



00387
5
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE APOYO
TAXONÓMICO AL GÉNERO *Casimiroa*
(RUTACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. AIDA NELLY GARCÍA ARGÁEZ

Director de Tesis: Dr. Mariano Martínez Vázquez

MÉXICO, D.F.

MAYO, 2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Autorizo a la Dirección General de Bienes
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo de tesis.
NOMBRE: Aida Nelly García
Argaéz
FECHA: 21 mayo 2003
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 10 de junio de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado del Doctorado en Ciencias del alumno(a) Aida Nelly García Argaez, con número de cuenta 72101573 y número de expediente 47942, con la tesis titulada: "Estudio fitoquímico de apoyo taxonómico al género *Casimiroa* (Rutaceae)", bajo la dirección del (la) Dr. Mariano Martínez-Vázquez.

Presidente:	Dra. María Cristina Pérez-Amador y Barrón
Vocal:	Dr. Javier Caballero Nieto
Vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal:	Dra. Alicia Brechú Franco
Secretario:	Dr. Mariano Martínez Vázquez
Suplente:	Dr. Francisco Javier Espinosa García
Suplente:	Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de mayo de 2003

[Firma manuscrita]
Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

B

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO

Con amor

A mis hijos Sara Janí y Jesús Altzil

Con amor, respeto y agradecimiento

A mi madre Albertina Argáez García

A la memoria de mi padre, Jesús García García

Con inmenso cariño

**A mis hermanos Rosy, Jesús, Marco,
Lupita A. y Lupita V.**

A mis sobrinos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

C

DE MANERA ESPECIAL AGRADEZCO AL DR. MARIANO
MARTÍNEZ VÁZQUEZ SU APOYO, ESTÍMULO Y VALIOSA
AYUDA EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO

0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por la beca otorgada para los estudios de doctorado

Al Instituto de Química por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo

A los miembros del jurado por la revisión del manuscrito y por sus valiosas sugerencias.

A mis compañeros del Laboratorio 1-4 en el Instituto de Química

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

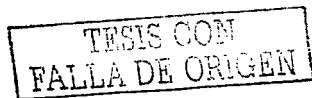
E

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I: INTRODUCCIÓN	3
II: ANTECEDENTES	9
II.1 EL GÉNERO <i>Casimiroa</i>	9
II.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS	17
II.3 QUIMIOTAXONOMIA	24
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	50
III.1 HIPÓTESIS	50
III.2 OBJETIVOS	50
IV. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LAS CUMARINAS PRESENTES EN <i>Casimiroa greggii</i> Y EN <i>C. pringlei</i> , <i>C. edulis</i> , <i>C.</i> <i>pubescens</i> Y <i>C. calderoniae</i>	51

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. PHENETIC ANALYSIS OF FOUR SPECIES OF <i>Casimiroa</i> (RUTACEAE)	67
VI. 11 β -HYDROXYOBACUNONE (ZAPOTERIN)	89
VII. CASIMIROIN, ZAPOTERIN, ZAPOTIN AND 5,6,2',3',4'- PENTAMETHOXYFLAVONE FROM <i>Casimiroa pubescens</i>	94
VIII. PUBESAMIDES A, B AND C, THREE NEW N- BENZOYLTYRAMIDE DERIVATIVES ISOLATED FROM <i>Casimiroa</i> <i>pubescens</i>	102
IX. CONCLUSIONES	120
X. BIBLIOGRAFÍA	123
XI. APÉNDICE	127



RESUMEN

En este estudio se utilizó la presencia de cumarinas en semillas y hojas de *C. edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens* y *C. calderoniae* para encontrar diferencias y similitudes entre los taxa, por lo que se recolectaron hojas y semillas de estas especies. De las semillas de *C. calderoniae* se aislaron las cumarinas isopimpinelina y felopterina, mientras que de las semillas de *C. pubescens* se aislaron isopimpinelina y 8-geraniloxipsoraleno. Adicionalmente en el presente estudio se determinó, mediante cromatografía líquida de alta resolución, la presencia y la concentración de cumarinas en hojas y en semillas de las especies estudiadas. Estos resultados, junto con informes previos, señalan a las cumarinas como posibles quimiomarcadores de *Casimiroa*. Sin embargo existe una diferencia entre las cumarinas sintetizadas por *C. greggii* y las demás Casimiroas, ya que *C. greggii* elabora cumarinas provenientes de la umbeliferona prenilada en el átomo de carbono 8, mientras que las demás especies elaboran principalmente furanocumarinas que provienen de la prenilación en el átomo de carbono 6. Lo que puede constituir una diferencia interespecífica. Por otro lado, con objeto de aclarar la confusión taxonómica entre *C. edulis* y *C. sapota* se realizó un análisis de ordenación utilizando la presencia y la concentración de varias cumarinas, junto con datos morfológicos de estas especies. Estos análisis permitieron delimitar a las especies estudiadas. La obtención de zapoterina cristalina, a partir de semillas de *C. edulis*, permitió establecer inequívocamente, mediante difracción de rayos X, la orientación beta del sustituyente hidroxilo en C-11 del limonoide. Por otro lado de las semillas de *C. pubescens* se aislaron los flavonoides zapotina y 5,6,2',3',4'-pentametoxiflavona. Estos resultados, junto con los informados en la literatura muestran que las flavonas con un núcleo 5,6-disustituido son característicos del género. También se aislaron, de semillas de *C. pubescens*, las pubesamidas A, B y C, compuestos terpenoides nuevos con un núcleo de N-benzotiramida. Informes previos indican que la N-benzotiramida fue aislada de *C. edulis*, por lo tanto, es probable que esta especie presente compuestos similares a las pubesamidas

1

TESIS CON
FALLA DE OMBLEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

ABSTRACT

In this study, the presence of coumarins in seeds and leaves of *Casimiroa edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens*, and *C. calderoniae* was used to find the differences and similarities among these taxa. Then, seeds and leaves from *C. edulis*, *C. pubescens* and *C. calderoniae* were collected. From *C. calderoniae* seeds the coumarins isopimpinellin and phellopterin were isolated, while from seeds of *C. pubescens* isopimpinellin and 8-geranyloxipsoralen were isolated. These results together with previous studies showed that coumarins could be chemiomarkers of the *Casimiroa*. On the other hand, in order to clarify the taxonomic confusion between *C. edulis* and *C. sapota*, an ordination analysis was performed using the data of presence and concentration of several coumarins, together with morphologic data of these species. These analysis led define both taxa. The isolation, as crystals, of the limonoid zapoterine from seeds of *C. edulis* led unequivocal established the stereostructure, by a RX diffraction study, of this limonoid. On the other hand, from *C. pubescens* seeds, the flavonoids zapotin and 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone were isolated. These results are in agreement with previous reports that show that flavones with 5,6-disubstitution pattern are usual in *Casimiroa*. Also from the seeds of *C. pubescens* the new N-benzoyltyramides derivatives named pubesamides A, B and C were isolated. Previous reports showed that N-benzoyltyramide was isolated from *C. edulis*, then is probable that N-benzoyltyramide derivatives could be present in others species of this genus.

I: INTRODUCCIÓN

El género *Casimiroa* (Rutaceae) está conformado por árboles o arbustos originarios de México y Centroamérica que viven en climas cálidos. En México, las especies *C. pubescens*, *C. pringlei*, *C. microcarpa*, *C. greggii*, *C. watsonii*, *C. tetrameria*, *C. calderoniae* y *C. emarginata* se encuentran en forma silvestre y generalmente, no presentan problemas taxonómicos. Las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *Casimiroa edulis* y varias formas de *C. sapota*. Aún mas, en la región central del país la especie más conocida es *C. edulis*, llamada popularmente zapote o zapote blanco. Sin embargo, a pesar de su popularidad, la situación taxonómica de esta especie no es clara, ya que se le ha asignado como sinonimia de *C. sapota*. Inclusive se ha mencionado que *C. sapota* forma un complejo difícil de desentrañar por la presencia de numerosas formas, ya que algunas de éstas no están bien definidas, aunque según Martínez morfológicamente se pueden distinguir estas dos especies por sus folíolos.

A pesar de la dificultad para distinguir a *C. edulis* de *C. sapota*, por la morfología de las hojas, solamente se ha realizado un estudio taxonómico utilizando otro tipo de caracteres, el cual se basó en la morfología de los granos de polen (8), sin embargo los autores no encontraron diferencias entre el polen de ambas especies.

Por otro lado, se conoce que los compuestos sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas son útiles en taxonomía; es así que dentro de la familia Rutaceae se han utilizado como marcadores taxonómicos a los aceites esenciales, los alcaloides, las cumarinas, los flavonoides, los limonoides y a las ceras. El uso específico de estos compuestos en la familia ha permitido apoyar exitosamente propuestas de clasificaciones preexistentes.

Por ejemplo, en el orden de los Rurales, que esta constituido por las familias: Simaroubaceae, Meliaceae, Burseraceae, Cneoraceae y posiblemente Anacardiaceae; la presencia recurrente de cumarinas, esta restringida a las familias Rutaceae y Meliaceae, y en esta última la presencia de cumarinas parece estar restringida a géneros de la subfamilia Cedreloideae. Se ha mencionado que esta subfamilia presenta gran similitud morfológica con la subfamilia Flindersioideae de las Rutáceas. Sin embargo, aunque la presencia de cumarinas en Rutaceae y Meliaceae, apoya su relación filogenética; por el contrario la presencia de cumarinas en las subfamilias Flindersioideae y Cedreloideae no apoya la propuesta de que Flindersioideae es una familia entre Rutaceae y Meliaceae. Aún más los metabolitos secundarios de Flindersioideae son típicos de la familia Rutaceae.

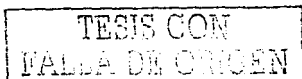
Se ha mencionado también que, debido al alto grado de similitud entre las cumarinas de las Umbelliferae y las Rutaceae, puede existir una cercanía taxonómica entre estas familias. Sin embargo, en las clasificaciones

taxonómicas existentes no se les considera filogenéticamente adyacentes. Por lo que, la similitud entre las cumarinas de estas familias representaría un caso de convergencia química. Aún mas, una comparación detallada en función de los sustituyentes prenilos de las cumarinas, presentes en ambas familias, muestra diferencias interesantes que sugieren rutas metabólicas distintas en cada familia.

La especies de la familia Rutaceae generalmente sintetizan cumarinas de tipo simple, así como furano y piranocumarinas. Inclusive estudios previos han demostrado que existe una relación 6:1:3 en la producción de cumarinas entre las subfamilias Rutoideae, Toddaloideae y Aurantioideae.

Por otro lado son pocos los estudios fitoquímicos que se han realizado en el género *Casimiroa*. Debido a su valor comercial y a las propiedades medicinales que se le atribuyen *C. edulis* es la especie del género a la que se le han realizado la mayor cantidad de estudios fitoquímicos. Una extensa investigación bibliográfica reveló que, aparte de *C. edulis*, sólo *C. greggii* y *C. pringlei* han sido estudiadas.

Estos estudios han revelado la presencia de cumarinas en las tres especies; así en *C. edulis* se ha encontrado 8-geraniloxipsoraleno, bergapteno, felopterina, isopimpinellina, escopoletina, éster metílico de la escopoletina, 5-geraniloxipsoraleno, 8-geranil-oxipsoraleno y 9 hidroxí-4-metoxipsoraleno; mientras que, en *C. pringlei* se ha aislado 8-geraniloxipsoraleno, bergapteno, xantotoxol,



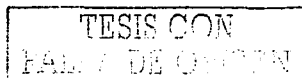
felofterina, 8-[(6,7-dihidroxi-3,7-dimetil-2-octenil)oxil]psoraleno y 8-[(4-acetoxi-3-metil-butil)oxil]psoraleno y por último de *C. greggii* se ha obtenido seselina y O-geranil-ostenol.

Como se observa en la familia Rutaceae, y específicamente dentro del género *Casimiroa*, las cumarinas tienen una presencia recurrente y por lo tanto pueden ser susceptibles de ser utilizadas como marcadores químicos de este género. Propuesta que se ha desarrollado para otros géneros dentro de la familia Rutaceae.

Por lo anterior es factible suponer que debido a la presencia de diferentes cumarinas en *C. edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens* y *C. calderoniae* se podrán establecer diferencias químicas diagnósticas entre estas taxa. Tomando en cuenta esta hipótesis, entonces es factible aportar datos químicos para apoyar la determinación taxonómica de especies del género *Casimiroa*.

Para tal efecto se estudiaron químicamente las semillas y hojas de cuatro especies de *Casimiroa*, lo que permitió establecer similitudes y diferencias entre las taxa bajo estudio.

Así se realizó un estudio, mediante cromatografía líquida de alta resolución, de hojas y semillas de *Casimiroa pubescens*, *C. edulis* y *C. calderoniae*. Los resultados mostraron la presencia de las cumarinas felofterina, isopimpinellina, heraclenol y heraclenina en las tres especies estudiadas. Estos resultados, junto con otros previamente publicados en la literatura sirvieron para realizar



un análisis de las diferencias estructurales entre las cumarinas sintetizadas por *C. greggii* y las demás especies estudiadas.

Así mismo, éstos resultados sirvieron de base para la realización de un estudio fenético de individuos de *Casimiroa edulis*, *C. pubescens*, *C. calderoniae* y *C. sapota*. En este análisis, cuando se utilizaron datos morfológicos y químicos, a través del análisis de componentes principales (PCA), las cuatro especies bajo estudio se separaron en cuatro grupos

Adicionalmente se realizaron estudios fitoquímicos de las semillas de *C. pubescens* y *C. calderoniae* y *C. edulis*. Así, de *C. pubescens* se aislaron las cumarinas 8-geraniloxipsoraleno e isopimpinelina, el alcaloide skimmianina y el ubicuo β -sitosterol, mientras que, de *C. calderoniae* se aislaron β -sitosterol, y las cumarinas isopimpinelina y felopterina.

También, el estudio fitoquímico de *C. pubescens* permitió el aislamiento de: casimiroina, zapoterina, zapotina y 5,6,2',3',4'-pentametoxiflavona. Estos resultados están de acuerdo con los estudios previos de especies de *Casimiroa* en los que se observan que flavonas con núcleos 5,6-dí-sustituídos son frecuentemente encontrados en el género.

Así mismo, a partir de *C. pubescens*, se aislaron tres nuevos compuestos, derivados de la N-benzoiltiramina: las pubesamidas A, B y C. La determinación estructural de éstos se realizó a través de sus constantes físicas, químicas y espectroscópicas. Aunque se había informado sobre la presencia de N-

benzoiltiramina en *C. edulis*, sin embargo en esa ocasión se efectuó un tratamiento ácido al extracto. Por lo que, de acuerdo a nuestros resultados es probable que *C. edulis* contenga compuestos similares a las pubesamidas aisladas de *C. pubescens*.

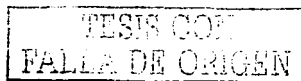
Así mismo la obtención de zapoterina en forma cristalina a partir de las semillas de *C. edulis*, permitió la obtención de su estructura molecular por análisis de difracción de Rayos X; de tal manera que se pudo establecer inequívocamente la posición del sustituyente hidroxilo en la molécula.

II: ANTECEDENTES

II.1 EL GÉNERO *Casimiroa*

El género *Casimiroa* (Rutaceae) fue establecido por los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza en su obra *Novorum Vegetabilium Descriptiones*, publicada en México en 1825 (1).

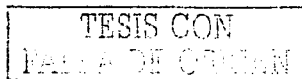
Las *Casimiroas* son árboles o arbustos mexicanos y centroamericanos, de corteza morena-grisácea, salpicada de numerosas lenticelas; de hojas alternas, pecioladas, digitadas, con 3 a 5 folíolos, rara vez 1 ó 7. Hojuelas lanceoladas, subelípticas, ovales u obovadas, con peciólulos cortos o largos, glabras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



Hasta 1944 se conocían siete especies para el género *Casimiroa* (1): *Casimiroa edulis* Llave et Lex., 1825, *C. sapota* Oerst., 1858, *C. pubescens* Ram., 1896, *C. pringlei* (Wats.) Engler, 1896, *C. watsoni* Engler, 1896, *C. tetrameria* Millsp., 1898, *C. emarginata* Standl. et Steyerl., 1944.

Maximino Martínez, en 1951 (1), agrega a esta clasificación una variedad y nueve formas de la *Casimiroa sapota*, una variedad de la *C. pringlei* y una forma de la *C. edulis*, quedando el género conformado por 19 taxa:

1. *Casimiroa tetrameria* Millsp.
2. *C. pringlei* var. *pringlei* (Wats.) Engl.
3. *C. pringlei* var. *neoleonensis* Martínez
4. *C. watsoni* Engler
5. *C. edulis* Llave et Lex. f. *typica*
6. *C. edulis* f. *microcarpa* Martínez
7. *C. pubescens* Ramírez
8. *C. sapota* Oerst. var. *sapota* f. *typica*
9. *C. sapota* var. *villosa* Quiroz Calvo et Martínez
10. *C. sapota* var. *villosa* f. *ovandoensis* Martínez
11. *C. sapota* var. *villosa* f. *sinaloensis* Martínez
12. *C. sapota* var. *villosa* f. *salvadorensis* Martínez
13. *C. sapota* var. *villosa* f. *tonilensis* Martínez
14. *C. sapota* f. *macrocarpa* Martínez
15. *C. sapota* f. *jaliscana* Martínez



16. *C. sapota* f. *comitana* Martínez
17. *C. sapota* f. *costarricensis* Martínez
18. *C. sapota* f. *glabrata* Martínez
19. *C. emarginata* St. et Steyerem.

En este trabajo Martínez propone que *C. pringlei* var. *pringlei* se distingue de *C. pringlei* var. *neoleonensis* por la uniformidad, el color y la forma de los folíolos, así como por la forma del fruto; ya que *C. pringlei* var. *pringlei* presenta folíolos desiguales de color verde claro o amarillento oblongo atenuadas elípticas y obovadas con el fruto globoso depresso, mientras que *C. pringlei* var. *neoleonensis* presenta folíolos uniformes de color verde obscuro anchamente elípticos y brevemente acuminados con el fruto oval acuminado. También propone utilizar caracteres de hojas y frutos (Cuadro 1) para distinguir a la forma típica de *Casimiroa edulis* de su forma *microcarpa* así como a *C. sapota* var. *sapota* f. *typica* de todas sus formas y variedades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 1. Caracteres morfológicos de las formas y variedades de *C. edulis* y *C. sapota*, según Martínez M., 1951.

CARACTER	<i>C. edulis</i> f. típica	<i>C. edulis</i> f. <i>microcarpa</i>	<i>C. sapota</i> f. típica	<i>C. sapota</i> f. <i>glabrata</i>	<i>C. sapota</i> f. <i>macrocarpa</i>	<i>C. sapota</i> f. <i>jaliscana</i>	<i>C. sapota</i> f. <i>costarricensis</i>	<i>C. sapota</i> f. <i>comitana</i>	<i>C. sapota</i> var. <i>villosa</i> f. típica	<i>C. sapota</i> var. <i>villosa</i> f. <i>ovandoensis</i>	<i>C. sapota</i> var. <i>villosa</i> f. <i>sinaloensis</i>	<i>C. sapota</i> var. <i>villosa</i> f. <i>salvadorensis</i>	<i>C. sapota</i> var. <i>villosa</i> f. <i>tomiensis</i>
PECÍOLO													
Largo de pedicelo (cm)	6.0-7.0-3.5	0.6-0.9	10.0-12.0	10.0-13.5	12.0-13.0	4.0-7.5		4.0-11.0	7.0-12.0	6.0-7.0	8.0-10.0	14.5	7.0-10.0
Pedicelo rígido		si	si	si			si	si	si	si	si	si	si
Pedicelo acanulado	si	si	si	si				si	si	si	si		si
Superficie tomentosa finamente	si	si											
Superficie glabra	no			si									
Superficie puberulenta					si								
Superficie hirsuta							si	si					
Superficie pubescente									si	si	si	si	si
PECÍOULO													
Largo de pediculo (cm)	1.0-2.0-3.0	0.3-0.5	1.25	0.8-1.5	1.5-2.0	0.4-0.7	0.5-0.8	0.6-1.5	0.5-0.6	1.0	0.5-0.7	1.2	0.5-1.5
Pediculo rígido							si						
Pediculo acanulado hacia el haz	si	si		si			si		si	si	si		si
Pediculo tomentoso finamente	si	si			si			si					
Pediculo glabro	no			si	no	si							
Pediculo hirsuto							si						
Pediculo pubescente									si	si	si	si	si
FOLIOLO													
No. de foliolos	3-4-5	3-4	5	3-4-5	3-4-5	3-5	3-5	3-5	3-5	3-4-5	3-4-5	5	3-4-5
Largo del limbo central (cm)	8.0-10.0	10.0-15.0	12.5-15.0	9.0-16.5	10-13-20	7.0-10.0	9.0-17.0	7.0-18.0	11.5-16.5	8.0-11.5	8.0-12.0	17.5-20.0	12.0-16.0
Ancho del limbo	1.5-6.0	3.0-3.5	5	4.0-7.0	4.5-6.0-7.5	4.0-4.5	4.0-4.5	4.0-8.5	5.5-7.5	2.0-4.5	4.0-5.0	6.5-10.0	5.0-7.0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

centra cm													
Largo del limbo lateral cm	5065	5065											
Ancho del limbo lateral cm		3035											
L.A. del limbo central	2060												
Limbo elíptico	si	si	si	si	si				si	si			si
Limbo angostamente elíptico	si	no		no	no								
Limbo anchamente elíptico	no	si		si	si	si	si	si		si			
Limbo oval	no	si		si	si	si	si	si				si	si
Limbo ovalado	no			si				si	si				
Base cuneata	si												si
Base obtusa	no	si		si	si	si	si	si	si	si	si		si
Base redondeada						si	si	si		si	si		
Base inequilateral	si y no	si y no						si y no	si y no			si	si
Borde entero	no	si		si	si			si	si	si	si	si	si
Borde aserrado o serrado dentado	si	no		si				si					si
Borde ondulado				si	si			si		si			
Borde revuelto				si				si					
Apice acuminado	si	no		si	si			si	si	si		si	si
Apice redondeado	si	no		si		si	si	si	si		si		
Apice truncado				si				si		si			
Apice refuso	si	no		si	si	si	si			si	si	si	
Apice emarginado	no	si											si
Superficie superior glabra	si	si	si	si		si		si				si	
Superficie superior pubescente								si		si	si	si	si
Superficie superior brillante	si			si				si	poco			no	si

Envadura central hundida	Si		Si			Si	Si		Si		
Envadura central con dens hacia la base	Si	Si			Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Envadura anastomosada cerca del borde	Si		Si								
Color del limbo verde claro		Si		Si		Si	Si	Si			
Color del limbo interno brillante			Si								
FRUTO											
Diámetro del fruto (cm)	6.0-10.0	1.3-1.5									
ARBOL											
Altura del árbol (m)	10.0-12.0	15	6.0-12.0	8.0-10.0	10.0-12.0	6.0-8.0	5.0-10.0	8.0-10.0	6.0-8.0	6.0-7.0	
Diámetro (cm)	30-40	30-40		40							

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Años mas tarde se adicionaron tres especies al género: *C. microcarpa*, descrita por Lundell en 1968 (2); *C. calderoniae*, en 1989 descrita por Chiang & Medrano (3,4), y por último, *Casimiroa greggii*, especie descrita primeramente por Watson y ubicada en el género *Sargentia*, la cual fue reubicada en el género *Casimiroa* con base en los estudios que realizó Chiang en 1989 (5).

De esta forma actualmente se considera que el género *Casimiroa* esta conformado por diez especies.

1. *Casimiroa tetrameria* Millps.
2. *C. pringlei* (Wats.) Engl.
3. *C. watsonii* Engler
4. *C. edulis* Llave et Lox.
5. *C. pubescens* Ramírez
6. *C. sapota* Oerst.
7. *C. emarginata* St. et Steyerem.
8. *C. microcarpa* Lundell
9. *C. calderoniae* Chiang & Medrano
10. *C. greggii* (Watson) Chiang

Como ya se mencionó, las únicas especies que son objeto de cultivo o semicultivo por sus frutos grandes y comestibles son *Casimiroa edulis* y varias formas de *C. sapota*. A las demás especies se les encuentra en forma silvestre (1-6).

Las especies silvestres, generalmente, no presentan problemas taxonómicos pero las cultivadas y especialmente la determinación botánica de *Casimiroa*

edulis y *C. sapota* han sido objeto de mucha confusión.

Casimiroa sapota, según Martínez (1), constituye un complejo de difícil arreglo sistemático ya que tiene muchas formas, algunas de las cuales no están bien definidas. Morfológicamente *C. sapota* se distingue por sus folíolos anchamente elípticos, ovales u obovados, hasta de 20 cm de largo y con los peciólulos cortos y gruesos, y el fruto puede ser ovoide o globoso. Algunas de sus formas se confunden con *Casimiroa edulis*, ya que hojas y frutos de algunas de éstas son prácticamente idénticos a los de *C. edulis* (1, 6).

Contrariamente a todo lo mencionado anteriormente Standley (7) mencionó que *C. sapota* casi siempre presenta tres folíolos pequeños y angostos, sobre peciólulos muy largos. A diferencia de *C. edulis*, la que describió con casi siempre 5 folíolos elípticos, ovales o ampliamente ovados, los laterales sésiles o sobre peciólulos cortos y firmes. El autor también mencionó que *C. sapota* se ha considerado igual a *C. edulis*, pero que para él son bastante diferentes, ya que las hojas de las dos especies son muy distintas. Además mencionó que todas las especies del género estaban representadas por material de herbario inadecuado.

Con objeto de encontrar diferencias entre *Casimiroa edulis* y *C. sapota*, Arreguín-Sánchez y col. realizaron un estudio sobre la morfología de los granos de polen (8). Los autores mencionaron la dificultad para distinguir taxonómicamente estas especies, por lo que trataron de diferenciarlas al nivel

de la morfología polínica; sin embargo concluyeron que no existen diferencias entre el polen de ambas especies.

Recientemente Chiang (9) mencionó que *Casimiroa sapota* ha sido generalmente incluida en *C. edulis* La Llave & Lex., y numerosos ejemplares de herbario han sido identificados como pertenecientes a esta última. En ese tratamiento y de acuerdo con Martínez (1). Chiang (9) consideró a éstas como dos especies separadas pero que forman híbridos. También mencionó que *C. edulis* se caracteriza por sus peciólulos largos y delgados y los folíolos elípticos, mientras que *C. sapota* tiene los peciólulos más cortos y rollizos y los folíolos obovados más grandes y anchos. Martínez (1) propuso muchos taxa infraespecíficos, basados, en gran parte, en caracteres tan variables como la pubescencia. En el estudio de la Flora de Nicaragua, Chiang consideró a las formas glabras y pubescentes dentro del mismo taxón (9).

II.2 DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

Casimiroa edulis La Llave et Lex.

Novorum Vegetabilium Descriptiones. Fasc. II, p. 2, 1825

Sinonimia: (1)

Zanthoxylum bombacifolium A. Rich, Ess. Fl. Cuba 32. 1842

Zanthoxylum araliaceum Turcz. Bull. Coc. Nat. Mosc. 32. 274. 1859.

Fagara bombacifolia Krug et Urb. Urban. Bot. Jahrb. 21. 567. 1896.

Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza, al hacer la descripción de *Casimiroa edulis*, no publicaron ningún dibujo ni citaron la localidad típica, por lo que Martínez describe así la especie:

Descripción: (Martínez, 1951) (1).

“Árbol de 10 a 12 m de altura, de ramas irregulares y extendidas, formando una copa ancha y frondosa. Pecíolos de 6 a 9.5 cm, mas comúnmente alrededor de 7, rollizos y delgados, acanalados en la parte superior y con la superficie finamente tomentulosa. Hojuelas 3, 4 ó 5, algunos autores dicen que a veces llegan a 7. Peciollillos acanalados hacia el haz, de 10 a 20 mm (hasta 30 mm), muy delgados y cubiertos de finísimo tomento. Limbos elípticos o angostamente elípticos, nunca anchos u obovados, de 8 a 10 cm de largo (hasta 15.5 cm), por 1.5 a 6 de ancho (siempre la longitud más de dos veces mayor que la anchura y a veces tres o más), delgados y algo coriáceos; borde obscuramente grueso-dentado, rara vez claramente así; base cuneada, a veces inequilateral; ápice bruscamente acuminado, retuso o en ocasiones redondeado; superficie glabra casi siempre brillante; en la cara superior se ven pelillos a lo largo de la nervadura central hacia la base, y a veces algunos esparcidos y muy cortos en las nervaduras; en la inferior se observan pelillos más abundantes hacia la base y algo hacia el borde; la nervadura central es muy saliente en la cara inferior y hundida en la superior; las laterales son

claramente visibles, pero pocos salientes en la cara superior y, como en las demás especies, se anastomosan cerca del borde. Inflorescencias axilares, con flores masculinas y femeninas, éstas últimas en menor proporción: están en panículas de 7 a 10 cm de largo, con las divisiones algo aplanadas y finamente tomentosas. Flores pequeñas, amarillo-verdosas, casi globosas cuando están en botón, de 3 mm de largo, sobre pedicelos tomentosos de 1.5 a 3 mm; sépalos 5 triangulares, hirsuto-laciniados: pétalos 5, gruesos y membranosos, valvados, oblongo-acuminados y algo reflejados, de unos 5 mm; estambres 5, de 2 mm, con los filamentos subulados y engrosados en la base insertados abajo del disco: Ovario súpero, oval, subpentagonal y 5 locular, con el estigma sésil y lobulado. Fruto globoso, a veces alargado o atenuado, de color verde amarillento, liso de 6 a 10 cm de diámetro. El epicarpio es delgado y de sabor amargo; el mesocarpio es blanco algo amarillento, de consistencia cremosa, de sabor dulce algo indigesto y para la mayoría de las personas no particularmente agradable. Semillas 4 ó 5, de las cuales una o dos suelen abortar; tienen forma de media luna, muy gruesas hacia fuera y aplanadas lateralmente, con la superficie reticulada, de color blanco levemente amarillento. La madera es blanda y de calidad inferior”.

Distribución: México, Salvador, Costa Rica y Guatemala cultivada en Cuba y Argentina (1, 10). En México se ha recolectado en los estados de Baja

California Sur (B.C.S.), Colima, Chiapas, Chihuahua, Estado de México y D. F., Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora Tabasco, Tlaxcala y Veracruz.

Nombre común: sapote blanco (nombre mas conocido); zapote; chapote; matasano (Oaxaca); cochitzapotl (Náhuatl, zapote dormilón); iztactzapotl (Náhuatl, zapote blanco); cacaxmuttza (Otomí, Buelna) (7).

Casimiroa calderoniae Chiang et Medrano.

Boletín de la Sociedad Botánica de México. 41. p. 23-26. 1981.

Descripción: (Chiang & Medrano, 1981) (7).

"Arbusto dioico, de hasta 2.5 m de alto, muy ramificado desde la base. Ramas jóvenes pubescentes, luego glabras. Hojas trifolioladas, a veces 1-2 folioladas; pecíolo de 2-5 mm de largo, pubescente; peciolulos 2-5 mm de largo, pubescentes. Folíolos obovados, con la base cuneada y el ápice retuso, con pubescencia aterciopelada, más densa en el envés, de 20-30 (40) mm de largo, 13-18 (25) mm de ancho y el margen revoluto. Inflorescencia masculina paniculada, axilar o terminal, de 10-35 mm de largo. Flores masculinas de 8 mm de diámetro, de color blanco cremoso; cáliz de 2 mm de largo, pubescente, con 5 lóbulos cortos deltoideos; pétalos 5, pubescentes en el lado

abaxial, oblongo-lanceolados, de 4.5 mm de largo y 5 mm de ancho. Flores femeninas solitarias o en grupos de 1-3 en fascículos laterales o terminales. Drupa escasamente pubescente, ovoidea, de 30 mm de largo y 25 mm de ancho, que va encorvándose a medida que crece, por lo que el pedúnculo y los restos del estigma no se encuentran alineados en la misma dirección. Semillas 1-2. Número cromosómico $n = 18$. Fruto maduro moreno amarillento de 6 cm de largo, sabor dulce".

Nombre común: A esta especie se le conoce en Oaxaca como "zapotelín".

Distribución: En los límites de los estados de Puebla y Oaxaca, por la carretera Tehuacan-Huajuapán de León, en la zona árida oaxaqueño-poblana, México.

***Casimiroa pubescens* Ram.**

An. Inst. Med. N. II. 19. 1896.

Descripción: (Martínez, 1951) (1).

"Arbolillo de 2 a 3 metros de altura, inerme y ramoso, con las ramas casi erguidas y rugosas; ramillas pubescentes; hojas alternas, tiesas, gruesas y coriáceas, compuestas de 3 folíolos ovales u ovado-oblongos, a veces elípticos u obovados, de borde entero y finamente ciliado, en seco ligeramente revoluto, principalmente cerca de la base; superficie finamente aterciopelada pubescente en ambas caras, sobre todo en el envés, donde a veces se nota casi lanosa; nervaduras paralelas y unidas en arco cerca del borde; ápice frecuentemente

emarginado u obtuso-redondeado; base obtusa; el folíolo central de 5.5 a 10 cm de largo por 2 a 4.5 de ancho; los folíolos laterales algo menores; pecíolos rollizos, engrosados en la base, articulados y pubescentes, de 1.4 a 4 cm de largo; peciólulos también pubescentes, el de los folíolos centrales de 5 a 15 mm y los de los laterales de 4 a 7 mm. Inflorescencias axilares o terminales, pubescentes y cortas, con el raquis de 10 a 20 mm, con muchas flores aglomeradas. Flores en botón globosas u obovadas, de unos 5 mm de largo y de color blanco verdoso. Pedicelos canoso-pubescentes, de 3 mm. Cáliz de 5 sépalos, triangulares y pubescentes; pétalos 5 de 4 a 5 mm, elípticos y gruesos; estambres 5; anteras de 2.5 mm, sobre filamentos subulados de 3 mm; polen diminuto y esférico. Fruto esférico, en seco depresso-globoso, con la superficie finamente pubescente como la de un durazno, de 4 a 5 cm de diámetro, y lleva a veces una protuberancia o chichón en el ápice; es de color amarillo anaranjado en su madurez, con pulpa escasa, amarillenta y cremosa, dulce y comestible, posiblemente más agradable que cualquier otro zapote blanco, con 5 semillas muy desarrolladas; en seco la sección transversal del fruto se observa pentagonal. Las semillas miden de 23 a 28 mm de largo por 16 a 20 mm de ancho".

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

Distribución: En México se ha recolectado en los estados de Guanajuato,

Hidalgo y Querétaro.

Casimiroa sapota Oerst.

Natur. Nist. ForenVidensk. Meddelelser. 1857. Walpers Ann. Botanicus Systematicae VII. 531. 1868.

Descripción: (Martínez, 1951) (1)

"Árbol mediano; ramillas rollizas, cubiertas de corteza rugosa y cenicienta; hojas alternas, con pecíolos de 4 a 4.5 pulgadas (de 10 a 12 cm) de largo, rígidos y rollizos, ligeramente estriados. Hojuelas 5 alargado-elípticas, acuminadas, de 5 a 6 pulgadas (12.5 a 15 cm) de largo por 2 pulgadas (5 cm) de ancho, sobre peciolillos de media pulgada (12.5 mm), muy glabras y algo rígidas, moreno-brillantes en la cara superior, con el ápice obtuso, levemente reticulado-venosas, borde encorvado, ondulado y revoluto; nervadura central prominente en el envés; nervaduras secundarias de 12 a 15, algo salientes, apenas encorvadas hacia el ápice y que se anastomosan entre sí. Racimos florales axilares, compuestos, con raquis de 3 a 4 pulgadas (7.5 a 10 cm) de largo, puberulento, moreno y comprimido; con 6 a 8 divisiones de una pulgada (25 mm) de largo, ralas y extendidas, sostenidas por una verruga en la base, en el lugar de la bráctea. Flores de 4 a 6, subcorimbosas, colocadas en el ápice de las ramificaciones, con pedicelos de 3 líneas de largo; divisiones del cáliz muy cortas, ciliado-pubescentes y algo agudas. Pétalos oblongos, glabros, revolutos, con el borde reflejado; filamentos subulados en el ápice.

Fruto ovoide, en forma de manzana de 2.5 pulgadas (6.2 cm) de largo por 1 a 1.5 pulgadas (25 a 37 mm), con el epicarpio moreno rugoso, umbilicado en ambas extremidades”.

Nombre Común: Zapote (Querétaro); zapote blanco (Jalisco); matasano (Nicaragua) (7).

Distribución: En México se ha recolectado en los estados de Colima, Chiapas, Durango, Estado de México, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Puebla, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Veracruz.

II.3 QUIMIOTAXONOMIA

Una de las grandes metas de la sistemática de plantas es ayudar a construir un sistema filogenético verdadero que refleje las relaciones naturales entre todos los taxa de plantas. Sin embargo, esta no es una tarea fácil de alcanzar a juzgar por los diferentes sistemas de clasificación de las angiospermas que se han producido en los pasados 40 años (11, 12).

En una casi total ausencia de evidencia fósil, los caracteres morfológicos auxiliados con aquellos de otras disciplinas tales como anatomía de plantas, palinología, embriología, química y bioquímica se usan para proponer afinidades naturales. Es en este contexto que se inscribe la llamada quimiotaonomía, la cual se puede entender como un método para clasificar a un grupo de plantas con base en los compuestos químicos que producen. De acuerdo a lo anterior estos compuestos químicos son caracteres

útiles para clasificar a un conjunto de plantas, (13). Estas características están genéticamente controladas y tienen la ventaja sobre las morfológicas de que pueden ser exactamente descritas en términos de una estructura definida y una fórmula química configuracional.

Se ha definido la quimiotaxonomía como el estudio de la distribución de un grupo de compuestos o grupos de compuestos biogénicamente relacionados en una serie de plantas relacionadas o supuestamente relacionadas.

Así mismo el grupo de metabolitos secundarios que constituyen un sistema de caracteres químicos que relacionan a un conjunto de plantas bajo estudio se constituyen en los marcadores quimiotaxonómicos de ese grupo de plantas.

Requisitos para seleccionar a un marcador químico

Para que un grupo de metabolitos secundarios sea considerado como marcadores quimiotaxonómicos es necesario que cumplan con los siguientes requisitos (12-15).

1. Tener una presencia recurrente en el taxón considerado
2. Presentar una variabilidad genética, intrínseca baja.
3. Presentar características en su estructura química que sean útiles en la clasificación a diferentes niveles jerárquicos
4. Que se conozcan las rutas biosintéticas de los metabolitos involucrados
5. Presentar una relativa facilidad de análisis

6. Que se puedan analizar en la cantidad y tipo de material biológico disponible

7. Ser químicamente estables.

1. El criterio de selección más importante es su presencia recurrente en el grupo de plantas a estudiar. Se podría suponer que la presencia de ciertos metabolitos en particular caracterice un taxón dado, o que su presencia en otro taxón sugiera una fuerte relación. Esto podría ser posible siempre y cuando se realice un estudio adecuado para el carácter de interés. Por ejemplo muchas sustancias como los aminoácidos proteinogénicos, algunos ácidos grasos y los azúcares se encuentran en la mayoría de todas las plantas y son por lo tanto de poco o nulo interés taxonómico. Debido a la presencia recurrente en plantas taxonómicamente relacionadas los metabolitos secundarios son los caracteres más utilizados en quimiotaxonomía (13, 14).

Se ha notado por varios investigadores que aunque es relativamente sencillo demostrar la presencia de una sustancia es casi imposible demostrar en forma definitiva su ausencia. A pesar de los problemas metodológicos relacionados con la detección de algunos metabolitos secundarios presentes en cantidades en trazas, los datos químicos son caracteres diagnóstico de igual forma que los morfológicos (14).

2. Dado que la síntesis de un metabolito secundario es una expresión genética, es de esperar que la presencia o ausencia de un determinado

producto del metabolismo secundario este regida por diferentes cauces que induzcan a esta expresión genética en particular. De tal forma que además de su probable presencia la cantidad en que se sintetice un metabolito secundario dependerá de las causas que induzcan a la expresión genética. El clima, el suelo, las interacciones planta-planta y planta-insectos son, entre otras más, las principales causas de inducción genética. Sin embargo un marcador químico necesariamente reflejará una variabilidad genética baja, lo cual supone que variará en cantidad, pero estará presente en todos los individuos de la especie, aunque solo sea en trazas, no importando el clima, o el suelo (13). Si existen informes sobre variación cualitativa que se caracterice por la ausencia de uno o más compuestos en una o mas subdivisiones del taxón esto debe tomarse con cuidado ya que puede deberse a los límites de detección del método analítico utilizado. Sería muy importante, por lo tanto, que los grupos previamente establecidos en base a la ausencia de compuestos se reinvestigaran.

3. Otra característica para ser considerada en la selección de un tipo de metabolito secundario es la variabilidad estructural del tipo de compuestos al que pertenece, como una medida de la especialización. Esta variabilidad permite que los compuestos químicos sean utilizados como caracteres a diferentes niveles estructurales. Cada nivel estructural puede ser utilizado como un carácter analítico o sintético. Los caracteres analíticos se usan para la



identificación, caracterización y delimitación de los taxa mientras que los caracteres sintéticos se utilizan para agrupar elementos dentro de taxa superiores y son caracteres usualmente de naturaleza constante y ampliamente frecuentes. Como se presenta en la figura 1, los caracteres del esqueleto, caracteres 1 y 2, son especialmente útiles como caracteres sintéticos a niveles taxonómicos más altos (tribu, subtribu). La información que proporciona la distribución de los sustituyentes específicos (especialmente grupos funcionales nuevos) o combinaciones de sustituyentes (carácter 3) es útil en el agrupamiento de los taxa. Cuando esta información se combina con datos del esqueleto, las entidades taxonómicas se pueden agrupar, usualmente a más bajos niveles de los que se puede cuando solamente se consideran caracteres del esqueleto. Como se mencionó anteriormente, la presencia de un tipo de esqueleto específico puede ser utilizado para establecer la afinidad de un género a una tribu o subtribu en particular. Aunque estos tipos de esqueletos pueden ayudar en la identificación de tribus y subtribus (uso analítico), ellos son mas útiles en la asignación de un género con afinidades dudosas a una tribu o subtribu. La presencia de un compuesto dado (carácter 4) puede ser utilizado como carácter sintético para un grupo de taxa. El complemento químico específico (nivel 5) de una taxón es obviamente un carácter analítico el cual puede ser útil en establecer límites infraespecíficos (15).

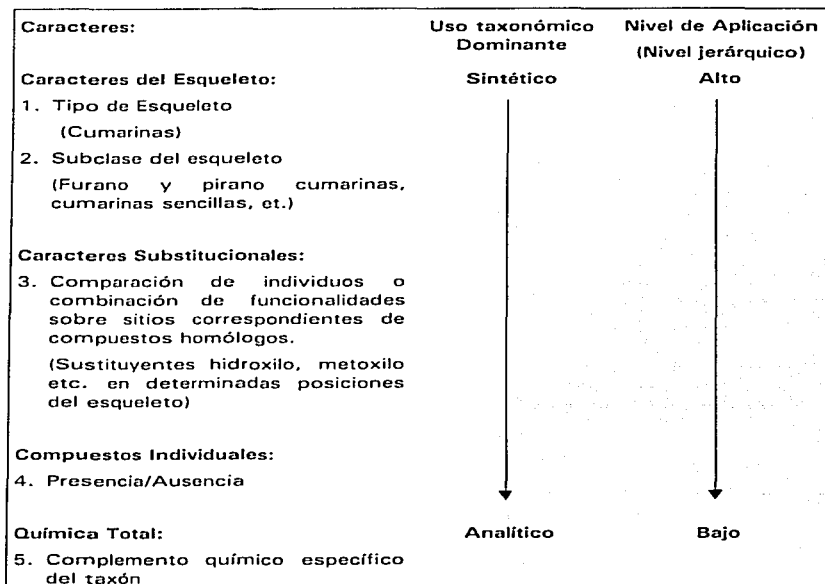


Fig. 1. Características químicas de los compuestos y sus correspondientes niveles de aplicación como caracteres taxonómicos (15).

4. Otro criterio a tomar en cuenta para la selección de compuestos secundarios es el conocimiento de las rutas biosintéticas de los metabolitos

involucrados.

Hay relaciones entre la "complejidad biosintética" de una sustancia y su significado taxonómico. Muchos compuestos químicos, aún aquellos de naturaleza compleja, se pueden formar por procesos biosintéticos relativamente simples. Tales sustancias son, de seguro, menos interesantes desde un punto de vista taxonómico, que los compuestos relacionados que han estado sometidos a transposiciones, ó a otros cambios secundarios. Se puede comparar por ejemplo, los ácidos grasos normales y sus análogos acetilénicos; los ácidos cinámicos y los lignanos; las flavonas y las transpuestas isoflavonas; isoflavonas y rotenoides; alcaloides isoquinolínicos y los alcaloides bisisoquinolínicos.

Algunas veces diferentes plantas contienen sustancias, que aunque perteneciendo a diferentes clases de compuestos químicos, parecen ser biosintéticamente análogas. Tales plantas probablemente contienen sistemas enzimáticos similares, y los compuestos que los producen pueden por lo tanto indicar que existe una relación relevante entre plantas.

Por otro lado, antípodos ópticos de un compuesto ó compuestos estructuralmente relacionados pertenecientes a series de antípodas, han sido frecuentemente encontradas en plantas no relacionadas. Parece muy improbable, a partir del punto de vista biológico que las especies cercanamente relacionadas contengan sistemas de enzimas muy diferentes y el hecho de que

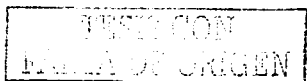
los antípodos sean producidas algunas veces por tales plantas pueden reflejar una flexibilidad espacial de una enzima.

En resumen, el conocimiento de las rutas metabólicas y las enzimas asociadas que dan origen a los caracteres químicos, permiten discernir el artefacto ocasional o carácter convergente, y realizar la clasificación con mayor información.

5. Una de las características importantes para la selección de metabolitos secundarios es la relativa facilidad de análisis, y esta es una de las ventajas, principalmente, de los compuestos volátiles, que a través de técnicas de cromatografía de gases (GLC) son detectados y los flavonoides, que a través de cromatografía en papel, cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos (CLAR); por mencionar algunos, han dado origen a una gran cantidad de análisis de poblaciones con grandes muestras (14).

6. La cantidad y tipo de material biológico de las plantas a analizar, depende de los metabolitos que se quieren investigar. De este modo, los flavonoides se han utilizado en forma exhaustiva con fines quimiotaxonómicos, debido a que pueden emplearse pequeñas cantidades de material para el análisis químico (inclusive material de los ejemplares de herbario), además de que se pueden utilizar plantas almacenadas. En contraste los compuestos volátiles como los aceites esenciales requieren de material fresco para su análisis.

7. Otra característica recomendable en los compuestos químicos para



utilizarse quimiotaconómicamente es su estabilidad química ya que algunos metabolitos químicos presentan alteraciones en su estructura durante los procesos de extracción y análisis. Por otro lado es recomendable que los cambios medio ambientales no afecten la producción de metabolitos secundarios candidatos a ser considerados caracteres químicos.

Consideraciones generales en Quimiotaconomía

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

Una de las dificultades al usar caracteres químicos para encontrar relaciones entre taxa superiores tales como familia, ordenes, y arriba de estos, es el hecho de que pocas clases de compuestos poseen una amplia distribución en las plantas, por lo tanto se carece de caracteres para comparar. Una excepción son los flavonoides los cuales están presentes en todas las plantas vasculares, pero presentan la desventaja de que el mismo tipo de estructura tiende a

ocurrir en grupos no relacionados (casos de convergencia química) (14).

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

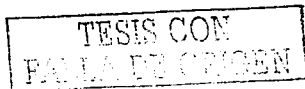
Sin embargo si el camino biosintético es el mismo, especialmente si este compuesto es relativamente fácil de sintetizar por la planta a partir de un metabolito primario tal como un aminoácido de proteína; entonces, la única manera para, decidir si la presencia de un cierto constituyente en dos taxa esta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

Otro punto a considerar es que los metabolitos secundarios son frecuentemente sintetizados en las plantas y a su vez le sirven para defenderse de factores del medio ambiente, tales como los depredadores. Cuando una planta produce un compuesto químico tóxico, el cual le confiere mejor protección contra plagas y enfermedades, esta planta tiene mayores posibilidades de sobrevivir; sin embargo, los insectos y microorganismos coevolucionan con las plantas y pueden detoxificar el veneno de la planta. La planta nuevamente evoluciona a producir un nuevo tipo de compuesto químico

el que su enemigo no puede, todavía, metabolizar. Por ejemplo los miembros de las Asteraceae muestran una facilidad para cambiar su muy característica síntesis de lactonas sesquiterpénicas por diterpenos, triterpenos y sesquiterpenos que no presentan la función lactona (15).

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

Aún más, debido a que el aislamiento de nuevos compuestos en el reino vegetal crece de manera exponencial (15), resulta imposible para un taxónomo



retener toda esta información en la memoria. Por lo que las bases de datos deberán contener toda esta información; y las relaciones entre los taxa serán propuestas por métodos filogenéticos, los que considerarán entre otros aspectos, la convergencia y pérdida de mutaciones. Por otro lado los caracteres químicos se han utilizado exitosamente para complementar o mejorar árboles construidos con otros caracteres o inclusive para discernir entre dos relaciones taxonómicas propuestas (14, 15).

Cuando hay diferencias entre el punto de vista químico y otro como por ejemplo el molecular, no necesariamente significa que alguno de los dos este mal. Un árbol filogenético basado en un solo carácter ya sea morfológico, anatómico, químico o molecular, refleja la evolución de ese carácter en particular y no la evolución de la planta. En todos los casos se tendrán que utilizar, tanto como sea posible, buenos caracteres de diferentes disciplinas en conjunto para proponer relaciones.

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

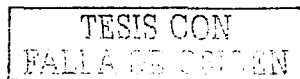
La quimiotaxonomía de plantas en el amplio sentido de la palabra, utilizando micro y macromoléculas, ha contribuido sustancialmente al propósito final de la sistemática de plantas: "la generación del sistema natural".

Marcadores químicos en Rutaceae

Dentro de la familia Rutaceae, Hegnauer, R. y Cronquist, A. (16, 17) han mencionado como marcadores taxonómicos a los aceites esenciales, los alcaloides, las cumarinas, flavonoides y limonoides. Aunque también algunos autores (18) han utilizado las ceras, como caracteres químicos. El uso específico de ceras, flavonoides, alcaloides, limonoides y cumarinas como marcadores químicos de la familia de las Rutáceas se analizan a continuación:

Norbdy y Nagy (18) emplearon las ceras de las hojas y de la cáscara de los frutos de 49 cultivares de *Citrus* (Rutaceae). En estos estudios los autores encontraron que los perfiles químicos de alcanos exhibían diferencias significativas para cada cultivar. También encontraron que cada perfil químico obtenido de la cáscara de los frutos se correspondía con los obtenidos de las ceras de las hojas. Los autores indicaron que las ceras de hojas son eficaces como marcadores taxonómicos y que se requiere de muestras de poblaciones naturales que hayan sido recolectadas con suficiente cuidado tal que las variaciones cuantitativas dentro y entre poblaciones deben ser tratadas como un dato estadístico y no como datos individuales.

Skorupa y col. (19), con objeto de proporcionar evidencias químicas a la taxonomía del género *Pilocarpus*, informaron sobre la distribución de hidrocarburos en las ceras epicuticulares de hojas, principalmente los n-alcános



de 11 especies endémicas, recolectadas en poblaciones silvestres de Brasil. Estos investigadores encontraron que *P. jaborandi* presenta un patrón diferente de hidrocarburos de ceras, debido a la presencia de relativamente altas cantidades del 1-fenil-5-vinil, 5,9-dimetil-decano. La mayoría de las especies presentaron como componentes principales n-alcános de 29 y 31 átomos de carbono. A través del análisis de conglomerados se observaron dendogramas con los taxa distribuidos en dos grandes grupos, también se observaron las relaciones de afinidad entre los taxa, los que ayudaron a definir la taxonomía del género (19).

Whiffin (20) realizó un estudio morfológico y químico tomando los aceites esenciales como marcadores químicos, entre poblaciones de *Correa aemula* y *C. reflexa*, así como de individuos cuyas formas son reconocidas como variedades de *C. reflexa*. Los datos de los aceites esenciales se sujetaron a un análisis numérico multivariado y los resultados sirvieron para confirmar la categoría de híbridos de las poblaciones antes consideradas como variedades.

Los flavonoides son los constituyentes secundarios más ampliamente utilizados en estudios taxonómicos. Esto se debe en parte a su presencia ubicua en las plantas superiores y a su gran diversidad estructural. También son sustancias químicas estables, fácilmente estudiadas en muestras pequeñas de plantas o aún en delgados fragmentos de material de herbario. Una razón más que completa su popularidad con los taxónomos de plantas es su facilidad de

análisis por procedimientos relativamente simples, ya que pueden ser detectados por cromatografía en papel, cromatografía en capa fina bidimensional y cromatografía líquida de alta resolución.

Los flavonoides se han empleado como caracteres taxonómicos a casi todos los niveles de la sistemática. Un ejemplo de ello lo constituye el género *Citrus*, en el cual, Albach y Redman (21) evaluaron 48 variedades que representaban 18 especies de *Citrus* reconocidas y 49 híbridos de 18 cruas diferentes. El análisis se realizó a través de cromatografía en capa fina y los resultados mostraron una consistencia cualitativa y cuantitativa de la composición de flavanonas para cada especie y para cada crua. Inclusive las reglas que gobiernan la herencia de las flavanonas de *Citrus* se dedujeron a partir de la composición de híbridos conocidos. Estas reglas acopladas con la composición de los datos se usaron para evaluar las probables relaciones de diferentes variedades y especies de cítricos.

Sin embargo, en un estudio más ambicioso, los flavonoides sirvieron para apoyar el arreglo taxonómico propuesto por Swingle, en 1943 (Cuadro 3), para la subfamilia Aurantioideae. En esta clasificación, el autor dividió a la subfamilia en dos tribus: la tribu Clauseneae (subtribus Micromelinae, Clauseninae y Merrillinae) y la tribu Citreae (subtribus: Triphasinae, Citrinae y Balsamaocitrinae). Este apoyo fue posible, principalmente, por el análisis de la variabilidad estructural de los flavonoides involucrados, realizado por Grieve y

Scora en 1980 (22).

Los principales tratados taxonómicos de la subfamilia Aurantioideae proponen el arreglo de los géneros en forma de una especialización morfológica creciente iniciando por el género *Micromelum*, un pariente muy lejano de los cítricos, y finalizando con el género *Citrus*. Los caracteres utilizados para esta propuesta son tanto morfológicos como químicos.

División de la subfamilia Aurantioideae
Tribu Clauseneae Subtribus: Micromelinae Clauseninae Merrilliinae
Tribu Citreae Subtribus: Triphasiinae Citrinae Balsamocitrinae

Cuadro 3. Clasificación de la subfamilia Aurantioideae en tribus y subtribus, según Swingle en 1938 (22).

En cuanto a los caracteres químicos la designación de un estado de carácter primitivo *versus* derivado, se basa en una gran cantidad de estudios químicos realizados por diversos investigadores en los que ciertos patrones de

flavonoides se correlacionan con la evidencia biológica disponible (Cuadro 4).

Caracteres Químicos	
Primitivos	Avanzados
C-glicosilflavonas presentes (orientina, luceninas, vitexina, vicenina, saponarina)	C-glicosilflavonas ausentes, reemplazadas por O-glicosil-flavonas (apigenina, acacetina, luteolina)
Flavonoles presentes; el anillo-B de flavonoides con patrones de trihidroxilación; como la miricetina	Los flavonoles presentes: con en el anillo-B di o monohidroxilado (quercetina, kaempferol)
Agliconas de flavona y flavonas-O-glicosiladas ausentes	Flavonoles reemplazados por flavonas (apigenina, acacetina, luteolina)
Flavanonas ausentes	Flavanonas presentes (naringina, poncirina, hesperidina)

Cuadro 4. Tendencias evolutivas en la Aurantioideae. Caracteres químicos propuestos por Harborne (1977).

Harborne ha sugerido que grupos de plantas arcaicas han retenido generalmente caracteres primitivos de flavonoides y a partir del estudio del metabolismo de los flavonoides ha postulado que los compuestos que se encuentran en las primeras etapas de la ruta biosintética de flavonoides pueden ser más primitivos que los componentes químicos que se forman en las últimas etapas.

Por otro lado la reducción en la complejidad de un carácter taxonómico puede

considerarse como un estado de carácter derivado debido a la dirección inversa del desarrollo evolutivo. Esta mutación perdida o tendencia a la reducción parece estar actuando sobre varios caracteres morfológicos y químicos de la subfamilia Aurantioideae.

Con respecto a los caracteres químicos la reducción se presenta en un taxón como un estado avanzado. En éste, el taxón tiene disminuidas sus capacidades enzimáticas lo que origina que no se formen compuestos que normalmente se sintetizan en los últimos estados de la biosíntesis de los flavonoides. Así mismo existe una acumulación de productos sintetizados en los primeros estados de la ruta metabólica. Por ejemplo aunque la síntesis de flavanona ocurre en una de las primeras etapas de la biogénesis de flavonoides, la acumulación de flavanona en la Aurantioideae (Cuadro 4) puede ser vista como un estado de carácter avanzado, como resultado de la pérdida de uno o más mecanismos biosintéticos, ya que estos caracteres correlacionan con los caracteres morfológicos.

Tomando en cuenta estas consideraciones, Grieve y Scora (22) observaron que los patrones de flavonoides en la tribu Clauseneae se distinguen por tres características químicas primitivas (Cuadro 4).

1. La predominancia de las C-glicosilflavonas
2. Presencia de glicósidos de flavonoles

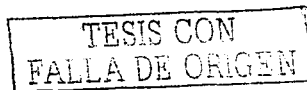
3. La ausencia de glicósidos de flavona y flavanona

Considerando que en plantas dicotiledóneas, los derivados C-glicosilados se han asociado con taxa leñosos, relativamente primitivos, los autores mostraron que en la tribu Clauseneae las uniones de las flavonas se encuentran solamente en la forma C-glicosiladas en vez de estar O-glicosiladas. Además mencionaron que la capacidad para la C-glicosilación es retenida a través de toda la subfamilia Aurantioideae.

Tomando en cuenta la subdivisión realizada por Swingle (1938) de la subtribu Citrinae (Citreae), que va de los cítricos primitivos a los más avanzados, Grieve y Scora encontraron que de los árboles más remotos a los más altamente especializados (árboles frutales de cítricos verdaderos) hay una tendencia a sustituir los flavonol-O-glucósidos por los flavona-O-glucósidos, con excepción de la subtribu Balsamocitrinae en la que predominan los flavonoles. Asimismo encontraron que en la Citrinae hay una tendencia a reemplazar a los glicósidos de flavonol por glicósidos de flavona y la distribución de las flavanonas esta restringida a *Pleiospermium* y a los seis géneros de los árboles frutales de cítricos verdaderos.

De este modo y tomando en cuenta los perfiles cromatográficos de las Citrinae y Balsamocitrinae se apoyó la propuesta taxonómica para la subfamilia Aurantioideae de Swingle.

Por otro lado, los alcaloides se han propuesto como marcadores taxonómicos



pero tienen asociados una serie de problemas al ser utilizados con este fin. Entre éstos se menciona que tienen una distribución limitada por lo que no se puede utilizar a niveles más altos de clasificación. Las propuestas taxonómicas generalmente se restringen a una clase particular de alcaloides ya que presentan estructuras muy diversas. Waterman (23) trabajó con los alcaloides de Rutaceae y él notó que los datos químicos en gran medida son inconsistentes con la clasificación de la familia generada por los trabajos clásicos. Ante este problema, procedió a reunir la información de los alcaloides y otros metabolitos secundarios para proponer una "nueva hipótesis taxonómica" de las subfamilias de las Rutaceae y los grupos cercanos de las Rutales.

Dreyer y colaboradores (24) propusieron el uso de los triterpenos del tipo limonoide como marcadores quimiotaxonómicos, principalmente por la sensibilidad de estos compuestos en cromatografía en capa fina al reactivo de Ehrlich's y su relativamente fácil aislamiento a través de la cristalización, sin embargo los autores también mencionaron que se requiere de un mayor conocimiento sobre la distribución de éstos en las especies de Rutaceae.

Los limonoides, compuestos amargos, son triterpenos modificados con 26 átomos de carbono que se encuentran presentes en el orden de los Sapindales. Debido a la presencia de estos compuestos triterpenoides, así como de otros caracteres, Cronquist menciona que las Rutaceae se encuentran agrupadas con

las familias Simaroubaceae, Meliaceae, Cneoraceae, Ptaerolaceae (17).

Dreyer y col. (24, 25) encontraron una marcada correlación entre los niveles de oxidación de los limonoides y su distribución en las tres principales subfamilias. Esto es, limonoides con un grupo metilo intacto en C-19 se encuentran en especies de la subfamilia Toddalioidae. Mientras que en la subfamilia Aurantioidae se encuentran pequeñas cantidades de este tipo de limonoides y una gran cantidad de limonoides con el metilo en C-19 oxidado, tal como la limonina. Por último las plantas de la subfamilia Rutoideae contiene limonina y sus productos de oxidación como la rutaevina y la difosfoenol limonina. De este modo las tres principales subfamilias pueden ordenarse de acuerdo al incremento en la capacidad de oxidación de los limonoides de la Toddalioidae al Aurantioidae y hasta la Rutoideae.

Las cumarinas se han estudiado con fines taxonómicos en las Rutaceae (14, 26, 27). Tal vez entre las características más útiles para ser usadas en taxonomía es su distribución y su variabilidad estructural en los diferentes taxa.

Las cumarinas se han utilizado en un nivel superior a la familia Rutaceae, obteniéndose dos observaciones de naturaleza positiva. Primero entre aquellas familias que generalmente se consideran que constituyen el orden natural de los Rutales (Rutaceae, Simaroubaceae, Meliaceae, Burseraceae, Cneoraceae y posiblemente, Anacardiaceae), las cumarinas se les han encontrado solamente

en las familias Meliaceae y Rutaceae. Aun más, en la familia Meliaceae, las cumarinas parecen estar bastante restringidas en su distribución a determinados géneros de la subfamilia Cedreloideae (26), familia a la que Hartley ha sugerido que puede tener una significativa similitud morfológica con la subfamilia Flindersioideae de las Rutáceas.

Mientras que la presencia de las cumarinas en estas subfamilias puede servir para un entendimiento de la filogenia de la Rutaceae y Meliaceae, el metabolismo secundario de la Flindersioideae es típicamente rutáceo y no apoya la propuesta que ésta se encuentre al nivel de familia entre Rutaceae y Meliaceae (26).

El alto grado de similitud entre las cumarinas de las Rutaceae y Umbelliferae, ha permitido sugerir que estas familias, que normalmente no están cercanas, son filogenéticamente adyacentes. La similitud de varias de estas cumarinas es de hecho impresionante, una comparación de las cumarinas de las Umbellíferas con las de las Rutáceas muestra pocas diferencias y si se probara que la cercanía filogenética es insostenible, entonces se presentaría un importante caso de convergencia química (26).

Sin embargo, una comparación de las modificaciones secundarias de las cadenas prenilo, que abundan en las cumarinas de ambas familias, muestran diferencias interesantes. Así, en las Umbelliferae hay una presencia extensa de cadenas de: senecioilo, isovalerilo, 2-metilbutirilo (2-MeBu) y angelilo.

Cadenas que frecuentemente están esterificando a las 3',4'-dihidroxi-dihidropirano-cumarinas, lo que muestra una diferencia distintiva en la sustitución de las cumarinas entre estas dos familias. Similarmente las Rutáceas también demuestran distintas rutas metabólicas en el uso de unidades de isopentenilo y en la formación de cumarinas preniladas en el C-3. Estas distinciones son probablemente aun más marcadas de lo que ellas parecían al principio, y pueden constituir una fuerte evidencia de que los compuestos tipo-prenilo de las Umbelliferae son realmente productos de degradación de los aminoácidos, una ruta que todavía no se ha informado dentro de las Rutáceas.

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

Aparentemente la distribución al azar de los tipos de furano y piranocumarinas, dentro de las Rutáceas y entre las Rutaceae y Umbelliferae, parece sugerir que estas estructuras *per se* tienen poco valor taxonómico. Esto se debe a que estos compuestos son, aparentemente, resultado de ciclizaciones espontáneas no controladas. Hasta que esta hipótesis sea eliminada, por el descubrimiento de sistemas que controlan estas reacciones, parece prudente considerar

solamente aquellos compuestos que se conoce están controlados enzimáticamente (formación de cumarinas, prenilación y sustituciones posteriores) como marcadores taxonómicos potencialmente útiles (26).

Investigaciones exhaustivas han demostrado que la mayoría de los géneros de las Rutáceas sintetizan cumarinas. (26).

Parece que existen algunas tendencias en los patrones de sustitución de las cumarinas. La presencia de mas de dos sustituyentes oxigenados en el núcleo de las cumarinas es relativamente extraña. Sin embargo patrones de sustitución 5,7,8 se han encontrado en el género *Ruta* mientras que en *Zanthoxylum* se han encontrado patrones 6,7,8. En los géneros, estrechamente relacionados, *Ruta* y *Thamnosia* se ha encontrado una sustitución en C-6 de cadena lateral isopentenil, mientras que en los géneros, aparentemente no relacionados *Murraya* (27) y *Phebalium* la misma sustitución se ha encontrado en C-8. Existe una posible tendencia entre las furanocumarinas monosustituídas que abarca desde la relativa baja prenilación en la Rutoideae (Zanthoxyleae) hasta una prenilación regular en la Aurantioideae, con la Toddalioidae y la Rutoideae en una posición intermedia entre ambos. Con la excepción del ubicuo aurapten, los sustituyentes O-geranilo se encuentran principalmente en el género *Geijera* (Zanthoxyleae) y en la subfamilia Aurantioideae. Sustituyentes en el átomo C-3, generalmente con un grupo 1,1-dimetilalilo se encuentran solamente en un pequeño grupo de

géneros y aparentemente son, particularmente, significativos en *Ruta* (con cumarinas simples) y *Clausena* (con piranocumarinas). La prenilación en el átomo C-8 parecería presentarse con menos frecuencia que en el átomo C-6 y puede reflejar una relativa rareza de la enzima responsable de modificar el átomo C-8, lo cual podría ser taxonómicamente valioso.

La presencia de glicósidos de cumarinas simples en *Eriostemon. rhomboideus*, así como la ausencia de piranocumarinas en esta especie, al igual que en *E. cymbiformis* y *E. wonganensis* coloca estas especies en un taxa particular de la sección *Nigrostipulae* (14).

Unos cuantos taxa se caracterizan por sus propias cumarinas altamente individuales entre estos los más sorprendentes son los géneros *Halfordia* (cumarinas 3,4-oxigenadas). *Eriostemon brucei* (cumarinas tipo bruceol, oribrucinol) y *Toddalia acuelata* que sintetiza cumarinas 5,7 dimetoxi, 6-preniladas.

Finalmente el potencial taxonómico de las cumarinas a niveles subespecíficos y de población todavía no se ha evaluado. El único estudio a la fecha que relaciona las variedades de *Ptelea trifoliata* sugiere que éstas pueden tener algún valor, por ejemplo, se han propuesto distintas razas químicas de *Murraya paniculata*: la Formosana y la Indonesiana. Estas taxa difieren químicamente ya que la raza Formosana esta exenta de la 5,7-dimetoxi-8-prenilcumarinas que son los constituyentes principales de la Indonesiana. Con la presencia de esta

clase de prenilcumarinas en la *Murraya paniculata* variedad *omphalocarpa* algunos autores sugieren una relación aparentemente mas cercana entre ésta variedad y la raza Indonesiana que con la raza Formosana (27).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1 HIPÓTESIS

Las cumarinas establecerán diferencias químicas diagnósticas entre *C. edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens* y *C. calderoniae*.

III.2 OBJETIVOS

Objetivo principal

Apoyar la determinación taxonómica de cuatro especies de *Casimiroa*, mediante estudios fitoquímicos de las semilla y hojas que permitan establecer similitudes y diferencias entre éstas.

Objetivos particulares

1. Caracterizar morfológicamente a las especies de *Casimiroa edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens*, *C. calderoniae*.
2. Caracterizar los principales metabolitos secundarios de estas especies.
3. Obtener, mediante análisis fitoquímico, cumarinas para ser utilizadas como estándares.
4. Determinar la distribución de cumarinas en las cuatro especies bajo estudio.
5. Realizar estudios de similitud y diferencias utilizando los datos de las cumarinas presentes en cada una de las especies.

IV. DIFERENCIAS ESTRUCTURALES ENTRE LAS CUMARINAS PRESENTES EN *Casimiroa greggii* Y EN *C. pringlei*, *C. edulis*, *C. pubescens* Y *C. calderoniae*

Diferencias estructurales entre las cumarinas presentes en *Casimiroa greggii* y en *C. pringlei*, *C. edulis*, *C. pubescens* y *C. calderoniae*

Aída N. García-Argáez¹, Nadia M. González-Lugo², Carmen Márquez², Mariano Martínez-Vázquez^{2*}

¹Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. Tel: +(52) 56224403; Fax: +(52) 56162203; E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

Resumen

Mediante cromatografía líquida de alta resolución se analizaron hojas y semillas de *Casimiroa pubescens*, *C. edulis* y *C. calderoniae*. Los resultados mostraron que las cumarinas: felopterina (6), isopimpinellina (9), heraclenol (15) y heraclenina (16) se detectaron en las tres especies estudiadas. Siendo *C. calderoniae* la especie que, en promedio, presentó una mayor concentración de este tipo de metabolitos. Estos resultados junto con otros previamente publicados han demostrado la presencia de 16 cumarinas en el género.

No obstante que se ha postulado que las cumarinas aisladas en el género, tienen como precursor común a la umbeliferona, existe, sin embargo, una clara diferencia entre las cumarinas sintetizadas por la *C. greggii* y las demás especies estudiadas. Así la seselina y el O-geranil-ostenol, ambas provenientes de la umbeliferona prenilada en el átomo de C-8, son sintetizadas por *C. greggii*, mientras que las furanocumarinas sintetizadas por las demás especies provienen de la prenilación en el átomo C-6 de la umbeliferona.

El presente trabajo constituye el primer estudio fitoquímico de *C. pubescens* y *C. calderoniae*.

Abstract

Leaves and seeds of *Casimiroa pubescens*, *C. edulis* and *C. calderoniae* were

analyzed by HPLC. The results showed that coumarins: phellopterin (6), isopimpinellin (9), heraclenol (15) and heraclenin (16) were present in all studied species. Among all analyzed species *C. calderoniae* showed the highest concentration of those metabolites. These results in addition to those previously published indicate that 16 different coumarins have been detected in the genus.

An accepted proposal is that the umbelliferone is a common precursor in the biogenesis of the coumarins of *Casimiroa*, however there is a clear difference between the coumarins synthesized by *C. greggii* and those present in the other studied species. Then seselin and O-geranyl-osthenol both synthesized from the prenylation of umbelliferone at C-8 are present in *C. greggii*, while the coumarins present in the other species are from the prenylation of umbelliferone at C-6.

To our knowledge this is the first study of *C. pubescens* and *C. calderoniae*.

Keywords: *Casimiroa*, coumarins, Rutaceae

Introducción

Las cumarinas son probablemente los metabolitos más comunes derivados de la ruta biosintética del shikimato-corismato (1).

En miembros de la familia Rutaceae se han encontrado aproximadamente 200 cumarinas y evidencias experimentales han demostrado que éstas se sintetizan por las mismas rutas biosintéticas observadas en otras familias de plantas, donde la umbeliferona se considera el intermediario común para la biosíntesis de cumarinas lineales y angulares (2).

El principal factor de diversificación estructural de las cumarinas en las Rutaceae es la amplia incorporación de unidades prenilo al núcleo cumarínico. En algunas especies, de esta familia, se ha demostrado que la prenilación ocurre cuando se ha formado la umbeliferona (1, 2). Las modificaciones secundarias que pueden efectuarse sobre los grupos prenilo, usualmente iniciada por epoxidaciones en el doble enlace, contribuyen a esta diversificación estructural de manera importante. Inclusive la transformación del doble enlace de la cadena prenilada lateral al diol respectivo, vía una epoxidación ha sido demostrada con marcadores radiactivos (1).

También se ha postulado que las furano y pirano cumarinas se forman biogenéticamente cuando al núcleo cumarínico se adiciona un grupo prenilo y este interacciona con un grupo ortofenólico, de tal modo que se generan diferentes cumarinas con un anillo heterocíclico adicional. Así se ha propuesto

que una prenilación en la posición 6 de la umbeliferona da origen a las furanocumarinas lineales como el psoraleno, mientras que una prenilación en la posición 8 da origen a las furanocumarinas angulares como la angelicina.(3).

Algunos autores asumen que las pirano y furano cumarinas lineales y angulares comparten caminos biosintéticos comunes, excepto en la etapa final de ciclización. Propuesta que se ha demostrado experimentalmente. Así, mediante marcadores radioactivos, se ha probado la transformación biogenética en, *Ruta graveolens* de la demetilsuberósina a psoraleno (3).

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados de un análisis, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, de la composición de cumarinas en hojas y semillas de *Casimiroa pubescens*, *C. edulis* y *C. calderoniae*. Adicionalmente se comparan los diferentes tipos de cumarinas presentes en *C. edulis*, *C. pubescens*, *C. calderoniae* y *C. greggii*.

Resultados y Discusión

Se realizaron los análisis a cinco individuos de cada especie, recolectados en el mismo sitio y en etapa de fructificación. Las cumarinas 1, 6, 9, 15 y 16, utilizadas como metabolitos secundarios de referencia, se aislaron previamente de *Decatropis bicolor* (Rutaceae) (4).

De manera general, los resultados del análisis cromatográfico indican la presencia de las cumarinas: felopterinina (6), isopimpinellina (9), heraclenol (15) y heraclenina (16), tanto en hojas como en semillas de las tres especies

estudiadas (cuadro 1). En contraste no se detectó la presencia de la seselina (1), cumarina previamente aislada de *C. greggii* (5).

El análisis de resultados para cada especie se presenta por separado.

C. pubescens.

El estudio en hojas de esta especie mostró que la heraclenina fue la única cumarina presente en los cinco individuos estudiados así mismo fue la de mayor concentración. Por otro lado la felopterina se detectó en cuatro individuos, mientras que la isopimpinellina se encontró en dos individuos y el heraclenol solamente en uno. La misma tendencia se observó en el análisis de las semillas.

Estos resultados indicaron que en esta etapa de crecimiento de las plantas y en este sitio de colecta, la especie acumula y/o sintetiza preferentemente heraclenina y felopterina.

C. edulis.

El estudio de las hojas de esta especie, a diferencia de las otras dos especies analizadas mostró una presencia abundante de las cuatro cumarinas de referencia con concentraciones que variaron de 0.048 a 0.801 mg/ g de planta. En contraste, en semillas, la presencia de las cumarinas (6, 9, 15 y 16) fue escasa, la única cumarina presente en todos los individuos fue la felopterina mientras que el heraclenol solamente se detectó en un solo individuo.

C. calderoniae.

Los resultados del análisis de esta especie muestran un patrón similar al observado en *C. pubescens*, esto es la presencia de 6, 9, 15 y 16, tanto en frecuencia como en concentración, es mayor en las hojas que en las semillas. Sin embargo es notable las concentraciones tan altas de heraclenina (20.9 mg/g) y de felopterina (23.8 mg/g) en hojas.

En suma, los resultados de las tres especies estudiadas indican que la presencia de las cumarinas de referencia 6, 9, 15 y 16 es mayor en las hojas que en semillas. No obstante existen diferencias notables en los resultados de los análisis de hojas, así en *C. pubescens* y *C. calderoniae* las cumarinas con mayor presencia fueron heraclenina y felopterina. Sin embargo, la concentración de estas cumarinas fue del orden de cien veces más en *C. calderoniae* que en *C. pubescens*. En contraste todas la cumarinas de referencia se detectaron en *C. edulis* con rangos de concentración similar.

Especies	No. herbario	CUMARINAS EN HOJAS mg/g*				CUMARINAS EN SEMILLA mg/g*			
		15	9	16	6	15	9	16	6
<i>C. pubescens</i>	84835	0.0100	0.1570	0.1450	0.4510	0.0630	0.1050	1.8170	0.8640
<i>C. pubescens</i>	84836	0.0000	0.0110	0.4100	0.1970	0.0000	0.3240	1.8020	1.5440
<i>C. pubescens</i>	84837	0.0000	0.0000	0.2790	0.1550	0.0000	0.1200	1.4150	1.0260
<i>C. pubescens</i>	84838	0.0830	0.0000	0.0660	0.0150	0.0000	0.0080	1.5000	0.9300
<i>C. pubescens</i>	84839	0.0000	0.0000	0.0320	0.0000	0.0000	0.1070	0.7160	0.2230
<i>C. edulis</i>	84847	0.0640	0.6820	0.1140	0.5030	0.0000	0.0000	0.0840	0.1030
<i>C. edulis</i>	84849	0.0520	0.0980	0.3310	0.1650	0.0000	0.0160	0.6050	0.3220
<i>C. edulis</i>	84850	0.0480	0.1530	0.8010	0.2430	0.0150	0.1030	0.1000	0.1440
<i>C. edulis</i>	84851	0.0860	0.5870	0.1100	0.2570	0.0080	0.0630	0.0420	0.1558
<i>C. edulis</i>	84852	0.0780	0.1320	0.7440	0.1780	0.0070	0.0000	0.0210	0.1110
<i>C. calderoniae</i>	84876	0.0000	1.5420	11.1400	2.1120	0.0000	0.6890	1.7320	2.1120
<i>C. calderoniae</i>	84877	0.0000	0.2300	7.2250	5.3050	0.0560	0.880	0.8180	1.0630
<i>C. calderoniae</i>	84878	0.0000	0.6670	12.9500	10.4800	0.0140	0.3400	1.6920	1.2230
<i>C. calderoniae</i>	84879	1.3070	2.5750	20.9300	23.8000	0.0000	0.1030	0.7550	0.4660
<i>C. calderoniae</i>	84880	0.0507	0.5220	4.7770	0.7890	0.0660	0.9850	3.5270	2.1380

15 = heraclenol, 9 = isopimpinilina, 16 = heraclenina, 6 = felopterina, * = mg de cumarina/g de planta seca.

Cuadro 1. Cantidad de cumarinas presentes por gramo de material vegetal.

Diversidad estructural de las cumarinas en *Casimiroa edulis*, *C. pubescens*, *C. calderoniae* y *C. greggii*.

Hasta el momento, tomando en cuenta los resultados de este trabajo así como los previamente publicados, se ha demostrado la presencia de 16 cumarinas en el género *Casimiroa* (cuadro 2)(2, 5-10).

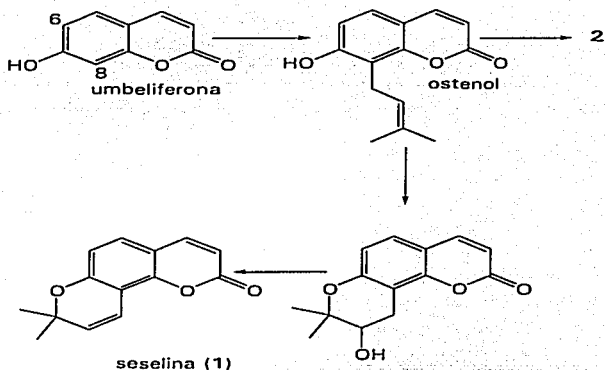
COMPUESTOS	ESPECIES				
	<i>C. greggii</i>	<i>C. pringlei</i>	<i>C. edulis</i>	<i>C. pubescens</i>	<i>C. calderoniae</i>
Seselin (1)	✓				
O-Geraniil-ostenol (2)	✓				
8-Geraniiloxipsoraleno (3)		✓	✓		
Bergapteno (4)		✓	✓		
Xantoxol (5)		✓			
Felopterina (6)		✓	✓	✓	✓
Cumarina 7		✓			
Cumarina 8		✓			
Isopimpinolina (9)			✓	✓	✓
Escopoletina (10)			✓		
Ester metílico de escopoletina (11)			✓		
5-Geraniil-oxipsoraleno (12)			✓		
8-Geraniil-5 metoxi-oxipsoraleno (13)			✓		
9-Hidroxi-4-metoxi-furano-(3,2,g) benzopiran-7-ona (14)			✓		
Heraclenol (15)			✓	✓	✓
Heraclenina (16)			✓	✓	✓

Cuadro 2. Cumarinas presentes en el género *Casimiroa*

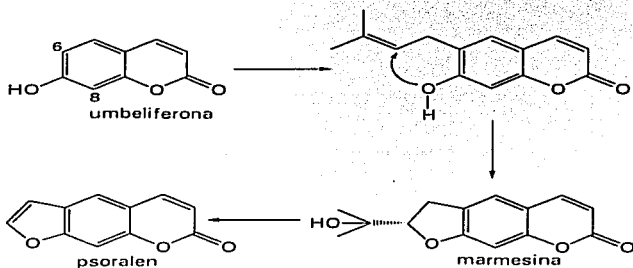
Las cumarinas aisladas del género *Casimiroa* apoyan la propuesta biogenética que supone que este tipo de compuestos derivan de la umbeliferona, ya que todas ellas, se postulan formadas a partir de este intermediario (3).

La presencia de 10 y 11 en el género se puede considerar un hecho poco frecuente ya que solo la *C. edulis* sintetiza este tipo de cumarinas.

La distribución del resto de las cumarinas en el género indican claramente diferencias notables, por ejemplo, la *C. greggii* sintetiza cumarinas provenientes de la umbeliferona pero preniladas en C-8.



Mientras que las cumarinas sintetizadas por las especies *C. edulis*, *C. pringlei*, *C. pubescens* y *C. calderoniae* también provienen de la umbeliferona, pero preniladas en C-6 con formación posterior de anillos furánicos como en el



psoraleno y con total ausencia de anillos pirónicos.

Conclusión

Hasta el momento, las cumarinas aisladas del género *Casimiroa* indican que tienen como precursor común a la umbeliferona, propuesta biogenética que es general a la familia Rutaceae. Sin embargo existe una clara diferencia entre las cumarinas sintetizadas por la *C. greggii* y las especies *C. edulis*, *C. pringlei*, *C. pubescens* y *C. calderoniae*. La *C. greggii* elabora la seselina y el O-geranilostenol, ambas provenientes de la umbeliferona prenilada en el átomo de C-8, mientras que las cumarinas sintetizadas por las demás especies elaboran, principalmente furanocumarinas, las cuales provienen de la prenilación en el átomo C-6 de la umbeliferona. Así mismo se determinaron la presencia y la concentración de las cumarinas: felopterina (6), isopimpinelina (9), heraclenol (15) y heraclenina (16), en semillas y hojas de *C. edulis*, *C. pubescens* y *C. calderoniae*.

De manera general, se observó que la concentración de estos metabolitos es mayor en hojas que en semillas.

Parte experimental

Material biológico.- Se recolectaron cinco individuos de cada especie, y los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario de la Facultad de Ciencias

de la Universidad Nacional de México, FCME). *Casimiroa edulis* se recolectó en el Mpio. de Comala, estado de Colima, en julio de 2000 (Nos. de registro del herbario 84847, 84849-84852). *C. pubescens* se recolectó en Ixmiquilpan, estado de Hidalgo, en junio de 2000 (Nos. de registro 84835-84839), y *C. calderoniae* en la zona árida oaxaqueño-poblana en octubre de 2000, en el estado de Oaxaca (Nos. de registro 84876-84880).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución.- La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se efectuó en un cromatógrafo de líquidos Waters modelo Delta PREP 4000, con detector UV, modelo 486 a una longitud de onda de 310 nm. El flujo del disolvente se mantuvo a 1 ml/min. Se utilizó un gradiente 50/50 MeOH/H₂O hasta 90/10 MeOH/H₂O en 20 min. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software "Millenium" (Waters).

Estándares y curvas de calibración.- Se utilizaron como estándares seselina (1), felopterina (6), isopimpinlina (9), heraclenol (15), heraclenina (16) aislados previamente de *Decatropis bicolor* (4). De cada compuesto se prepararon disoluciones en acetato de etilo a concentraciones de 2.9, 2.6, 2.6, 2.7 y 3.6 mg/ml de cada una de ellas, respectivamente. Se prepararon cinco diluciones de cada compuesto en el rango de 0.013 a 0.13 mg/ml. Las curvas de calibración se construyeron inyectando, por triplicado, las diluciones estándar. Los coeficientes de correlación (r^2) para cada gráfica de cada compuesto se calcularon teniendo valores para r^2 mayores a 0.997.

Obtención de extractos hexánico y metanólico de los individuos.- Una cantidad pesada de material vegetal, de cada individuo, hojas o semillas secas y molidas se extrajeron con hexano por maceración a temperatura ambiente durante 24 horas, por tres veces consecutivas. Los extractos se juntaron y después de evaporar el disolvente bajo presión reducida, el extracto seco se pesó. Este procedimiento se repitió con metanol para obtener el extracto metanólico correspondiente de cada muestra. De cada extracto se prepararon disoluciones de concentración conocida y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos. Para el procesamiento de los datos se empleó el software Millenium, (Waters), este programa calcula la cantidad de cada compuesto presente en cada mililitro de disolución inyectada, sobre la base de las curvas de calibración de los estándares. La cantidad de cada compuesto presente en el extracto hexánico se suma con el correspondiente compuesto presente en el extracto metanólico y con esta suma se calculan los miligramos de cada compuesto presentes en cada gramo de planta seca.

Agradecimientos Los autores agradecen el apoyo en el financiamiento parcial del CONACYT, proyecto No. 34992-N, y a la Beca de PASPA, DGAPA para los estudios de doctorado de la M. en C. García-Argáez.

BIBLIOGRAFÍA

- Dewick, P.M. *Natural Products Reports*. 1994, 11, 173-203.
- Gray, A. I.; Waterman, P.G. *Phytochemistry*. 1978, 17, 845.

Murray, R.; Méndez, J.; Brown, S. *The Natural Coumarins*, John Wiley & Sons Ltd.; Norwich; 1982; 163-185.

García-Argáez, A. N.; Ramírez, A. T. O.; Parra, D. H.; Velázquez, G.; Martínez-Vázquez, M. *Planta Medica*. 2000, 66, 279-281.

Meyer, B. N., Wall, M.E., Wani, M.C., Taylor, H.L. *J. Nat. Prod.* 1985, 48, 952-956.

Castellanos, S. V. Tesis FES Zaragoza, UNAM, México, 1998. 124 pp.

Rizvi, S. H.; Kapil, R.S.; Shoe, A. *J. Nat. Prod.* 1985, 48, 146.

Iriarte, J.; Kincl, F.A.; Rosenkranz, G.; Sondheimer, F. *J. Chem. Soc.* 1956, 4170-4173.

Kincl, F.; Romo, J.; Rosenkranz, G.; Sondheimer, F. *J. Chem. Soc.*, 1956, 4163-4169.

Enríquez, R. G.; Romero, M. L.; Escobar, L. I.; Joseph-Nathan, P.; Reynolds, W. F. *J. Chromatogr.*, 1984, 287, 209-214.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. PHENETIC ANALYSIS OF FOUR SPECIES OF
Casimiroa (RUTACEAE)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Phenetic analysis of four species of *Casimiroa* (Rutaceae)

**Aída N. García-Argáez^a, Nadia M. González-Lugo^b, Hortensia Parra-Delgado^b,
Carmen Márquez^a, Mariano Martínez-Vázquez^b**

^aDepartamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. ^bInstituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F.

Corresponding author. Tel: + (52) 56224403; Fax: + (52) 56162203

E-mail address: marvaz@servidor.unam.mx

Abstract

From the analyses of 34 individuals of *Casimiroa edulis*, 12 of *C. pubescens*, 8 of *C. calderoniae* and 8 of *C. sapota*, based on the phenetic investigation of morphologic data and chemical characters, a qualitative and quantitative database was assembled and used for ordination analyses using NTSYS.

The results showed that the four species were delimited in four separated groups when the morphologic data as well as the chemical characters were both included in the ordination analyses, although *C. edulis* and *C. sapota* are very close taxa.

Additionally, in a first step the phytochemical studies of the seeds of *C. pubescens* and *C. calderoniae* were carried out. Then, the coumarins 8-geranyloxypsoralen and isopimpinellin, the alkaloid skimmianine, and the ubiquitous β -sitosterol were isolated from *C. pubescens*, while from *C. calderoniae*, β -sitosterol and the coumarins isopimpinellin and phellopterin were isolated. To our knowledge this is the first phytochemical study of these species.

1. Introduction

The small genus *Casimiroa* Llave et Lex. (Rutaceae) comprises only 10 species and grows specially on the tropical and subtropical areas of Central America and Mexico (Martínez, 1951, Lundell, 1968; Chiang and Medrano, 1981;

Chiang, 1989).

Due to its pleasant flavored fruits, *C. edulis* is cultivated in Central Mexico. Furthermore, in folk medicine, a concoction of its leaves, and less frequently of its seeds, is administered as a sleep inducer (Martínez, 1944).

Nevertheless, there is a great deal of confusion about the taxonomic situation among *C. edulis* and *C. sapota*. According to an early study (Standley, 1946), *C. sapota* could be distinguished from *C. edulis* by the shape and the length of their leaflets. Thus, it was proposed that *C. sapota*, almost always presented three narrow and small leaflets with long petiolules, while *C. edulis* presented five elliptic, ovate or wide obovate leaflet with small and stronger petiolules.

However, in a contrasting way in a later study, it was claimed that the presence of wide elliptic, ovate and obovate leaflets, up to 20 cm long, were characteristic of *C. sapota* and not of *C. edulis* (Martínez, 1951, 1969).

Recently, it has been reported (Chiang, 2001) that *C. sapota* has erroneously been included in the same taxa as *C. edulis* and therefore numerous herbarium samples are misidentified. This author, based on morphologic studies of samples of different herbarium as well as wild species, concluded that these two species could be distinguished by their shape, size and form of their leaflet and petiolules. Accordingly, *C. edulis* presents elliptic leaflet with long and skinny petiolules, while *C. sapota* presents shorter and thicker petiolules as well as bigger and wider obovate leaflets than *C. edulis*.

There is only one study using other morphologic characteristics of leaflets and petiolules (Arreguín-Sánchez et al., 1986). In this study, the authors analyzed the morphologic characters of pollen grain. However, they concluded that there is not difference between the pollen grain of the two species.

On the other hand, it is very well known that the coumarins are found among the secondary metabolites that characterize the Rutaceae (Gray, A and Waterman, P., 1978). Although only two species of the genus *Casimiroa* have been studied phytochemically it appears that coumarins could also be used to characterize this genus. Then, from *C. edulis* and *C. greggii* have been isolated the coumarins: 9-hydroxy 4-methoxy-furan [3,2-g] benzopiran-7-ona, phellopterin, 8-geranyl-oxipsoralen, 5-geranyl-oxipsoralen, 5-methoxy 8-geranyloxipsoralen, bergapten, seselin, O-geranyl-osthenol isopimpinellin, scopoletin, and the methyl ether scopoletin (Kincl, F. et al., 1956; Dreyer, D., 1968; Enríquez, R. et al., 1984; Iriarte, J., et al., 1956; Rizvi, S. et al., 1985; Meyer, B. et al., 1985). This prompted us to use the coumarins as chemical characters that along with morphological data would delimit species of genus *Casimiroa*.

The species selected for this study were *C. edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens* and *C. calderoniae*. Since there is no available chemical data for the last two it was decided, as a first step, to carry out the respective chemical studies of these species.

In a second step, in order to determine the interspecific variation of the coumarins presented in the four species selected, 34 individuals of *Casimiroa edulis*, 12 of *C. pubescens*, 8 of *C. calderoniae* and 8 of *C. sapota* were analyzed by HPLC.

These data, along with the morphologic data, were used to assemble a qualitative and quantitative database for these species and used for ordination analyses using NTSYS.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material

Seeds of *C. pubescens* were collected between Vithe and Cardonalito Towns in Ixmiquilpan County, Hidalgo, Mexico, in June 2000, while those of *C. calderoniae* were collected in the surroundings of Nochixtlan, Oaxaca, Mexico in December 2001. The voucher specimens were deposited at the Herbarium of Facultad de Ciencias UNAM (FCME-84833 for *C. pubescens* and FCME-84876 for *C. calderoniae*).

2.2 Phytochemical analyses of *C. pubescens* and *C. calderoniae*.

Dried and milled seeds (3834 g) of *C. pubescens* were extracted with n-hexane (5 l x 3 times) for 48 h at room temperature. The hexanic extract (62.53 g, residue dry weight) was absorbed on 4 g of silica gel and then chromatographed on a column packed with 130 g of silica gel 60 (Merck).

Elution with solvent mixtures of increasing polarity afforded β -sitosterol (35 mg, Hex: EtOAc, 9:1) (Rubinstein *et al.*, 1976), isopimpinellin (29 mg, Hex: EtOAc, 6:4) (Elgamel *et al.*, 1979) and skimmianine (82 mg, EtOAc: MeOH, 7:3) (Chakravarty *et al.*, 1999).

Seeds of *C. calderoniae* (336 g) were treated on a similar way. Then, they were extracted with *n*-hexane (700 ml x 3 times) for 48 h at room temperature. The resulting extract (2.3 g, residue dry weight) was adsorbed on 1 g of silica gel and then chromatographed on a column packed with 10 g of silica gel 60 (Merck). Elution with solvent mixtures of increasing polarity afforded phellopterin (81 mg, Hex: EtOAc, 9:1) and isopimpinellin (20 mg, Hex: EtOAc, 9:1) (Elgamel *et al.*, 1979).

The phytochemical analyses of the leaves of both species were carried out by HPLC techniques.

2.3 HPLC analyses of *C. pubescens*, *C. calderoniae*, *C. edulis* and *C. sapota* seeds.

Coumarin determination in each individual was achieved by using an HPLC system consisting of a Waters Delta Prep 4000 and a 486 UV detector set to a λ 310 nm. A LUNA 5 μ m C18 (2) column was used (4.6 mm i. d. x 150 mm) and a gradient profile based on MeOH and water was employed. Initial conditions were 50% of MeOH and 50% of water, with a linear gradient reaching 90% MeOH and 10% water in 20 min.

Heraclenol (1), isopimpinellin (2), heraclenin (3) and phellopterin (4) (fig.1) previously isolated from *C. edulis*, *C. pubescens* and *C. calderoniae*, as well as from *D. bicolor* (García-Argáez, et al., 2000), were used as standards. The standard solutions of each compound were obtained dissolving 2.9, 2.6, 2.6 and 2.7 mg in one ml of EtOAc respectively. The calibration curves were built by injecting six dilutions of the standard solutions by triplicates. The correlation coefficients (r^2) for each calibration curve were over 0.997.

Dried and milled leaves and seeds of the four selected species were extracted separately with hexane for 24 h (3 times). The extracts were reunited and after evaporation at low pressure of the solvent, the total dry weight was recorded. The same procedure was realized when the material plant was extracted with MeOH. Solutions of known concentration from each extract were injected to HPLC. The quantity of each compound in the extract by ml of injected solution was calculated using the calibration curve and the Millennium program (Waters). The total weight in mg of each compound was calculated adding the weight of the compound in both extracts (table 1).

2.4 Phenetic analyses.

The data of their source and voucher number of 34 individuals of *Casimiroa edulis*, 12 of *C. pubescens*, 8 of *C. calderoniae* and 8 of *C. sapota* collected are in table 1. They were described morphologically and these data, along with those of the chemical information, were used as a character for the numerical

analyses (table 2). Each individual was considered an Operational Taxa Unit (OTU).

A Basic Data Matrix (BDM) was built with 24 chemical and morphologic characters by 62 OTU and it was standardized character by character through a linear transformation, in which the average value was subtracted from the value of each character divided by the standard deviation. The Standard Basic Data Matrix (BDMS) was examined by ordination analyses. The phenetic studies were carried out by the NTSYS 2.02i program.

The principal component analyses were achieved from an Eigen ordination analysis using a correlation matrix by character, which was calculated from the BDMS. In figure 2 are shown the projections of the OTU over the two first principal factors, including only the morphologic data, while in figures 3 and 4 are shown the projections over two and three principal factors, but including now both morphologic and chemical data.

The characters with major importance in every principal component were observed in the character Eigen ordination matrix (table 4).

3. Results and discussion

The analyses of the principal component (PCA) based only on the morphologic data led the delimitation of the studied individuals in three large groups. Then,

the first component enclosed *C. pubescens* and *C. calderoniae* separated from the group formed by *C. edulis* and *C. sapota*, while the second component led the delimitation between *C. pubescens* and *C. calderoniae* but no led the delimitation of *C. edulis* and *C. sapota*. It is worth to note, that the *C. sapota* individuals in the *C. edulis* and *C. sapota* group are located in the periphery of the collection (Fig 2).

Although heraclenol (1), isopimpinellin (2), heraclenin (3), and phellopterin (4) were detected in the four species studied and therefore the presence of this kind of coumarins could be a diagnosis of the *Casimiroa* genus. However, their concentrations in each specie were very different. For example, the concentrations of 3 and 4 were 10 times more in *C. pubescens* than in the other three species.

Then, when the chemical data of the leaves were incorporated to the PCA analyses, the species were delimited in four groups although *C. sapota* and *C. edulis* are very close taxa (Fig. 3 and 4). As expected the concentrations of heraclenin and isopimpinellin were important to achieved the separation of *C. edulis* and *C. sapota* (Table 3).

According to our results, when the ordination analyses was carried out, taking into account only the morphologic data, because the variation of the morphologic data of leaflet, petiole and petiolules, mainly in *C. edulis* and *C. sapota* it was not possible delimit the studied species. Conclusion, which is in

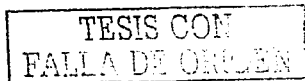
complete agreement with the present confusion about the taxonomic situation among *C. edulis* and *C. sapota*.

4. Acknowledgements:

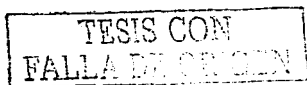
We are indebted to Dr. Susana Valencia, Academic Technique from the Herbarium Facultad de Ciencias, UNAM, for technical assistance. Partial financial support from CONACYT (34992-N), and scholarship to A.N.G.A. from PASPA, DGAPA, UNAM is acknowledged.

5. References

1. Martínez, M., 1951, *Anal. Inst. Biol.*, 22 (1) 25-181.
2. Lundell, C.L., 1968, *Wrightia*, 4 (2) 79-96.
3. Chiang, F., González-Medrano, F., 1981, *Bol. Soc. Bot. Mex.*, 41, 23-26.
4. Chiang, F., 1989, *Taxon*, 38 (1) 116-119.
5. Martínez, M., 1969, *Las Plantas Medicinales de México*. Ed. Botas. 5th edition, 349-355 pp, Mexico.
6. Arreguín-Sánchez, M. L., Palacios-Chávez, R., Quíroz-García, D., Ramos-Zamora, D., 1986, *Phytologia*, 60 (6) 391-394.
7. Standley, P.C., Steyermark, J.A. 1946-1976. *Fieldiana, Botany*, 24, 398-404.



8. Chiang, F., 2001., Flora of Nicaragua, *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 85, III, 2289.
9. Arreguín-Sánchez, M. L., Palacios-Chávez, R., Quíroz-García, D., Ramos-Zamora, D., 1986, *Phytologia*, 60 (6) 391-394.
10. Gray, A. I., Waterman, P.G., 1978, *Phytochemistry*, 17, 845-864.
11. Kincl, F., Romo, J., Rosenkranz, G., Sondheimer, F., 1956, *J. Chem. Soc.*, 4163-4169.
12. Dreyer D. L., 1968, *J. Org. Chem.*, 33, 3577-3582.
13. Enríquez, R., Romero, M. Escobar, L., Joseph-Nathan, P., Reynolds, W., 1984, *J. Chrom.*, 287, 209-214.
14. Iriarte, J.; Kincl, F.A.; Rosenkranz, G.; Sondheimer, F., 1956, *J. Chem. Soc.*, 4170-4173.
15. Rizvi, S. H., Kapil, R.S., Shoe, A., 1985, *J. Nat. Prod.*, 48, 146.
16. Meyer, B. N., Wall, M.E., Wani, M.C., Taylor, H.L., 1985, *J. Nat. Prod.*, 48, 952-956.
17. Rubinstein, I., Goad, L.J., Clague, A.D., Mulheirn, L.J., 1976, *Phytochemistry*, 15, 195-200
18. Elgamal, M.H., Elwa, N.H., Elkhrisy, E.A., Duddeck, H., 1979,



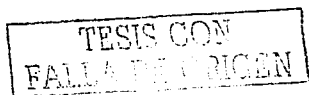
Phytochemistry, 18, 139-143.

19. Chakravarty, A.K., Sarkar, T., Masuda, K. Shiojima, K., 1999, *Phytochemistry*, 50, 1263-1266.
20. García-Argáez, A., Toscano, R., Martínez-Vázquez, M., 2000, *J. Chem. Cryst.*, 30, 727-730.

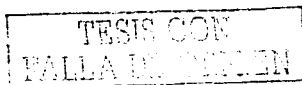
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Source, Voucher number, and extraction data.

No. OTU	Species	Source	Voucher Number	Plant. Mat. used	Plant Mat. (g)	Hex. Extract (g)	MeOH Extract (g)
C1	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84872	Leaf	40.00	1.462	6.046
C3	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84874	Leaf	40.00	1.527	4.958
C4	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84875	Leaf	40.00	1.542	6.208
C5	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84875	Leaf	40.00	0.973	7.338
				Seed	4.930	0.045	0.851
C6	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84877	Leaf	40.00	1.944	6.382
				Seed	10.37	0.102	1.279
C7	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84878	Leaf	40.00	1.268	6.884
				Seed	1.920	0.034	0.326
C8	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84879	Leaf	40.00	0.992	7.023
				Seed	2.150	0.018	0.467
C9	<i>C. calderoniae</i>	Nochixtlan, Oax.	FCME-84880	Leaf	40.00	1.355	0.593
				Seed	4.340	0.095	0.408
E1	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Col.	FCME-84847	Leaf	40.00	0.726	3.664
				Seed	40.00	0.222	2.521
E2	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Col.	FCME-84848	Seed	40.00	0.332	2.730
E3	<i>C. edulis</i>	Comala, Col.	FCME-84849	Leaf	40.00	0.693	2.371
				Seed	40.00	0.242	1.706
E4	<i>C. edulis</i>	Los Obradores, Col.	FCME-84850	Leaf	40.00	0.683	3.272
				Seed	40.00	0.178	1.376
E5	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Col.	FCME-84851	Leaf	40.00	0.424	2.299
				Seed	40.00	0.187	2.090
E6	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Comala, Col.	FCME-84852	Leaf	40.00	0.415	3.645
				Seed	40.00	0.186	1.516
E7	<i>C. edulis</i>	La Ermita, Col.	FCME-84853	Leaf	40.00	0.520	2.721
				Seed	40.00	0.291	0.752
E8	<i>C. edulis</i>	Rancho Alto, Col.	FCME-84854	Leaf	40.00	0.624	2.263
				Seed	40.00	0.197	1.364
E9	<i>C. edulis</i>	Nuevo Antonio, Col.	FCME-84855	Leaf	40.00	0.677	3.566
				Seed	40.00	0.157	0.998
E10	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Col.	FCME-84856	Leaf	40.00	0.768	3.672
				Seed	40.00	0.247	0.799
E11	<i>C. edulis</i>	La Yerbabuena, Col.	FCME-84857	Leaf	40.00	0.633	5.283
				Seed	40.00	0.078	2.200
E12	<i>C. edulis</i>	La Becerrera, Col.	FCME-84858	Leaf	40.00	0.085	2.243
				Seed	40.00	0.144	2.528
E13	<i>C. edulis</i>	Comala, Col.	FCME-84859	Leaf	40.00	0.677	4.293
				Seed	40.00	0.144	2.528
E14	<i>C. edulis</i>	Atenago del Rio, Gro.	FCME-84834	Leaf	40.00	0.200	4.763
E16	<i>C. edulis</i>	Sn. Cristobal, Hgo.	MEXU 292308	Leaf	0.327	0.008	0.066



E17	<i>C. edulis</i>	Ajacuba, Hgo.	MEXU-516675	Leaf	0.244	0.010	0.042
E18	<i>C. edulis</i>	Arroyo Hondo, Col.	FCME-84860	Leaf	0.363	0.016	0.028
				Seed	40.00	0.207	3.423
E19	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Comala, Col.	FCME-84861	Leaf	40.00	0.684	2.340
				Seed	0.200	0.003	0.035
E21	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Col.	FCME-84862	Leaf	40.00	0.521	3.771
				Seed	40.00	0.175	2.318
E22	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Col.	FCME-84865	Leaf	40.00	0.287	3.131
				Seed	40.00	0.421	2.275
E23	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Col.	FCME-84866	Leaf	40.00	0.269	2.902
				Seed	40.00	0.185	1.651
E24	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Col.	FCME-84863	Leaf	40.00	0.274	3.965
				Seed	40.00	0.241	1.607
E25	<i>C. edulis</i>	Nogueras, Comala, Col.	FCME-84864	Leaf	40.00	0.302	3.603
				Seed	40.00	0.121	1.576
E26	<i>C. edulis</i>	Suchitlan, Col.	FCME-84867	Leaf	40.00	0.189	2.995
				Seed	40.00	0.168	1.080
E27	<i>C. edulis</i>	Junta Auxiliar La Asunción, Pue.	FCME-84868	Leaf	40.00	0.404	5.933
E29	<i>C. edulis</i>	Yautepec, Mor.	FCME-84869	Leaf	40.00	0.769	3.601
				Seed	40.00	0.203	3.763
E30	<i>C. edulis</i>	Yautepec, Mor.	FCME-84870	Leaf	40.00	0.720	3.081
				Seed	12.14	0.192	1.429
E31	<i>C. edulis</i>	Sn. Juan Roboso, Pue.	FCME-84871	Leaf	40.00	0.485	4.972
E52	<i>C. edulis</i>	Xochipala, Gro.	MEXU-660812	Leaf	0.230	0.068	0.035
E53	<i>C. edulis</i>	Zitacuaro, Mich.	MEXU-16353	Leaf	0.490	0.009	0.057
E54	<i>C. edulis</i>	Sta. Rosa Gto.	MEXU-479202	Leaf	0.340	0.009	0.067
E55	<i>C. edulis</i>	Santiago Tezontla, Hgo.	MEXU-516675	Leaf	0.350	0.090	0.078
E56	<i>C. edulis</i>	La Venta, Oro.	MEXU-217694	Leaf	0.150	0.002	0.028
E57	<i>C. edulis</i>	Ajacuba, Hgo.	MEXU-516673	Leaf	0.270	0.008	0.034
P1	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84835	Leaf	40.00	0.407	2.401
				Seed	40.00	0.837	5.970
P2	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84836	Leaf	40.00	0.444	2.651
				Seed	40.00	0.752	3.127
P3	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84837	Leaf	40.00	0.451	2.386
				Seed	40.00	1.089	3.388
P4	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84838	Leaf	40.00	0.525	2.149
				Seed	40.00	0.861	2.528
P5	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84839	Leaf	40.00	0.469	1.948
				Seed	40.00	0.599	2.930
P6	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84840	Leaf	40.00	0.726	2.484
				Seed	40.00	0.800	3.422
P7	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84841	Leaf	40.00	0.753	3.346
				Seed	40.00	1.096	2.305
P8	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84842	Leaf	40.00	0.913	2.936
				Seed	40.00	0.787	3.733



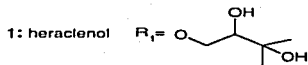
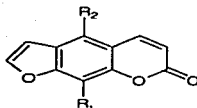
P9	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84843	Leaf	40.00	0.533	2.759
				Seed	40.00	0.823	2.804
P10	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84844	Leaf	40.00	0.638	2.233
				Seed	40.00	0.533	3.498
P11	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84845	Leaf	40.00	0.495	1.581
P12	<i>C. pubescens</i>	Ixmiquilpan, Hgo.	FCME-84846	Leaf	0.268	0.013	0.051
S1	<i>C. sapota</i>	Ojo de Agua, Jal.	MEXU-16336	Leaf	0.566	0.005	0.036
S2	<i>C. sapota</i>	Pánuco, Ver.	MEXU-113351	Leaf	0.257	0.011	0.058
S3	<i>C. sapota</i>	Los Molinos, Dgo.	MEXU-265491	Leaf	0.580	0.012	0.076
S4	<i>C. sapota</i>	Pánuco, Ver.	MEXU-113317	Leaf	0.420	0.011	0.057
S6	<i>C. sapota</i>	Sn. Jose de Gracia, Mich.	MEXU-Sn. J. Gracia	Leaf	0.570	0.003	0.057
S7	<i>C. sapota</i>	El Saucillo, Mich.	MEXU-880221	Leaf	0.380	0.004	0.063
S8	<i>C. sapota</i>	Zapotlanejo, Jal.	MEXU-16152	Leaf	0.500	0.003	0.032
S9	<i>C. sapota</i>	Barranca de Guadalajara, Jal.	MEXU-16319	Leaf	0.390	0.001	0.035

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Table 2. Characters and their states used in the study of *Casimiroa* species

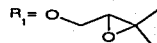
No.	Data evaluated in the species.
1	Length of petiole (cm)
2	Surface of petiole: glabrous (0), puberulents (1), pubescencent (2), thin tomentulose (3), hirsute (4).
3	Length of petiolule (cm)
4	Surface of petiolule: glabrous (0), puberulents (1), pubescencent (2), thin tomentulose (3), hirsute (4).
5	Number of Leaflet: 3 (1); 4 (2); 5 (3); 3 y 5 (4); 3, 4 y 5 (5); 3 y 4 (6); 1 y 3 (7); 2 y 3 (8), 1, 2 y 3 (9)
6	Length of central leaflet (cm)
7	Length and wide of the half of central leaflet.
8	Length and wide of the third part from apex of central leaflet
9	Leaflet shape: narrowed elliptic (0); wider elliptic (1); oval (2); obovate (3); elliptic and oval (4); elliptic (5).
10	Base: rounded (0); cuneate (1)
11	Base in equilateral: no (0); yes (1); both (2).
12	Margin: complete (0); serrate crenate (1); dentate (2).
13	Margin revolute: no (0); yes (1).
14	Margin undulates: no (0); yes (1).
15	Apex: rounded (0); acuminate (1); obtuse (2); truncate (3).
16	Apex: emarginated (0); retuse (1).
17	Upper surface: glabrous (0); pubescent (1)
18	Under surface: glabrous (0); pubescent (1)
19	Bright upper surface: no (0); yes (1)
20	Depress central midvein: no (0); yes (1).
21	Heraclenol (mg/g of dried leaves)
22	Isopimpinellin (mg/g of dried leaves)
23	Heraclenin (mg/g of dried leaves)
24	Phellopterin (mg/g of dried leaves)

Fig. 1. Standards for HPLC analysis



$R_2 = \text{H}$

3: heraclenin



$R_2 = \text{H}$



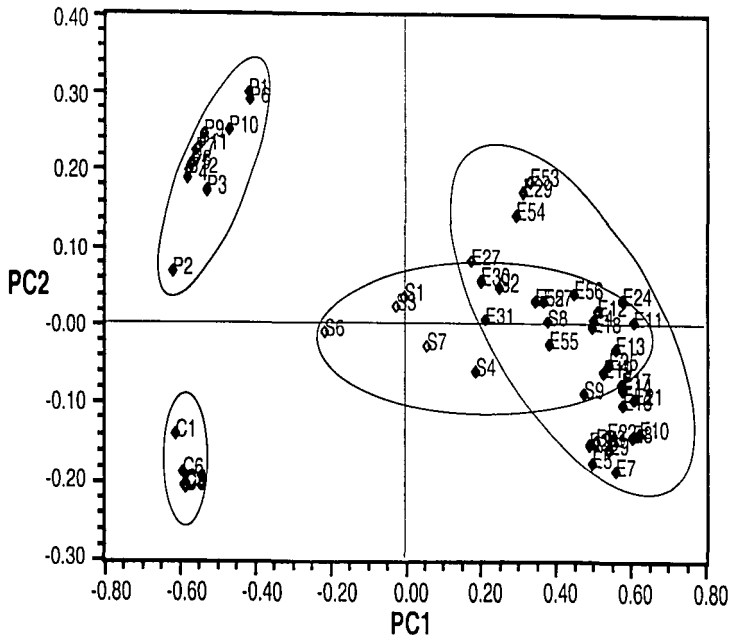
4: phellopterin



$R_2 = \text{H}$

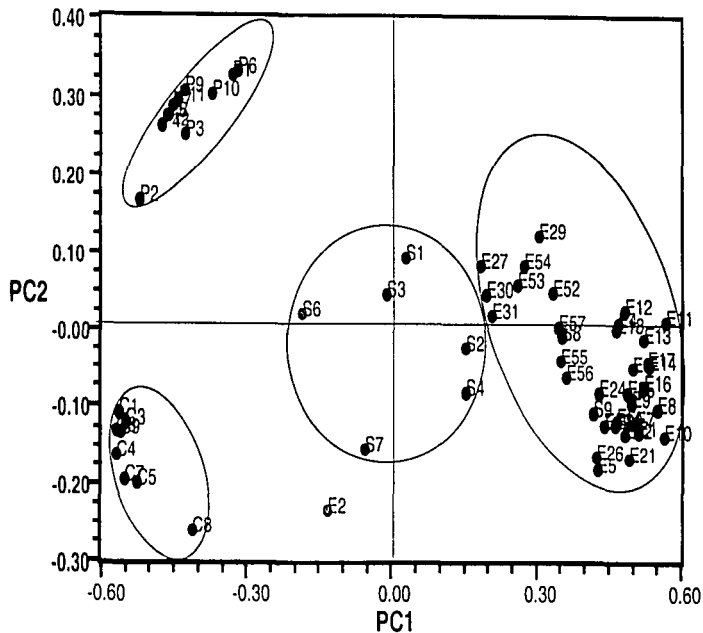
Character No.	Principal Components Analysis		
	1	2	3
1	0.8363	0.1724	0.0633
2	-0.8393	0.2446	0.1676
3	0.3798	0.6166	-0.0863
4	-0.8393	0.2446	0.1676
5	-0.3313	-0.6605	0.3633
6	0.8022	0.2515	-0.0575
7	0.6139	0.0884	-0.4186
8	0.5274	0.0300	-0.3583
9	-0.6827	0.3235	-0.1846
10	-0.0058	0.0572	0.0677
11	-0.6992	0.2291	-0.1292
12	0.8184	0.2736	0.2759
13	-0.8919	0.1921	-0.0483
14	0.8090	-0.2821	0.1153
15	0.4954	0.6549	0.1434
16	0.1859	-0.7104	0.3459
17	-0.9520	0.1054	0.1158
18	-0.9155	0.2635	0.0991
19	0.6170	0.5107	-0.0778
21	-0.0993	-0.3236	-0.6539
22	-0.2945	-0.7066	-0.4105
23	-0.6028	-0.6789	-0.1277
24	-0.3292	-0.5443	-0.4450

Table 3. Loadings on principal axes from Principal Component Analysis of characters in four *Casimiroa* species. See Table 2 for definitions of characters. Boldface depicts loadings with absolute values ≥ 0.4105



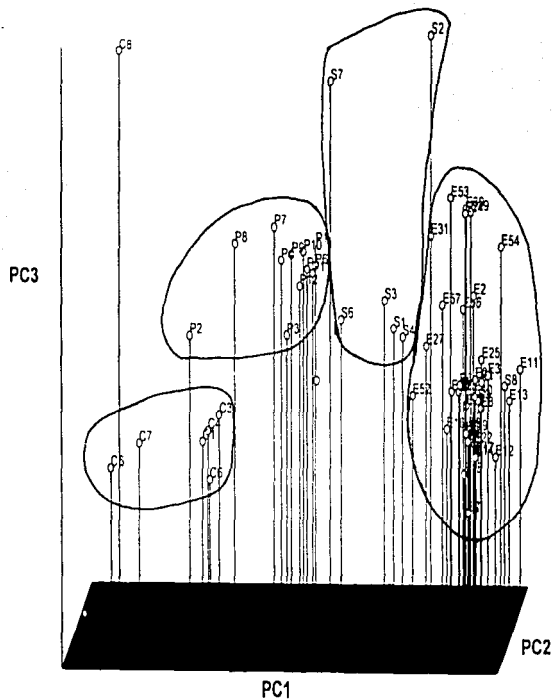
The cumulative percent variation explained by the three factors are 72.41%. P = *C. pubescens*;
 C = *C. calderoniae*; S = *C. sapota*; E = *C. edulis*

Fig. 2. Projection of the species of *Casimiroa* onto the space of morphological characters as defined by the first and second principal components.



The cumulative percent variation explained by the three factors are = 66.81%. P = *C. pubescens*; C = *C. calderoniae*; S = *C. sapota*; E = *C. edulis*

Fig 3. Projection of the species of *Casimiroa* onto the space of morphological and chemical characters as defined by the first and second principal components



The cumulative percent variation explained by the three factors are = 66.81%. P = *C. pubescens*; C = *C. calderoniae*; S = *C. sapota*; E = *C. edulis*

Fig. 4. Projection of the species of *Casimiroa* onto the space of morphological and chemical characters as defined by the first, second and third principal components

VI. 11 β -HYDROXYOBACUNONE (ZAPOTERIN)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11 β -Hydroxybacunone (zapoterin)

Aída Nelly García Argáez,⁽¹⁾ Rubén A. Toscano^{(2)*} and Mariano Martínez-Vázquez^{(2)*}

Received October 15, 2000

The crystal structure of zapoterin C₂₂H₃₀O₄ isolated from *Casimiroa edulis* has been determined and the compound crystallizing in the monoclinic space group *P*2₁ with *a* = 7.486(1), *b* = 16.247(3), *c* = 9.736(2) Å, β = 98.77(1)°, *V* = 1170.3(4) Å³, and *Z* = 2 was confirmed as 11 β -hydroxybacunone (11 β -hydroxy-14,15:21,23-diepoxy-4,4,8-trimethyl-*A*,*D*-di-homo-24-nor-4,17-dioxo-chola-1,20,22-triene-3,7,16-trione) **1**. The molecule comprises a tetracyclic skeleton with homo-oxa rings *A* and *D*. In the crystal, molecules form infinite ribbons along the *b* axis by hydrogen bonding involving the hydroxyl group and the carbonyl group of the seven-membered lactone.

KEY WORDS: Zapoterin; *A*,*D*-bis-*seco* limonoid; triterpene; *Casimiroa edulis*.

Introduction

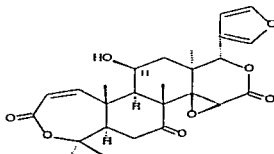
Zapoterin was first isolated from *Casimiroa edulis* Llave et Lex in the mid 1950s by Kinel *et al.*¹ However, it was not until the late 1960s that two structures were proposed for this limonoid. Murphy *et al.*,² deduced an 11 β -hydroxybacunone structure (**1**), while Dreyer³ proposed a 12 α -hydroxy isomer (**2**). In both reports the structure elucidation was based on spectroscopic trends and comparison with other closely related known structures. Somewhat later Moss *et al.*,⁴ noting some discrepancies on the ¹H-NMR signal assignments made by Dreyer, performed solvent exchange and nuclear Overhauser experiments and concluded that the correct structure for zapoterin must be (**1**).

As part of our chemosystematic study of the genus *Casimiroa* we undertook the investigation of *Casimiroa edulis* seeds. Its dried and milled seeds were defatted with *n*-hexane and then extracted with acetone. Chromatography of this extract over silica gel

yielded zapoterin (**1**) and its single crystal structure determination was carried out in order to establish unequivocally the position of the hydroxy substituent in the molecule.

Experimental

Casimiroa edulis was collected near Texcoco, México. The dried and milled seeds (460 g) were first macerated with *n*-hexane (3 \times 24 hr). After that, the seeds were extracted with acetone (3 \times 24 hr) at room temperature, and the resulting extract was partitioned between EtOAc/H₂O (1:1). The organic phase was evaporated and chromatographed over silica gel,

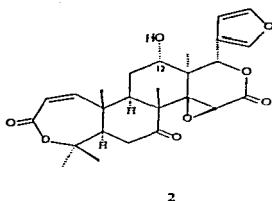


1

⁽¹⁾Laboratorio de Química, Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, México, D.F., México

⁽²⁾Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, 04510, México, D.F., México

* To whom correspondence should be addressed



2

eluting with a solvent gradient of increasing polarity. From fractions eluted with EtOAc a white powder precipitated, its purification by preparative TLC and crystallization from methanol allowed the isolation of 16.0 mg of zapoterin.

Accurate unit cell parameters were obtained by least-squares refinement of $\sin^2\theta$ values for 25 reflections ($10 < \theta < 25^\circ$). Data reduction included

Table 1. Crystal Data and Structure Refinement

Compound	11 β -Hydroxybaccubone (zapoterin)
CCDC no.	CCDC-1003/5966
Color/shape	Colorless/parallelepiped
Chemical formula	C ₂₄ H ₃₀ O ₈
Molecular weight	470.50
Temperature	293(2) K
Crystal system	Monoclinic
Space group	$P2_1$
Unit cell dimensions	
$a = 7.486(1)$ Å	
$b = 16.247(3)$ Å	
$c = 9.736(2)$ Å	
$\beta = 98.77(1)^\circ$	
Volume	1170.3(4) Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.335 Mg/m ³
Absorption coefficient	0.099 mm ⁻¹
Diffractometer/scan	Siemens P4/PC/ $\omega/2\theta$
θ range for data collection	1.50 to 25.00°
Reflections measured	2315
Independent/observed reflections	2144 ($R_{int} = 0.085$)/1493 [$I > 2\sigma(I)$]
Data/restraints/parameters	2144/1/311
Extinction Coefficient	0.008(5)
Absolute Structure	0(3)
Parameter	
Goodness of fit on F^2	1.099
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	$R1 = 0.0627$, $wR2 = 0.1550$
R indices (all data)	$R1 = 0.1029$, $wR2 = 0.1918$

Table 2. Coordinates and Equivalent Isotropic Displacement

Atom	x	y	z	U_{eq} (Å ²) ^a
O1	0.4970(7)	0.5950(3)	0.9648(6)	0.0426(13)
O2	0.2169(8)	0.5581(4)	0.9388(8)	0.0594(18)
O3	0.9774(10)	0.4801(4)	1.4170(6)	0.0576(17)
O4	0.8289(9)	0.4028(5)	1.0708(8)	0.0362(17)
O5	1.1251(7)	0.2508(3)	1.3735(7)	0.0499(15)
O6	0.9757(10)	0.2308(5)	1.6323(6)	0.0631(18)
O7	1.1950(13)	0.3108(5)	1.7263(8)	0.085(3)
O8	0.5050(17)	0.1170(6)	1.6909(14)	0.123(4)
C1	0.5585(10)	0.4028(5)	0.9410(8)	0.0362(16)
C2	0.4133(10)	0.4512(5)	0.9683(8)	0.0421(18)
C3	0.3745(10)	0.5343(5)	0.9404(8)	0.0414(18)
C4	0.7000(9)	0.5839(4)	0.9809(8)	0.0352(16)
C5	0.7511(10)	0.5108(5)	1.0809(8)	0.0367(17)
C6	0.9290(11)	0.5263(4)	1.1801(8)	0.0400(17)
C7	0.9634(9)	0.4615(4)	1.2934(8)	0.0347(16)
C8	0.9643(9)	0.3726(4)	1.2451(8)	0.0329(15)
C9	0.7756(9)	0.3630(4)	1.1483(7)	0.0301(14)
C10	0.7445(9)	0.4221(4)	1.0195(7)	0.0311(15)
C11	0.7231(10)	0.2710(4)	1.1309(8)	0.0341(16)
C12	0.6937(11)	0.2336(5)	1.2705(8)	0.0432(18)
C13	0.8053(10)	0.2717(5)	1.4041(8)	0.0369(16)
C14	0.9771(10)	0.3104(4)	1.3675(8)	0.0369(16)
C15	1.1324(12)	0.3131(5)	1.4800(9)	0.051(2)
C16	1.1061(14)	0.2835(5)	1.6266(10)	0.057(3)
C17	0.8638(12)	0.1991(5)	1.5089(9)	0.047(2)
C18	0.6958(13)	0.3357(5)	1.4725(9)	0.0459(19)
C19	0.8754(10)	0.4035(5)	0.9129(8)	0.0415(18)
C20	0.7087(14)	0.545(7)	1.5595(10)	0.061(2)
C21	0.651(2)	0.1652(10)	1.6804(15)	0.107(5)
C22	0.602(2)	0.0936(10)	1.4934(13)	0.105(5)
C23	0.476(2)	0.0725(14)	1.5679(17)	0.134(8)
C28	0.7487(11)	0.5775(6)	0.8338(8)	0.050(2)
C29	0.7595(11)	0.6670(5)	1.0432(10)	0.046(2)
C30	1.1379(10)	0.3635(5)	1.1768(9)	0.0446(18)

^a $U_{eq} = 1/3 \sum U_{11} + U_{22} + U_{33}$.

corrections for background, Lorentz, and polarization effects. Refinement was by full-matrix least squares, with neutral-atom scattering factors and anomalous dispersion. The weighting scheme was $[\sigma^2(F_o^2) + (0.0789P)^2 + 0.8072P]^{-1}$, where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Positional parameters for the hydrogen atom attached to O4 hydroxyl group were refined, while others were placed in calculated positions with C—H distances of 0.96 Å. SIR97² was used to solve the structure, and SHELXL-97³ was used for structure refinement. The refinement of Flack's parameter γ [0(3)] using the unique reflections data solely could not be used to determine the absolute configuration reliably, but was assigned to correspond to the known configuration of limonoids.⁸ Experimental details are listed in Table 1.

Results and discussion

Table 2 lists the atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters of compound 1, which is illustrated in Fig. 1. The lengthening observed in the bond distances O1—C4 [1.514(8) Å] and C8—C9 [1.582(9) Å] as well as the great deviation from the standard values for the bond angles: O1—C4—C29 [99.5(6)°], C28—C4—C5 [117.7(6)°], C30—C8—C9 [117.7(6)°] and C11—C9—C10 [119.9(6)°] appear to result from *trans*-annular 1,3-interactions among the methyl group C19 and the methyl groups C28 [3.043(13) Å] and C30 [3.057(11) Å]. All the other geometrical parameters (Table 3) are fairly close to their expected values, except for the shortening of the C14—C15 bond due to the *cis* β -oxirane ring. The Cremer and Pople⁹ parameters summarized in Table 4 indicate the conformation of the six-membered rings B (C5—C6—C7—C8—C9—C10), C (C8—C9—C11—C12—C13—C14) and D (C13—C14—C15—C16—O6—C17) as chair, twist-boat, and twist-boat conformations, respectively. The conformation of the seven-membered ring A (C1—C2—C3—O1—C4—C5—C10) is highly distorted resembling none of the symmetrical forms and can be described as a composition of the boat and twist-boat forms, mainly. These conformations and

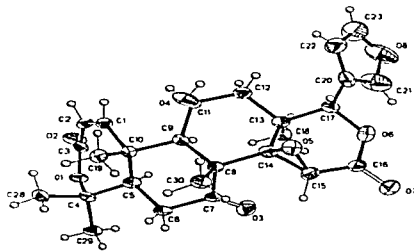


Fig. 1. ORTEP view of 11 β -hydroxyobacunone (zapoterin), thermal ellipsoids at 30% probability level.

Table 3. Geometric Parameters

Bond Lengths (Å)			
O1—C3	1.343(10)	O1—C4	1.514(8)
O2—C3	1.239(10)	O3—C7	1.211(10)
O4—C11	1.417(10)	O5—C15	1.444(11)
O5—C14	1.466(9)	O6—C16	1.335(12)
O6—C17	1.451(10)	O7—C16	1.211(11)
O8—C21	1.361(17)	O8—C23	1.39(2)
C1—C2	1.339(11)	C1—C10	1.517(10)
C2—C3	1.425(12)	C4—C29	1.518(11)
C4—C28	1.534(11)	C4—C5	1.548(10)
C5—C6	1.541(10)	C5—C10	1.558(10)
C6—C7	1.532(11)	C7—C8	1.525(9)
C8—C14	1.555(10)	C8—C30	1.555(10)
C8—C9	1.582(9)	C9—C11	1.547(9)
C9—C10	1.568(9)	C10—C19	1.561(10)
C11—C12	1.535(10)	C12—C13	1.562(11)
C13—C14	1.522(10)	C13—C18	1.537(11)
C13—C17	1.578(11)	C14—C15	1.472(11)
C15—C16	1.483(14)	C17—C20	1.514(13)
C20—C21	1.326(16)	C20—C22	1.371(17)
C22—C23	1.317(19)		
Bond Angles(°)			
C3—O1—C4	125.3(6)	C15—O5—C14	60.7(5)
C16—O6—C17	120.1(7)	C21—O8—C23	104.9(11)
C2—O1—C4	130.4(7)	C1—O2—C3	133.5(7)
O2—C3—O1	113.3(7)	O2—C3—C2	121.2(8)
O1—C3—C2	25.3(7)	O3—C7—C29	99.5(29)
O1—C4—C28	106.8(6)	O3—C4—C28	109.7(7)
O1—C4—C5	107.7(5)	O3—C4—C5	113.7(6)
C28—C4—C5	117.7(6)	C6—C5—C4	112.1(6)
C6—C5—C10	111.4(6)	C4—C5—C10	118.6(6)
C7—C6—C5	123.3(6)	O4—C7—C8	123.2(7)
O3—C7—C6	121.6(6)	C8—C7—C6	115.0(6)
C7—C8—C14	111.8(6)	C7—C8—C30	105.8(6)
C14—C8—C30	108.0(6)	C7—C8—C9	103.8(5)
C14—C8—C9	109.7(6)	C30—C8—C9	117.7(6)
C11—C9—C10	119.9(6)	C11—C9—C8	110.5(5)
C10—C9—C8	115.2(6)	C11—C9—C5	110.9(6)
C5—C10—C19	104.3(6)	C5—C10—C19	116.6(6)
C1—C10—C9	106.8(6)	C5—C10—C9	105.5(6)
C19—C10—C9	112.4(6)	O4—C11—C12	112.5(6)
O4—C11—C9	109.0(6)	C12—C11—C9	110.7(6)
C11—C12—C13	116.8(6)	C14—C13—C18	110.3(6)
C14—C13—C12	109.4(6)	C18—C13—C12	112.1(7)
C12—C13—C17	107.4(6)	C18—C13—C17	109.9(6)
C12—C13—C11	107.6(6)	O5—C14—C15	58.9(5)
O5—C14—C8	112.2(6)	C15—C14—C13	116.0(7)
O5—C14—C3	114.7(6)	C15—C14—C8	120.0(7)
C13—C14—C8	119.5(6)	O5—C15—C14	60.4(5)
O5—C15—C16	116.9(7)	C14—C15—C16	118.5(8)
O7—C16—O6	117.9(10)	O7—C16—C15	123.1(9)
O6—C16—C15	118.9(7)	O6—C17—C20	106.0(7)
O6—C17—C13	109.8(6)	C20—C17—C13	114.7(7)
C21—C20—C22	105.4(12)	C21—C20—C17	126.6(11)
C22—C20—C17	128.0(10)	C20—C21—O8	111.4(13)
C23—C22—C20	110.1(14)	C23—C23—O8	108.0(13)

Table 4. Cremer and Pople Parameters⁹

Ring	A	B	C	D
θ , (°)	—	6.0(8)	84.1(6)	110.3(3)
ϕ_1 , (°)	69.9(8)	251(7)	82.9(7)	93.5(9)
ϕ_2 , (°)	129.5(11)	—	—	—
Q_2 , (Å)	0.564(8)	0.061(8)	0.705(8)	0.526(9)
Q_3 , (Å)	0.385(8)	0.596(8)	0.073(8)	0.195(9)
Q_T , (Å)	0.683(8)	0.600(8)	0.709(8)	0.561(9)

the *trans* ring junctions A/B, B/C, and C/D give zwitterin an overall conformation very similar to that observed in gedunin,¹⁰ approaching the 11 α -hydrogen to the H1 vinyl hydrogen close enough (2.02 Å) to give the nuclear Overhauser effect observed by Moss *et al.*⁴.

In the crystal, molecules form infinite ribbons along the b axis by hydrogen bonding [H4...O2 (-x + 1, y + 1/2, -z + 2): 2.13(12) Å, O4...O2

(-x + 1, y + 1/2, -z + 2): 2.831(8)  ) between the hydroxyl group and the carbonyl group of the seven-member lactone.

References

1. Kinel, F. A.; Romo, J.; Rosenkranz, G.; Sundheimer, F. *J. Chem. Soc.* 1956, 4163.
2. Murphy, J. W.; Toube, T. P.; Cross, A. D. *Tetrahedron Lett.* 1968, 5153.
3. Dreyer, D. L. *J. Org. Chem.* 1968, 33, 3577.
4. Moss, G. F.; Toube, T. P.; Murphy, J. W. *J. Chem. Soc.(C)* 1970, 694.
5. Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *J. Appl. Cryst.* 1999, 32, 115.
6. Sheldrick, G. M. *SHELXL97. Program for Refinement of Crystal Structures*, University of Göttingen, Germany, 1997.
7. Taylor, D. A. H. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Hertz, W.; Grisenbach, H.; Kirby, G. W., Eds.; Springer Verlag: New York, 1984; Vol. 45, p 1.
8. Flack, H. D. *Acta Crystallogr.* 1983, A39, 876.
9. Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 1354.
10. Toscano, R. A.; Mata, R.; Calder n, J.; Segura, R. *J. Chem. Crystallogr.* 1996, 26, 707.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. CASIMIROIN, ZAPOTERIN, ZAPOTIN AND
5,6,2',3',4'-PENTAMETHOXYFLAVONE FROM *Casimiroa*
pubescens

CASIMIROIN, ZAPOTERIN, ZAPOTIN AND 5,6,2',3',4'-
PENTAMETHOXYFLAVONE FROM *Casimiroa pubescens*

Aída N. García-Argáez^a, Nadia M. González-Lugo^b, Hortensia Parra-Delgado^b,
Mariano Martínez-Vázquez^{b*}

^aDepartamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. ^bInstituto de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad
Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F.

* Corresponding author. Tel: + (52) 56224403; Fax: + (52) 56162203

E-mail address: marvaz@servidor.unam.mx

Keywords: *Casimiroa pubescens*, flavones, 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone

1. Subject and source

The genus *Casimiroa* Llave et Lex. (Rutaceae) comprises approximately 9 species (Chiang, 1989) and grows specially on the tropical and subtropical areas of Central America and Mexico. Seeds of *C. pubescens* Ram. were collected in June 2000 at Ixmiquilpan, Hidalgo close to Cardonalito Town. A voucher specimen (84833) was deposited at the Herbarium of Facultad de Ciencias (FCME, Universidad Nacional Autónoma de México).

2. Previous work

Previous phytochemical studies on *Casimiroa* have shown the presence of flavones, coumarins and limonoids (Rizvi et al., 1985, Enríquez, et al., 1984, Romero et al., 1983). Within the flavones, the 5,6 di-substituted pattern is quite often found in the genus (Dreyer, 1968, Domínguez et al., 1976, Meyer et al., 1985). Nevertheless, to our knowledge, this is the first phytochemical study on *C. pubescens*.

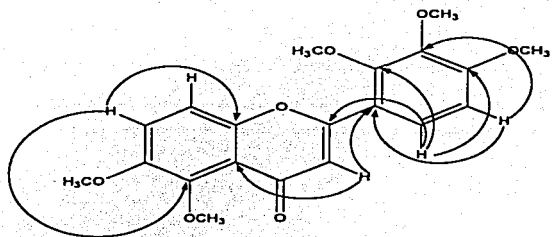
3. Present study

Fractionation of the EtOAc extract (48.9 g) of dried and milled seeds of *C. pubescens* (1173 g) was carried out by means of VLC (silica gel, step gradient of hexane in EtOAc). Fractions eluted with 7:3 mixtures yielded 6 mg of zapotin (5,6,2',6'-tetramethoxyflavone), while 16 mg of the alkaloid casimiroin and 82.3 mg of 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone were isolated from the fractions eluted with 3:7 mixtures. Finally 7.2 mg of the limonoide zapoterin were isolated from the fractions eluted with EtOAc.

All compounds were identified by comparison of their ^1H and ^{13}C NMR spectra with the data reported in literature (Dreyer, 1968; Rizvi et al., 1985; García-Argáez et al., 2000; Parveen and Khan, 1987). Although 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone was identified by means of spectral data, we wanted to report now their ^{13}C -NMR data as well as the results of HETCOR and COLOC experiments.

^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 178.4 (C-4), 160.6 (C-2), 156.5 (C-4'), 153.3 (C-2'), 151.7 (C-9), 149.9 (C-6), 147.8 (C-5), 142.7 (C-3'), 124.2 (C-6'), 119.3 (C-7), 118.9 (C-10), 118.5 (C-1'), 113.3 (C-8), 110.9 (C-3), 107.4 (C-5'), 62.0 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_3$), 61.3 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_6$), 61.0 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_4$), 57.2 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_2$), 56.2 ($\text{CH}_3\text{-O-C}_5$).

Heteronuclear correlation $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ δ (ppm). 124.2/7.51, 119.3/7.30, 113.3/7.25, 110.9/6.84, 107.4/6.79, 62.0/3.91, 61.3/3.93, 61.0/3.94, 57.2/3.95, 56.2/3.98.



Correlations determined by COLOC experiments for 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. Chemotaxonomic significance

Although only the species *C. edulis* and *C. greggii* (formerly *Sargentia greggii*) from the genus *Casimiroa* have previously been studied phytochemically; the presence of 5,6-disubstituted flavone-type products is constant, for example zapotin and zapotinin both with a 5,6,2',6'-tetrahydroxyflavone nucleus were isolated from *C. edulis* (Dreyer, 1968). Compounds with a 5,6,2'-trimethoxyflavone nucleus such as cerrosillin, cerrosilin B, and 5,6,2',4',5',6'-hexamethoxyflavone have been isolated from *C. greggii* (Meyer et. al, 1985). The presence of zapotin and 5,6,2',3',4'-pentamethoxyflavone in *C. pubescens* is in total agreement with previous studies of species from this genus.

Furthermore, it seems that this kind of flavonoid is a chemical characteristic of the genus.

5.- Acknowledgements

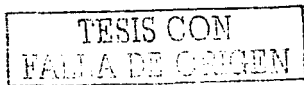
We are indebted to Héctor Ríos, Rocío Patiño, Luis Velasco, Javier Pérez and Gabriela Salcedo for technical assistance. Partial financial support from CONACYT (34992-N) and scholarship to A. N. G. A. from PASPA, DGAPA, UNAM is acknowledged.

6.- References.

1. Rizvi, S.H., Kapil, R.S., Shoe, A., 1985. *J. Nat. Prod.* 48, 146.
2. Enríquez, R.G., Romero, M.L., Escobar, L.I., Joseph-Nathan, P., Reynolds, W.F., 1984. *J. Chrom.* 287, 209.
3. Romero, M.L., Escobar, L.I., Lozoya, X., Enríquez, R.G., 1983. *J. Chrom.* 281, 245.
4. Dreyer, D.L., 1968. *J. Org. Chem.* 33, 3577.
5. Domínguez, X.A., Villegas, D., 1976. *Rev. Latinoamer. Quim.* 7, 45.
6. Meyer, B.N., Wall, M.E., Wani, M.C., Taylor, H.L., 1985. *J. Nat. Prod.* 48, 952.
7. García-Argáez, A., Toscano, R., Martínez-Vázquez, M., 2000. *J. Chem. Cryst.* 30, 727.
8. Parveen, M., Khan, N.U., 1987. *Indian J. Chem., Sect. B.* 26, 894.
9. Sondheimer, F., Meisels, A., 1960. *Tetrahedron.* 9, 139.
10. Chiang, F. 2001. Flora de Nicaragua. In: Stevens, W.D., Ulloa, O., Pool, A., Montiel, O.M. (Eds.), *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.* 85, III, 2289.

11. Domínguez, X.A., Rodríguez, V., Villegas, A.D., Rojas, P., 1972.

Phytochemistry, 11, 2648.



VIII. PUBESAMIDES A, B AND C, THREE NEW N-BENZOYLTYRAMIDE DERIVATIVES ISOLATED FROM *Casimiroa pubescens*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PUBESAMIDES A, B, AND C. THREE NEW N-BENZOYLTYRAMIDE
DERIVATIVES ISOLATED FROM *Casimiroa pubescens*.

AÍDA N. GARCÍA-ARGÁEZ*, NADIA M. GONZÁLEZ-LUGO^b, HORTENSIA
PARRA-DELGADO^b AND MARIANO MARTÍNEZ-VÁZQUEZ^b.

* Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito
Exterior, Coyoacán, 04510, México, D. F. ^b Instituto de Química, Universidad
Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior,
Coyoacán, 04510, México, D. F.

Running title: Pubesamides A, B, and C from *Casimiroa pubescens*

* Author for correspondence and reprints requests

Abstract

Three new N-benzoyltyramides derivatives named pubesamides A, B and C together with the known skimmianine, β -sitosterol and daucosterol were isolated from seeds of *C. pubescens*. Their structures were determined by spectroscopic data.

Key Words- *Casimiroa pubescens*, N-benzoyltyramides, pubesamides A, B, and C.

Introduction

The small genus *Casimiroa* Llave et Lex. (Rutaceae) comprises only 9 species (Chiang, 1989) and grows especially on the tropical and subtropical areas of Central America and Mexico. Previous phytochemical studies on *Casimiroa* have shown the presence of flavones, coumarins and limonoids (Rizvi, *et al.*, 1985, Enríquez, *et al.*, 1989, Romero, *et al.*, 1983). Within the flavones, the 5,6 di-substituted pattern is quite often found in the genus (Dreyer, 1968, Domínguez, *et al.*, 1976, Meyer, *et al.*, 1985). Due to its pleasant flavour *C. edulis* is cultivated and sold in several markets of Central México. It has been known since prehispanic times for its interesting sedative-like effect and its use as a sleep inducer (Romero, *et al.*, 1983). In folk medicine, a concoction of leaves, and less frequently of seeds, is administered for this purpose. Furthermore, the seeds are used in the treatment of dermatological conditions (Martínez, 1944).

As part of our ongoing investigation on biologically active compounds from Mexican plants (Martínez-Vázquez and García-Argáez, 2001) and especially from *Casimiroa* genus (García-Argáez, *et al.*, 2000), we have studied the seeds of *Casimiroa pubescens* (Rutaceae). To our knowledge this is the first phytochemical study on *C. pubescens*.

Results and Discussion

From the EtOAc extract of *C. pubescens* seeds, pubesamides A (1), C

(3), and a mixture of 1 and pubesamide B (2) were isolated. On the other hand, skimmianine and β -sitosterol were isolated from the hexanic extract and daucosterol and a mixture of 1 and 2 were isolated from the methanolic extract.

The presence of a N-benzoyltyramide core in 1, 2, and 3 was easily deduced by means of their IR absorptions due to a secondary amide (NH and CO), as well as their ^1H - and ^{13}C NMR spectra (Tables I and II) and MS spectral data. Then, the structural differences between 1-3 underlie in the alkyl residue of the side chain on the oxygen atom of the 1, 4-disubstituted benzene ring of the N-benzoyltyramide nucleus.

The high resolution mass spectrum of pubesamide (1), showed its $[\text{M}]^+$ at 391.2220 for a $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{N}$ formula. The peaks at m/z 135, 120 and 105 were attributed to the N-benzoyltyramide residue. The presence of a oxymonoterpene moiety ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}$) in the side chain was indicated by the mass difference between 1 and the N-benzoyltyramide moiety. It contains an isobutylidene moiety at the end of monoterpene residue (C-17/C-20), conjugated to a carbonyl group at C-16 as deduced by their signals in the ^1H - and ^{13}C NMR spectra [δ ^1H : 1.88 s (3H) H-19; 2.17, s, (3H), H-20 and 6.13 brs (1H) H-17; δ ^{13}C : 27.8, C-19; 20.6, C-20; 127.4 C-17; 153.0, C-18 and 191.4, C-16] and by the fragment at m/z 83 in the MS spectrum. Also the presence of a vinylic methyl group at C-21 and a methylene residue at C-13,

both linked to a trisubstituted double bond at C-14/ C-15, conjugated with the carbonyl group at C-16 was deduced [δ ^1H : 2.22 s (3H), H-21; 6.08 s (1H), H-15; 2.59 t J = 7.1 (2H), H-13; δ ^{13}C : 19.3, C-21; 126.2, C-15; 154.9, C-14 and 40.6, C-13]. Finally the presence of an oxymethylene moiety at C-12 vicinal to the vinylic methylene at C-13 was observed [δ ^1H 4.09 t J = 7.1 (2H), δ ^{13}C 65.9]. All the assignments were supported by HETCOR and COSY experiments. The stereochemistry Z of the double bond at C-14/C-15 in **1** was deduced by NOESY and COLOC experiments.

A detailed analysis of the NMR spectral data, IR adsorptions and MS fragmentations of the mixture of **1** and **2**, clearly showed a Z, E isomeric relationship between them at C-14/C-15 double bond. Then **2** correspond to be the E isomer (Tables I and II).

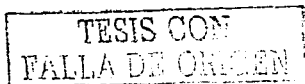
An additional experimental support for the structural proposal of **1** and **2** was the spontaneously transformation, during the time of acquisition of NMR data (approximately 10 h), of **1** to a mixture of **1** and **2** with a proportion of 1:1, estimate from the integration values of the methyl group signal at C-21 in the ^1H -NMR spectrum. Thus, the less stable isomer **1Z** (heat of formation - 55.14265 Kcal/mole, determined by MOPAC calculations) is transformed into the more stable isomer **2E** (heat of formation -57.28074 Kcal/mole, determined by MOPAC calculations), probably this transformation is due to the acidity of CDCl₃. Accordingly **2** could be an artifact produced during the

chromatographic procedures.

When **1** and **2** mixture was treated with hydrogen in presence of PtO₂, tetrahydro púbesamide A (**4**) was obtained. Also **4** was obtained from hydrogenation reaction of **1**.

As expected, the high-resolution mass spectrum of **4** showed four hydrogen atoms more than **1** ($[M]^+$ at 395.2537 for a C₂₅H₃₃O₃N formula). The only difference between **4** and **1** is found in the monoterpene side chain. (Tables I and II). Thus, the ¹³C NMR spectrum of **4** revealed the signals for: three methyl, four methylene and two methine atom carbons in the sp³ region and at δ 210.4 ppm the signal for the carbonyl at C-16. The correlation between the signals of ¹H and ¹³C NMR spectra of **4** are shown in Table III.

The high-resolution mass spectrum of **3** showed its $[M]^+$ at 393.2333 for a C₂₅H₃₁O₃N formula. The presence of an unsaturated monoterpene moiety (C₁₀H₁₇O) in the side chain was indicated by the mass difference between **1** and the N-benzoyltyramide residue. As, in **1** and **2**, the presence of an isobutyridene moiety at the end of the monoterpene residue in **3** was evident (Tables I and II). The presence of an additional double bond at C-15/C-16 conjugated to the isobutyridene moiety was deduced by the signals in the ¹H and ¹³C NMR spectra [δ ¹H: 5.63, d, J=15, H-15; 6.52, dd, J=11, 15, H-16; 5.82, d, J=11, H-17; δ ¹³C: 136.6, C-15; 124.5, C-16; 124.3, C-17]. The presence of a hydroxyl group and a methyl group at C-14 was deduced by



their signals in the ^1H and ^{13}C NMR spectra [$\delta^1\text{H}$: 1.37 s, (3H), H-21; $\delta^{13}\text{C}$: 29.0 C-21; 72.7, C-14] and the signals at 40.9 and 65.4 were assigned to the methylene groups at C-13 and C-12 respectively. All the assignments were supported by COSY, HETCOR and COLOC experiments. During the time of acquisition of NMR data (approximately 10 h), **3** suffered not a isomerization as **1**, but hydrolysis reaction to afford N-benzoyltiramide. As it can be seen, N-benzoyltiramides derivatives **1-3** are sensitive to mild acidic conditions. The presence of N-benzoyltiramide was also detected in a hexanic extract of *C. edulis*. However, this extract was previously treated with an aqueous solution of HCl (Kincl, *et al.*, 1956). Then, according with our results, it is quit probably that in *C. edulis* compounds similar to **1-3** were present.

Experimental

Plant material. Seeds of *C. pubescens* were collected from plants growing in the surroundings of Ixmiquilpan Hidalgo, México. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Facultad de Ciencias UNAM (FCME 84833).

Dried and milled seeds (3834 g) were extracted with hexane, EtOAc and MeOH successively (51 x 3 times, each) at room temperature for 48 h.

The hexanic extract (62.53 g, residue dry weight) was absorbed on 4 g of silica gel and then chromatographed on a column packed with 130 g of silica

gel 60 (Merck). Elution with solvent mixtures of increasing polarity afforded β -sitosterol (35 mg, Hex:EtOAc, 9:1) (Rubinstein *et al.*, 1976), isopimpinellin (29 mg, Hex:EtOAc, 6:4) (Elgamal *et al.*, 1979) and skimmianine (82 mg, EtOAc:MeOH, 7:3) (Chakravarty *et al.*, 1999). Chromatography of the EtOAc extract (181.5 g) absorbed on 6 g of silice gel and using 370 g of silice gel afforded pubesamide A (1) (20 mg, Hex:EtOAc, 7:3), mixture of pubesamide A (1) and B (2) (297 mg, Hex:EtOAc, 6:4) and pubesamide C (3) (52 mg, Hex:EtOAc, 3:7). Mixture of 1 and 2 (108 mg, Hex:EtOAc, 7:3) and daucosterol (12 mg, EtOAc:MeOH, 8:2) (Voutquenne, *et al.*, 1999) were isolated from the methanolic extract (61.2 g) chromatography.

The identification of the known compounds was achieved by comparison of their physical and spectroscopic data with those published in the literature.

Pubesamide A (1).

Yellow solid mp 88-91°C HRMS: m/z : 391.2220 (rel int.) ($[M]^+$, calcd for $C_{25}H_{29}O_3N$: 391.2226). MS m/z : (rel int.) 391 ($[M]^+$) (15), 254 (6), 151 (100), 135 (16), 120 (44), 105 (47), 83 (86), 77 (16). UV λ max nm (CHCl₃) 269 (log ϵ = 4.38) IR (KBr) ν max cm^{-1} 3452, 1657, 1513, 1030. ¹H, ¹³C NMR see tables I and II.

Mixture of pubesamides A(1) and B(2).

Yellow solid mp 89-92°C. MS m/z : (rel int.) 391 ($[M]^+$) (5), 295 (10), 271 (8),

257 (2), 254 (5), 151 (100), 137 (11), 134 (6), 123 (12), 120 (43), 105 (60), 83 (86), 77 (22), 55 (13), 43 (8). IR (KBr) ν max cm^{-1} 3317, 1634, 1537, 1242. ^1H , ^{13}C NMR see tables I and II.

Pubesamide C (3).

Yellowish solid mp 83-84°C HRMS: m/z : 393.2333 ($[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$: (393.2304). MS m/z : (rel. int.) 393 ($[\text{M}^+]$) (6), 375 (30), 272 (8), 254 (94), 232 (16), 202 (14), 193 (30), 168 (76), 166 (98), 135 (100), 120 (68), 105 (89), 93 (42), 77 (37), 55 (20). UV λ max nm (MeOH) 230 ($\log \epsilon = 4.52$) and 202 ($\log \epsilon = 4.37$) IR (KBr) ν max cm^{-1} 3455, 1655, 1512, 1486 and 1286. ^1H , ^{13}C NMR see tables I and II

Tetrahydropubesamide A (4)

From 1 and 2 mixture. A sample of the 1 and 2 mixture (70 mg) dissolved in CH_2Cl_2 was treated with hydrogen in presence of PtO_2 (7 mg). The reaction mixture was separated by PLC eluted with hexane-EtOAc, 3:2 mixtures, affording 4 (60 mg).

From 1. A sample of 1 (20 mg) dissolved in CH_2Cl_2 was treated with hydrogen in presence of PtO_2 (7 mg). Usual work up yielded 4 (16 mg).

White crystals mp 78-80°C, HRMS: m/z 395.2537 ($[\text{M}]^+$, calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_3\text{N}$: 395.2539). MS m/z : (rel int.) 395 ($[\text{M}^+]$) (5), 274 (13), 155 (100),

120 (10), 105 (26), 57 (23).). UV λ max nm (CHCl₃) 251 (log ϵ =3.62) IR (KBr) ν max cm⁻¹: 3314, 2930, 1705, 1636, 1539, 1513, 1244. ¹H, ¹³C NMR see tables I and II

Acknowledgements

We are indebted to Héctor Ríos, Nieves Zavala, Rocío Patiño, Javier Pérez, Luis Velasco and Gabriela Salcedo for technical assistance. Partial financial support from CONACYT (34992-N) is acknowledged.

References

- Chakravarty A. K., Sarkar T., Masuda K. and Shiojima K. (1999), Carbazole alkaloids from roots of *Glycosmis arborea*, *Phytochemistry*, **50**, 1263-1266.
- Dreyer D. L. (1968), Citrus bitter principles. IX. Extractives of *Casimiroa edulis*. Structure of zapoterin, *J. Org. Chem.* **33**, 3577-3582.
- Domínguez X. A. (1976), Estructura de la Cerrosillina B (5,6,3',4',5'-pentametoxiflavona) aislada de las hojas del chapote amarillo (*Sargentia greggii*). *Rev. Latinoamer. de Quím.* **7**, 45-46.
- Elgamal M. H. A., Elwa N. H., Elkhriy E. A. M. and Duddeck H. (1979), ¹³C NMR Chemical shifts and carbon-proton coupling constants of some

furocoumarins and furochromones, *Phytochemistry*. **18**, 139-143.

Enríquez R., Romero M. Escobar L., Joseph-Nathan, P., Reynolds W. (1984), High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. II. Determination of furanocoumarins, *Journal of Chromatography*. **287**, 209-214.

García-Argáez A. N., Ramírez Apán, T. O., Parra Delgado H., Velázquez G., Martínez-Vázquez M. (2000). Anti-inflammatory Activity of Coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA Ear Mice Model, *Planta Medica*. **66**, 279-281.

García-Argáez A. N., Toscano A. R., Martínez-Vázquez M. (2001). 11- β -hydroxyobacunone (Zapoterin), *Journal of Chemical Crystallography*. **11**, 727-730.

Kincl F. A., Romo J., Rosenkranz G. and Sondheimer. (1956). The constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex., Part I, The seed, *Journal of Chemical Society*. 4163-4169.

Martínez M. (1944), *Las plantas medicinales de México*, Ed. Botas, México.

Meyer B. N., Wall M. E., Wani M. C., Taylor H. L. (1985). Plant antitumor agents, 21. Flavones, coumarins and an alkaloid from *Sargentia greggii*, *Journal of Natural Products*, **48** (6) 952-956.

MOPAC, CS program. Cambridge Soft Corporation, 1985-2000.

Rizvi S. H., Kaph R. S. and Shoeb A. (1985). Alkaloids and coumarins of

Casimiroa edulis, Journal of Natural Products, 48 (1) 146.

Romero M., Escobar L., Lozoya X., Enríquez R. (1983). High performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. Journal of Chromatography, 281, 245-251.

Rubinstein I. Goad L. J., Clague A. D. H. and Mulheirn L. J. (1976). The 220 Mhz NMR Spectra of phytosterols, Phytochemistry, 15, 195-200.

Voutquenne L., Lavaud, Massiot G., Sevenet T. and Hadi A. H. (1999). Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*, Phytochemistry, 50, 63-69.

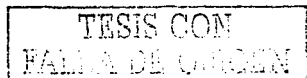


Table I. ^1H NMR spectral data of 1-4

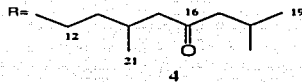
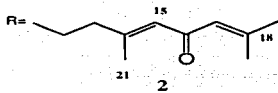
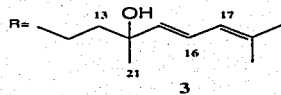
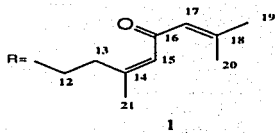
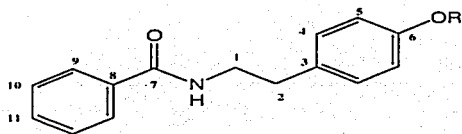
H	1	2	3	4
1	3.69 (t, J = 6.9)	3.69 (t, J = 6.9)	3.67 (t, J = 6.9)	3.69 (t, J = 6.9)
2	2.87 (t, J = 6.9)	2.86 (t, J = 6.9)	2.86 (t, J = 6.9)	2.87 (t, J = 6.9)
4	7.14 (d, J = 8.7)	7.13 (d, J = 8.7)	7.14 (d, J = 8.7)	7.15 (d, J = 8.7)
5	6.85 (d, J = 8.7)	6.86 (d, J = 8.7)	6.85 (d, J = 8.7)	6.85 (d, J = 8.7)
9	7.69 (brd)	7.68 (brd)	7.68 (brd)	7.69 (brd)
10	7.45 m	7.45 m	7.41 m	7.38 m
11	7.38 m	7.41 m	7.47 m	7.45 m
12	4.09 (t, J = 7.1)	4.16 (t, J = 6.6)	4.12 m	3.97 (t, J = 6.9)
13a	2.59 (t, J = 7.1)	3.06 (t, J = 6.6)	2.14 (dd, J = 15, 6)	1.78 m
13b	*	*	1.97 (dd, J = 15, 8)	1.67 m
14	*	*	*	2.26 m
15	6.08 (brs)	6.08 m	5.63 (d, J = 15)	2.41 m
16	*	*	6.52 (dd, J = 11, 15)	*
17	6.13 (brs)	6.13 m	5.82 (d, J = 11)	2.26 m
18	*	*	*	2.15 (hep, J = 6)
19	1.88 s	1.89 s	1.73 s	0.90 (d, J = 6)
20	2.17 s	2.15 s	1.76 s	0.91 (d, J = 6)
21	2.22 s	2.01 s	1.37 s	0.97 (d, J = 6)

Table II. ^{13}C NMR spectral data of 1-4.

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

Table III. HETCOR correlation of 1, 3-4.

1	3	4
19.3/2.22	18.3/1.73	19.9/0.97
20.6/2.17	26.0/1.76	22.6/0.90 and 0.91
27.8/1.88	29.0/1.37	24.5/2.15
34.8/2.87	34.8/2.86	26.4/2.26
40.6/2.59	40.9/2.14 and 1.97	34.8/2.87
41.3/3.69	41.3/3.67	36.0/1.78 and 1.67
65.9/4.09	65.4/4.12	41.2/3.69
114.9/6.85	114.9/6.85	50.6/2.41
126.2/6.08	124.3/5.82	52.3/2.26
126.8/7.68	124.5/6.52	66.0/3.97
127.4/5.63	126.8/7.68	114.7/6.85
128.5/7.45	128.5/7.41	126.8/7.69
129.8/7.14	129.8/7.14	128.5/7.45
131.4/7.38	131.4/7.47	129.7/7.15
	136.6/5.63	131.6/7.38



IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de los estudios fitoquímicos de *C. edulis*, *C. sapota*, *C. pubescens* y *C. greggii* realizados en este trabajo, así como los previamente informados en la literatura, es innegable que la química del género *Casimiroa* esta gobernada por la síntesis y presencia de limonoides, cumarinas, flavonoides y alcaloides.

La obtención de zapoterina, un limonoide, en forma cristalina a partir de las semillas de *C. edulis*, permitió la obtención de su estructura molecular por análisis de difracción de Rayos X; de tal manera que se pudo establecer inequívocamente la posición del sustituyente hidroxilo en la molécula. Este compuesto también se aisló de semillas de *C. pubescens*.

La presencia de zapotina y la 5,6,2',3'.4' pentametoxiflavona en *C. pubescens* junto con los informes en la literatura sobre las flavonas presentes en *C. edulis*, *C. pringlei* y en *C. greggii* tales como zapotina, zapotinina, 5,6-dimetoxiflavona, cerrosillina y cerrosillina B, entre otras, indican una presencia recurrente, en el género, de flavonas con núcleos 5,6-disustituídos.

En un principio, se podría catalogar como singular el aislamiento a partir de *C. pubescens* de tres derivados prenilados de la N-benzoiltiramida, las llamadas pubesamidas A, B y C, sin embargo, en un trabajo publicado en 1956 se informaba del aislamiento y caracterización de la N-benzoiltiramida a partir de un extracto hexánico de *C. edulis*. Debido a que el interés de los

investigadores, en esa ocasión, era la búsqueda de posibles alcaloides, el extracto hexánico antes referido fue lavado con una solución acuosa de ácido clorhídrico. De acuerdo con los datos proporcionados en este trabajo, las pubesamidas son extremadamente sensibles al medio ácido, de tal forma que inclusive pueden sufrir transposiciones o hidrólisis por la acidez del cloroformo deuterado utilizado en la adquisición de los datos espectrales de resonancia. Por lo tanto es factible suponer que *C. edulis* también sintetizara este tipo de compuestos, los cuales, debido al tratamiento con ácido, se destruyeron o se hidrolizaron para dar la N-benzoiltiramida.

No obstante para proponer a este tipo de compuestos como relevantes en la química del género *Casimiroa*, es necesario realizar su búsqueda cuidadosa en las demás especies del género.

Por otro lado, en el presente estudio se determinó la presencia y la concentración de las cumarinas heraclenol, heraclenina, felopterina e isopimpinellina en hojas de *C. sapota*, *C. edulis*, *C. pubescens*, *C. calderoniae* y en semillas de las últimas tres especies; además, de semillas de *C. calderoniae* se aislaron isopimpinellina y felopterina y de semillas de *C. pubescens* se aislaron isopimpinellina y 8-geraniloxipsoraleno. Lo que indiscutiblemente, señala a las cumarinas como quimiomarcadores del género, ya que hasta el momento todas las especies estudiadas presentan este tipo de compuestos.

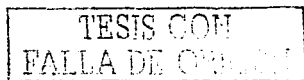
Estos hallazgos, así como los informes en la literatura de las cumarinas

aisladas de *Casimiroa*, apoyan la propuesta biogenética para este tipo de compuestos. La cual propone a la umbeliferona como el intermediario inicial, ya que todas ellas se postulan formadas a partir de este intermediario. Sin embargo existe una diferencia entre las cumarinas sintetizadas por *C. greggii* y las especies *C. edulis*, *C. calderoniae* y *C. pubescens*: *Casimiroa greggii* elabora la seselina y el O-geranilostenol, ambos compuestos provenientes de la umbeliferona prenilada en el átomo de carbono 8, mientras que las cumarinas sintetizadas por las demás especies elaboran principalmente furanocumarinas las que provienen de la prenilación en el átomo de carbono C-6 de la umbeliferona. Lo que puede constituir una diferencia interespecífica.

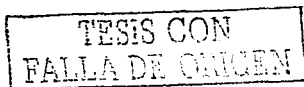
Como se ha mencionado, las especies *C. edulis* y *C. sapota* presentaban una situación taxonómica confusa. Lo que motivo a que se utilizaran tanto datos químicos como caracteres morfológicos para su concreta delimitación. De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo la concentración de las cumarinas heraclenol, isopimpinellina, heraclenina y felopterina en hojas de *C. pubescens*, *C. edulis*, *C. calderoniae* y *C. sapota* junto con los caracteres morfológicos de los folíolos, pecíolos y peciódulos, constituyeron los datos de una matriz que a través de análisis de ordenación permitieron delimitar a las cuatro especies estudiadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

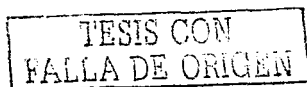
1. Martínez, M. (1951). Las Casimiroas de México y Centroamérica. *Anales del Instituto de Biología*, 22 (1) 25-81.
2. Lundell, C.L. (1968). Studies of Tropical American Plants V. *Wrightia* 4 (2) 79-96.
3. Chiang, F. y González-Medrano, F. (1981). Nueva especie de *Casimiroa* (Rutaceae) de la zona árida oaxaqueño-poblana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 41, 23-26.
4. Chiang, F. (1984). Nota sobre la ortografía correcta de *Casimiroa calderonii* Chiang et Medrano. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 46, 89.
5. Chiang, F. (1989), *Casimiroa greggii*, formerly in *Sargentia* (Rutaceae). *Taxon*, 38 (1) 116-119.
6. Martínez, M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. Editorial Botas. Quinta Edición, pp 349-355, México.
7. Standley, P.C. (1923). *Trees and Shrubs of Mexico*. Contributions from the National Herbarium Part III. (Reprint 1961). pp. 525-538.
8. Arreguín-Sánchez, M. L., Palacios-Chávez, R., Quíroz-García, D., Ramos-Zamora, D. (1986). Morfología de los granos de polen del género *Casimiroa* (Rutaceae) del Valle de México. *Phytologia*, 60 (6) 391-394.



9. Chiang, F. (2001). Casimiroa, in Stevens, W.D., Ulloa, UC., Pool, A. and Montiel, O.M. (Eds.). Flora de Nicaragua Angiospermas (Pandanaeae-Zygophyllaceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 85, III, 2289.
10. Standley, P.C. and Steyermark, J.A. (1946-1976). Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany, 24, 398-404.
11. Harborne, J.B. and Turner, B.L. (1984). *Plant Chemosystematics*. Academic Press, 562 pp, London.
12. Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press., 1262 pp. New York.
13. Erdtman, H. (1963) Some Aspects of Chemotaxonomy, in: *Chemical Plant Taxonomy*. Swain T., Ed., Academic Press, London, 89-125.
14. Sultana, N., Armstrong, J.A., Waterman, P.G. (1999). Benzopyran derivatives from the aerial parts of *Eriostemon rhomboideus*. *Phytochemistry*, 52, 895-900.
15. Seaman, C.F. (1982). Sesquiterpene Lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*. 48, 121-692.
16. Hegnauer, R. (1964). *Chemotaxonomie der Pflanzen III*. Birkhauser Verlag. 174-239 pp



17. Cronquist, A. (1988). *The evaluation and classification of flowering plants*. Allen Press, Inc., N.Y., 535 pp.
18. Norbdy, H.E., Nagy, S. (1977). Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Citrus* peels. *Phytochemistry*, **16**, 1393-1397.
19. Skorupa, L.A., Salatino, M.L.F. and Salatino, A. (1998). Hydrocarbons of leaf epicuticular waxes of *Pilocarpus* (Rutaceae): Taxonomic meaning. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**, 655-662.
20. Whiffin, T. (1977). Volatile oils and the study of natural hybridization between *Correa aemula* and *C. reflexa* (Rutaceae). *Australian Journal. Botany.*, **25**, 291-298.
21. Albach, R.F., Redman, G. H. (1969). Composition and inheritance of flavanones in Citrus fruit. *Phytochemistry*, **8**, 127-143.
22. Grieve, C. M., Scora, R.W. (1980). Flavonoid distribution in the Aurantioideae (Rutaceae). *Systematic Botany*, **5**, 39-53.
23. Waterman, P.G. (1975). Alkaloids of the Rutaceae: Their distribution and systematic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, **3**, 149-180.
24. Dryer, D.L., Pickering, M.V., Cohan, P. (1972). Distribution of limonoids in the Rutaceae. *Phytochemistry*, **11**, 705-713.



25. Dryer, D.L. (1966). Citrus bitter principles-V. Botanical Distribution and Chemotaxonomy in the Rutaceae. *Phytochemistry*, 5, 367-378.
26. Gray, A. I., Waterman, P.G. (1978). Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry*, 17, 845-864.
27. Kinoshita, T., Wu, J-B., Ho, F-C. (1996). The isolation of a prenylcoumarin of chemotaxonomic significance from *Murraya paniculata* var. *omphalocarpa*. *Phytochemistry*, 43, 125-128.

XI. APÉNDICE

Matriz Básica de Datos de Casimiroa

Output: NTSYSpC 2.02i, (C) 1986-1998, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 4:58:24 AM

Input parameters

Read input from file: C:\My Documents\FINALTESIS\FENEFINAL\COMPLETOS\cfbdm62.nts

Format: width=9 decimals=4 Page width: 80 Field width: 9 Decimal places: 4 Page

width: 80

Comments:

Matriz Básica de datos de *Casimiroa*, Aida Nelly García Argáez

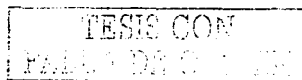
Las columnas son OTU'S y las hileras caracteres

Los OTU'S con P= *C. pubescens*, E=*C. edulis*, S= *C. sapota*, C= *C. calderoniae*

Matrix type =1, size =24 by 62, missing value code =99 (rectangular)

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	7.0000	3.0000	4.7000	3.5000	3.2000	6.0000	3.7000	4.0000
2	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
3	2.0000	0.7000	2.0000	1.1000	1.4000	2.5000	1.6000	1.2000
4	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
5	1.0000	7.0000	7.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	13.5000	6.6000	11.5000	7.7000	7.2000	13.3000	7.5000	8.6000
7	2.4500	1.8300	1.8800	1.7900	1.8400	2.1000	2.0200	1.8600
8	2.7000	2.0600	2.1600	1.8700	1.9400	2.1000	2.1400	2.0400
9	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000	4.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
13	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
17	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
18	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0100	0.0000	0.0000	0.0830	0.0000	0.0000	0.1050	0.0570
22	0.1570	0.0110	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
23	0.1450	0.4100	0.2790	0.0660	0.0320	0.0470	0.0810	0.1480
24	0.4510	0.1970	0.1550	0.0150	0.0000	0.0130	0.0240	0.0290

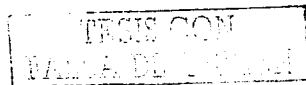
	P9	P10	P11	E1	E3	E4	E5	E6
1	5.0000	6.2000	4.8000	10.1000	10.1000	8.9000	7.5000	6.1000
2	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	1.6000	2.3000	1.5000	1.5000	1.1000	1.5000	0.7000	0.7000
4	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	1.0000	1.0000	1.0000	5.0000	3.0000	5.0000	4.0000	3.0000
6	8.5000	10.0000	9.0000	12.6000	12.8000	11.0000	10.5000	12.5000
7	2.2300	1.6000	1.8300	2.4700	1.9300	2.3400	2.2800	2.3100
8	2.2900	1.5000	2.0000	2.5200	6.0600	2.6000	2.7600	2.5000
9	4.0000	3.0000	4.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000



10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
12	0.0000	0.0000	0.0000	2.0000	2.0000	2.0000	3.0000	2.0000
13	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000
17	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0000	0.1360	0.0580	0.0640	0.0520	0.0480	0.0860	0.0780
22	0.0000	0.0000	0.0000	0.6820	0.0980	0.1530	0.5870	0.1320
23	0.2010	0.0010	0.0640	0.1140	0.3310	0.8010	0.1100	0.7440
24	0.1210	0.0590	0.0170	0.5030	0.1650	0.2430	0.2570	0.1780

	E7	E9	E11	E13	E14	E16	E17	S1
1	7.0000	7.4000	11.7000	12.0000	9.0000	8.9000	9.0000	10.3000
2	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	2.0000
3	1.0000	1.4000	2.8000	2.0000	1.7000	1.8000	1.8000	1.2000
4	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	2.0000
5	5.0000	5.0000	4.0000	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000	3.0000
6	10.5000	10.6000	13.6000	14.0000	13.0000	11.0000	13.0000	14.6000
7	2.5600	2.2000	2.8000	2.2000	2.6000	2.3400	2.6000	2.7000
8	2.7600	2.4000	2.8900	2.5900	2.6000	2.6000	2.6000	3.2000
9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	2.0000
12	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	3.0000	2.0000	3.0000	1.0000
13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0000	0.0490	0.0580	0.0360	0.0000	0.1110	0.0000	0.1200
22	0.0010	0.0290	0.0120	0.0660	0.0000	0.0000	0.0000	0.1160
23	0.1290	0.0680	0.0000	0.0330	0.1480	1.2770	0.1640	0.0620
24	0.6260	0.3170	0.0920	0.2050	0.1080	0.1130	0.3080	0.1430

	S2	E12	E2	E8	E10	E18	E26	E19
1	6.0000	12.3000	9.9000	6.4000	7.1000	8.5000	6.0000	10.0000
2	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	0.5000	1.5000	1.6000	1.0000	1.2000	1.4000	0.6000	1.0000
4	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	0.0000	3.0000	3.0000	5.0000	5.0000	5.0000	3.0000	3.0000
6	14.6000	17.5000	17.4000	13.2000	12.4000	11.0000	12.5000	12.8000
7	2.3000	2.0500	2.4800	2.6900	2.6900	2.3400	2.3100	1.8500
8	2.2400	2.5000	3.1000	3.8800	3.1800	2.6000	2.5000	6.0400
9	3.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
12	1.0000	1.0000	1.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000



13	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.4000	0.0320	99.0000	0.0190	0.0620	0.0410	0.0050	0.0000	0.0000
22	0.1880	0.0630	99.0000	0.0550	0.2790	0.1130	0.3380	0.6000	0.6000
23	0.1790	0.3200	99.0000	0.0870	0.4140	0.3620	2.2480	2.6870	2.6870
24	0.1140	0.2840	99.0000	0.0480	0.2220	1.5000	0.3390	0.3000	0.3000

	P12	E21	E22	E23	E24	E25	E29	E30
1	3.5000	10.1000	7.5000	6.1000	9.9000	10.1000	11.5000	12.3000
2	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	1.1000	1.5000	1.2000	0.7000	1.6000	1.1000	2.0000	1.0000
4	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	1.0000	5.0000	4.0000	3.0000	3.0000	3.0000	5.0000	3.0000
6	7.6000	12.6000	10.5000	12.5000	17.4000	12.8000	14.2000	14.0000
7	2.0000	2.4700	2.2800	2.3100	2.4800	1.9300	3.3800	3.5900
8	2.1000	2.5200	2.7600	2.5000	3.1000	6.0600	5.6800	4.6700
9	4.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	5.0000	5.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	2.0000	2.0000
12	0.0000	2.0000	3.0000	2.0000	1.0000	2.0000	1.0000	1.0000
13	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
17	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0000	0.0040	0.0000	0.0190	0.5630	0.0520	0.0000	0.0000
22	0.1060	0.4770	0.3000	0.2220	0.5000	0.2290	0.3430	0.0460
23	0.2290	2.1510	0.7160	0.7970	2.2320	0.9770	0.0000	0.6650
24	0.0780	3.6280	0.9680	0.0000	2.2780	2.3130	0.0680	1.2130

	C5	C6	C7	C8	C9	S3	S4	E52
1	0.5000	0.5000	0.5000	0.2000	0.5000	6.6000	4.0000	6.5000
2	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	0.0000	1.0000
3	0.3000	0.8000	0.3000	0.2000	0.3000	1.0000	0.2000	1.5000
4	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000	0.0000	1.0000
5	9.0000	9.0000	9.0000	9.0000	9.0000	1.0000	5.0000	6.0000
6	4.0000	2.8000	2.3000	2.5000	3.0000	10.3000	12.0000	11.1000
7	1.8200	1.6500	1.6400	1.6700	1.9000	2.1000	2.4000	2.6000
8	2.2000	1.8700	1.5000	1.7900	1.5800	2.3000	2.6000	3.6000
9	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	3.0000	0.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	3.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000
12	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
13	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
15	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000

TESIS COM
FALLA DE ORACION

16	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
17	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
19	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0000	0.0000	0.0000	1.3070	0.0507	0.0160	0.0000	0.0000
22	1.5420	0.2300	0.6670	2.5750	0.5220	0.1570	0.8190	0.0822
23	11.1400	7.2250	12.9500	20.9300	4.7770	0.7650	0.2580	0.6740
24	2.1120	5.3050	10.4800	23.8000	0.7890	0.0400	0.0000	0.1570

	S6	S7	S8	S9	E53	E54	E56	E57
1	5.3000	4.4000	6.5000	9.0000	7.0000	6.3000	5.9000	5.2000
2	2.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	1.0000	0.5000	0.5000	1.0000	2.0000	2.0000	1.5000	2.3000
4	2.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	5.0000	1.0000	3.0000	5.0000	1.0000	1.0000	5.0000	5.0000
6	10.7000	10.5000	15.0000	13.2000	9.5000	9.5000	11.8000	9.7000
7	2.8000	2.6000	3.0000	2.5000	3.2000	4.5000	3.7000	3.9000
8	2.8000	2.6000	3.6000	2.7000	4.5000	9.5000	5.1000	5.4000
9	5.0000	3.0000	1.0000	3.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	1.0000	2.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000	2.0000
12	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
13	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
14	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000
15	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
17	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
18	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
19	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.1200	0.2480	0.0210	0.0000	0.6680	0.0000	0.3790	0.0640
22	0.4890	0.8970	0.0770	0.1230	0.5770	0.1310	0.8890	0.2540
23	0.3160	2.3180	0.1190	2.7540	0.0930	1.7530	0.0160	0.1940
24	0.5200	29.9200	0.1580	0.5490	0.2350	1.4310	1.1110	0.1440

	E27	E41	C1	C3	C4	E55
1	4.1000	9.2000	0.2000	0.2000	0.8000	7.4000
2	1.0000	1.0000	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000
3	1.7000	1.8000	0.4000	0.3000	0.2000	1.7000
4	1.0000	1.0000	2.0000	2.0000	2.0000	1.0000
5	5.0000	3.0000	9.0000	9.0000	9.0000	5.0000
6	6.5000	16.0000	2.9000	2.5000	3.4000	9.0000
7	3.8000	2.8000	1.5000	1.3000	1.5000	3.4600
8	5.9000	4.3000	2.6000	1.7000	1.5000	4.5000
9	0.0000	5.0000	3.0000	3.0000	3.0000	0.0000
10	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	2.0000	0.0000
12	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
13	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000
14	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	1.0000	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
17	0.0000	0.0000	2.0000	2.0000	2.0000	0.0000
18	0.0000	0.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.0000

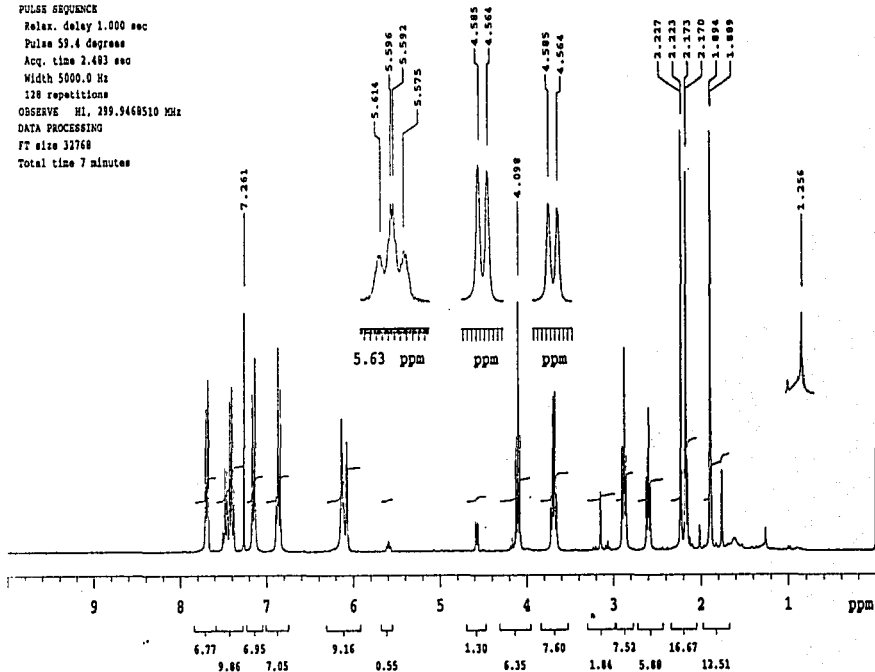
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

19	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
21	0.0000	0.0000	0.0000	0.3630	0.0000	0.0000
22	0.0000	0.0000	0.1150	0.3500	0.6380	0.2250
23	0.0000	0.4420	13.0800	2.8520	6.4850	0.3040
24	0.1310	1.1590	5.7150	0.1620	5.6980	1.6730

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

Dr. Mariano Htz.
 Mrs Aida
 CP11
 NE
 Solvent: CDCl3
 Temp. 27.0 C / 300.1 K
 UNITY-300 *up500*

PULSE SEQUENCE
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 59.4 degree
 Acq. time 2.493 sec
 Width 5000.0 Hz
 128 repetitions
 OBSERVE H1, 299.9468510 MHz
 DATA PROCESSING
 F2 size 32768
 Total time 7 minutes

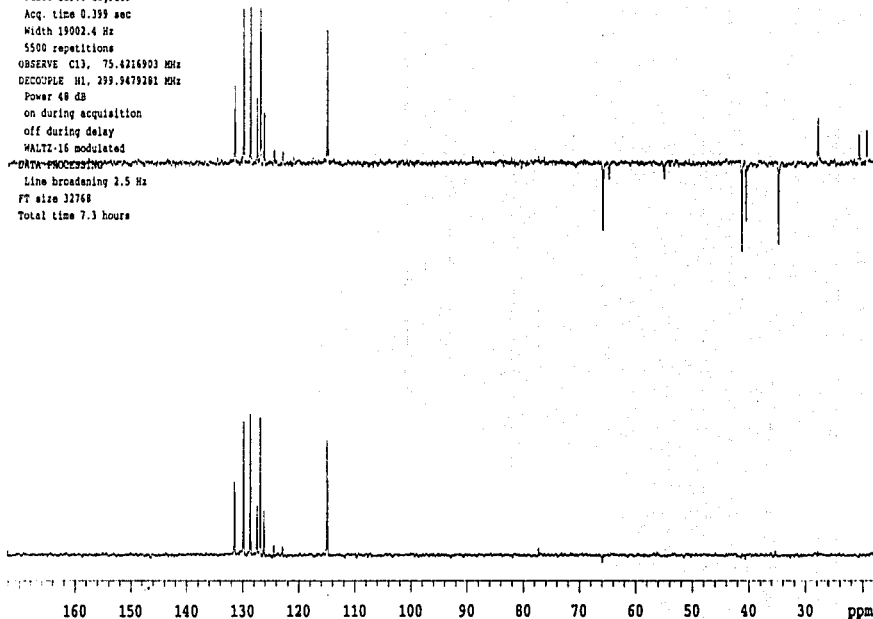


Espectro de resonancia magnética protónica de la pubesamida A

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

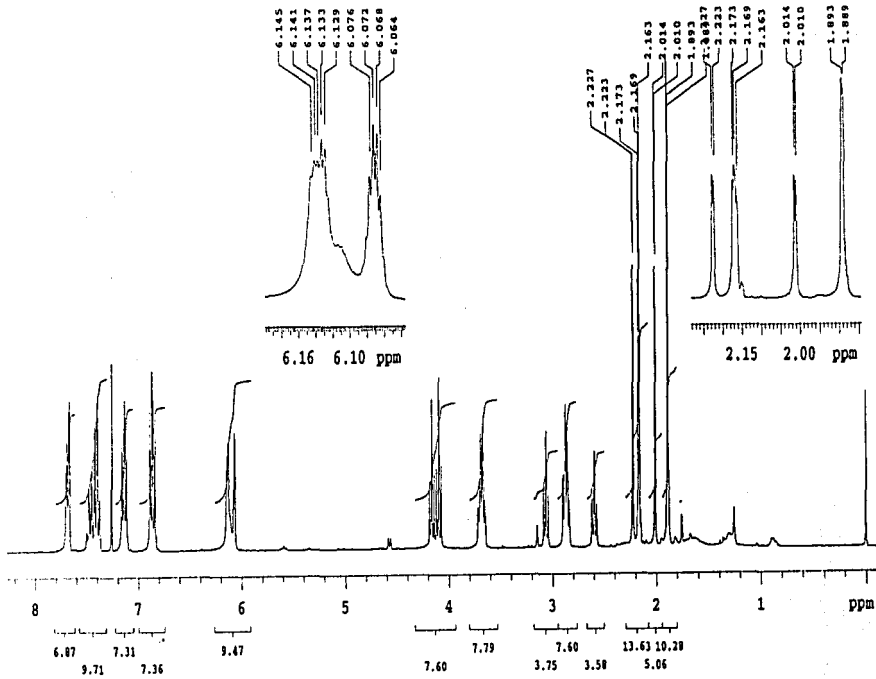
Dr. Mariano Mta.
Mtra. Aida
CP11
NZ
Solvent: CDCl3
Temp. 27.0 C / 300.1 K
UNITY-300 *up500*

PULSE SEQUENCE: dept
Relax. delay 2.000 sec
Pulse 129.8 degree
Acq. time 0.399 sec
Width 19002.4 Hz
5500 repetitions
OBSERVE C13, 75.4216903 MHz
DECOUPLE H1, 299.9479261 MHz
Power 48 dB
on during acquisition
off during delay
WALTZ-16 modulated
DATA-PROCESSING
Line broadening 2.5 Hz
FT size 32768
Total time 7.3 hours



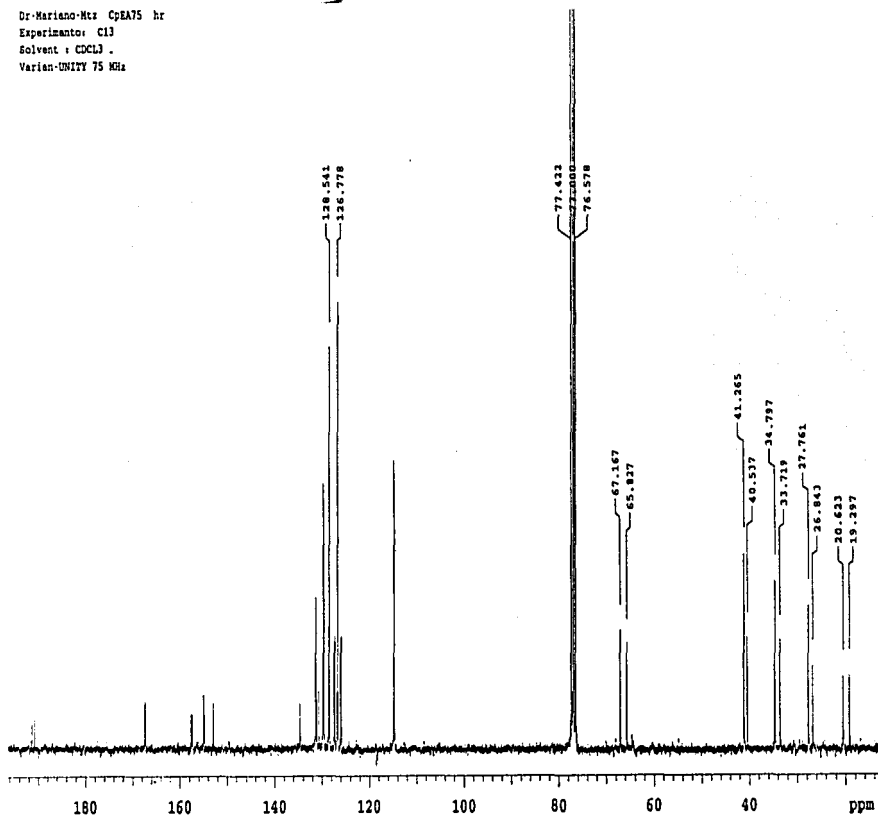
Espectro de resonancia magnética de ^{13}C -DEPT de la pubesamida A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



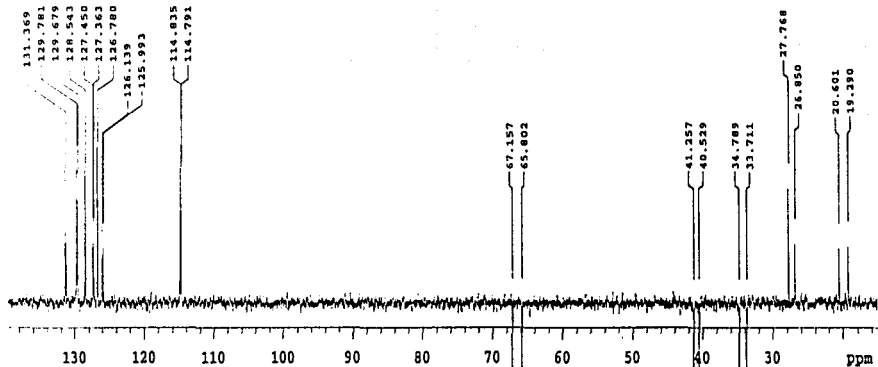
Espectro de resonancia magnética protónica de la pubesamida B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

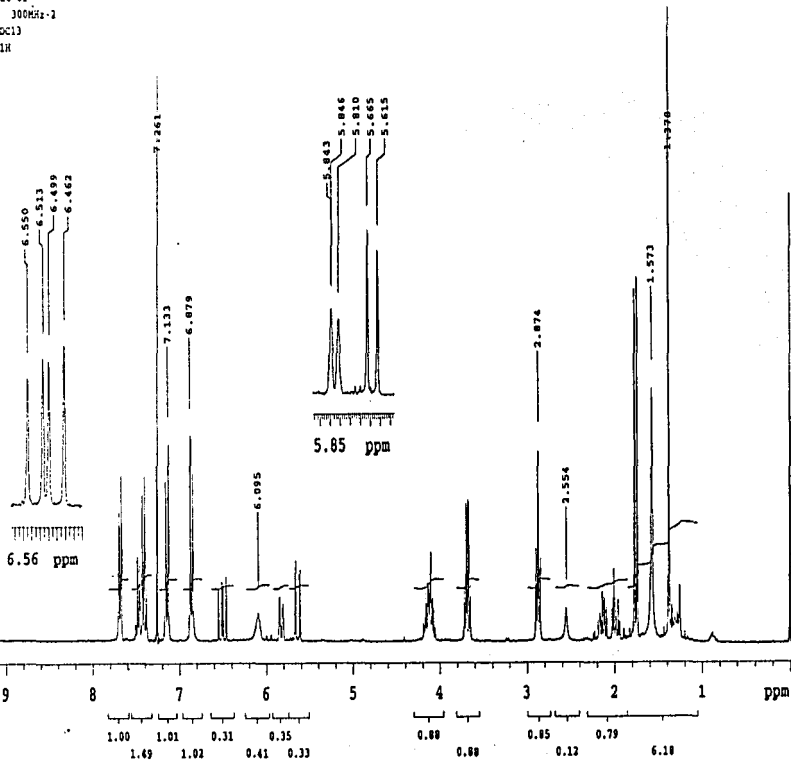
Espectro de resonancia magnética de ^{13}C de la pubesamida B



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro de resonancia magnética de ¹³C-DEPT de la pubesamida B

Instituto de Química UNAM XZ
Dr. Mariano Mtz./Nadia G.
Clave:CPZACOEZ-61
Varian-Unitl 300MHz-1
Disolvente:CDCl3
Experimento:1H
14-01-03



Espectro de resonancia magnética protónica de la pubesamida C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

