

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Resultados de pruebas preliminares:

Se realizaron las pruebas preliminares para el extracto acuoso de las hojas de *Croton ciliatoglanduliferus* y para las semillas sin hojas de *Trichilia havanensis*, los resultados de dichas pruebas se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 6.1 Resultados de pruebas preliminares.

	Acuoso de T. havanensis	Acuoso de C. ciliatoglanduliferus	Acuoso de T. havanensis después de hacer Clorofórmico
ALCALOIDES			
Mayer	+	++	++
Dragendorff	-	++	++
Wagner	++	-	-
Hager	++	-	+
SAPONINAS			
H ₂ O caliente	+	++	++
Rosenthaler	++	++	++
TRITERPENOS	++	++	-

TABLA 6.1 (continuación) Resultados de pruebas preliminares.

TANINOS			
Reactivo gelatina	++	-	++
Cloruro férrico	+	-	+
FLAVONOIDES			
Vapores de amoniaco	+	++	+
Shinoda	-	-	-
Pew's	-	++	-
Hidróxido de sodio	+	++	++
GLUCOSIDOS CARDIOTÓNICOS			
Legal	++	+	++

Analizando la tabla de resultados podemos darnos cuenta que las pruebas dieron positivas para la mayoría de los grupos de metabolitos secundarios. Una característica importante que podemos notar al observar los resultados de la Tabla 5.1 fue que al realizar un extracto clorofórmico previo a un acuoso a las semillas de *T. havanensis* la prueba para detección de triterpenos nos arroja un resultado negativo, lo cual se debe probablemente a que este tipo de compuestos son poco polares por lo consiguiente se ven extraídos por el cloroformo.

En la tabla anterior también existieron resultados negativos y positivos para un mismo grupo de metabolitos secundarios lo cual es debido al tipo de reactivo que se

utilizó, Es probable que las plantas no produzcan los metabolitos que detecta esa prueba o se encuentren en poca cantidad lo cual los hace no detectables.

6.2 Resultados de pruebas de actividad

30mg de cada extracto seco, fueron utilizados para realizar las pruebas de actividad insecticida. Los resultados obtenidos de dichos ensayos son mostrados en la siguiente tabla.

TABLA 6.2 Pruebas de actividad insecticida.

Índices de actividad antialimentaria (IA), de disuasión de la alimentación (ID) y de supresión de la alimentación (IS) de cuatro extractos crudos sobre larvas de <i>Spodoptera exigua</i> (gusano soldado)			
Extracto *	IA	ID	IS
5000 ppm			
Clorofórmico Cc	17.4 ± 5.2	47.1 ± 6.2	4.4 ± 14.7
H ₂ O Cc	-12.6 ± 7.8	30.8 ± 8.9	-18.8 ± 18.5
H ₂ O Th	50.6 ± 5.4	17.8 ± 6.2	42.9 ± 6.3

*Cc= *Croton ciliatoglanduliferus*

**Th= *Trichilia havanensis*.

Los resultados arrojados por los ensayos de actividad biológica dieron un alto índice antialimentario para *T. havanensis* lo cual nos indica una inhibición en la alimentación del gusano soldado.

Por otra parte *C. ciliatoglanduliferus* tuvo mejores resultados de índice de disuasión ya que el gusano sí llegó a probar los discos foliares marcados con el extracto solo que no los consumió, optando por comer los no marcados.

6.3 Cromatografía de *Croton ciliatoglanduliferus*:

Se hizo una columna cromatográfica en sílica gel (50.000g), en la cual se colocaron 5g de extracto. Se obtuvieron un total 158 fracciones cada una de las cuales fue probada en placas de cromatografía de placa fina para juntar aquellas que tuvieran un Rf similar con lo cual se obtuvieron 15 fracciones distintas con un peso total de 1.826g y un rendimiento del 36.526%.

Los pesos obtenidos de cada fracción se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 6.3 Pesos de fracciones de extracto acuoso de *C. ciliatoglanduliferus*.

FRACCIÓN	Fracciones juntadas	Peso (mg)	Polaridad (%)
F1	1-13	127.20	AcOEt/Hx (55%:45%)

F2	14-20	70.20	AcOEt/Hx (55%:45%)
F3	21-29	29.60	AcOEt/Hx (65%:35%)
F4	30-36	19.60	AcOEt/Hx (75%:25%)
F5	37-40	54.40	AcOEt/Hx (75%:25%)
F6	41-52	4.80	AcOEt/Hx (95%:5%)
F7	53-56	11.60	AcOEt/Hx (95%:5%)
F8	57-71	76.40	AcOEt (100%)
F9	72-75	78.20	MetOH /AcOEt (10%:90%)
F10	76-86	100.80	MetOH /AcOEt (10%:90%)
F11	87-98	81.80	MetOH /AcOEt (20%:80%)
F12	99-107	101.50	MetOH /AcOEt (50%:50%)
F13	108-118	33.80	MetOH /AcOEt (40%:60%)
F14	119-150	142.00	MetOH /AcOEt (20%:80%)
F15	151-158	894.40	MetOH (100%)

*AcOEt = Acetato de Etilo. Hx = Hexano. MetOH = Metanol.

Así como para el extracto acuoso, el extracto clorofórmico también fue sembrado en columna cromatográfica de silica gel obteniéndose 60 fracciones, las cuales al juntar aquellas que presentaban el mismo Rf resultaron 7 fracciones distintas. El peso total de las fracciones obtenidas fue de 1.648g lo que es igual a un rendimiento del 55.000%.

La siguiente tabla muestra los pesos de cada fracción y las fracciones que fueron juntadas.

TABLA 6.4 Peso de fracciones de extracto clorofórmico de *C. ciliatoglanduliferus*

FRACCIÓN	Fracciones juntas	Peso en mg
F1	1-11	228.00
F2	12-14	130.00
F3	15-23	220.00
F4	24-26	180.00
F5	27-40	180.00
F6	41-50	250.00
F7	51-60	460.00

6.4 Cromatografía y pruebas de actividad de *Trichilia havanensis*

Se hizo un extracto acuoso de *Trichilia havanensis* el cual, una vez liofilizado, pesó 32.340g de extracto seco, de esta cantidad, 10.000g se utilizaron en cromatografía de sílica gel obteniendo 63 fracciones de 50mL y una última fracción de 250ml. Por comparación en cromatografía de placa fina, se juntaron aquéllas que presentaron igual Rf obteniendo al final 8 fracciones. El peso total obtenido fue de 4.969g con un rendimiento de 49.690%.

En la siguiente tabla se muestran los pesos de cada fracción ya sin disolvente.

TABLA 6.5. Pesos de fracciones del extracto acuoso de *Trichilia havanensis*.

FRACCIONES	Fracciones juntas	Cantidad obtenida	Polaridad (%)
F1	1-3	220.00mg	AcOEt/MetOH (60%:40%)

F2	4-8	840.00mg	AcOEt/MetOH (60%:40%)
F3	9-17	410.00mg	AcOEt/MetOH (40%:60%)
F4	18-31	420.00mg	AcOEt/MetOH (20%:80%)
F5	35-46	859.00mg	MetOH (100%)
F6	47-56	300.00mg	H ₂ O/MetOH (25%:75%)
F7	57-63	220.00mg	H ₂ O/MetOH (50%:50%)
F8	64	1.17g	H ₂ O (100%)

Se tomaron 100mg de cada fracción para hacer las pruebas de actividad biológica correspondiente obteniendo los siguientes resultados:

TABLA 6.6. Resultados de índices de actividad biológica de *T. havanensis*

Índices de actividad antialimentaria de ocho fracciones del extracto acuoso de semillas de <i>T. havanensis</i> sobre larvas de <i>S. exigua</i>			
Fracciones 1000 ppm	IA ± E.E.	ID ± E.E.	IS ± E.E.
F1	-1.0 ± 2.9	-2.2 ± 3.5	8.9 ± 3.6
F2	9.2 ± 2.6	-10.4 ± 6.2	25.1 ± 4.8

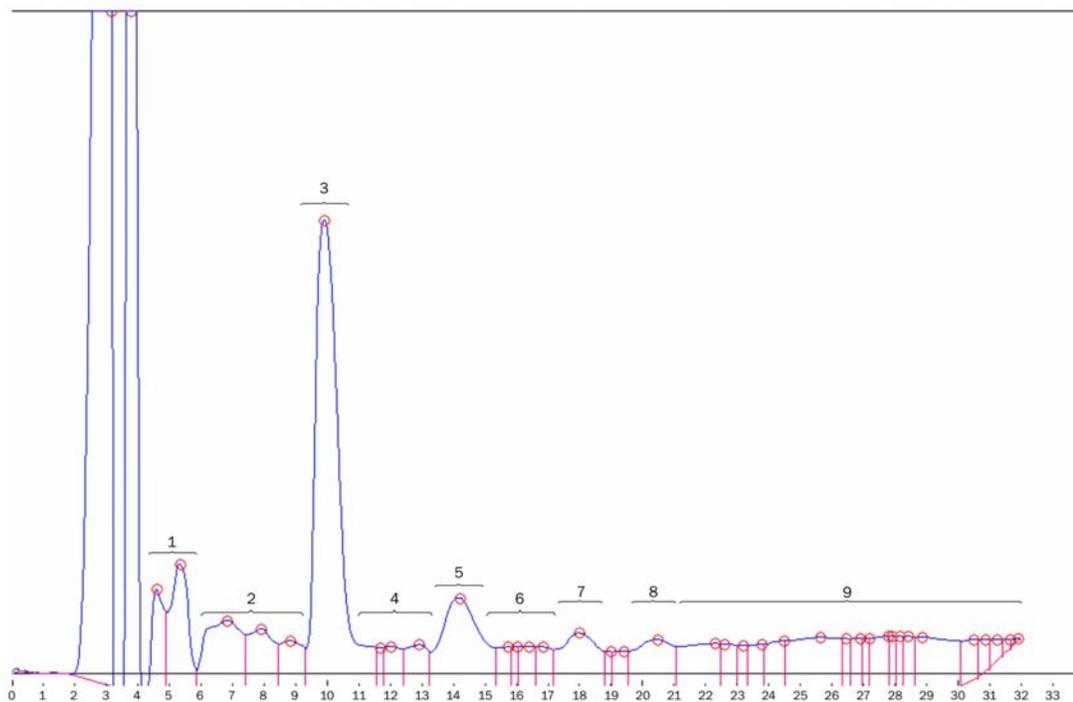
F3	19.3 ± 3.3	-15.7 ± 7.0	35.5 ± 3.5
F4	55.0 ± 4.9	-8.7 ± 5.5	41.0 ± 3.0
F5	32.5 ± 3.7	7.4 ± 7.1	25.7 ± 3.2
F6	40.6 ± 2.5	3.5 ± 6.4	39.1 ± 3.7
F7	47.4 ± 3.2	4.3 ± 7.6	42.5 ± 3.4
F8	44.7 ± 4.0	11.9 ± 8.9	44.7 ± 3.7

De acuerdo con los resultados de la tabla 5.6, las fracciones que presentaron mayor índice de actividad antialimentaria y de supresión de apetito fueron las fracciones F4, F7 Y F8. Los bajos índices de disuasión presentados en la tabla 5.6 eran de esperarse de acuerdo a la tabla 5.2. En la cual se observó un índice de disuasión bajo para el extracto acuoso original del cual provienen estas fracciones

La F8 (300.00mg) se trabajó en columna de gel de sílice (24g) obteniendo 6 fracciones distintas. Las cuales se procesaron en HPLC con columna C18 obteniendo los siguientes cromatogramas:

La fracción 1 presentó el siguiente cromatograma:

CROMATOGRAMA 1 de la F1 de la F8



Se recolectaron 9 fracciones de acuerdo a los picos que aparecieron en el cromatograma, en algunos casos en lo que no se resolvían las señales correctamente se tomó la decisión de juntarlos con otros para en un futuro purificarse con una columna distinta.

Los tiempos de retención de los picos observados y recolectados se pueden observar en la siguiente tabla:

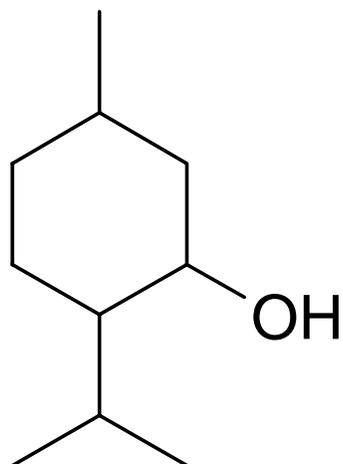
TABLA 6.7 Datos del cromatograma.

# de PICO	Tiempo de retención (en min.)	Anchura de pico (en min.)
1	4.35	1.18
2	6.00	2.7
3	9.50	1.6
4	11.15	2.55
5	13.80	1.9
6	15.55	1.85
7	17.50	1.25
8	19.60	1.48
9	21.10	2.9

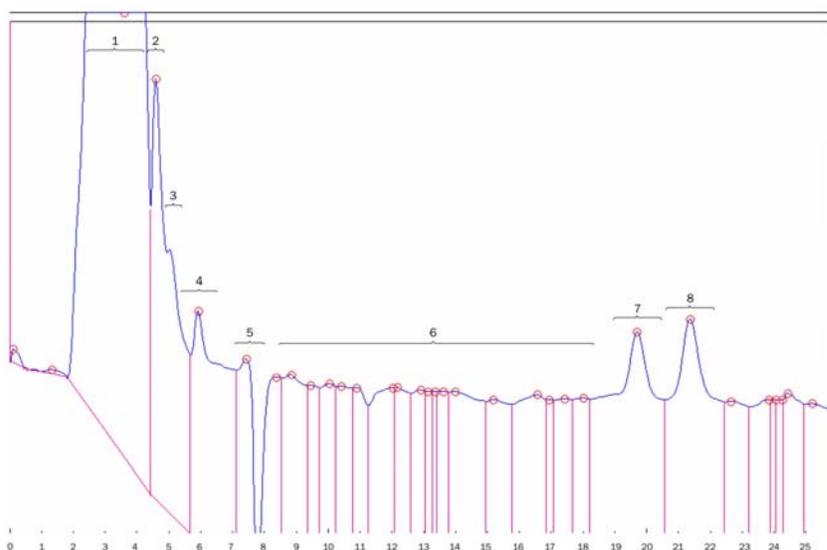
En este cromatograma podemos observar claramente el pico número 3 bien definido, que por la cantidad obtenida fue el único que se pudo elucidar estructuralmente por RMN.

El análisis de los espectros de RMN de hidrógeno (^1H), carbono 13 (^{13}C), gCOSY, APT, y HSQC, la bibliografía consultada y el uso del programa de modelado molecular (PCMODEL v6.0), el compuesto obtenido es el 4-(isopropil)-1metil-3-ciclohexanol comúnmente conocido con el nombre de mentol.

Figura 6.1 Mentol



CROMATOGRAMA 2 F6 de F8



Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol-agua 68-32. La solución que se inyectó tenía una concentración de 1.13mg/mL y se trabajó de acuerdo a la metodología mencionada.

Se recolectaron 8 fracciones distintas y en la siguiente tabla se muestran sus picos de retención.

TABLA 6.8 Tiempo de retención de picos de la fracción 6

# DE PICO	Tiempo de retención (en min.)	Anchura del pico (en min.)
1	1.83	1.47
2	3.58	0.37
3	4.00	0.65
4	4.86	0.49
5	5.50	0.41
6	6.00	13.70
7	19.70	1.10
8	21.73	1.33

Los picos mejor definidos y resueltos son el 7 y 8 los cuales por su forma podemos pensar que se encuentran bastante puros y se planea elucidar su estructura en un futuro con la ayuda de RMN.

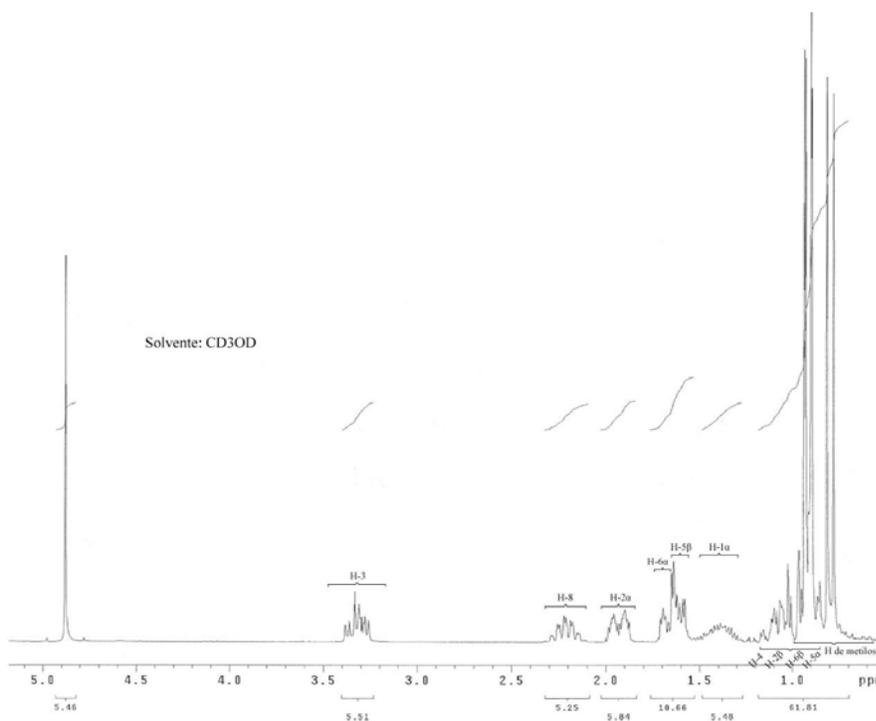
Las 4 fracciones restantes fueron también trabajadas en HPLC pero sus cromatogramas no salían con los picos bien resueltos o las fracciones no salieron en cantidades suficientes como para ser observadas en RMN. La falta de resolución de los picos se debe probablemente al tipo de columna utilizada, con lo cual se recomienda usar alguna otra para obtener la purificación de dichas fracciones.

6.5 Elucidación del Compuesto

La elucidación de la estructura se realizó con la ayuda de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C así como los experimentos de HSQC, APT y gCOSY.

Primeramente se analizaron los espectros de ^1H y ^{13}C apoyándose en el experimento de HSQC. Se compararon con la literatura y coincidieron con los espectros reportados para el mentol.

FIGURA 6.2 Espectro ^1H -RMN



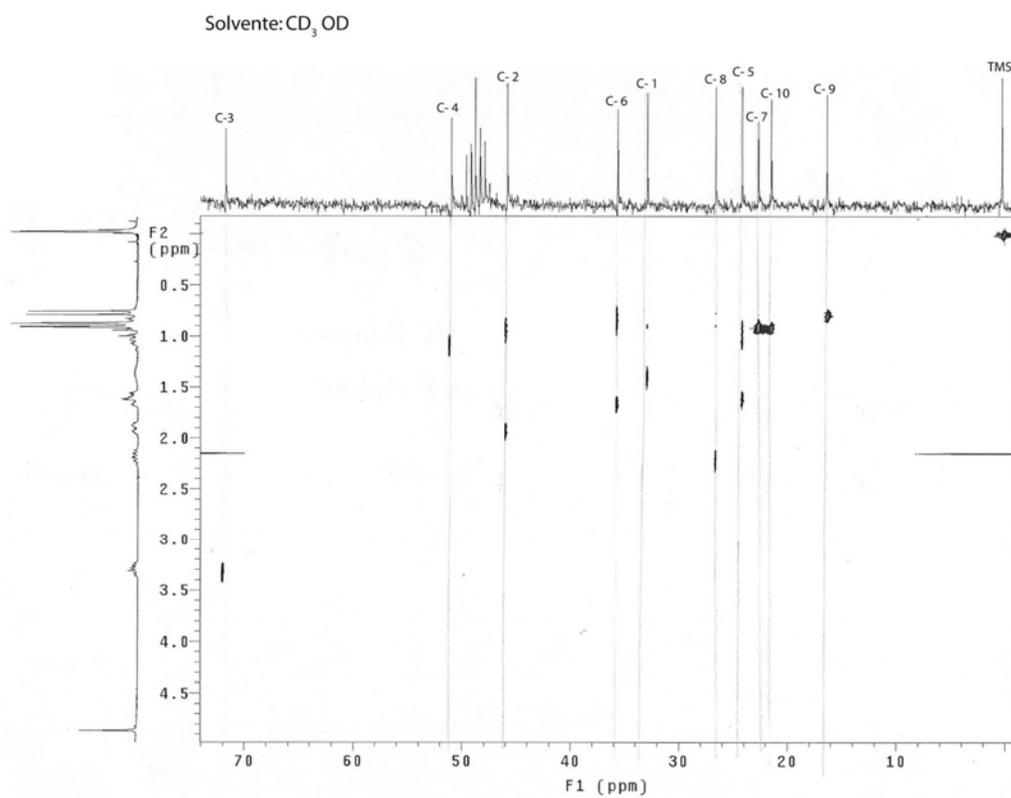
El espectro ^1H -RMN (Figura 6.2) mostró una señal a δ 3.32 (ddd) asignado a H-3, la señal a δ 2.22 se mostró como un hepteto doble asignado a H-8. La señal a δ 1.93 (dddd) fue asignada al H-2 α mostrando un acoplamiento a larga distancia tipo W con H-6 α . En el rango de δ 1.55-1.72 se encuentran las señales correspondientes a H-6 α y H-5 β . El Multiplete de la región δ 1.26-1.50 fue asignado al H-1. Se encontraron señales

superpuestas y difíciles de identificar en la región δ 0.83- 1.25 correspondientes a H-4, H-2 β , H-6 β y 5-H α . Tres señales dobles correspondientes a grupos metilos a δ 0.8 (CH₃-9), δ 0.9 (CH₃-7), δ 0.92 (CH₃-10).

La asignación de este espectro fue conforme a los datos espectroscópicos de la literatura (Silverstein et al 1996). Las constantes de acoplamiento se encuentran enlistadas en la tabla 5.9.

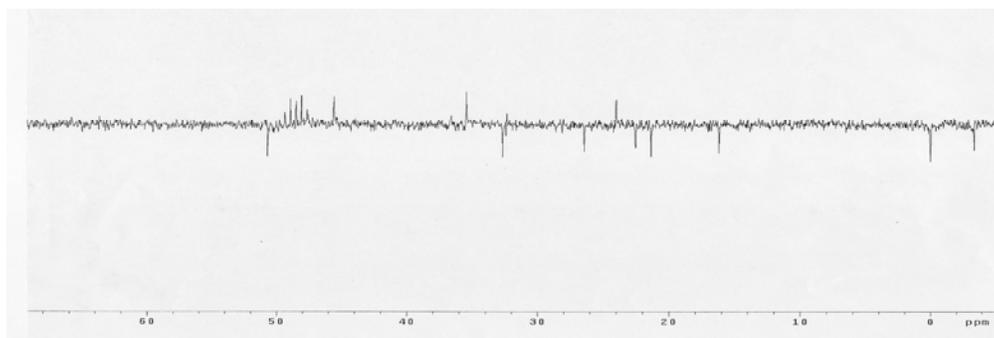
La asignación del espectro de carbono ¹³C-RMN fue hecha con la ayuda de un experimento de HSQC (Figura 6.3), este tipo de experimento permite correlacionar los hidrógenos con los carbonos a los cuales están unidos. En el experimento de HSQC que se muestra en la figura (Figura 6.3) se observa que el C1 correlaciona con la señal de hidrógeno que aparece a δ 1.4, el C2 con la de δ 0.90 y con la señal a δ 1.90, C3 con la de δ 3.40, el C4 con la de δ 1.10, C5 con una señal a δ 0.95 y a δ 1.60, el C6 una señal a δ 1.7 y con otra a δ 0.80, el C7 correlaciona con una sola señal a δ 0.85 de desplazamiento, el C8 con la señal correspondiente al desplazamiento de δ 2.20 y el C10 y C9 con correlación con las señales en δ 0.92 y δ 0.80 respectivamente.

FIGURA 6.3 Experimento HSQC.



El experimento APT, mostrado en la figura 6.4 corrobora las observaciones hechas en el HSQC.

FIGURA 6.4, Experimento APT



Posteriormente, se realizó un modelado molecular utilizando el programa con el que se cuenta que fue el PCMODEL para así observar la conformación de mínima energía. Luego, se obtuvieron las constantes de acoplamiento teóricas entre sus hidrógenos a partir del valor de los ángulos diedros.

En la siguiente tabla se pueden observar las constantes de acoplamiento teóricas y experimentales de cada hidrógeno de la molécula.

En dicha tabla se pueden observar la muy buena concordancia entre las constantes de acoplamiento teóricas con las experimentales.

TABLA 6.9. Constantes de acoplamiento.

Hidrógeno	Θ	J teórica [Hz]	J [Hz] exp obtenida
H _{1α} -H _{2α}	59.7	3.25	3.4
H _{1α} -H _{2β}	177	12.34	11.4
H _{1α} -H _{6α}	-59.4	3.29	3.4
H _{1α} -H _{6β}	-176.8	12.34	11.8
H _{1α} -CH ₃ - 7	-	-	6.6

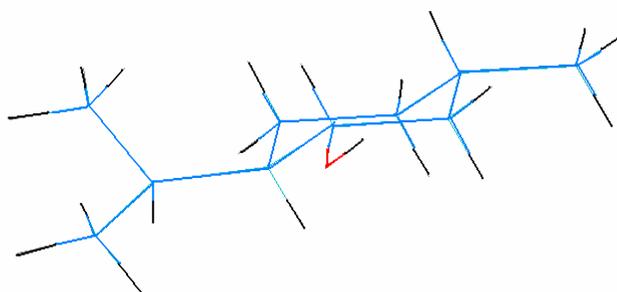
$H_{2\alpha}$ - $H_{2\beta}$	-	-	15
$H_{2\alpha}$ - $H_{3\alpha}$	-57.5	4.5	4.4
$H_{2\alpha}$ - $H_{6\alpha}$	Acoplamiento tipo w a larga distancia.		2.2
$H_{2\beta}$ - $H_{3\alpha}$	-147.7	11.3	10.0

TABLA 6.9. (Continuación) Constantes de acoplamiento.

Hidrógeno	Θ	J teórica [Hz]	J [Hz] exp obtenida
$H_{3\alpha}$ - $H_{5\alpha}$	-179.2	12.4	10.0
$H_{4\beta}$ - $H_{5\alpha}$	-179.4	12.4	*
$H_{4\beta}$ - $H_{5\beta}$	-61.8	3.0	2.2
$H_{4\beta}$ - H_8	77.0	1.0	22.0
$H_{5\alpha}$ - $H_{5\beta}$	-	-	15.0
$H_{5\alpha}$ - $H_{6\alpha}$	57.2	3.5	*
$H_{5\alpha}$ - $H_{6\beta}$	174.4	13.2	*
$H_{5\beta}$ - $H_{6\alpha}$	-59.0	3.1	3.2
$H_{5\beta}$ - $H_{6\beta}$	58.2	3.3	*
$H_{6\alpha}$ - $H_{6\beta}$	-	-	12.0
H_8 -CH ₃ - 9	-	-	7.0
H_8 -CH ₃ - 10	-	-	7.0

***señales superpuestas para su identificación**

FIGURA 6.5 Conformación de mínima energía del mentol (PCMODEL)



6.6 Asignación de señales de carbono

El espectro de ^{13}C -RMN y su posterior comparación bibliográfica (Silverstein et al 1996), nos arrojó la siguiente tabla, en ella se asignan los desplazamientos químicos de las señales de carbono en nuestra muestra y las reportadas. Dichas señales son muy semejantes con lo que el compuesto obtenido es el mentol.

En artículos revisados (Soheil, S. et al 2003), se encontró la numeración correcta reportada para cada carbono del mentol.

FIGURA 6.6 Mentol numerado

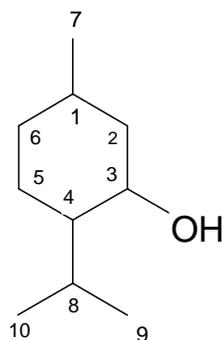
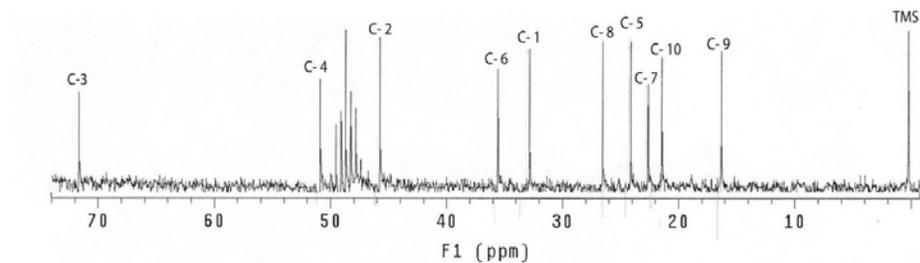


TABLA 6.10 $J^{13}\text{C}$ -RMN para mentol (CD_3OD) y TMS Como patrón interno

Número de Carbono	Desplazamiento (ppm)
	Experimental
1	32.6
2	46.0
3	71.3
4	51.0
5	23.3
6	35.5
7	22.5
8	26.0
9	16.3
10	19.0

Figura 6.7 Espectro de carbono.

Solvente: CD₃ OD



El mentol es un metabolito secundario aislado inicialmente del género *Mentha* y es ampliamente usado principalmente como aromatizante y saborizante, aunque también se le llega a utilizar como digestivo y sustancia refrescante para la piel.

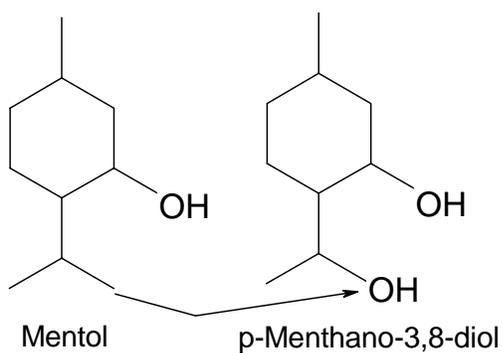
Debido a que este compuesto fue extraído de una de las fracciones que presentaban gran actividad antialimentaria, es probable que sea uno de los causantes de dicha actividad. Maggi Maria, en su artículo “El origen de los pesticidas Naturales” nos menciona el uso del mentol como repelente de insectos de la papa. Distintos autores han mencionado también el uso de la *Mentha rotundifolia* y *Mentha piperita*, como buenas repelentes de mosquitos al untarse en la piel lociones hechas a base de extractos acuosos de dichas plantas (Clemente S.).

Otro dato que nos hace pensar que el mentol puede ser el o uno de los metabolitos responsables de la actividad repelente de ésta planta es la comparación estructural con el compuesto llamado *p*-Mentano-3,8-diol. Dicho compuesto ya ha sido estudiado especialmente como insecticida y repelente y su nombre IUPAC es 2-(2-hidroxil-2-metil)-5-metil-ciclohexanol (Pest Management Regulatory Agency 2002)

El compuesto anteriormente mencionado tiene una estructura muy parecida al mentol solo que uno de los grupos metilo del sustituyente isopropilo está reemplazado por un grupo -OH.

La siguiente figura compara las dos moléculas:

Figura 6.8 Comparación entre mentol y compuesto insecticida



Observando lo anterior se recomienda probar la actividad biológica del mentol para comprobar si es un compuesto que puede ser utilizado como repelente o no.