

53
2eje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
" ZARAGOZA "

Análisis químico de Iostephane madrensis

TESIS

de Licenciatura para
obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Sustentante :

Raúl Rojas Martínez

Director :

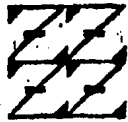
Quím. Arturo E. Cano Flores

Lugar donde se desarrolló el tema :

FES. "ZARAGOZA", campo II, Lab. 314.

México, D.F. 1994

FES
ZARAGOZA



EN HOMAJE A LA
DE NUESTRA PATERNA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL:

QUÍMICO ARTURO E. CANO FLORES.

ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN EL XXIX CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA,
REALIZADO EN NOVIEMBRE DE 1993 EN CANCÚN Q. ROO, MÉXICO.

INDICE.

	página
Resumen	1
Introducción.	2
Fundamentación.	5
Planteamiento del Problema.	30
Objetivo.	30
Hipótesis.	31
Material y Equipo.	32
Desarrollo experimental.	34
- Espectros	47
1.- I.R. del Acido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	48
2.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	49
3.- I.R. de la mezcla formada por el ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico y el ácido <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico.	50
4.- RMN- ¹ H (80 MHz) de la mezcla formada por el ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico y el ácido <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico.	51
5.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido <i>ent</i> -beyer-15-en-19-oico.	52
6.- I.R. del 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.	53
7.- RMN- ¹ H (80 MHz) del 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.	54
8.- I.R. del β -sitosterol.	55
9.- RMN- ¹ H (300 MHz) del β -sitosterol.	56
10.- I.R. del ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	57
11.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	58
12.- RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	59

13.- RMN- ¹ H (300 MHz, Py-d ₆) del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	60
14.- I.R. del ácido 15α-angeloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	61
15.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido 15α-angeloiloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.	62
16.- I.R. del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	63
17.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	64
18.- RMN- ¹ H (300 MHz) del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	65
19.- I.R. del 16α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-19-ol.	66
20.- RMN- ¹ H (80 MHz) del 16α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-19-ol.	67
21.- I.R. del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-11-en-19-oico.	68
22.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido 15α-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-11-en-19-oico.	69
23.- I.R. del <i>pen</i> -acetil glucósido del β-sitosterol.	70
24.- RMN- ¹ H (200 MHz) del <i>pen</i> -acetil glucósido del β-sitosterol.	71
25.- I.R. del ácido 15α-acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	72
26.- RMN- ¹ H (80 MHz) del ácido 15α-acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	73
27.- RMN- ¹ H (300 MHz) del ácido 15α-acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.	74
28.- I.R. del 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	75
29.- RMN- ¹ H (80 MHz) del 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	76
30.- RMN- ¹³ C (20 MHz) del 15α-hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo.	77
Resultados y Discusión de resultados.	78
Conclusiones	113
Recomendaciones	115
Bibliografía	116

RESUMEN.

El presente trabajo describe los resultados obtenidos del análisis químico de la planta medicinal *Iostephane madrensis*, la cual es conocida con el nombre de "cachana". Cabe señalar que es el primer estudio realizado a esta especie vegetal.

Iostephane madrensis (S. Watson) Strother (Asteraceae), es una planta perenne de flores amarillas que habita principalmente en los bosques de pino y encino que se localizan en el Noroeste de la Sierra Madre Occidental de Chihuahua. El té de la raíz de la cachana es tomada como remedio para las úlceras estomacales, los padecimientos del riñón y de la esterilidad, mientras que como emplasto es utilizado para el tratamiento del reumatismo.

De 100 g del extracto clorofórmico de la raíz de la cachana seca de la cachana colectada en la ciudad de Chihuahua, se aislaron y caracterizaron las siguientes sustancias:

1. ácido *ent*-traquiloban-19-oico
2. ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico
3. ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico
4. ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico
5. ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico
6. ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico
7. 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano
8. 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol
9. ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico
10. *S*-sitosterol y
11. *S*-D-glucósido del *S*-sitosterol

empleando para su aislamiento técnicas convencionales de laboratorio y caracterizadas por medio de los resultados de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

INTRODUCCION

El término "producto natural" se refiere a cualquier sustancia proveniente de un organismo vivo (animal, vegetal o microorganismo) y es el resultado de los procesos metabólicos secundarios; es decir, son aquellos que se derivan de un grupo reducido de metabolitos primarios, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en todos los organismos vivos; siendo por lo tanto, sustancias esenciales para el desarrollo del mismo, mientras que los metabolitos secundarios presentan una distribución más restringida y en algunos casos sirven como indicadores taxonómicos para un determinado grupo de plantas^[1,2]. Sin embargo, en la actualidad subsisten controversias sobre el papel específico que desempeñan los metabolitos secundarios en el propio organismo^[3].

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos del análisis químico de la planta medicinal *Iostephane madrensis*, conocida con el nombre de "cachana", la cual es utilizada por los Tarahumaras para el tratamiento del reumatismo, las úlceras estomacales, los padecimientos del riñón, de la esterilidad y del "mal de espanto"^[4].

El estudio de una planta medicinal, requiere de una metodología que permita examinar las interacciones y relaciones entre los componentes biológicos, químicos y culturales del medio ambiente. En México, la información sobre plantas de uso medicinal es ambigua y obsoleta, en su de por sí, escasa literatura científica; no obstante de hallarse bien documentado y arraigado el empleo de las plantas medicinales en algunos grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país. Después de más de 5 siglos, no se ha logrado aún contar con un inventario amplio y confiable de tales recursos vegetales, por lo que es necesario que se integren y desarrollen grupos interdisciplinarios que contribuyan, por medio de la investigación, a la preservación y uso racional de tan valioso recurso natural.

En los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas

medicinales, recobrando una posición que parecía pérdida después del surgimiento y auge de la Industria Farmacéutica, ya que siguen siendo un recurso importante de donde se obtienen los viejos y nuevos fármacos^[5]. Actualmente se replantea la utilidad y vigencia de la herbolaria medicinal bajo el enfoque de una nueva biotecnología que augura revolucionar el mundo de los medicamentos provenientes de plantas^[6].

Por otro lado, el auge en la investigación química de las plantas medicinales ha sido gracias a los grandes avances en las técnicas instrumentales de análisis; ya que actualmente se cuentan con nuevos métodos cromatográficos (cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), en capa fina a alta presión, de líquidos a vacío, en capa fina de alta resolución, etc.)^[7], con equipos de resonancia magnética nuclear (RMN) con una mayor resolución, lo cual ha permitido el desarrollo de nuevos experimentos como: RMN-¹³C (DEPT, APT), H-H COSY, C-H COSY y más recientemente la HMBC^[8]; así como la espectrometría de masas (EM) acoplada con cromatografía de gases (CG) y la difracción de rayos X, las cuales han ayudado a elucidar estructuralmente los componentes de las plantas medicinales^[7,8].

Asimismo, el estudio químico de los productos naturales ha coadyuvado al desarrollo en varias áreas de la química orgánica, propiciando un avance científico y tecnológico importante, principalmente en el área de la síntesis orgánica. Además ha fomentado el desarrollo de otros campos del saber, debido a la gran variedad de sustancias elucidadas, ya que algunos compuestos producen un efecto terapéutico y otras pueden ser utilizadas como materias primas para la obtención de hormonas, aceites industriales, resinas, colorantes, saborizantes, disolventes, etc.^[5,7].

1. COSY; Correlación Homo y Heteronuclear en dos dimensiones. APT; Desacoplamiento total de C-13. DEPT; Desacoplamiento parcial de C-13. HMBC; Conectividad de enlaces múltiples heteronucleares.

FUNDAMENTACION

Existen en el mundo una gran cantidad de familias de plantas, distribuidas conforme a su habitat natural. La familia *Compositae* (*Asteraceae*) es la más vasta dentro de las fanerógamas y mejor distribuida en el mundo. La familia *Compositae* está constituida por hierbas, arbustos y árboles, con hojas alternadas y opuestas, las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, actinomorfas o cigomorfas, con cáliz ausente o sustituido por el pappus o vilano, que sirve para la diseminación de los frutos, las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capítulos^[9,10].

Se conocen 316 géneros en la familia *Compositae*, distribuidos en 13 tribus^[3,9], éstas son; *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae*, *Eupatorieae*, *Inuleae*, *Anthemideae*, *Calenduleae*, *Cardueae*, *Mutisieae*, *Cichorieae*, *Senecioneae*, *Vernonieae* y *Arctoteae*. Donde en México, la *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae* y *Eupatorieae* son las más importantes y abundantes, que en conjunto dan a estas Plantas Mexicanas un matiz fuertemente americano; las demás tribus tienen una importancia cuantitativa secundaria, pues son grupos cuyos centros principales de diversificación se encuentran en otras partes del mundo. La participación de estas Plantas Mexicanas en la flora fanerógama de México a nivel de géneros alcanza un 13.2% del número total, aumentando la importancia de la familia del Sureste a Noroeste. Los valores máximos encontrados (19.9%) se localizan en la parte del altiplano correspondiente a Durango y en el sur de California; el mínimo (4.4%) en la región de Tuxtepec (Oaxaca), sobre la planicie costera del Golfo de México^[9].

El bosque tropical perennifolio, característico de clima cálido y húmedo, representa el habitat menos propicio para los miembros de la familia; en cambio, los matorrales xerófilos, los pastizales y los bosques de pino y encino los favorecen particularmente. Los valores mínimos (0.0 y 0.9 %) corresponden al bosque tropical en Campeche y en

la región de Tuxtepec (Oaxaca) respectivamente, los valores máximos, al matorral desértico en el norte de Chihuahua (23.5 %) y al pinar en el sur de Sonora (22.7 %). Asimismo, se registran porcentajes altos en los pastizales de Durango (19.9 %) y en las zonas alpinas de los altos picos montañosos (20.0 %) [9].

En México, al igual que en la mayor parte del Continente Americano, las *Heliantheae*² forma el grupo dominante de la familia *Compositae*, alcanzando una mayor diversificación y abundancia en las partes montañosas entre 1000 y 2000 m de altitud, escasa a más de 3000 m e inexistentes en el norte de Alaska; de esta circunstancia cabe establecer la afinidad por las regiones templado-cálidas y tropicales de montaña, mismas que pueden haber sido el lugar de origen de esta tribu, y tal vez de todas las compuestas³, se sugiera que la tribu *Heliantheae* constituye la base del árbol genealógico de la familia *Compositae* [9].

La familia *Compositae* está compuesta por una gran diversidad de especies, de los que se han aislado y caracterizado una infinidad de metabolitos secundarios, los cuales han sido clasificados en los siguientes grupos; los aceites esenciales de ácidos grasos, diterpenos, triterpenos, compuestos acetilénicos, flavonas, flavonoles metilados, lactonas sesquiterpénicas, fructanos tipo inulina, los ciclotoles, l-inositol y escillitol. Los aceites esenciales y los diterpenoides son muy distribuidos. Sin embargo, los compuestos como alcaloides, glucósidos cianogénicos, amidas, cumarinas y diversos

2. La tribu *Heliantheae* se subdivide en 15 subtribus, éstas son:

<i>Helaepodiinae</i> ,	<i>Zinulinae</i> ,	<i>Ecliptinae</i> ,	<i>Verbesininae</i> ,	<i>Helianthinae</i> ,
<i>Callardiinae</i> ,	<i>Coreopsidinae</i> ,	<i>Fitchlinae</i> ,	<i>Bahlinae</i> ,	<i>Nadiinae</i> ,
<i>Calinsoginae</i> ,	<i>Neurolaeninae</i> ,	<i>Engelmanninae</i> ,	<i>Ambrosiinae</i>	y
<i>Millettinae</i> [12].				

3. La tribu *Helenieae* presenta su diversidad y abundancia en el norte de México y en el suroeste de Estados Unidos, precisamente en zonas de clima árido. La tribu *Eupatorieae* parece estar ligada a las zonas montañosas de México, este grupo de plantas de ascendencia francamente americana, tiene 2 centros de diversificación; uno en las montañas de México y otro en las de Brasil. La tribu *Astereae* tiene en el norte y en el centro de México su mayor diversificación que abarca tanto las zonas áridas como las montañosas [9].

constituyentes fenólicos tienen una distribución limitada, dando pauta a los interesantes caracteres de los rangos taxonómicos infrafamiliares^[3] (tabla I).

La β -amirina (I), α -amirina (II), lupeol (III), taraxerol (IV), germanicol (V), taraxasterol (VI) y pseudotaraxasterol (VII) (ver tabla II), son triterpenos aislados de muchos miembros de la familia y los 4 últimos son constituyentes típicos de su composición. Los flavonoides son universales en todas las plantas, éstos al igual que los glucósidos de la chalcona son el pigmento de las flores y van siempre acompañados por su correspondiente aurona o flavanona^[3]. Dentro de los diterpenos, existen los biciclos [como el copalol (VIII)], los triciclos [ácido abiético (IX), allodevadarool (X)] y tetracíclicos [esteviol (XI), monoginol (XII), hidroximonoginol (XIII)]. Los diterpenoides biciclicos son del tipo del labdano (XIV) y clerodano (XV), los triciclicos del pimarano (XVI) y abietano (XVII), los tetracíclicos del tipo del kaurano (XVIII) y los pentacíclicos del tipo del traquilobano (XIX) (ver tabla III). Estos compuestos pueden combinarse con grupos derivados del furano, butenólicas, lactonas o sustancias fenólicas que son los sustituyentes más comunmente encontrados^[3,11].

En la familia Compositae y en especial en la subtribu *Helianthinae*⁴ (perteneciente a la tribu *Heliantheae*), se presentan géneros con una gran diversidad de especies, de los cuales el género *Viguiera* agrupa la mayor cantidad y variedad, siendo ésta al igual que los géneros afines a ella, originarios del continente Americano. La mayoría de las especies del género *Viguiera* se encuentran en el centro de México, en el área comprendida entre los estados de Durango y Oaxaca, continuando con menor variedad hacia el centro y sudamérica, y aumentando ligeramente al sureste del cono sur. Esta abundancia y variedad disminuye drásticamente hacia Norteamérica, siendo prácticamente nula

4. En la subtribu *Helianthinae*, los géneros más comunes, constituyen un conjunto, con características botánicas y filogenéticas comunes, de los géneros son: *Echinacea*, *Encelia*, *Flourensia*, *Helianthella*, *Helianthus*, *Matibida*, *Radbeckia*, *Tithonia*, *Viguiera* y *Wyethia* [12,15].

su localización en Canada. El género *Viguiera* es considerado como el punto de origen de la familia *Compositae*, ya que uno de los escasos fósiles de identidad establecida pertenece a este género, por lo que el estudio taxonómico de *Viguiera* y géneros derivados de él, tiene interés en cuanto al aspecto evolutivo de la familia *Compositae*^[12,13,16]. Este género elabora lactonas sesquiterpénicas del grupo de las Heliangólidas, compuestos aromáticos como buteina y sulferitina, ácidos diterpenicos del tipo del kaurano, estracheno y traquilobano, así como compuestos acetilénicos y flavanoles^[15,17-19] (ver tabla IV).

Dentro de la subtribu *Helianthinae*^[12] (*Heliantheae, Compositae*), los géneros *Tithonia* y *Helianthus* están relacionados con el género *Viguiera*, siendo nativas de México y Centroamérica. En estos géneros se han identificado sustancias idénticas en varias especies, lo cual nos indica la notable relación filogenética que existe entre estos géneros. Los géneros *Tithonia* y *Helianthus* elaboran lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, flavonoles, compuestos acetilénicos y triterpenos (ver tabla V).

Otro género perteneciente a la subtribu *Helianthinae*^[12] (*Heliantheae, Compositae*) es *Iostephane*, la cual está constituida por cuatro especies que crecen en las montañas del Norte, Centro y Sur de México^[20]. Una de estas especies es la *Iostephane heterophylla*, distribuida principalmente en el noroeste de los estados de Chihuahua y Sinaloa, y en el sur de Oaxaca. La raíz de esta planta medicinal es utilizada como cataplasma para el tratamiento de heridas e inflamaciones; la tintura alcohólica o el extracto acuoso para el tratamiento del reumatismo y artritis; el té de esta raíz es utilizado para la diabetes complicaciones gastrointestinales y enfermedades del hígado. Del estudio fitoquímico de esta planta medicinal, se aislaron e identificaron: dos nuevos bisabolenos y un nuevo diterpeno ent-kauranoico, xantorizol, ocho diterpenos policíclicos, escopoletina y el 8-hidroxi-6-acetil-2,2-dimetil-cromeno (ver tabla VI).

La planta medicinal *Iostephane madrensis* (S. Watson) Strother, objeto del presente estudio, es conocida con el nombre popular de "cachana", la cual está relacionada con *Iostephane heteropylla*. La *Iostephane madrensis* forma parte del complejo denominado "cachani", junto con otras 3 especies de esta familia (*Leatris punctata*, *Psidium sp.* y *Roldana sessilifolia*)^[21]. La cachana es común encontrarla en el mercado de la Ciudad de Chihuahua, su distribución se encuentra limitada principalmente a poblaciones aisladas en las colinas Orientales de la Sierra Madre de Chihuahua^[4]. El Té de la raíz de la cachana es tomado como remedio para las úlceras estomacales, los padecimientos del riñón, de la esterilidad y del "mal de espanto", mientras que como emplasto es utilizada para el tratamiento del reumatismo. La raíz seca de la cachana, junto con el Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*), la arnica (*Heterotheca inuloides*), la yerba mora (*Solanum sp.*) y la siricua (*Plumbago scadens*), son los ingredientes del té denominado úlcero, el cual es muy popular en la Ciudad de Chihuahua^[21].

La *Iostephane madrensis* (cachana) cuyos sinónimos son *Helianthella madrensis* o *Pinocarpus madrensis*, presenta raíces gruesas y carnosas, sus tallos son escasamente pubescentes o glabos, casi desnudos, de 60 cm de largo, sosteniendo de 3 a 5 flores penduladas. Las hojas en su mayoría son radicales lineares y largamente aterciopeladas, agudas o acuminadas, de 10.2 a 25.4 cm de longitud (también presenta hojas caulinales mas cortas), enteras y grabras en el haz. Las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas pequeñas (5 a 6 líneas de flores), involucro finamente pubescente formado por brácteas. Las brácteas de las flores poseen 9 líneas de longitud, son escamosas, delgadas y escariosas, y el vilano tiene dos aristas delgadas y numerosamente desecadas. Los bosques de pino sirve de nicho para la cachana^[22].

Del análisis químico de la planta medicinal *Iostephane madrensis*, se aislaron e identificaron sustancias que pertenecen a los compuestos denominados "Terpenos". A principios del siglo XX, se observó la

presencia de una unidad estructural común en los terpenos, una organización de grupos de cinco átomos de carbono dentro de cada compuesto, relacionándose con la molécula del isopreno^[23,24] (ver figura 1).

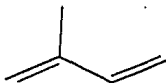


Figura 1: Molécula del isopreno, unidad estructural de los Terpenos.

Los terpenos⁵ pueden existir tanto como estructuras de cadena abierta, cíclicas o combinaciones de ambas, conteniendo solo átomos de carbono e hidrógeno, o incorporando además átomos de oxígeno. La biosíntesis de los terpenos ha sido estudiada intensamente mediante la utilización de compuestos marcados isotópicamente con ¹⁴C, alimentando la planta con esta molécula y después de un período de crecimiento, se aíslan los compuestos de interés que han sido sintetizados por la planta. Cada uno de estos pasos que conducen al precursor terpenico es catalizado y controlado por enzimas específicas en el proceso biosintético real, las cuales son relacionadas con los procesos químicos de reacciones químicas estudiadas como se explica a continuación: Dos moléculas de acetato en forma de tioésteres del acetil-coenzima A (acetilCoA), se combinan mediante una reacción de condensación, para formar el compuesto denominado acetoacetil-CoA, que posteriormente reacciona con otra molécula de acetil-CoA, para formar

5. Los terpenos confieren a las plantas y flores una gran parte de su fragancia. El olor característico de un bosque, se debe parcialmente a los terpenos originados de los pinos, de hecho, el nombre "terpeno" se deriva de los compuestos aislados de la Trementina, un líquido volátil obtenido de los pinos [23].

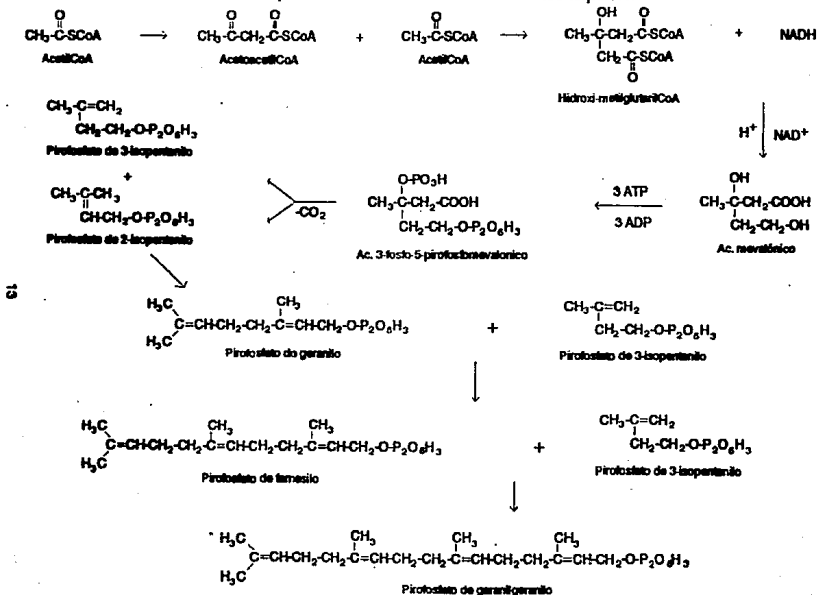
un intermediario, que mediante la reducción de un grupo carboxilo por el NADH y la subsecuente hidrólisis del grupo tioéster, produce el ácido mevalónico.

El ácido mevalónico se fosforila por el ATP, sufriendo una posterior descarboxilación para producir la unidad isoprénica real, el pirofosfato de 3-isopentenilo. La posterior dimerización de dos grupos isopentenilo, que es promovida por la isomerización del doble enlace en algunas moléculas del pirofosfato de 3-isopentenilo, desde la posición 3 a la posición 2; formando el pirofosfato de 2-isopentenilo. La posterior reacción de sustitución del doble enlace del pirofosfato de 3-isopentenilo en el carbono terminal del pirofosfato de 2-isopentenilo, produce la formación de pirofosfato de geranilo, siendo este compuesto el precursor de la formación de todos los monoterpenos (2 unidades isoprénicas) [23,25].

La condensación de una molécula de pirofosfato de 3-isopentenilo con una molécula de pirofosfato de geranilo, produce la formación de pirofosfato de farnesilo, que mediante la adición de una molécula de pirofosfato de 3-isopentenilo, da como resultado la formación del geranilgeranil-pirofosfato, siendo este compuesto el precursor de todos los diferentes esqueletos diterpénicos (ver esquema 1) [24-26].

La primera etapa para la formación de los diferentes esqueletos diterpénicos, es la ciclización del geranilgeranil-pirofosfato (1), la cual es producida por el ataque electrofílico de un protón en el doble enlace terminal del C-14, provocando el desplazamiento electrónico de los dobles enlaces de los carbonos 6 y 10, dando origen a la formación de 2 anillos fusionados de 6 miembros cada uno, con una subsecuente eliminación de un protón del grupo metilo en el C-7, para generar un metileno exocíclico, para dar origen a la formación de un intermediario cíclico estable; conocido con el nombre de pirofosfato de copalilo (2). Este intermediario sirve como sustrato para posteriores ciclizaciones adicionales que permiten la formación de los diferentes tipos de diterpenos [27-30] (ver esquema 2).

Esquema 1. Mecanismo biosintético de los terpenos.



El ataque nucleofílico sobre el C-13 por parte del metileno exocíclico, con la posterior eliminación del grupo pirofosfato, produce; mediante el arreglo espacial de la cadena de pirofosfato, dos carbocaciones epiméricos (3a y 3b) que son utilizados en rutas distintas en la formación de los diferentes diterpenos policíclicos.

El ataque nucleofílico del doble enlace de los carbonos 15 y 16 del carbocatión 3a, sobre el carbono 8; genera una ciclización adicional que induce a la formación de un carbocatión en el C-16 (4), que por la eliminación de un protón del C-15, se genera un doble enlace entre los carbonos 15 y 16, obteniendo el esqueleto del *ent*-beyereno (5) (ver esquema 2).

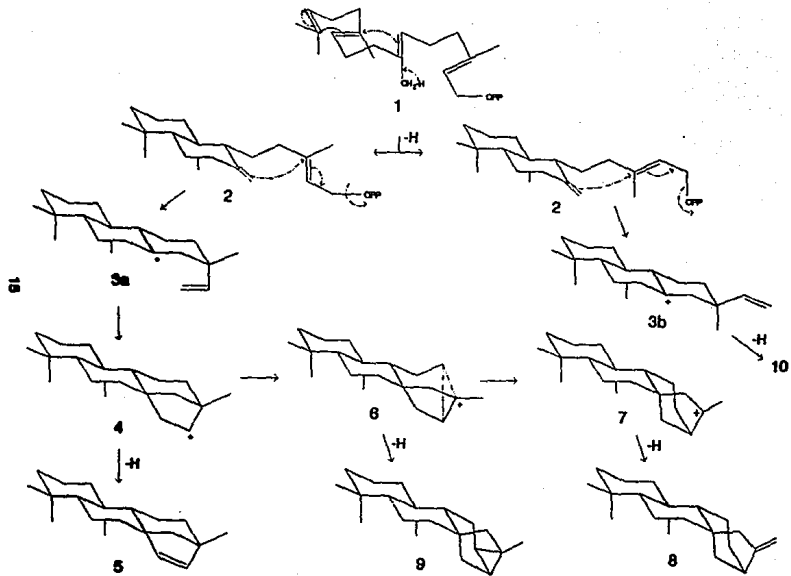
Por otro lado, la ruptura del enlace de los carbonos 12 y 13 y la parcial formación del enlace de los carbonos 12 y 16, genera la formación de un Carbocatión no clásico (6), el cual es el intermediario importante en la formación del *ent*-kaureno, el cual obtiene una estabilidad por la pérdida de un protón del carbono 17 (7), dando lugar a la formación del metileno exocíclico del *ent*-kaureno⁸ (8) (ver esquema 2).

A partir del carbocatión (6) se genera, mediante la eliminación de un protón del carbono 12 y la subsecuente formación del enlace entre los carbonos 12 y 16, la formación del esqueleto base del *ent*-traquilobano⁷ (9) (ver esquema 2).

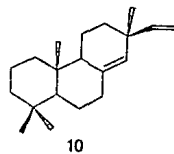
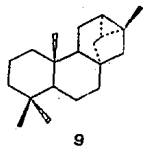
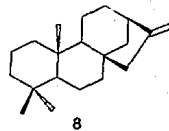
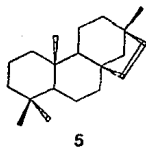
6. Algunos derivados del *ent*-kaureno, que han sido aislados e identificados de diferentes plantas de uso medicinal, han sido sometidos a bioensayos para determinar sus propiedades farmacológicas que permitan el mejor uso de estas plantas medicinales. El trabajo realizado por Zhi-Zhen Lu y colaboradores [31], demostró que el ácido angelilgrandiflorico, es un inhibidor espontáneo de la contracción uterina en guinea pig, y se observó que a dosis de 100 mg/ml no se presenta evacuación uterina, pero a dosis de 100 a 200 mg/kg se produce dicha evacuación, cuya conclusión fue que esta sustancia aislada se puede utilizar para asegurar la actividad de la fertilidad-regulatoria in vivo.

7 En el trabajo realizado por María Isabel Aguilar y colaboradores (20) aislaron diterpenos policíclicos, sometiéndolos a bioensayos de toxicidad con *Artemia salina*, encontrando que solo el ácido traquilobanico y el metil 16 α -hidroxil-*ent*-kaur-11-en-19-oato presentan toxicidad a una LC₅₀ de 945.7 y 467.8 respectivamente.

Esquema 2. Biosíntesis de diterpenos.



Esquema 2. continuación

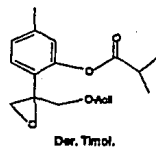
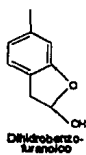
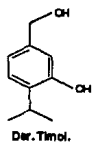
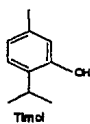


Una ciclización análoga a la realizada al epímero (3a), se produce con el epímero (3b), esta ciclización acoplada con la posterior eliminación del grupo pirofosfato, produce un intermediario, que adquiere una estabilización por la pérdida de un proton, dando como resultado la formación del (+)-sandarocopimaradieno 10 (ver esquema 2).

Una de las principales utilidades de los diterpenos; en especial el ent-kaureno, es la formación de las giberelinas (grupo de hormonas del crecimiento, cuyo efecto más característico consiste en incrementar la elongación de los tallos en varios tipos de plantas superiores), mediante una serie de transformaciones enzimáticas ocurridas *in vivo*^[29].

Tabla I. Ejemplos de metabolitos secundarios aislados de la familia de las Compuestas.

Aceites esenciales



Diterpenos

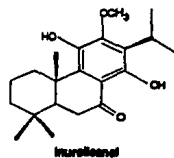
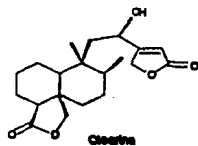
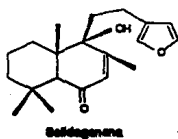
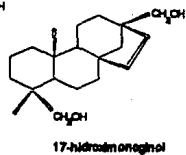
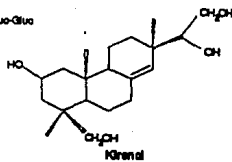
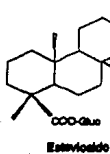
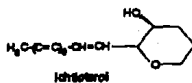
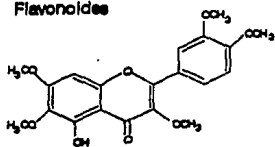


Tabla I. continuación

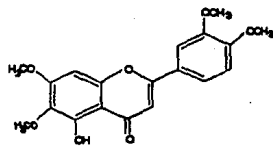
Compuestos Acetilénicos.



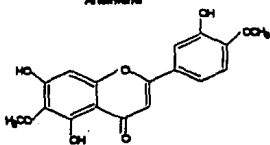
Flavonoides



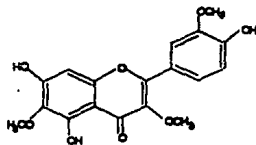
Artemisina



Tetrametoxilavona



Eupaterina



Centauridina

Amidas

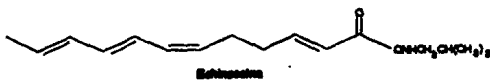
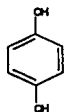
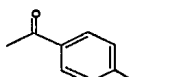


Tabla I. continuación

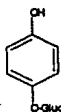
Fenólicos



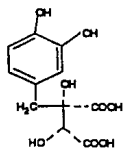
Hidroquinona



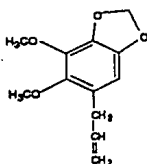
Picelina
O-Gluc



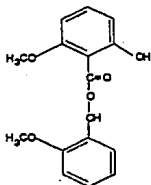
Arbutina
O-Gluc



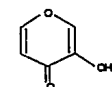
Ac. Fúldico



Dioepila

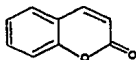


Dinatohidrobenzil benzoato

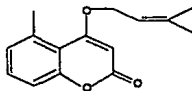


Ac. Piromecónico

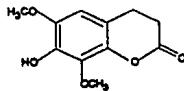
Cumarinas



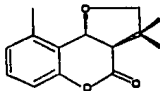
Cumarina



Gerberacumarina



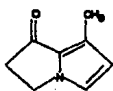
Isotrédina



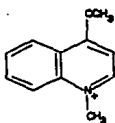
Isogerbera cumarina

Tabla I. continuación

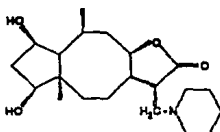
Alcaloides



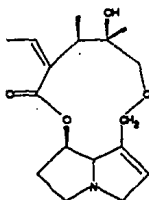
Formosina



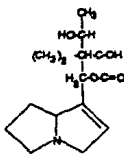
Echinerina



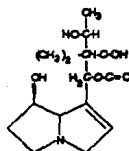
Pulchellina



Benadonina

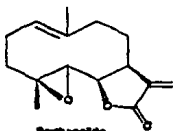


Supina

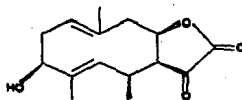


Pinderina

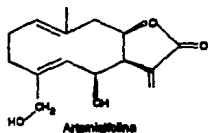
Lactones Sesquiterpénicas



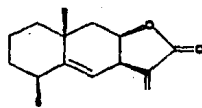
Parthenolida



Chamaecristina

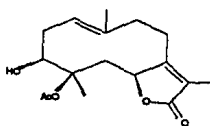


Artemisiolona

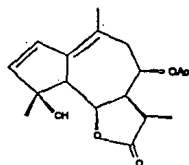


Anabialactona

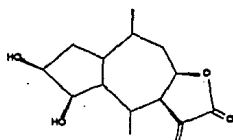
Tabla I. continuación



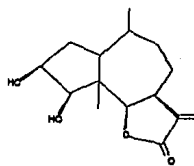
Guzmanins



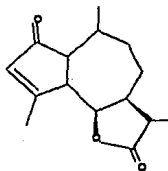
Matricina



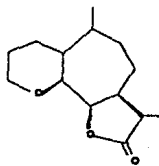
Galgerinins



Ambrosol



Carpesilactona



Picrosachina C

Tabla II. Ejemplos de Triterpenos aislados de la familia de las Compuestas.

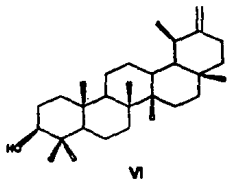
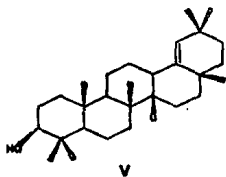
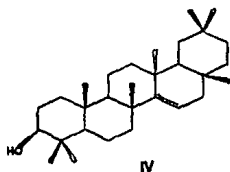
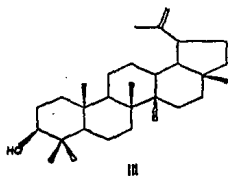
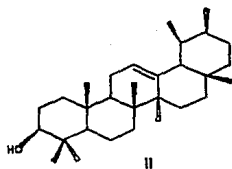
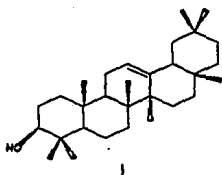


Tabla III. Algunas estructuras diterpénicas aisladas de la familia de las Compuestas.

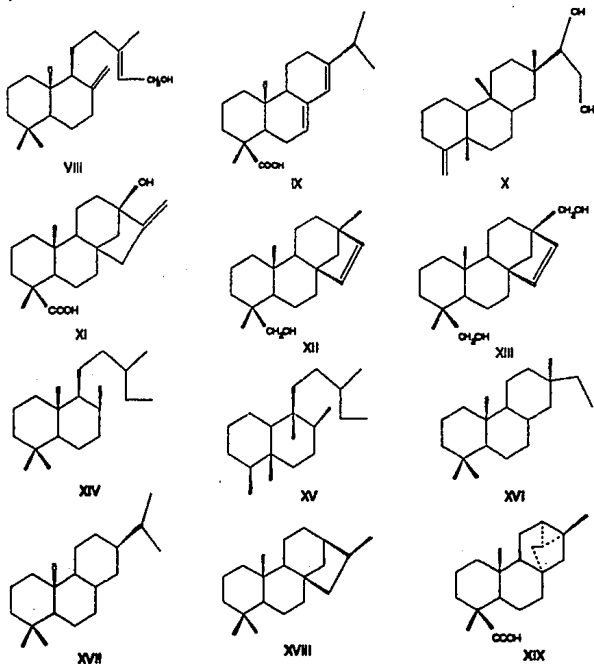
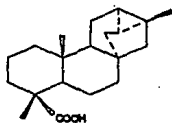
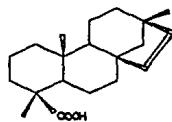


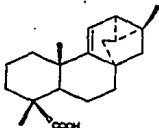
Tabla IV. Algunos metabolitos secundarios del género *Viguiera*.



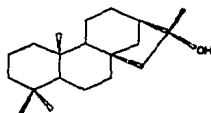
Ac. Traquilobanolico



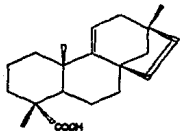
Ac. Estrachen-19-olico



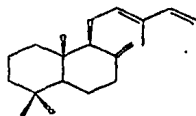
Ac. 9,11-dehidro-traquilobanolico



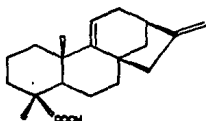
16-hidrocl-ent-kaurano



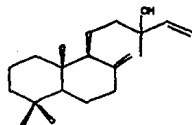
Ac. 9,11-dehidro-estragen-19-olico.



Biformeno

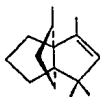


Ac. 9,11-dehidro-ent-kaurilico

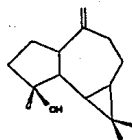


ent-marval

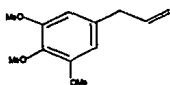
Tabla IV. continuación



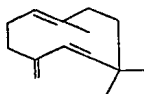
Mochelano



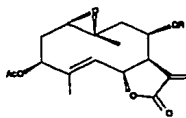
Epatuleno



Elmicina



Humuleno



R = H, Me, Et, Pr, Bu.

Viguetarina

TABLA V. Algunas sustancias aisladas de *Tithonia* y *Helianthus*.

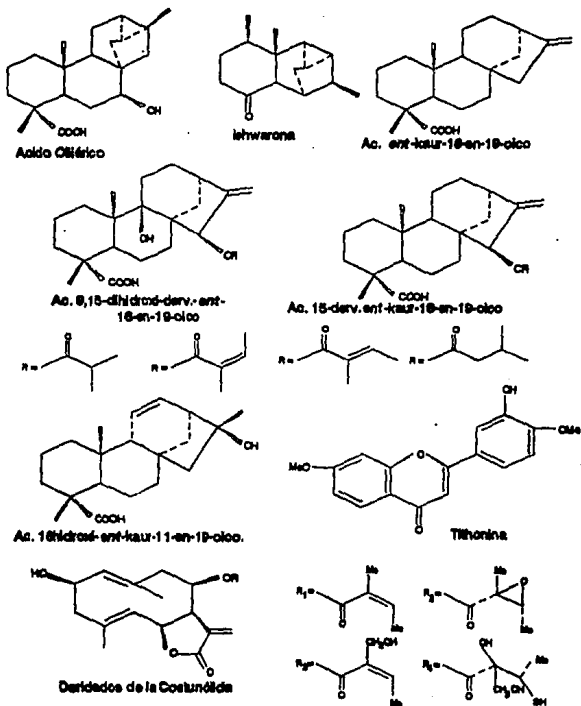
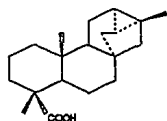
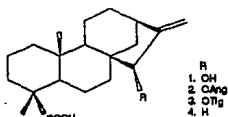


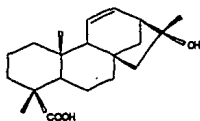
Tabla VI. Metabolitos aislados de *Iostephane heterophylla*.



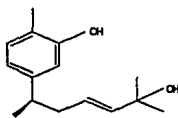
Ac. traquiloban-19-oico.



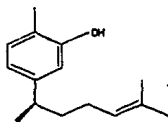
Ac. 15-aili-ent-kaur-16-en-19-oico



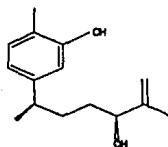
Ac. 16-hidroxi-kaur-11-en-19-oico



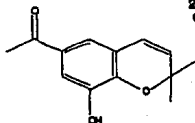
2-metil-5-(5-hidroxi-1,5-dimetil-3-hexenil) fenol



xantorrizol



2-metil-5-(4-hidroxi-1,5-dimetil-3-hexenil) fenol



6-hidroxi-8-acetil-2,2-dimetil cromeno

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
OBJETIVO E HIPOTESIS.**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

México cuenta con una infinidad de recursos vegetales de los cuales algunos son utilizados como plantas de uso medicinal por diversos grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país. Sin embargo, el conocimiento empírico y la información sobre las plantas medicinales es ambigua y obsoleta, en su de por sí escasa literatura científica. No obstante el hallarse bien documentado el arraigado y antiguo uso que de las plantas han hecho los Mexicanos por más de cinco siglos. Hoy en día no se ha logrado aún contar con un inventario amplio y confiable de estos recursos vegetales.

Por lo que en el presente trabajo, se describe el estudio químico de *Iostephane madrensis* (cachana), con la finalidad de aislar, purificar y determinar la estructura molecular de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en esta planta medicinal, la cual es utilizada rutinariamente por los Tarahumaras en el tratamiento del reumatismo, úlceras digestivas y problemas de esterilidad; empleando técnicas convencionales de aislamiento y purificación; así como, técnicas espectroscópicas y espectrométricas que permitan determinar la estructura de estas sustancias.

OBJETIVO.

El presente trabajo tiene como objetivo la extracción, aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios del extracto clorofórmico de la raíz seca de *Iostephane madrensis* (cachana). Como una contribución al conocimiento químico que se tiene sobre plantas de uso medicinal en particular y sobre la cubierta vegetal de nuestro país.

HIPOTESIS.

En la subtribu *Helianthinae* perteneciente a la familia *Asteraceae*; se encuentran los géneros *Viguiera*, *Tithonia* y *Helianthus*, los cuales están relacionados botánica y filogenéticamente con el género *Iostephane* [12-15]. Estudios químicos previos realizados a plantas pertenecientes a estos tres géneros, indican que las sustancias más características aisladas de ellas son: los diterpenos policíclicos con esqueleto del *ent*-kaurano, *ent*-beyereno y *ent*-traquilobano; lactonas sesquiterpánicas, compuestos aromáticos, compuestos acetilénicos, etc., entonces por medio de la aplicación de las técnicas de extracción, separación y purificación se podrán aislar los metabolitos secundarios mayoritarios de *Iostephane madrensis*, los que serán caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas, y confirmadas por algunas transformaciones químicas; los cuales pueden ser sustancias iguales a las aisladas de otros géneros de la misma familia, o bien sustancias muy diferentes que son una manifestación de la individualidad de cada especie, determinados principalmente por factores de tipo biológico.

MATERIAL Y EQUIPO.

Material: Columnas para cromatografía de diferentes tamaños y diámetros (en función de la cantidad de extracto); equipo necesario para realizar destilaciones simples y fraccionadas; equipo para la preparación de Diazald Kit; material de vidrio (pipetas, matraces Erlenmeyer, vasos de precipitados, matraces Kitasato de diferentes capacidades); pipetas Pasteur y embudos Büchner; placas de agitación magnética; placas de calentamiento; material básico de laboratorio.

Equipo: Balanza analítica Ainsworth modelo 100A; Balanza granataria Ohaus serie 700-800; Aparato Fischer Johns; Espectrofotómetro de IR Perkin-Elmer (modelo 283 y 681); Espectrofotómetro Nicolet FT IR (modelo 5 SX); Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5985 GC/MS System 70 eV.; Espectrómetro de RMN Varian VXR-300 S; Rotavapor Yamamoto RE-47; Lámpara de Luz UV (Listed INSA & Meas 399-J).

Sustancias: Cromatofolios de sílica gel con soporte de aluminio 60F254; Cromatoplasmas de 20x20 de sílica gel G-200 UV254; reveladores químicos específicos ($H_2O:H_2SO_4:HAC$ y $H_2O:H_2SO_4$:Sulfato-cárico de amonio); sílica gel para capa fina 60 GF254; sílica gel para cromatografía en columna (70-230 ASTM); disolventes^a (cloroformo, acetona, acetato de etilo, etanol, éter etílico, éter isopropílico, dimetil sulfóxido, dimetil formamida, hexano y ácido acético); celita para filtración, carbón activado, N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (diazald), hidróxido de potasio, piridina.

B. Los disolventes utilizados en las técnicas cromatográficas son de grado técnico, los cuales fueron sometidos a una destilación fraccionada para obtener una mayor pureza de los mismos. Los disolventes utilizados en las reacciones químicas fueron de grado analítico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL
Y ESPECTROS.**

PARTE EXPERIMENTAL.

La planta *Iostephane madrensis* (S. Watson) Strother, cuyo nombre popular es cachana, fue obtenida en el Mercado de la Reforma en el Municipio de Chihuahua, Chih., siendo originaria de San Buena Ventura al Noroeste de la Sierra Madre de Chihuahua. El material vegetal fue obtenido e identificado conjuntamente por el Dr. Robert Bye y la M. en C. Edelmira Linares, colección 14147 del Instituto de Biología de la UNAM.

Se sometieron a extracción por maceración, 7.5367 kg de la raíz seca de la cachana; utilizando cloroformo a temperatura ambiente, la operación se realizó 2 veces y por concentración del disolvente, se obtuvo el extracto clorofórmico, el cual se mantuvo a baja temperatura y protegido de la luz, para evitar la posible descomposición de algunas de las sustancias presentes en el extracto.

La separación de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto crudo de *Iostephane madrensis* se realizó por cromatografía a vacío^[32], para lo cual: 100 g del extracto clorofórmico se adsorbieron en 100 g de celita, y posteriormente se aplicaron en una columna de vidrio de 8.7 cm de diámetro empacada con una altura de 13 cm de sílica gel para cromatografía en capa fina. La elución de la columna se inició empleando *n*-hexano como fase móvil, para continuar eluyendo con una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo de polaridad creciente, hasta finalmente eluir con acetato de etilo puro; de donde se obtuvieron 430 fracciones de 500 ml cada una, el desarrollo cromatográfico de la columna se siguió por medio de c.c.f., utilizando como reveladores; luz ultravioleta, una mezcla de ácido sulfúrico:ácido acético:agua (4:80:16), además una solución formada de 350 g de agua, 22.2 ml de H₂SO₄ concentrado y 12 g de Sulfato cármico de amonio.

De las fracciones 2-4 y 9-16 obtenidas al eluir la columna con *n*-hexano; se aisló un compuesto sólido que cristalizó espontáneamente,

el cual fue recristalizado por par de disolventes (CHCl_3 -EtOH) y lavado con éter isopropílico, obteniéndose 3.49 g de un sólido blanco de pf. 160-162°C, que fue identificado en base a los datos obtenidos de su análisis espectroscópico y espectrométrico, como el ácido *ent*-traquiloban-19-oico^[33-34] al cual le corresponde una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$ y un peso molecular de 302 uma.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 1): 2929, 2858, 1729, 1692, 1467, 1409, 1367, 1266, 1177, 1127, 970 y 845.
RMN-¹H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 2): δ 1.11 (s, 3H, CH_3 -17), δ 0.86 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.20 (s, 3H, CH_3 -18), δ 0.63 y 0.77 (señal compleja, 2H, H-C₁₂ y H-C₁₃).
E.M. (I.E.) m/z : 302 (M⁺, 100%), 246 (85.37%), 231 (34.15%), 119 (41.46%), 105 (56.09%), 93 (65.85%), 91 (85.37%), 79 (51.22%) y 41 (41.46%).

De las fracciones 2-4 y 25-26 obtenidas al eluir la columna con *n*-hexano y una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (95:5) respectivamente, se aislaron 430 mg de una mezcla de ácidos diterpénicos tetracíclicos, formada por el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico y por el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico, la cual fue insoluble en acetona y etanol; la purificación de esta mezcla se llevó a cabo por medio de cristalizaciones sucesivas, utilizando como disolventes una mezcla de CHCl_3 -EtOH.

La caracterización e identificación de cada uno de los componentes de la mezcla se realizó en base a los datos obtenidos a partir de sus propiedades físicas y del análisis espectroscópico y espectrométrico; los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura^[35,36] y con muestra auténtica en ccf.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 3): 3300-2500, 1730, 1692, 1468, 1264, 1125, 972 y 878.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 4): δ 0.96 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.26 (s, 3H, CH_3 -18), δ 2.64 (s. amplio, $W_{1/2}=12$ Hz, 1H, H-C $_{13}$) y δ 4.73 (s. amplio, $W_{1/2}=11$ Hz, 2H, H-C $_{17}$).

E.M.(I.E.) $^m/z$: 302 [M^+ , 65.85%], 287 (56.10%), 259 (24.39%), 249 (24.39%), 241 (34.15%), 213 (19.51%), 119 (46.34%), 105 (65.85%), 93 (56%) y 91 (100%).

RMN- ^1H (ácido *ent*-bayer-15-en-19-oico), (espectro 5); δ 0.69 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.00 (s, 3H, CH_3 -17), δ 1.22 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.72 (d, $J_{AB}=6$ Hz, 1H, H-C $_{18}$) y δ 5.42 (d, $J_{AB}=6$ Hz, 1H, H-C $_{18}$).

A partir de las fracciones 23-31, que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (95:5), se aisló un diterpeno tetracíclico con esqueleto de *ent*-kaurano; el cual fue cristalizado por par de disolventes (CHCl_3 -EtOH), obteniéndose 400 mg (0.40%) de un sólido blanco cristalino de pf. 215-217 $^{\circ}\text{C}$ [lit.^[37] pf. 215-216 $^{\circ}\text{C}$], que fue identificado como el 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 6): 3600, 2930, 1463, 1385, 1369, 1113, 925 y 826.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 7): δ 0.81 (s, 3H, CH_3 -19), δ 0.86 (s, 3H, CH_3 -18), δ 1.04 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.37 (s, 3H, CH_3 -17) y δ 1.45 (s, 2H, H-C $_{18}$).

E.M.(I.E.) $^m/z$: 290 [M^+ , 7.32%], 275 [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 41.4%], 257 [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$, 20%], 232 [$\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 29.27%], 229 (7.32%), 217 [$\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{CH}_3$, 12.02%], 123 (39.02%), 105 (36.59%), 69 (63.41%), 55 (65.85%), 43 (100%) y 41 (63.17%).

En la fracciones 33-41, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (95:5); se aislaron 15.3mg (0.015%) de un sólido blanco de pf. 149°C, el cual resultó ser soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona. La caracterización de esta sustancia se logró por medio de los datos obtenidos de su análisis espectroscópico y espectrométrico, lo cual permitió concluir que se trataba del β -sitosterol, comprobando su identidad por comparación directa con muestra auténtica, esta sustancia se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza^[38,39].

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 8): 3609, 3001, 2937, 2868, 1602, 1462, 1379
1121, 1048 y 922.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 9); δ 0.68 (s, 3H, CH₃-18), δ 1.01 (s, 3H, CH₃-19), δ 0.85 (t, J=7 Hz, 3H, CH₃-29), δ 0.92 (d, 3H, J=7 Hz, CH₃-21), δ 0.85 (d, J=7 Hz, 6H, CH₃-26 y 27), δ 5.4 (dd, J=6.6 Hz, 1H, H-C₄), δ 3.5 (dddd, J=11 y 6 Hz, 1H, H-C₂) y δ 1.51 (s. amplio, 1H, H-C₂-OH).

E.M. (I.E.) μ/z : 414 [M⁺, 43.21%], 339 (27.16%), 303 (22.22%), 273 (20.98%), 255 (23.46%), 213 (32.10%), 163 (22.22%), 161 (24.69%), 159 (27.16%), 145 (37.04%), 107 (50.62%), 105 (51.85%), 97 (34.57%), 95 (51.85%), 93 (43.21%), 91 (51.85%), 81 (50.62%), 79 (33.33%), 71 (39.51%), 69 (49.38%), 67 (34.57%), 57 (66.66%), 55 (86.42%), 43 (100%), 41 (51.85%) y 40 (32.10%).

De las fracciones 67-90, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (90:10), se aislaron 1.06g (1.06%) de un sólido cristalino de pf. 229-231°C [lit^[35] 227-228°C, lit^[40] 226-228°C], el cual cristalizó espontáneamente, el cual es soluble en acetato de etilo, cloroformo e insoluble en éter isopropílico; sus

constantes espectroscópicas y espectrométricas permitieron concluir que se trataba del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-*en*-19-oico.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 10): 3602, 3064, 2936, 1692, 1468, 1258, 1183, 998 y 905.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 11): δ 0.95 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.21 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.04 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H_α - C_{17}), δ 5.17 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H_β - C_{17}), δ 3.77 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{18}$) y δ 2.70 (s. amplio, $W_{1/2}=12$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{13}$).

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 12): δ 0.961 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.259 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.081 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, H_α - C_{17}), δ 5.216 (s. amplio, $W_{1/2}=6$ Hz, 1H, H_β - C_{17}), δ 3.812 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{18}$) y δ 2.747 (s. amplio, $W_{1/2}=15$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{13}$).

RMN- ^1H (300 MHz, Py-d_6 , TMS), (espectro 13): δ 1.18 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.388 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.228 (s. amplio, $W_{1/2}=6.0$ Hz, 1H, H_α - C_{17}), δ 5.522 (s. amplio, $W_{1/2}=6.0$ Hz, 1H, H_β - C_{17}), δ 4.194 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{18}$) y δ 2.677 (s. amplio, $W_{1/2}=15$ Hz, 1H, $\text{H}-\text{C}_{13}$).

E.M. (I.E.) $^m/z$: 318 [M^+ , 26.83%], 303 [M^+-CH_3 , 17.07%], 300 [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$, 41.46%], 285 [$\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3$, 60.98%], 272 [M^+-HCOOH , 14.63%], 260 [$\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$, 95.12%], 257 [$\text{M}^+-\text{HCOOH}-\text{CH}_3$, 24.39%], 245 [$\text{M}^+-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\text{CH}_3$, 31.77%], 91 (90.24%), 84 (90.24%), 79 (100%) y 55 (85.37%).

De las fracciones 80-90, obtenidas al eluir la columna con *n*-hexano: acetato de etilo (90:10); se aislaron 130mg (0.13%) de un sólido cristalino, que fue recrystalizado con una mezcla de etanol-éter isopropílico, con pf. 185-187°C [lit^[35] 193-195°C, lit^[15] 187-188°C], el cual fue identificado como el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-*en*-19-oico.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 14): 3033, 2935, 2870, 1693, 1457, 1239, 1163, 1124, 1040 y 960.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 15): δ 0.95 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.22 (s, 3H, CH_3 -18), δ 2.75 (s. amplio, $W_{1/2}=11$ Hz, 1H, H-C $_{13}$), δ 5.05 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H-C $_{15}$), δ 5.10 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, H $_{\alpha}$ -C $_{17}$), δ 5.31 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H $_{\beta}$ -C $_{17}$), δ 6.18 (cc, $J=7$ y 1.12 Hz, 1H, H-C $_{3'}$), δ 2.03 (dc, $J=7$ y 1.4 Hz, 3H, CH_2 -C $_{\alpha'}$) y δ 1.99 (dc, $J=1.3$ y 1.0 Hz, 3H, CH_2 -C $_{\beta'}$).

E.M. (I.E.) ν/z : 400 [M^+ , 10%], 318 [M^+ -C $_8$ H $_8$ O, 2.5%], 300 [M^+ -RCOOH, 2.5%], 285 [M^+ RCOOH-CH $_3$, 22.5%], 272 [M^+ -C $_8$ H $_8$ O-HCOOH, 10%], 260 [M^+ -C $_8$ H $_8$ O-C $_2$ H $_5$ O, 2.5%], 255 [M^+ -RCOOH-HCOOH, 5%], 239 [M^+ -RCOOH-CH $_2$ -HCOOH, 10%], 83 [ión angelato, 100%] y 55 [ión angelato-CO, 45%].

A partir de las fracciones 80-120, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (90:10), se aislaron 1.0297 g (1.02%) de un sólido blanco cristalino de pf. 222-224°C, que fue cristalizado a partir de una mezcla de CHCl_3 -*n*-hexano y lavado posteriormente con éter isopropílico, dicha sustancia fue caracterizada como el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico, al que le corresponde una fórmula molecular C $_{30}$ H $_{30}$ O $_3$ y un peso molecular de 318 uma.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 16): 3600, 3510, 2930, 2850, 1730, 1693, 1460, 1445, 1260, 1120, 1000 y 960.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 17): δ 0.90 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.23 (s, 3H, CH_3 -18), δ 1.24 (s, 3H, CH_3 -17) y δ 3.26 (s, 1H, H-C $_{18}$).

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 18): δ 0.909 (s, 3H, CH_3 -20),

δ 1.176 (s, 3H, CH₃-18), δ 1.201 (s, 3H, CH₃-17) y δ 3.249 (s, 1H, H-C₁₈).

E.M. (I.E.) ^{m/z}: 318 [M⁺, 100%], 300 (M⁺-H₂O, 31.71%), 285 (M⁺-H₂O-CH₃, 26.83%), 261 (41.46%), 151 (63.41%), 145 (46.34%), 123 (56.09%), 107 (60.98%), 105 (73.17%), 97 (81.71%), 95 (56.10%), 93 (64.63%), 91 (98.78%), 79 (90.24%) y 41 (68.3%).

De las fracciones 138-147, obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (80:20), cristalizó espontáneamente un sólido cristalino, que fue recristalizado en una mezcla de *n*-hexano-cloroformo, obteniendo 22.6 mg (0.022%); el cual presentó un pf. de 201-202°C y que en base a los datos obtenidos del análisis espectroscópico y espectrométrico, se determinó que se trataba de un diterpeno con esqueleto del tipo del *ent*-kaurano, al que le corresponde una fórmula molecular C₂₀H₃₀O₂ y se identificó como el 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 19): 3628, 3012, 2869, 2820, 1462, 1374, 1211, 1007 y 927.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 20): δ 0.96 (s, 3H, CH₃-18), δ 1.01 (s, 3H, CH₃-20), δ 1.36 (s, 3H, CH₃-17) y δ 3.55 (dd, 2H, H₂-C₁₉).

E.M. (I.E.) ^{m/z}: 288 [M⁺-H₂O, 21.95%], 275 (46.34%), 258 (46.34%), 257 (100%), 217 (26.89%), 147 (26.89%), 135 (31.71%), 123 (78.05%), 109 (63.41%), 105 (60.98%), 95 (63.41%), 91 (70.73%), 81 (63.41%), 79 (58.54%), 55 (53.66%) y 43 (95.12%).

De las fracciones 250-264, que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (70:30), se separaron 66.8 mg (0.68%) de un sólido de pf. 234-236°C [lit.^[35], 244-246°C], el cual fue recrystalizado a partir de una mezcla de cloroformo-éter isopropílico. Sus datos espectroscópicos y espectrométricos indican que se trata del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico (C₂₀H₃₀O₂).

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 21): 3451, 3424, 3024, 2927, 1699, 1467, 1378, 1238, 1173, 1152, 932 y 890.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 22): δ 0.84 (*s*, 3H, CH₃-20), δ 1.23 (*s*, 3H, CH₃-18), δ 1.31 (*s*, 3H, CH₃-17), δ 5.50 (*dd*, J=10 y 4 Hz, 1H, H-C₁₂) y δ 5.89 (*dd*, J=10 y 4 Hz, 1H, H-C₁₁).

E.M. (I.E.) ^{m/z}: 261 (17.07%), 260 (100%), 136 (24.39%), 123 (21.95%), 110 (26.83%), 104 (29.27%), 92 (48.78%), 91 (48.78%), 43 (36.59%) y 41(21.95%).

E.M. (I.Q.) ^{m/z}: 319 (73.17%), 303 (12.20%), 302 (10.5%), 301 (100%), 273 (12.20%), 260 (20.73%), 259 (17.07%), 255 (17.07%), 215 (9.76%) y 213 (9.76%).

De los eluatos 399-430, obtenidos al eluir la columna con acetato de etilo puro, se obtuvo un polvo blanco que descompone con la temperatura, soluble en etanol y metanol. Su espectro de IR en KBr, mostró una banda muy intensa en 3415 cm⁻¹, lo cual permitió suponer que dicha molécula presentaba varios grupos hidroxilo; lo que la hace muy polar y poco manejable para su análisis espectroscópico, razón por la cual fue necesario la preparación del correspondiente *per*-acetil derivado; para ello, 41.1 mg de la sustancia pura, se hicieron reaccionar con 1 ml de anhídrido acético en presencia de 0.5 ml de piridina a temperatura ambiente, durante aproximadamente 2 horas,

siguiendo el curso de la reacción por medio de ccf.

Concluida la transformación, se le adicionó hielo a la mezcla de reacción, para posteriormente llevar a cabo la extracción del producto, lo cual se logró por medio de extracciones sucesivas con acetato de etilo. La fase orgánica total obtenida de éstas, se lavaron con una solución de HCl al 10%, el exceso de ácido en la fase orgánica fue suprimido al tratarla con una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio, y cualquier exceso de reactivo presente en el medio se eliminó al lavar con agua; para posteriormente secar la fase orgánica obtenida con Na_2SO_4 anhidro, obteniéndose 17.2 mg (32.48%) de un sólido blanco cristalino de p.f. 149-151°C; el cual es soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona, e insoluble en hexano. La identificación y caracterización se hizo mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, las que permitieron concluir que se trataba del *pen*-acetil-glucósido del 8-sitosterol^[41].

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} (espectro 23): 2956, 2869, 1752, 1461, 1371, 1168, 1134, 1039 y 909.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 24): δ 5.361 (d, J=8 Hz, 1H, H-C₆), δ 2.079-2.007 (4s, 12H, 4[-OCOCH₃]), δ 4.597 (d, J=8 Hz, 1H, H-C₁'), δ 5.219 (t, J=10 Hz, 1H, H-C₃'), δ 5.083 (t, J=10 Hz, 1H, H-C₄'), δ 4.966 (dd, J=10 Hz, 1H, H-C₂'), δ 4.229 (dd, J=10 y 5 Hz, 1H, H_a-C₈'), δ 4.112 (dd, J=10 y 2.0 Hz, 1H, H_b-C₈'), δ 3.681 (ddd, J=10.5 y 2Hz, 1H, H-C₅'), δ 3.450 (dddd, J=10 y 5 Hz, 1H, H-C₂), δ 0.676 (s, 3H, CH₃-18), δ 0.988 (s, 3H, CH₃-19), δ 0.852 (d, J=7 Hz, 6H, CH₃-26) y CH₃-27) y δ 0.935 (d, J=7 Hz, 3H, CH₃-21).

E.M. (I.E.) ν_{max} : 396 [M⁺-348, 100%], 331 (18%), 169 (64%), 145 (15%), 127 (13%), 109 (38%), 95 (15%), 81 (19%) y 43 (58%).

Obtención del ácido 15 α -acetoxi-*ent*-traquiloban-19-oico.

52.7 mg del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico, se hicieron reaccionar con 0.75 ml de anhídrido acético y 0.5 ml de piridina durante 55 minutos a temperatura ambiente; el curso de la reacción fue seguido por ccf.. La separación del producto se realizó por medio de extracciones sucesivas, empleando para ello cloroformo; una vez obtenida la fase orgánica, se emplearon soluciones de HCl al 10% y una solución saturada de NaHCO₃, para eliminar cualquier exceso de reactivo presente en el medio, se realizaron varios lavados con agua, para posteriormente secar la fase orgánica resultante con Na₂SO₄ anhidro, obteniéndose 47.8 mg (79.66%) de un sólido blanco, recristalizado en *n*-hexano, con pf. de 193-194°C.

I.R. $\nu_{\max}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 25): 3000, 2931, 2870, 1721, 1694, 1467, 1448, 1372, 1256 y 1020.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 26): δ 0.88 (s, 3H, CH₃-20), δ 1.06 (s, 3H, CH₃-17), δ 1.18 (s, 3H, CH₃-18), δ 2.06 (s, 3H, CH₃-CO-) y δ 4.76 (s, 1H, H-C₁₅).

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 27); δ 0.890 (s, 3H, CH₃-20), δ 1.074 (s, 3H, CH₃-17), δ 1.196 (s, 3H, CH₃-18), δ 2.095 (s, 3H, CH₃-CO-) y δ 4.788 (s, 1H, H-C₁₅).

E.M. (I.E., 70 eV) m/z : 361 [M⁺], 360 (3%), 318 (3%), 313 (1.3%), 105 (23.17%), 91 (29.27%), 79 (24.39%), 60 (17.07%), 57 (18.29%), 55 (26.83%), 45 (28.05%) y 43 (100%).

Obtención del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo.

25.4 mg del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico, fueron tratados con diazometano en éter. etílico en condiciones normales. El

curso de la reacción fue seguido por ccf., obteniéndose 20.9 mg (76.31%) del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo, el cual presentó la apariencia de un aceite.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹ (espectro 28): 3600-3400, 2915, 2860, 1725, 1460, 1445, 1232, 1150, 1015, 1000 y 800.

RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 29): δ 0.77 (s, 3H, CH₃-20), δ 1.15 (s, 3H, CH₃-18), δ 1.20 (s, 3H, CH₃-17), δ 3.25 (s, 1H, H-C₁₈) y δ 3.61 (s, 3H, CH₃-21).

E.M. (I.E.) m/z : 317 (M⁺-CH₃, 4.48%), 314 (7.32%), 275 (9.76%), 239 (6.10%), 236 (6.10%), 215 (7.32%), 182 (14.6%), 159 (8.54%), 147 (2.72%), 145 (19.98%), 135 (13.41%), 121 (28.63%), 107 (36.59%), 105 (43.90%), 91 (78.05%), 81 (51.22%), 79 (73.17%), 43 (92.68%) y 41 (100%).

RMN-¹³C (20 MHz, CDCl₃, TMS), (espectro 30): C-1 (δ 39.79, t), C-2 (δ 19.15, t), C-3 (δ 38.15, t), C-4 (δ 43.82, s), C-5 (δ 56.73, d), C-6 (δ 20.99, t), C-7 (δ 33.94, t), C-8 (δ 44.96, d), C-9 (δ 52.12, d), C-10 (δ 38.58, s), C-11 (δ 18.87, t), C-12 (δ 25.12, d), C-13 (δ 23.59, d), C-14 (δ 29.72, t), C-15 (δ 86.76, d), C-16 (δ 27.87, s), C-17 (δ 16.02, s), C-18 (δ 28.69, c), C-19 (δ 177.82, s), C-20 (δ 12.74, c) y C-21 (δ 51.06, c).

Obtención del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.

120 mg del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico se disolvieron en 25 ml de una solución de KOH al 5% en metanol, para posteriormente someter la solución resultante a reflujo durante 26 horas. El curso de la reacción se siguió por ccf. La reacción fue suspendida al adicionar HCl al 5% hasta neutralidad. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (5 veces) y la fase orgánica

obtenida fue posteriormente secada con Na_2SO_4 anhidro. La eliminación del disolvente permitió la obtención de 97.5 mg (102.2 %) de un sólido cristalino recristalizado en una mezcla formada de acetona:éter isopropílico, con un *pf* de 230-231°C.

I.R. $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} (espectro 10): 3602, 3064, 2936, 1692, 1468, 1258, 1183, 998 y 905.

RMN- ^1H (80 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 11): δ 0.95 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.21 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.04 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H_a - C_{17}), δ 5.17 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H_b - C_{17}), δ 3.77 (s. amplio, $W_{1/2}=4$ Hz, 1H, H - C_{15}) y δ 2.70 (s. amplio, $W_{1/2}=12$ Hz, 1H, H - C_{13}).

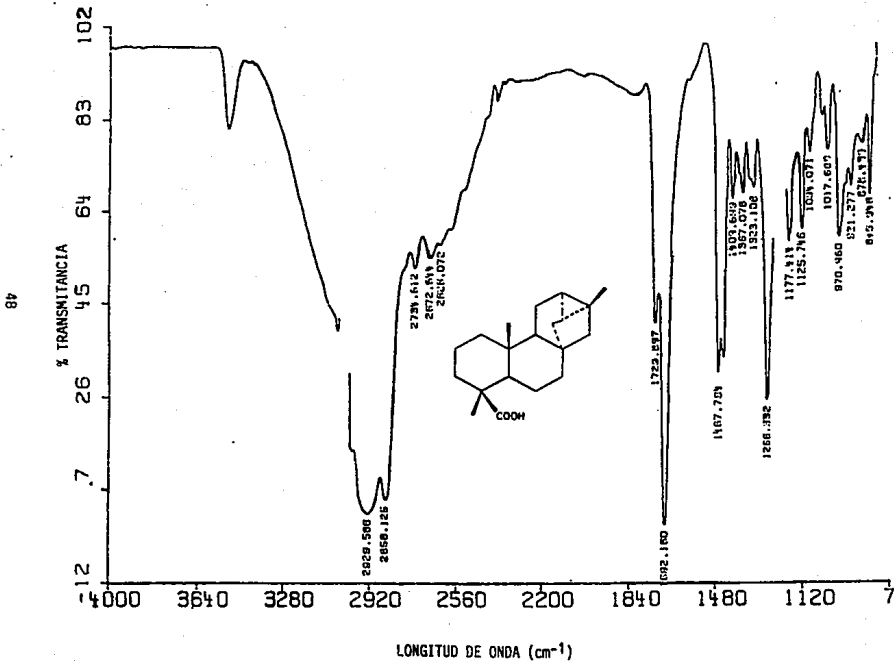
RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS), (espectro 12): δ 0.961 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.259 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.081 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, H_a - C_{17}), δ 5.216 (s. amplio, $W_{1/2}=6$ Hz, 1H, H_b - C_{17}), δ 3.812 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, H - C_{15}) y δ 2.747 (s. amplio, $W_{1/2}=15$ Hz, 1H, H - C_{13}).

RMN- ^1H (300 MHz, Py-d_5 , TMS), (espectro 13): δ 1.18 (s, 3H, CH_3 -20), δ 1.388 (s, 3H, CH_3 -18), δ 5.458 (s. amplio, $W_{1/2}=6.0$ Hz, 1H, H_a - C_{17}), δ 5.522 (s. amplio, $W_{1/2}=6.0$ Hz, 1H, H_b - C_{17}), δ 4.194 (s. amplio, $W_{1/2}=5$ Hz, 1H, H - C_{15}) y δ 2.677 (s. amplio, $W_{1/2}=15$ Hz, 1H, H - C_{13}).

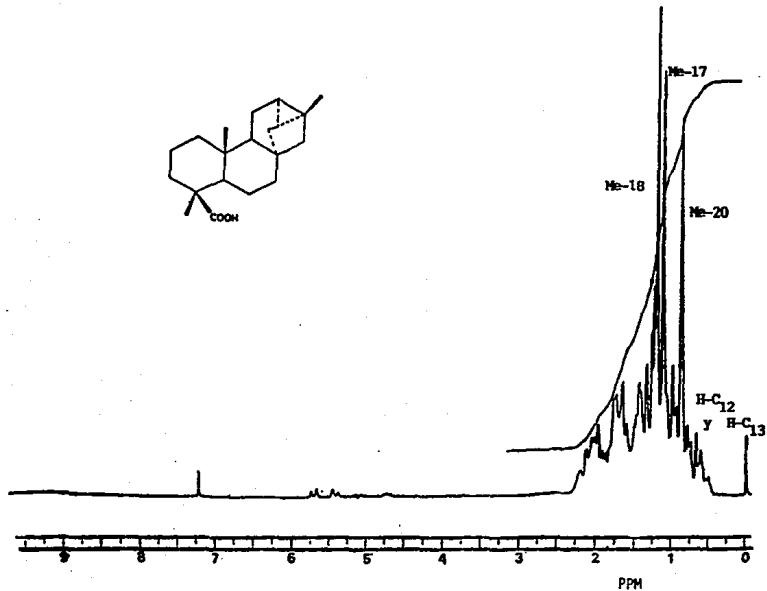
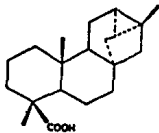
E.M. (I.E.) $^m/z$: 318 [M^+ , 26.83%], 303 [M^+ - CH_3 , 17.07%], 300 [M^+ - H_2O , 41.46%], 285 [M^+ - H_2O - CH_3 , 60.98%], 272 [M^+ - HCOOH , 14.63%], 260 [M^+ - $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, 95.12%], 257 [M^+ - HCOOH - CH_3 , 24.39%], 245 [M^+ - $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ - CH_3 , 31.77%], 91 (90.24%), 84 (90.24%), 79 (100%) y 55 (85.37%).

ESPECTROS.

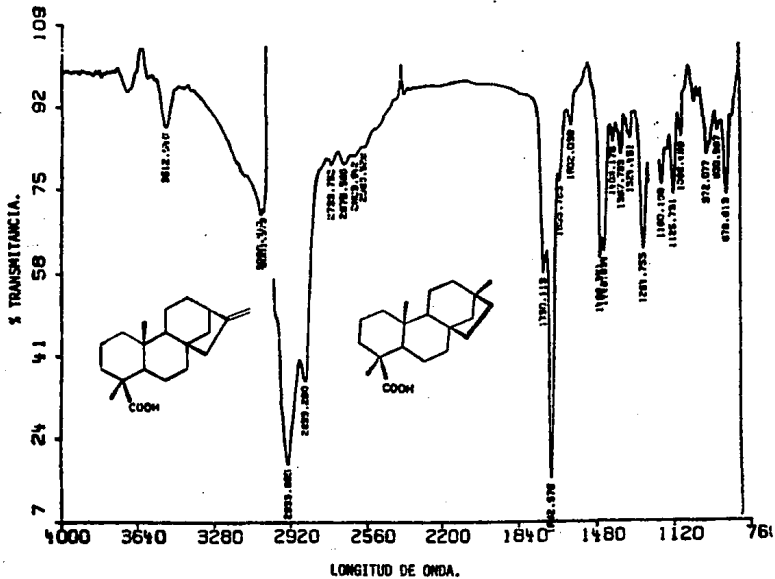
ESPECTRO 1. I. R. (CHCl_3) del Acido *ent*-traquiloban-19-oico (compuesto 1).



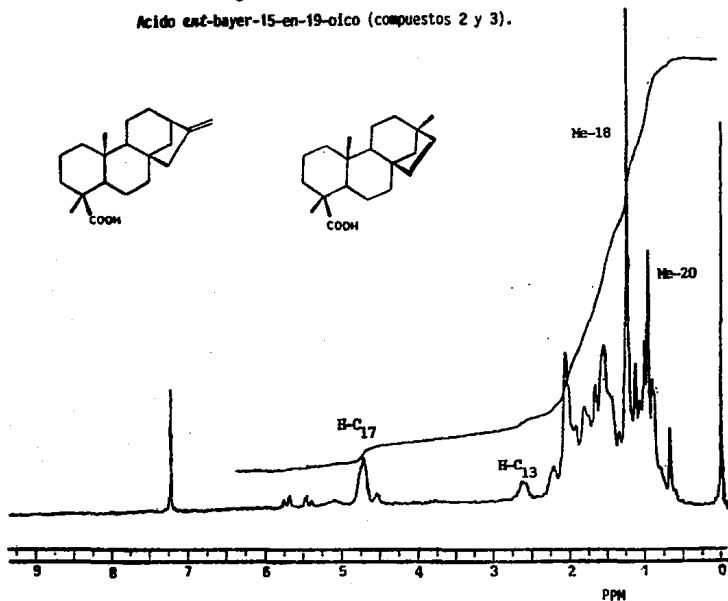
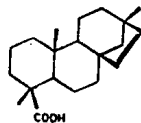
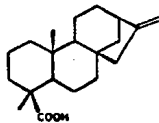
ESPECTRO 2. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido est-traquiloban-19-oico (compuesto 1).



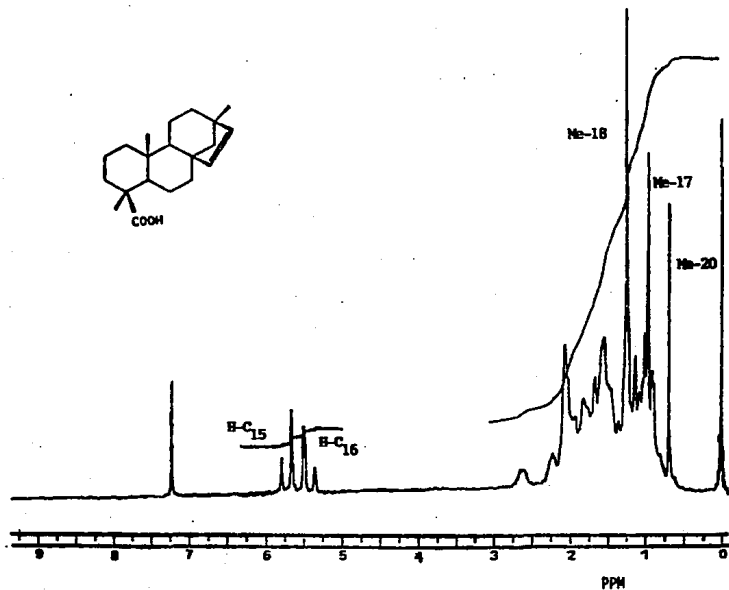
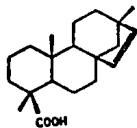
ESPECTRO 3. I.R. (CHCl_3) del Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico mezclado con el Acido *ent*-beyer-15-en-19-oico.
(compuesto 2 y 3).



ESPECTRO 4. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico mezclado con el Acido *ent*-bayer-15-en-19-oico (compuestos 2 y 3).

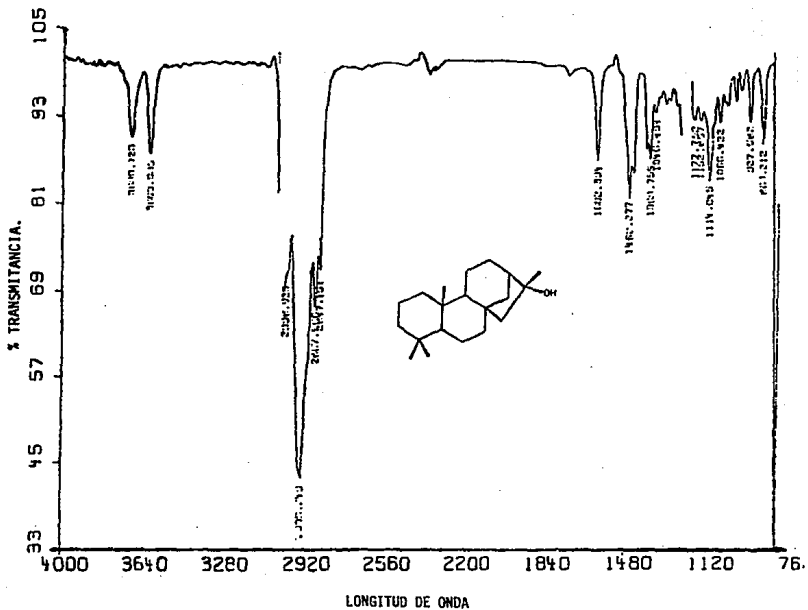


ESPECTRO 5. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido *ant*-beyer-15-en-19-oico (compuesto 3).

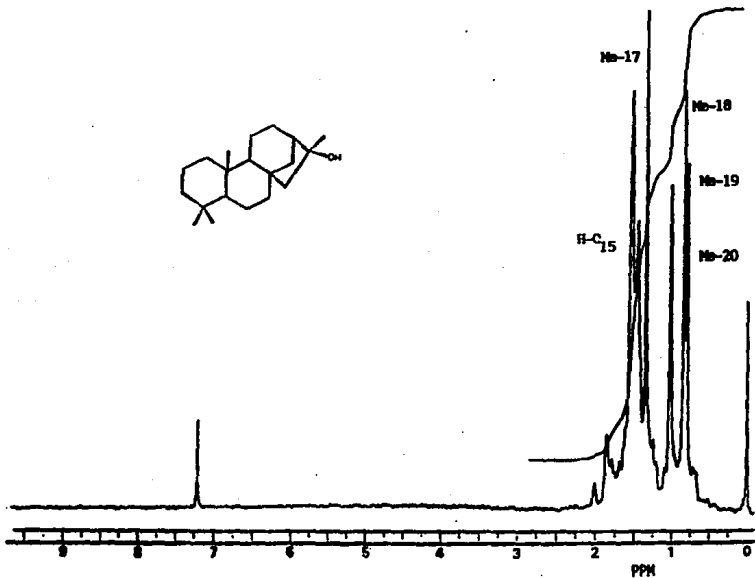


ESPECTRO 6. I.R. (CHCl_3) del 16 α -hidroxi-ent-kaurano (compuesto 4).

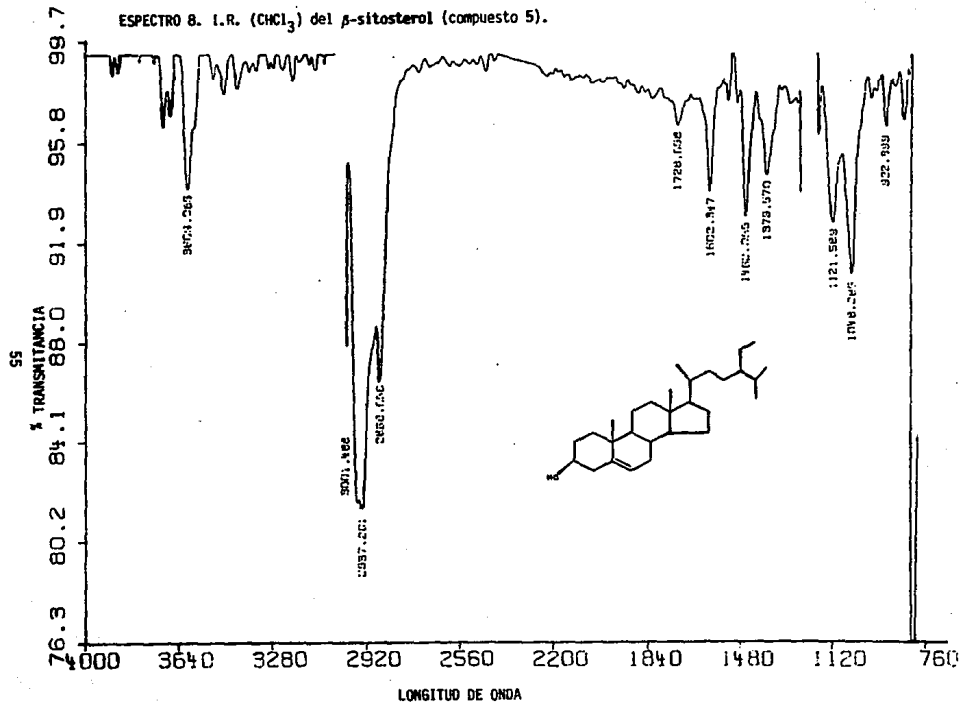
65



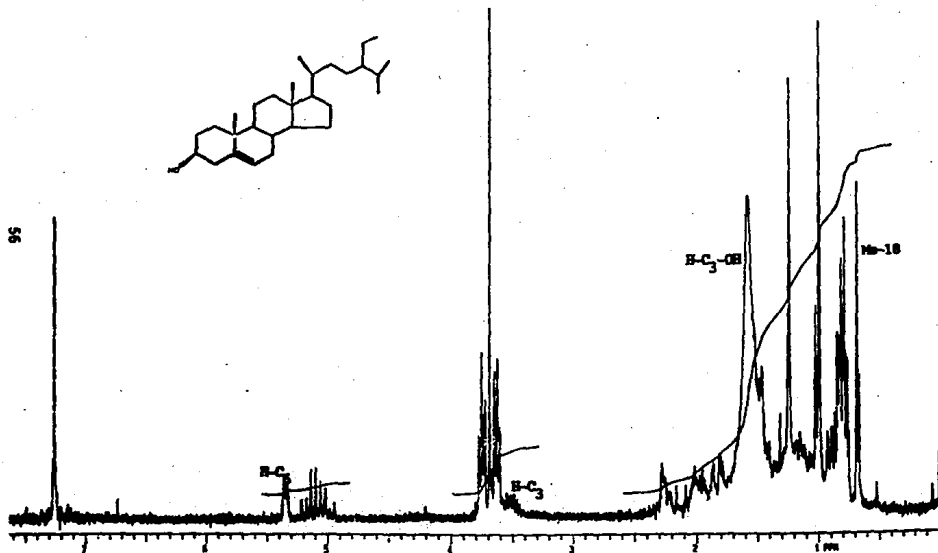
ESPECTRO 7. RMN-¹H (80 Mhz, CDCl₃, TMS) del 16 α -hidroxil-ent-kaurano (compuesto 4).

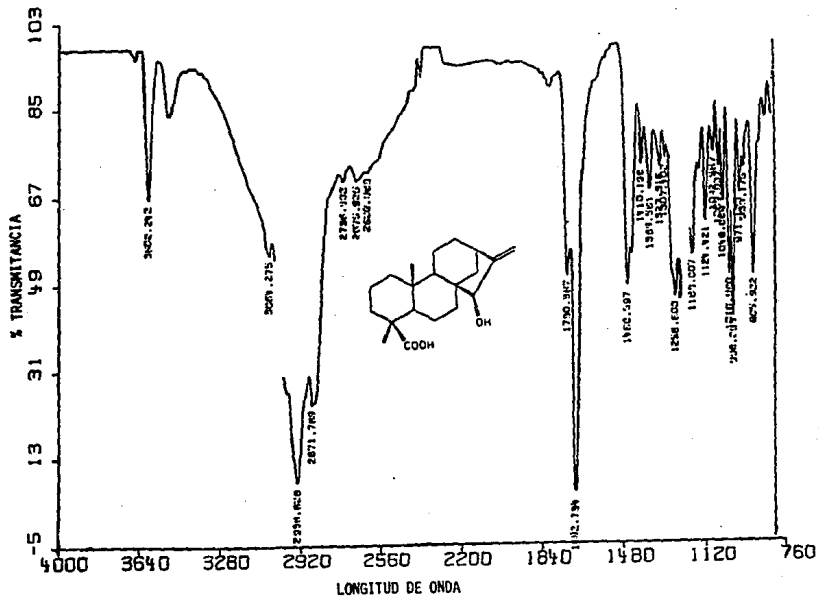


ESPECTRO 8. I.R. (CHCl₃) del β -sitosterol (compuesto 5).

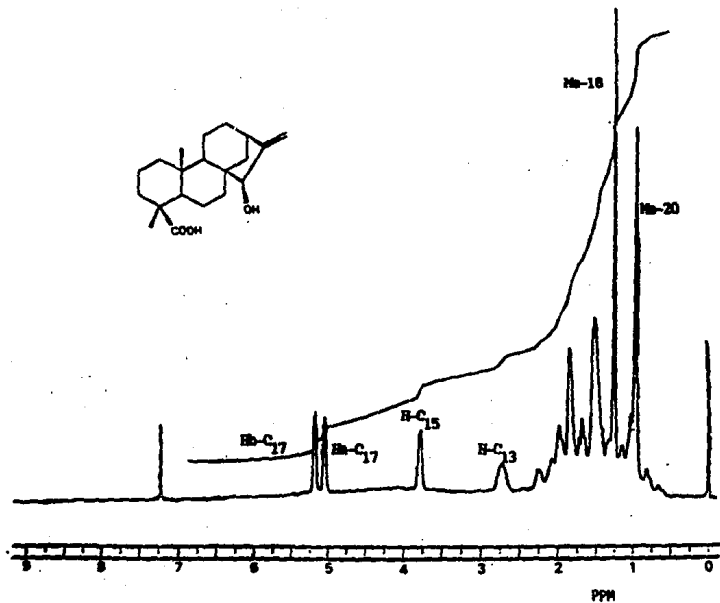
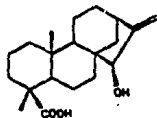


ESPECTRO 9. $\text{PMN-}^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3 , TMS) del β -sitosterol (compuesto 5).

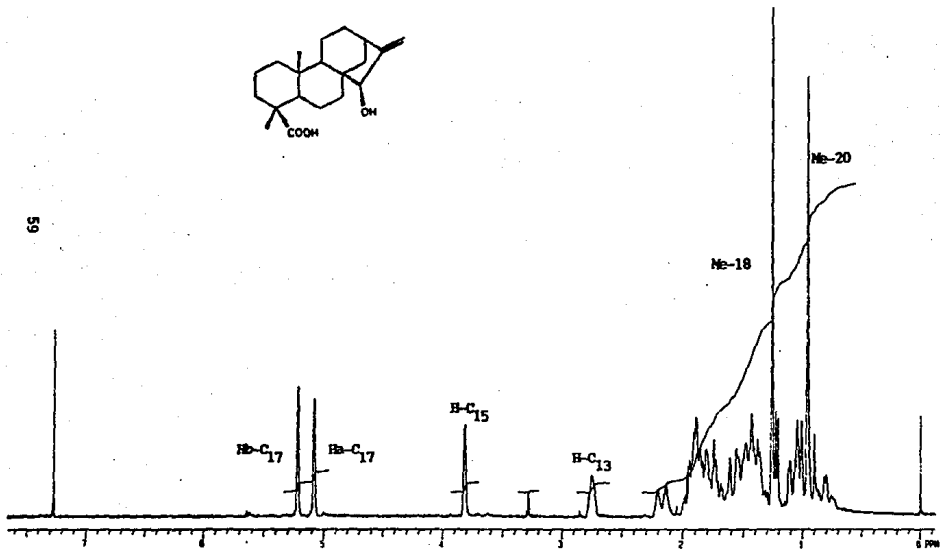
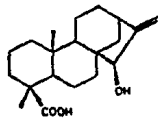


ESPECTRO 10. I.R. (CHCl₃) del Acido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (compuesto 6).

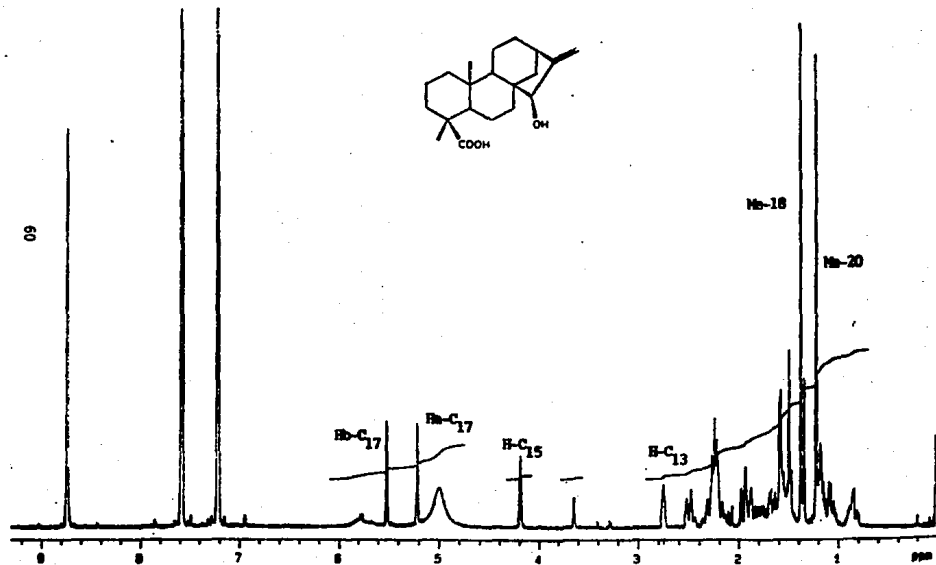
ESPECTRO 11. $\text{RMN-}^1\text{H}$ (80 Mhz, CDCl_3 , TMS) del Acido 15o-hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico (compuesto 6).



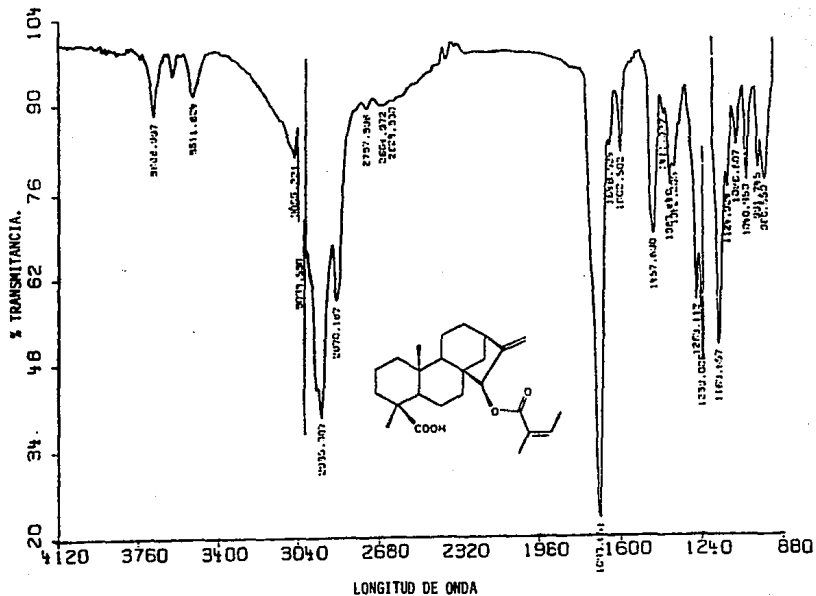
ESPECTRO 12. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido 15a-hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (compuesto 6).



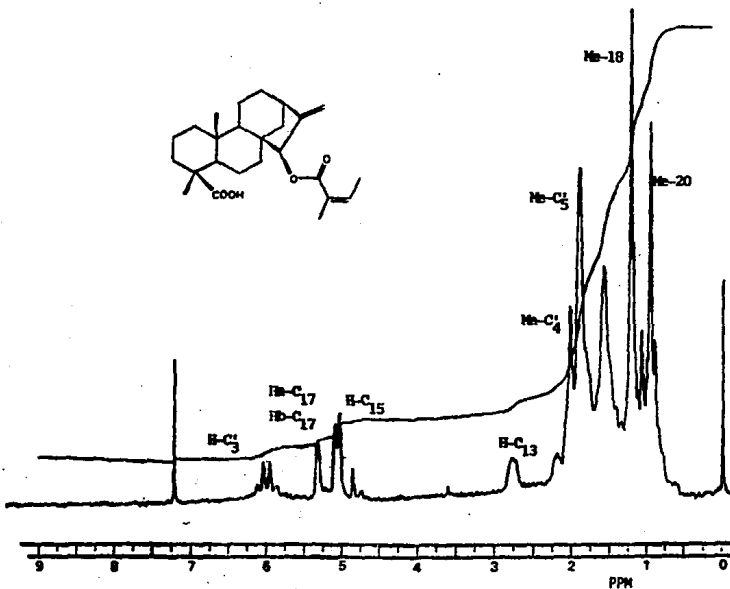
ESPECTRO 13. RMN-¹H (300 MHz, Py-D₅, TMS) del Acido 15-hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico (compuesto 6).



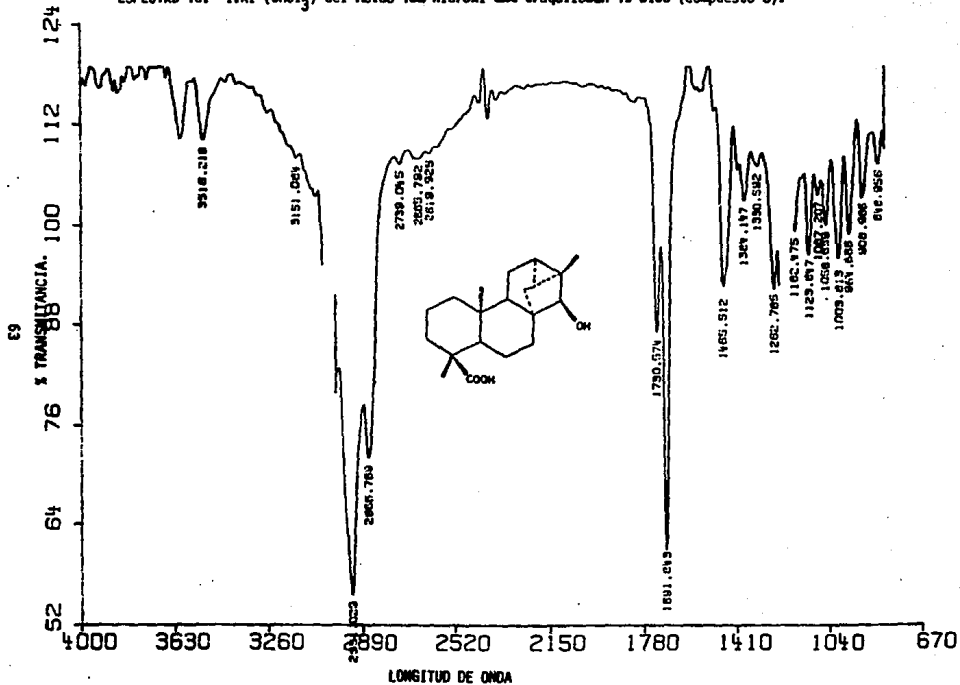
ESPECTRO 14. I.R. (CHCl₃) del Acido 15-angelilloxi-ent-kaur-16-en-19-oico (compuesto 7).



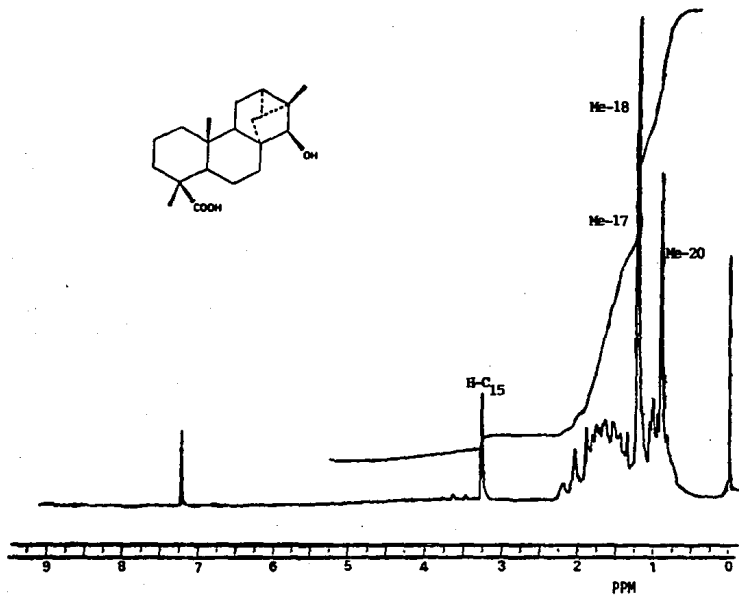
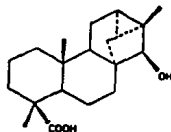
ESPECTRO 15. RMN-¹H (60 Mhz. CDCl₃, TMS) del Acido 15-angelilloxi-ent-kaur-16-en-19-oico (compuesto 7).



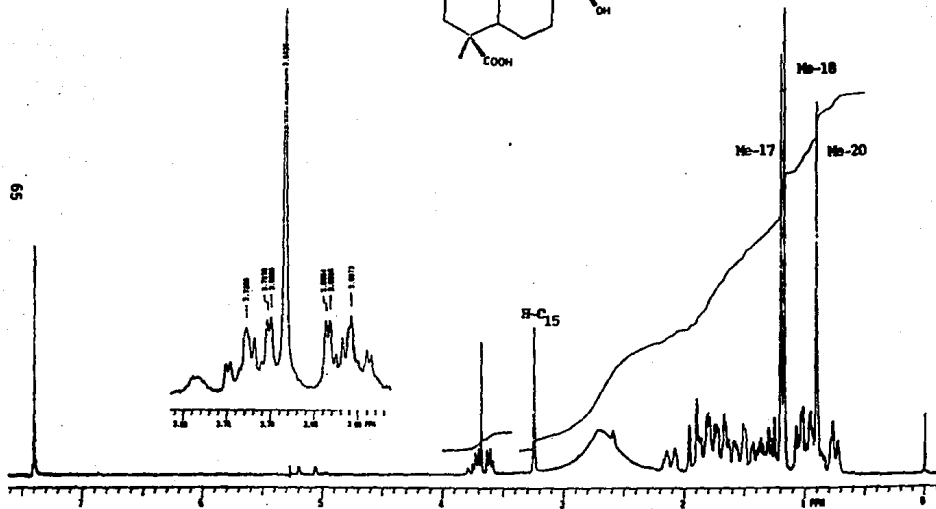
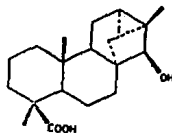
ESPECTRO 16. I.R. (CHCl₃) del Acido 15α-hidroxi-2α,6α-traquiloban-19-oico (compuesto 8).



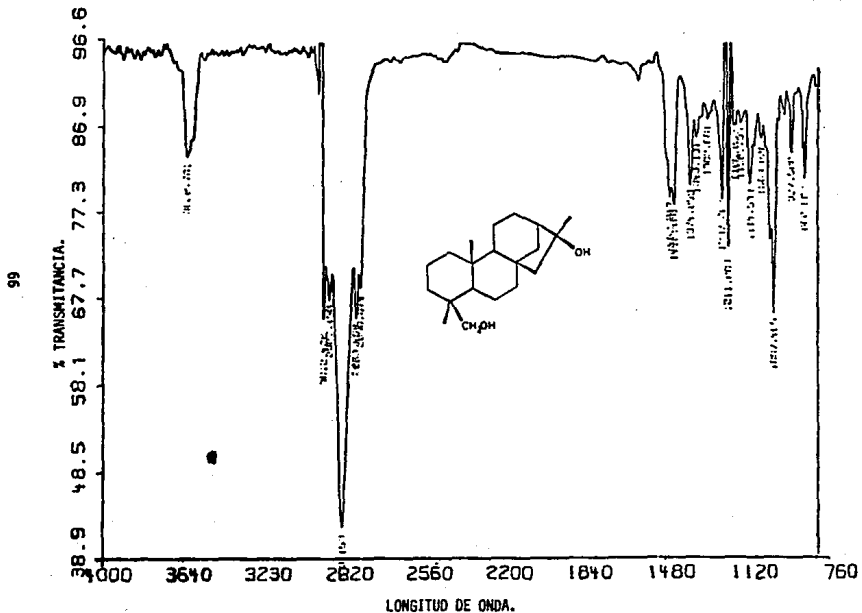
ESPECTRO 17. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (compuesto 8).



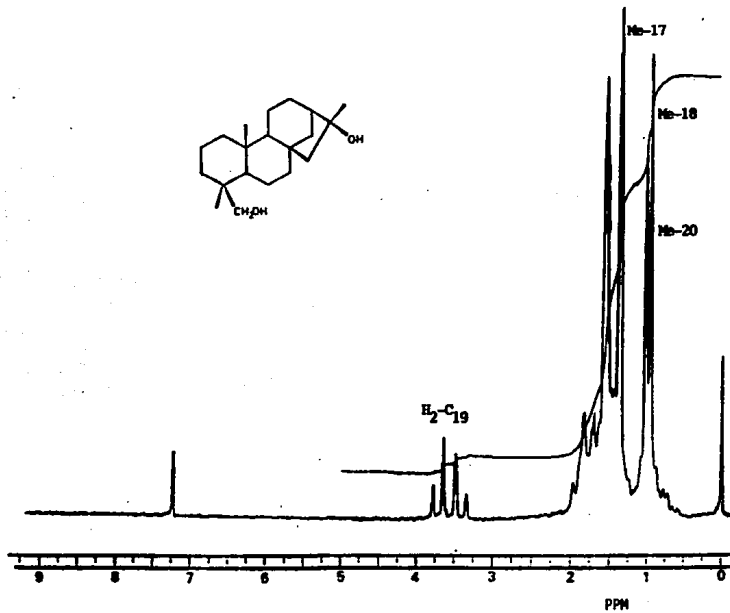
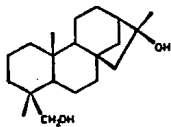
ESPECTRO 18. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido 15α-hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico
(Compuesto 8).

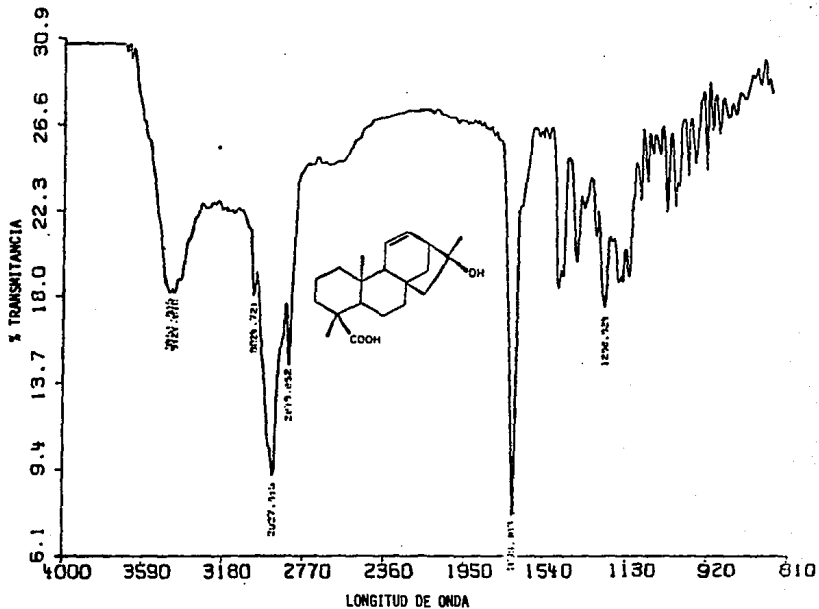


ESPECTRO 19. I.R. (CHCl₃) del 16 α -hidroxi-ent-kaur-19-ol (compuesto 9).



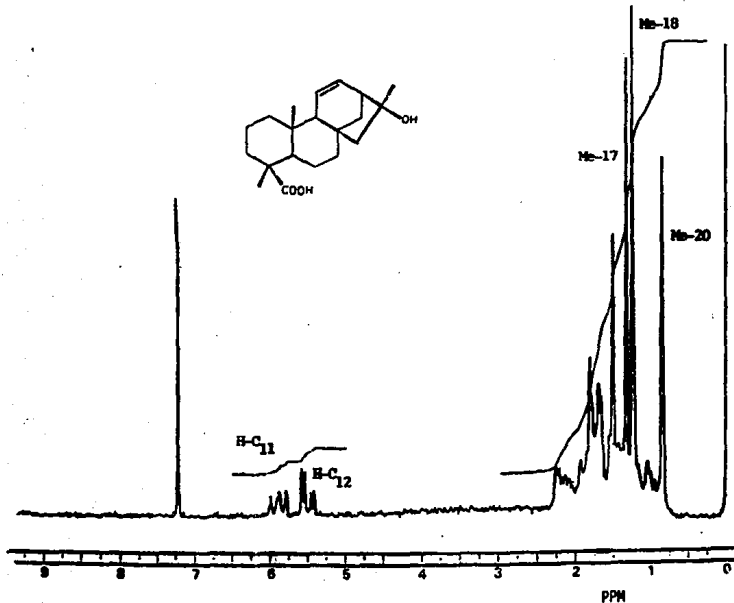
ESPECTRO 20. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del 16α-hidroxi-*ent*-kaur-19-ol (compuesto 9).



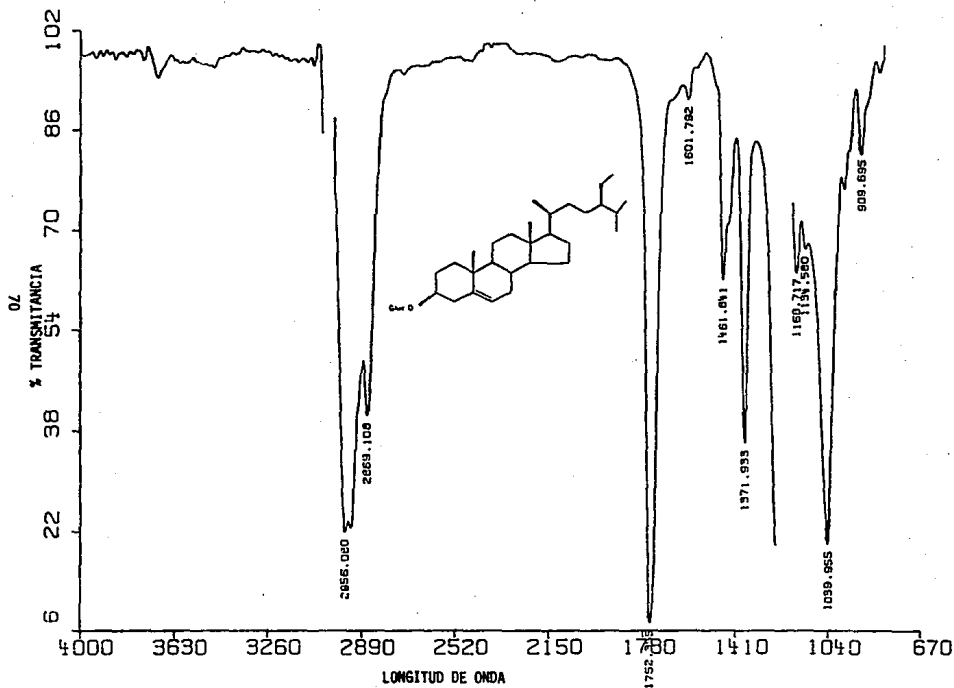
ESPECTRO 21. I.R. (CHCl_3) del *Ácido 15-hidroxi-eet-kaur-11-en-19-oico* (compuesto 10).

ESPECTRO 22. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido 15o-hidroxi-zax-kaur-11-en-19-oico (compuesto 10).

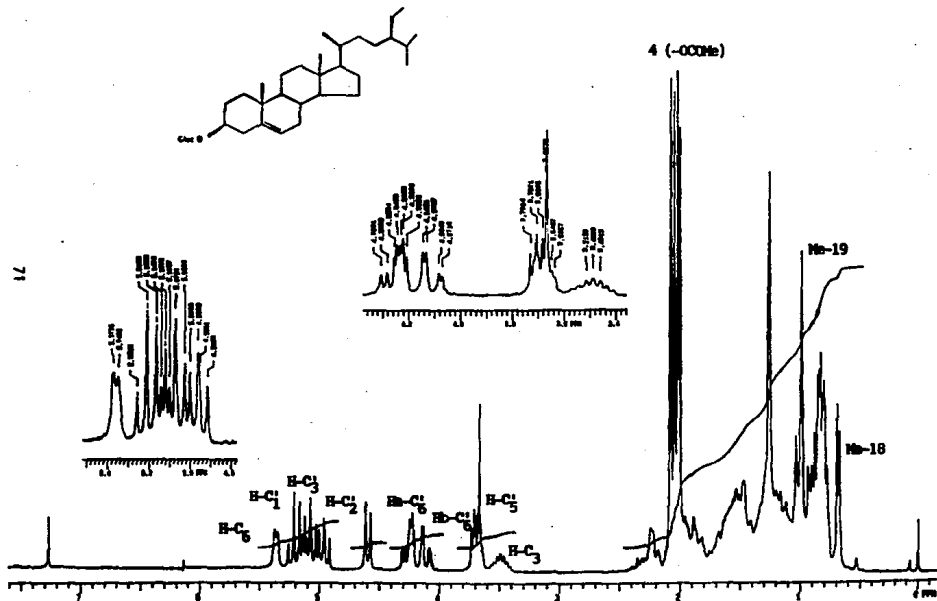
69



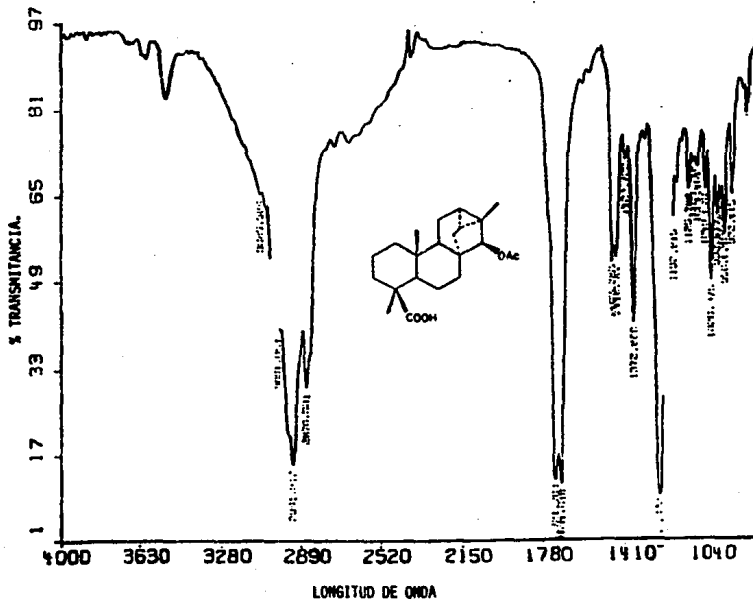
ESPECTRO 23. I.R. (KBr) del ~~per~~-acetil glucósido del β -sitosterol (compuesto 11a).



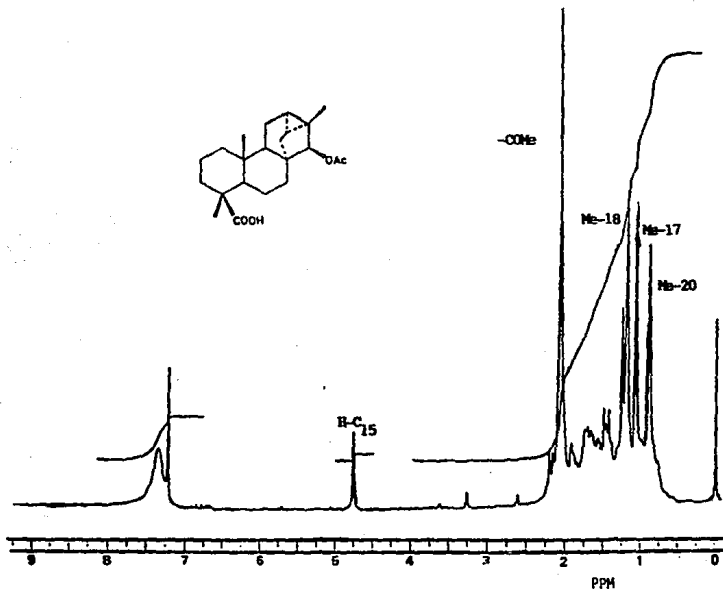
ESPECTRO 24. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS) del pex-acetil glucósido del β-sitosterol (compuesto 11a).



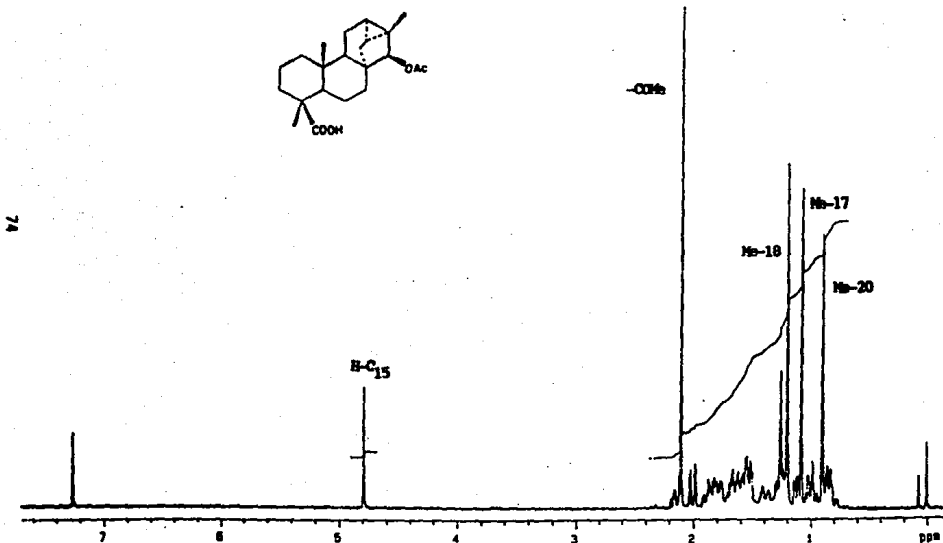
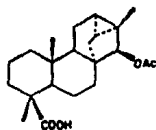
ESPECTRO 25. I.R. (CHCl₃) del Acido 15-acetoxi-*ent*-traquiloban-19-oico .



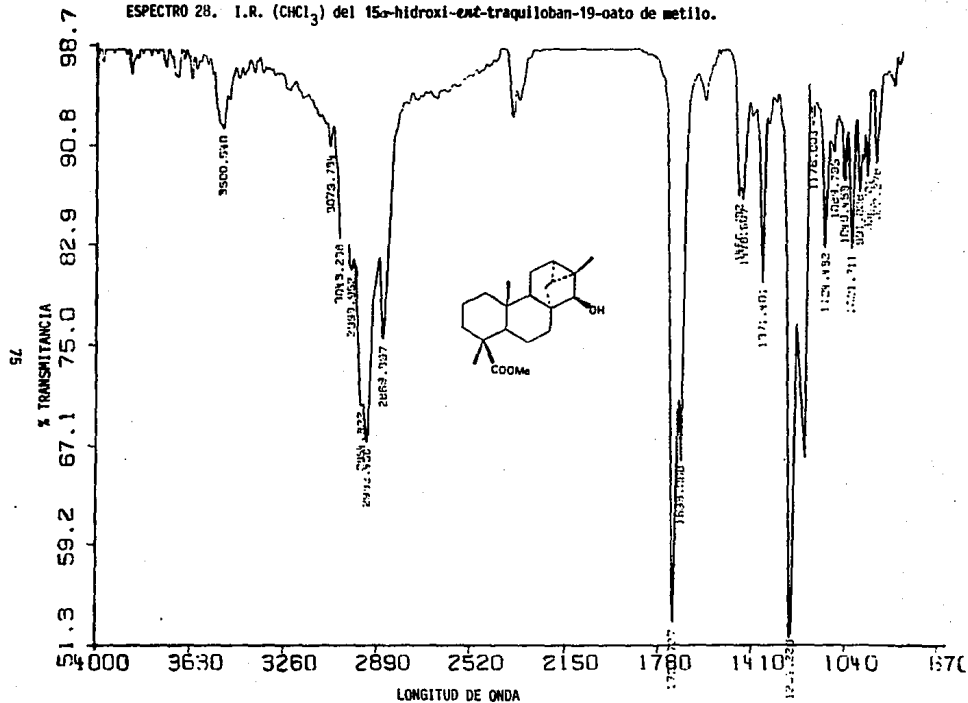
ESPECTRO 26. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del 15 α -acetoxi-ent-*traquiloban*-19-olico.



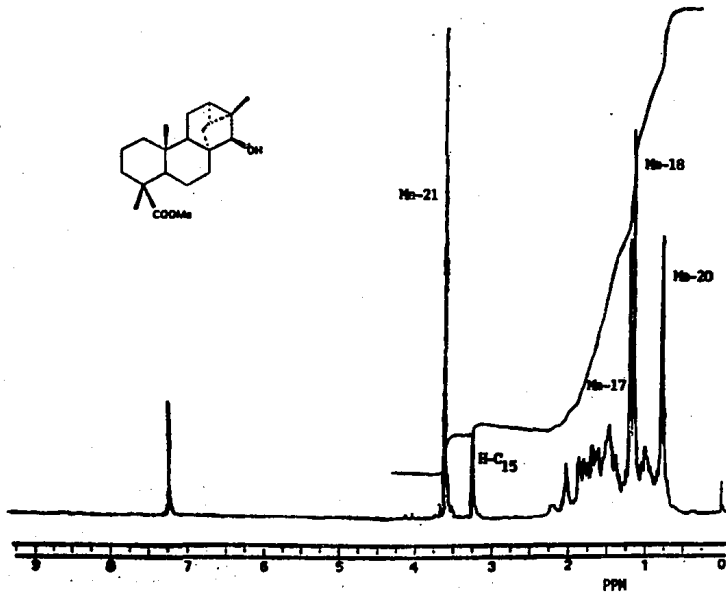
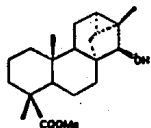
ESPECTRO 27. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del Acido 15 α -acetoxi-*ent*-traquiloban-19-*oico*.



ESPECTRO 28. I.R. (CHCl₃) del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo.

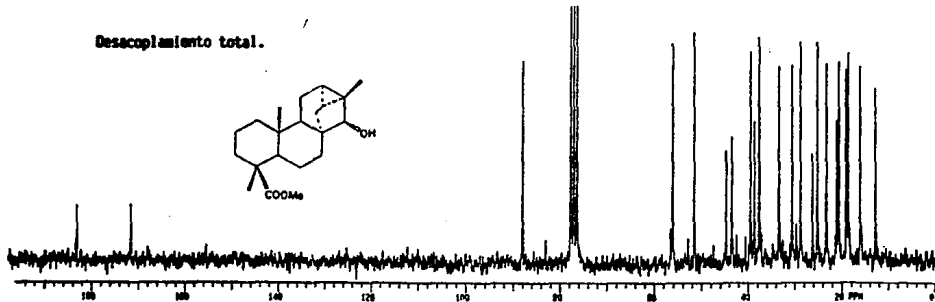
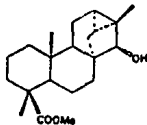


ESPECTRO 29. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del 15α-hidroxi-εα-tetraquibano-19-oato de metilo.



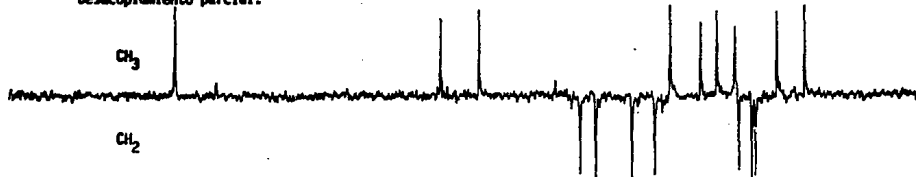
ESPECTRO 30. RMN- ^{13}C (20 MHz, CDCl_3 , TMS) del 15a-hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo.

Desacoplamiento total.



Desacoplamiento parcial.

77



RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La raíz seca de *Iostephane madrensis* fue sometida a extracción por maceración con CHCl_3 , en las condiciones que se describen en la parte experimental, para después proceder a la separación y determinación de sus metabolitos secundarios mayoritarios.

De las fracciones 2-4 y 9-16, que se obtuvieron al eluir la columna con *n*-hexano, se aisló un sólido cristalino de pf. 160-162°C, que en el espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular $[M^+]$ m/z : 302. En el espectro de infrarrojo (espectro 1) se observa una banda para la ν (O-H) de 3200-2600 cm^{-1} , y dos bandas que corresponden a la ν (C=O) en 1729 y 1692 cm^{-1} , lo cual indica la presencia de un grupo carboxilo (-COOH); el cual se comprobó al obtener el éster correspondiente por metilación con diazometano (CH_2N_2) en condiciones normales (figura 3a).

Los datos anteriores aunados con la posterior discusión, permitieron proponer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, a la cual le corresponden seis grados de insaturación. El espectro de RMN- ^1H (espectro 2) del compuesto, muestra tres singuletes a campo alto que integran para tres protones cada uno, lo cual indica la presencia de tres grupos metilos unidos a carbonos cuaternarios, observándose además dos señales complejas a campo alto (δ 0.63 y 0.77) que por su desplazamiento químico, corresponden a los hidrógenos que forman parte de un ciclopropano^[42, 43].

Por lo anterior, se propuso como hipótesis estructural un diterpeno tetracíclico, con esqueleto del tipo del traquilobano, ya que éste incorpora en su arreglo molecular a un ciclopropano (figura 2).

De esta manera se explican los seis grados de insaturación que posee la molécula; uno debido a la presencia del grupo carboxilo y los cinco

restantes corresponden al esqueleto del traquilobano (figura 3).

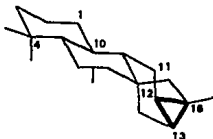


Figura 2: Esqueleto del *ent*-traquilobano, diterpeno que incorpora un anillo de 3 miembros en su arreglo molecular.

Las asignaciones para los tres singuletes observados en el espectro de RMN-¹H, correspondientes a los grupos metilo que están unidos a carbonos cuaternarios son: δ 1.11 (*s*, 3H, CH₃-17), δ 0.86 (*s*, 3H, CH₃-20), tal asignación se argumenta al considerar el efecto de anisotropía que causa el grupo carboxilo en posición axial sobre el CH₃-20^[44].

El efecto de un grupo carboxilo axial sobre un grupo metilo unido al mismo átomo de carbono es de desprotección, debido a que el grupo metilo se encuentra espacialmente muy cercano a un grupo electrotractor, de ahí que la señal que se encuentra a campo más bajo, haya sido asignada al CH₃-18 (δ 1.20, *s*, 3H). Mientras que al grupo CH₃-17 se le asignó la señal en δ 1.11, al considerar el efecto de desprotección que causa el anillo del ciclopropano. Las asignaciones descritas son consistentes con las correspondientes para diterpenos con esqueleto del *ent*-kaurano y que se muestran en la tabla VII.

De la discusión anterior y en base a la comparación de las propiedades físicas y de las características espectroscópicas, con las

reportadas en la literatura para el traquiloban-19-oato de metilo^[44], se pudo concluir que la sustancia aislada de *Iostephane madrensis* es el ácido *ent*-traquiloban-19-oico^[45,46] (figura 3), compuesto aislado previamente de *Helianthus ciliaris*^[47], *Helianthus annuus*^[48], *Viguiera pazensis*, *V. lanceolata*, *V. procumbens* y *V. bishopii*^[37].

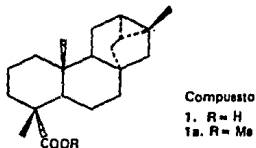


Figura 3: Acido *ent*-traquiloban-19-oico (1) y *ent*-traquiloban-19 oato de metilo (1a), aislado previamente de especies de los géneros *Viguiera* y *Helianthus*.

De las fracciones 2-4 y 25-26, que se obtuvieron al eluir la columna con *n*-hexano y una mezcla de *n*-hexano:acetato de etilo (95:5) respectivamente, se aisló una mezcla de dos compuestos; ambos muestran en el espectro de masas por impacto electrónico un ión molecular a m/z de 302.

El espectro de infrarrojo (espectro 3), muestra una banda ancha en la región de 3300 a 2500 cm^{-1} que corresponde a la ν (O-H), además dos bandas finas e intensas en 1730 y 1692 cm^{-1} que corresponden a la ν (C=O) y una banda a 920 cm^{-1} debida a la ν (O-H) fuera del plano, que sugiere la presencia de un grupo carboxilo. La presencia de un doble enlace se manifiesta por las bandas que aparecen a 3066 cm^{-1} y que corresponde a la ν (C-H) olefínico, en 1655 cm^{-1} para la ν (C=C) y en 878 cm^{-1} a la ν (C-H) fuera del plano.

La discusión anterior explica dos grados de insaturación y se propone una fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$, fórmula a la cual le corresponden seis grados de insaturación; lo cual está de acuerdo con su espectro de masas, que además muestra homogeneidad en la zona del ión molecular; por lo que se concluye que la mezcla está constituida por sustancias isoméricas.

En el espectro de RMN- 1H (espectro 4) se observan dos señales simples a campo alto, las cuales integran para tres protones cada una; al CH_2 -18 se le asignó la señal en δ 1.26 (s, 3H). En la tabla VII se observa que el desplazamiento químico para el CH_2 -18 en posición ecuatorial aumenta de 0.4 a 0.45 ppm, cuando el grupo metilo en posición axial en C-4 es sustituido por un grupo carboxilo. Estas observaciones se fundamentan si se considera en primer término, la cercanía espacial de los grupos CH_2 -18 ecuatorial y el grupo carboxilo axial, y en segundo término, el efecto electroattractor que presenta el grupo carboxilo. Por otro lado, al CH_2 -20 se le asignó la señal en δ 0.96 (s, 3H), debido al efecto de anisotropía que ejerce el grupo carboxilo, el cual provoca un efecto de protección sobre el metilo angular en el C-10, esto se debe al arreglo espacial que presenta el sistema sp^2 (plano trigonal); el cual presenta libre rotación y tiende a estar equidistante del grupo CH_2 -20^[49]. Lo anterior está de acuerdo con los datos que se presentan en la tabla VII y VIII.

Además se observa un efecto de desprotección al CH_2 -20 por el grupo carboxilo en posición axial en C-4, dicho efecto es originado por el arreglo espacial en el isómero *trans-anti-cla* que tienen los anillos del *ent*-kaurano, que ocasionan que el grupo CH_2 -20 sufra interacciones 1,3-diaxiales, en el cual la interacción corresponde a un desplazamiento a campo bajo en aproximadamente 0.12 ppm, ver figura 4.

Las señales en δ 2.64 (s. amplio, 1H, $W_{1/2}$ =12 Hz) y δ 4.73 (s. amplio, 2H, $W_{1/2}$ =11 Hz) corresponden a la presencia de un protón alílico terciario y de un metileno exocíclico respectivamente. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura para el

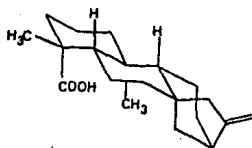


Figura 4: Esqueleto del *ent*-kaurano; donde se muestra el arreglo espacial *trans-anti*-cia de los anillos de este diterpeno.

ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico^[35] (figura 5) y por comparación directa con una muestra auténtica del mismo, confirmó la identidad de la sustancia aislada de *Iostephane madrensis*. Este compuesto ha sido aislado previamente de *Viguiera cordifolia*, *V. stenoloba* var *chihuahuense*, *V. grammatoglossa*^[50], *Wedelia bupthamiflora*^[51], *Baccharis minutiflora*^[52], *Wedelia grandiflora*^[53] y *W. glauca*^[54].

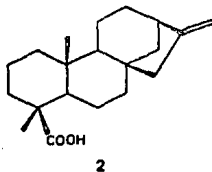


Figura 5: Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico (compuesto 2), sustancia aislada previamente del género *Viguiera*.

El otro componente de la mezcla obtenida, se encuentra en proporción minoritaria y le corresponde la misma fórmula molecular $C_{28}H_{44}O_2$, este compuesto fue identificado como el ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico (figura 6), ya que el espectro de RMN- 1H muestra dos señales dobles que forman parte de un sistema AB, que fueron asignadas a los protones vinílicos que están unidos al C-15 (δ 5.72, *d*, J_{AB} =6 Hz, 1H) y al C-16 (δ 5.42, *d*, J_{AB} =6 Hz, 1H), además se observan tres señales simples que se asignaron de la siguiente manera: Al CH_2 -20 la señal en δ 0.69, al CH_2 -18 la señal en δ 1.22, mientras que la señal en δ 1.00 fue asignada al CH_2 -17. La confirmación de la estructura propuesta se realizó mediante la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las que se encuentran reportadas en la literatura, después de su purificación por medio de cristalizaciones sucesivas y por la comparación directa con muestra auténtica^[55]. Esta sustancia ha sido aislada previamente de *Viguiera bishopii*^[37], *V. cordifolia*, de *V. grammatoglossa*^[50].

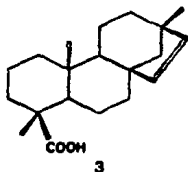


Figura 6: Acido *ent*-beyer-15-en-19-oico (compuesto 3), sustancia aislada del especies del género *Viguiera*.

Tabla VII. Desplazamientos químicos de los grupos metilo en derivados del ent-kaurano.

Grupo (R) axial en C-4	Me en C-4 Me-18	Me en C-10 Me-20	Compuesto
-Me	0.81 - 0.85	1.00 - 1.01	I R= -Me -CH ₂ OH -COOH
-CH ₂ OH	0.95 - 0.98	0.99	II R= -Me -COOMe
-COOMe	1.17	0.81 - 0.82	III R= -COOH -COOMe
-COOH	1.23 - 1.24	0.93 - 0.94	IV R= -COOMe

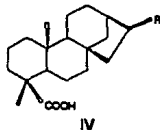
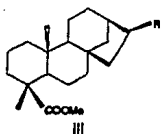
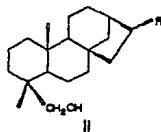
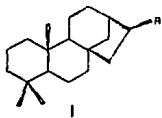


Tabla VIII. Desplazamientos químicos de los grupos metilo en derivados del *ent*-kaurano, aislados de *Isotephane madrensis*.

Grupo (R) axial en C-4	Me en C-4 Me-15	Me en C-10 Me-20	Compuesto
-Me	0.81	1.04	7
-COOH	1.21 - 1.26	0.95 - 0.96	5, 12, 14, 20
-COOMe	1.17	0.81 - 0.82	12 metilado
-CH ₂ OH	1.36	1.01	9

De las fracciones 23-31, que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (95:5), se aisló un sólido cristalino de pf. 215-217°C, que en su espectro de masas por impacto electrónico presenta un ión molecular a m/e 290. El espectro de infrarrojo (espectro 6), muestra la presencia de un grupo hidroxilo evidenciada por la banda en 3411 cm^{-1} , que corresponde a la ν (O-H). También se observa una señal doble a 1385 y 1369 cm^{-1} que indica la presencia de un *gem*-dimetilo que corresponde a la ν (C-H). Por otro lado, en el espectro de RMN- ^1H (espectro 7), se observan cuatro señales simples que integran para tres protones, los cuales corresponden a cuatro grupos metilo que están unidos a átomos de carbono cuaternario. Los datos descritos permitieron proponer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$, a la que le corresponden cuatro grados de insaturación y plantear como hipótesis estructural a un diterpeno tetracíclico con esqueleto del tipo *ent*-kaurano, con la presencia de un grupo hidroxilo como sustituyente en el átomo de C-16 (figura 7).

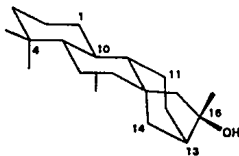


Figura 7: Esqueleto del *ent*-kaurano sustituido en el C-16.

Esta hipótesis fue confirmada al analizar el espectro de masas de este compuesto, el cual sugiere un patrón de fragmentación análogo al

propuesto para el *ent*-kauran-16-ol, y que se muestra en el esquema 3^[56]. Esta secuencia de fragmentación explica la presencia de una señal a m/z 232 (29.27%), que corresponde a la pérdida de 58 una a partir del ión molecular [$M^+ - C_2H_4O$]. La eliminación del fragmento (C_2H_4O) puede llevarse a cabo al romperse la unión entre el C(13) y C(16), con una migración del hidrógeno hidroxílico al C-13 para que posteriormente se lleve a cabo una transposición de Mc. Lafferty. La pérdida del sustituyente axial del C-4 a partir del ión [$M^+ - 58$] genera un ión a 217 unidades de masa^[56].

Las asignaciones de las diferentes señales que aparecen en el espectro de RMN-¹H (espectro 7), se realizaron de la siguiente manera: la señal en δ 0.86 (s, 3H) se asignó al CH₃-18 en posición ecuatorial, mientras que el CH₃-19 en posición axial se le asignó la señal a δ 0.81 (s, 3H), tomando en consideración que los grupos metilos en posición ecuatorial aparecen a campos más bajos que los metilos en posición axial, debido a la desprotección que ejercen las ligaduras sigma C-C sobre los sustituyentes en posición ecuatorial^[57]. Por otro lado, el CH₂-20 se le asignó la señal en δ 1.04 (s, 3H) tomando en consideración el efecto de desprotección debido a las interacciones 1,3-diaxiales con los grupos CH₃-19 y CH₃-14 (figura 8).

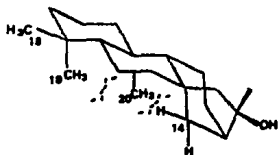
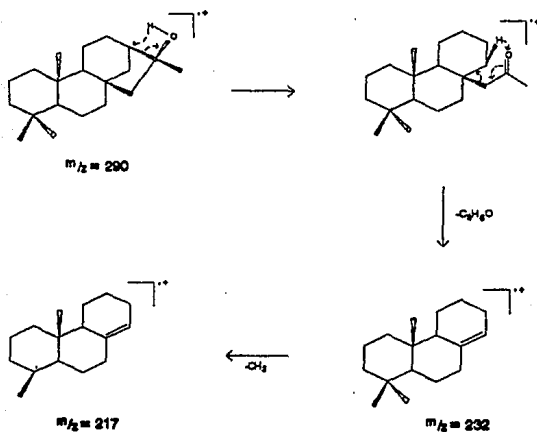


Figura 8: Interacciones 1,3-diaxiales del CH₂-20 con los grupos CH₃-19 y CH₃-14.

Esquema 3. Patrón de fragmentación del ent-kauran-16-ol. [56]



Los desplazamientos químicos asignados a los tres grupos metilos presentes en la molécula, están de acuerdo con los desplazamientos químicos que se han reportado para los derivados del *ent*-kaurano y los cuales se muestran en la tabla VII. Finalmente, las señales en δ 1.37 (s, 3H) y δ 1.45 (s, 1H) fueron asignados a los grupos CH_3 -17 y HO-C-16 respectivamente.

De la discusión anterior y de acuerdo con el patrón de fragmentación mostrado en el espectro de masas; así como la comparación de sus propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura, se concluyó que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano^[35,58] (figura 9), compuesto aislado previamente de *Viguiera bishopii*^[37], *Baccharis minutiflora*^[52] y *Wedelia grandiflora*^[53].

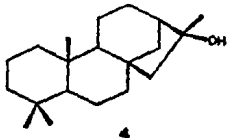


Figura 9: 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano (compuesto 4)^[35,58], metabolito secundario aislado de *Iostephane madrensis*, el cual ha sido aislado previamente de especies del género *Viguiera*.

De las fracciones 33-41, obtenidas al eluir la columna original con *n*-hexano-acetato de etilo, se aisló un sólido blanco con pf. de 149°C. El espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular a m/z 414. El espectro de infrarrojo (espectro 8), muestra la presencia de un grupo hidroxilo por las bandas en 3609 cm^{-1} y (O-H), 1379 cm^{-1}

ν (C-O) y 1048 cm^{-1} ν (O-H) fuera del plano. Estos datos permitieron proponer como hipótesis estructural a un triterpeno, con una fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$, y que tiene asociado 4 grados de insaturación.

El espectro de RMN- ^1H (espectro 9), presenta múltiples señales a campo alto que fueron asignadas de la siguiente manera; al CH_2 -18 la señal en δ 0.68 (s, 3H), el CH_2 -19 en δ 1.01 (s, 3H), mientras que al CH_2 -21 la señal en δ 0.92 (d, $J=7$ Hz, 3H). La señal en δ 0.85 (t, $J=7$ Hz, 3H) se le asignó al CH_2 -29 y los metilos 26 y 27 a una señal en δ 0.85 (d, $J=7$ Hz, 6H), una señal en δ 1.51 (s. amplio, 1H) que corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo, la señal en δ 3.5 (dddd, $J=11$ y 6 Hz, 1H) corresponde al hidrógeno del C-3, base del grupo hidroxilo, este desplazamiento se debe a la cercanía espacial con un grupo electroatractor y la señal en δ 5.4 (dd, $J=6.6$ Hz, 1H) corresponde al hidrógeno vinílico del carbono 6.

La comparación de las propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura para los correspondientes fitosteroles^[59], confirmó que la sustancia aislada de *Iostephane madrensis* fue el β -sitosterol^[38,39] (figura 10).

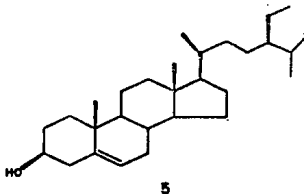


Figura 10: β -sitosterol ($\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$) (compuesto 5), sustancia frecuentemente caracterizada en la mayoría de las especies vegetales.

De las fracciones 67-90, obtenidas al eluir la columna inicial con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (90:10), se aisló un sólido cristalino de pf. 229-231°C, el espectro de masas por impacto electrónico, muestra un ión molecular en m/z 318. El espectro de infrarrojo (espectro 10), muestra la presencia de un grupo carboxilo por las bandas que aparecen en 3200-2500 cm^{-1} para la ν (O-H), 1692 cm^{-1} para la ν (C=O) y 906 cm^{-1} para la flexión fuera del plano del grupo hidroxilo. La presencia de un metileno exocíclico es evidenciada por las bandas que aparecen en 3064 cm^{-1} ν (C=C-H) y 906 cm^{-1} para la vibración fuera del plano (C=C-H), la cual aparece superpuesta con la banda de la ν (O-H). Las absorciones del grupo hidroxilo aparecen en 1061 cm^{-1} para ν (C-O) y la de 1258 cm^{-1} para la ν (C-H).

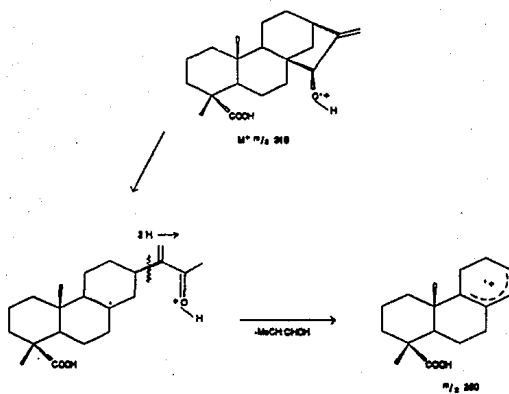
En el espectro de RMN- ^1H (espectro 11) se observan dos señales simples que fueron asignadas al CH_2 -20 (δ 0.95, *s*, 3H) y al CH_2 -18 (δ 1.21, *s*, 3H). Estas asignaciones confirman los argumentos descritos en la tabla VII y VII. Por otro lado, la señal en δ 2.70 (*s*, amplio, $W_{1/2}$ =12 Hz, 1H) se asignó al protón unido al C-13, el cual se encuentra en posición alílica.

Con base al patrón de fragmentación reportado en la literatura, se pudo verificar la presencia de un grupo hidroxilo en el C-15, debido a la eliminación del fragmento ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), la cual puede llevarse a cabo al romperse la unión entre los carbonos C(8)-C(15), y posteriormente transponerse dos átomos de hidrógeno para generar un ión en m/z 260 (95.12%). Este patrón de fragmentación se muestra en el esquema 4^[35].

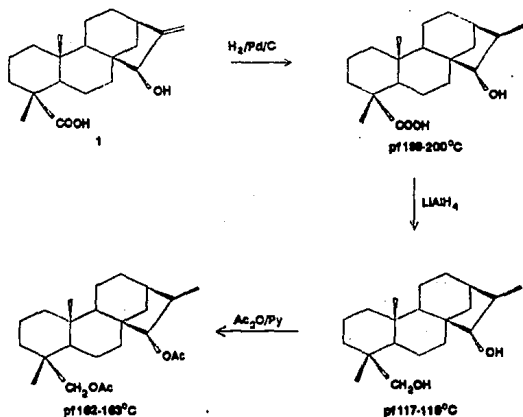
La orientación α del grupo hidroxilo en el C-15, fue establecida por Franco Piozzi y colaboradores como se describe en el esquema 5^[40]. Primeramente efectuaron la reducción catalítica del ácido grandiflórenico (pf 226-228°C), obteniéndose como producto el ácido dihidro-grandiflórenico (pf. 198-200°C), el cual posteriormente fue reducido con LiAlH_4 para obtener el diol correspondiente.

Este último fue acetilado y del producto final fue posible deducir la posición entre el grupo metilo del C-16 y la función oxigenada en

Esquema 4. Patrón de fragmentación del ácido
 15 α -hidroxil-ent-kaur-16-en-19-oico.^[35]



Esquema 5. Derivatización del ácido grandiflorénico (1), realizada por F. Piozzi y Col., para establecer la estereoquímica en C-15.



C-15, los cuales guardan una relación *trans* debido a la constante de acoplamiento ($J=4$ Hz) que hay entre el H-C₁₅ y H-C₁₆ [40,60]; esto se debe a que el grupo metilo en C-16 tiene una orientación β , ya que la hidrogenación catalítica del doble enlace en C(16)-C(17) procede por la cara α (cara alfa) de la olefina. El detalle gráfico de la estereoselección mencionada se indica en la figura 11. La estereoquímica del epímero en C-15 del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, ha sido determinada por correlación química, ver esquema 6.

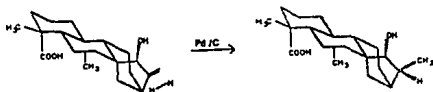
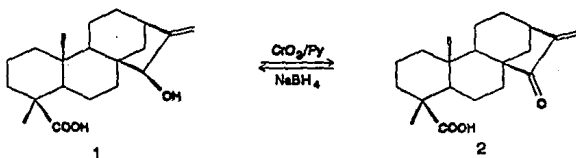


Figura 11: Detalle gráfico que muestra la estereoselección en la reacción de Hidrogenación del ácido grandiflórenico.

La oxidación del alcohol alílico secundario (I) produce la enona correspondiente (II), la cual al ser tratada con NaBH₄, produce el producto original (I). Tomando en consideración que la entrada del hidruro al C-15 es por el lado menos impedido de la molécula, por lo que se concluye que el hidroxilo tiene la orientación β [60].

De acuerdo a lo anterior y comparando las propiedades físicas y constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura, se pudo confirmar que la sustancia aislada es el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico [40,60] (figura 12). Esta sustancia

Esquema 8. Oxidación y reducción del ácido 15 β -hidroxid-ent-kaur-16-en-19-oico, para la determinación de la orientación del grupo hidroxilo.



La estereoquímica del epímero en C-15 del ácido 15 β -hidroxid-ent-kaur-16-en-19-oico, ha sido determinada por correlación química. La oxidación de alcohol alílico secundario (1), produce la enona correspondiente (2), la cual al ser tratada con NaBH₄, produce el producto original (1). Tomando en consideración que la entrada del hidruro al C-15 es por el lado menos impedido de la molécula, por lo que se concluye que el hidroxilo tiene orientación β .

ha sido aislada previamente de *Phebalium rude*^[60] entre otras.

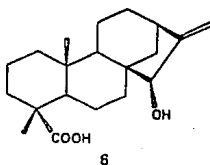


Figura 12: Acido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (compuesto 6), el cual ha sido aislado de la especie *Phebalium rude*^[60].

De las fracciones 80-90 que se obtuvieron al eluir la columna con una mezcla de disolventes formada de *n*-hexano-acetato de etilo (90:10), se aisló un sólido cristalino de pf. 185-187°C. El espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular en m/z 400, al cual se le hizo corresponder una fórmula molecular $C_{22}H_{32}O$, y la que presenta ocho grados de insaturación, que junto con los datos obtenidos del análisis espectroscópico, indica que se trata de un diterpeno tetracíclico del tipo del *ent*-kaurano esterificado con un residuo de cinco átomos de carbono.

En el espectro de infrarrojo (espectro 14), se observan bandas en 3200-2600 cm^{-1} ν (O-H), 1693 cm^{-1} ν (C=O) y 909 cm^{-1} ν (C-H), que sugieren la presencia de un grupo carboxilo. Las bandas del grupo carbonilo del éster se superponen con la ν (C=O) del grupo carboxilo; sin embargo, la presencia del grupo éster se confirma con las bandas en 1239 cm^{-1} (vibración asimétrica) y 1169 cm^{-1} (vibración simétrica), que corresponden a la unión C-O-C. La presencia del doble enlace (C=C), se manifiesta por las absorciones en 3055 cm^{-1} ν (C-H) y 1648 cm^{-1} ν (C=C).

En el espectro de RMN-¹H (espectro 15), se observan dos señales simples que se asignaron al CH₂-20 (δ 0.95, *s*, 3H) y CH₂-18 (δ 1.22, *s*, 3H) que corresponden a un derivado del *ent*-kaurano basándose en los argumentos descritos anteriormente y en los datos mostrados en la tabla VII. Al protón alílico del C-13, se le asignó la señal en δ 2.75 (*s*. amplio, W_{1/2}=12 Hz, 1H), mientras que la señal en δ 5.05 (*s*. amplio, W_{1/2}=4 Hz, 1H) se asignó al protón alílico base del éster en la posición del C-15. Asimismo se confirma la presencia de un grupo metileno exocíclico, ya que se observan señales correspondientes a este grupo funcional en δ 5.10 (*s*. amplio, W_{1/2}=5 Hz, 1H, H_a-C17) y δ 5.31 (*s*. amplio, W_{1/2}=4 Hz, 1H, H_b-C17).

El grupo éster fue identificado como el resto del ácido angélico (figura 13), el cual se dedujo a partir de las señales características que presenta en el espectro de RMN-¹H (espectro 15), las cuales son las siguientes: el H-3' vinílico se le asignó la señal a δ 6.18 (cc, J=7 y 1.2 Hz, 1H), al CH₂-4' una señal a δ 2.03 (dc, J=7 y 1.4 Hz, 3H) y para el CH₂-5', la señal en δ 1.99 (*s*. amplio, W_{1/2}=1.2 Hz, 3H).

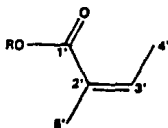


Figura 13: Fragmento derivado del ácido angélico, que se tiene como sustituyente en el C-15 del esqueleto del *ent*-kaurano, en el compuesto 7.

La presencia del residuo del ácido angélico se apoya en el patrón de fragmentación del espectro de masas, ya que presenta un ión en *m/z*: 100

(22.5%), que corresponde a la pérdida del fragmento $C_2H_2O_2$, al cual le corresponden 100 uma. La señal en m/z 83 (100%) corresponde al ión C_3H_5O , y finalmente la señal en m/z 55 (45%) corresponde a la pérdida de CO a partir del ión angelato^[61-63]. Para la determinación y posición del grupo angeloiloxi en el esqueleto del *ent*-kaureno, se sometió a hidrólisis una muestra del ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico con una solución alcohólica de KOH al 5%, obteniéndose como producto de la reacción el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, el cual es un metabolito secundario natural de *Iostephane madrensis*. La posición y orientación del grupo angeloiloxi fue determinada en base a las propiedades físicas y constantes espectroscópicas del producto aislado y del producto de reacción.

Con base a la discusión anterior y comparando las propiedades físicas y las constantes espectroscópicas y espectrométricas, con las reportadas en la literatura, se concluyó que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (figura 14)^[15,35]. Esta sustancia ha sido aislada previamente de *Viguiera stenoloba* var. *Chihuahuense*^[50], *Wedelia buphthalmiflora*^[51], *W. helianthoides* y *W. grandiflora*^[66].

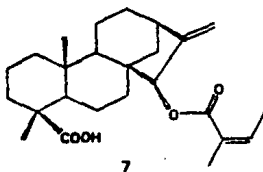


Figura 14: Ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (compuesto 7), sustancia aislada previamente de *Viguiera stenoloba* var. *Chihuahuense*^[50] entre otros.

De las fracciones 80-120, obtenidas al eluir la columna original con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (90:10), se aisló un sólido cristalino de pf. 222-224°C, que en el espectro de masas por impacto electrónico, muestra una señal correspondiente al ión molecular en m/e 318. El espectro de infrarrojo (espectro 16), muestra la presencia de una banda ancha de 3300 a 2500 cm^{-1} que corresponde a la ν (O-H), y dos bandas a 1730 y 1690 cm^{-1} que corresponden a la ν (C=O), lo cual sugiere la presencia de un grupo carboxilo, que fue confirmada al tratar la muestra de este compuesto con diazometano en éter etílico, para obtener el derivado metilado correspondiente (figura 15).

La presencia del grupo hidroxilo, fue determinada por una banda ancha a 1360 cm^{-1} , la cual corresponde a la vibración de flexión del grupo hidroxilo. La presencia de este grupo fue confirmada al acetilar una muestra de este compuesto en condiciones normales.

El espectro de RMN- ^{13}C (espectro 30), del derivado metilado en desacoplamiento total, muestra la presencia de 21 átomos de carbono. La naturaleza de un grupo funcional, así como el grado de hidrogenación de estos átomos se deduce en base a su desplazamiento químico y por la multiplicidad mostrada en el espectro de desacoplamiento parcial. En base a esto, se estableció la presencia del grupo carboxilo, cinco carbonos cuaternarios, cinco metinos, siete metilenos y cuatro metilos, por lo que la molécula posee, 21 átomos de carbono, 31 átomos de hidrógeno, 2 átomos de oxígeno del grupo carboxilo y un átomo de oxígeno del grupo hidroxilo, el cual ya estaba comprobada su presencia al formar el derivado acetilado de dicha sustancia^[64] (figura 15).

De la información anterior, se propuso una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$, que sugiere que se trata de un diterpeno tetracíclico, que presenta como esqueleto base al del *ent*-traquilobano y al que se le asocian cinco grados de insaturación.

El espectro de RMN- ^1H (espectro 17) de este compuesto, muestra la presencia de tres señales simples: las señal en δ 0.77 y δ 1.15 (s, 3H) fueron asignadas al CH_3 -20 y CH_3 -18 respectivamente, al considerar el

efecto de protección originado por el cambio de sustituyente ($\text{COOH} \rightarrow \text{COOCH}_3$) unido al C-19 en 2 compuestos diferentes que presentan el mismo esqueleto (ver tabla VIII).

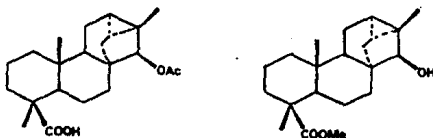


Figura 15: Derivados formados para la caracterización del ácido 15α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (compuesto 8).

Por otro lado, al comparar el desplazamiento químico del CH_2 -17 en los compuestos de las reacciones, se observa un efecto de desprotección ($\Delta\delta = -0.10$ ppm) sobre el CH_2 -17 del compuesto original; lo cual sugiere la presencia cercana de un átomo electronegativo. De ahí que la señal en δ 3.21 (s, 1H) haya sido asignada a un átomo de hidrógeno base de un grupo hidroxilo; tal asignación fue apoyada al observar en el espectro de RMN^1H (espectro 26) del derivado acetilado una señal simple en δ 4.76 (s, 1H); mientras que la señal del CH_2 -17 aparece en 1.06 ppm en este mismo compuesto.

La posición y el arreglo espacial del grupo hidroxilo, fueron confirmados con base a los datos proporcionados por el espectro de RMN^{13}C (espectro 30). En un esqueleto del tipo del *ent*-traquilobano, el grupo CH_2 -17 presenta una orientación β -ecuatorial, mientras que el grupo hidroxilo en el C-15 puede tomar dos diferentes orientaciones: β -axial y α -ecuatorial (figura 16).

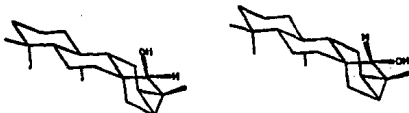
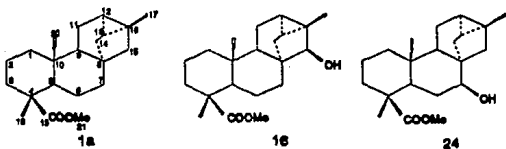


Figura 16: Posibilidades que existen en el arreglo espacial del grupo hidroxilo en el C-15 del esqueleto del *ent*-traquilobano.

El efecto de un grupo sustituyente separado por tres enlaces de un átomo de carbono depende de su orientación relativa; por ejemplo, un átomo de carbono en su conformación eclipsada ó alternada, sufre una protección mayor que su configurómero anti^[65]. Por lo que los átomos de carbono en posición γ al grupo hidroxilo, cuando éste se encuentra en una orientación β -axial, deben de sufrir un desplazamiento a campo alto, debido al efecto de compresión estérica ocasionada por el grupo hidroxilo. Sin embargo, en la tabla IX se muestra un $\Delta\delta$ mayor para los átomos de C-7, C-14 y C-17, lo que indica que existe un mayor efecto de compresión estérica entre estos átomos de carbono y el grupo hidroxilo. Por lo tanto, la disposición espacial del grupo hidroxilo queda determinada exclusivamente por el átomo de C-14, ya que las dos orientaciones posibles del grupo hidroxilo generan dos configurómeros diferentes. En el confórmero *anti* el grupo hidroxilo es β -axial por lo que el efecto γ -gauche sería nulo; mientras que en el confórmero *syn*, el grupo hidroxilo se encuentra en posición α -ecuatorial en el C-15, y es en este confórmero donde existe un mayor efecto γ -gauche que protege

Tabla IX. Desplazamientos químicos en ^{13}C para tres diferentes compuestos con esqueleto del *ent*-triquibano (CDCl_3 , TMS).



C	1a	16	24 ^a
1	39.8, t	39.79, t	39.7, t
2	18.9, t	19.19, t	19.4, t
3	38.1, t	38.18, t	38.5, t
4	43.7, s	43.82, s	43.8, s
5	57.0, d	56.73, d	64.0, d
6	21.8, t	20.89, t	24.9, t
7	39.3, t	33.94, t	74.2, d
8	40.0, s	44.25, s	47.4, s
9	52.7, d	82.12, d	82.2, d
10	38.4, s	38.89, s	39.3, s
11	19.7, t	18.87, t	22.3, t
12	20.8, d	28.12, d	24.0, d
13	24.2, d	23.99, d	21.0, d
14	33.1, t	32.72, t	32.2, t
15	80.4, t	88.76, d	45.4, t
16	22.4, s	27.87, s	30.1, s
17	30.8, e	18.02, e	50.9, o
18	28.7, o	28.60, o	29.2, o
19	177.8, s	177.92, s	179.9, s
20	12.3, o	12.74, e	13.1, o
21	---	81.08, o	---

^a Ref. 47

al C-14 (figura 17) [66,67].

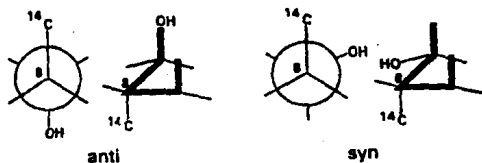


Figura 17: Proyecciones de Newman que representan el efecto 7-gauche en el compuesto 8.

La discusión anterior confirma la estructura y estereoquímica de este metabolito secundario aislado de *Iostephane madrensis*, y que fue identificado como el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico [68-70] (figura 18). Esta sustancia ha sido aislada previamente de *Viguiera* sp. Arten [68], *Helianthus annuus* [69] y *Xylopia acthiopila* [70].

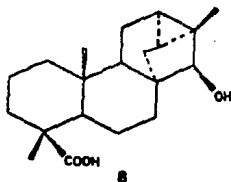


Figura 18: Acido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (compuesto 8), sustancia aislada previamente de *Viguiera* sp. Arten [68] y *Helianthus annuus* [69].

De las fracciones 138-147 que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (80:20), se aisló un sólido cristalino de pf. 201-202°C. En el espectro de masas por impacto electrónico muestra una señal correspondiente al ión $[M^+-H_2O]$ en 288 una, lo cual indica que el compuesto tiene un peso molecular de 306. En el espectro de infrarrojo (espectro 19) se observa la presencia de un grupo hidroxilo, por la banda que aparece a 3628 cm^{-1} ν (O-H); las bandas en 2929 , 2869 cm^{-1} y 1446 , 1374 cm^{-1} corresponden a la ν (C-CH) saturado, vibración asimétrica y vibración simétrica respectivamente.

Los datos anteriores aunados con la discusión posterior, permitieron proponer una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$, a la que le corresponden cuatro grados de insaturación y que se le atribuyen al esqueleto base de la molécula; lo que permitió que se planteara como hipótesis estructural el esqueleto de un *ent*-kaurano.

En el espectro de RMN- 1H (espectro 20) de este compuesto, se observa un sistema AB, que por su desplazamiento químico (δ 3.55) corresponde a dos protones no equivalentes (diasterotópicos) que se encuentran cercanos a un grupo hidroxilo y que se asignó al metileno en posición axial sobre el átomo de C-4^[71]. Lo anterior puede confirmarse en base al espectro de masas^[56], ya que se observa un pico a m/z 275 (46.35 %) que corresponde a la pérdida del sustituyente axial en C-4 y el cual genera el fragmento $[M^+-CH_2OH]$. Por otro lado, en su espectro de RMN- 1H , presenta tres señales que corresponden a los tres grupos metilos presentes en el esqueleto del *ent*-kaurano, que fueron asignados de la siguiente manera: al CH_3 -20 se le asignó la señal en δ 1.01 (*s*, 3H), observándose que no existe variación en el desplazamiento químico de éste grupo cuando se reemplaza un grupo metilo axial por el grupo $-CH_2OH$. Mientras que el grupo metilo ecuatorial unido al C-4 se le adjudicó la señal en δ 0.96, y mostró un efecto de protección ($\Delta\delta$ = 0.1 ppm), debido a la presencia del grupo $-CH_2OH$, lo que está de acuerdo con los desplazamientos químicos enlistados en la tabla VII^[44]. La señal en δ 1.36 fue asignada al

CH₃-17, debido a la cercanía del grupo hidroxilo; lo cual fue demostrado por la pérdida de 58 uma a partir del ión molecular M⁺-C₃H₈O, la eliminación de este fragmento se ilustra en el esquema 7 [56]. Asimismo, la pérdida del sustituyente axial en C-4 a partir del M⁺-58, genera un ión a 217 (26.83%), comprobando que el grupo CH₃-17 se encuentra en posición geminal al grupo hidroxilo.

De la anterior discusión y comparando los resultados con datos físicos y espectroscópicos de esta molécula reportados en la literatura se pudo concluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol [72,73] (figura 19) compuesto aislado previamente de *Helianthus annuus* [69].

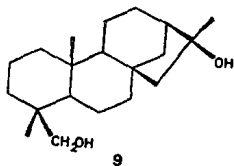
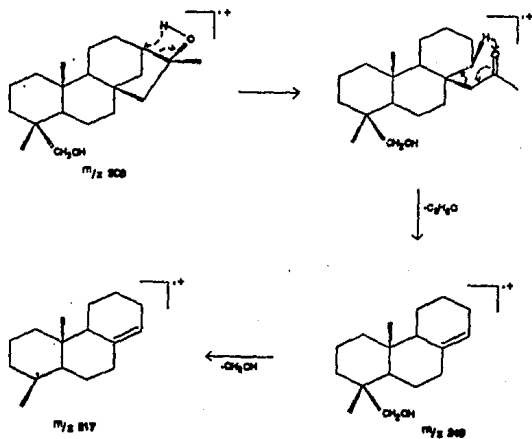


Figura 19: 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol (compuesto 9), sustancia aislada del girasol (*H. annuus*) [69].

De las fracciones 250-264, que fueron obtenidas al eluir la columna con una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo (70:30), se aisló un sólido que presenta un pf. 234-236°C, el cual muestra en el espectro de masas por ionización química, una señal correspondiente al ion M+1 en m/z 319. En el espectro de infrarrojo (espectro 21), se muestra la presencia de un grupo carboxilo, debido a la presencia de bandas a 3250-2500 cm⁻¹ que corresponde a la vibración ν (O-H), 1699 y 890 cm⁻¹ que corresponden a la ν (C=O) y ν (O-H) respectivamente. La presencia de una doble ligadura se manifiesta por la banda en 3024 cm⁻¹ que

Esquema 7. Patrón de fragmentación del
16 α -hidrox-*ent*-kaur-19-diol.^[66]



corresponde a la ν (C-H olefinico) y las bandas a 3452 cm^{-1} ν (O-H) y 1238 cm^{-1} ν (O-H) que indican la presencia de un grupo hidroxilo. De esta manera se explican dos grados de insaturación, de los seis que corresponden a un compuesto de fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_2$.

El espectro de RMN- ^1H (espectro 22) presenta señales similares a los ácidos *ent*-kauránicos, ya que se observan tres señales simples que corresponden a los tres grupos metilos unidos a átomos de carbono cuaternario y que fueron asignados tomando en cuenta los argumentos descritos anteriormente y en base a los datos mostrados en la tabla VII. Por lo tanto, la señal en δ 0.84 (*s*, 3H) fue asignada al grupo metilo del C-10, mientras que al grupo metilo unido al C-4 se le asignó la señal a δ 1.23 (*s*, 3H). La señal en δ 1.31 (*s*, 3H) corresponde al CH_3 -17, ya que su desplazamiento químico sugiere la cercanía de un átomo electronegativo como el oxígeno, y el cual se encuentra en el mismo átomo de carbono al que está unido el grupo metilo. Por otro lado, se observa en la zona de los protones vinílicos, cuatro señales que forman parte de un sistema AB; en el cual cada parte del sistema interactúa con un protón adicional, indicando la presencia de una fórmula parcial representada en la figura 20.

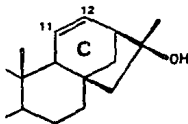


Figura 20: Estructura parcial en la caracterización del compuesto 10.

El anillo C de un esqueleto del tipo del *ent*-kaurano, es el único sitio donde es posible ubicar el fragmento estructural recién descrito, por lo que la señal en δ 5.89 (dd, $J=10$ y 4 Hz, 1H) fue asignada al H-C₁₂, mientras que la señal a δ 5.50 (dd, $J=10$ y 4 Hz, 1H) se asignó al H-C₁₁.

En base a la discusión teórica anterior y por medio de la comparación de sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con las ya reportadas en la literatura, se pudo concluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico^[74] (figura 21). Esta sustancia ha sido aislada previamente de *Helianthus salicifolius*^[74].

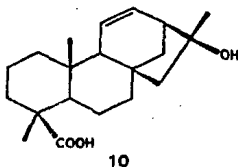


Figura 21: Acido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico (Compuesto 10), sustancia previamente aislada de *H. salicifolius*^[74].

De las fracciones 399-430, obtenidas al eluir la columna con acetato de etilo puro, se aisló un sólido cristalino que descompone con la temperatura, el cual es soluble en etanol y metanol. El espectro de infrarrojo (espectro 23), muestra una banda intensa en 3415 cm⁻¹ lo que permitió suponer que la molécula presenta varios grupos hidroxilo, lo cual la hace muy polar y poco manejable para el análisis espectroscópico, siendo necesario la preparación del correspondiente

per-acetil derivado como se indica en la parte experimental. De la reacción se obtuvo un sólido cristalino blanco, con pf. de 149-151°C, siendo soluble en cloroformo, acetato de etilo y acetona, insoluble en hexano. El espectro de masas por impacto electrónico presenta un ión molecular en m/z 396 (M^+ -348, 100%). El espectro de infrarrojo (espectro 23) presenta una banda en 1752 cm^{-1} , lo que nos indica la presencia de un carbonilo (C=O) correspondiente de los grupos acetato adicionados a la molécula original. Estos datos permitieron proponer una hipótesis estructural de un triterpeno derivado del β -sitosterol, al que le corresponde una fórmula molecular $C_{32}H_{58}O_{10}$.

El espectro de RMN- ^1H (espectro 24) del compuesto acetilado, presenta señales múltiples a campo alto, asignadas de la siguiente manera: δ 0.676 (s, 3H, CH_3 -18), δ 0.988 (s, 3H, CH_3 -19), δ 0.852 (d, J=7 Hz, 6H, CH_2 -26 y CH_2 -27), δ 0.935 (d, J=7 Hz, 3H, CH_3 -21), δ 5.361 (d, J=8 Hz, 1H) asignada al hidrógeno del C-6, base del grupo glucosídico. Las siguientes asignaciones corresponden a los hidrógenos de la molécula de glucósido, las cuales son: δ 4.597 (d, J=8 Hz, 1H) asignada al H-C $_1$, δ 4.966 (dd, J=10 Hz, 1H) asignada al H-C $_2$, δ 5.219 (t, J=10 Hz, 1H) correspondiente al H-C $_3$, δ 5.083 (t, J=10 Hz, 1H) asignado al H-C $_4$, δ 3.681 (ddd, J=10.5 y 2 Hz, 1H) señal del H-C $_5$, δ 4.229 (dd, J=10 y 5 Hz, 1H) correspondiente al H-C $_6$, δ 4.112 (dd, J=10 y 2 Hz, 1H) señal del H-C $_7$, además 4 señales entre δ 2.007 y 2.079 (4s, 12H) que corresponden a los cuatro grupos metilo de los grupos acetato adicionados a la molécula original.

De la discusión anterior y en base a la comparación de las propiedades físicas y características espectroscópicas reportadas en la literatura, se concluyó que la sustancia analizada es el *per*-acetil-glucósido del β -sitosterol, por lo tanto la sustancia aislada de *Iostephane madrensis* es el glucósido del β -sitosterol (figura 22) [41,59].

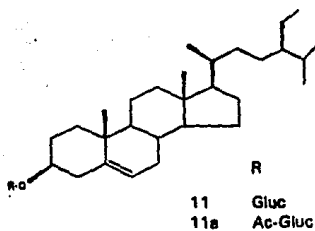


Figura 22: Glucósido del β -sitosterol (compuesto 11), sustancia producida por la mayoría de las especies vegetales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES.

- Del presente estudio se aislaron e identificaron 11 metabolitos secundarios, todos ellos del extracto cloroformico de la raíz seca de la cachana, que fue colectada en la ciudad de Chihuahua. De las sustancias aisladas 9 son diterpenos policíclicos, 2 de ellas son derivados del *ent*-traquilobano, 6 del *ent*-kaurano y 1 del *ent*-beyereno, además de 2 triterpenos derivados del β -sitosterol, todas ellas aisladas por metodos convencionales de laboratorio. El análisis estructural de estas sustancias, se realizó con base a los datos obtenidos del análisis espectroscópico y espectrométrico de cada una de ellas, además de sus constantes físicas características de la misma, comparando los datos obtenidos con referencias reportadas en la literatura.

- Del análisis estructural se identificaron las siguientes sustancias: ácido *ent*-traquiloban-19-oico, ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico, ácido *ent*-beyer-15-en-19-oico, 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano, β -sitosterol, ácido 15 α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico, 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-ol, ácido 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico y el glucosido del β -sitosterol. Estas sustancias han sido aisladas previamente de los géneros *Viguiera*, *Tithonia* y *Helianthus*, lo que nos indica la gran relación genética y filogenética que existe entre éstos géneros y el género *Iostephane*, esta consideración nos indica que la hipótesis propuesta es aceptada, por lo tanto el objetivo primordial del presente estudio ha sido alcanzado, ya que este trabajo ayuda a enriquecer el conocimiento que se tiene de las plantas de uso medicinal, utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana, bajo un enfoque científico para su mejor aprovechamiento.

RECOMENDACIONES.

- Integrar áreas del saber como Farmacología, Fisiología, Medicina, etc. para determinar el efecto terapéutico o toxicológico que presentan las sustancias aisladas en el presente trabajo, ya que con esto se obtendría una mayor información para un mejor uso de las mismas.

- En estos tiempos, la medicina moderna ha sido desplazada lentamente por la medicina tradicional, no solo en México, sino en todo el Mundo; volviendo a la utilización de la medicina tradicional en forma de té, tisanas, etc. los cuales no sufren procesos de ninguna especie, ya que se utilizan de manera natural, impidiendo que sustancias utilizadas comunmente en la medicina moderna como conservadores, colorantes y demás excipientes, no sean utilizados, impidiendo que se produzcan reacciones secundarias en el organismo o si se presentan sean muy leves. Por esto se debe de crear una sociedad, la que se encargue del estudio de las plantas de uso medicinal en México, para el mejor aprovechamiento de los recursos vegetales del país y para la creación de nuevas tecnologías en el área de la salud.

BIBLIOGRAFIA

1. Thomson, R.M.; *The Chemistry of Natural Products*. Blackie & Son Limited, Great Britain, 154-155 (1985).
2. Hegnauer, R.; *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic press, Great Britain, 283-324 (1977).
3. Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R. and Rahman, S.K.; Why are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized. *J. Nat. Prod.* 52, 1189-1208 (1989).
4. Bye, R.A.; *Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants*. *Economic Botany* 40, 103 (1986).
5. Lozoya, Xavier y Lozoya, Mariana.; *Flora Medicinal de México*. 1ª parte: Plantas Indígenas. IMSS, México, 1-16 (1982).
6. Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth, N.R.; *Economic and Medicinal Plants Research*. Academic Press, New York, 20-35 (1985).
7. Tyler, Varro E.; *Medicinal Plant Research: 1953-1987*. *Planta medica* 54, 95-100 (1988).
8. Seto, Harvo.; *Structural Studies of Natural Products by New NMR Techniques*. *Pure and Appl. Chem.* 61, 365-368 (1989).
9. Rzedowski, J.; *Contribuciones a la Fitogeografía Florística e Histórica de México*. III; *Algunas Tendencias en la Distribución Geográfica y Ecológica de las Compositae Mexicanas*. *Ciencia XXVI* (9-5), 123-132 (1972).
10. Sanchez, S.O.; *La Flora del Valle de México*. Herrero, México, 390-391 (1972).
11. Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Acriba, España, 291-305 (1991).
12. Swain, Tony and Williams, C.A.; *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press, Great Britain, 673-693 (1977).

13. Delgado, G., Romo de Vivar, A., Ortega, A., Cardenas, J. and Schlemper, E.O.; Diterpenoids from *Viguiera insignis*. *Phytochemistry* 22, 1227-1230 (1983).
14. Delgado, G., Garcia, P.E., Bye, R. and Linares, E.; Eremophilanolides from *Roldana sessilifolia*. *Phytochemistry* 30, 1716-1719 (1991).
15. Delgado, G., Alvarez, L. and Romo de Vivar, A.; Terpenoides and a Flavan-3-ol from *Viguiera quinqueradiata*. *Phytochemistry* 23, 675-678 (1984).
16. Delgado Lamas, E.G.; Las Lactonas Sesquiterpénicas en 5 Especies del Género *Viguiera* (Compositae, Heliantheae). Implicaciones Quimiotaxonómicas. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM (1981).
17. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Grenz, M., Suding, H., Robinson, H. and King, R.M.; Germacranolids and Diterpenes from *Viguiera* species. *Phytochemistry* 20, 113-116 (1981).
18. Cuevas, L.A., Garcia Jimenez, F. y Romo de Vivar, A.; Estructura de la Estenolobina. *Rev. Latinoamericana Quim.* 3, 22-27 (1972).
19. Bohlmann, F., Zdero, C. und Mahanta, P.; Neue Diterpene aus *dimorphothea* und *Viguiera* arten. *Phytochemistry* 16, 1073-1075 (1977).
20. Aguilar, M.I., Delgado, G., Bye, R. and Linares E.; Bisabolones, Polycyclic Diterpenoids and other Constituents from the Roots of *Iostephanne heterophylla*. *Phytochemistry* 33, 1161-1163 (1993).
21. Linares, E. and Bye, R.; A Study of Four Plant Complexes of Mexico and Adjacent United States. *J. of Ethnopharm* 19, 153 (1987).
22. Watson, S.; Contributions to American Botany. *Proc. Amer. Academ. Arts.* 23, 27 (1988).
23. Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. and Hammond, G.S.; *Química Orgánica*. Mc Graw-Hill, México, 568-574 (1987).
24. Evans, W.C.; *Farmacognosia*. Interamericana-Mc Graw-Hill, México, 312-317 (1989).

25. Bruneton, J.; Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Acriba, España, 226-317 (1989).
26. Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E.; Farmacognosia. El Ateneo, Argentina, 170-176 (1979).
27. Robinson, D.R. and West, Ch.A.; Biosynthesis of Cyclic Diterpenes in Extracts from Seedling of *Recinus communis* L. 11. Conversion of Geranylgeranyl-pyrophosphate into Diterpene Hydrocarbons and Partial Purification of the Cyclization Enzymes. *Biochemistry* 9, 80-89 (1970).
28. Shechter, I. and West, Ch.A.; Biosynthesis of Cyclic Diterpenes from Trans-geranylgeranyl-pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 244, 3200 (1969).
29. Uppier, Ch.D. and West, Ch.A.; Biosynthesis of Gibberellins. II. Enzymic Cyclization of Geranylgeranyl Pyrophosphate to Kaurene. *J. Biol. Chem.* 244, 3285-3292 (1967).
30. Briggs, L.H. and White, G.W.; Constituents of the Essential Oil of *Araucaria araucana*. *Tetrahedron* 31, 1311-1314 (1975).
31. Lu, Z., Xue, A., Tu, z., Konno, C., Waller, D.P., Soejarto, D.D., Cordell, G.A. and Fong, H.S.; Studies on Zoapatle, VII. Angeloylgrandifloric Acid, a Spontaneous Uterine Contraction Inhibitor (SUCI) from *Montanoa tormentosa* ssp *tormentosa*. *J. Nat. Prod.* 50, 995-997 (1987).
32. Coll, J.C. and Bowden, B.F.; The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *J. Nat. Prod.* 49, 934-936 (1986).
33. Hugel, G., Lods, L., Mellor, J.M., Theobald, D.N. et Furrison, G.; Diterpenes di *Trachylobium*. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2888 (1965).
34. Pyrek, S.St.; New Pentacyclic Diterpene Trachyloban-19-oic Acid from Sunflower. *Tetrahedron* 26, 5029 (1970).
35. Esahak, A.P., Ghosh, D.P. and Pakrashl, S.C.; Studies in Indian Medicinal Plants. Part XXIX. Diterpenoid and other Constituents of *Enhydra fluctuans* Lour. *J. Indian Chem. Soc.* 51, 409-418 (1974).

36. Bohlmann, F. und Le Van, Ngo.; Uber neue Diterpene aus *Dimorphoteca plunialis* Moench. *Chem. Ber.* 109, 1446 (1976).
37. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Grenz, M., Suding, H., Robinson, H. and M. King, R.; Germacranolides and Diterpenes from *Viguiera* species. *Phytochemistry* 20, 113-116 (1981).
38. Knights, B.A.; Identification of Plants Sterol using Combined ^{CCl}/₄ / MASS Spectroscopy. *J. Gas. Chromatog.*, 273 (1967).
39. Jain, T.C. and Banks, C.M.; 22-dihydrostigmasterol from *Sausurrea lappa*. *Can. J. Chem* 46, 2323 (1968).
40. Piozzi, F., Sprio, V., Passannati, J. e Mondelli, R.; Struttura dell' Acido Grandiflorilico, *Gazz. Chim. Ital.* 98, 907 (1968).
41. Agrawal, P.K.; NMR Spectroscopy in the Structure Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330 (1992).
42. Hugel, G., Lods, L., Mellor, J.M., Theobald, D.N. et Purisson, G.; Diterpenes de *Trachylobium*. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2894-2902 (1965).
43. Hassan, C.M., Healey, T.M. and Waterman, P.G.; 7 β -acetoxy-trachyloban-18-oic Acid from the Stem Bark of *Xylopia quintasii*. *Phytochemistry* 11, 327-332 (1972).
44. Henrick, C.A. and Jefferies, P.R.; The Chemistry of the *Euphorbiaceae* (The Diterpene of *Recinocarpus stylosus*). *Aust. J. Chem.* 17, 915 (1964).
45. Bory, S. et Fetizon, M.; Determination de la Configuration d' Esther di ou Triterpeniques par Spectroscopie Infrarouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 570 (1964).
46. Pyrek, S.St.; New Pentacyclic Diterpene. *Trachyloban-19-oic Acid* from *Sunflower*. *Tetrahedron* 26, 5029 (1970).
47. Buendales, L.F. and Geissman, T.A.; Constituents of *Helianthus ciliaris*. *Phytochemistry* 11, 327-332 (1972).
48. Achmatowicz, O., Euchart, A., Jurczak, J., Kozerski, L. and Pyrek, J.St.; Confirmation of the Structure of a New Diterpene *Trachiloban-19-ol* by *Tris(dipivaloylometanato)-Europium-Shifted*

- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Amer. Chem. Soc.*, 98-99 (1971).
49. Chien, J.C.C.W.; Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Resin Acids. *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 4762 (1960).
 50. Bohlmann, F., Zdero, Ch. und Mahanta, P.; Neue Diterpene aus *Dimorphotheca*- und *Viguiera*-arten. *Phytochemistry* 16, 1073-1075 (1977).
 51. Schteingart, C.D. and Pomilio, A.B.; Terpenoids from *Wedelia buphthalmiflora*. *Phytochemistry* 20, 2589-2590 (1981).
 52. Bohlmann, F., Kramp, W., Jakupovic, J., Robinson, H. and King, R.M.; Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry* 21, 399-403 (1982).
 53. Bohlmann, F. und Le Van, Ngo.; Neuen Kaurensaure- Derivate aus *Wedelia*- Arten. *Phytochemistry* 16, 579-581 (1977).
 54. Oberti, J.C., Pomilio, A.B. and Gros, E.G.; Diterpenes and Sterols from *Wedelia glauca*. *Phytochemistry* 19, 2051-2052 (1980).
 55. Bohlmann, F. und Le Van, Ngo.; Uber Neue Diterpene aus *Dimorphotheca pluvialis* Moench. *Chem. Ber.* 109, 1446 (1976).
 56. Kalinowsky, A.I., Serebryakov, E.P. et al.; Mass Spectrometry of Kaurene Derivates. *Organic. Mass Spectrometry* 3, 1393 (1970).
 57. Nathan, J. y Diaz, E.; Introducci3n a la RMN-¹H. Limusa, M3xico 1970, 170-171.
 58. Hugel, G., Lods, L., Mellor, J.M., Theobald, D.W. et Ourrison, G.; Diterpenes de *Trachylobium*: Introduction Generale, Isolement du Kauranol et de Huit Diterpenes Rouveaux. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2882 (1965).
 59. Rubinstein, I., Goad, L.J., Clague, A.D.H. and Mulheirn, L.J.; The 220 MHz NMR Spectra of Phytosterols. *Phytochemistry* 15, 195-200 (1976).
 60. Cannon, J.R., Chon, P.W., Jefferies, P.R. and Meehan, G.V.; Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic Acid an 15 α -hidroxy-(-)-kaur-16-en-19-oic Acid from *Phebalium rude*. *J.*

- Aust. Chem.* 19, 981 (1966).
61. Nair, M.D. and Adams, R.; The Structure of Redellic and the Stereochemistry of Nelic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 922 (1961).
 62. Bolhmann, F. and Zdero, Ch.; Über ein Never Diterpenus *Melampodium perfoliatum* (carv.) A. Gray. *Chem. Ber.* 109, 1670 (1976).
 63. Grande, M., Segura, M., Mancheño, B.; New Kaurene Diterpenoids from the Roots of *Elaeolinum tenuifolium*. *J. Nat. Prod.* 49, 259 (1986).
 64. Levy, G. y Nelson, G.; Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13. *Bellaterra, Madrid*, 124-134 (1972).
 65. Grover, S.H. and Stothers, J.B.; C-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies. Examination of the Long-range Shielding Effects of the Hydroxyl Group in Alicyclic Systems. *Can. J. Chem.* 52, 870 (1974).
 66. Elial, E., Bayley, W., et al.; C-13 Magnetic Resonance. Upfield Shifts Causes by Nitrogen, Oxygen and Fluorine Atoms located at the γ -position and anti-periplanar to the Nucleus Observed. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 322 (1975).
 67. Wehli, F.W. and Wirthlin, T.; Interpretation of C-13 NMR Spectra. *Heyden, Great Britain*, 22 (1978).
 68. Bolhmann, F., Zdero, Ch., Schmeda-Hirschmann, G., Jakupović, J., Castro, V., King, R.M. und Robinson, H.; Heliangolide Trachyloban und Villanoban Derivates aus *Viguiera* arten Liebigs. *Ann. Chem.*, 495 (1984).
 69. Ferguson, G., McCrindle, R., Murphy, S.T. and Parvaez, H.; Further Diterpenoid Constituents of *Helianthus annuus* L., Crystal and Molecular Structure of Methyl *ent*-15 α -hidroxy-trachyloban-19-oato. *J. Chem. Research*, 200 (1982).
 70. Faulknor, D.F., Lebbby, V. and Waterman, P.G.; Further Diterpenes from othem Bark of *Xylopiá aethiópica*. *Planta Medica*, 354 (1985).
 71. Gaudemer, A., Polonsky, J., Wenkert, E.; Determination de la Conformation Desgroupements. -CH₂OH et -CH₂OAc de Quelques Composés Terpeniques par la Resonance Magnetique Nuclearie. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 407 (1964).

72. Franklin, N.C. and Feltkamp, H.; Conformational Analysis of Cyclohexane Derivates by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.* 4, 774 (1979).
73. Torsell, K.B.; *Natural Products Chemistry*. Jhons Wiley & Sons LTD, Great Britain, 189 (1983).
74. Pearce, J., Gershenzon, J. and Mabry, T.J.; Sesquiterpene Lactones and Diterpene Carboxylic Acids from *Helianthus divaricatus*, *H. resinosus* and *H. salicifolius*. *Phytochemistry* 25, 159-165 (1986).