



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

16  
255

“CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LAS RAÍCES  
DE SALVIA ASPERA”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**Q U I M I C A**  
P R E S E N T A:  
**MARGARITA FLORES VALDES**

MEXICO, D. F.

1995.

FALLA DE ORIGEN

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>ALFONSO ROMO DE VIVAR</b>
<b>VOCAL</b>	<b>ROCIO POZAS HORCASITAS</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>BALDOMERO ESQUIVEL RODRIGUEZ</b>
<b>1 er. SUPLENTE</b>	<b>ERNESTINA CERVERA FLORES</b>
<b>2 do SUPLENTE</b>	<b>FERNANDO LEON CEDEÑO</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :**

**INSTITUTO DE QUIMICA . UNAM .**

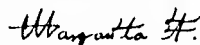
**ASESOR DEL TEMA**



**M en C .**

**BALDOMERO ESQUIVEL  
RODRIGUEZ**

**SUSTENTANTE**



**MARGARITA FLORES  
VALDES**

Este trabajo se realizó en el laboratorio 2-8 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.

Agradecimientos y dedicatorias.

Deseo agradecer a los siguientes profesores: M. en C. Margarita Chávez, M. en C. Ana Adela Sánchez Q. Elvia Pilar Martínez Izaguirre, I.Q. Mayo Gines Martínez Kahn y al Dr. Marcos Soto. por el estímulo y apoyo que me han brindado a través de mi formación profesional.

También a las personas que laboran en el I.Q. de la UNAM, especialmente a los técnicos laboratoristas.

Al M. en C. Baldomero Esquivel R. por facilitar el material vegetal analizado y por el tiempo dedicado para el logro de esta tesis.

Agradezco a los M. en C. Simón Hernández Ortega y Hugo Ramírez Pérez sus valiosos Comentarios.

Con todo cariño agradezco a mis padres Rosa y Jerónimo por el apoyo que me han brindado a través de mi formación profesional y en cada instante de mi vida.

A mis hermanos Vicente, Antonio y Jerónimo.

A mis sobrinos: Toño, Marí, Sami y David. Como un estímulo para su constante superación.

A mi pequeño amigo José Manuel Esquivel Sánchez.

A mi Tía Aurelia por su cariño así como a la memoria de José Luis.

A mis amigos, con los cuales comparto este trabajo al igual que compartimos logros a lo largo de la carrera.

A la Dra. Lydia Rodríguez Hahn por su gran calidad humana y  
académica.

De manera especial le agradezco el apoyo económico que me  
brindó a través del SNI.

~~RESUMEN~~

=====

El presente trabajo se realizó con la finalidad de contribuir al estudio de la flora de México, específicamente se contribuye en el estudio de las raíces de las Salvias Mexicanas ya que éstas han sido poco estudiadas.

Se describe e ilustra la composición química de las raíces de la *Salvia aspera* Mart. et Gal. del género *Salvia* de la Familia de las Labiadas.

Los metabolitos aislados son: abietanos (sugiol, taxodiona y la 6 epi-desmetil esquirolina D), icetexanos (desmetil salvicanol, salviasperanol y el 5  $\alpha$ , 6  $\beta$ -dihidro-6  $\alpha$ -hidroxisalviasperanol), un sesquiterpeno (clovandiol) y un esteroide ( $\beta$ -sitosterol).

Tres de los metabolitos aislados son novedosos (el salviasperanol, 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidro-6  $\alpha$ -hidroxisalviasperanol y la 6 epi-desmetilesquirolina D).

El diacetato del desmetil salvicanol resultó tener actividad biológica en presencia de *Artemia salina* Leach.



## INDICE DE TEMAS.

	Páginas.
<b>INTRODUCCION.</b>	1
Objetivos.	3
<b>ANTECEDENTES.</b>	5
<b>PARTE TEORICA.</b>	17
<b>Elucidación estructural de los metabolitos del extracto polar.</b>	18
Elucidación de la estructura del sugiol.	18
Elucidación de la estructura del salviasperanol.	19
Reacciones del salviasperanol.	
Reacción de hidrogenación.	29
Reacciones de esterificación.	30
Proyección de Rayos-X del salviasperanol.	31
Elucidación de la estructura del 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$ hidroxisalviasperanol.	32
Elucidación de la estructura del clovandiol.	37
Elucidación de la estructura de la 6-epi-desmetil esquirolina D.	38
<b>Elucidación estructural de los metabolitos del extracto no polar.</b>	45
Elucidación de la estructura de la taxodiona.	45
Elucidación de la estructura del $\beta$ -sitosterol.	46
Elucidación de la estructura del desmetilsalvicanol.	46
Pruebas de toxicidad.	55
Resultados.	55
<b>CONCLUSIONES.</b>	57
Comentarios.	59
<b>PARTE EXPERIMENTAL.</b>	60
Recolección del material vegetal.	61
Extracción de los metabolitos secundarios.	61
Separación.	62
Elucidación estructural.	63
Identificación.	64

OBTENCION DE METABOLITOS DEL EXTRACTO POLAR.	69
Sugiol.	69
Salviasperanol.	69
Reacciones del compuesto 2.	70
Hidrogenación.	70
Acetilación.	71
Esterificación.	71
5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$ -hidroxisalviasperanol.	72
6 epi desmetilequirolina D.	72
Clovandiol.	72
OBTENCION DE METABOLITOS DEL EXTRACTO NO POLAR.	73
Taxodiona.	73
$\beta$ -sitosterol.	74
Desmetil salvicanol.	74
PRUEBAS DE TOXICIDAD.	75
APENDICE.	
Espectros.	

**INTRODUCCION**

En el territorio Mexicano se encuentran representados los distintos biomas, en él hay una muy variada cubierta de especies vegetales, que al ser analizadas permiten obtener productos químicos muy diversos.

La flora del país no ha sido muy estudiada y la influencia humana sobre ella es en general destructiva. Se ha forzado a los ecosistemas con factores bióticos y abióticos, los impactos de éstos han sido perjudiciales y beneficiosos al mismo tiempo, perjudiciales para el medio y beneficiosos para el hombre. Al usar los distintos factores se tiende a simplificar un ecosistema ya que se reduce el número de especies, la reducción de éstas limita el conocimiento de la riqueza florística del país.

Una de las familias que se encuentra en esta cubierta vegetal es la familia de las Labiadas, la cual se encuentra representada por numerosas especies y 300 de ellas pertenecen al género *Salvia*. A pesar de esta abundancia, el género ha sido poco estudiado desde el punto de vista químico<sup>(1)</sup>.

Desde hace ocho años se inició un estudio químico sistemático de algunas Labiadas mexicanas, este estudio se ha centrado principalmente en las partes aéreas de especies del género *Salvia* y se ha obtenido una gran variedad de sustancias novedosas<sup>(2)</sup> de tipo diterpénico algunas de las cuales han mostrado poseer actividades biológicas importantes tales como antitumoral y antialimentario contra insectos. La actividad antitumoral se ha descubierto para diterpenos del tipo del abietano, mientras que la segunda acción ha sido encontrada para algunos clerodanos.

1.- Esquivel, R.B. Estudio quimiotáxonómico de la sección fulgentes del género *Salvia* (Labiatae). Tesis de grado UNAM. México (1986).

2.- Rodríguez-Hahn, I.; Esquivel, B.; Sánchez, A.A.; Sánchez, C.; Cárdenas, J. & Ramamoorthy, T.P. Rev. Latinoamericana de Química. 20 [3] 105-110 (1989).

La composición química de las Salvias Mexicanas, varía dependiendo entre otras cosas de la sección botánica a la cual pertenece la planta. Este hecho, sumado al tipo de productos presentes en ellas (principalmente clerodanos), han permitido establecer relaciones fitogeográficas con las Salvias del viejo continente, las cuales biosintetizan principalmente abietanos<sup>3)</sup>.

Se ha observado también que de las raíces de las Salvias Euroasiáticas estudiadas hasta ahora, se aíslan compuestos de tipo abietánico principalmente. La presencia de estas sustancias se ha propuesto como una característica quimiotaxonómica del género *Salvia*, sin embargo no se tienen datos de la composición química de la raíz de las Salvias Americanas, que permitan reforzar o descartar esta hipótesis, por lo que el estudio de las raíces de las Salvias Mexicanas reviste importancia Quimiotaxonómica.

Lo anteriormente expuesto pone de manifiesto la importancia que tiene el estudio de la Familia y más aún las raíces de las Salvias en México ya que son un material idóneo para estudios de evolución y de diversificación.

Los objetivos que se persiguen en la presente tesis son los siguientes:

#### **Objetivos Generales.**

- ☒ Contribuir al estudio sistemático del género *Salvia* en México.
- ☒ Aíslar nuevas sustancias con posible acción biológica.
- ☒ Contribuir al conocimiento de la reactividad química de las moléculas orgánicas presentes en estos vegetales.

3.- Ramamoorthy, T. P.; Esquivel, B.; Sánchez, A. A. & Rodríguez-Hahn, L. *Taxon* . 27 [4] 908 - 12 (1988).

**Objetivos Particulares.**

- ❑ Conocer la composición química de la raíz de la *Salvia aspera* con el fin de aumentar el conocimiento de la flora nacional y aportar datos útiles en quimiotaxonomía.
- ❑ Aislar los metabolitos mediante las técnicas adecuadas.
- ❑ Elucidar los metabolitos aislados así como a los productos de reacción.
- ❑ Determinar la toxicidad de los metabolitos aislados para la *Artemia salina* Leach.

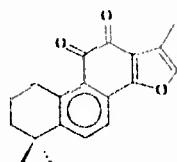
**ANTECEDENTES**

El género *Salvia* comprende aproximadamente 900 especies y es el más abundante de la familia de las Labiadas. Se le encuentra en regiones tropicales y subtropicales así como en áreas montañosas, estas regiones son el Mediterráneo, Brasil y en las zonas altas del Centro de México<sup>69</sup>. El género *Salvia* se encuentra dividido en los subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphaece*<sup>69</sup>.

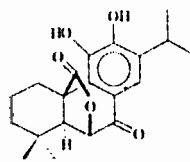
Las *Salvias* Europeas y Asiáticas pertenecen principalmente a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*, de ellas se aíslan abietanos de partes aéreas y raíces, con excepción de *Salvia sclarea*, de ella se aísla el diterpeno de tipo labdano, esclareol<sup>69</sup>. Por ejemplo de las raíces de *Salvia phlomoides* se aísla el criptojaponol<sup>70</sup>, de las raíces de *Salvia fruticosa* se aísla la Tanshinona II<sup>69</sup>, de las partes aéreas de *Salvia lavandulifolia* se aísla el galdosol<sup>69</sup>.

- 4.- Rodríguez-Hahn, L.; Esquivel, U. & Cárdenas, J. The Distribution of Diterpenoids in *Salvia*. In R. M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiatae Science* pp. 335-347 (1992). Royal Botanic Gardens, Kew.
- 5.- Bentham, G. *Labiatarum Genera et Species*. (1883).
- 6.- Ruzicka, L. & Janot, M.M. *Helvetica Chimica Acta*. 14 645-50 (1931).
- 7.- Hueso-Rodríguez, J. A.; Jimeno, M. L.; Rodríguez, B.; Savona, G. & Bruno, M. *Phytochemistry*. 22 [9] 2005-9 (1983).
- 8.- Ulubelen, A.; Oztorik, S. & Isildatici, S. *Journal Pharmacia Science*. 57 [6] 1037-38 (1968).
- 9.- Escudero, J.; Pérez, L.; Rabanal, R. M. & Valverde, S. *Phytochemistry*. 22 585-87 (1993)



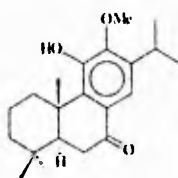


tanshinona B

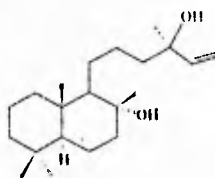


galdosol

subgénero *Salvia*



cryptojaponol



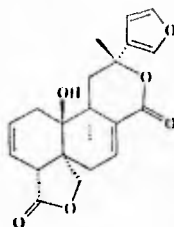
esclareol

subgénero *Scalaria*

El subgénero *Leonia* se encuentra representado por varias especies de *Salvias* de América del Norte. De las partes aéreas de *Salvia plebeia* se aísla el clerodano salviacoccina<sup>(10)</sup>.

10.- García-Alvarez, M. C.; Husao, M.; Michavila, A.; Fernández-Gadea, F.; & Rodríguez, H.

*Phytochemistry* 25 272-274 (1986).



salviaecocina  
subgénero Leonia

En México existen cerca de 250 especies de *Salvias*<sup>(11)</sup>, las cuales se encuentran predominantemente entre bosque de pinos, abetos y encinos. La mayor parte de las que crecen en México, Centro y Sudamérica pertenecen al subgénero *Calosphaece*<sup>(1)</sup>. Las especies de este subgénero se encuentran organizadas en 105 secciones.

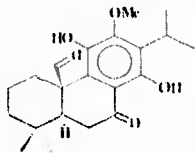
A diferencia de las *Salvias* Europeas y Asiáticas se han aislado diterpenos con esqueleto de abietano, icetexano, clerodano y pimarano. Para éste subgénero, por ejemplo: de las raíces de *Salvia coulteri* se aisló el abietano 20-oxo-inuroyleanol<sup>(12)</sup>, de las partes aéreas de *Salvia ballotaeiflora* se aisló la icetexona<sup>(13)</sup>, de las partes aéreas de *Salvia rhyacophylla* se aisló

11.- Comunicación con el Dr. T.P. Ramamoorthy.

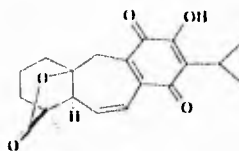
12.- Frontana, H; Cárdenas, J & Rodríguez-Hahn, L. Diterpenoids from *Salvia coulteri*.  
*Phytochemistry*. 36 [3] 739-41 (1994).

13.- Domínguez, X. A; González, H; Aragón, E. B; Gutiérrez, M; Marroquín, J. S & Watson  
W. *Planta Medica*. 20 237-241 (1976).

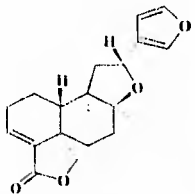
el clerodano deshidrokerlina<sup>(14)</sup> y de las partes aéreas de *Salvia microphylla* se aisló el pimarano ácido 7- $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico<sup>(15)</sup>.



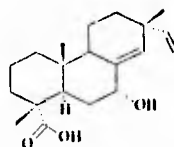
20-oxo-11-muroyleanol



lectoxona



deshidrokerlina



ácido 7- $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico

#### subgénero *Calosphaea*

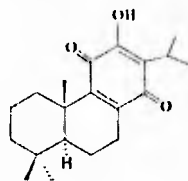
En las *Salvias* del viejo mundo se observa una gran diversidad morfológica en la estructura floral, particularmente en las *Salvias*

14. Fernández, M. C.; Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Sánchez, A.; Toscano, R. A. & Rodríguez-Hahn, I. *Tetrahedron*, **47** [35] 7199-7208 (1991).

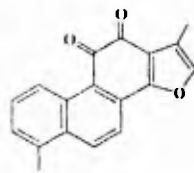
15. Esquivel, B.; Martínez, N. S.; Cárdenas, J.; Ramamourthy, T. P. & Rodríguez-Hahn, I. *Planta Medica*, **55** 62-63 (1989).

encontradas en el área de Irán e Irak. Se especula que éste es el lugar de origen de el género *Salvia*, además de que se sugiere la posibilidad de que el subgénero *Calosphaece* pueda tener su origen en las salvias del viejo mundo y pudo haberse diferenciado posteriormente de los subgéneros Europeos (*Sclarea* y *Salvia*), la diferenciación es pronunciada morfológicamente así como fitoquímicamente .

La presencia de diterpenos con esqueleto de abietano en las raíces de las especies de el género *Salvia*, ha sido considerado como carácter quimiotaxonómico del género<sup>(6)</sup>, esto es, porque al ser estudiadas las raíces de 89 especies se encontraron diterpenos tipo tanshinona<sup>(17)</sup> y royleanona<sup>(9)</sup>.



royleanona



tanshinona I

De los estudios quimiotaxonómicos (partes aéreas de las plantas), realizados sobre el género *Salvia* subgénero *Calosphaece* en el Instituto de Química de la UNAM, se han caracterizado<sup>(9)</sup> para la sección *Seorodonia* diterpenos con esqueleto de clerodano (fig.1), en la sección *Fulgentes* se identificarón diterpenos con esqueleto de clerodano y pimarano (fig. 2),

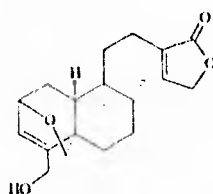
16.- Patudis, A ; Romanova, A ; Sukolow, W. S. & Pribylowa, G. *Planta Medica* . **26** 201-207 (1974).

17.- Chang, H. M ; Cheng, K. P ; Cloang, T. F ; Chow, H. F ; Chui, K. Y ; Hon, P. M ;

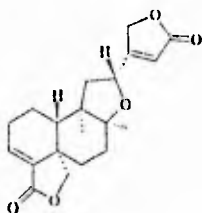
Lau Tan, F. W ; Yang, Y. & Zhong, Z. P. *Journal of Organic Chemistry* . **55** 3537-43 (1990).

en la sección *Erythrostachys*, se encontraron diterpenos con esqueleto de abietano (fig. 3), de la sección *Atratae* y *Mitratae* clerodanos<sup>68</sup>, de la

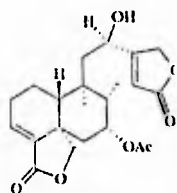
SECCION SCORODONIA



breviflora lactona  
*Salvia breviflora*



kerlina



kerlinólida

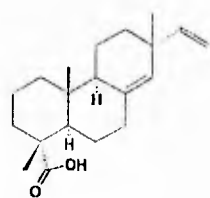
*Salvia kerlii*

fig. 1

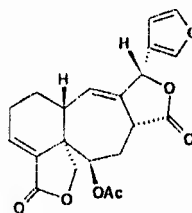
- 18.- Rodríguez-Hanh, L.; Esquivel, B.; Sánchez, C.; Sánchez, A. A.; Cárdenas, J. & Ramamurthy, T. P. *Revista Latinoamericana de Química* 104-109 (1987).

sección Tomentellae diterpenos con esqueleto de abietano e icetexano (fig. 4). Las dos últimas contienen diterpenos abietánicos similares a los encontrados en las salvias Europeas y Asiáticas, cuyos esqueletos tienen el anillo C oxidado.

SECCION FULGENTES

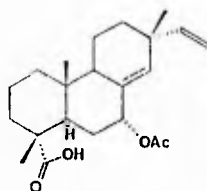


ácido sandaracopimárico



salvigotólida

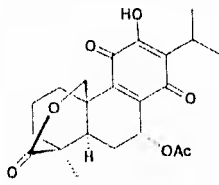
*Salvia fulgens*



ácido 7  $\alpha$ -acetoxi-sandaracopimárico

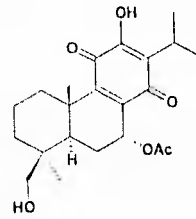
(fig. 2)

SECCION ERYTROSTACHYS



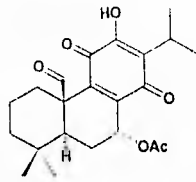
seseína

*Salvia sessel*



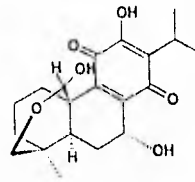
19-hidroxi-7-α-acetoxirolanona

*Salvia regia*



nemorona

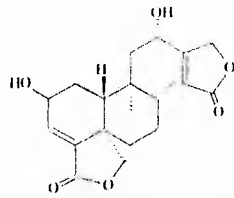
*Salvia pubescens*



conacytona

(fig. 3)

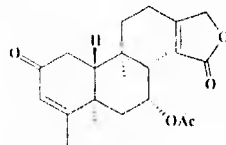
SECCION ATRATAE



semiatrina

*Salvia semiatrata*

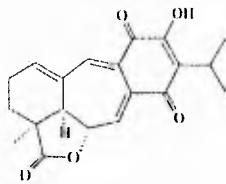
SECCION MITRATAE



lasianina

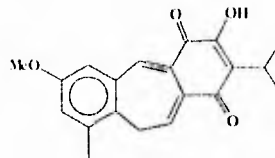
*Salvia lasiantha*

SECCION TOMENTELLAE



anastomosina

*Salvia anastomosans*



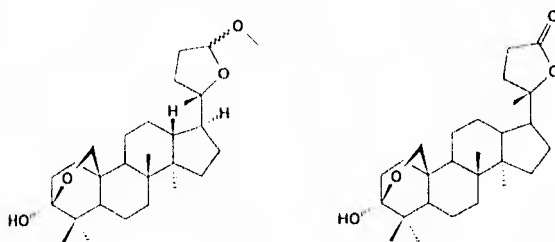
fraticullina A

*Salvia fraticulosa*

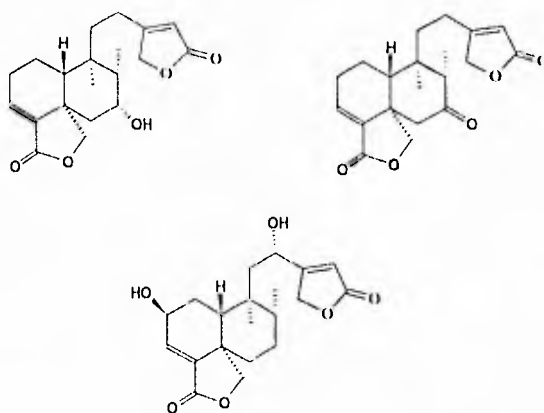
(fig. 4)



Las partes aéreas de la *Salvia aspera* (Labiatae), ya han sido estudiadas (9), de ellas se aisló  $\beta$ -sitosterol, ácido oleanólico, 3 diterpenos clerodánicos y 2 trinordamaranos.



trinordamaranos



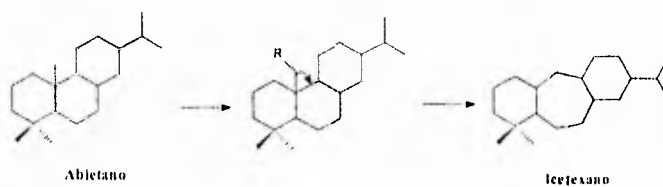
diterpenos clerodánicos

19.- Francisco, G. G. Estudio Fitoquímico de *Salvia Atropaenulata* Epl. y *Salvia Aspera* Mart. ET Gal. Tesis profesional UNAM. México. 1993.

Los diterpenos del tipo del abietano e icetexano son tricíclicos, se ha propuesto la siguiente biosíntesis para el esqueleto del abietano via ácido mevalónico. El ácido mevalónico es formado desde ácido acético, el mecanismo involucra condensación de acetil Co A y Acetoacetil Co A a  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril Co A y al hacer reducción del tioletér se obtiene ácido mevalónico. El (+)-ácido mevalónico sirve como precursor de los diterpenos.

Tres moléculas de Acetato  $\rightarrow$  Tres de Acetil-S Co A  $\rightarrow$  Acetoacetil-S Co A  $\rightarrow$   $\beta$ -hidroxi  $\beta$ -Metil Glutaril-S Co A  $\rightarrow$  Hemiacetal  $\rightarrow$  Acido Mevalónico  $\rightarrow$  Mevalonil 5-Fosfato  $\rightarrow$  Mevalonil 5-Pirofosfato  $\rightarrow$  Pirofosfato de Isopentenoil  $\rightarrow$  Pirofosfato de Dimetilalilo  $\rightarrow$  Pirofosfato de Geranilo  $\rightarrow$  Pirofosfato de Farnesilo  $\rightarrow$  Pirofosfato de Geranylgeraniol  $\rightarrow$  Diterpenos  $\rightarrow$  Abietanos<sup>(9)</sup>.

Para la biosíntesis del esqueleto del icetexano, se postula que si hay un buen grupo saliente R en el carbono veinte, éste hará que se expanda el anillo B<sup>(9)</sup>.



20.- Goodwin . A . Chemistry of Terpenes and Terpenoids . 1a ed . Ed . Academia Press England (1972)

~~PARTE TEORICA~~



Las raíces de la *Salvia aspera* (Labiatae) se sometieron a una maceración con acetona y el extracto acetónico posteriormente se concentró. El extracto total se sometió a una partición con Hexano-Benceno y Metanol-Agua, obteniéndose un extracto polar y uno no polar.

#### **Elucidación estructural de los metabolitos del extracto polar.**

Del extracto polar se logran aislar 5 metabolitos mediante cromatografías sucesivas y recristalizaciones. Al más abundante (compuesto No.2) se le nombra *salviasperanol*, al compuesto No.3 se le llama *5- $\alpha$ ,6- $\beta$ -dihidro, 6  $\alpha$  hidrox-salviasperanol*, al metabolito **5** se le nombra *6-epi-desmetil-esquirolina-D* y a los metabolitos **4** y **1** se les identificó como *clovandiol* y *sugiol* respectivamente.

#### ***Elucidación de la estructura del sugiol***

El componente menos polar (**1**), es un sólido cristalino blanco. En su espectro de IR se observan bandas en 3 606 y 3 535  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a enlaces oxhidrilo<sup>21</sup>. Las señales de RMN<sup>1H</sup> de éste se ilustran en la tabla de la siguiente página.

Con base en su espectro de IR y los datos de RMN<sup>1H</sup>, el compuesto (**1**) fué identificado como el sugiol.

Las características espectroscópicas de este compuesto concuerdan con lo descrito en la literatura para el sugiol<sup>(22,23)</sup>.

21.- Preisch, Clere ; Seibt, Simon . Tables of Spectral Data for Structures Determination of Organic

Compounds . Springer - Verlag Berlin Heidelberg . (1983) .

22.- Kupchan, M. S ; Karim , A & Marek , C . The Journal of Organic Chemistry . **34** 3192 (1969)

23.- Paiva , C. J & Ferreira , F. S. Phytochemistry . **14** 2299 - 300 (1975)

**RMN<sup>1</sup>H del sugiol.**

No. átomo de hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración	Constante de acoplamiento (Hz)
14	7.91 (s)	1	
11	6.69 (s)	1	
fenol	5.23 (s)	1	
15	3.15 (heptuplete)	1	5.6
CH <sub>3</sub> -16 ó 17	1.28 (d)	3	5.6
CH <sub>3</sub> -16 ó 17	1.24 (d)	3	5.6
CH <sub>3</sub> -20	1.23 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -19	0.99 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -18	0.93 (s)	3	

***Elucidación de la estructura del salviasperanol***

El siguiente compuesto aislado (2), fué el más abundante (262 mg), tiene un punto de fusión de 203 - 205 °C y una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = -31.5^{\circ}$  (C = 0.1, CHCl<sub>3</sub>).

En el espectro de UV se obtienen absorciones a 205, 275 y 280 nm, dichas absorciones son parecidas a las de los fenoles<sup>24</sup>. Por ejemplo: en el 12-hidroxi-20-nor-abieta-1(10),2,8,11,13-pentaeno, tetra- hidrogenado, hay una absorción máxima a 282 nm ( $\log \epsilon = 3,36$ )<sup>25</sup>, el abietano 11,12-dihidroxi-abieta-8,11,13-trieno absorbe a 278 nm (EtOH)<sup>26</sup>. El salvicanol tiene longitudes de onda máxima (MeOH) en 230, 274 y 281 nm<sup>27</sup>, el isosalvicanol en 230, 276 y 283 nm<sup>27</sup>.

En el espectro de masas (**Esp. No. 2 d**), del compuesto número dos, el ión molecular se observa en una  $m/z$  de 314 con una abundancia del 16.9% y corresponde para una fórmula molecular de  $C_{20}H_{26}O_3$  (ocho insaturaciones). Los 20 carbonos de la fórmula condensada corresponden para un diterpeno. En los antecedentes presentados se mencionó que para el subgénero Calosphace (subgénero al cual pertenece la planta), se aislan diterpenos con esqueleto de abietano, icetexano, clerodano y pimarano. Además de que se ha postulado la presencia de diterpenos con esqueleto de abietano en las raíces de las especies de el género *Salvia* (ver página número diez), siendo estos los posibles esqueletos a los que puede pertenecer el compuesto.

24.- Scott, A. I. Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products - Vol. 7. Pergamon Press LTD. (1964).

25.- Shinichi Hasegawa, Toshimi Kojima and Yoshiyuki Hirose. Phytochemistry 24 [7] 1545-51 (1985).

26.- González, G. A.; Andrés, S. E.; Luis, G. J.; Brito, I. & Rodríguez, L. M. Phytochemistry 30 [12] 4067-70 (1991).

27.- Bruno, M.; Savona, G.; Piozzi, F.; De la Torre, C. M.; Rodríguez, JI & Marlier, M. Phytochemistry 30 [7] 2339-43 (1991).

En el espectro de infrarrojo (IR), se observan bandas en 3500 y 3297  $\text{cm}^{-1}$  las cuales se atribuyen a grupos oxhidrilos<sup>(28)</sup> las bandas observadas en 1627, 1588 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  corresponden para dobles enlaces, dos de ellas pertenecen al grupo funcional aromático (Esp. No. 2 a).

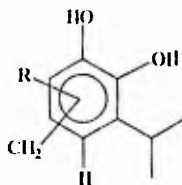
En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Esp. No. 2 b), se observa un patron de acoplamiento AB<sup>(29)</sup>, el cual consiste de dos señales dobles, uno de los dobletes se encuentra centrado en 2.87 ppm y el otro en 2.63 ppm, cada uno de ellos integra para un hidrógeno y tienen una constante de acoplamiento de 16.5 Hz. Lo anterior es debido al acoplamiento geminal que hay entre los protones de un metileno y su desplazamiento químico indica que es de naturaleza benéfica como en el pisiniferanol y el 12-desoxipisiniferanol<sup>(29)</sup>. Se observan otras señales que son características de un grupo isopropilo, el metino de éste se observa como un heptuplete a  $\delta$  de 3.08 ppm con una constante de 6.8 Hz, el desplazamiento químico es característico de un protón en posición benéfica. Los protones de los metilos del isopropilo se observan como dos dobletes<sup>(28)</sup> centrados en 1.24 y 1.30 ppm, cada uno de ellos integra para tres hidrógenos y tienen una constante de 6.8 Hz. En 1.14 y 1.02 ppm. se observan dos singuletes, que integran para tres hidrógenos cada uno, se asignan como los protones de dos metilos.

Con las señales observadas de el isopropilo y de los metilos, se descartan los esqueletos de clerodano y pimarano, quedando así la posibilidad de que sea un diterpeno del tipo del abietano o icetexano (en

28.- Joseph-Nathan , P. & Torres , D. E. Elementos de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ,  
2a Ed. Grupo Editorial Iberoamérica (1993) .

algunos productos se presentan con un anillo aromático, con uno<sup>29)</sup> o dos grupos fenólicos<sup>30)</sup> libres o metilados, tales como criptojaponol, galdosol (ver página siete) y la icetexona (ver página nueve) se encuentra como una quinona).

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto no se observan las señales correspondientes a cinco metilos como en el sugiol, sino cuatro. Como ya se mencionó dos de ellos pertenecen al grupo isopropilo y los otros dos metilos restantes se asignan como los metilos angulares de un icetexano. Se observa otra señal en un desplazamiento químico de 6.43 ppm. como un singulete el cual integra para un hidrógeno y se asigna a un protón aromático. Dos singuletes anchos en 5.6 y 5.25 ppm que intercambian con óxido de deuterio, se asignan como protones fenólicos (Esp. No. 2 c) . De estos datos se dedujo la presencia de un anillo aromático con dos hidroxilos fenólicos. Este anillo aromático se asignó como el anillo C de el icetexano y dado que hay un protón aromático, un isopropilo y metileno bencílicos, se propone un grupo funcional aromático pentasustituído para el anillo C del icetexano como se muestra en la siguiente figura:



29.- Ulubelen, A. & Topcu, G. Phytochemistry 31 (11) 3949-51 (1992).



En 6.02 ppm se observa un doble de dobles que integra para un hidrógeno y tiene constantes de acoplamiento de 2.1 y 0.8 Hz. En  $\delta$  5.09 ppm hay un doblete, integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de 2.1 Hz, su constante indica que se encuentra acoplado con el doble de dobles en 6.02 ppm.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Esp. No. 2 e) se observan las señales de veinte carbonos, con éste y con el espectro de un experimento DEPT (Esp. No. 2 f), se deduce que cuatro de las veinte señales observadas tienen una multiplicidad de triplete, cuatro de doblete, ocho de singulete y cuatro de cuarteto.

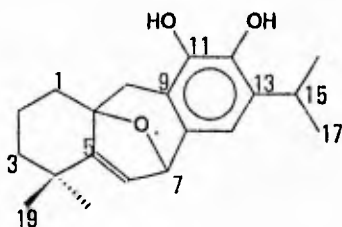
La presencia de cuatro señales con multiplicidad de cuarteto en 22.45, 22.78, 27.66 y 29.84 ppm, en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del salviasperanol, indican que hay cuatro metilos, ésto corrobora a las señales asignadas como metilos angulares así como a los metilos del isopropilo.

Las ocho señales que tienen multiplicidad de singulete, se encuentran en 149.46, 142.57, 139.87, 131.39, 131.01, 117.02, 83.74 y 33.75 ppm. La última se asignó para un carbono  $\text{sp}^3$  totalmente sustituido, la señal en 83.74 ppm se asignó para un átomo de carbono unido a un átomo de oxígeno. Como en el espectro de RMN $^1\text{H}$  de este compuesto se observa un protón aromático, se propone que uno de los carbonos del anillo aromático se observe con una multiplicidad de doblete, de esta manera cinco de los carbonos singuletes del tipo  $\text{sp}^2$  pertenecen al grupo funcional aromático y uno a carbono vinílico totalmente sustituido.

Se observan cuatro metinos, como carbonos con multiplicidad de doblete a 128.34, 112.14, 79.94 y 26.98 ppm, los dos primeros por su desplazamiento químico se asignan como carbonos  $\text{sp}^2$ , siendo uno de ellos

parte de un grupo funcional aromático y el otro de olefina. La señal en 79.94 ppm se asignó como carbono unido a un átomo de oxígeno y como en la espectroscopia anterior (RMN<sup>1</sup>H) se mencionó la presencia de un grupo isopropilo, la señal en 26.98 ppm se asigna al metino del isopropilo. Los carbonos con multiplicidad de triplete corresponden a metilenos.

Con la espectroscopia de RMN de <sup>13</sup>C y con lo propuesto anteriormente, se descartó la posibilidad de que el compuesto **2** tuviera un esqueleto de abietano quedando así la posibilidad de que se tratara de un icetexano. Con los resultados mencionados se propuso la estructura que se muestra a continuación, la cual corresponde para un icetexano y contiene además del anillo C propuesto un enlace vinílico y un grupo funcional etéreo.



ESTRUCTURA I.

La asignación de la RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se ilustra en las siguientes tablas y se hizo con apoyo del experimento HETCOR (Esp. No. 2 g) y comparando algunos desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C con compuestos similares.

RMN de <sup>1</sup>H del *salviasperanol*.

No. átomo de Hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración	Constante de acoplamiento (Hz)
14	6.43 (s)	1	
6	6.02 (dd)	1	21.1 y 0.8
7	5.09 (d)	1	2.1
15	3.08 (hept)	1	6.8
20 A ó B	2.87 (d)	1	16.5
20 A ó B	2.63 (d)	1	16.5
CH <sub>3</sub> - 16 o 17	1.24 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> - 16 o 17	1.30 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> - 19	1.14 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -18	1.02 (s)	3	

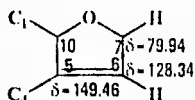
RMN de  $^{13}\text{C}$  del *salviasperanol*.

No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)	No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)
1	38.56 (t)	11	142.57 (s)
2	18.98 (t)	12	139.87 (s)
3	40 (t)	13	131.01 (s)
4	33.75 (s)	14	112.14 (d)
5	-149.46 (d)	15	26.98 (d)
6	128.34 (d)	16	22.45 (c)
7	79.94 (d)	17	22.78 (c)
8	131.39 (s)	18	29.84 (c)
9	117.02 (s)	19	27.66 (c)
10	83.74 (s)	20	30.25 (t)

HETCOR del *salviasperanol*.

Carbono de	con desplazamiento Químico de (ppm)	correlaciona con Hidrógeno-(os) de (multiplicidad)	en desplazamiento Químico de (ppm)
tipo sp <sup>2</sup>	128.34	dd	6.02
tipo sp <sup>2</sup>	112.14	s	6.43
metino	79.94	d	5.09
metileno	40	no es posible	asignarlo
metileno	38.56	no es posible	asignarlo
metileno	30.25	sistema AB	2.87 y 2.63
metilo	29.84	s	1.02 o 1.14
metilo	27.66	s	1.02 o 1.14
metino	26.98	hept	3.08
metilo	22.78	d	1.24 o 1.30
metilo	22.45		1.24 o 1.30
metileno	18.98	no es posible	asignarlo

Al comparar el heterociclo de cinco miembros que contiene la estructura propuesta con compuestos relacionados, como son el 2,5-dihidrofurano y el bicicloheptadieno se encontraron  $\delta$  químicos similares<sup>30</sup>. Se encontro que el carbono  $sp^3$  del 2,5-dihidrofurano aparece en 75.3 ppm y el  $sp^2$  en 126.3 ppm. En el bicicloheptadieno el carbono  $sp^2$  aparece en 143 ppm. Con estas comparaciones se asignan los desplazamientos químicos para los carbonos C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub> y C<sub>7</sub> como se ilustra a continuación.



El carbono en  $\delta$  149.46 ppm se encuentra unido mediante un enlace  $\pi$  con el carbono doblete en  $\delta$  128.34 ppm, formando una olefina trisustituida. El grupo funcional éter, se encuentra formado por los carbonos con multiplicidad de singulete y de doblete en los desplazamientos químicos de 83.74 y 79.94 ppm.

Mediante un experimento <sup>1</sup>H COSY (homonuclear Esp. No. 2 h), se determinó que el doble de dobles (6.02 ppm; J=2.1 y 0.8 Hz), observado en RMN de <sup>1</sup>H, se encuentra acoplado con el doblete en 5.09 ppm, correspondiente al proton geminal al éter y con uno de los hidrogenos del metileno en 4.0 ppm. En el espectro también se puede observar el acoplamiento que hay entre los dobletes del sistema A B (metileno en C<sub>20</sub>) en los desplazamientos químicos de 2.87 y 2.63 ppm. Así como también

30.- Johnson & Jankowski. Carbon-13 NMR Spectra. Wiley Interscience (1972).

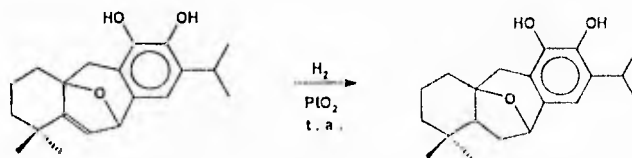
se puede observar el acoplamiento del metino del isopropilo con sus respectivos metilos. Las regiones que nos indican que hay acoplamiento entre las respectivas señales ya mencionadas se ilustran en el espectro número 2 h, mediante el trazo de cuadros cruzados por una línea diagonal.

#### Reacciones del salviasperanol.

Con este metabolito se llevaron a cabo tres reacciones, una reacción de hidrogenación y dos esterificaciones.

#### Reacción de Hidrogenación.

La reacción de hidrogenación se llevo a cabo con óxido de platino a temperatura ambiente.



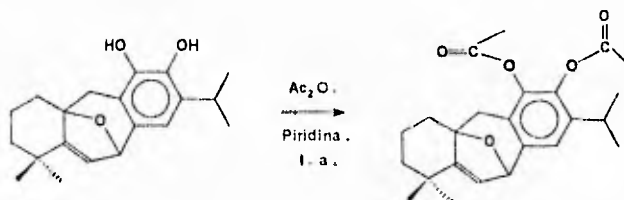
Con ella se confirma la presencia del protón vinílico en el compuesto 2. En espectrometría de masas (EM) el ión molecular tiene una  $m/z$  de 316 (Esp. No. 2 i), en el espectro de IR (Esp.No. 2 i) se observan señales correspondientes para oxhidrilo (3 605, 3 544) y bandas características del grupo funcional aromático en 1 633 | 500  $cm^{-1}$ . En el espectro de  $RMN^1H$  (Esp.No. 2 j) ya no se observa el doble de dobles que se asignaba para el protón vinílico en 6.024 ppm. El espectro concuerda con la estructura del producto de reacción y se le nombró 5,6-dihidrosalviasperanol.

## Reacciones de Esterificación.

### Acetilación.

Con la reacción de acetilación se confirmó la presencia de los dos grupos funcionales fenólicos.

En el espectro de IR (Esp. No. 2 m) del producto resultante de la reacción de acetilación no se observan las bandas de oxhidrilos, en su lugar se observa en  $1770\text{ cm}^{-1}$  una señal correspondiente al carbonilo de éster de fenol y en  $1630\text{ cm}^{-1}$  una pequeña banda que se asigna a dobles enlaces aromáticos. En espectrometría de masas (EM) el ión molecular tiene una  $m/z$  de 398 (Esp.No.2 n) y corresponde para una fórmula condensada de  $C_{24}H_{30}O_5$ . En RMN de  $^1H$  (80 MHz,  $CDCl_3$ ) se observa un singulete que integra para seis protones en 2.30 ppm. (Esp. No. 2 o), el desplazamiento químico indica que son los protones de los metilos de acetatos fenólicos. Al producto obtenido de la reacción se le nombró **11,12-diacetilsalviasperanol**.

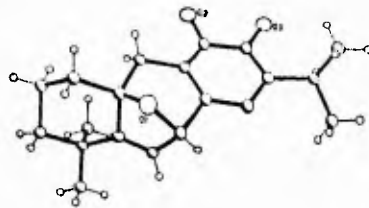
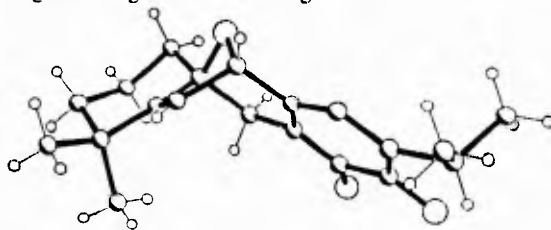


### Benzoilación.

El salviasperanol (compuesto 2), contiene dos centros estereogénicos, éstos forman parte del puente etéreo y para obtener su configuración absoluta por estudios de Difracción de Rayos X se trató con Cloruro de para Bromo Benzoilo (en piridina), de manera que al cristalizar el producto de



reacción y mandarlo a un estudio de Difracción de Rayos X se pretendía obtener la configuración absoluta del salviasperanol. Los resultados de la reacción no fueron exitosos, el producto de reacción es un aceite que no se logró cristalizar, por lo que se sometió un cristal de salviasperanol a estudio de Difracción de Rayos X (siguiente figura). Los resultados obtenidos confirman la estructura propuesta y muestran que se trata de un icetexano aromático en el cual se encuentran los grupos funcionales éter y alqueno; sin embargo no se logró obtener su configuración absoluta.



**Proyección de Rayos X del salviasperanol.**

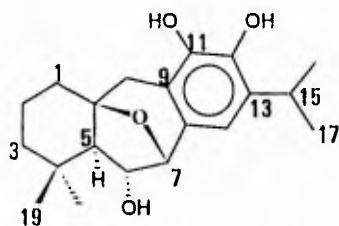
La estructura propuesta para el compuesto número 2, al cual se le nombró salviasperanol no se encuentra descrita en la literatura, así como tampoco sus productos de reacción, por lo que se considera al salviasperanol como compuesto nuevo.

***Elucidación de la estructura del 5  $\alpha$ , 6  $\beta$  - dihidro - 6  $\alpha$  hidroxisalviasperanol.***

El compuesto **3** es un sólido amorfo de color blanco (18 mg) tiene un p.f. de 184 - 190 °C, una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = -20^{\circ}$  (C = 0.1, CHCl<sub>3</sub>).

Con el espectro de UV se calcularon logaritmos de coeficientes de absorptividad molar ( $\epsilon$ ) de 4.5 y 3.9 correspondientes a  $\lambda$  máxima (MeOH) de 205 y 270 nm, absorciones características de fenoles<sup>20</sup>. En espectrometría de masas (EM. Esp. No. **3 e**), el ión molecular M<sup>+</sup> se encuentra a m/z de 332 con una intensidad relativa de 13.7 % y corresponde para una fórmula condensada C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>, lo cual implica siete elementos de insaturación. La m/z encontrada para el compuesto **3**, difiere en 18 unidades de la de el compuesto **2**. Las señales de la espectroscopia de IR (Esp. No. **3 a**) y de RMN<sup>1</sup>H (Esp.No. **3 b**) son muy parecidas a las del compuesto **2**.

En base a los datos espectroscópicos que se discuten a continuación se le asignó al compuesto **3**, la siguiente estructura y se le nombró 5  $\alpha$ ,6  $\beta$  - dihidro - 6  $\alpha$  - hidroxisalviasperanol.



**ESTRUCTURA II.**

Su espectro de infrarrojo muestra bandas en 3690, 3603 y 3552  $\text{cm}^{-1}$  que se asignan a grupos hidroxil-fenólicos. Las bandas en 1602 y 1539  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la presencia de dobles enlaces aromáticos.

En su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa un singlete correspondiente al protón aromático H-14 en un desplazamiento químico de 6.54 ppm. Las señales características de un sistema AB también son observadas, sus dobletes se encuentran en 2.76 y 2.43 ppm, cada uno integra para un protón y tienen una constante igual a 16 Hz. Las señales del isopropilo se observan en 3.13 ppm (hept, un hidrógeno,  $J = 6.8$  Hz, H-15); 1.26 ppm (d, tres hidrógenos,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-16 ó 17); 1.22 ppm (d, tres hidrógenos,  $J = 6.8$  Hz, CH<sub>3</sub>-16 ó 17). Los metilos angulares se observan como singletes en 1.03 y 1 ppm.

Las señales en que difiere el espectro de RMN $^1\text{H}$  del compuesto 3 en comparación con la del compuesto 2 son un doblete en 4.72 y un triplete en 4.30 ppm, cada una integra para un protón y tienen una constante de 6.2 Hz lo cual indica que el doblete y triplete están acoplados. El doble de dobles (6.02 ppm, H-6 protón vinílico ) y el doblete (5.09 ppm, H-7 protón alílico y gem a un grupo funcional éter ) del compuesto 2 no se observan .

El doblete en 4.72 se asignó al protón del carbono siete, el cual es geminal a una función oxigenada. El triplete en 4.30 ppm, se asignó como una señal geminal a un grupo funcional oxhidrilo (protón que se encuentra en el carbono seis).

Las señales de RMN $^1\text{H}$  se resumen en la siguiente tabla.

RMN de  $^1\text{H}$  de 5  $\alpha$ , 6  $\beta$  - dihidro - 6  $\alpha$  - hidroxisalviasperanol

No. átomo de Hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración	Constante de acoplamiento (Hz)
14	6.54 (s)	1	
7	4.72 (d)	1	6.2
6	4.30 (t)	1	6.2
15	3.13 (hept)	1	6.3
20 A ó B	2.76 (d)	1	10
20 A ó B	2.43 (d)	1	10
CH <sub>3</sub> - 16	1.26 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> - 17	1.22 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> - 19	1.03 (s)	3	
CH <sub>3</sub> - 18	1.00 (s)	3	

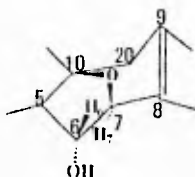
En la RMN de  $^{13}\text{C}$  (Esp. No. 3d), se observan cuatro carbonos con multiplicidad de triplete y cuatro con multiplicidad de cuarteto al igual que en el compuesto 2. Comparando esta resonancia con la del *salviasperanol*, se encontró que diferían en el número de carbonos doblete y de singulete. En el espectro del producto 2 hay cuatro carbonos doblete y ocho de singulete en el de 3 hay cinco carbonos con multiplicidad de doblete y siete

de singulete. El carbono seis doblete en 128 ppm del compuesto **2** ya no se observa, ahora se observa un doblete en cincuenta y ocho ppm. El singulete en 149.46 ppm del carbono cinco tampoco se observa. Los carbonos siete y diez, bases del éter se encuentran tanto en **2** como en **3**. En la siguiente tabla se ilustra su RMN<sup>13</sup>C.

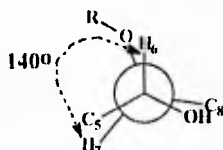
**RMN de <sup>13</sup>C de 5  $\alpha$ , 6  $\beta$ -dihidro - 6  $\alpha$ -hidroxisalviasperanol .**

No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)	No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)
1	29.67 (t)	11	140.55 (s)
2	15.24 (t)	12	142.25 (s)
3	30.43 (t)	13	132.27 (s)
4	31.34 (s)	14	115.71 (d)
5	58.06 (d)	15	27.19 (d)
6	77.85 (d)	16	22.84 (e)
7	78.36 (d)	17	22.84 (e)
8	126.63 (s)	18	30.06 (e)
9	117.63 (s)	19	27.84 (e)
10	80.54 (s)	20	39.01 (t)

El grupo funcional oxhidrilo que se encuentra sobre el carbono número seis se asignó con una orientación  $\alpha$ . Su estereoquímica se ilustra en la siguiente figura y se dedujo por efectos conformacionales. La constante de acoplamiento que hay para los protones seis y siete es de 6.2 Hz.



El acoplamiento observado entre los protones seis y siete está de acuerdo para un ángulo dihedral de aproximadamente  $140^\circ$  y se ilustra en la proyección de Newman a través de los átomos de carbono  $C_6$  y  $C_7$ .



Esta constante de acoplamiento ( $J = 6.2$  Hz), se atribuyó para una posición *trans*<sup>(10)</sup> entre los protones ya mencionados.

La estructura asignada tiene una fórmula condensada de  $C_{20}H_{28}O_4$  y siete elementos de insaturación, lo cual concuerda con lo mencionado anteriormente.

Como la estructura elucidada es muy similar a la del **salviasperanol**

31.- W. SIMON & J.T. CLERC. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Ed. Alhambra, 1977.

(compuesto 2), se pensaba que era un producto de transformación de éste, pero al tratarlo bajo las condiciones experimentales (ver parte experimental) con las que fue obtenido el compuesto 3, no hubo transformación. Por lo que se le considera como otro compuesto el cual no ha sido descrito en la literatura y se le da el nombre de 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$ -hidroxisalviasperanol.

### *Elucidación de la estructura del clovandiol*

Mediante cromatografías sucesivas de las fracciones más polares se aislaron trece miligramos de un producto (compuesto 4) cristalino incoloro, el cual tiene un p.f. de 115 °C.

En la **Espectrometría de Masas** de este compuesto, el ión molecular se encuentra a m/z de 238, corresponde para una fórmula condensada C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>. En el espectro de **IR**, destacan las señales de oxhidrilos (3 617 y 3 458 cm<sup>-1</sup>)<sup>(2)</sup>. En **RMN de <sup>1</sup>H** hay un doble de dobles en 3.80 ppm y un singulete en 3.33 ppm cada uno integra para un hidrógeno. Estas señales se asignan como protones gem a oxhidrilo. En 1.04, 0.97 y 0.86 ppm se observan tres singuletes, cada uno integra para tres protones que se asignan como metilos unidos a carbono sp<sup>3</sup>.

Este producto fue identificado como clovandiol. Al comparar su **RMN de <sup>1</sup>H** con una descrita<sup>(2)</sup>, resultaron ser idénticas.

Su espectro de **RMN <sup>13</sup>C**, así como su punto de fusión y la manera de revelar, determinaron que la sustancia aislada, es idéntica al clovandiol.

32. Rios, G. M. *Floroglucinoses, terpenoides y alcaloides de Esenbeckia nesiotica y Esenbeckia*

*belizensis* (Rutaceae). Oxidación espontanea de alcaloides Furoquinolinicos. Tesis de grado.

UNAM, México, 1991.

***Elucidación de la estructura de la 6-epi-desmetil  
esquirolina D***

El último compuesto aislado de la parte polar fué el compuesto **5**, se aisló como un sólido blanco (24 mg). Tiene un p.f. de 203-205 °C y una rotación específica  $[\alpha]_D^{20} = -56^{\circ}$ . (  $C = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$  ).

El compuesto **5** presenta bandas en su espectro de IR (Esp. No. **5 a**) de oxhidrilos<sup>(21)</sup> en 3616 y 3534  $\text{cm}^{-1}$ . En Espectrometría de Masas muestra el ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  de 348 (Esp. No. **5 d**) con una abundancia relativa de 5.5 % y corresponde a una sustancia de fórmula condensada  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$  (siete insaturaciones).

En su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Esp. No. **5 b**), se puede observar un singulete que integra para un protón en 6.76 ppm y se asigna a un protón aromático. En 5.35 ppm se observa un singulete que integra para un protón y se asigna como un protón de hemiacetal. Las señales observadas (doblete y triplete) en los desplazamientos químicos de 4.63 ppm ( $J = 4.4$  Hz) y 4.03 ppm ( $J = 4.4$  Hz) se asignan a protones sobre carbono y geminales a función oxigenada, cada una de ellas integra para un hidrógeno y se encuentran acopladas dado que tienen la misma constante. También se pueden observar las señales que corresponden a un grupo isopropilo enlazado a un anillo aromático<sup>(20)</sup>, en desplazamientos químicos de 3.25 ppm (hept,  $J = 6.8$  Hz), de 1.23 (doblete,  $J = 6.8$  Hz) y de 1.12 ppm (doblete,  $J = 6.8$  Hz); cuya relación de áreas es de 1:3:3. El valor de las constantes ( $J = 6.8$  Hz) apoyan esta suposición. Por último hay dos singuletes en 1 ppm que integran cada uno para tres protones y se asignan como los hidrógenos de dos metilos.



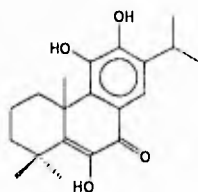
Como se mencionó anteriormente, se esperaba aislar diterpenos con esqueleto de abietano, icetexano, clerodano y pimarano. La presencia de cuatro señales asignadas para hidrógenos de metilos en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, descarta la posibilidad de que se trate de un clerodano ó pimarano y dado que ya no se observa el sistema AB como en los icetexanos 2 y 3, se descarta también la posibilidad de que se trate de un icetexano. Lo anterior es indicio de que el compuesto 5 posee un esqueleto de un abietano.

Se trazaron espectros de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto 5, usando como disolvente CDCl<sub>3</sub> y CDCl<sub>3</sub>+D<sub>2</sub>O con el fin de poder observar las señales correspondientes a los protones de oxhidrilos. Al comparar los espectros de RMN de <sup>1</sup>H no se observaron cambios claros que nos indicaran la cantidad de protones debidos a la presencia de oxhidrilos. Por lo que siete miligramos del compuesto se disolvieron ahora en una mezcla de CDCl<sub>3</sub> y DMSO y en su espectro (Esp. No. 5 c) se pueden observar ahora dos singuletes anchos en δ 7.43 y 6.75 ppm correspondientes a los protones de oxhidrilos; el singulete que se encontraba anteriormente (espectro de RMN<sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub>) en un desplazamiento cuántico de 5.35 ppm, se observa ahora como doblete en el mismo desplazamiento y el triplete (δ de 4.03) se observa como doblete de tripletes. Los cambios observados para las señales doblete (δ de 5.35) y el doblete de tripletes (δ de 4.03) indican que los protones son geminales a grupos funcionales oxhidrilos y se observan de la manera anterior porque sus protones se encuentran acopladas con los protones de los oxhidrilos geminales a ellos.

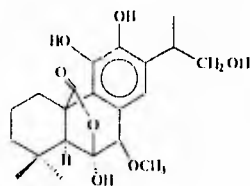
En RMN <sup>13</sup>C (Esp. No. 5 e), se observan las señales de veinte carbonos, lo cual concuerda para la estructura de un diterpeno. Diez de las señales observadas corresponden a carbono totalmente sustituido y a metilenos, las otras diez señales corresponden a metinos y metilos.

Como ya se mencionó en la espectroscopia de RMN<sup>13</sup>C de este compuesto se espera que se trate de abietano y dado que no se observan las señales correspondientes a los protones de cinco metilos en su RMN protónica se procedió a hacer comparaciones con respecto al desplazamiento químico del carbono en diez de algunos abietanos descritos en la literatura.

Por ejemplo el desplazamiento químico para el carbono diez en la 19-hidroxi-7  $\alpha$  - acetoxiroyleanona (página 13) es de 38 ppm<sup>(33)</sup> éste mismo se encuentra en  $\delta$  41.3 ppm en el 14-desoxi-coleon U<sup>(34)</sup> y en el 16-hidroxi-7-metoxiromanol, el carbono 10 aparece en 47.1 ppm<sup>(34)</sup>.



14-desoxi-coleon U.



16-hidroxi-7-metoxiromanol.

Lo anterior indica que el carbono diez del compuesto 5 (abietano), siente el efecto de un grupo funcional y como sólo se observan bandas de oxhidrilos y anillo aromático en la espectroscopia, se propone que el

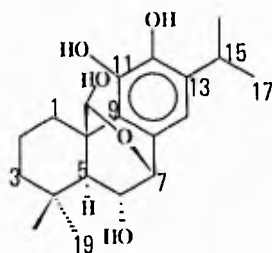
33.- Hernández, M; Esquivel, B; Cárdenas, J; Rodríguez-Hahn, L & Ramamoorthy, T. P. *Phytochemistry* . 26 [12] 3297-99 (1987) .

34.- Luis, J. G. & Grillo, T. A. *Phytochemistry* . 24 [3] 863-64 (1993) .

carbono 10 esté interaccionando con el anillo aromático como en la estructura de un abietano, para que así pueda ser movido hacia campo bajo<sup>20</sup>. Se encuentra un carbono en 46 ppm el cual tiene multiplicidad de singlete y es atribuido al carbono 10 del abietano.

Los carbonos del anillo aromático pentasustituido se encuentran hacia campo bajo.

Como en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del compuesto **5** se dedujo la presencia de un grupo funcional hemiacetalico, se propone que el abietano posea una estructura (siguiente figura) en la que el carbono hemiacetalico sea el carbono veinte y el carbono siete se encuentre unido a un átomo de oxígeno, formando un puente etéreo.



**Estructura III.**

El carbono en 91.02 ppm, se asigna como el carbono hemiacetalico y el carbono en 73.68 ppm se asigna al carbono siete.

Con la estructura propuesta se explica el acoplamiento de H-6 con H-7 observado en RMN de  $^1\text{H}$  (doblete acoplado con triplete) además concuerda con la fórmula condensada así como con la espectroscopía.

La asignación de las señales de la espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se ilustran en las siguientes tablas.

RMN de  $^1\text{H}$  de 6-*epi*-desmetil-esquirolina-D.

No. átomo de Hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración	Constante (Hz)
14	6.76 (s)	1	
20	5.35 (s)	1	
7	4.63 (d)	1	4.4
6	4.03 (t)	1	4.4
15	3.25 (hept)	1	6.8
CH <sub>3</sub> -16	1.23 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> -17	1.19 (d)	3	6.8
CH <sub>3</sub> -18	1.06 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -19	1.04 (s)	3	

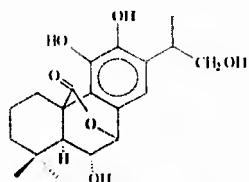
RMN <sup>13</sup>C de 6-*epi*-desmetil-esquirolina-D.

No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)	No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)
1	29.30 (t)	11	143.24 (s)
2	18.15 (t)	12	142.91 (s)
3	40.94 (t)	13	133.86 (s)
4	33.51 (s)	14	115.71 (d)
5	56.32 (d)	15	26.58 (d)
6	68.86 (d)	16	22.58 (c)
7	73.68 (d)	17	22.42 (c)
8	128.70 (s)	18	33.19 (c)
9	122.05 (s)	19	22.85 (c)
10	46.82 (s)	20	91.02 (d)

El oxhidrilo que se encuentra sobre el carbono seis se le asignó con una orientación  $\alpha$  - ecuatorial por comparación con el 16 hidroxí - isorosmanol<sup>35</sup>.

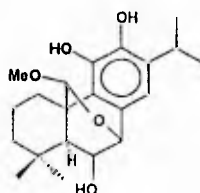
El proton que se encuentra sobre C<sub>7</sub> en el compuesto 5 tiene una constante de 4.4 Hz igual que el 16 - hidroxí - isorosmanol.

35 - Lais, J. G. & Andrés, L. *Phytochemistry*, **22**, 635 (1993).



16-hidroxi-isorosmanol.

Se ha aislado la esquirolina D (siguiente figura), de *Coleus esquirolii*<sup>26</sup>, la cual es muy parecida al compuesto 5.



esquirolina D.

El compuesto 5 no se encuentra reportado en la literatura de manera que se asigna como un compuesto nuevo y se le nombra *6 epi desmetilesquirolina D*.

36.- Chemical Abstracts 119 3862 y (1993).

#### Elucidación estructural de los metabolitos del extracto no polar.

Del extracto no polar se aislaron 3 metabolitos a dos de ellos (6 y 7) se les identificó como taxodiona y  $\beta$ -sitosterol. El compuesto (8) se aisló mediante una reacción de acetilación y fue identificado como el 11, 12-diacetil-desmetilsalvianol.

#### ***Elucidación de la estructura de la taxodiona***

El compuesto 6 fue aislado como un sólido cristalino anaranjado de p.f. 110 °C (se cristalizaron 56 mg con acetona).

Su peso molecular de 314, fue obtenido por espectrometría de masas, es congruente para una fórmula de  $C_{20}H_{26}O_3$ . En su espectroscopía infrarroja (IR) hay una banda en  $3\ 347\text{ cm}^{-1}$  y se asigna como un grupo funcional oxhidrilo y las bandas en  $1\ 671$  y  $1\ 617\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la presencia de carbonilos de quinona<sup>(21)</sup>. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se observa un singulete que intercambia con óxido de deuterio e integra para un protón, se trata de un grupo funcional oxhidrilo. En 6.88 ppm (s, 2 H) y en 6.21 ppm (s, 1 H) hay grupos funcionales de cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Un heptuplete centrado en 3.45 ppm, se asigna al metino del isopropilo y sus metilos se observan como dobletes centrados en 1.19 y 1.16 ppm, cada uno integra para 3 protones. Otras señales se observan en: 2.60 (s, 1 H); 1.27 (s, 6 H) y 1.12 (s, 3 H)<sup>(20)</sup>. Esta sustancia fue identificada, por comparación con una muestra auténtica, como taxodiona.

La taxodiona se aisló por primera vez de *Taxodium distichum* por Sir. Morris Kupchan, Aziz Karim y Carol Marcks<sup>(22)</sup>, ellos encontraron que

presentaba actividad antitumoral<sup>37</sup>, posteriormente se encontró que presenta actividad citotóxica<sup>38</sup>.

También se le ha aislado de *Salvia phlomoides* y *Salvia oaxacana*<sup>39</sup>.

### ***Elucidación de la estructura del $\beta$ -sitosterol***

El siguiente componente (7), es una sustancia cristalina blanca con p.f. de 130 - 132 °C (acetona-metanol). Al comparar directamente en una cromatografía en capa fina este componente con una muestra pura y auténtica de  $\beta$ -sitosterol se observó que son iguales. Además los datos de la espectroscopía de IR de la sustancia 7 concuerdan con los descritos en la literatura para  $\beta$ -sitosterol<sup>39,40</sup>, por lo que este componente se asigna de manera contundente como  $\beta$ -sitosterol.

### ***Elucidación de la estructura del desmetil salvicanol***

El compuesto número 8, se logró aislar mediante una reacción de acetilación de las fracciones 106-122. En el espectro de infrarrojo de estas fracciones, trazado antes de la reacción de acetilación, no fueron observadas las bandas características de los carbonilos de éster de fenol o de alcohol.

37.- Kupchan , S. Morris . Journal of the American Chemical Society . 20 [21] 5923-24 (1968) .

38.- Comentarios de M. C. Baldomero Esquivel .

39.- Devon , T. K. & Scott , A. J. , Hand Book of Naturally Occurring Compounds . Vol . II . Academic Press , Inc . London 1972 pp 320 .

40.- Martínez , C. N . S . Estudio Fitoquímico de *Salvia microphylla* variedad neurepia . Tesis profesional Univ . Veracruzana . 1988 .

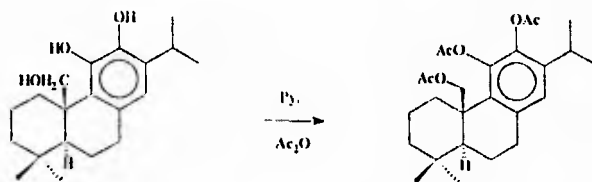


El compuesto es de color blanco, su punto de fusión es de 120-121 °C, se obtienen de él 20 mg. Es soluble en Acetona, Cloroformo, Metanol, Acetato de Etilo, Eter e insoluble en Hexano. Después de varios intentos se logró cristalizarlo en una mezcla de Eter-Hexano (1:1).

Con el espectro de UV se calcularon los  $\log \epsilon$  de 2.7 y 2.6 correspondientes a  $\lambda$  máximas (metanol) de 263 y 270 nm. En la literatura se encuentran descritos compuestos acetilados, por ejemplo, un fenol acetilado el cual absorbe a 261 nm (hexano) y tiene un coeficiente de extinción de 2.48<sup>(20)</sup> y el triacetato del 11,12,20-(abieta 8,11,13-trieno) absorbe (etanol) a  $\lambda$  máximas de 255, 264 y 275<sup>(20)</sup>. En la **Espectrometría de Masas (Esp. No. 8 c)**, el ión molecular se encuentra a  $m/z$  de 402 y corresponde a una fórmula condensada  $C_{24}H_{34}O_5$ . Se observan los iones a  $m/z$  de: 360 ( $M^+$  -  $CH_2=C=O$ ), 318 ( $M^+$  - dos  $CH_2=C=O$ ), 342 ( $M^+$  - AcOH), 282 ( $M^+$  - dos AcOH) y 43 ( $CH_3C=O^+$ ), correspondientes a la fragmentación de acetatos. Estos son indicios de que se trata de un diterpeno, el cual contiene dos fenoles acetilados. En su espectro de IR (Esp. No. 8 a), destacan las señales de los siguientes grupos funcionales: oxhidrilo ( $3517\text{ cm}^{-1}$ ), carbonilo de éster de fenol ( $1770\text{ cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces del grupo funcional aromático ( $1600$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$ )<sup>(20)</sup>. En su espectro de RMN de  $^1H$  se observa un singulete (6.98 ppm) que integra para un protón, el cual es aromático (Esp. No. 8 b), con esto se propone que el compuesto número 8 sea aromático. En 4.8 ppm se observa un singulete ancho que intercambia con  $D_2O$  y se asigna como el protón de un grupo funcional oxhidrilo. En 2.66 ppm se observa un singulete que integra para dos protones, su desplazamiento químico<sup>(20)</sup> indica que se trata de un metileno bencílico. Se observan las señales de un grupo isopropilo en 2.91 ppm (heptuplete), 1.21 ppm (doblete), 1.17 ppm (doblete), las cuales

integran para 1, 3 y 3 hidrógenos respectivamente con una constante de 6.92 Hz, la cual indica que los dobletes y el heptuplete están acoplados. En 2.3 y 2.29 ppm se observan dos singuletes, cada uno integra para tres protones los cuales se asignan como los hidrógenos de los metilos de dos acetatos. En 0.92 y 0.89 ppm se observan otros dos singuletes, cada uno integra para tres protones y se asignan como los hidrógenos de dos metilos.

Este metabolito se logro aislar mediante una reacción de acetilación, usando piridina y anhídrido acético, condiciones con las cuales se acetilan fenoles, alcoholes primarios y secundarios. Por ejemplo el 11,12,20-Trihidroxi-abieta-8,11,13-trieno aislado de *Salvia mellifera*<sup>(20)</sup> se acetila con las condiciones de reacción antes citadas y al acetilarlo obtienen el triacetato.

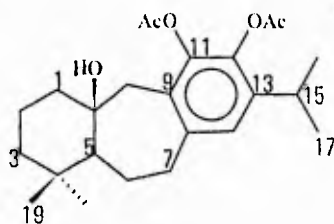


Se acetilaron los dos fenoles y el alcohol primario del compuesto aislado de *Salvia mellifera*. Se usaron las condiciones de reacción anteriores para acetilar las fracciones 106-122 y en la espectroscopia de infrarrojo, obtenida para el producto de reacción (compuesto número 8), se observa una señal correspondiente a un oxhidrilo y ya que no se acetilo se asignó como un oxhidrilo terciario. Con la espectroscopia de IR, RMN de  $^1\text{H}$  y EM se dedujo la presencia de dos acetatos fenólicos.

Para observar mejor las señales, se elaboró un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  usando como disolvente  $\text{C}_6\text{D}_6$ . En el segundo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Esp.No. 8 e) se observa ahora un sistema AB, en lugar del singulete que en cloroformo se encontraba en 2.66 ppm. Los dobletes del sistema AB se encuentran centrados en 2.69 y 2.47 ppm, cada uno integra para un protón. Un sistema AB se observa en los dos icetexanos descritos anteriormente y en el desmetil salvicianol aislado de las partes aéreas de *Salvia mellifera*<sup>26</sup>.

En RMN de  $^{13}\text{C}$  (Modalidad de APT. Esp.No. 8 d) se observan nueve carbonos con multiplicidad de singulete, tres carbonos con multiplicidad de doblete, seis carbonos con multiplicidad de triplete y seis carbonos con multiplicidad de cuarteto.

En base a lo encontrado anteriormente se propone la estructura de un icetexano, con un grupo funcional oxhidrilo sobre C-10.



La asignación de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{C}_6\text{D}_6$  se ilustra en las en las siguientes tablas.

RMN<sup>1</sup>H del 11,12 diacetil desmetilsalicanol.

No. átomo de Hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	Integración Integración	Constante (Hz)
14	6.98 (s)	1	
15	2.91 (heptaplete)	1	6.92
20	2.66 (s)	2	
CH <sub>3</sub> -23	2.30 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -24	2.29 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -16	1.21 (d)	3	6.92
CH <sub>3</sub> -17	1.17 (d)	3	6.92
CH <sub>3</sub> -19	0.92 (s)	3	
CH <sub>3</sub> -18	0.89 (s)	3	

RMN de  $^1\text{H}$  del 11,12 diacetil desmetil salvicanol ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

No. átomo de Hidrógeno	Desplazamiento Químico (ppm)	integración	Constante (Hz)
14	6.95 (s)	1	
15	3.01 (quintuplete)	1	6.94
20 A	2.69 (d)	1	14.7
20 B	2.47 (d)	1	14.7
AcOEt.	1.83 (s)	3	
AcOEt.	1.76 (s)	3	
$\text{CH}_3$ -16 ó 17	1.17 (d)	3	6.94
$\text{CH}_3$ -16 ó 17	1.15 (d)	3	6.94
$\text{CH}_3$ -18 ó 19	1.06 (s)	3	
$\text{CH}_3$ -18 ó 19	0.92 (s)	3	

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 8 se observa que dos de los carbonos con multiplicidad de singlete pertenecen al grupo funcional acetato, cinco son del anillo aromático, uno del carbono 4 y el que se encuentra hacia campo bajo se asigna para el  $\text{C}_{20}$ , su desplazamiento químico indica que está sintiendo el efecto desprotector de un grupo funcional y en este caso se trata de un oxhidrilo. La asignación de las señales de RMN de  $^{13}\text{C}$  se ilustra en la siguiente tabla.

RMN de  $^{13}\text{C}$  de 11,12 diacetil desmetil salvicanol .

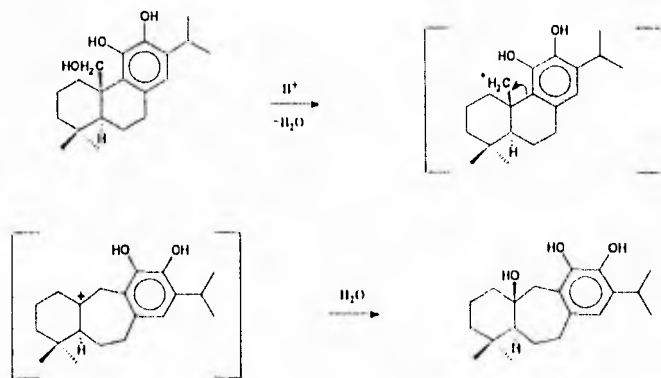
No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)	No. átomo de Carbono	Desplazamiento Químico (ppm)
1	42.46 (t)	13	139.50 (s)
2	18.63 (t)	14	123.76 (d)
3	42.46 (t)	15	27.49 (d)
4	34.37 (s)	16	22.97 (c)
5	38.41 (d)	17	22.97 (c)
6	23.21 (t)	18	32.22 (c)
7	36.68 (t)	19	21.63 (c)
8	138.02 (s)	20	43.43 (t)
9	127.95 (s)	21	168.66 (s)
10	70.47 (s)	22	169.52 (s)
11	141.47 (s)	23	20.52 (c)
12	142.96 (s)	24	20.37 (c)

La estructura propuesta coincide con la espectroscopia encontrada y al comparar la RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **8** con la del desmetilsalvicanol (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), aislado de las partes aéreas de *Salvia mellifera* se encontraron señales muy parecidas entre sí, con excepción de los grupos funcionales acetato<sup>(26)</sup>.

Para el desmetilsalvicanol se describe una señal muy característica, que revela la presencia de un sistema AB el cual tiene uno de sus dobletes en un desplazamiento químico de 2.57 ppm y el otro en 3.03 ppm, los

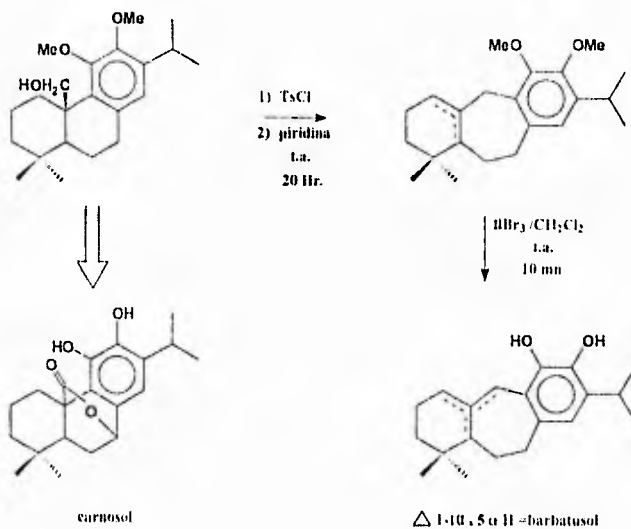
dobletes tienen la misma constante ( $J = 14$  Hz). Otras señales se encontraron en los siguientes desplazamientos químicos: 0.85 y 0.92 (3 H cada uno, s, Me-18 y Me-19); 1.21, 1.24 (3 H cada uno, d,  $J = 7$  Hz, Me-16 y Me-17); 2.57, 3.03 (1 H cada uno, d,  $J = 14$  Hz, CH<sub>2</sub>-20); 3.16 (1 H, heptuplete,  $J = 7$  Hz, H-15); 5.66, 6.43 (1 H cada uno, singulete ancho, oxhidrilos que intercambian con D<sub>2</sub>O); 6.57 (1 H, s, H-14). Además el IR presentó bandas para oxhidrilo y grupo funcional aromático.

El desmetilsalvicanol tiene una fórmula condensada de C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub> [M<sup>+</sup>] a m/z de 318. Se estableció la orientación del alcohol en 10 como β por consideraciones biogenéticas y porque la configuración absoluta del salvicanol aislado en *Salvia mellifera* es β, esto se estableció al analizar por difracción de rayos X el derivado 11-p-bromobenzoilado. La deshidrogenación enzimática del Me-20 en el 11,12,20-trihidroxi-abieta-8,11,13-trieno y migración del grupo fenilo a carbono 20 seguido por ataque de H<sub>2</sub>O sobre el carbocatión en carbono 10 da un icetexano.



Dado que la espectroscopía descrita para el desmetilsalvicanol resultó ser muy parecida a la del compuesto 8, se asignó a éste como el derivado acetilado del desmetilsalvicanol.

El desmetilsalvicanol fué aislado por primera vez por Alphonse Kelecom de *Coleus barbatus*<sup>(41)</sup>, también se le ha aislado de *Salvia mellifera*<sup>(42)</sup>. Kelecom prueba químicamente que un icetexano proviene de la expansión del anillo B de un abietano y obtiene  $\Delta^1-10, 5 \alpha$  11 = barbatusol a partir del carnosol <sup>(42)</sup>.



41.- Natural Product Reports, 8 6-8 (1991).

42.- Kelecom, A. Tetrahedron, 22 [21] 3603-08 (1993).



## PRUEBAS DE TOXICIDAD.

La toxicidad se determinó mediante bioensayos para la *Artemia salina* Leach con el Salviasperanol, el 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$ -hidroxisalviasperanol, aislados de las raíces de *Salvia aspera* y con los productos obtenidos de reacción como son el 5,6-dihidrosalviasperanol y el 11, 12 - diacetil desmetilsalvicanol, de acuerdo a la técnica descrita por B. N. Meyer<sup>(43)</sup> y colaboradores, considerando que este bioensayo permite detectar en forma preliminar actividades biológicas más complejas. La preparación de las muestras se indica en la parte experimental (ver página número 75). Los resultados obtenidos se alimentan a un programa de computadora y se obtiene que el 11, 12 - diacetil desmetilsalvicanol es un metabolito tóxico para la *Artemia salina* Leach, a 50 ppm.

## RESULTADOS.

Los datos obtenidos de los bioensayos realizados, se alimentan a un programa de computadora y se obtiene que el 11, 12 - diacetil desmetilsalvicanol es un metabolito tóxico para la *Artemia salina* Leach. Los resultados se tabulan a continuación.

Según los autores mencionados<sup>(43)</sup>, la expectativa de encontrar sustancias bioactivas es superior cuando las dosis letales medias son menores o iguales a 1000 ppm, en la actualidad se consideran 100ppm<sup>(48)</sup>.

43.- Meyer, B. N ; Ferrigni, N. R ; Pulnam, J. E. Jacobsen, L. B ; Nichols, D. E. Mc Laughlin, J. L. Planta Medica. 45 31-34 (1982).

TOXICIDAD DE LOS METABOLITOS Para *Artemia salina* Leach.

compuesto	concentración µg / ml	toxicidad
salviasperanol	100	No presente
	10	No presente
	1	No presente
5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$ - hidroxi- salviasperanol	100	No presente
	10	No presente
	1	No presente
5,6-dihidrosalvi- asperanol	100	No presente
	10	No presente
	1	No presente
11,12-diacetil- desmetilsalvicanol	100	Si presente
	10	Si presente
	1	No presente

## ~~CONCLUSIONES~~

## CONCLUSIONES.

En este trabajo se presentan los resultados sobre el estudio químico de las raíces de la *Salvia aspera*, planta mexicana del género *Salvia*. Con ésto se extienden los conocimientos químicos de las raíces del género (*Salvia*) en México.

De las raíces de *Salvia aspera*, se lograron aislar mediante técnicas cromatográficas seis diterpenos, un sesquiterpeno y un esteroi.

Tres de los diterpenos son nuevos y se les dió por nombre el salviasperanol, el 5  $\alpha$ , 6  $\beta$ -dihidro-6  $\alpha$ -hidroxisalviasperanol y la 6-epi desmetilesquirolina-D.

Se establecen las estructuras I, II y III para los diterpenos nuevos. Los dos primeros tienen un esqueleto de icetexano y el tercero de abietano.

El sesquiterpeno, el esteroi y los otros tres diterpenos aislados, se encuentran descritos en la literatura y fueron identificados como el clovandiol, el  $\beta$ -sitosterol, el sugiol, la taxodiona y el desmetilsalvicanol. Este último se aisló mediante una reacción como el 11,12-diacetil desmetilsalvicanol.

Se determinaron las características físicas y espectroscópicas de los compuestos aislados y de los derivados preparados.

El 11,12-diacetil desmetilsalvicanol resultó tener actividad tóxica para la *Artemia salina* a 100 y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

→ Comentarios.

Se propone realizar estudios posteriores acerca de la toxicidad del 11,12-diacetil desmetilsalvicanol y sobre los posibles usos que puedan hacerse de este metabolito.

También se propone estudiar mayor cantidad de raíces de *Salvia aspera* y así poder separar otros posibles metabolitos, distintos a los presentados en este estudio.

~~PARTE EXPERIMENTAL~~

---

---

El desarrollo de la parte experimental, se llevó a cabo mediante la siguiente metodología:

→ **Recolección del material vegetal.**

Esta etapa se lleva a cabo con base en los datos del Herbario Nacional. Las raíces de *Salvia aspera* (Labiatae) se recolectaron en Tehuacán estado de Puebla.

La planta estudiada (raíces de *Salvia aspera*, Labiatae), fué recolectada en agosto de 1991 a 1 Km de San Antonio Cañada en el Valle de Tehuacán, estado de Puebla, por el MC. Baldomero Esquivel R. y el QFB. Simón Hernández O. y fué identificada por el Dr. T.P. Ramamoorthy del Instituto de Biología de la UNAM. En dicho instituto se dejó una muestra de la especie, quedando registrada en el herbario como MEXU 544950.

La *Salvia aspera* es un arbusto de 1 m con flores amarillas, la vegetación que la circundaba era *Salvia melissodora* y *cactáceas*, se encontró en un suelo calizo.

→ **Extracción de los metabolitos secundarios.**

Este proceso se lleva a cabo vía maceración con disolventes orgánicos. La maceración de las raíces se hizo con acetona. El extracto obtenido se sometió a una partición, este proceso permite efectuar una primera separación de los metabolitos secundarios de acuerdo a su polaridad. De esta manera se obtienen dos extractos (uno polar y otro no polar), los cuales se someten en una siguiente etapa a una separación cromatográfica.

El peso de la planta fué de 4.506 Kg de donde se tomaron 1.506 Kg de raíces, las cuales se extrajeron mediante una maceración con acetona (12 lt) a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente del extracto se destilo a presión reducida en un rotavapor y su completa eliminación al alto vacío.

Se obtuvieron 62.7 g del extracto crudo seco, éste se sometió a una partición con Hexano - Benceno (1:1) vs Metanol - Agua (4:1). Tanto la fase polar como la no polar se evaporaron a presión reducida hasta eliminación total de los disolventes, lo cual se completó al destilar al alto vacío.

→ Separación.

En esta etapa se llevo a cabo la separación y purificación de los diferentes metabolitos secundarios. La separación se basó en la aplicación de métodos cromatográficos en sus diferentes modalidades como son: cromatografía en columna y en capa delgada. Para el desarrollo de estas técnicas se emplearon diferentes disolventes (Hexano, Acetato de Etilo, Cloruro de Metileno, Acetona y Metanol), en forma pura y en mezclas de diferente polaridad. Este proceso se repite varias veces hasta obtener productos puros.

Para las cromatografías en columna se utilizó sílica-gel 60 Merck de malla 230 - 400 y 70 - 230 Mesh ASTM y para las de capa fina se usaron placas de sílica - gel 60 con indicador de fluorescencia.

Los extractos (polar y no polar) se cromatografarón al vacío, cada uno de ellos por separado. Los eluyentes que se usarón en las dos separaciones fuerón: Hexano, Acetato de Etilo, Metanol y mezclas de Acetato de Etilo - Hexano y Acetato de Etilo - Metanol las eluciones se llevarón a cabo en polaridad ascendente con fracciones de 500 ml. De la separación del extracto polar se obtuvieron 109 fracciones y del extracto no polar 153 fracciones.

Otra técnica utilizada para la purificación es la cristalización por par de disolventes. Dependiendo de la complejidad de la mezcla se pueden



emplear ciertas reacciones químicas que modifiquen la polaridad de los productos y que ayuden de esta forma a su separación.

Una vez aislados y purificados se procede a la identificación de la estructura molecular de dichas sustancias.

→ Elucidación estructural.

Para la elucidación estructural de los metabolitos secundarios se emplean técnicas espectroscópicas, tales como IR, EM, UV, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Otra técnica utilizada es la Difracción de Rayos X, la cual proporciona información muy completa de los metabolitos.

Los espectros de IR fueron determinados en cloroformo en un espectrofotómetro Nicolet FT - SX o en un Perkin Elmer modelo 283 B. Los datos se expresan en números de onda  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Los espectros de UV fueron determinados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552. Los datos se expresan en longitudes de onda  $\lambda$  máx (nm) para los máximos de absorción en disoluciones de metanol.

La espectrometría de masas (EM) se determinó en un espectrofotómetro Hewlett - Packard 5945 - A, mediante la técnica de impacto electrónico, a 70 eV. Los datos se expresan como una relación de masa a carga,  $m/e$ , de los correspondientes fragmentos. El ión molecular se designa como  $\text{M}^+$ .

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en el espectrómetro Varian-Gemini 200 a 200 y 80 MHz respectivamente, usando como disolvente  $\text{CDCl}_3$ . Los desplazamientos químicos de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  están dados en ppm con respecto al TMS, sus constantes de acoplamiento J se expresan en Hz.

RO, las rotaciones específicas se obtuvieron en un polarímetro Jasco DIP - 360, usando como disolvente cloroformo, la concentración se expresa en g / 100 ml y se realizaron a temperatura ambiente.

→ Identificación.

De acuerdo a la complejidad de la estructura se puede llevar a cabo la formación de derivados, para confirmar la presencia de ciertos grupos funcionales.

La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina en cromatofolios Macherey - Nagel, usando como reveladores luz ultravioleta y una solución de sulfato cérico al 1 % en ácido sulfúrico 2 N.

Los puntos de fusión de los metabolitos obtenidos fueron determinados en un aparato Fisher - Johns y no están corregidos.

La planta estudiada (raíces de *Salvia aspera*, Labiatae) , fué recolectada en agosto de 1991 a 1 Km de San Antonio Cañada en el Valle de Tehuacán, estado de Puebla, por el MC. Baldomero Esquivel R. y el QFB. Simón Hernández O. y fué identificada por el Dr. T.P. Ramamoorthy del Instituto de Biología de la UNAM. En dicho instituto se dejó una muestra de la especie, quedando registrada en el herbario como MEXU 544950.

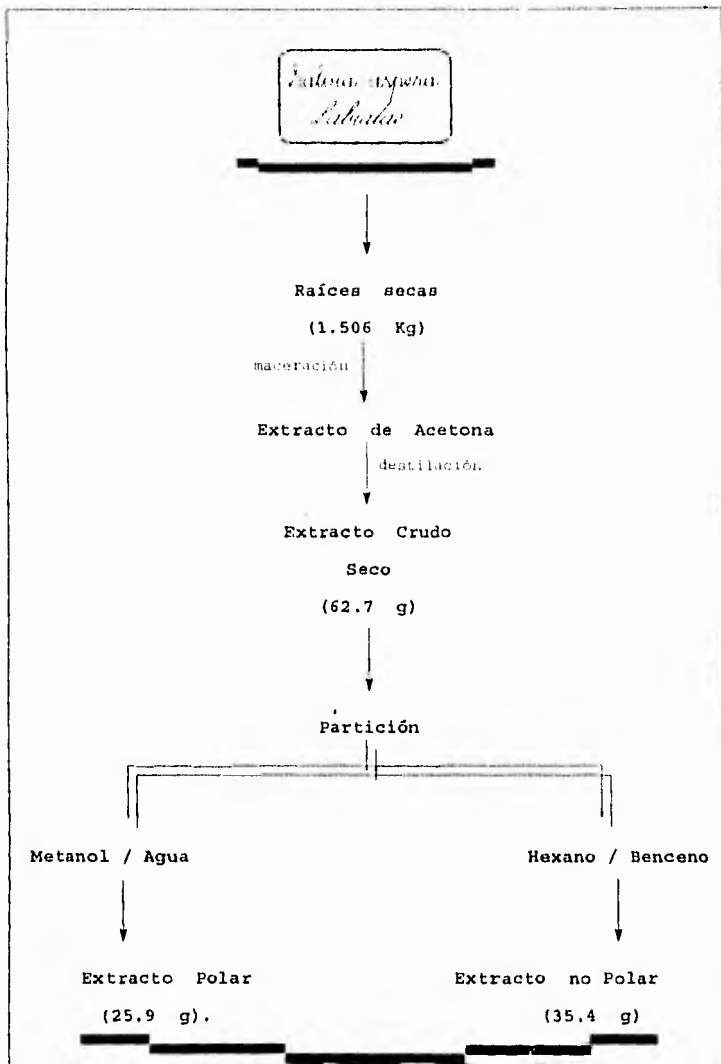
La *Salvia aspera* es un arbusto de 1 m con flores amarillas, la vegetación que la circundaba era *Salvia melissodora* y *cactáceas*, se encontró en un suelo calizo.

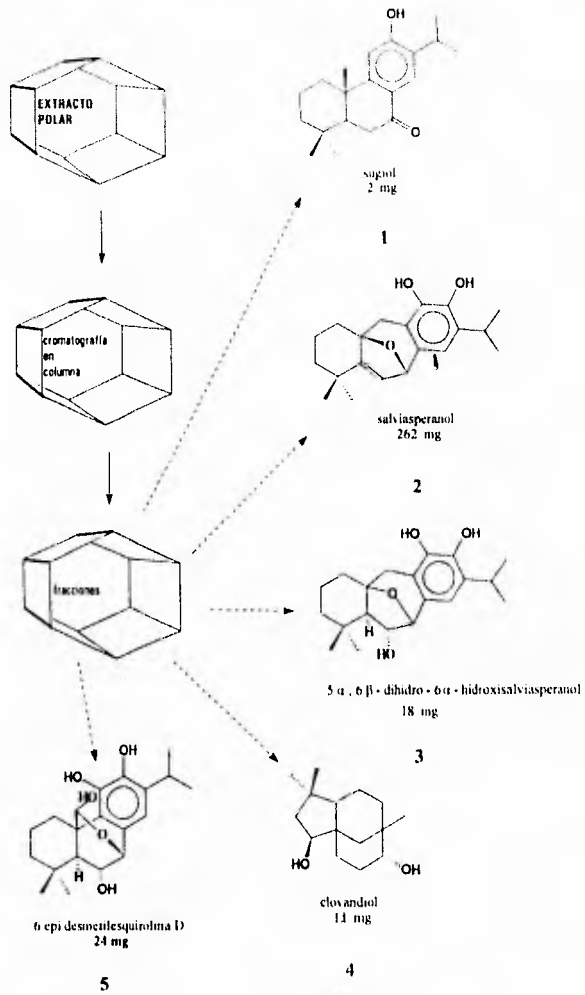
El peso de la planta fué de 4.506 Kg de donde se tomaron 1.506 Kg de raíces, las cuales se extrajeron mediante una maceración con acetona (12 lt) a temperatura ambiente durante 4 días. El disolvente del extracto se destilo a presión reducida en un rotavapor y su completa eliminación al alto vacío.

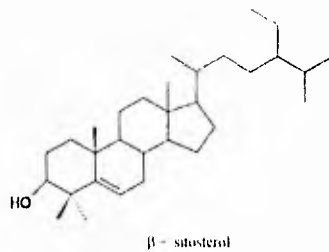
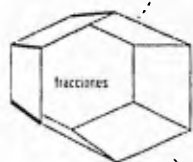
Se obtuvieron 62.7 g del extracto crudo seco, éste se sometio a una partición con Hexano-Benceno (1:1) vs Metanol-Agua (4:1). Tanto la fase polar como la no polar se evaporaron a presión reducida hasta eliminación total de los disolventes, lo cual se completo al destilar al alto vacío.

Los extractos (polar y no polar) se cromatografiaron al vacío, cada uno de ellos por separado. Los eluyentes que se usaron en las dos separaciones fueron Hexano, Acetato de Etilo, Metanol y mezclas de Acetato de Etilo-Hexano y Acetato de Etilo-Metanol las eluciones se llevaron a cabo en polaridad ascendente con fracciones de 500 ml.

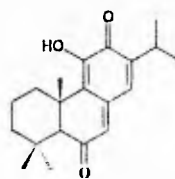
De la separación del extracto polar se obtuvieron 109 fracciones y del extracto no polar 153 fracciones.





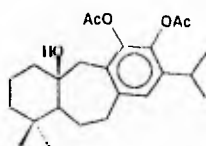


6



56 mg

7



20 mg

8

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## **OBTENCION DE METABOLITOS DEL EXTRACTO POLAR**

Del extracto polar se aislaron 5 metabolitos, los cuales se caracterizaron como: sugiol, salviasperanol, 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -dihidro-6 $\alpha$  hidroxisalviasperanol, 6-epi-desmetil esquirolina D y clovandiol.

### ***sugiol***

Las fracciones 2 - 4 eluidas de la columna con 90 % de Hexano y 10 % de Ac. de Etilo se reunieron (2.6 g), porque resultaron ser iguales al ser comparadas entre sí mediante una cromatografía en capa fina. Con estas fracciones se hace una segunda cromatografía con Hexano, Hexano - Acetato de Etilo, Acetato de Etilo y Acetato de Etilo - Metanol como eluyentes, en orden creciente de polaridad usando sílice de malla 70 - 230.

Las fracciones 55-76 (0.3839 mg) de esta segunda cromatografía se reunieron y se cromatografiaron nuevamente usando como eluyente una mezcla de 98 % de Hexano y 2 % de Acetona y sílice de malla 230-400 Merck.

De las fracciones 5-12 de esta cromatografía se obtienen 2 mg del compuesto (1), el cual cristaliza de Acetona y tiene un p.f. de 167-170 °C.

### ***salviasperanol***

De la fracción 9 se obtiene por cristalización un compuesto (2) al compararlo con las fracciones 8 a 12 mediante cromatografía en capa fina resultó estar en ellas por lo que se reunieron estas fracciones y se logró aislar por precipitación (Hexano-Acetato de Etilo) 262 mg. de un producto sólido blanco 2 el cual tiene un p.f. de 203-205 °C.

EM (esp. No. 2 d)

IR (esp. No. 2 a)

RMN<sup>1</sup>H (esp. No. 2 b y 2 c)

RMN<sup>13</sup>C (esp. No. 2 e y 2 f)

HETCOR. (esp. No. 2 g)

COSY. (esp. No. 2 h)

### REACCIONES DEL COMPUESTO 2.

#### Hidrogenación.

Se intentó hidrogenar a 50 mg del compuesto 2 con 5 mg de Paladio adsorbido en Carbon al 5 %, al cabo de 10 horas no hubo reacción y por tal motivo se recuperó el compuesto.

El compuesto recuperado se hidrogenó usando 10 mg de Paladio adsorbido en Carbon al 10 % y 5 ml de Acetato de Etilo durante 21 horas. Al separar el catalizador de la mezcla de reacción y efectuando cromatografía en columna se obtienen 8 mg de un producto aceitoso.

33 mg del compuesto 2 se hidrogenaron nuevamente a temperatura ambiente, usando ahora como catalizador óxido de Platino. 12 mg de óxido de Platino se prehidrogenaron en 5 ml de Acetato de Etilo durante 40 min., en seguida se agregó el compuesto 2, la reacción se monitoreo por cromatografía en capa fina, al cabo de 6 días se observo en la cromatoplaca transformación total y la reacción se dio por concluida. La mezcla de reacción se filtra sobre Celita, lavando con Acetato de Etilo para separar el catalizador. El filtrado se concentró a presión reducida, posteriormente se disolvió con Acetato de Etilo y se precipitó con Hexano, obteniéndose 15 mg de precipitado blanco, con un punto de fusión de 196 °C.

IR. (Esp. No. 2 i)

RMN<sup>1</sup>H. (Esp. No. 2 j y 2 k)



EM. (Esp. No. 2 l)

#### **Esterificación.**

##### **Acetilación.**

60 mg del compuesto 2 se colocan con 0.5 ml de Piridina y 0.5 ml de Anhídrido Acético a temperatura ambiente. La reacción se monitorea por medio de cromatografía en capa fina después de 10 horas y media se agregan 0.5 ml de Piridina y 0.5 ml de Anhídrido Acético. Al cabo de 3 horas de haber agregado más reactivo no se observó transformación y se procedió a calentar a 60 °C.

Durante 14 horas se calentó y al no haber transformación se agregaron 20 mg de catalizador (2,4 Dimetil Amino Piridina). Después de 4 horas de haber agregado el catalizador la reacción se paró. La reacción se concentró al alto vacío para quitar los residuos de Piridina y Anhídrido Acético; a continuación se disuelve con Acetato de Etilo y se lava con agua salada, posteriormente se le efectúa una cromatografía en columna obteniéndose 35 mg de producto aceitoso.

IR. (Esp. No. 2 m)

RMN<sup>1</sup>H. (Esp. No. 2 o)

EM. (Esp. No. 2 n)

##### **Benzoilación.**

26 mg del compuesto 2 se colocan con 25 mg de Cloruro de para Bromo Benzoilo en 0.5 ml de Piridina anhidra a temperatura ambiente.

Al cabo de 3 horas no hay reacción y se calienta a 70 °C durante una hora, posteriormente a 100 °C (2 horas). Se agregan 10 mg más del reactivo y se deja en reacción durante una hora, luego se agregan 18 mg más del reactivo y al cabo de 2 horas no se observó en la cromatografía transformación total y la reacción se quitó.

La mezcla de reacción se disolvió con Acetato de Etilo y luego se lavo con agua salada, por medio de un embudo de separación se extrajo la fase orgánica y se concentro; de ésta se obtienen 52 mg, los cuales se cromatografian obteniéndose 7 mg de un producto aceitoso y se recupera el reactivo. El aceite no cristalizó.

***5  $\alpha$  , 6  $\beta$ - dihidro - 6  $\alpha$  - hidroxisalviasperanol***

Las fracciones 12 - 38, eluidas con 90 % de Hexano y 10 % de Ac. Etilo se reunieron, debido a que en la cromatografía en capa fina se observaban iguales. Estas fracciones se recromatografiaron, usando una mezcla de elución compuesta con 96 % de Cloruro de Metileno y 4 % de Acetona. De las fracciones 31-34 de ésta segunda recromatografía, se pudieron aislar por precipitación (Hexano-Benceno-Metanol), 18 mg de un producto sólido blanco (3) p.f. 184 - 190 °C.

IR (esp. No. 3 a)

RMN<sup>1</sup>H (esp. No. 3 h)

EM (esp . No. 3 c)

RMN <sup>13</sup>C (esp. No. 3 d)

***6 epi desmetilesquirolina D***

y

***clovandiol***

Las fracciones 64-69 eluidas con 60 % de Hexano y 40 % de Acetato de Etilo al ser comparadas entre sí, mediante cromatografía en capa fina resultaron ser iguales, estas fracciones se reunieron y se recromatografiaron

usando una mezcla de 96 % de Cloruro de Metileno y 4 % de Acetona como eluyente.

Las fracciones 33-39 se compararon mediante cromatografía en capa fina y como resultaron iguales, se reunieron, de ellas se obtiene el compuesto (5) mediante una precipitación (Hexano-Acetato de Etilo).

A las fracciones 80-93 se les elabora una cromatografía en capa fina, obteniéndose así el compuesto (4), el cual cristalizó en Hexano caliente, en forma de agujas incoloras, de el se obtienen 13 mg., su punto de fusión es de 115 °C. En cromatografía de capa fina revela con sulfato cérico, como una mancha azul intensa.

Del compuesto 5 se aislan 24 mg es un producto sólido blanco, el cual tiene un p.f. 203-205 °C. Revela de color azul con Sulfato Cérico.

IR (esp. No. 5 a)

RMN<sup>1H</sup> (esp. No. 5 b y 5 c)

EM (esp. No. 5 d)

RMN<sup>13C</sup> (esp. No. 5 e)

### ***OBTENCION DE METABOLITOS DEL EXTRACTO NO POLAR.***

Del extracto no polar se lograron aislar 3 componentes, los cuales se caracterizaron como taxodiona, β-sitosterol y desmetil salvicanol.

#### ***taxodiona***

El componente menos polar es una sustancia cristalina anaranjada, se logró aislar mediante cromatografías sucesivas de la siguiente manera:

Las fracciones 53 - 58 eluidas de la columna con Hexano-Ac.Etilo (9.3:0.7) se reunieron por mostrar en una cromatografía en capa fina ser iguales. Posteriormente se cromatografiaron usando sílice de malla 70-230 Merck las fracciones 27-29 de esta segunda cromatografía se reunieron por ser iguales y se les elaboró una cromatografía en capa fina usando como eluyente Benceno, obteniéndose así 56 mg del compuesto 6, el cual cristalizó de acetona. Es soluble en Ac. Etilo, Acetona, Metanol, Clorofórmio, Eter e insoluble en Hexano posee un p.f. de 110 °C.

***β - sitosterol***

De las fracciones 90-105, eluidas de la columna con Hexano - Ac.Etilo (9:1), se aisló el compuesto cristalino 7, el cual cristalizó en una mezcla de Acetona-Metanol.

***desmetil - salvicanol***

Las fracciones 106-122 se observaron iguales en cromatografía en capa fina y se reunieron (1.533 mg). Como no se logró separarlas por medio de cristalización, precipitación, cromatografía y en su espectro de IR se observaban principalmente bandas de oxhidrilo, se procedió a acetilarlas para poder separarlas. Cabe mencionar que en el espectro de IR de las fracciones reunidas, no fueron observadas las bandas que corresponden a los carbonilos de éster de fenol y éster de alcohol.

Para esta reacción de acetilación se uso Piridina y Anhídrido Acético a temperatura ambiente durante una semana. Se concentró al alto vacío, se disolvió con Acetato de Etilo y se lavo con Agua Salada obteniéndose 1.765

mg, como no se logró cristalizar y tampoco precipitar se procedió a cromatografiar usando como eluyente una mezcla de Hexano-Acetona al 10 % de las fracciones 3-6 (717 mg) de ésta cromatografía se hace una segunda cromatografía (Hexano-Acetona 5 %) y de las fracciones 8-9 se obtienen 20 mg (compuesto 2) de un producto blanco, por precipitación (Hexano-Acetato de Etilo) el cual tiene un punto de fusión de 120 °C.

**IR (esp. No. 8 a)**

**RMN<sup>1</sup>H (esp. No. 8 b)**

**EM. (esp. No. 8 c)**

**RMN <sup>13</sup>C (esp. No. 8 d)**

**RMN<sup>1</sup>H (200 MHz), (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), (esp. No. 8 e)**

Tanto en la parte polar como en la no polar, se encontró que el peso de algunas fracciones era pequeño, de manera que al intentar separar algunos compuestos mediante cromatografías sucesivas, se iban obteniendo cantidades aún mas pequeñas, las cuales no eran suficientes para estudios espectroscopicos, por lo que estas fracciones ya no se siguieron trabajando.

### **Pruebas de toxicidad .**

**Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* L.each.**

**Preparación de las muestras.**

Las muestras (compuestos puros, como son: Salviasperanol, 6 epi desmetil esquirolina D y los productos obtenidos de reacción como son el Salviasperanol hidrogenado y el 11, 12 diacetil desmetil-salvicanol), se preparan disolviendo dos miligramos del compuesto en dos mililitros de acetona. Posteriormente se transfieren a tres viales en forma independiente

5. 50 y 500  $\mu$ l de la solución original. Como las pruebas se hacen por triplicado se utilizan un total de nueve viales (tres con una concentración de 100  $\mu$ g/ml, tres con una concentración de 10  $\mu$ g/ml y los otros tres de 1  $\mu$ g/ml). Finalmente se deja evaporar el disolvente de cada una de las soluciones al vacío.

Preparación del medio salino.

Se hace con una relación de 38 g de sales por litro de agua destilada. Estas sales contienen las condiciones ideales para el desarrollo de la *Artemia salina* Leach.

Después de haber desarrollado durante 48 horas los huevecillos de *A. salina* Leach en el medio salino artificial, se transfieren 10 especímenes a cada uno de los viales, conteniendo la muestra a evaluar más 5 ml de medio salino, 24 horas más tarde se registran el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en  $\mu$ g/ml (indicando las dosis letales).

~~APENDICE~~  
ESPECTROS

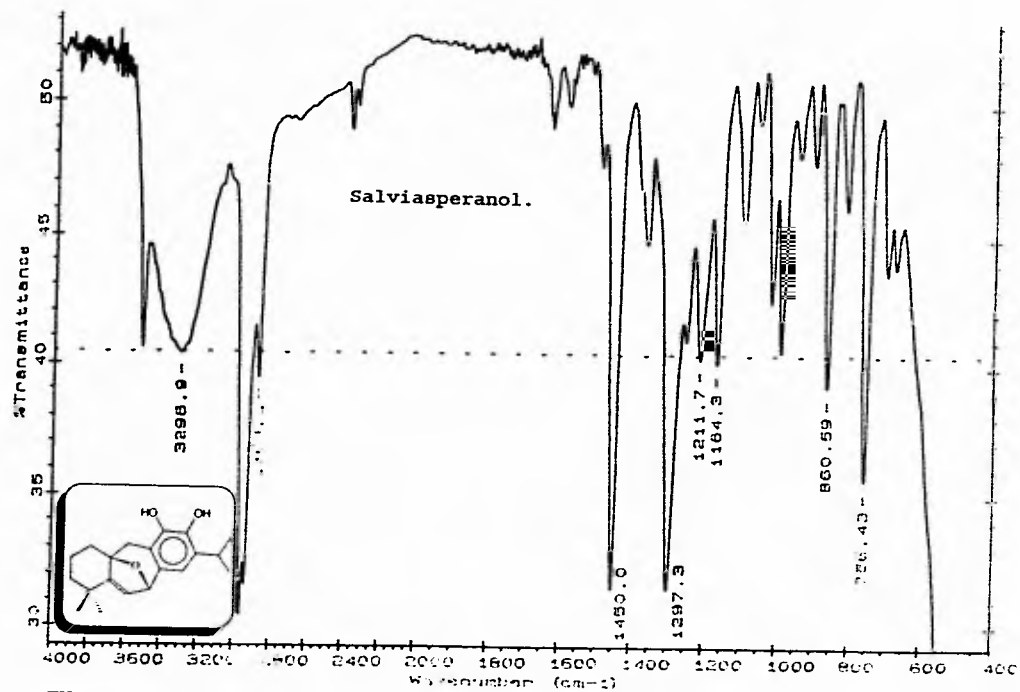
---

---

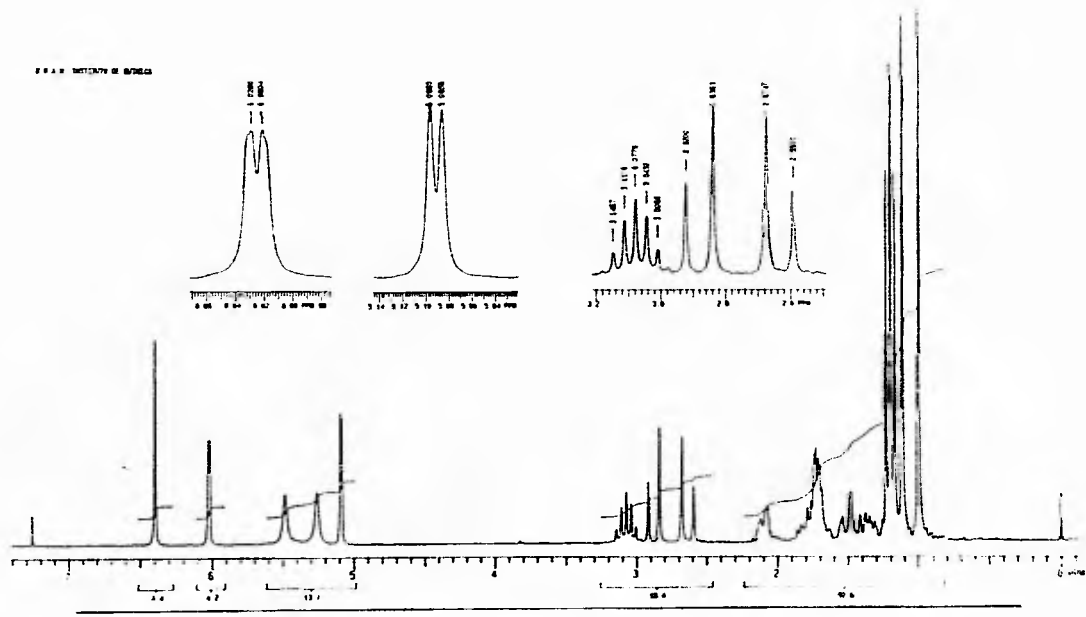
**TESIS SIN PAGINACION**

**COMPLETA LA INFORMACION**

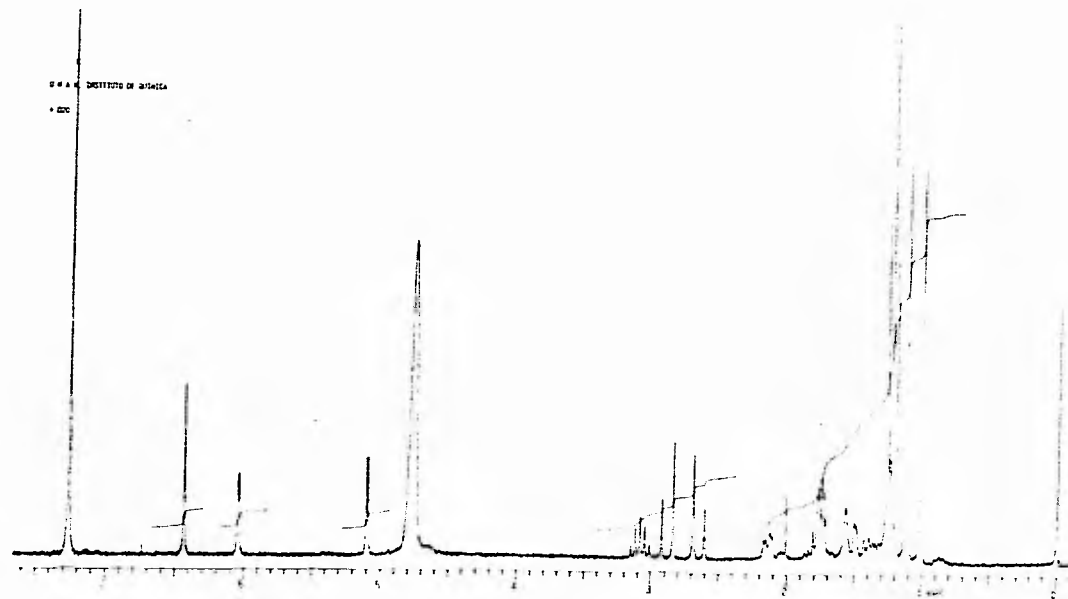




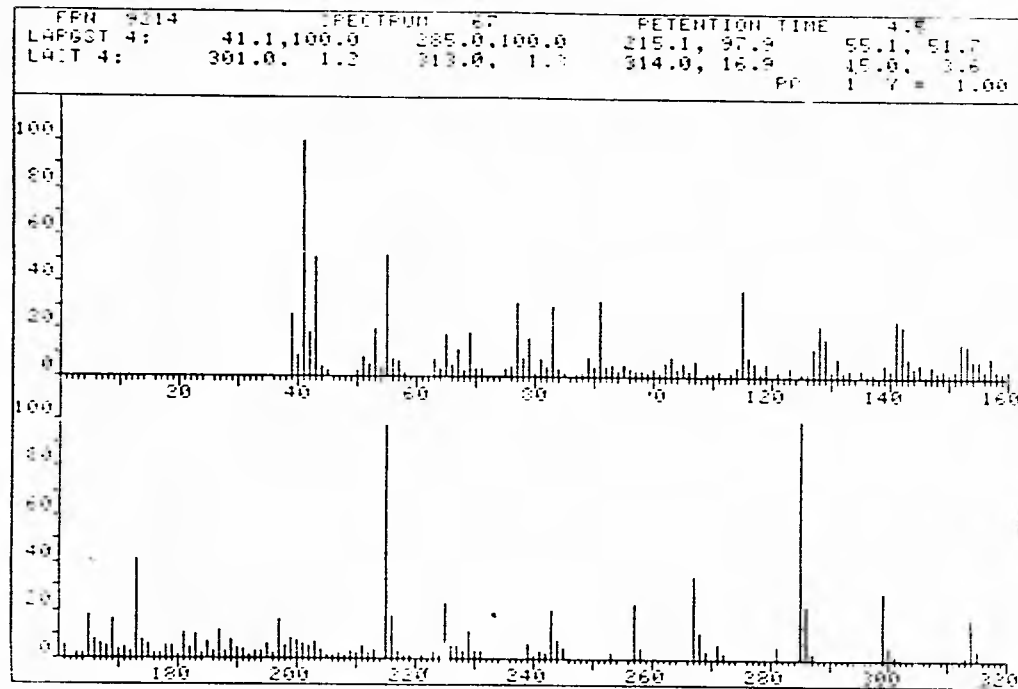
ESPECTRO No. 2a.



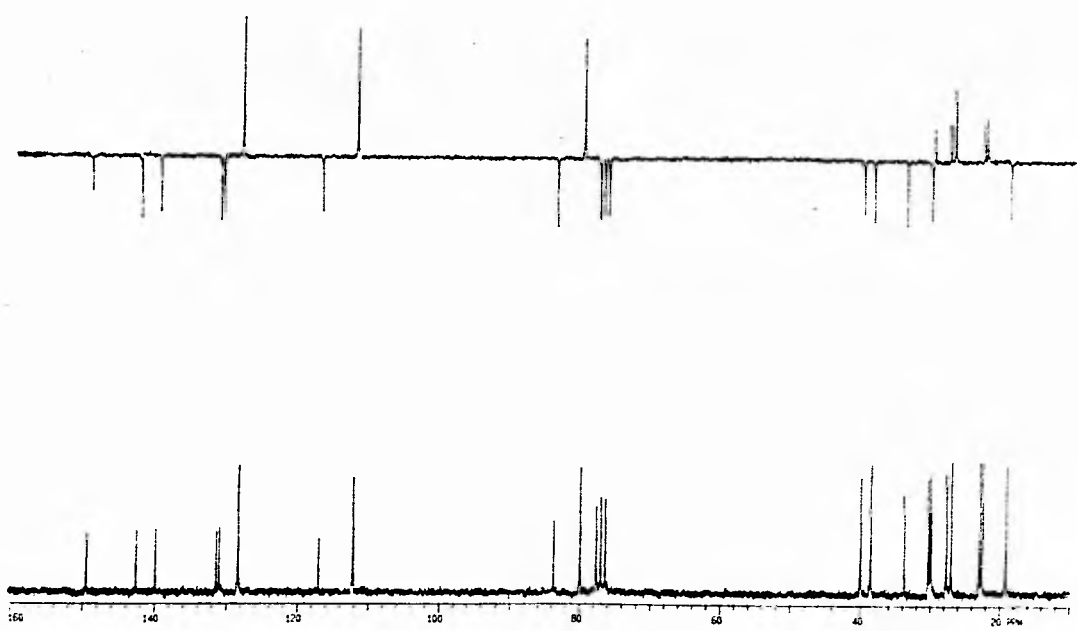
ESPECTRO No. 2b.



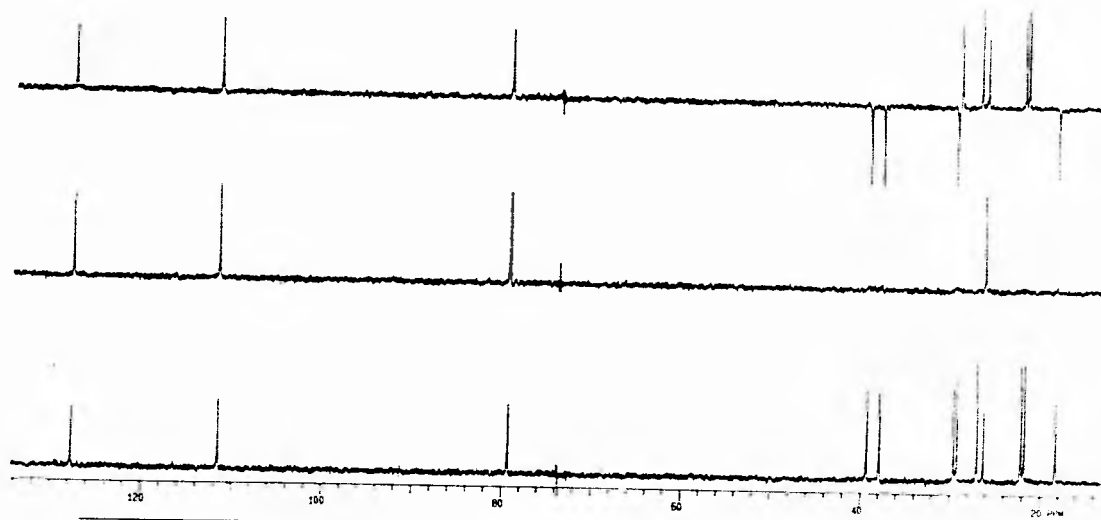
ESPECTRO No. 2c.



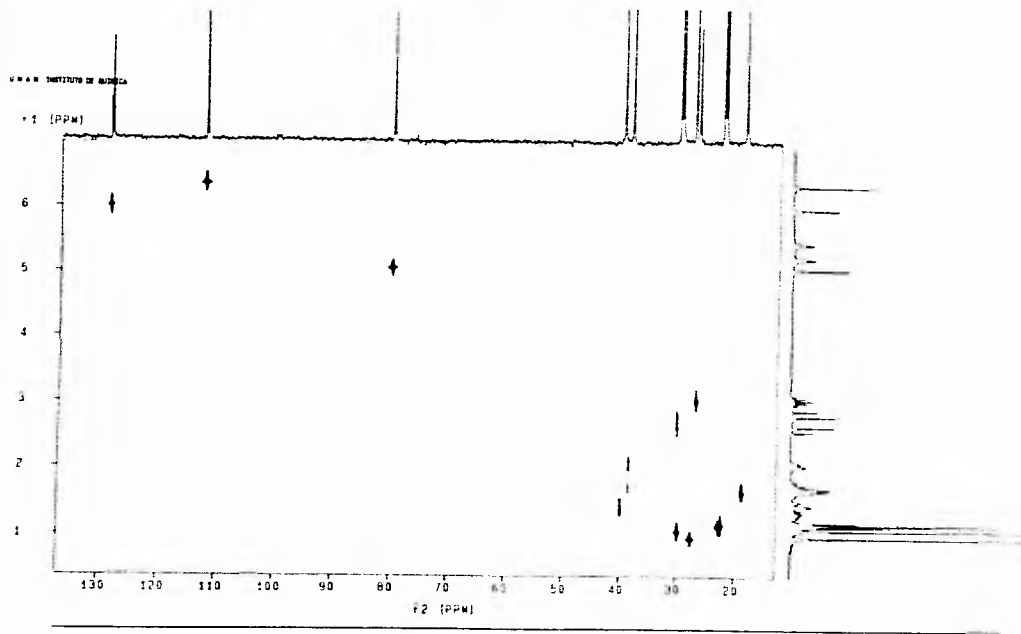
ESPECTRO No. 2d.



ESPECTRO No. 2e.

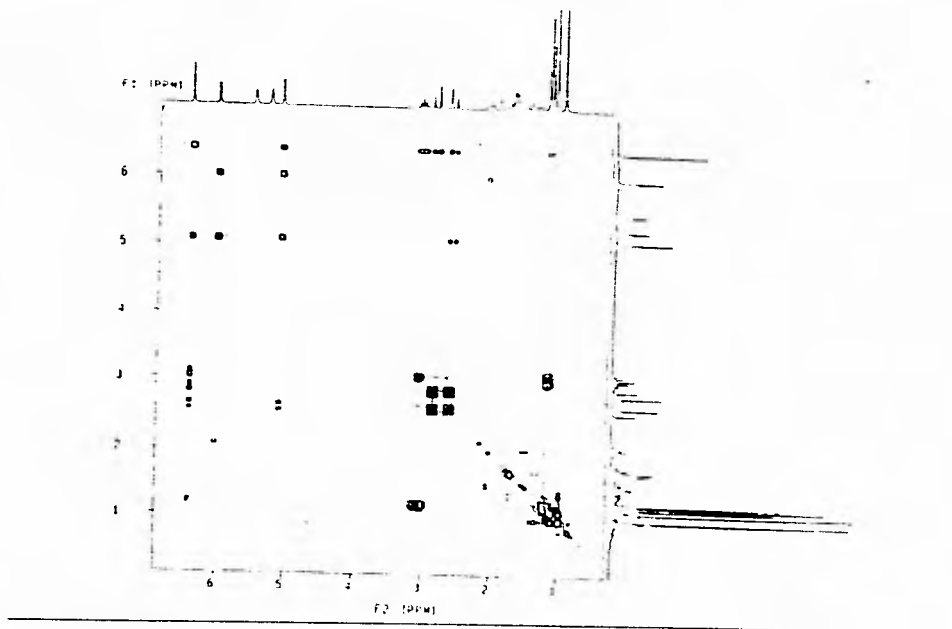


ESPECTRO No. 2f.



ESPECTRO No. 2g.

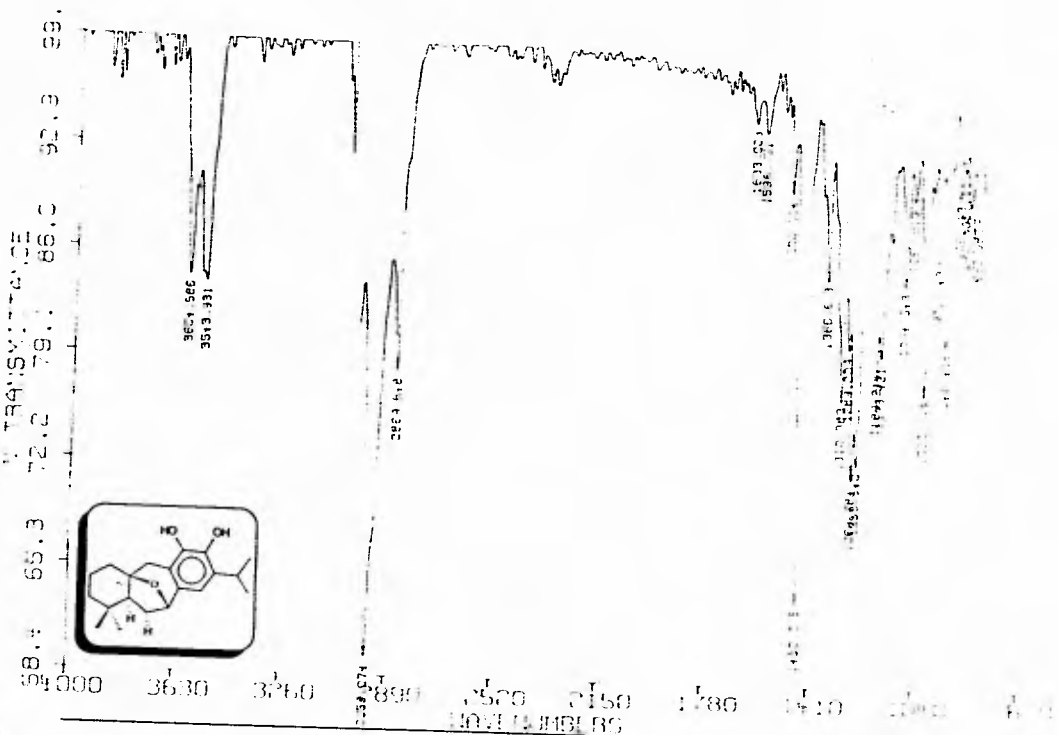
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO No. 2h.

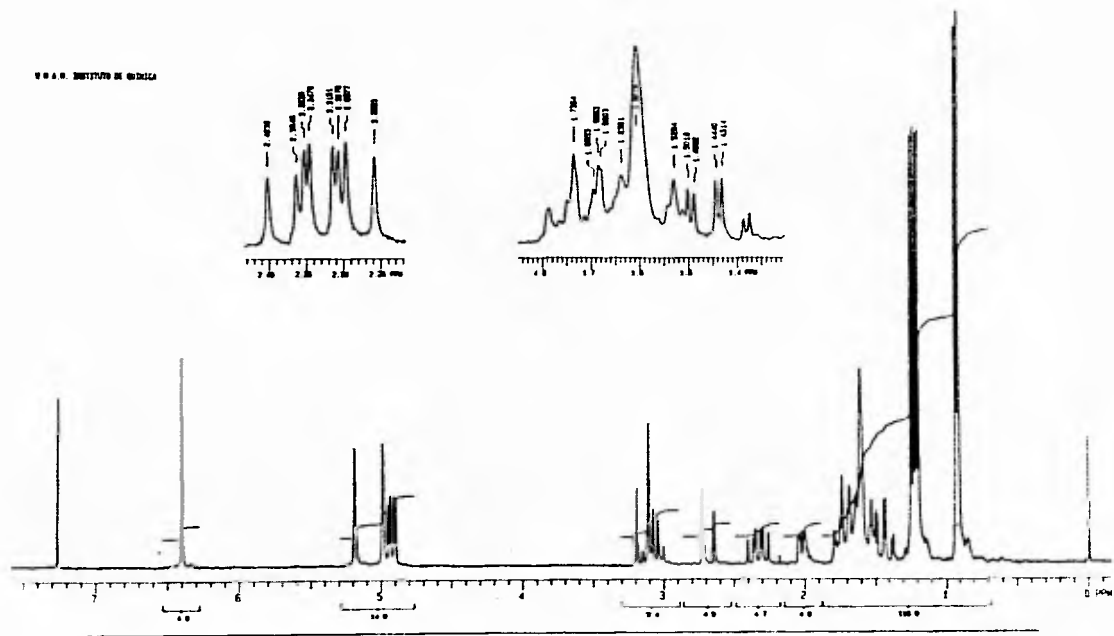


FALLA DE ORIGEN



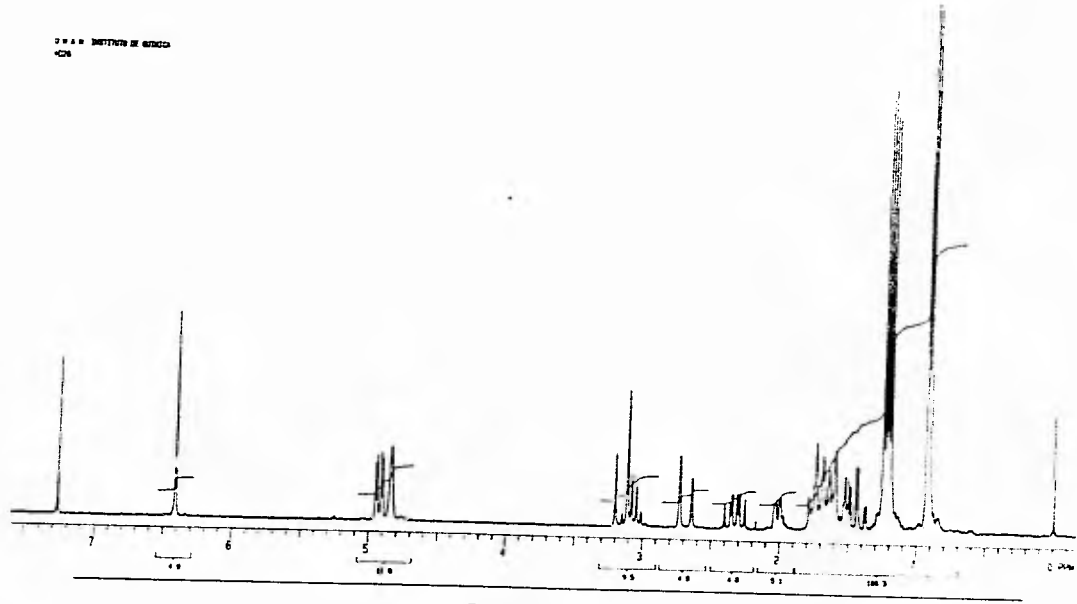
ESPECTRO No. 2i.

INSTITUTO DE QUÍMICA



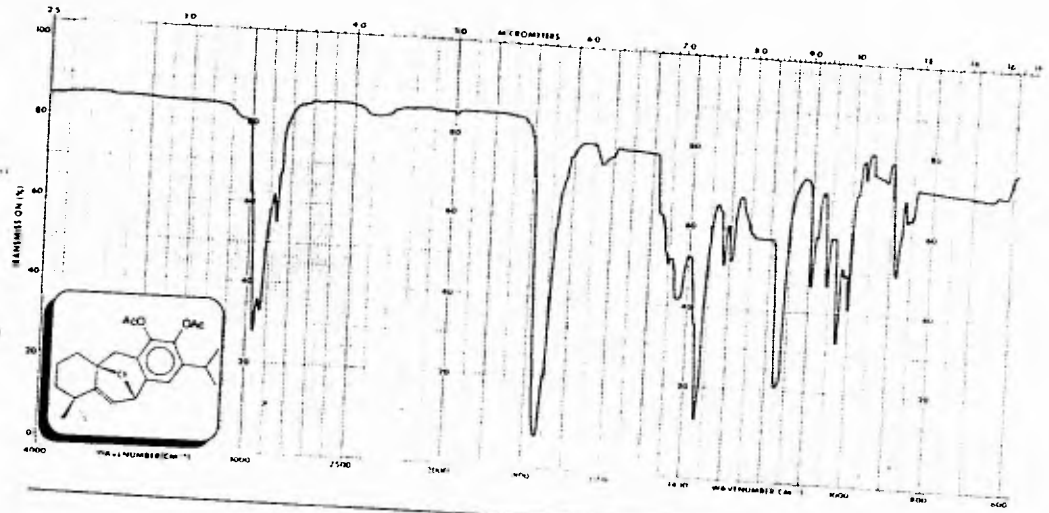
ESPECTRO No. 2j.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO  
CHILE



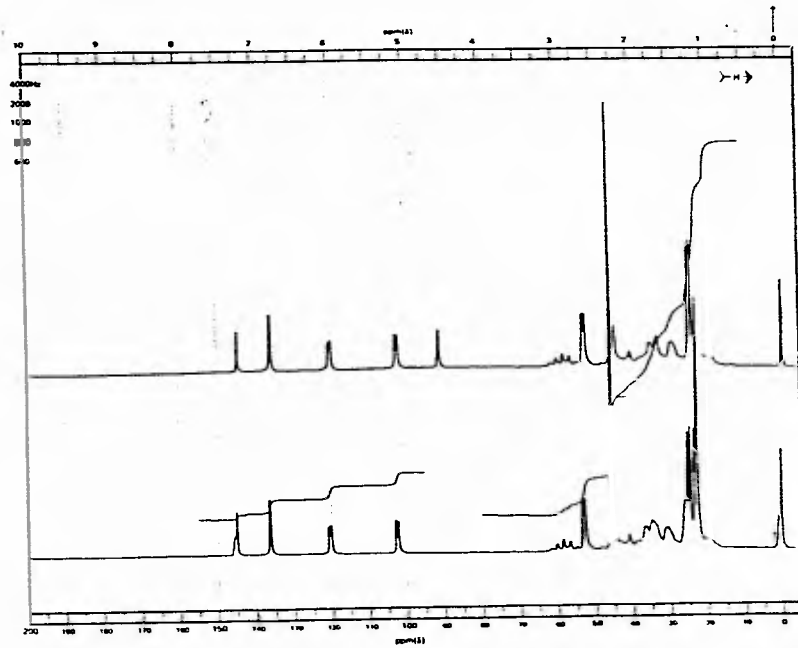
ESPECTRO No. 2k.





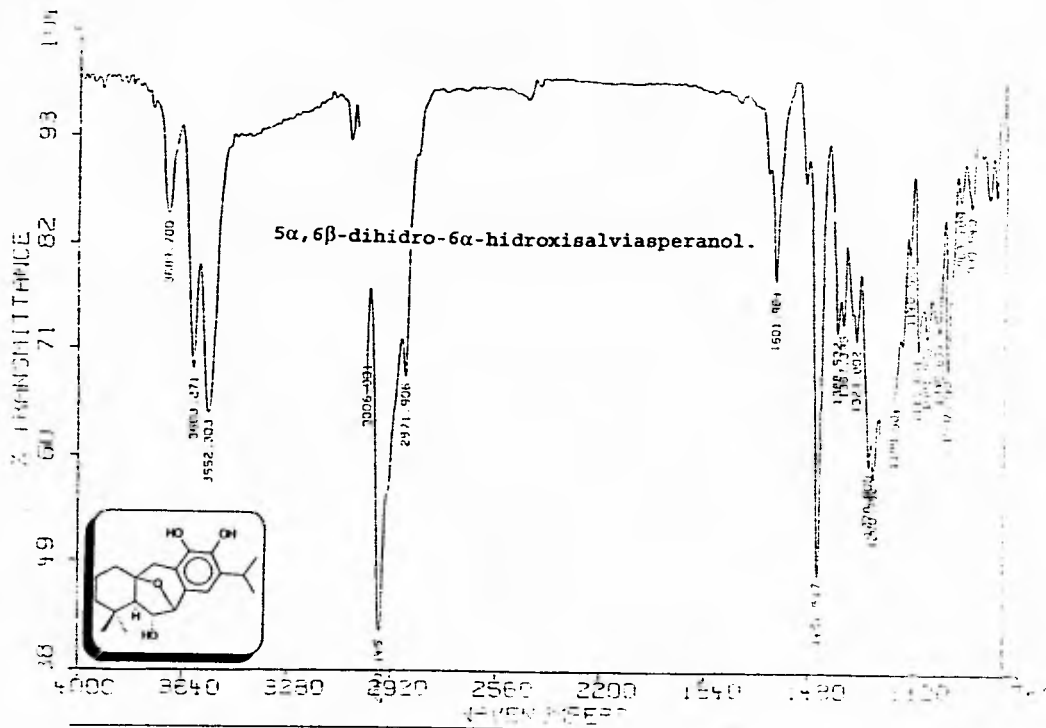
ESPECTRO No. 2m.





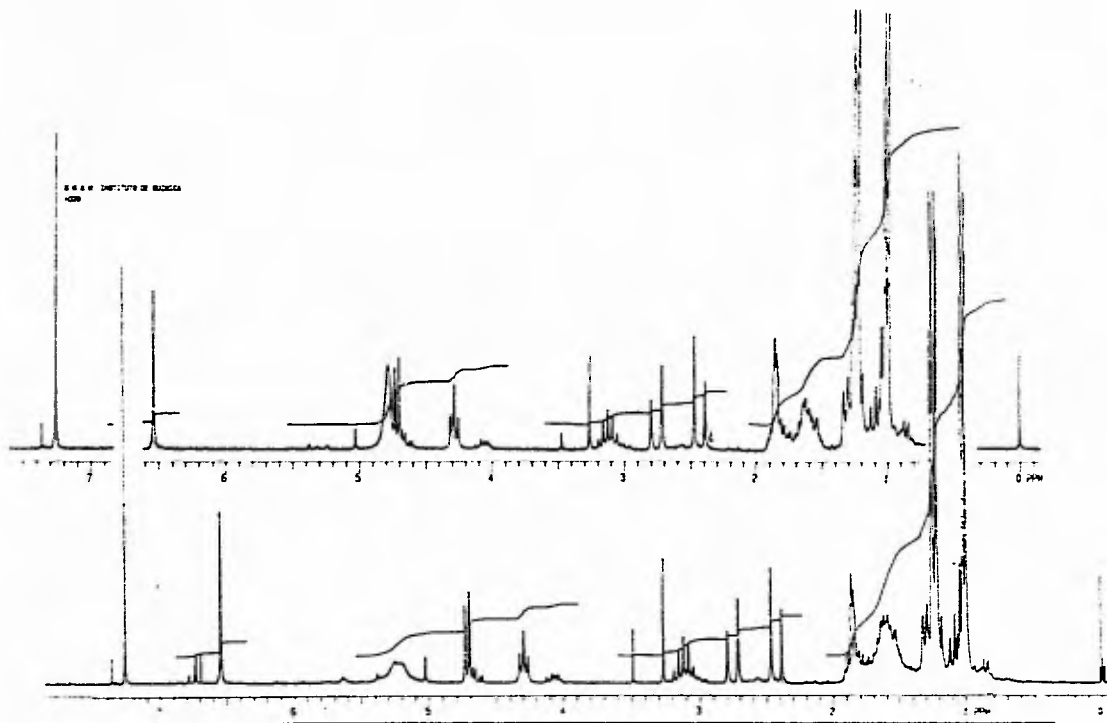
ESPECTRO No. 2o.

FALLA DE ORIGEN

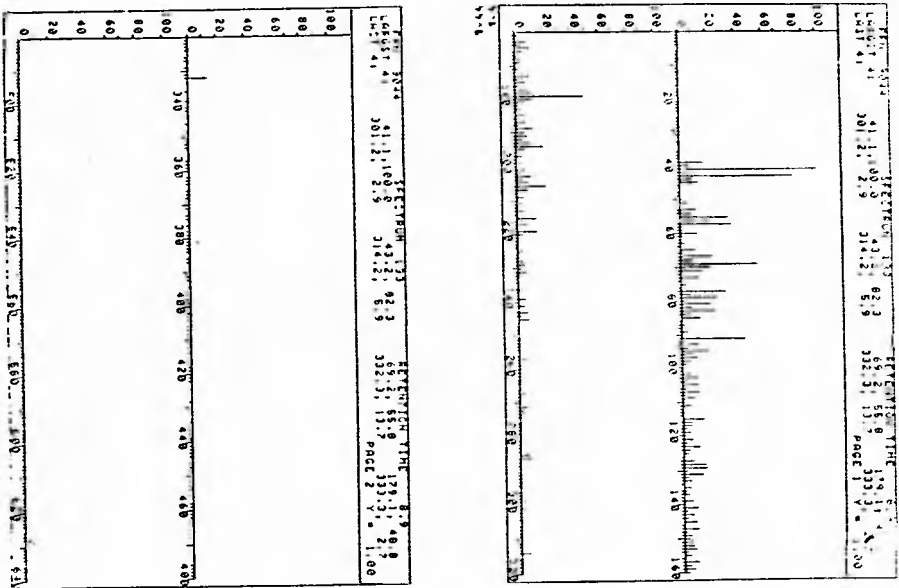


ESPECTRO No. 3a.

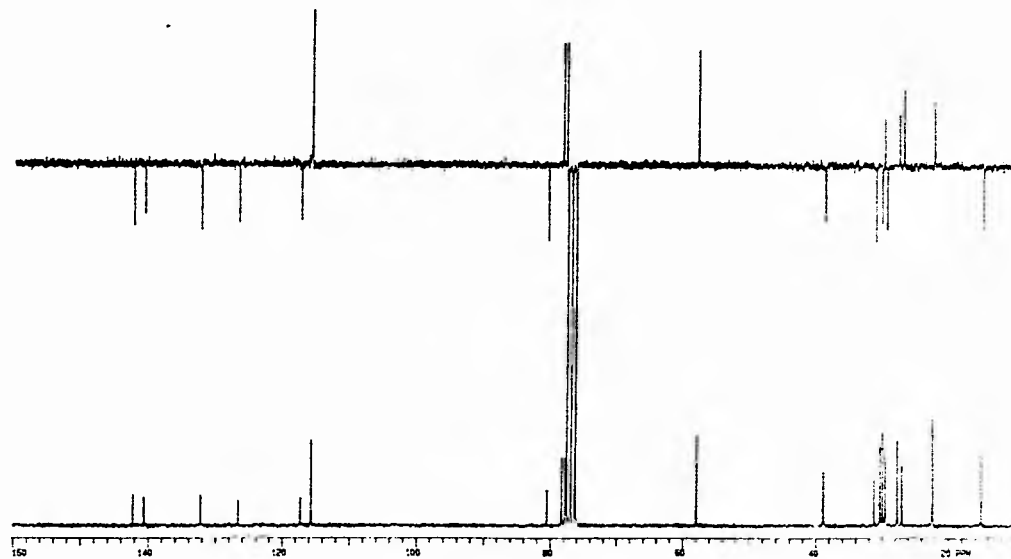




ESPECTRO No. 3b.

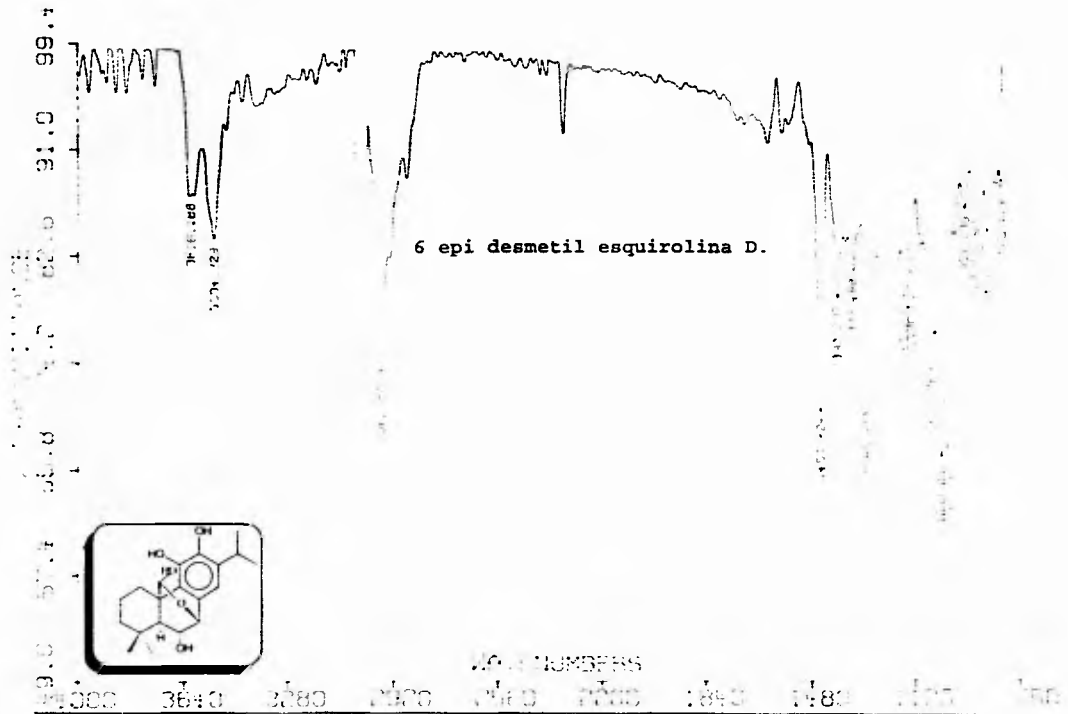


ESPECTRO No. 3c.

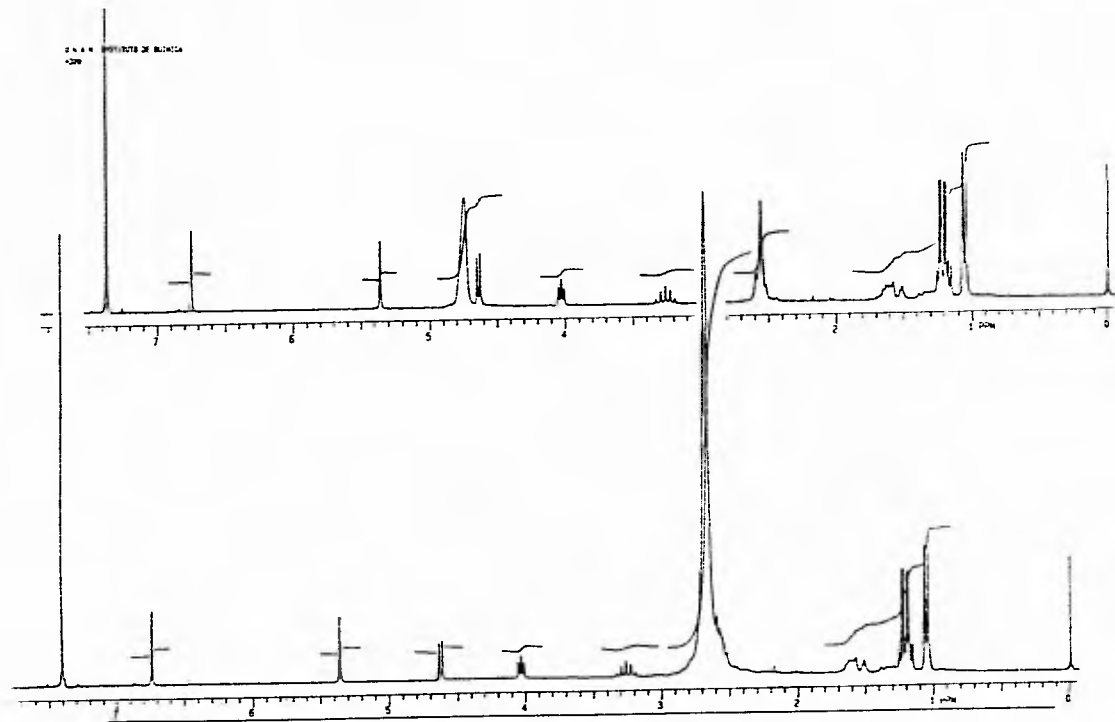


ESPECTRO No. 3d.

FALLA DE ORIGEN

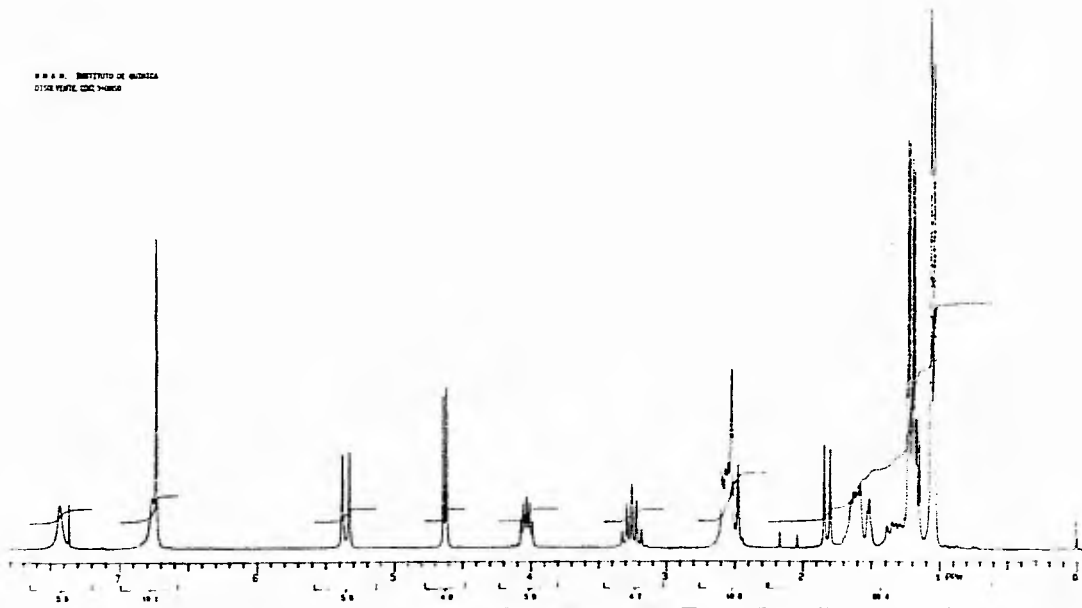


ESPECTRO No. 5a.

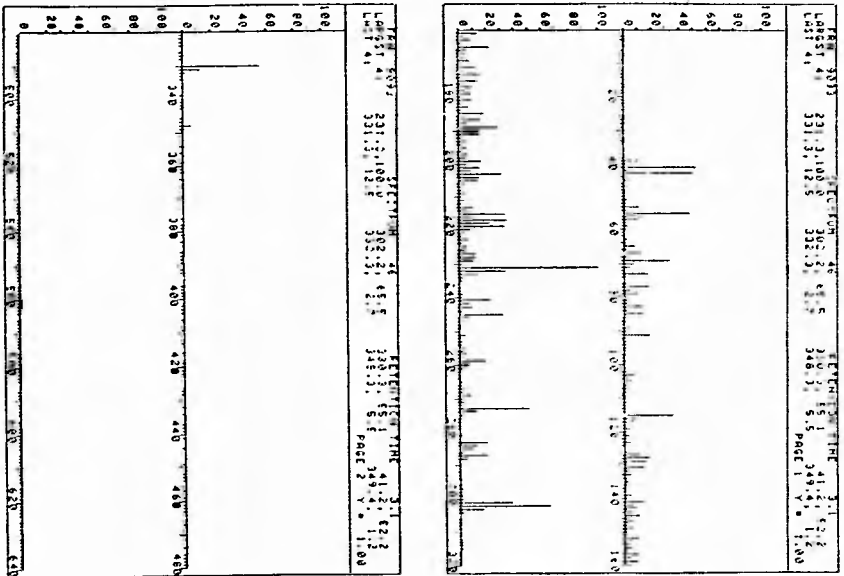


ESPECTRO No. 5b.

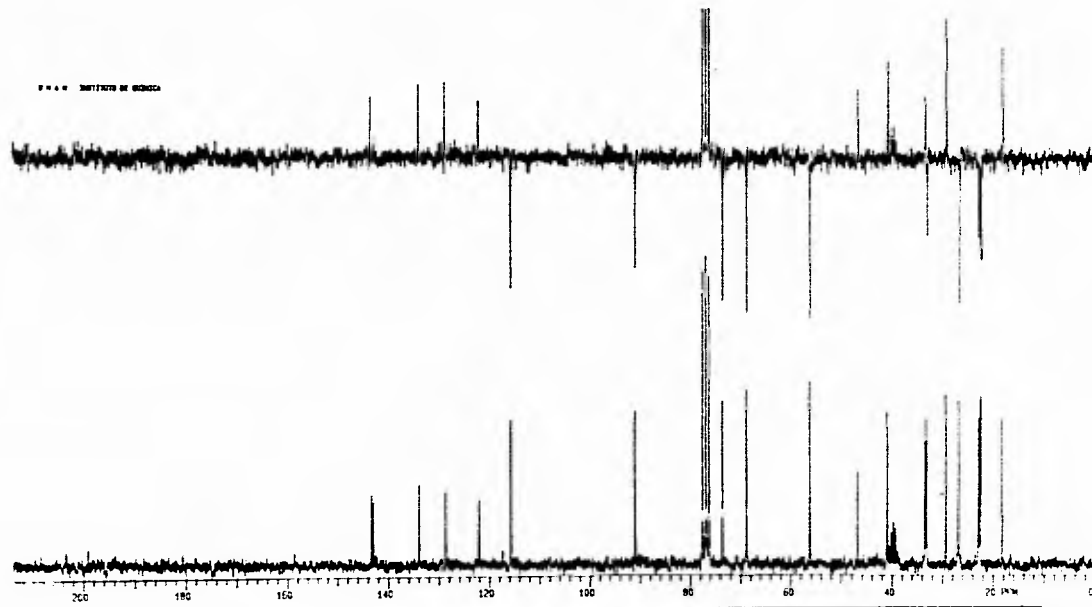
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DIEZ VEINTE CINCO TORRES



ESPECTRO No. 5c.

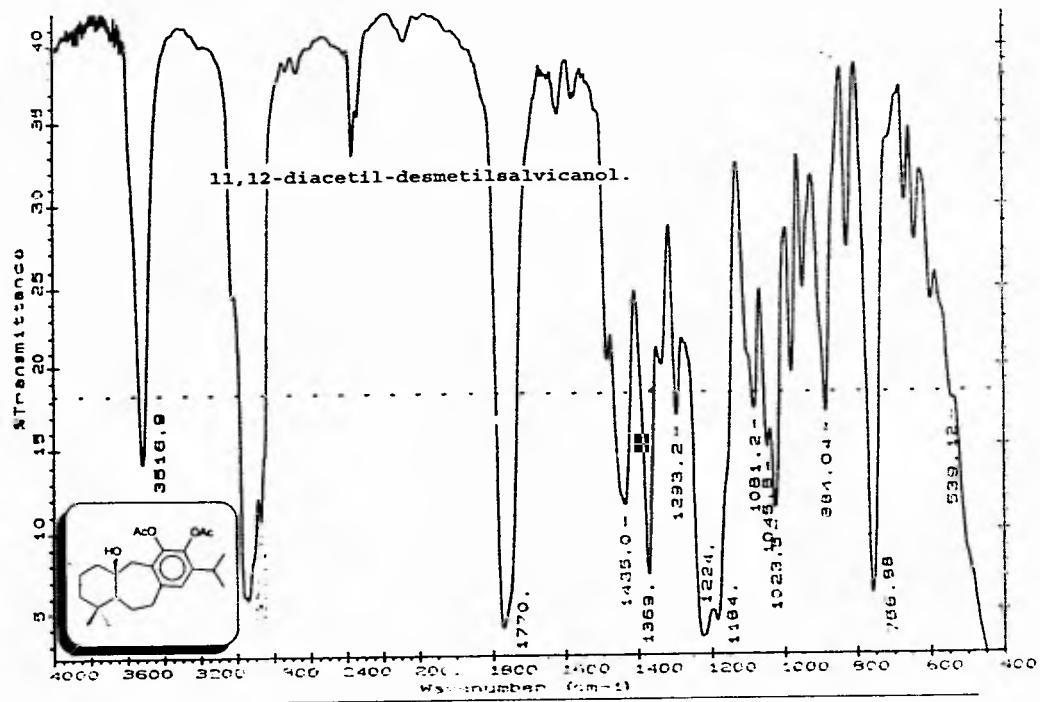


**ESPECTRO No. 5d.**



ESPECTRO No. 5e.





ESPECTRO No. 8a.

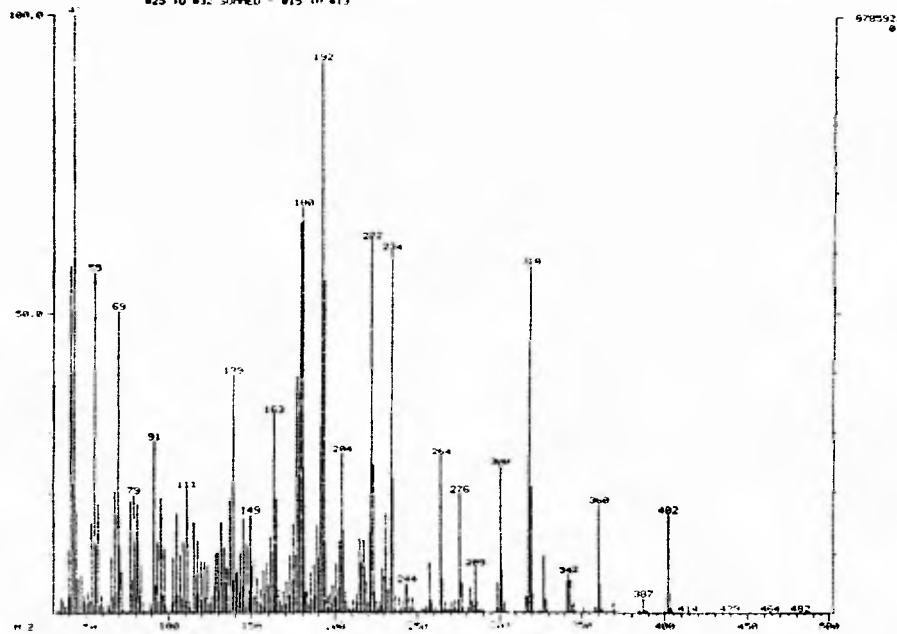


MASS SPECTRUM

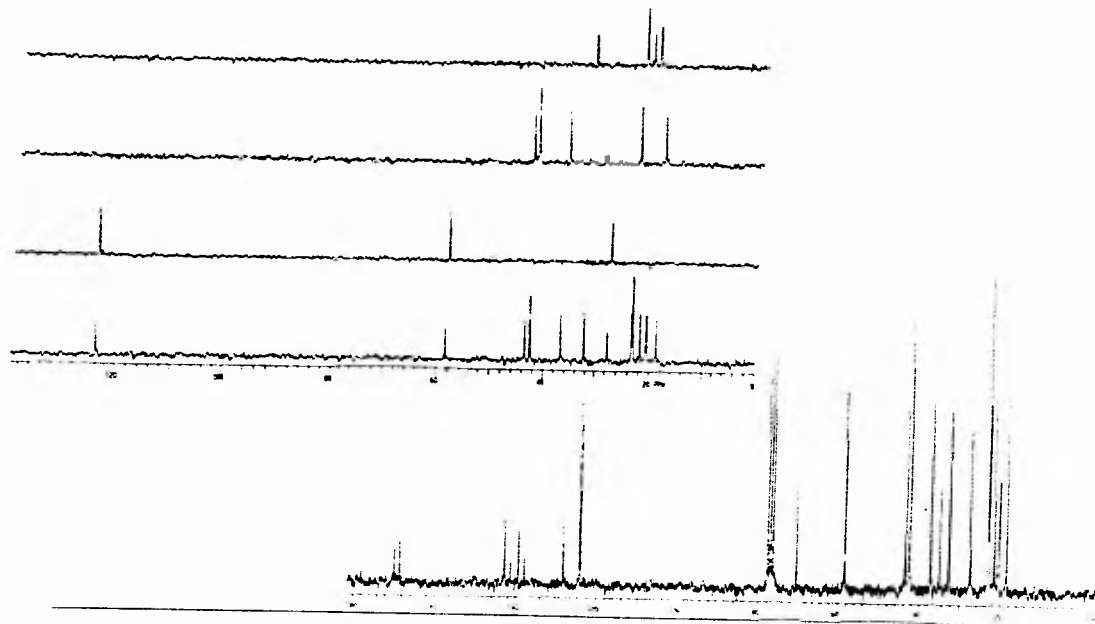
Date: 05/14/80  
CALY MASS 81

Time: 11:21:43  
File: 21037100

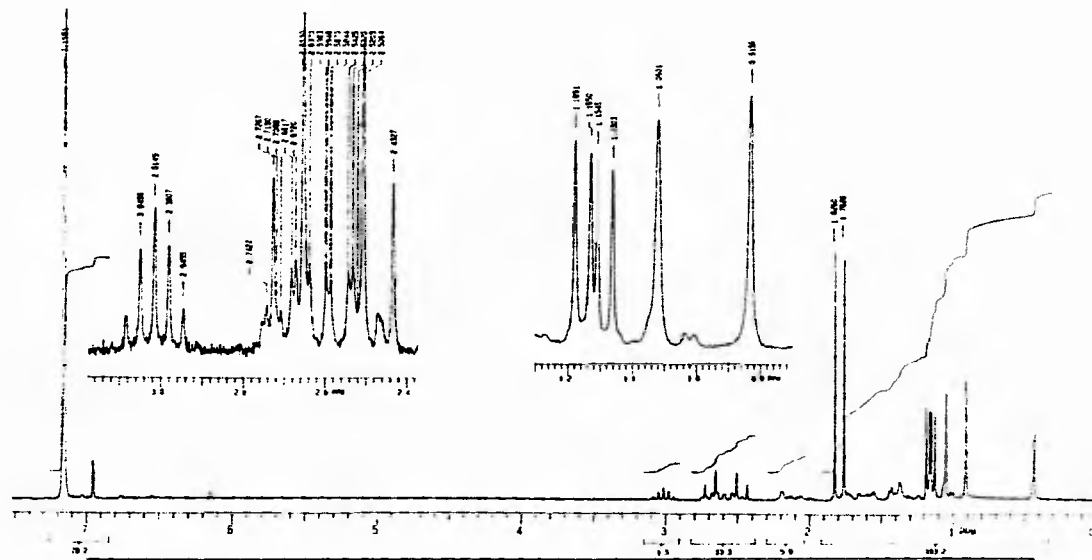
COND: 1 PROBE (DEP) SOLA Y SECUENCIA "LC"  
TEMP: 40 DEG. C  
825 TO 832 SUPPLY - 815 TO 819



ESPECTRO No. 8c.



ESPECTRO No. 8d.



ESPECTRO No. 8e.

7

7

1

1

L

1

