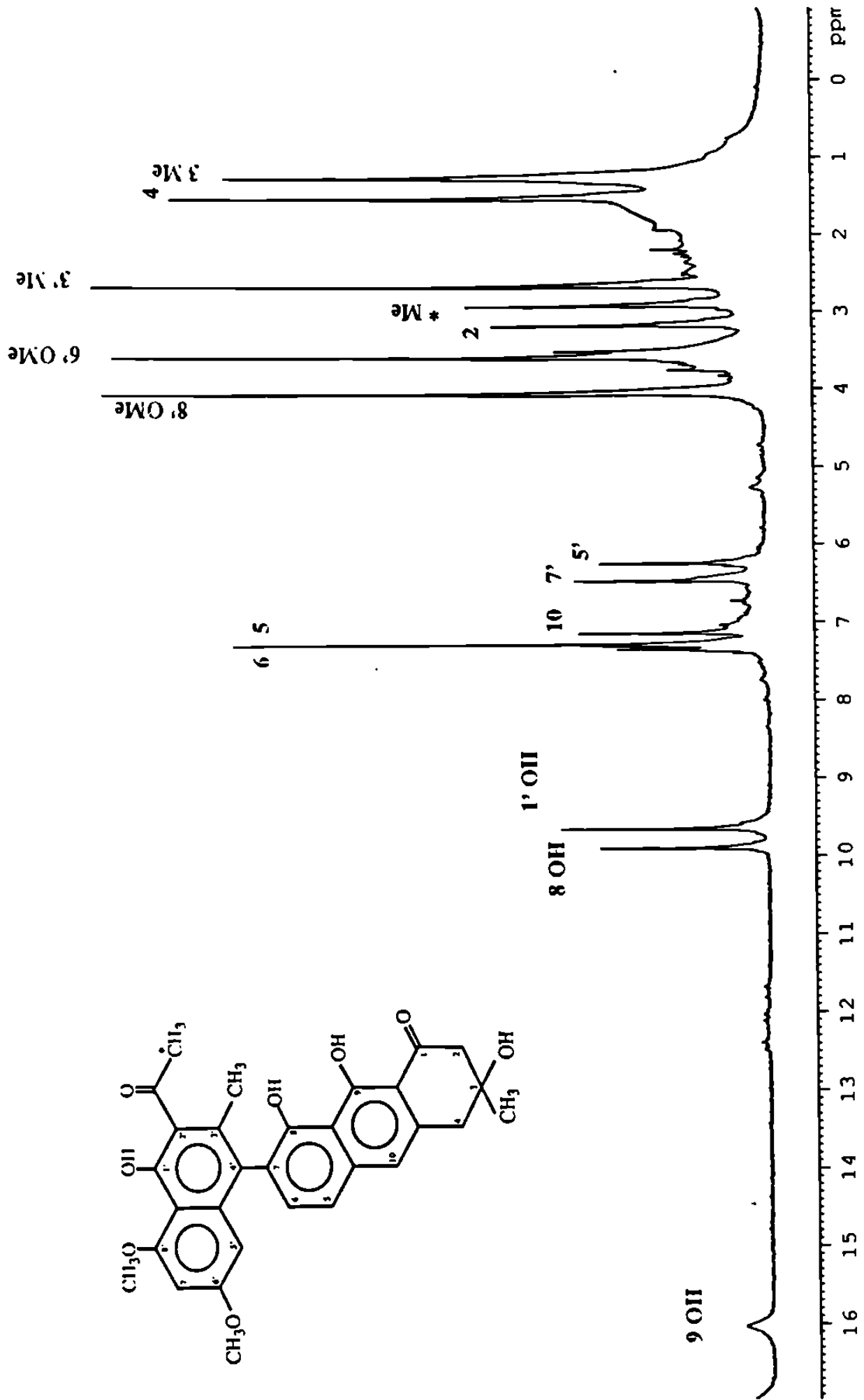


Fig. 44. Espectro ¹H RMN del compuesto G.

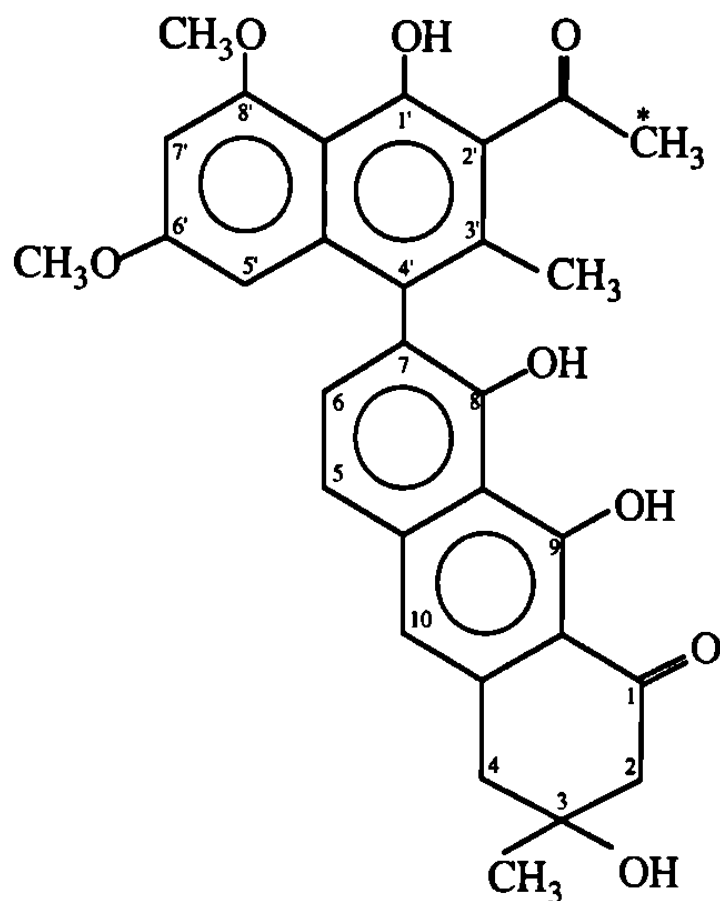
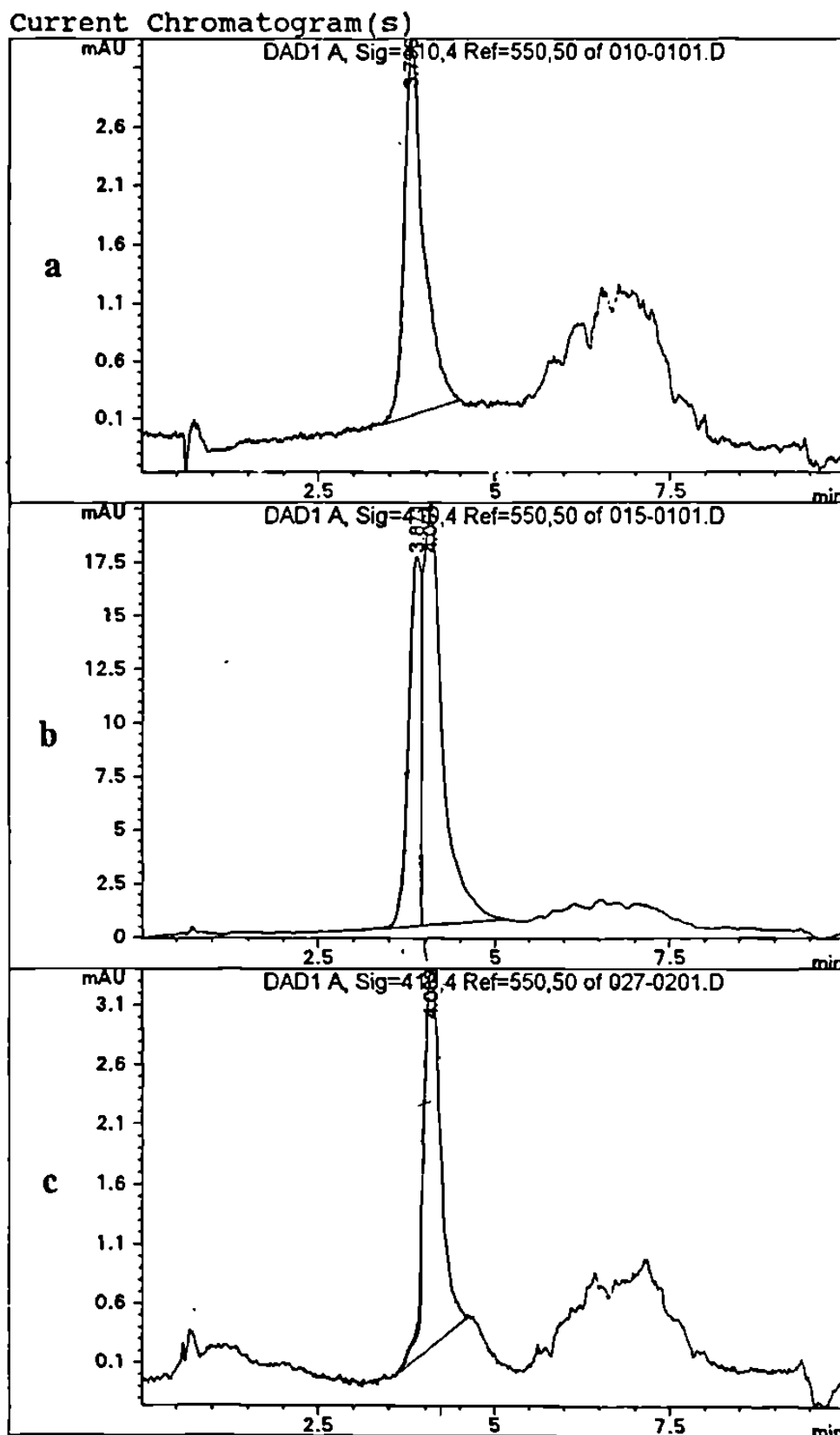


Fig. 45. Compuesto G (7-(2'-acetil-6',8'-dimetoxi-3'-metil -1'-hidroxinaftol -4'-il)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracena).



**Fig. 46. Cromatogramas en CLAR (programa 3b).
 a) Compuesto H1, b) Mezcla H,
 c) Compuesto H2.**

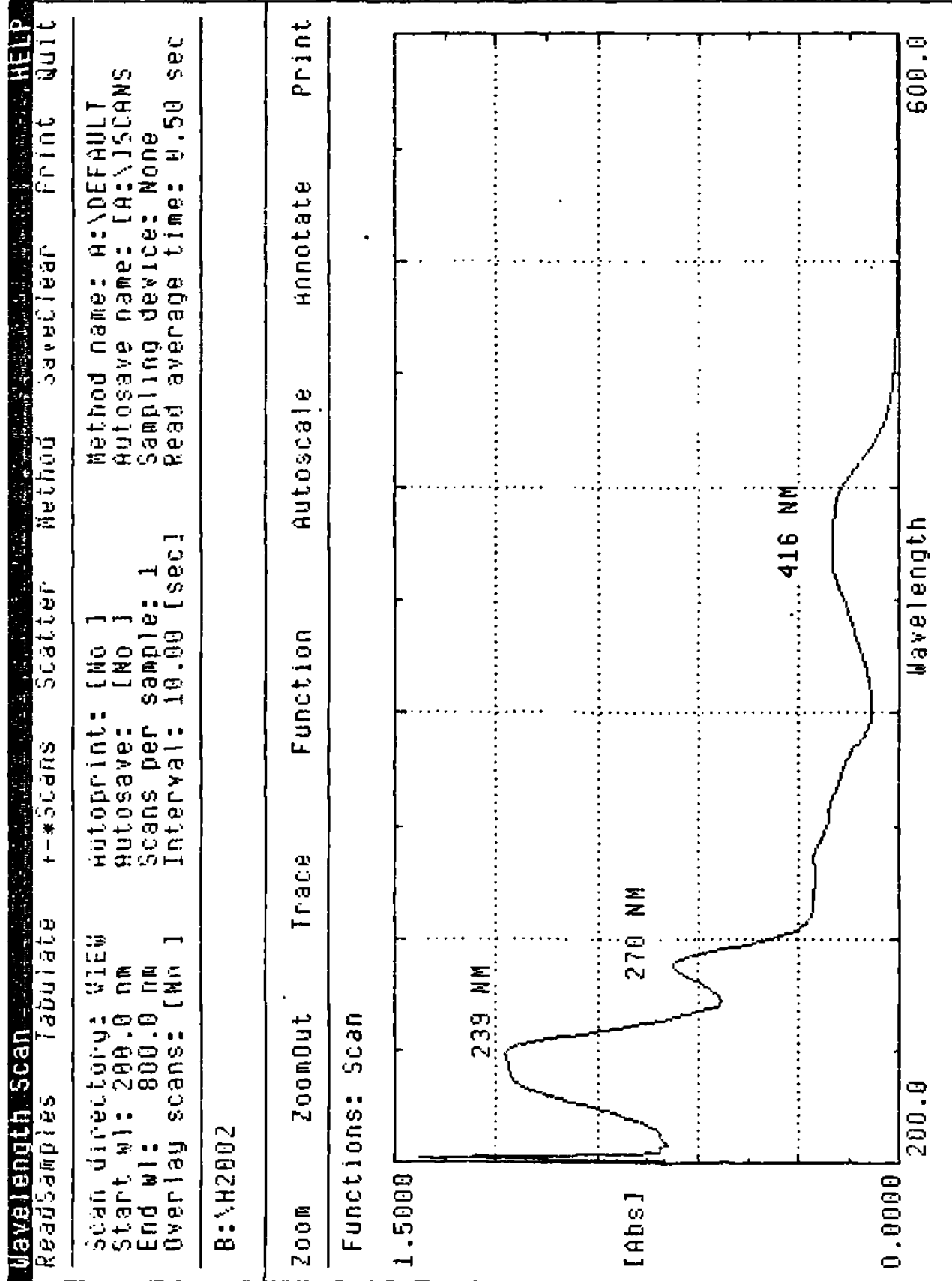


Fig. 47. Espectro UV-Visible del compuesto H1.

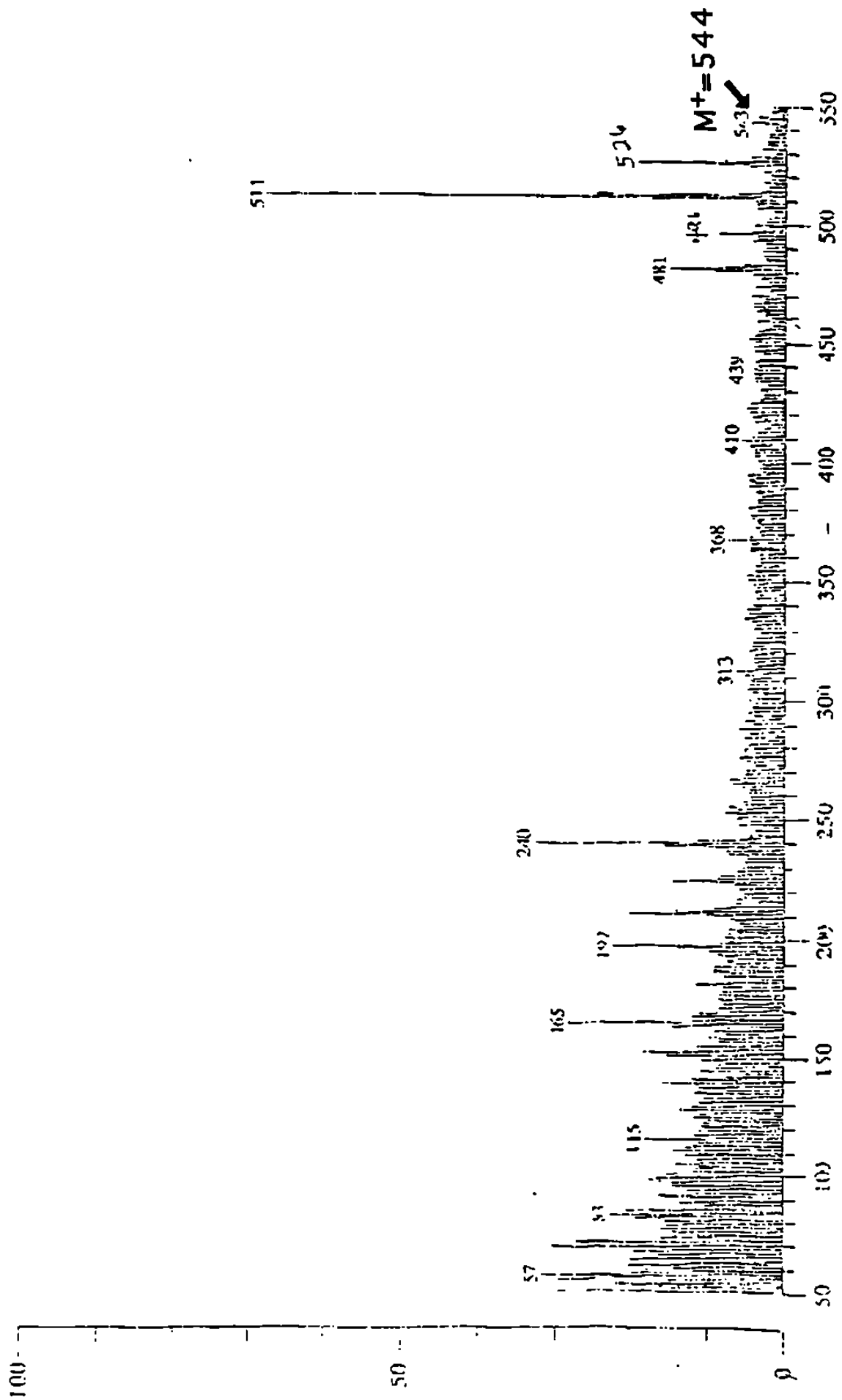


Fig. 48. Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto H1.

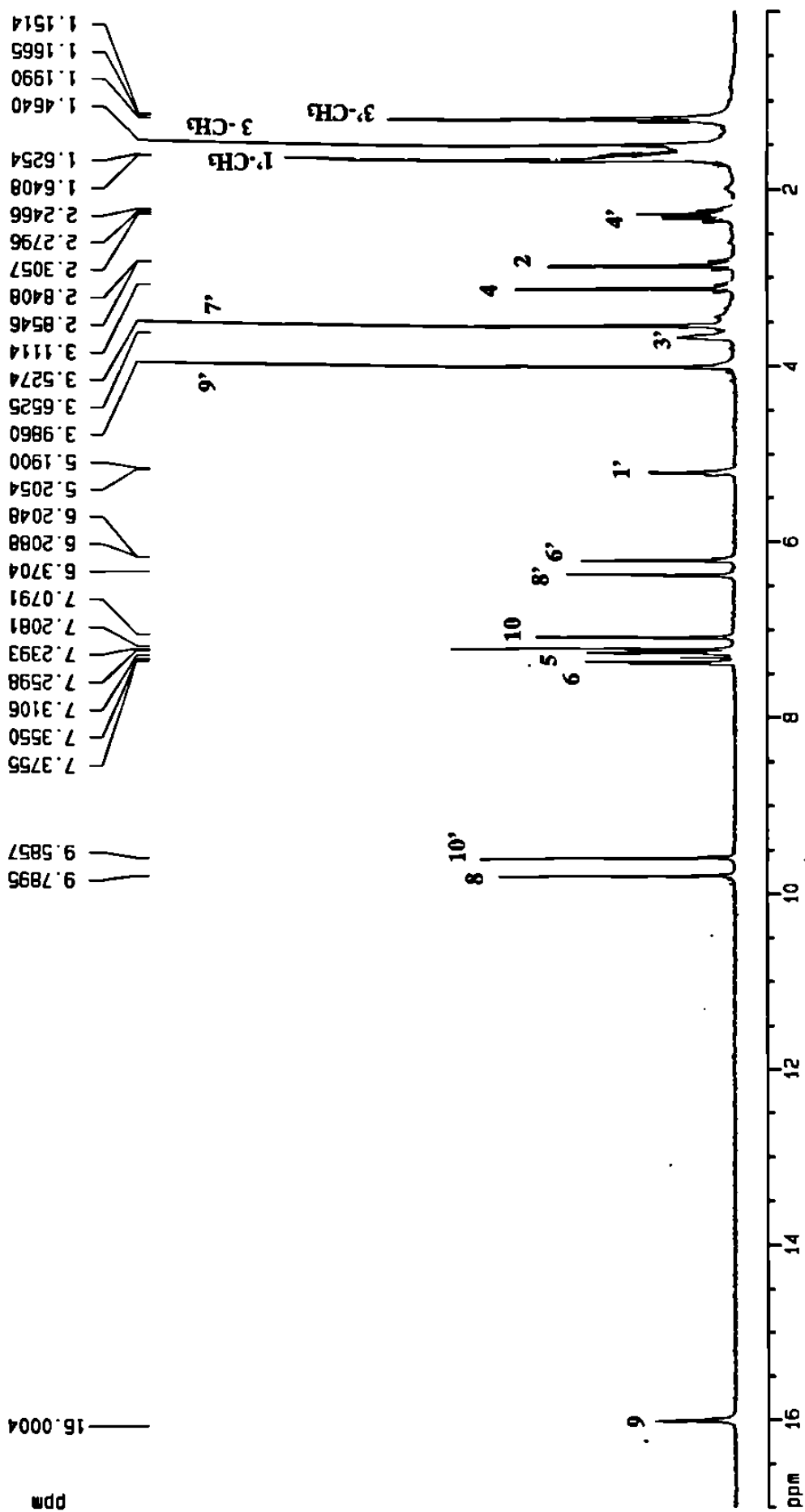


Fig. 49. Espectro ¹H RMN del compuesto H1 (0-17 ppm).

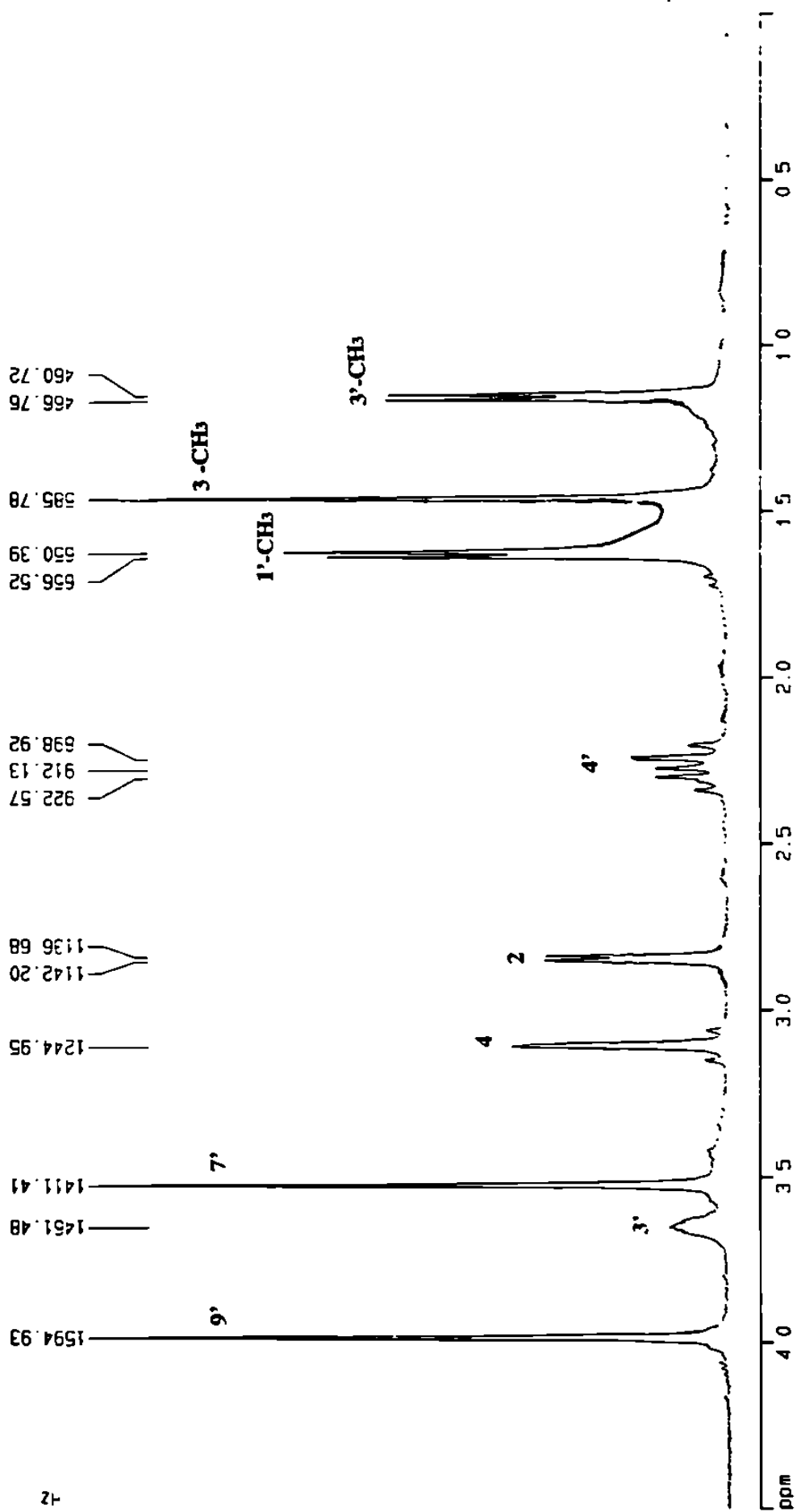


Fig. 50. Espectro ^1H RMN del compuesto H1 (0.0-4.5 ppm).

2082.85
2076.66

2548.97
2484.31
2482.72

2951.14
2942.95
2925.17
2904.88
2896.65
2884.19
2832.55

Hz

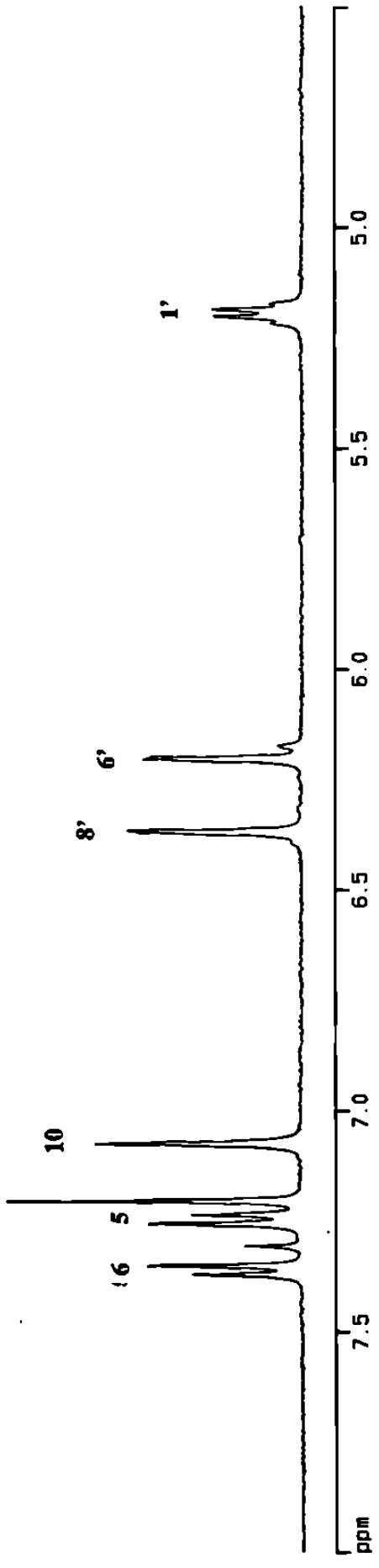


Fig. 51. Espectro ¹H RMN del compuesto H1 (4.5-8.0 ppm).

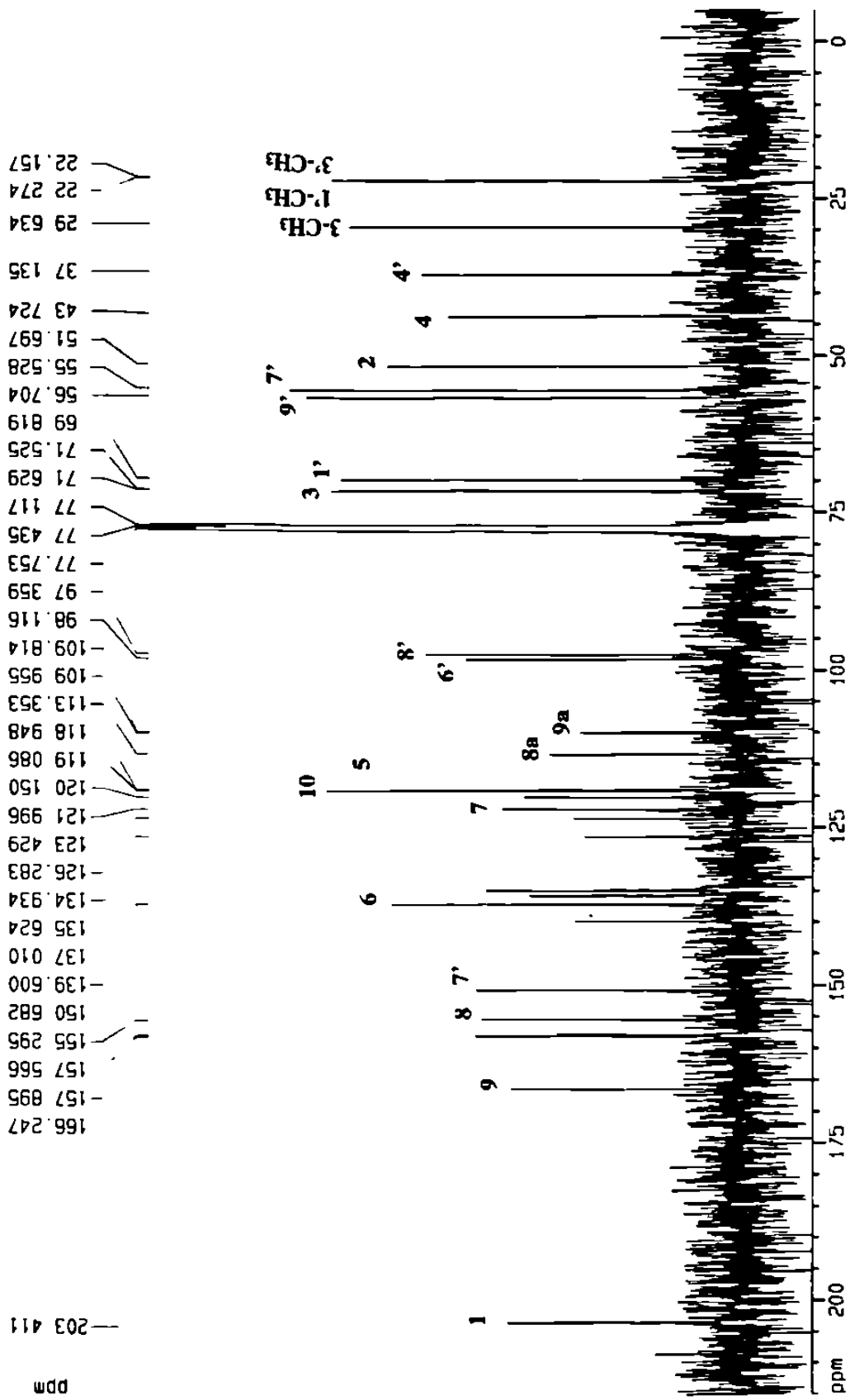


Fig. 52. Espectro ^{13}C RMN del compuesto H1 (0 -205 ppm).

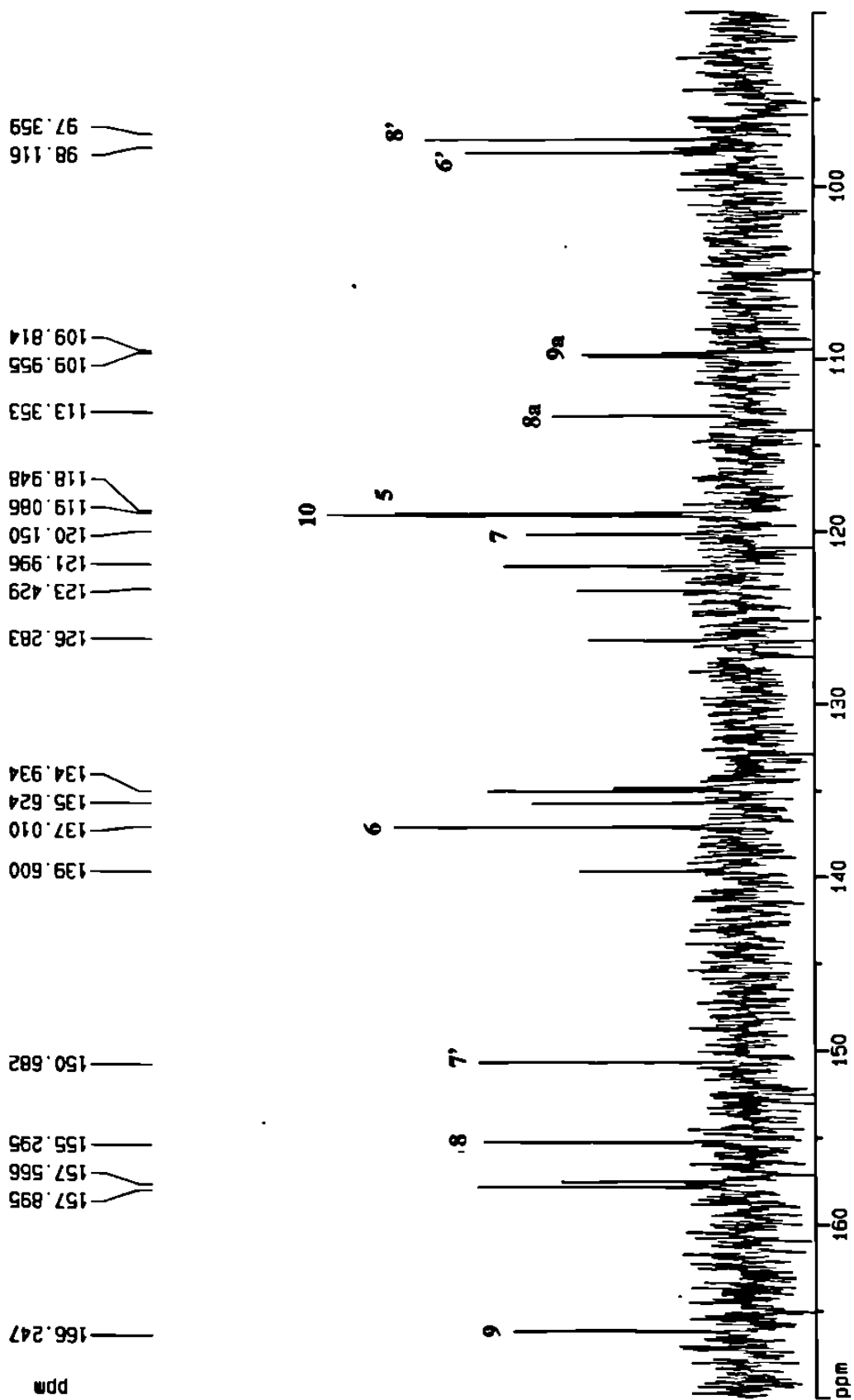


Fig. 53. Ampliación del espectro ¹³C RMN del compuesto H1 (90-170 ppm).

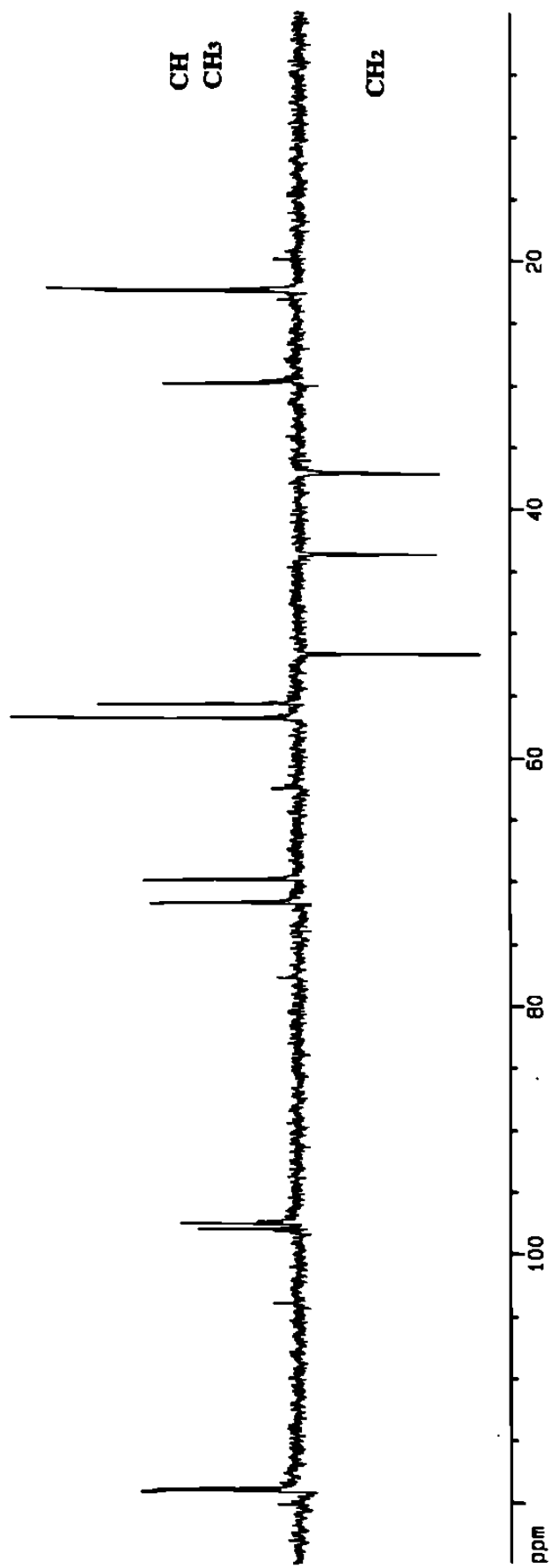


Fig. 54. Espectro DEPT 135 del compuesto H1.

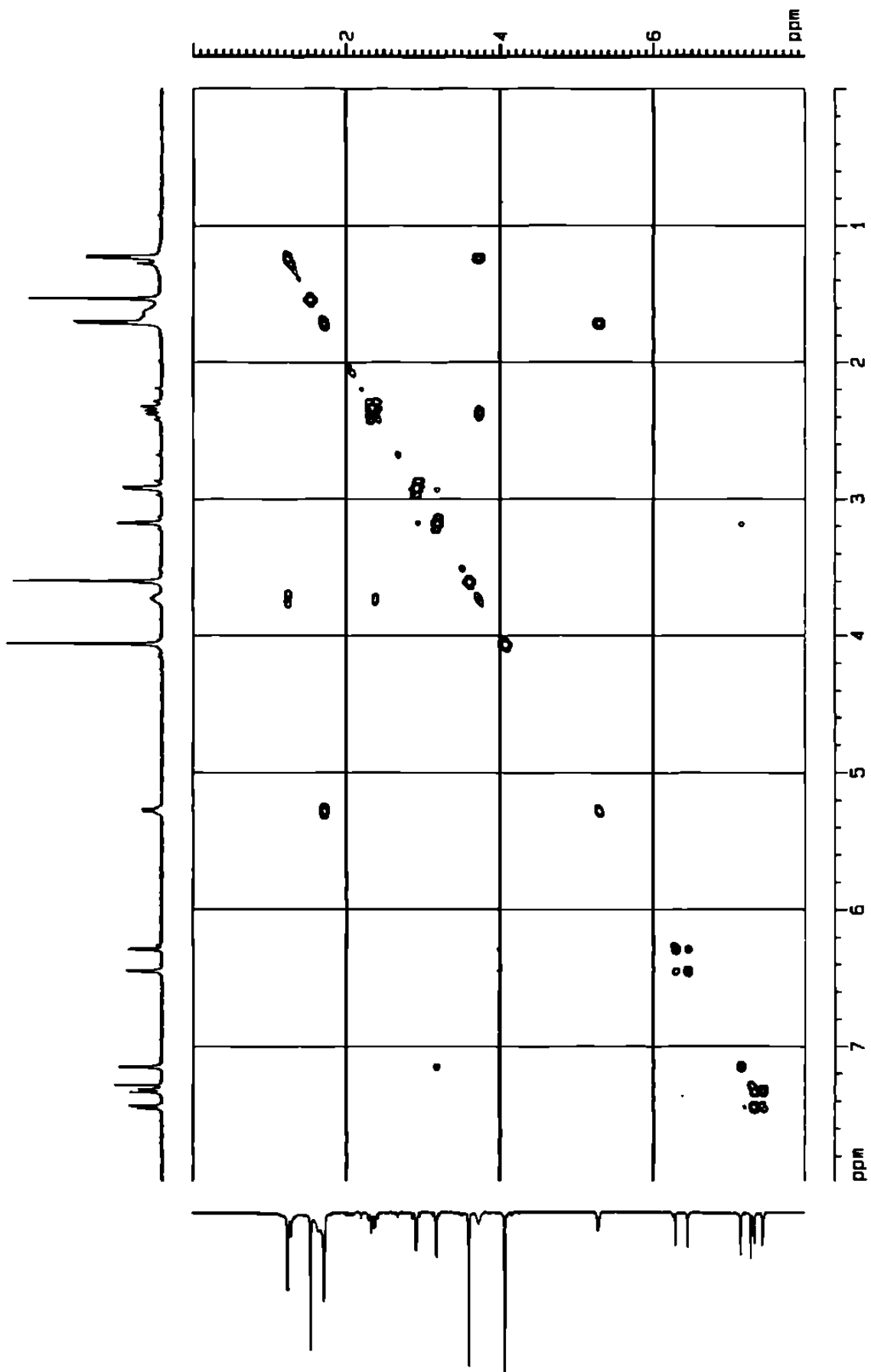


Fig. 55. Espectro COSY del compuesto H1 (0-8 ppm).

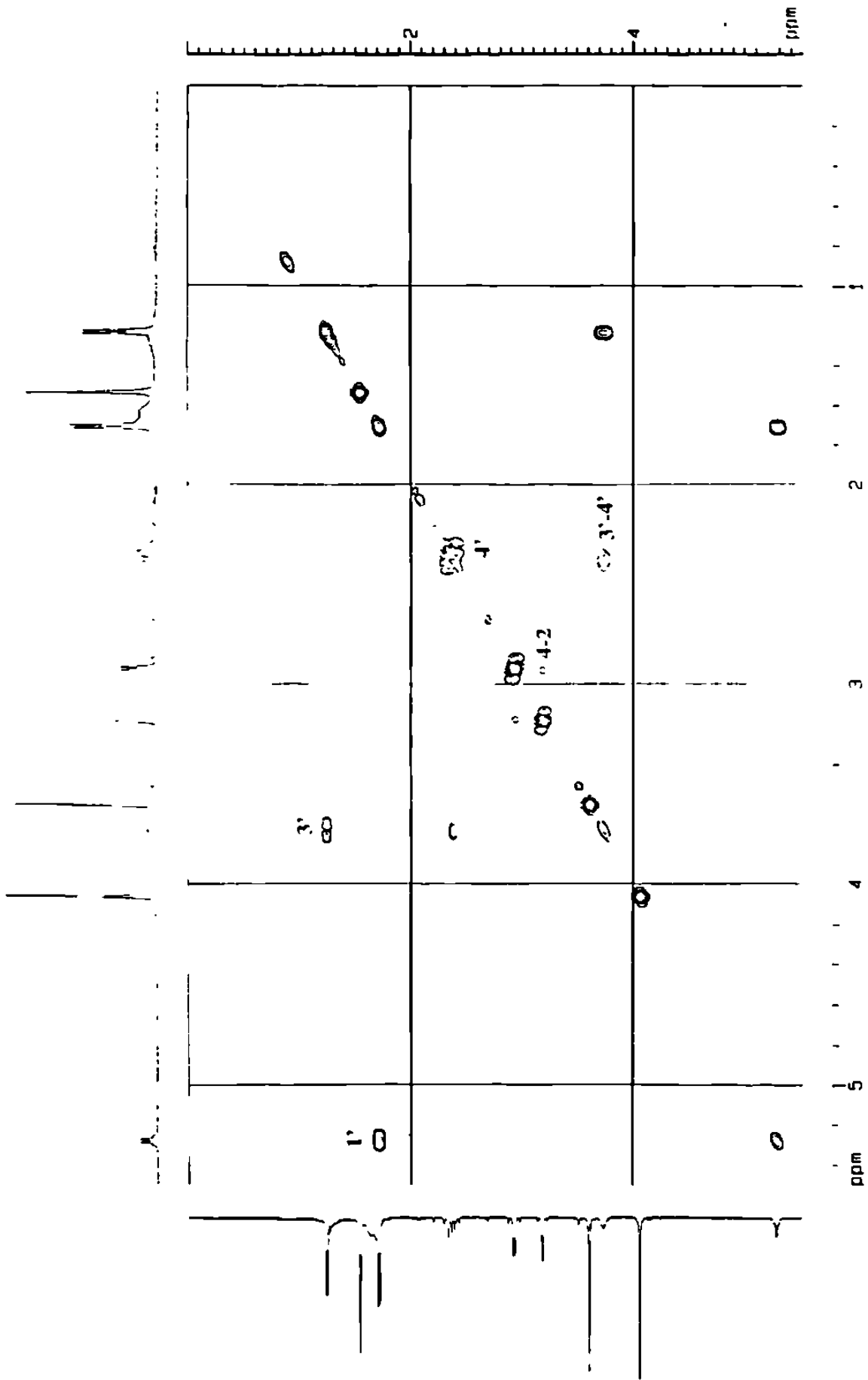


Fig. 56. Espectro COSY del compuesto III (0.0-5.5 ppm).

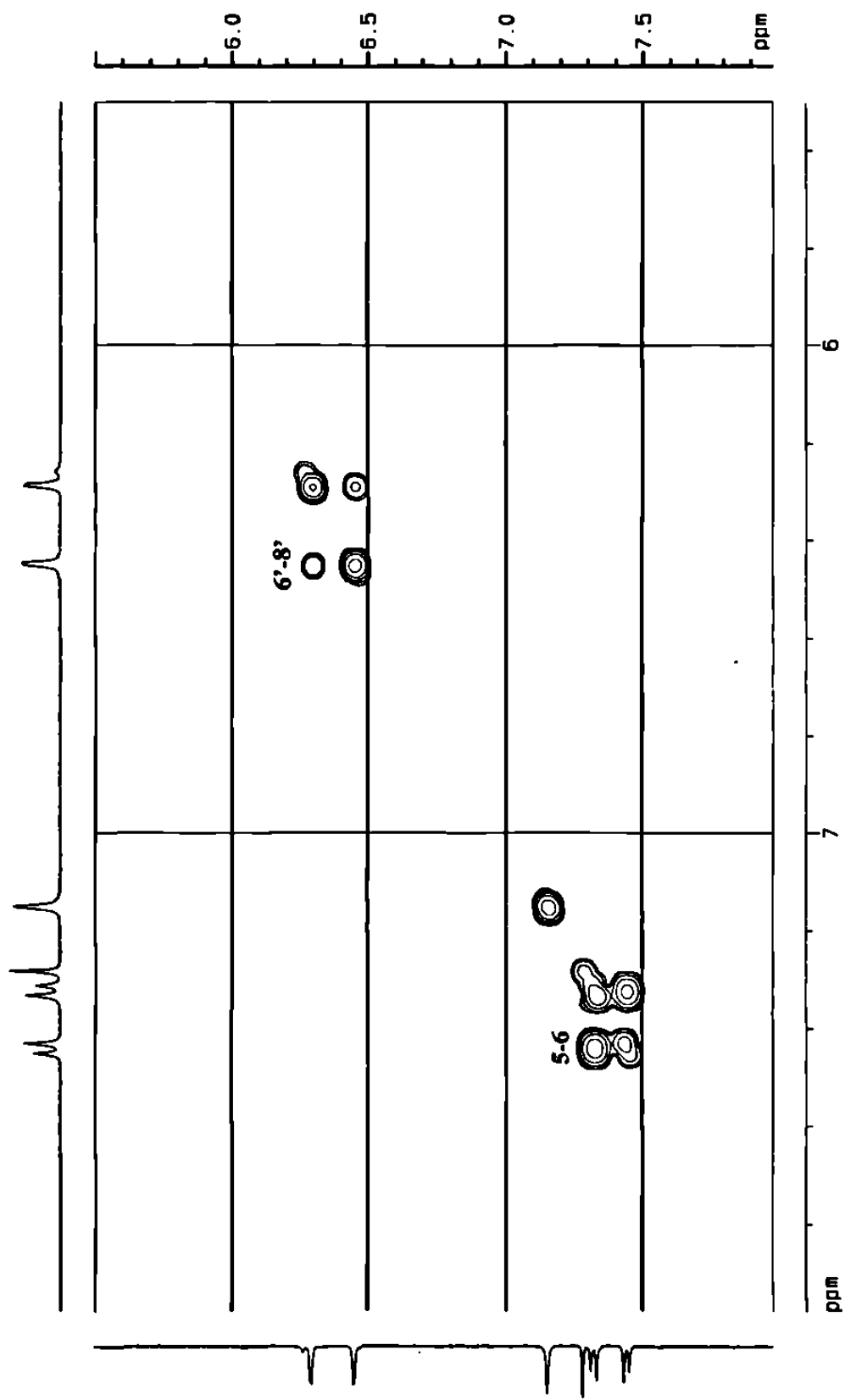


Fig. 57. Espectro COSY del compuesto H1 (5.5-8.0 ppm).

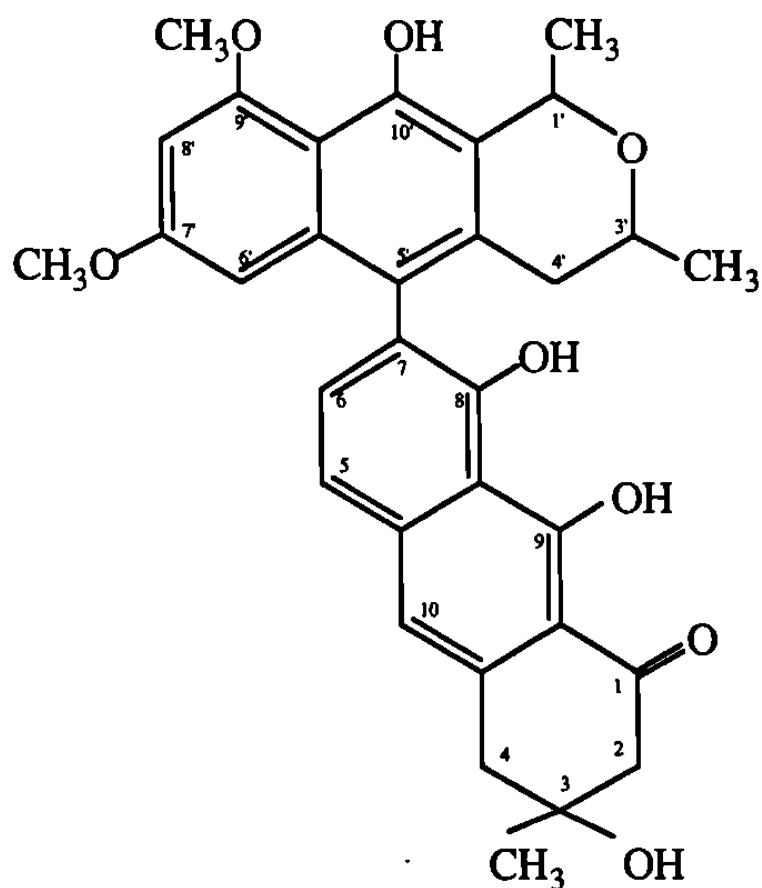


Fig. 58. Compuesto H1 (7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi -1'H-nafto (2',3'-c') pirano-5'-il) -3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracenona).

La estructura propuesta para el compuesto H1 es 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-naftol(2',3'-c')pirano-5'-il)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracena como se muestra en la figura 58.

3.4.3. COMPUESTO H2.

3.4.2.1. Determinación de la pureza:

- a). Punto de descomposición: 175 °C.
Punto de carbonización: 225 °C.
- b). CCF: Utilizando como eluente 1b.
R_f de 0.36
- c). CCF de fase reversa: Utilizando como eluente 2b.
R_f de 0.43
- d). CLAR analítico: Utilizando como eluente 3b.
t_R de 4.08 (fig. 46).

3.4.2.2. Elucidación de la estructura:

- a). UV-Visible en metanol Merck (fig. 59).
- b). Espectro de Masas por impacto electrónico (fig. 60).
- c). Espectro de ¹H RMN, usando CDCl₃ como solvente (fig. 61, 62, 63).
- d). Espectro de ¹³C RMN, usando CDCl₃ como solvente (fig. 64, 65).
- e). Espectro COSY (fig. 66, 67, 68).
- f). Espectro HMQC (fig. 69).

La estructura propuesta para el compuesto H2 es 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-naftol(2',3'-c')pirano-5'-il)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracena como se muestra en la figura 70.

```

Wavelength Scan
ReadSamples  tabulate  +-#Scans  Scatter  Method  SaveClear  Print  Quit
Scan directory: VIEW  Autoprint: [No ]  Method name: A:\DEFAULT
Start wl: 200.0 nm  Autosave: [No ]  Autosave name: LA:\JSCANS
End wl: 800.0 nm  Scans per sample: 1  Sampling device: None
Overlay scans: [No ]  Interval: 10.00 [sec]  Read average time: 0.50 sec

```

B:\H2002

```

Zoom  ZoomOut  Trace  Function  Autoscale  Annotate  Print

```

Functions: Scan

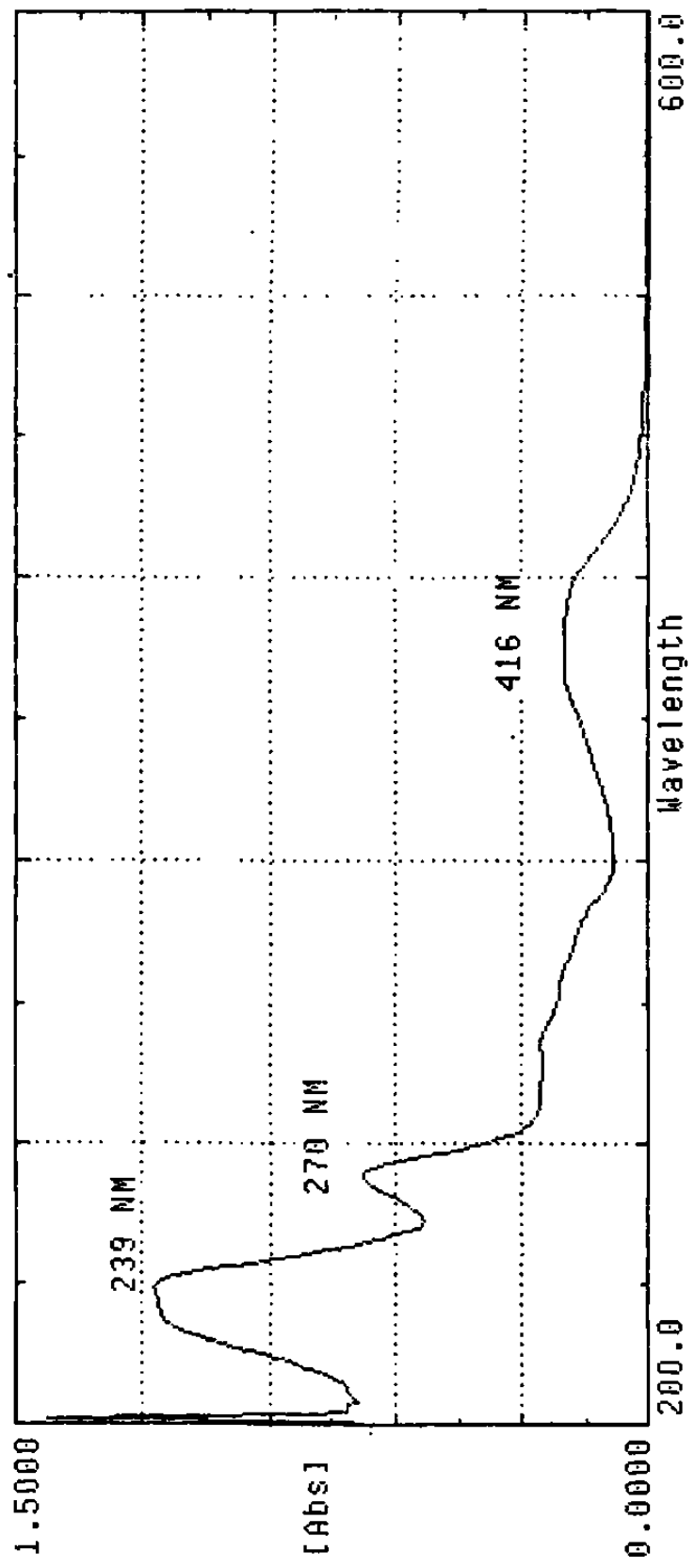


Fig. 59. Espectro UV-Visible del compuesto H2.

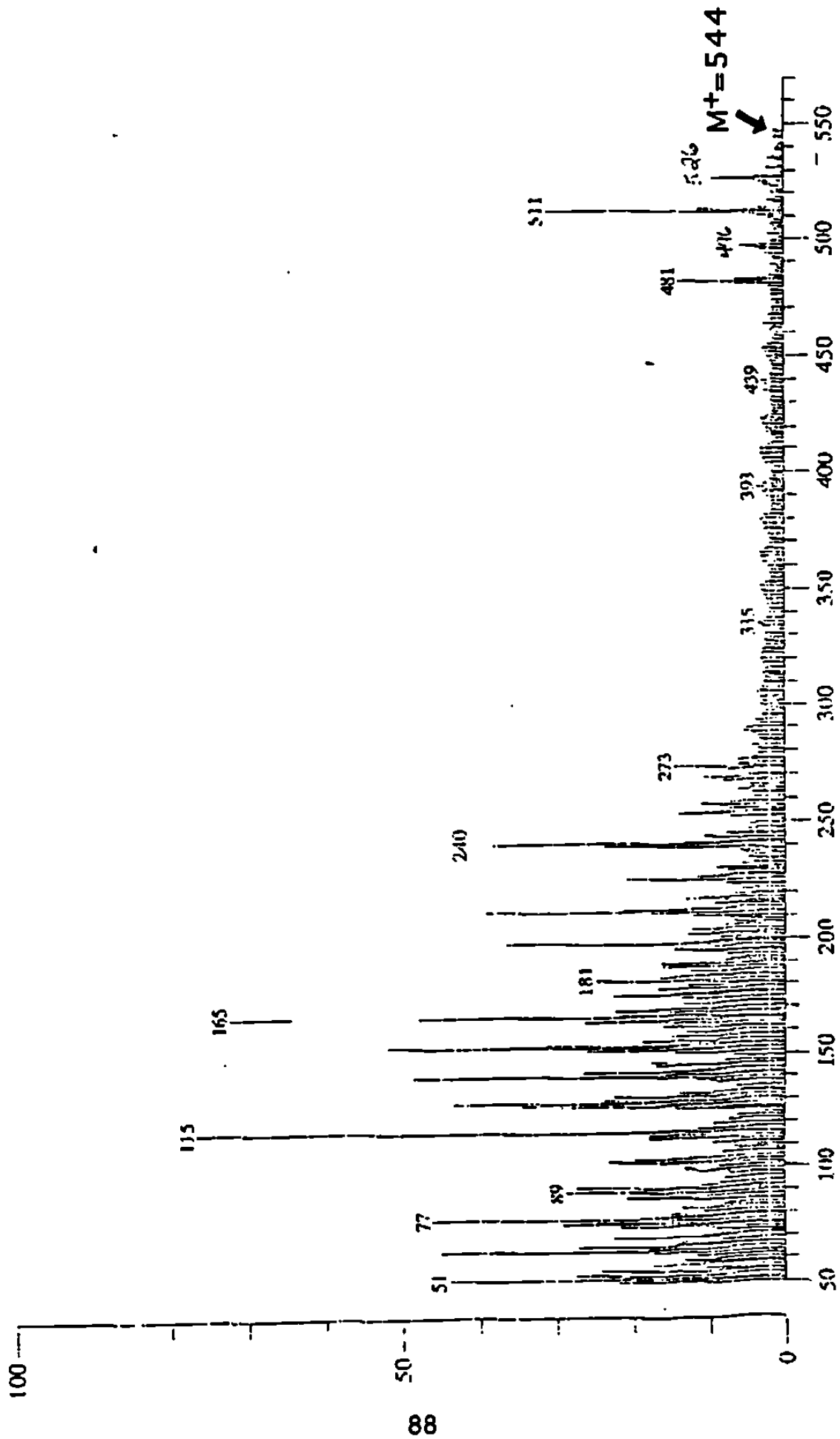


Fig. 60. Espectro de masas por impacto electrónico del compuesto H2.

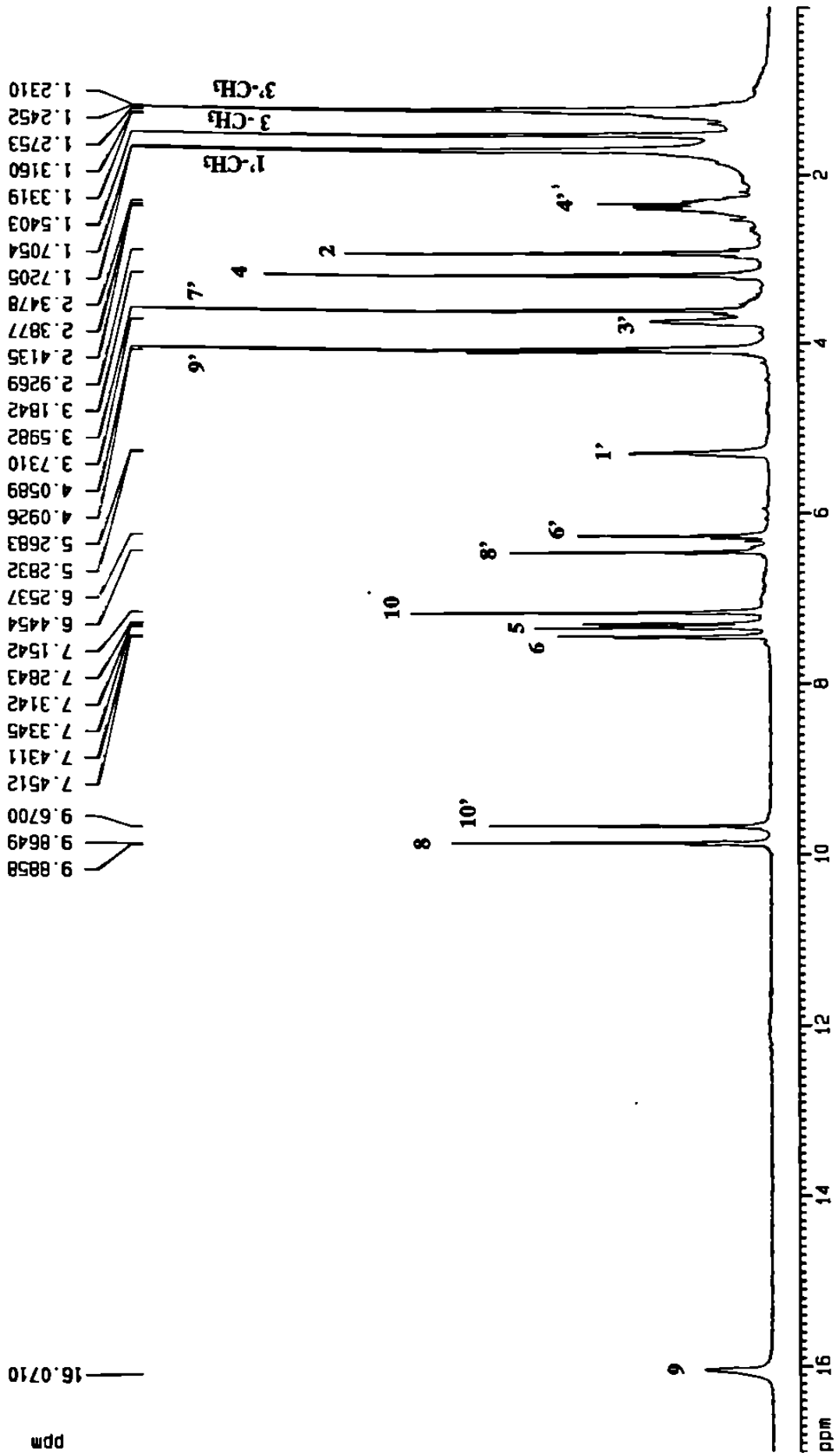


Fig. 61. Espectro ¹H RMN del compuesto H2 (0 -17 ppm).

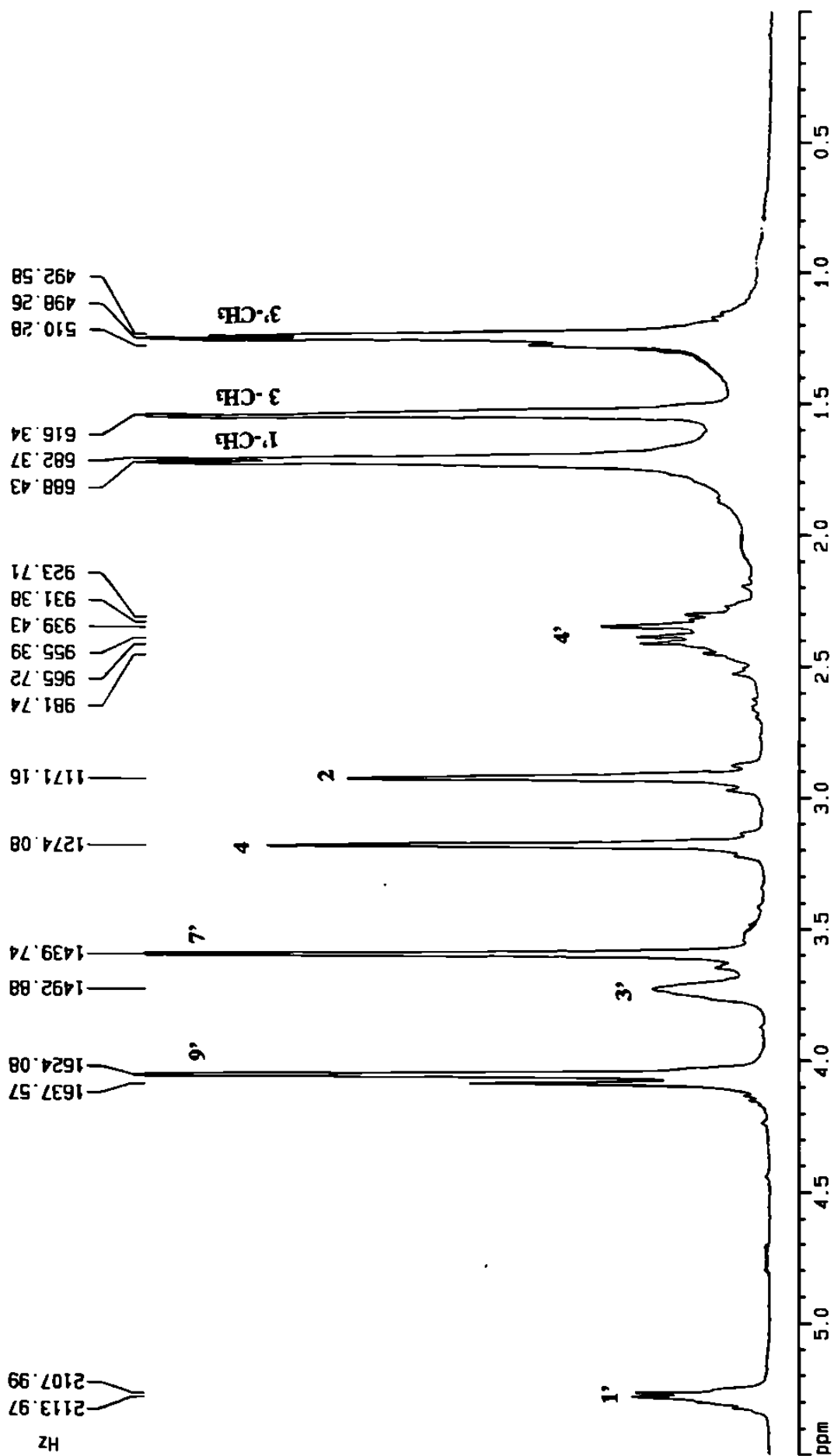


Fig. 62. Espectro 1H RMN del compuesto H2 (0.0-5.5 ppm).

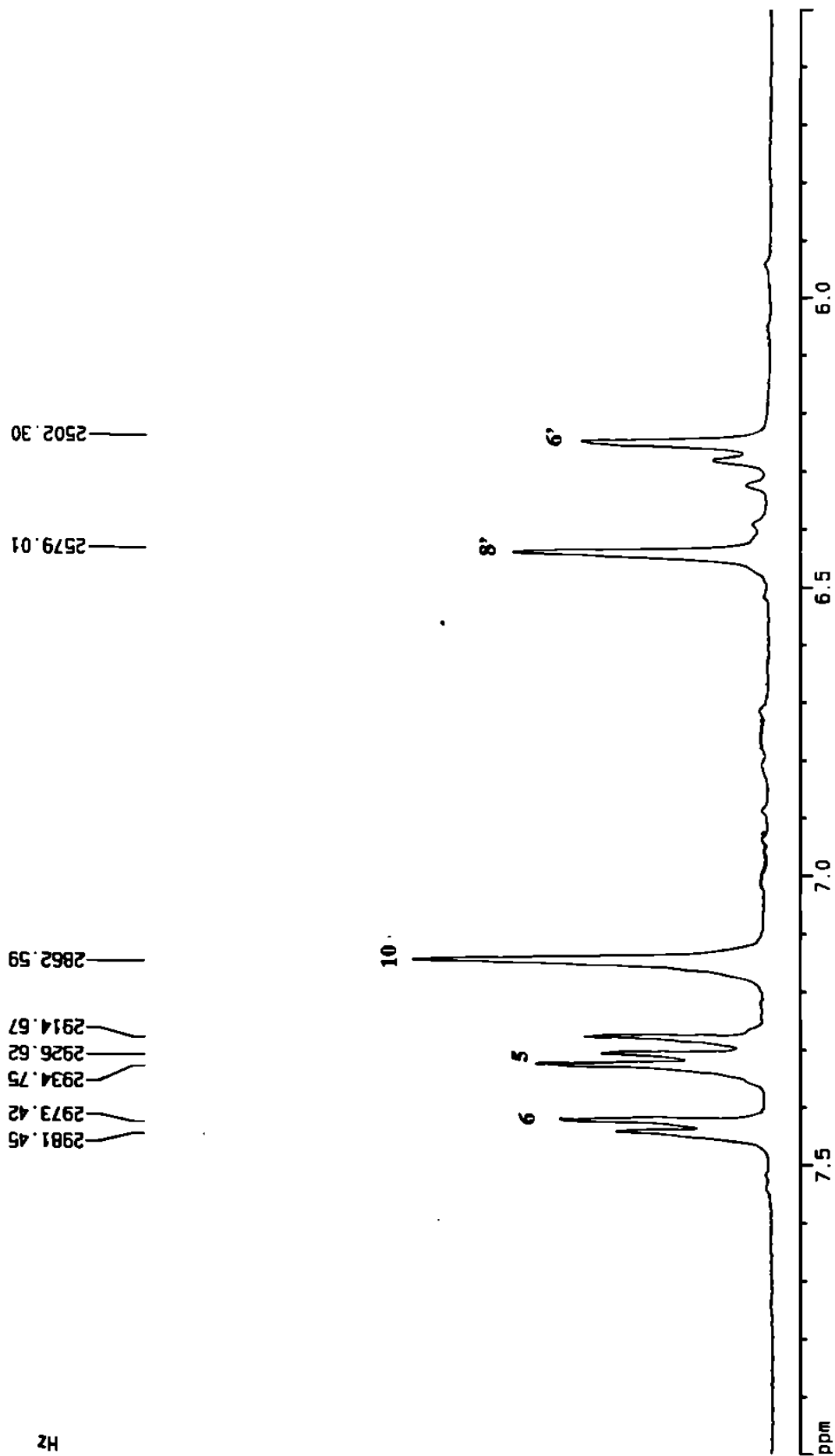


Fig. 63. Espectro 1H RMN del compuesto H2 (5.5-8.0 ppm).

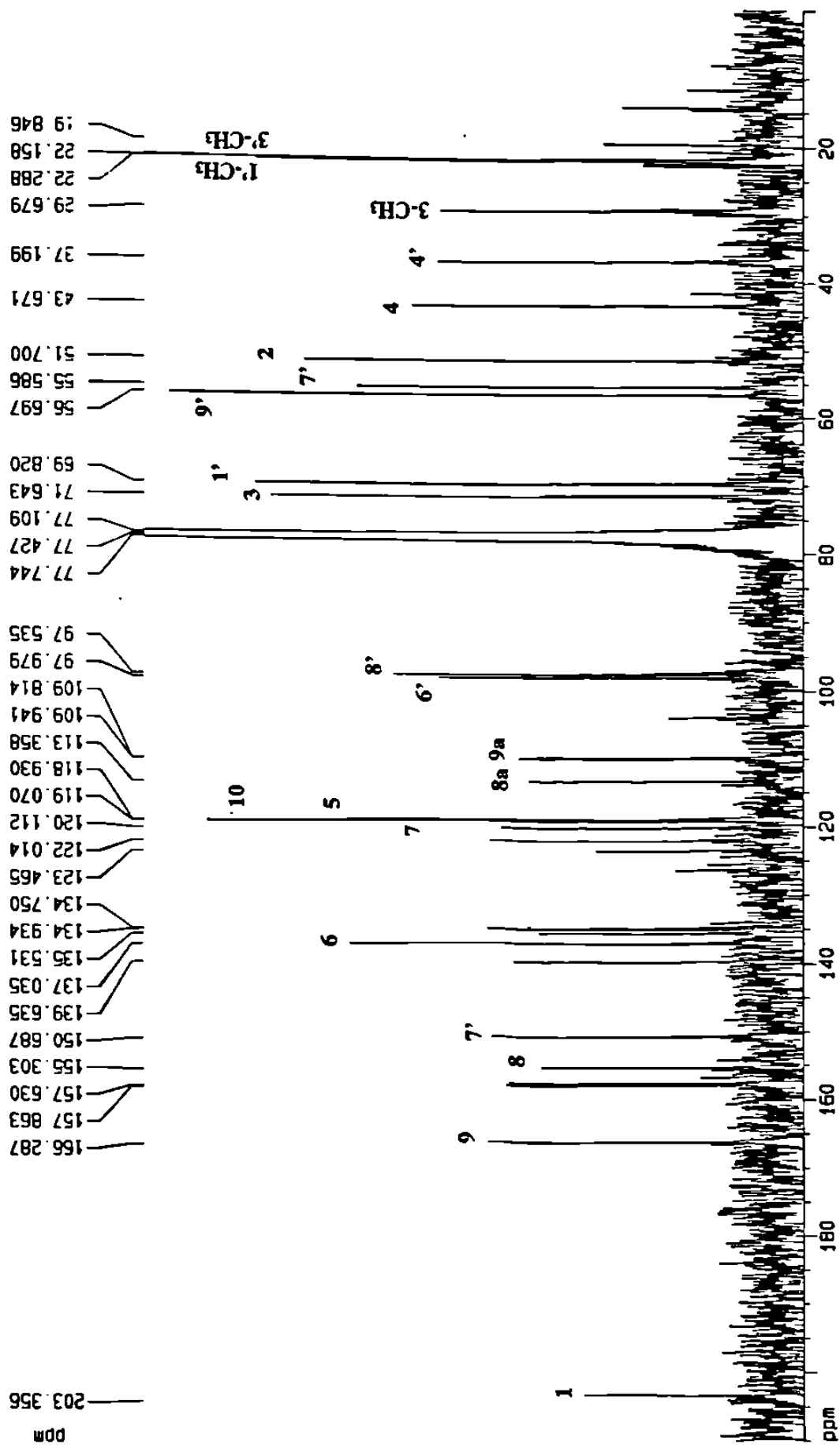


Fig. 64. Espectro ¹³C RMN del compuesto H2 (0-210 ppm).

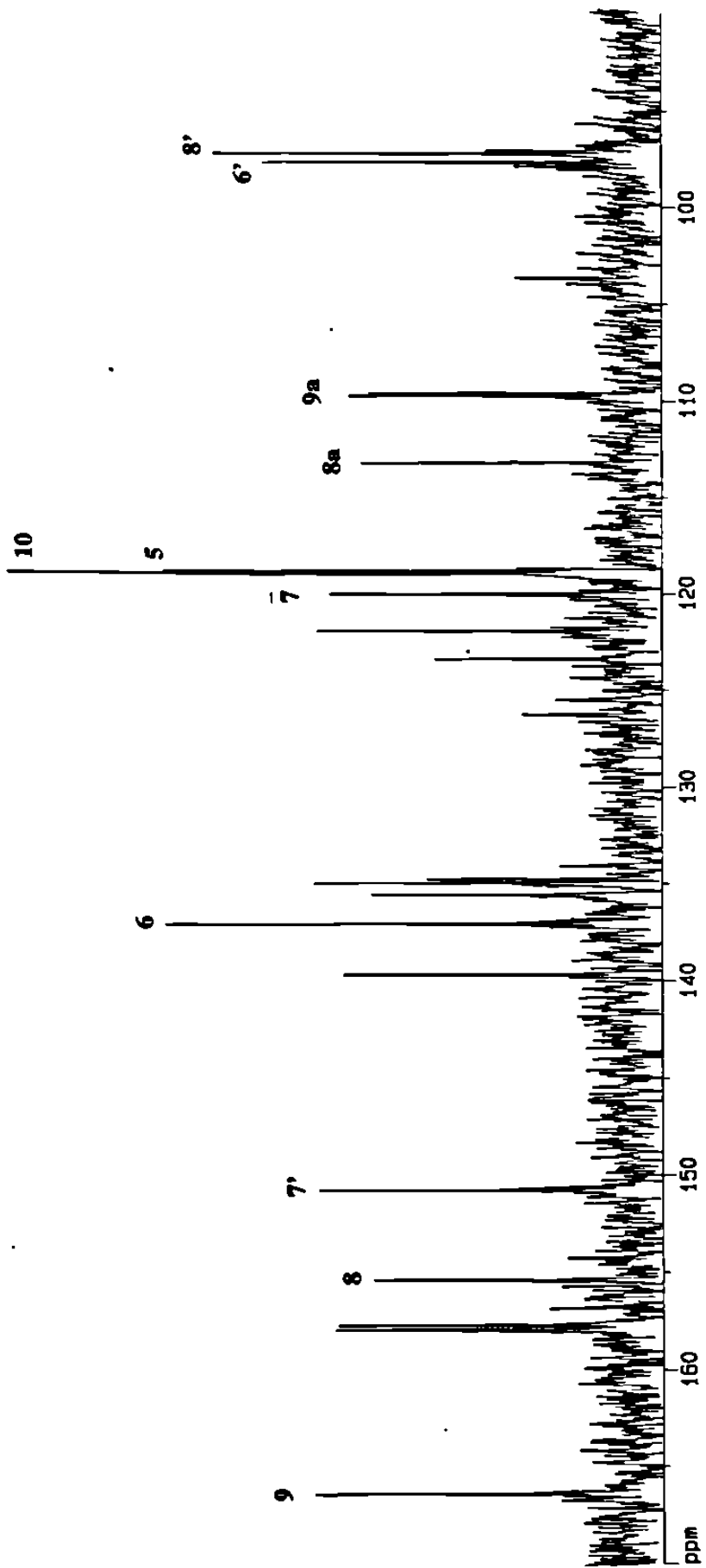
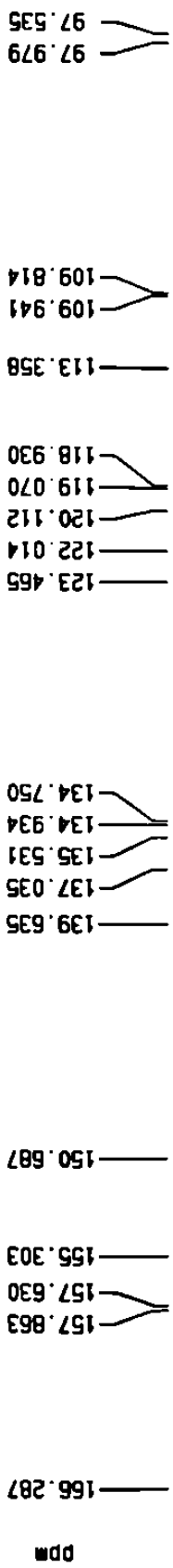


Fig. 65. Ampliación del espectro 13C RMN del compuesto H2 (90-170 ppm).

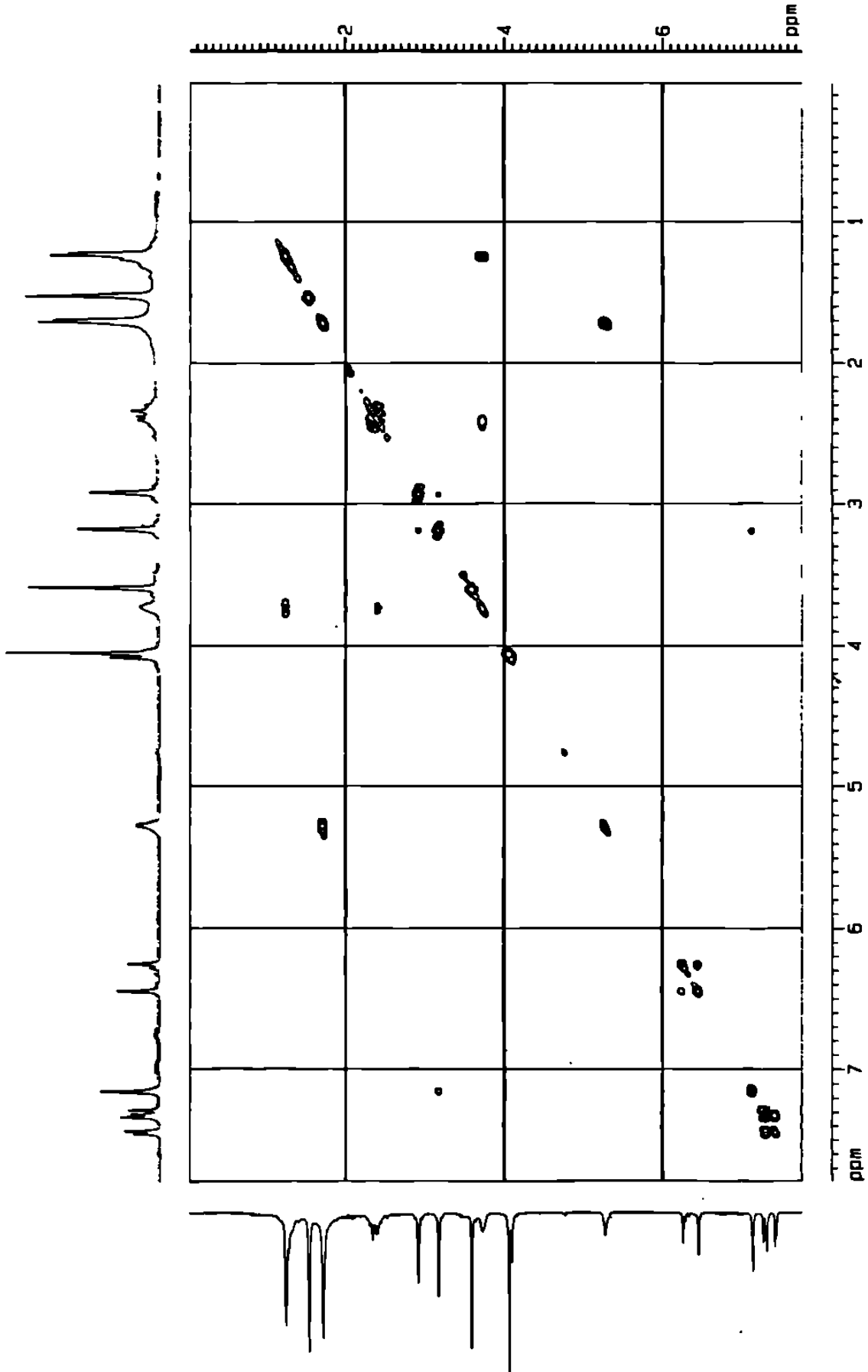


Fig. 66. Espectro COSY del compuesto H2 (0-8 ppm).

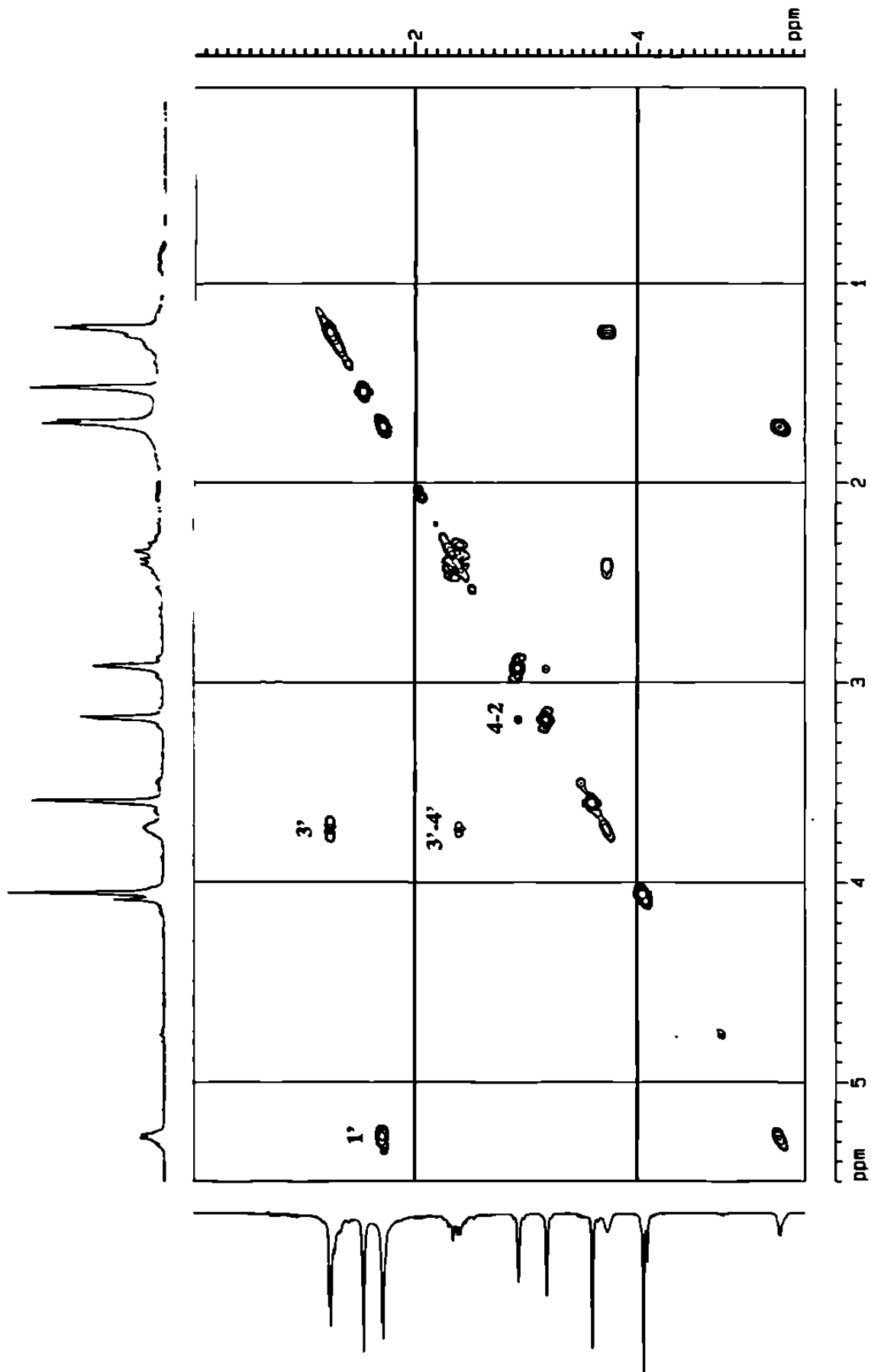


Fig. 67. Espectro COSY del compuesto H2 (0.0-5.5 ppm).

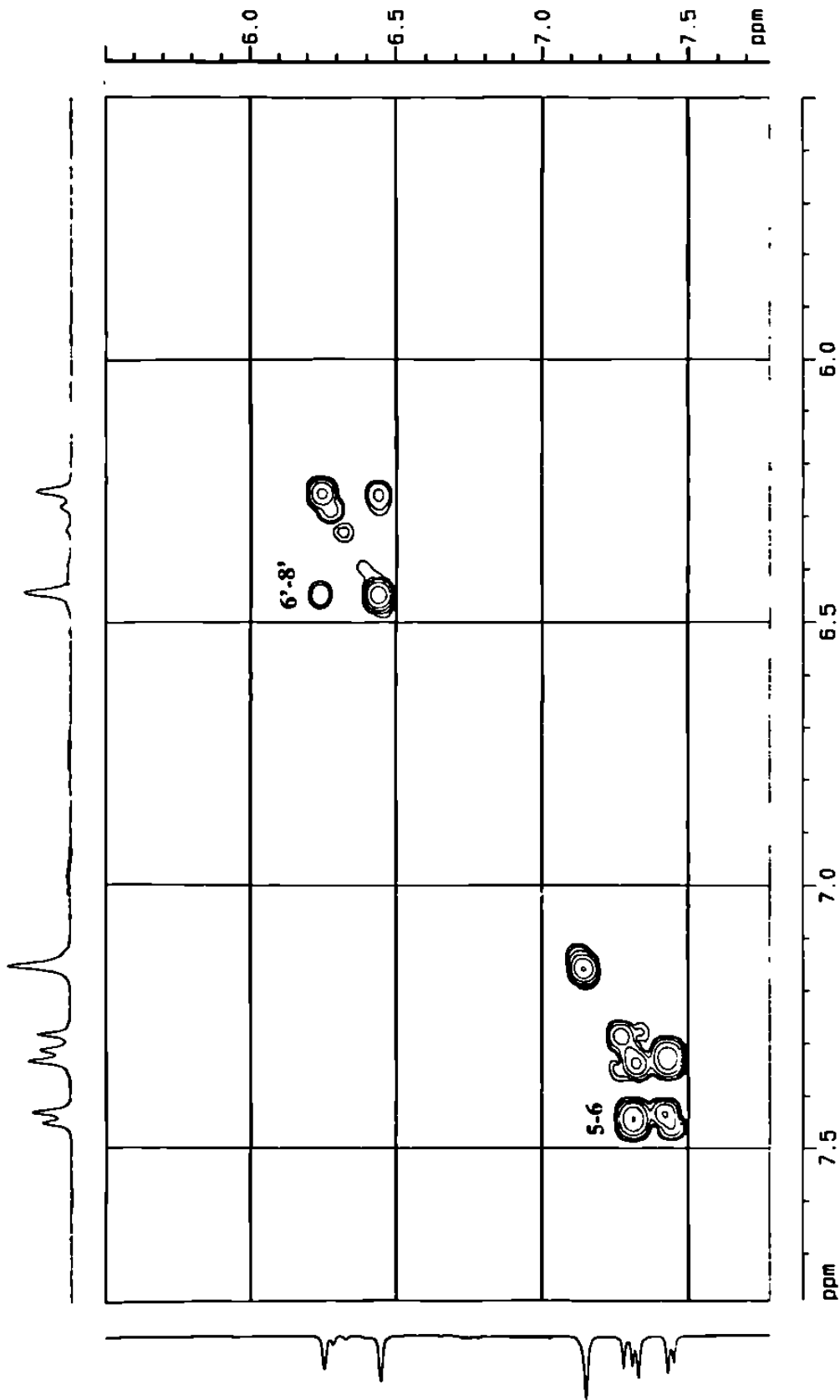


Fig. 68. Espectro COSY del compuesto H2 (5.5-7.7 ppm).

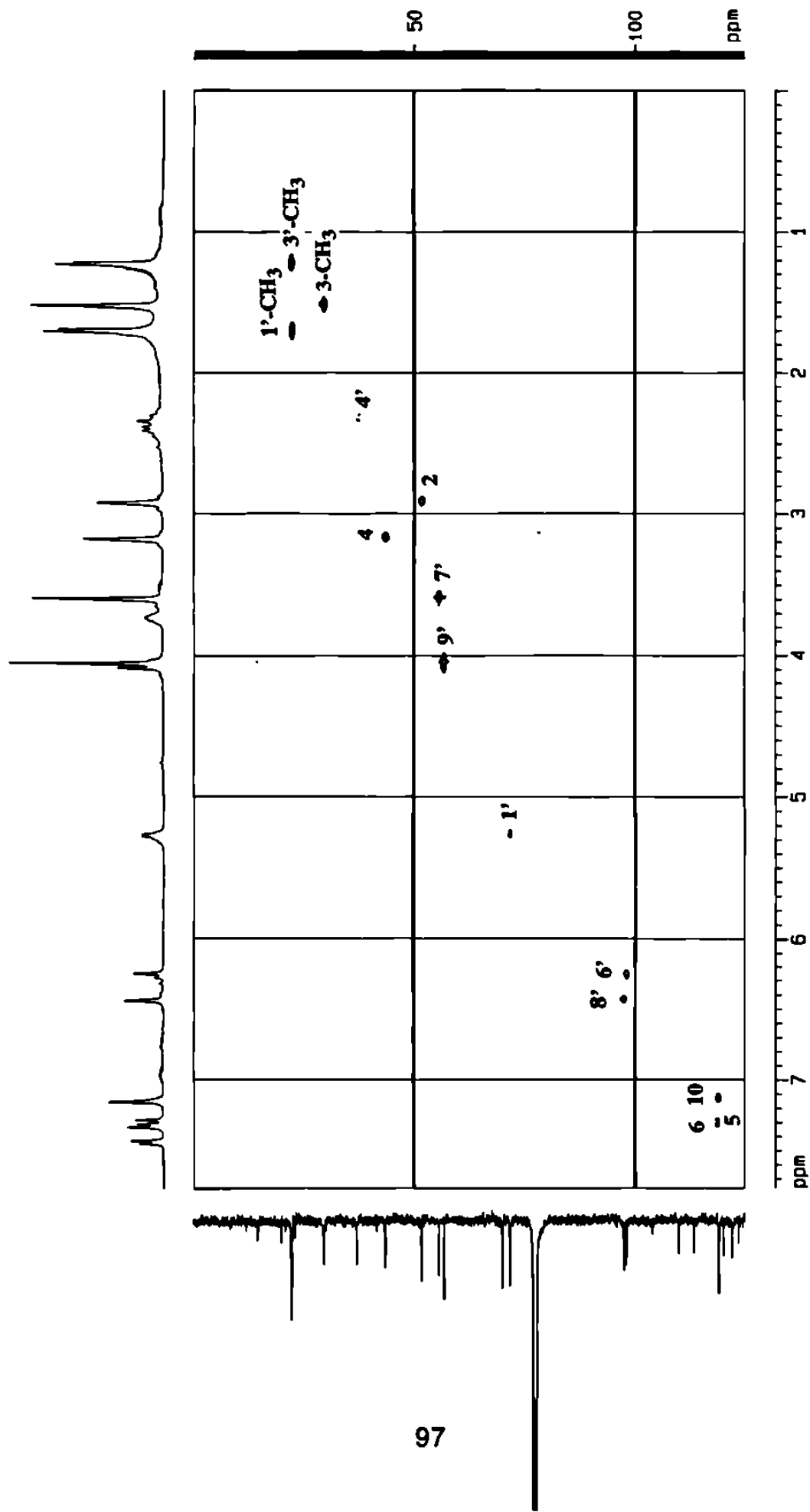


Fig. 69. Espectro HMQC del compuesto H2.

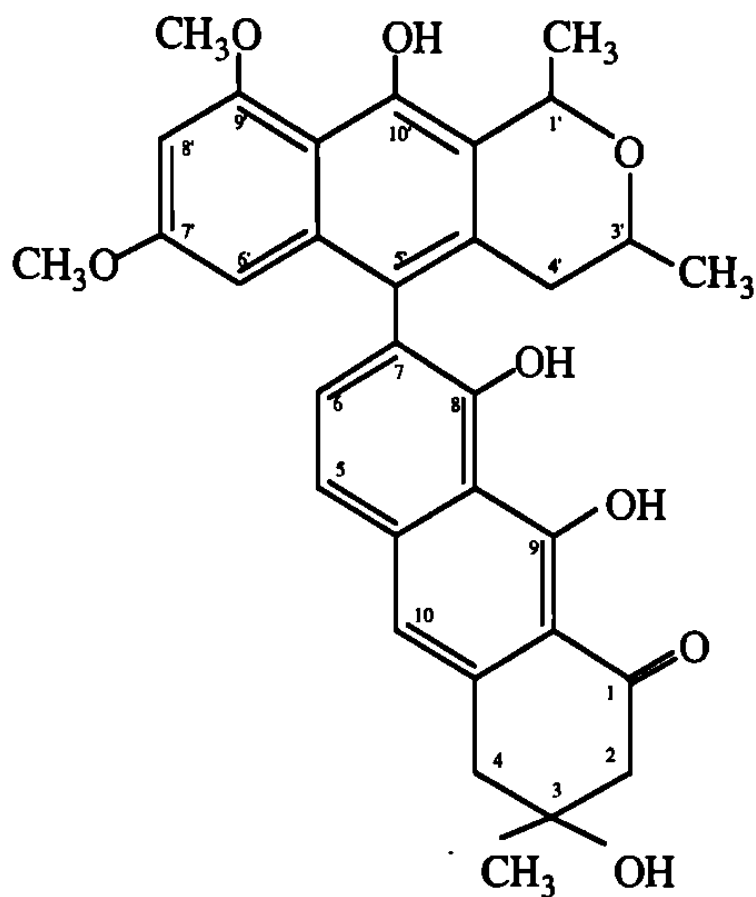


Fig. 70. Compuesto H2 (7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi -1'H-nafto (2',3'-c') pirano-5'-il) -3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-antracena).

3.5. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

3.5.1. BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE *Artemia salina*:

Este bioensayo se realizó a los compuestos puros A, B, H1 y H2, así como a la mezclas H y E.

Compuesto A DL₅₀ = 49.99 ppm (73.08 - 26.12 ppm).

Compuesto B DL₅₀ = 4.44 ppm (8.64 - 1.35 ppm).

Compuesto H1 DL₅₀ = 12.30 ppm (58.00 - 8.30 ppm).

Compuesto H2 DL₅₀ = 9.88 ppm (14.60 - 5.40 ppm).

Mezcla H DL₅₀ = 7.20 ppm (15.90 - 3.50 ppm).

Mezcla E DL₅₀ = No activa.

3.5.2. DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATALASA.

Se determinó el 100 % de actividad de la catalasa sin el compuesto, resultando 28.378 U/mL y en base a ello se calculó el porcentaje de inhibición del compuesto sobre la catalasa. Esta determinación se realizó a los compuestos puros A y B, así como a la mezcla H.

El compuesto A en una concentración de 37.037 μ M, originó un 16.81 % de inhibición.

El compuesto B en una concentración de 19.607 μ M, mostró un 4.56 % de inhibición.

La mezcla H en una concentración de 36.764 μ M, no presentó inhibición.

CAPITULO 4

DISCUSION

4.1. OBTENCION Y PREVALORACION DE LOS EXTRACTOS.

En el presente trabajo se realiza un estudio químico biodirigido de la raíz de *K. parvifolia*, para lo cual se realizaron extracciones utilizando solventes no polares, poco polares y polares para obtener la mayoría de los componentes de la raíz de esta planta. Se obtuvo el extracto de éter de petróleo (EEP), el extracto de acetato de etilo (EAcOEt) y el extracto metanólico (EM) respectivamente; las extracciones se realizaron por agitación mecánica y a una temperatura de 25°C, ya que se ha observado que a temperaturas mayores de 40°C los compuestos obtenidos de frutos de plantas del género *Karwinskia* presentan descomposición.

Debido a que se realizó el bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina* como un método preliminar para detectar la toxicidad, se pudo seguir una ruta biodirigida en la separación de los extractos obtenidos de la raíz de *K. parvifolia*, de los cuales los EEP y EAcOEt resultaron activos, por lo que se escogieron para proseguir con nuestra investigación.

4.2. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EEP.

El extracto de éter de petróleo se fraccionó de acuerdo con el diagrama 3, obteniéndose los compuestos A, B y E, los cuales se sometieron a la determinación de la pureza. Los compuestos A y B en CCF

se revelaron con KOH en etanol, lo que nos indicó la presencia de hidroxiantraquinonas.

El compuesto E al ser analizado por CCF (eluyente 1c), así como por CCF en fase reversa (eluyente 2a), se observó como una sola mancha; sin embargo en base al análisis por CLAR (t_R y pureza espectral) demostró ser una mezcla de 2 compuestos con t_R muy cercanos (fig. 42). Dado que esta mezcla no resultó ser activa no se prosiguió con su purificación e identificación.

4.2.1. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO A:

En el Espectro de Masas del compuesto A se observa un ión molecular de 540 (fig. 12), con lo que supusimos que se trataba de una molécula dimérica; además aparecen picos a 525 que es pérdida de metilo y a 226 que nos indica la pérdida de uno de los monómeros. Esto, junto con el resultado del revelado con KOH y el conocimiento de otros metabolitos semejantes aislados previamente, permitió sugerir que se trataba de algún derivado hidroxiantraquinónico de la T544 con fórmula molecular de $C_{32}H_{28}O_8$, con lo que nos resulta un total de 19 insaturaciones.

Al analizar el espectro de 1H RMN (figs. 13, 14, 15, 16, 17, 18) se observaron 17 señales, 3 están a campos muy bajos (9.71, 12.02 y 12.38 ppm) que corresponden a los oxidrilos fenólicos 10', 1 y 8 respectivamente de la estructura propuesta, siendo el 1 y 8 menos apantallados por su atracción con el grupo carbonilo. Después se observa la zona de los H aromáticos entre 6.15 y 8.00 ppm: menos desplazados se observan 2 dobletes con una J pequeña (2.1 Hz, partición meta) y que corresponden a los H de las posiciones 8' y 6' y más desplazados están dos dobletes con una J = 7.6 Hz a 7.67 y 8.00 ppm que corresponden a los H de las posiciones 5 y 6. También en esta zona se observan a 7.15 un singulete y

7.73 un doblete (partición en meta), que integran cada uno para un H y corresponden a los H de las posiciones 2 y 4 (fig. 15). La zona de los H alifáticos comprende de 1.26 a 5.27 ppm, siendo la señal más desplazada un cuarteto que integra para un H ($J=6$ Hz) que correspondería al H-1' (fig. 18). Se observan dos singuletes que integran para tres H cada uno a 4.07 y 3.64 ppm que corresponden a los H de los metoxilos (9' y 7') (fig. 14). A 3.73 ppm, se observa un multiplete que integra para un H (3') (fig. 17). A mayor campo (2.51 ppm) se observa un singulete que integra para tres H que corresponde a el metilo de la posición 3, luego se observa un doble doblete distorsionado (2.25 ppm) que integra para dos H que correspondería a los H químicamente diferentes del CH₂ de la posición 4' (fig.16). A 1.70 y 1.26 ppm se observan dos dobletes que integran para tres H cada uno y corresponderían a los metilos de las posiciones 1' y 3' respectivamente, de la estructura propuesta.

El espectro de ¹³C RMN (fig. 19, 20) muestra 32 señales. Las más desplazadas están a 182.46 y 193.23 ppm que corresponden a los grupos carbonilo de las posiciones 10 y 9. Se observa la zona aromática de 97.58 a 163.25 ppm y por debajo de 80 ppm se encuentra la zona alifática donde se aprecian las señales de los C metoxilos 9' y 7' (56.75 y 55.59 ppm).

En el espectro DEPT 135 (fig. 21) se observa una señal negativa a 37.25 ppm que correspondería al único CH₂ de la molécula.

En el espectro COSY (fig. 22, 23, 24) se observan las correlaciones entre 1'H-1'CH₃, 3'H-3'CH₃, 3'H-4'CH₂, 6'H-8'H (posición meta), 5H-6H, 2H-4H (posición meta), las cuales nos ayudaron a establecer las correlaciones para asignar las señales de la estructura propuesta.

En el espectro HMQC (fig. 25). Se observan las correlaciones H-C de 3'-CH₃, 1'-CH₃, 4'-CH₂, 3-CH₃, 7'-OCH₃, 3'H-C, 9'-OCH₃, 1'H-C, 8' H-C, 6'H-C, 2H-C, 5H-C, 4H-C, 6H-C, que nos ayudaron a establecer la estructura.

Con los datos espectroscópicos se llegó a establecer que el compuesto A (fig. 26) es el 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-C')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-hidroxiantraquinona.

4.2.2. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPUESTO B:

En el espectro de masas (fig. 29) que se realizó para el compuesto B, resultó un ión molecular de 510, que sería una diferencia de m/e 30 (posiblemente un CH₃O-) con respecto al obtenido para el compuesto A, también se observa pico base de 495 que sería pérdida de metilo. La fórmula molecular propuesta es C₃₁H₂₆O₇, con lo que resultaron 19 insaturaciones en la molécula.

En el espectro de ¹H RMN (figs. 30, 31, 32, 33, 34, 35) se observan 17 señales al igual que en el compuesto A pero la diferencia con respecto a éste es la desaparición de una señal en la zona alifática, la de 3.64 ppm (fig. 31), que correspondería al metoxilo de la posición 7' y la aparición de una señal en la zona aromática que integra para 1H como doble doblete con J=7.9 y 8.8 (fig. 32).

El espectro de ¹³C RMN (fig. 36) muestra 31 señales, una señal menos que para el compuesto A en la zona de los C alifáticos, en donde aparece sólo una señal del metoxilo (9').

En el espectro DEPT 135 (fig. 37) se observa a 37.22 ppm una señal negativa que correspondería al único CH₂ de la molécula.

En el espectro COSY (figs. 38, 39, 40) se observa las correlaciones entre 1'H-1'CH₃, 3'H-3'CH₃, 3'H-4'H, 7'H-6'H-8'H, 4H-2H.

Con los datos espectroscópicos se llegó a establecer que el compuesto B (fig. 41) es el 7-(3',4'-dihidro-9'-metoxi-1',3'-dimetil-10'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-hidroxiantraquinona.

4.3. COMPUESTOS OBTENIDOS DEL EAcOEt.

El extracto de acetato de etilo se fraccionó de acuerdo con el diagrama 4, obteniéndose los compuestos que se denominaron G, H1 y H2, a los cuales se les determinó la pureza. Aunque los compuestos H1 y H2 presentaron R_f iguales en CCF, al ser analizado en el CLAR analítico (programa 3b) se observa (fig. 46) que presentan diferente t_R , por lo que no se tratan de la misma molécula.

El compuesto G al ser analizado por CLAR (programa 3b) presentó un t_R de 2.894 y al correr un estándar de T516 en las mismas condiciones, se observó que presentaba el mismo t_R , por lo cual se realizó un análisis espectral de ambos compuestos, observándose la sobreposición de los mismos (fig. 43).

4.3.1. VERIFICACION DE LA IDENTIDAD DEL COMPUESTO G.

Para confirmar la identidad del compuesto G, que como ya se mencionó, de acuerdo con el análisis cromatográfico y espectral (arreglo de diodos) resultó ser la T516, se realizó un ^1H RMN.

En el espectro ^1H RMN (fig. 44) se observan 15 señales. Las señales a campos bajos (16.05, 9.91 y 9.66 ppm) corresponden a los oxidrilos fenólicos de las posiciones 9, 8 y 1', siendo el 9 el menos apantallado por ser atraído por el grupo carbonilo. En la zona aromática, de 7.36 a 6.24 ppm, se observan 5 señales (6H, 5H, 10H, 7'H, 5'H) y a mayores campos

se observan 7 señales (8'-OCH₃, 6'-OCH₃, 2-CH₂, *-CH₃, 3'-CH₃, 4-CH₂, 3-CH₃) en la zona alifática por debajo de 4.08 ppm.

4.3.2. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA DE H1 Y H2.

Los compuestos H1 y H2 en el espectro de masas (figs. 48 y 60), presentan el mismo ión molecular de 544, así como los iones 526 (-H₂O), el 511 (-CH₃) y el 240 que nos indica la pérdida de un monómero. La fórmula molecular propuesta es C₃₂H₃₂O₈ con lo que resultan 17 insaturaciones.

En el espectro de ¹H RMN los compuestos H1 (figs. 49, 50, 51) y H2 (figs. 61, 62, 63) presentan 18 señales las cuales están distribuidas de la siguiente manera: a campos bajos encontramos tres singuletes que integran para un H cada uno y que corresponden a los oxidrilos fenólicos de las posiciones 9, 8 y 10' (H1: 10.00, 9.78, 9.58 ppm) (H2: 16.07, 9.86 y 9.67 ppm), siendo el 9 el menos apantallado por ser atraído por el grupo carbonilo. La zona aromática comprende de 7.50 a 6.00 ppm, con 5 señales: dos dobletes que integran para un H cada uno y corresponden a los H de las posiciones 5 y 6 (H1: 7.36, 7.24 ppm) (H2: 7.44, 7.32 ppm) y tres singuletes que integran para un H cada uno, que corresponderían a 10, 8' y 6' (H1: 7.20, 6.37, 6.20 ppm) (H2: 7.15, 6.44 y 6.25 ppm). A campos altos encontramos la zona alifática por debajo de 5.50 ppm, con 10 señales; la más desplazada es un cuarteto que integra para un H y corresponde a el H de la posición 1' (H1: 5.19 ppm) (H2: 5.27 ppm). Se observa un multiplete que integra para un H y correspondería al H-3' (H1: 3.65 ppm) (H2: 3.73 ppm), dos singuletes que integran para tres H cada uno que corresponderían a los metoxilos de las posiciones 9' y 7' (H1: 3.98, 3.52 ppm) (H2: 4.05, 3.59 ppm). Otros dos singuletes que integran para dos H cada uno se observan y corresponden a los CH₂ de las posiciones 4 y 2 (H1: 3.11, 2.85 ppm) (H2: 3.18, 2.92 ppm), así como un doblete que también integra para dos H y corresponde al 4' (H1: 2.28 ppm) (H2: 2.38 ppm). También en esta zona, más apantallados, se observan dos dobletes

que integran para tres H cada uno de los metilos de las posiciones 1' y 3' (H1: 1.63, 1.16 ppm) (H2: 1.71, 1.23 ppm) y un singulete que integra para tres H y correspondería al metilo de la posición 3 (H1: 1.46 ppm) (H2: 1.54 ppm).

En el espectro de ^{13}C RMN ambos compuestos, H1 (figs. 52, 53) y H2 (figs. 64, 65), presentan 32 señales. A campos muy bajos se observa la señal del carbonilo de la posición 1 (H1: 203.41 ppm) (H2: 203.35 ppm), de la estructura propuesta. En la zona aromática, de 170.00 a 95.00 ppm, se observan 21 señales y en la zona alifática, de 75.00 a 0.00 ppm, se observan 10 señales. En la figura se ven las asignaciones, faltando algunas de C cuaternarios que para asignarlas correctamente se necesita de técnicas de RMN de acoplamiento H-C a larga distancia, como el HMBC, que durante el transcurso de la tesis no se pudieron llevar a cabo.

En el espectro DEPT 135, tanto en H1 (fig. 54) como en H2, se observan los tres CH_2 (como señales negativas) que presenta la molécula en las posiciones 2, 4 y 4'.

En el espectro COSY (figs. 55, 56, 57, 66, 67, 68) se observan las siguientes correlaciones: 6H-5H, 8'H-6'H (posición meta), 1'H-1'CH₃, 3'H-3'CH₃, 3'H-4'H y 4CH₂-2CH₂ (posición meta). Estas nos ayudaron a establecer las posiciones de la estructura propuesta.

En el espectro HMQC (fig. 69) se observan las correlaciones C-H de 3'-CH₃, 3-CH₃, 1'-CH₃, 4'-CH₂, 2-CH₂, 4-CH₂, 7'-OCH₃, 9'-OCH₃, 1'-CH, 6'-CH, 8'-CH, 10-CH, 5-CH, 6-CH que nos ayudaron a establecer la estructura.

Con los datos espectroscópicos llegamos a establecer que los compuestos H1 (fig. 58) y H2 (fig. 70) tienen la misma estructura planar, que es 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3,4-dihidro-3-metil-3,8,9-trihidroxi-1(2H)-

antracena (T544, tullidinol), pero diferente arreglo espacial que puede originarse en los carbonos quirales 1', 3', 3 o en el impedimento rotacional alrededor de la unión bifenólica 5', 7 (atropoisomerismo). Para llegar a establecer la estereoquímica de estos compuestos, se deberán realizar otros estudios de RMN de doble dimensión como el NOESY y la difracción de rayos X.

Con el aislamiento e identificación de H1 y H2 se confirma la presencia del complejo T544 en las raíces de *K. parvifolia*, además de T516. Se debe tener presente que la T544 está ausente en los frutos de esta especie, como se menciona en la introducción. Además, éste es el primer trabajo donde se aislan e identifican dos isómeros de la T544. Por otra parte no se encontraron cantidades perceptibles de peroxisomicina A1, peroxisomicina A2 ni T496 que son los compuestos mayoritarios en los frutos de *K. parvifolia*.

4.4. PREVALORACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.

4.4.1. BIOENSAYO DE LETALIDAD DE LARVAS DE *Artemia salina*.

Esta es una técnica sencilla y rápida, fácilmente adaptable a los laboratorios convencionales, resultando una herramienta útil para tener una idea de la actividad de los compuestos aislados, ya que se ha observado una correlación entre la toxicidad celular y la toxicidad que presenta este bioensayo^(25,26).

Este bioensayo se realizó con los compuestos A, B y E aislados del EEP. El compuesto E, que resultó una mezcla de dos compuestos, no presentó actividad en el rango de concentraciones probadas, por lo que no se prosiguió con su purificación y elucidación de la estructura. Se puede

concluir que los responsables de la actividad en este extracto son los compuestos hidroxiantraquinónicos A (DL₅₀ = 49.99 ppm) y B (DL₅₀ = 4.44 ppm), que son idénticos a los aislados en México por Fernández y cols. en 1995⁽²⁴⁾ y de los cuales ellos no reportan actividad biológica para los mismos.

De los compuestos aislados del EAcOEt, se realizó el ensayo tanto con la mezcla H, como con los compuestos puros H1 y H2, de los cuales todos resultaron activos en el rango de las concentraciones probadas. Dado que es la primera vez que se aíslan estos isómeros y debido a la actividad reportada para el complejo T544^(10, 11), resultará interesante realizar más bioensayos en cultivo celular y animales de laboratorio para establecer la neurotoxicidad de cada uno de ellos.

4.4.2. DETERMINACION DEL GRADO DE INHIBICION DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE CATALASA.

Este se realizó a los compuestos A y B, así como a la mezcla H. Los compuestos A (37.037 μ M) y B (19.607 μ M), originaron un 16.81 y 4.56 por ciento de inhibición respectivamente; a concentraciones mayores el H₂O₂ interfiere oxidando los compuestos. El porcentaje de inhibición es muy bajo, lo cual era de esperarse por ser compuesto de tipo antraquinónico como lo son el crisofanol y la emodina los cuales se usan como control negativo en la inhibición de la catalasa.

En cuanto a la mezcla H se llegó a una concentración de 36.764 μ M sin presentar inhibición apreciable y a concentraciones mayores el H₂O₂ oxida los compuestos.

Esta determinación como ya se mencionó en la introducción, se utiliza de rutina en el control de calidad de la T514 o Peroxisomicina A1, la cual a una concentración de 10 μ M inhibe al 100 por ciento la catalasa. Se

ha demostrado que a mayor semejanza estructural con ésta mayor grado de inhibición, lo cual se reafirma con los resultados obtenidos para los compuestos probados A, B y H (Tabla 2).

Cabe mencionar que en las raíces examinadas no se encontró el compuesto 7' desmetoxilado de la T544 reportado por Yussim y cols.⁽²⁴⁾ quienes señalan, que el porcentaje de este compuesto el cual encontraron en las raíces de las diferentes plantas estudiadas es muy dependiente de la especie, de esta forma se puede pensar que en la raíz de la *K. parvifolia* esté ausente o en cantidades por debajo de nuestro límite de apreciación.

CONCLUSIONES

- Se siguió una ruta biodirigida en la separación de los extractos obtenidos de la raíz de *K. parvifolia*, de los cuales los EEP y EAcOEt resultaron activos.

- Apartir del EEP se aislaron, purificaron y caracterizaron dos compuestos hidroxiantraquinónicos.

- El compuesto A con un PM de 540 es el 7-(3',4'-dihidro-7',9'-dimetoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-hidroxiantraquinona.

- El compuesto B con un PM de 510 es el 7-(3',4'-dihidro-9'-metoxi-1',3'-dimetil-10'-hidroxi-1'H-nafto(2',3'-c')pirano-5'-il)-3-metil-1,8-hidroxiantraquinona.

- El compuesto E aislado también del EEP, resultó ser una mezcla de 2 compuestos con *tr* muy cercanos. No es una hidroxiantraquinonas y no presentó actividad biológica.

- A y B resultaron con actividad en el bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina*, pero no inhibieron significativamente la actividad de la catalasa.

- A partir del EAcOEt se aislaron, purificaron y caracterizaron tres compuestos antracénicos.

- El compuesto G resultó ser la T516 ya descrita en la literatura por Dreyer y col. en 1975.

- El componente principal de la raíz que en CCF tiene el mismo *R_f*, color y características de fluorescencia de la T544 descrita por Dreyer resultó ser una mezcla de 2 estereoisómeros (H1 y H2).

- H1 y H2 se aislaron e identificaron por primera vez y resultaron muy activos en el bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina*.

RECOMENDACIONES

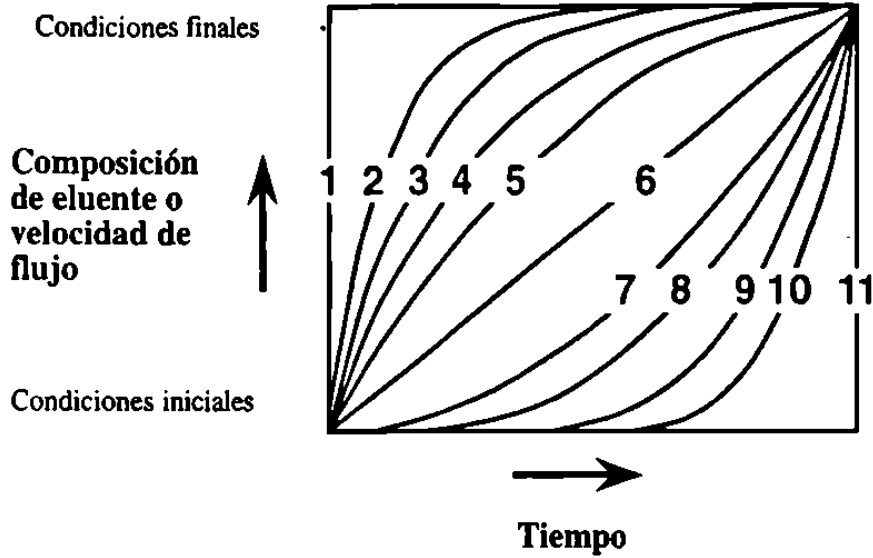
Realizar estudios en cultivos celulares a los compuestos que resultaron activos en el bioensayo de letalidad de larvas de *Artemia salina* (A, B, H1 y H2) y correlacionar los resultados obtenidos.

Realizar estudios para establecer la estereoquímica de H1 y H2 mediante el empleo de técnicas de RMN (como el NOESY) y/o la difracción de Rayos X.

A partir del conocimiento de la estructura de los compuestos de la raíz de la *K. parvifolia*, sería interesante realizar otros estudios que lleven a establecer las posibles vías fisiológicas de transformación de los mismos.

APENDICE

PERFILES DE CURVA DE GRADIENTE



Número de curva	Efecto
1	Inmediatamente toma las condiciones especificadas.
2 a 5	Curva de gradiente convexa.
6	Curva de gradiente lineal.
7 a 10	Curva de gradiente cóncava.
11	Mantiene las condiciones iniciales hasta la siguiente etapa.

REFERENCIAS

1. Fernández, Nava R., "Nombres comunes, usos y distribución Geográfica del Género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México". **Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México**, Ser. Bot. 63 (1), (1992), pp. 1-23.
2. Clavijero, F. J. Historia de la Antigua o Baja California. (Traducción). México. Imprenta del Museo Nacional de Arqueología. Historia y Geografía. 1933.
3. (a) Shaver, T. N., Ph.D. Thesis, Texas A and M University, 1966; (b) Kim, H. L., Ph. D. Thesis, Texas A and M University, 1970; (c) Kim H. L. and Camp, B. J., **Toxicon**, 10, (1972), 83.
4. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D., "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". **J. Am. Chem. Soc.** 97, (1975), pp. 4985.
5. Weller, R., Mitchel, J. and Daves, D. Jr. Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) toxins. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Williams and Wilkins, Eds. Baltimore. (1980), 336.
6. Bustamante-Sarabia, J., Olvera-Rabiela, J. y Nieto-Cañedo, L. Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*), comunicación de un caso. **Gaceta méd. México** (1978) 114, 241.
7. Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. "Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (tullidora)". **Toxicon**, 25, (1987), 565-568.
8. Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A., "Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)". **Toxicon**, 24, (1986), pp. 1091.

9. Bermúdez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. y Piñeyro, A., "Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog". *Toxicon*, 30, (1992), pp. 1493.
10. Muñoz-Martínez, E. J., Cueva, J. and Joseph-Nathan, P., Denervation caused by tullidora (*Karwinskia humboldtiana*) neuropathol. *Appl. Neurobiol*, 9, (1983), 121-134.
11. Muñoz-Martínez, E. J., Cuéllar-Pedroza, H., Rubio-Franchini, C., Jáuregui-Rincón, J. and Joseph-Nathan. Depression of Fast Axonal Transport in Axons Demyelinated by Intraneural Injection of a Neurotoxin from *K. humboldtiana*. *Neurochemical Research*, Vol. 19, No. 11, (1994), pp 1341-1348.
12. Piñeyro, A., Mtz de Villarreal, L. and González, R., "In vitro selective toxicity of toxin T514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines". *Toxicology*, 92, (1994), pp. 217-227.
13. Piñeyro-López, A., "Pharmazeutisch brauchbare Naphthalin und Anthracenderivate" "Pharmaceutically applicable naphthaline and anthracene dervatives" "Derivés de naphthaline et d'anthracene utiles comme medicamenta" *Europäisches Patenblatt*, 48/1995, 29.11.1995.
14. Sepúlveda, J. Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro L., A., Harder, W. and Veenuis, "Studies on the effect of toxin T514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts". *M. FEMS Microbiology Letters*, 91, (1992), 207-212.
15. Moreno, M., Vargas, R., Esquivel, D., Waksman, N., Piñeyro, A., "Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity". *Planta Médica*, 61, (1995), 337-340.
16. Waksman, N., Martínez, L. y Fernández, R., "Screening químico y toxicológico de otras especies del género *Karwinskia*". *Rev. Latinoam. Quím.*, 20, (1989), 27.
17. Waksman, N. y Ramírez, R., "Isolation of a new dymeric

- anthracenone from *Karwinskia parvifolia*". **Rev. Latinoam. Quím.** 23/1 and 22/4, (1992), pp. 25-27.
18. Rivas G., Verónica, Estudio químico de los extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* y *K. johnstonii*. Tesis de Maestría. Fac. de Medicina, UANL, Monterrey N.L., (1995).
 19. Waksman, N., Torres, R., Salazar, M. L., Ceniceros, L. y Piñeyro, A., "Peroxisomicina: un producto de interés farmacológico. Avances en los métodos de producción". **XIX Simposium de Química de Productos Naturales, ITESM**, Abril, (1992).
 20. Martínez, M., "Las Plantas Medicinales de México". **4a. Ed. Editorial Botas**, México, pág 465 (1959).
 21. Domínguez, X. A., Temblador, S. y Cedillo, M. E., "Estudio químico de la raíz de la Tullidora (*K. humboldtiana*)". **Rev. Latinoamer. Quím.**, 7, (1976), pp.46.
 22. Mitscher, L. A., Gollapudi, S. R., Oburn, D. S. and Drake, S., "Antimicrobial agents from higher plants: two dimethylbenziso chromans from *Karwinskia humboldtiana*". **Phytochemistry**, Vol. 24, No. 8, (1985) pp. 1681-1683.
 23. Fernández, R., Lara, O., Yussim, L., Benavidez, A., Tamariz, J., Zepeda, L. G. "Estudio químico de la raíz de tres plantas del género *Karwinskia*. **Rev. Soc. Quím. Méx.** Vol.37, No 6, (1993).
 24. Yussim, L.F., Lara, O., Benavides, A., Hernández, B., Fernández, R., Joaquín, T. and Zepeda, G. "Anthracenones and anthraquinones from roots of five species of the genus *Karwinskia*". **Phytochemistry** 1429 (1995).
 25. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnana, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and McLaughlin, J., "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". **Planta Médica.** 45, (1982), 31-34.
 26. Teng Wah Sam, "Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*" in **Bioactive Natural Products**. London: CRC Press, (1993), 441-456.

27. Salazar, M.L., Piñeyro, A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and Other Anthracenonic Compounds". **J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.**, 19(9), (1996) 1391-1403.
28. Aebi, H., Bergmeyer, U. in: Methods of enzymatic analysis, (Bergmeyer, H. U., ed.), **Academic Press**, London, New York, (1974) 673-678.

