



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

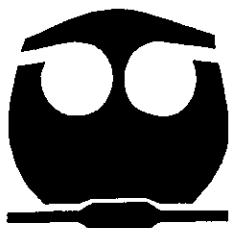
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION BIOLOGICA Y AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Neurolaena lobata*, UNA ESPECIE EMPLEADA EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A SANTA EMMA BERRUECOS LOPEZ



MEXICO, D.F.

2000

Handwritten signature





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:

Presidente	Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Vocal	Blas Flores Pérez
Secretario	Georgina Artemisa Duarte Lisci
1er. Suplente	Héctor Ríos Olivares
2o. Suplente	Irma Susana Rojas Tome

Sitio donde se desarrolló el tema: Instituto de Química de la UNAM.

Asesor del tema: Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas



Sustentante: Santa Emma Berruecos López.



Esta tesis se realizó en la Unidad de Investigación de Plantas Medicinales del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Guillermo Delgado Lamas, y con apoyo financiero del Sistema Nacional de Investigadores (SEP-CONACYT) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional (proyecto IN221198).

DEDICATORIAS

A mi padre: Celerino Berruecos, quien con su ejemplo, dedicación y cariño ha hecho de mi lo que soy y quien siempre confía en mí. Gracias Papito. Te quiero mucho.

A mi hermana: Georgina Berruecos, quien además de ser mi mejor amiga es la mujer a quien más quiero.

A Everardo Orozco, quien ha sido la persona más cariñosa y comprensiva que he conocido. Gracias por tu apoyo y por todo lo que juntos hemos vivido. Te amo.

A Violeta Pérez, quien siempre me ha brindado su amistad y apoyo.

A mis hermanitas: Jessica y Andrea Berruecos, quienes son mis consentidas y por eso me llenan la vida de alegría.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, quien siempre y en todo lo que hago esta conmigo.

Al Doctor Guillermo Delgado Lamas, por la ayuda y el apoyo que en todo momento me ha brindado, y por el interés que siempre demuestra en la superación de sus alumnos.

Al personal Técnico y Académico del Instituto de Química: M. en C. Rocío Patiño, M en C. Beatriz Quiróz, M. en C. Isabel Chávez, Francisco Javier Pérez y Luis Velasco, por la realización de los análisis espectroscópicos.

A Teresa Ramírez Apan y Ma. del Carmen Gutierrez por las evaluaciones biológicas realizadas.

Al personal de la Biblioteca "Jesús Romo Armería", especialmente a Lupita "guerita" Anaya.

A mi padre, porque siempre me ha apoyado e impulsado a seguir adelante, y quien en todo momento ha tenido confianza en mí.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1 de la Unidad de Plantas Medicinales: Ma. Luisa Garduño, Ricardo Figueroa, Liliana Hernández, Anibal Julián, Bernice Guerrero, Socorro Álvarez y Julia Cassani, quienes siempre me han brindado su amistad y ayuda incondicional, por hacer que el trabajo en el laboratorio sea siempre agradable.

A mis amigas "las cravis" de la Facultad de Química: Martha Cravioto, Carolina Guzmán, Teresa Romero, Rosalba Terán y Alejandra Peralta y a Fernando Calderón por todos los momentos angustiosos y felices que vivimos juntas durante la carrera.

A mis amigos: Alex Arias, Rubén Páez, Tania Chávez, Tania Cázares, Héctor Gómez, Araceli Ahumada, Miguel Angel Campos, Yadira Martínez, Alberto Sevilla, José Cordero, Efrén Contreras y Hernán Cruz, al lado de quienes he crecido, por los momentos que hemos compartidos lo largo de nuestras vidas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. ANTECEDENTES	4
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	13
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
6. CONCLUSIONES	73
7. ESPECTROS	
Espectro 1. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Neurolenina B (3)	76
Espectro 2. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Neurolenina C (4).	77
Espectro 3. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Neurolenina D (5).	78
Espectro 4. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) de Isoneurolenina B (33).	79
Espectro 5. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Isoneurolenina B (33).	80
Espectro 6. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de Isoneurolenina B (33).	81
Espectro 7. RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de Isoneurolenina B (33).	82
Espectro 8. EM (70 eV) de Isoneurolenina B (33).	83
Espectro 9. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahydro-neurolenina (34).	84
Espectro 10. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahydro-neurolenina B (34).	85
Espectro 11. EM (70 eV) de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahydro-neurolenina B (34).	86
Espectro 12. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	87
Espectro 13. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	88
Espectro 14. RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	89
Espectro 15. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	90
Espectro 16. COSY de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	91
Espectro 17. COSY de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	92
Espectro 18. HMQC de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	93

Espectro 19. HMQC de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	94
Espectro 20. EM (70 eV) de (11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).	95
Espectro 21. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolenina B (36) y O1,1-Iso-neurolenina B (37).	96
Espectro 22. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolenina B (36).	97
Espectro 23. RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de O1,1-Iso-neurolenina B (37).	98
Espectro 24. EM (70 eV) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolenina B (36) y O1,1-Iso-neurolenina B (37).	99
Espectro 25. IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹) de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	100
Espectro 26. RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	101
Espectro 27. RMN ¹ H (300 MHz, C ₅ D ₅ N) de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	102
Espectro 28. RMN ¹³ C (125MHz, CDCl ₃) de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	103
Espectro 29. COSY de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	104
Espectro 30. COSY de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	105
Espectro 31. HMQC de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	106
Espectro 32. HMQC de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	107
Espectro 33. EM (70 eV) de (11 <i>S</i>)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).	108
8. BIBLIOGRAFÍA	109

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

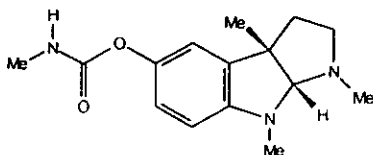
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CL ₅₀	Concentración letal media
COSY	Correlated Spectroscopy
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
δ	Desplazamiento químico
<i>d</i>	Doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM	Espectrometría de masas
H	Hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
He ₂	Helio
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMCPB	Ácido meta-cloro-perbenzoico
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
IR	Espectroscopía de infrarojo
J	Constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
M	Concentración molar
(M')	Ion molecular
<i>m</i>	Multiplicidad
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	masa-carga
NaBH ₄	Borohidruro de sodio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
Pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
Rf	Relación de frentes
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética nuclear de carbono 13
RO	Rotación óptica
<i>s</i>	Singulete
<i>t</i>	Triplete
THF	Tetrahidrofurano
TPA	12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

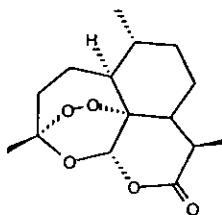
Actualmente es reconocido que México posee una notable biodiversidad, la cual representa un recurso natural que es necesario conocer y estudiar para su conservación y aprovechamiento racional. Particularmente, la vegetación ha constituido una fuente muy apreciada para diversos fines, tales como alimento, en construcción, como colorantes, insecticidas, entre otros, pero sobre todo, ciertos vegetales han sido utilizados en la preparación de remedios para curar diversas enfermedades. Es interesante mencionar que aún en nuestros tiempos, la mayoría de la población mundial emplea recursos herbolarios para la solución de problemas de salud.

El estudio científico de la bioactividad de las preparaciones empleadas tradicionalmente por diversos grupos étnicos se denomina etnofarmacología, un término empleado desde finales de los sesentas [1]. A través de ésta disciplina, es posible, de manera rigurosa, adquirir una apreciación de que las plantas usadas en medicina tradicional pueden servir como fuente de agentes terapéuticos.

El trabajo de campo exploratorio de los usos medicinales de plantas por los indígenas en el mundo, aunado a la aplicación de ensayos biológicos capaces de determinar si las plantas ejercen un efecto biológico, ha facilitado el descubrimiento de moléculas bioactivas. Algunas de estas sustancias poseen un notable potencial para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades, como ejemplos pueden mencionarse la fisostigmina (de *Physostigma venosum*, empleada para el glaucoma y la miastenia gravis) y la artemisinina (de *Artemisia annua*, utilizada contra la malaria) [1, 2].



Fisostigmina



Artemisinina

Aún cuando el enfoque etnofarmacológico ha permitido el descubrimiento de muchas sustancias biológicamente activas, existen otros métodos de selección de plantas que también han conducido a la caracterización de innumerables compuestos con considerable actividad terapéutica, entre estos criterios podemos citar el aleatorio, el taxonómico, el fitoquímico (conocido también como quimiotaxonómico) y el ecológico. Es interesante mencionar que el taxol, uno de los mejores agentes anticancerígenos descubiertos en años recientes, fue aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* en un programa de búsqueda de agentes antitumorales, donde las plantas fueron colectadas aleatoriamente [3].

Gracias a la investigación química de numerosas fuentes naturales, entre las que destacan los vegetales, hoy en día se conoce la cura para cientos de enfermedades, pero aún existen muchos otros padecimientos para los cuales no se cuenta con un remedio totalmente seguro y efectivo.

Es así como se aborda el estudio de *Neurolaena lobata*; una planta abundante en América Central, que abarca también el sur de México y las islas Caribe, la cual es utilizada por las comunidades indígenas para combatir enfermedades como malaria, dolores estomacales, enfermedades de la piel, diabetes, entre otras [4]. El estudio tendiente a elucidar la estructura molecular de los metabolitos secundarios presentes en esta planta, así como la realización de una evaluación biológica preliminar de los principales constituyentes de esta planta, integran el presente trabajo de investigación.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

De acuerdo con una de las áreas de investigación multidisciplinaria que se desarrolla en nuestro país, el objetivo general del presente trabajo es contribuir al conocimiento de los recursos naturales para su conservación y aprovechamiento racional, en este caso, de la vegetación, mediante la investigación experimental que permita la generación de resultados novedosos referentes a las plantas empleadas en la medicina tradicional. Para el logro del objetivo general, se plantean los siguientes objetivos particulares.

OBJETIVOS PARTICULARES.

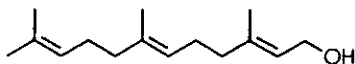
- 1.- Compilar y revisar la información química y biológica referente a *Neurolaena lobata*.
- 2.- Aislar y caracterizar químicamente los metabolitos secundarios presentes en *N. lobata*.
- 3.- Realizar algunos derivados de los principales constituyentes de *N. lobata*.
- 4.- Llevar a cabo la evaluación biológica preliminar de los metabolitos secundarios presentes en *N. lobata*, así como de los derivados que se obtengan, con el fin de comparar el grado de actividad biológica que presenten con relación a su estructura molecular.
- 5.- Aportar conocimientos que permitan ponderar la importancia de los metabolitos secundarios como sustancias bioactivas, así como llevar a cabo la evaluación preliminar de los mismos como agentes terapéuticos.
- 6.- Correlacionar los resultados obtenidos con algunas de las actividades biológicas registradas en la medicina tradicional para esta especie.

ANTECEDENTES.

Los metabolitos secundarios de plantas superiores pueden agruparse, de acuerdo a las rutas biogénicas que siguen en: terpenoides, alcaloides, esteroides, acetogeninas, flavonoides y compuestos bencenoides, principalmente.

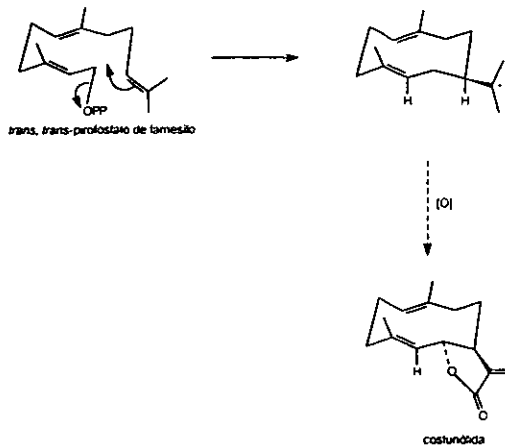
Un grupo de compuestos de amplio interés son los sesquiterpenos, y en particular, las lactonas sesquiterpénicas, las cuales, además de utilizarse como marcadores quimiotaxonómicos de la familia Compositae, han llamado la atención por sus interesantes propiedades biológicas [5, 7, 8]. Debido a que este tipo de metabolitos secundarios son los constituyentes característicos de *Neurolaena lobata*, a continuación se mencionarán generalidades sobre la biogénesis de estos metabolitos.

Los sesquiterpenos son productos naturales con quince átomos de carbono, formados por la unión de tres unidades de isopreno. El sesquiterpeno más sencillo, y al que se considera precursor de los demás sesquiterpenos, es el farnesol.



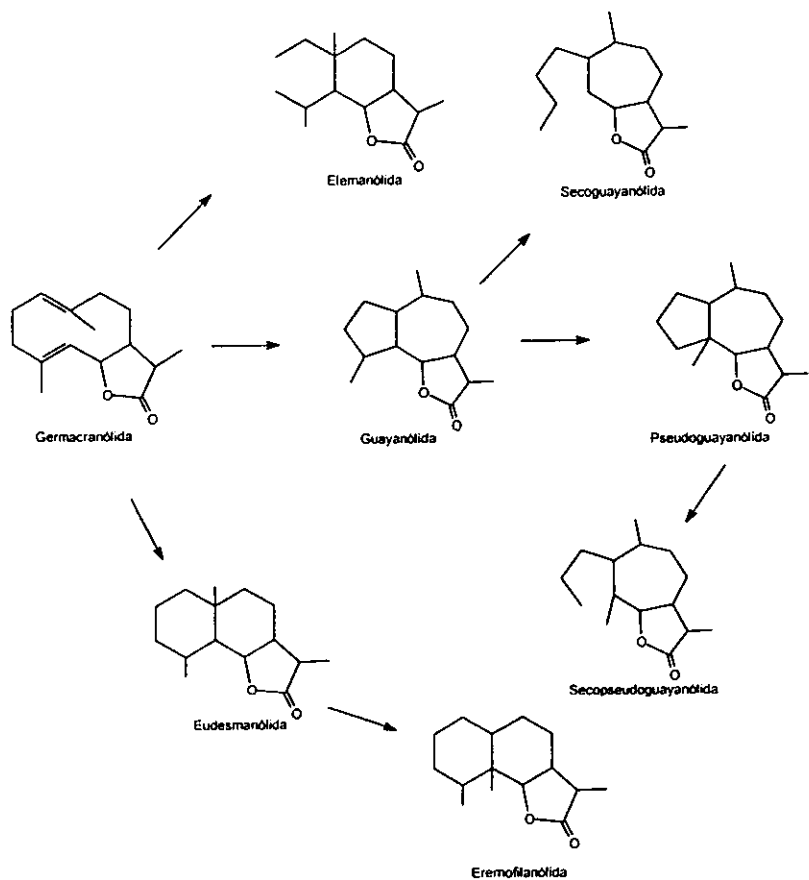
Farnesol.

El primer tipo de lactona sesquiterpénica que se forma por ciclización del farnesol es el de la germacranólida. Estas sustancias son las más ampliamente distribuidas y las más numerosas. Como se muestra en el esquema 1, la ciclización del *trans, trans*-pirofosfato de farnesilo, resulta en el intermediario *trans, trans* del germacradieno, el cual por modificaciones enzimáticas oxidativas origina las germacranólidas, representados por su miembro más simple, la costunólida.



Esquema 1. Biogénesis del esqueleto de las germacranólidas [6].

Como ya se ha mencionado, las germacranólidas son las primeras lactonas que se forman por ciclización del pirofosfato de farnesilo. Estas sustancias de primer paso biogénico se seguirán transformando para dar origen a otras lactonas sesquiterpénicas, cuya complejidad estructural puede correlacionar con pasos biogénicos adicionales [6,7], como se muestra en el esquema 2.



Esquema 2. Relaciones biogénicas entre germacranólidas y otro tipo de estructuras.

Las lactonas sesquiterpénicas destacan por sus diversas e interesantes propiedades químicas y biológicas. Entre las biológicas pueden mencionarse propiedades antihelmíntica, regulatoria de la actividad del crecimiento vegetal y la inhibidora de tumores cancerosos [7, 8], en lo referente a las propiedades químicas, puede mencionarse la síntesis de diversos esqueletos a partir de las germacranólidas [6].

A través de las últimas décadas se ha acumulado información científica proveniente de numerosos grupos de investigación, lo que ha permitido tener ahora un mejor concepto del importante papel ecológico que desempeñan estos metabolitos

secundarios

Neurolaena lobata es una planta herbácea, propia de terrenos montañosos, colinas, matorrales y tierras de bosques [9]. Esta planta está ampliamente distribuida en América Central, abarcando también el sur de México y las Islas Caribe [4].

Es una planta con tallos leñosos, erectos y muy ramificados, de 1.5-3 cm de alto, sus hojas son alternadas, apretado pubescentes y escabrosas, dentado denticuladas o diversamente lobadas, acuminadas en el ápice, estrechas en la base, sus flores son tubulares, amarillas, perfectas y fértiles.

Con respecto a los aspectos taxonómicos, es pertinente mencionar que el lugar del género *Neurolaena* dentro de la familia Asteraceae, ha sido objeto de considerable discusión [4]. De acuerdo al género, Brown (1817), colocó a *Neurolaena* en la subtribu Galinsoginae, tribu Heliantheae, cercano al género *Calea*. Sin embargo, este criterio no fue compartido por De Candolle (1836), ni por Bentham (1873), quienes la colocaron en la tribu Senecioneae. Tiempo después, Rydberg (1927) colocó a *Neurolaena* en una nueva tribu: Neurolaneae.

En 1973, Robinson y Bretell, redujeron la tribu de Rydberg al nivel de subtribu Heliantheae. Sin embargo, en el más reciente estudio de *Neurolaena*, Tune (1982), colocó al género dentro de la tribu Heliantheae, subtribu Galinsoginae, tal como había sido sugerido por Brown.

Es generalmente aceptado que los metabolitos secundarios (entre los que destacan las lactonas sesquiterpénicas y los flavonoides entre otros) pueden ser empleados en la taxonomía vegetal, para coadyuvar en los argumentos que permitan identificar la ubicación de una especie [7], sin embargo, es importante considerar los argumentos químicos en relación a otras evidencias.

Actualmente se conocen 13 especies del género *Neurolaena*, estas son *N. balsana*, *N. cobanensis*, *N. fulva*, *N. intermedia*, *N. jannaweissana*, *N. lamina*, *N. lobata*, *N. macrocephala*, *N. macrophylla*, *N. oaxacana*, *N. schippii*, *N. ventura* y *N. Wendtii* [15-20, 44].

De todas las especies del género *Neurolaena*, la especie que ha sido más estudiada es *N. lobata*, presumiblemente debido a las propiedades curativas que ésta ha manifestado y a su disponibilidad práctica; *N. lobata* es usada por las comunidades

indígenas como remedio contra diversas enfermedades. En el siguiente cuadro se muestran los principales usos medicinales que se le da a *N. lobata* en los países de Latinoamérica.

País	Uso	Referencia
Colombia	Como cataplasma para tratar la mordedura de serpiente.	[13]
Guatemala	Se utiliza para la malaria, dolores estomacales, diabetes, amibiasis, para tratar enfermedades de la piel, contra enfermedades nerviosas, anemia e hipotensión.	[4, 13, 15, 23]
Honduras	Para dolores estomacales, úlceras e infecciones.	[12, 15]
Jamaica	Como repelente de insectos y para el tratamiento de dolores estomacales.	[15]
México	Como remedio para la malaria, resfriados y fiebres.	[31]
Panamá	Para tratar diabetes, hipertensión, dolores hepáticos, malaria y como repelente de insectos.	[11, 22]
Trinidad y Tobago	Para tratar fiebre y resfriados.	[30]
Venezuela	Como remedio para tratar la malaria.	[15]

Cuadro 1. Uso etnomédico de *N. lobata* en diversos países de Latinoamérica.

Debido al aprecio popular referente a las propiedades curativas que *N. lobata* ha mostrado, diversos investigadores la han estudiado continuamente y han realizado diversas evaluaciones, comprobando así su actividad hipoglucemiante [23], su efecto antiparasitario (principalmente contra diversas especies de *Plasmodium*) [13, 24-29], así como su actividad citotóxica [26, 27, 28]. También se le realizaron pruebas contra diversas especies de hongos y bacterias, pero la actividad manifestada no fue sobresaliente [12, 28].

En estudios previos se ha reportado el aislamiento y caracterización de varios metabolitos presentes en *Neurolaena lobata*. Estos han sido principalmente lactonas sesquiterpénicas, furanoheliangólidas, varios flavonoides y derivados del timol [4, 11, 14, 16, 21, 22]. A continuación se mencionan los compuestos que han sido informados como constituyentes de *Neurolaena lobata*: neurolenina A (8), neurolenina B (3), neurolenina C (4), neurolenina D (5), neurolenina E (6), neurolenina F (7), lobatina A (9), lobatina B (10), lobatina C (11) 8β-isovalerianiloxi-9α-hidroxi-calicutatólida (12), 8β-isovalerianiloxi-9α-acetoxi-calicutatólida (13), éter 3,7-dimetílico de 6-hidroxi-kaempferol (14), éter 3,7-

dimetilico de quercetagetina (15), éter 3,6-dimetilico de quercetagetina (16), éter 3'-metilico de 6-hidroxiuteolina (17) 7-glucósido de 6-hidroxi-kaempferol (18), quercetagetina (19), 7-glucósido de 6-hidroxiuteolina (20), éter 3-metilico-7-sulfato de quercetagetina (21), éter 3-metilico-7-sulfato de 6-hidroxi-kaempferol (22), éter 3-metilico-7-glucósido de 6-hidroxi-kaempferol (23), éter 3-metilico-7-glucósido de quercetagetina (24), 7-glucósido de quercetagetina (25), timol derivado-1 (26), timol derivado-2 (27), timol derivado-3 (28), timol derivado-4 (29), timol derivado-5 (30), bisalboleno (31), germacreno D (32).

A continuación se muestran las estructuras de los compuestos mencionados anteriormente.

Neurolenina A (8)

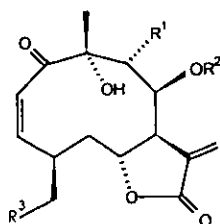
Neurolenina B (3)

Neurolenina C (4)

Neurolenina D (5)

Neurolenina E (6)

Neurolenina F (7)

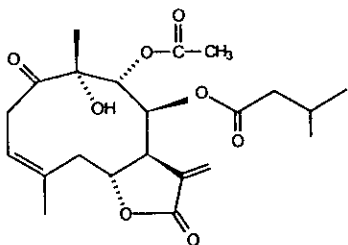


	R ¹	R ²	R ³
8	H	lval	H
3	OAc	lval	H
4	Oival	H	H
5	OH	lval	H
6	OAc	lval	OH
7	OAc	5-OH-tig o 5-OH-Ang	H

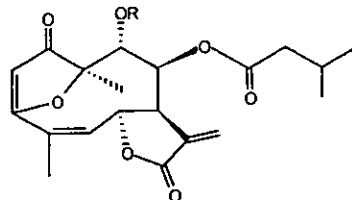
lobatina A (9)

lobatina B (10)

lobatina C (11)



9



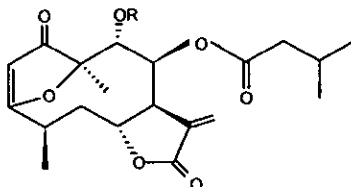
R

10 H

11 Ac

8 β -isovalerianiloxi-9 α -hidroxi-caliculatólida (12)

8 β -isovalerianiloxi-9 α -acetoxi-caliculatólida (13)



R

12 H

13 Ac

éter 3,7-dimetílico de 6-hidroxi-kaempferol (14)

éter 3,7-dimetílico de quercetagetina (15)

éter 3,6-dimetílico de quercetagetina (16)

éter 3'-metílico de 6-hidroxiluteolina (17)

7-glucósido de 6-hidroxi-kaempferol (18)

quercetagetina (19)

7-glucósido de 6-hidroxluteolina (20)

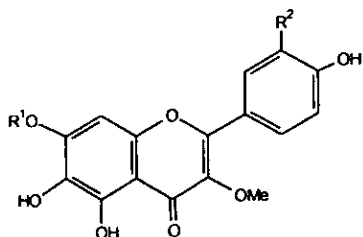
éter 3-metilico-7-sulfato de quercetagetina (21)

éter 3-metilico-7-sulfato de 6-hidroxikaempferol (22)

éter 3-metilico-7-glucósido de 6-hidroxikaempferol (23)

éter 3-metilico-7-glucósido de quercetagetina (24)

7-glucósido de quercetagetina (25)



14 R¹=Me, R²=H

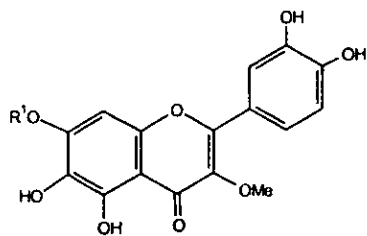
15 R¹=Me, R²=OH

21 R¹=SO₃, R²=OH

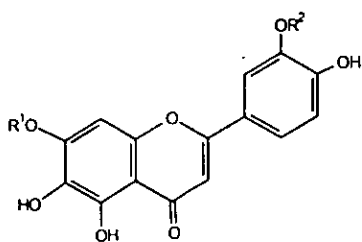
22 R¹=SO₃, R²=H

23 R¹=glc, R²=H

24 R¹=glc, R²=OH

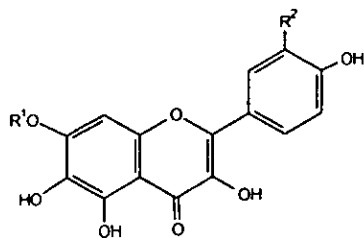


16 R¹=H



17 R¹=H, R²=Me

20 R¹=β-D-Glcp, R²=H

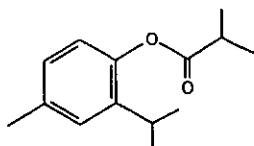


18 R¹=β-D-Glcp, R²=H

19 R¹=H, R²=OH

25 R¹=β-D-Glcp, R²=OH

Timol derivado-1 (26)

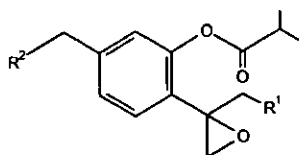


26

Timol derivado-2 (27)

Timol derivado-3 (28)

Timol derivado-4 (29)



27 $R^1 = \text{OCOCHMe}_2$, $R^2 = \text{H}$

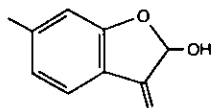
28 $R^1 = \text{OCOCH(Me)Et}$, $R^2 = \text{H}$

29 $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{OCOCHMe}_2$

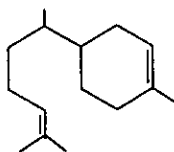
Timol derivado-5 (30)

Bisaboleno (31)

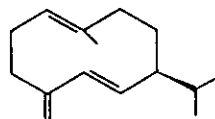
Germacreno D (32)



30



31

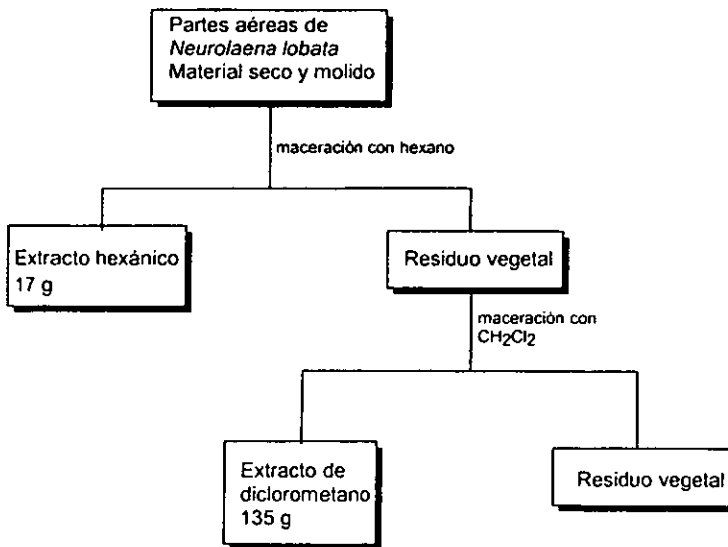


32

DESAROLLO EXPERIMENTAL

El material vegetal fue colectado en la región lacandona del estado de Chiapas, por el Biólogo Esteban Martínez, éste se sometió a un proceso de secado al aire. Las partes aéreas (3 Kg) fueron molidas y extraídas a temperatura ambiente con hexano durante 48 h, en tres ocasiones consecutivas, empleando para ello cinco litros de disolvente en cada extracción. El disolvente fue evaporado a presión reducida y el residuo vegetal desengrasado fue sometido a maceración con diclorometano, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. De esta forma, se obtuvieron 17 g de extracto hexánico y 135 g de extracto de diclorometano.

El procedimiento de obtención de extractos se esquematiza de la siguiente forma



Esquema 3. Obtención de los extractos de *Neurolaena lobata*.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los extractos hexánico y

de diclorometano en las evaluaciones antiinflamatoria y antimicrobiana.

- Evaluación antiinflamatoria.

Con esta evaluación se comprueba la inhibición del edema inducido con TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) en la oreja de ratón. Se utilizan 0.5 mg de extracto por cada oreja. Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la tabla 1.

Material ensayado	% de inhibición del edema
Indometacina	60.50
Extracto de Diclorometano	95.22
Extracto Hexánico	32.86

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria presentada por los extractos.

En este ensayo, se utilizó Indometacina como fármaco de referencia para inhibir el edema del ratón, el porcentaje de inhibición que ésta presentó fue del 60.5%; de acuerdo a los resultados mostrados por los dos extractos, se ve que el extracto diclorometánico exhibe una actividad antiinflamatoria mayor que el extracto hexánico y que la referencia.

- Evaluación antimicrobiana.

La realización de la evaluación antimicrobiana tiene como objetivo detectar la inhibición del crecimiento de distintas especies de bacterias y hongos. Lo que se mide es el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano. Para la realización de ésta prueba se utilizaron 500 µg de extracto por disco. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en esta prueba.

Extracto	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>T. viride</i>	<i>A. niger</i>
Diclorometánico	-	-	-	-	-
Hexánico	-	-	10 mm.	-	-

Tabla 2. Actividad antimicrobiana presentada por los extractos.

De acuerdo a los resultados mostrados, podemos señalar que los extractos no exhiben actividad antimicrobiana significativa frente a los microorganismos ensayados.

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO.

El extracto hexánico (16 g) se adsorbió en 16 g de sílice 70-230 y fue aplicado en una columna empacada con sílica gel Merk 60 GF (en una relación 1:5), la columna se desarrolló a presión reducida, eluyéndola con mezclas de hexano-acetato de etilo con incremento de polaridad.

De esta forma, se colectaron 139 fracciones de 250 mL cada una, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas de acuerdo a su similitud en corrimiento en cromatografía en capa fina (CCF), como se muestra en la siguiente tabla.

Eluyente	Fracción	Clave asignada	Compuesto aislado
Hexano	1	Ahv	ceras
Hexano	2-4	Bhv	ceras
Hexano	5-10	Chv	ceras
Hexano	11-16	Dhv	ceras
Hexano-AcOEt 95:5	17-18	Ehv	ceras
Hexano-AcOEt 95:5	19-24	Fhv	mezcla de β -sitosterol (2) y estigmasterol (1)
Hexano-AcOEt 95:5	25-30	Ghv	mezcla de β -sitosterol y estigmasterol (1)
Hexano-AcOEt 95:5	31-37	Hhv	
Hexano-AcOEt 95:5	38-54	Ihv	
Hexano-AcOEt 95:5	55-61	Jhv	
Hexano-AcOEt 9:1	62-67	Khv	
Hexano-AcOEt 9:1	68-79	Lhv	neurolenina B (3)
Hexano-AcOEt 9:1	80-103	Mhv	neurolenina B (3)
Hexano-AcOEt 87:13	104-121	Nhv	
Hexano-AcOEt 87:13, 84:14, 80:20'	122-139	Ñhv	

Tabla 3. Datos del desarrollo cromatográfico del extracto hexánico.

Las primeras fracciones Ahv, Bhv, Chv fueron eluidas con hexano al 100%, mismas que mostraron una consistencia cerosa de color blanca. Su espectro de IR mostró señales de enlace carbono-hidrógeno en 2957, 2929 y 2854 cm^{-1} y la ausencia de grupos funcionales confirma que se trata de lípidos, por lo que no se continuó su análisis.

Aislamiento de la mezcla de estigmasterol (1) y β -sitosterol (2).

Las fracciones Fhv y Ghv presentaron un aspecto de ceras verde opacas, al

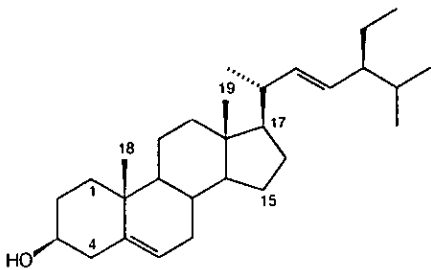
adicionarle una mezcla de disolventes hexano-acetona en proporción 1:1, se precipitó un sólido amorfo de color blanco opaco, que posteriormente se recrystalizó con hexano-acetona y se identificó como una mezcla de estigmasterol (1) y β -sitosterol (2) en proporción 1:1, cuyos datos físicos y espectroscópicos son:

pf: 143-145 °C (agujas)

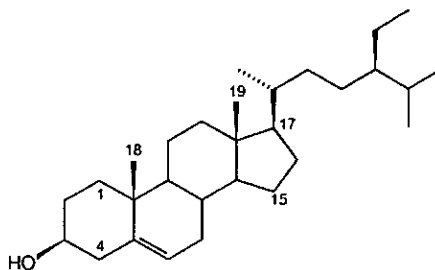
Rf: 0.37 (hexano-AcOEt, 4:1)

IR λ_{\max} (CHCl₃): 3517, 2931, 2857, 1172, 1650, 1466 cm⁻¹

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 5.35 (1H, *d*, J=5.4, H-6), 5.16 (1H, *dd*, J=8.4, 15, H-22), 5.02 (1H, *dd*, J= 8.1, 15, H-23), 3.52 (1H, *m*, H-3), 1.25 (1H, *s*, presumible impureza), señales a campo alto, atribuibles a metilos: δ 1.01, 0.93, 0.91, 0.85, 0.83, 0.81, 0.70 y 0.68.



Estigmasterol (1)



β -sitosterol (2)

Aislamiento de Neurolenina B (3).

Los eluatos 86, 87, 88, 89 de la fracción Lhv presentaron un sólido en forma de agujas que fueron lavadas con hexano, y posteriormente se recrystalizaron por par de disolventes, hexano-diclorometano, obteniendo un compuesto identificado como Neurolenina B (3).

La fracción Mhv mostró un sólido cristalino en forma de agujas color verde claro

que fueron lavadas con hexano. Se procedió a recrystalizar por par de disolventes utilizando diclorometano-éter isopropílico, y se obtuvo un sólido amorfo de color blanco que se identificó como Neurolenina B (3).

La eliminación del disolvente de las aguas madres, permitió la obtención de un residuo (1.82 g), el cual fue adsorbido en sílica gel 70-230 en relación 1:1, mismo que fue aplicado en una columna empacada con sílica gel Merk 60 GF en relación 1:5. Esta columna se desarrolló a presión reducida utilizando mezclas de disolventes hexano-AcOEt con incremento de polaridad, obteniendo 85 subfracciones, las cuales se reunieron según la similitud de su corrimiento en CCF, como se muestra en la tabla 4.

Eluyente	Fracción	Clave asignada
Hexano 100% y hexano-AcOEt 95:5	1-23	Mhv-1
Hexano-AcOEt 95:5, 93:7	24-27	Mhv-2
Hexano-AcOEt 93:7	28-30	Mhv-3
Hexano-AcOEt 93:7	31-34	Mhv-4
Hexano-AcOEt 93:7	35-46	Mhv-5
Hexano-AcOEt 93:7	47-50	Mhv-6
Hexano-AcOEt 93:7	51-57	Mhv-7
Hexano-AcOEt 93:7	58-61	Mhv-8
Hexano-AcOEt 87:13	62-73	Mhv-9
Hexano-AcOEt 87:13	74-85	Mhv-10

Tabla 4. Datos del desarrollo cromatográfico de la fracción Mhv.

Las fracciones Mhv 5, Mhv 6 y Mhv 7 se recrystalizaron por par de disolventes de diclorometano y éter isopropílico obteniendo así Neurolenina B (3). El procedimiento de obtención de Neurolenina B (3) se ilustra en el esquema 2.

Datos físicos y espectroscópicos de 3

pf: 162-164 °C

UV (EtOH) $\lambda_{\text{máx}}$ nm: 302 (1395), 279 (1268), 212 (14292)

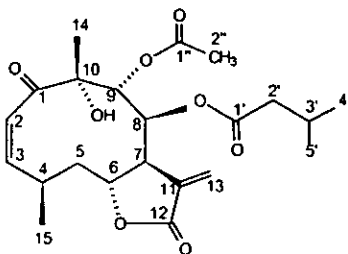
Rf: 0.36 (hexano-AcOEt 7:3)

IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 3469, 2968, 2934, 2875, 1759, 1689, 1632 cm⁻¹.

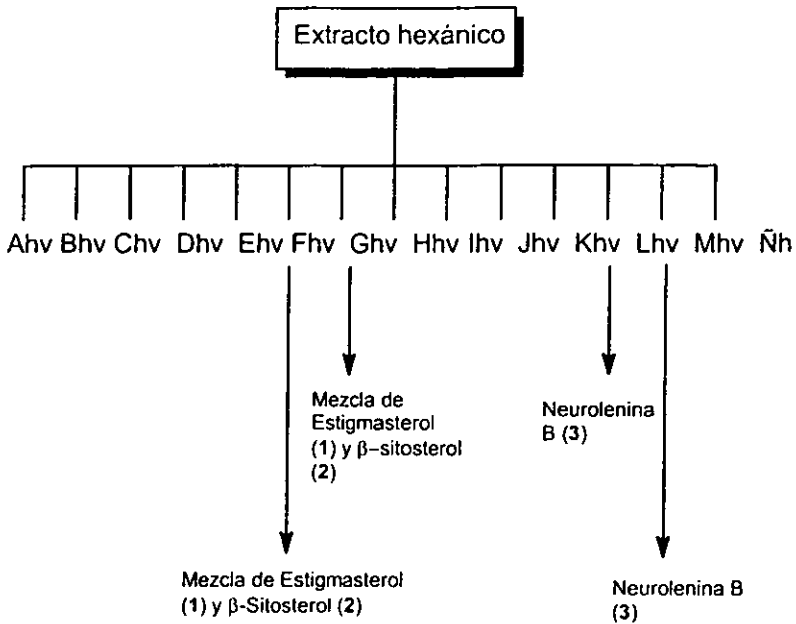
RMN ¹H, (500 MHz, CDCl₃, δ): 6.593 (1H, *d*, J=12.5, H-2), 6.320 (1H, *d*, J= 1.5, H-13a), 6.008 (1H, *t*, J= 12, H-3), 5.815 (1H, *d*, J= 1.5, H-13b), 5.560 (2H, *s*, H-8 y H-9), 4.550 (1H, *dd*, J= 5,12, H-6), 3.110 (1H, *m*, H-4), 2.59 (1H, *s*, H-7) 2.100(1H, *s*, H-2''); 2.090 (1H, *s*, H-2a), 1.960 (1H, *m*, H-2b), 1.950 (1H, *m*, H-3'), 1.830 (1H, *ddd*, J= 5, 13.5, H-5a), 1.427 (1H, *ddd*, J= 5.5, 13, 13.5, H-5b), 1.330 (1H, *s*, H-14), 1.135 (1H, *d*, J= 6.5, H-15), 0.870 (1H, *d*, J= 6.5, H-5'), 0.870 (1H, *d*, J= 6.5, H-4').

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, δ): 204.75 (C-1), 171.07 (C-1'), 170.23 (OCOCH₃ -9), 168.80 (C-12), 148.16 (C-3), 134.95 (C-11), 126.39 (C-13), 125.4 (C-2), 79.36 (C-10), 76.3 (C-6), 73.98 (C-8), 73.88 (OAc-9), 42.58 (C-2'), 41.32 (C-7), 40.3 (C-5), 28.2 (C-4), 24.9 (C-3'), 23.68 (C-14), 22.27 (C-5'), 20.49 (OCO-CH₃-9), 19.68 (C-15).

EM *m/z* (IE): C₂₂H₃₀O₈ (PM 422) 380 [M+-CH₂CO]+ (11); 364 [M+-C₄H₈CO]+ (3); 338 [M+-C₄H₈CO]+ (25); 320 (8); 296 (6); 278 (51); 260 (14); 235 (13); 217 (25); 193 (21); 189 (14); 179 (13); 165 (10); 147 (9); 125 (12); 111 (21); 85 [C₄H₈CO]+ (100); 82 (60); 57 (42); 43 (13); 41 (3).



Neurolenina B (3)



Esquema 4. Procedimiento de extracción y aislamiento de los constituyentes de *Neurolaena lobata* en el extracto de hexano.

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO.

El extracto de diclorometano (130 g) fue adsorbido en silica gel 70-230 (en una relación 1:5), y fue aplicado en 2 columnas de 12 cm de diámetro, empacadas con silica gel 60 GF (en una relación 1:5). Las columnas se desarrollaron a presión reducida, usando mezclas de disolventes hexano-AcOEt, con incremento de polaridad.

De esta forma se obtuvieron 285 fracciones de 500 mL cada una, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas, de acuerdo a su similitud en corrimiento cromatográfico. Esto se resume a continuación en la tabla 5.

Eluyente	Fracción	Clave asignada	Compuesto aislado
Hexano	1-5	Adm	ceras
Hexano-AcOEt 98:2	6-18	Bdm	ceras
Hexano-AcOEt 98:2	19-28	Cdm	ceras
Hexano-AcOEt 98:2	29-42	Ddm	ceras
Hexano-AcOEt 96:4, 94:6	43-59	Edm	ceras
Hexano-AcOEt 94:6	60-76	Fdm	β -sitosterol (2) y estigmasterol (1)
Hexano-AcOEt 94:6	77-81	Gdm	β -sitosterol (2) y estigmasterol (1)
Hexano-AcOEt 94:6	82-86	Hdm	ácidos carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.
Hexano-AcOEt 94:6	87-105	Idm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.
Hexano-AcOEt 92:8	106-126	Jdm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.
Hexano-AcOEt 92:8	127-136	Kdm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.
Hexano-AcOEt 92:8	137-161	Ldm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.
Hexano-AcOEt 92:8	162-171	Mdm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos
Hexano-AcOEt 92:8, 87:13	172-206	Ndm	neurolenina B (3)
Hexano-AcOEt 8:2, 7:3	207-230	Ñdm	neurolenina B (3) neurolenina C (4), neurolenina D (5)
Hexano-AcOEt 7:3, 6:4	231-237	Odm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos
Hexano-AcOEt 7:3, 6:4	238-287	Pdm	ác. carboxílicos, ésteres lipídicos y ác. grasos.

Tabla 5. Datos del desarrollo cromatográfico del extracto de diclorometano.

Las fracciones Fdmv y Gdmv presentaron un sólido en forma de agujas opacas que se lavaron con hexano, eliminando el colorante y dejándolas blancas, se realizó una comparación cromatográfica con la muestra de la mezcla de estigmasterol (1) y

β -sitosterol (2) que fue aislada en el extracto hexánico, observando que se trataba de la misma mezcla de sustancias. Los datos espectroscópicos del estigmasterol (1) y β -sitosterol (2) se encuentran en la parte experimental referente al análisis del extracto hexánico.

La fracción Ndmv se comparó por punto de fusión, CCF e IR con la referencia de neurolenina B (3), observando la identidad de dicho compuesto.

Con la finalidad de eliminar los pigmentos presentes en esta fracción, se realizó un ensayo con carbón activado, para comprobar que no se modifican los metabolitos secundarios.

Una muestra (500 mg) de la fracción, se disolvió en la mínima cantidad de etanol, añadiendo el carbón activado en relación 1:2, agitando hasta disolver. Se filtró en celita y se concentró a presión reducida. La comparación cromatográfica, tomando como referencia a la neurolenina B (3) permitió concluir que no se alteraba la composición de los metabolitos secundarios y se eliminaba el colorante. Se trató con carbón activado el resto de la fracción (8.9 g) en la forma anteriormente descrita. Posteriormente se procedió a cristalizar por par de disolventes hexano- CH_2Cl_2 , obteniéndose así cristales en forma de agujas gruesas de color verde claro, que fueron lavadas con éter isopropílico.

Se realizó un análisis de la fracción Ñdmv y se observó que tenía tres manchas definidas, pero existía un exceso de colorante, por lo cual se trató con carbón activado, teniendo como resultado las tres manchas homogéneas, las cuales se trataron de cristalizar utilizando el par de disolventes hexano-diclorometano. Se observó un sólido pegado en las paredes del matríz, mismo que posteriormente se lavó con éter isopropílico. Por análisis en CCF no se observó la separación de las manchas, por lo que se decidió proceder a separar por cromatografía en columna. Se aplicaron 7.4 mg de la fracción Ñdmv en una placa analítica de 10 x 20 cm, esta cromatoplaca fue eluida con hexano-AcOEt en proporción 7:3 (tres veces). Se procedió a cortar y recuperar las bandas por separado, utilizando CH_2Cl_2 como disolvente de extracción. El análisis por CCF de los productos recuperados mostró que no se logró la separación exitosa de las sustancias. La mayor parte de la fracción Ñdmv (6.4 g) fue tratada con carbón activado y 500 mg de este residuo fue aplicado a una columna de 3 cm de diámetro, empacada con sílica gel 70-230 (relación 1:50). La elución de esta columna se llevó a cabo con un gradiente creciente de hexano-AcOEt.

Se obtuvieron 96 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas de acuerdo a la similitud de su Rf, como se muestra en la tabla 6.

Eluyente	Fracción	Clave asignada
Hexano-AcOEt 9:1, hexano-AcOEt 85:15, hexano-AcOEt 8:2	1-44	AÑdmv
Hexano-AcOEt 8:2	45-73	BÑdmv
Hexano-AcOEt 8:2	74-79	CÑdmv
Hexano-AcOEt 8:2	80-91	DÑdmv
Hexano-AcOEt 8:2	92-96	EÑdmv

Tabla 6. Datos del desarrollo cromatográfico de la fracción Ñdm.

Se observó que el lavado de la columna anterior contenía 2 sustancias principales. La cristalización por par de disolventes (diclorometano-hexano) permitió la obtención de un sólido en forma de cristales pequeños de color blanco, sustancia que fue identificada como Neurolenina D (5).

Datos físicos y espectroscópicos de 5.

pf: 164-165 °C

Rf: 0.28 (Hexano-AcOEt 6:4)

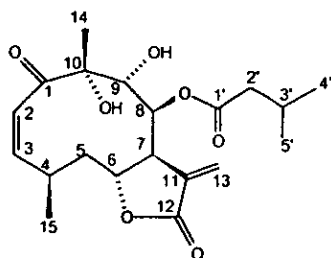
IR CHCl_3 $\nu_{\text{máx}}$: 3493, 2966, 2931, 1761, 1691 cm^{-1}

RMN ^1H , (500 MHz, CDCl_3 , δ): 6.509 (1H, *d*, *J*=12, H-2), 6.280 (1H, *d*, *J*= 1.25, H-13a), 5.993 (1H, *t*, *J*= 11.5, H-3), 5.757 (1H, *d*, *J*= 1.5, H-13b), 5.303 (1H, *dd*, *J*= 2.5, 9, H-8), 4.446 (1H, *dd*, *J*=H5, 11.5, H-6), 4.078 (1H, *s*, OH), 3.896 (1H, *t*, *J*= 10, H-9), 3.174 (1H, *m*, H-4), 2.621 (1H, *s*, H-7), 2.370 (1H, *d*, *J*= 11.5, H-OH), 2.146 (2H, *m*, H-2a y H- 2b), 2.041 (1H, *m*, H-3'), 1.799 (1H, *ddd*, *J*= 5.5, 12.5, 13, H-5a), 1.519 (1H, *s*, H-14), 1.421 (1H, *ddd*, *J*= 5.5, 12.5, 13, H-5b) 1.126 (1H, *d*, *J*= 6.5, H-15), 0.913 (2H, *d*, *J*=6.5, H-4' y 5').

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ): 205.610 (C-1), 173.746 (C-1'), 169.010 (C-12), 148.088 (C-3), 135.718 (C-11), 125.344 (C-2), 125.213 (C-13), 80.905 (C-10), 77.262 (C-6), 77.00 (C-8), 76.752 (C-9), 42.964 (C-2'), 41.653 (C-7), 40.356 (C-5), 28.059 (C-4), 25.378 (C-

3'), 24.212 (C-14), 22.231 (C-4' y C-5'), 19.696 (C-15).

EM m/z : 380 [M+], 362 [M+-18], 337 [M+-43]; 335 (5), 320 (1), 296 (16), 278 (15); 277 (5); 235 (16); 233 (7), 217 (9); [M+-85]; 189 (9); 153 (10); 85 (100); 149 (7), 125 (12), 111 (58), 85 [C₄H₉CO]⁺; 82 (35), 57 (71); 43 (34), 41 (24).



Neurolenina D (5)

La fracción Ñdmv (6.4 g) fue tratada con carbón activado y se adsorbió en sílice Merck 70-230, en relación 1:1. El residuo fue aplicado a una columna cromatográfica de 6 cm de diámetro empacada a presión reducida con sílice 60-250 (80g). La elución se llevó a cabo con mezclas de benceno-AcOEt, con incremento de polaridad. Se colectaron 105 fracciones de 100 mL cada una, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas de acuerdo a su similitud en corrimiento en CCF, como se muestra en la tabla 7.

Eluyente	Fracción	Clave asignada
Benceno-AcOEt 9:1	9	A'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	10-13	B'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	14	C'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	15	D'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	16-20	E'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	21-29	F'Ñdmv
Benceno-AcOEt 9:1	30-38	G'Ñdmv
Benceno-AcOEt 88:12	39-49	H'Ñdmv
Benceno-AcOEt 88:12	50-61	I'Ñdmv
Benceno-AcOEt 88:12, 80:20	62-83	J'Ñdmv
Benceno-AcOEt 8:2	84-87	K'Ñdmv
Benceno-AcOEt 8:2	88-91	L'Ñdmv
Benceno-AcOEt 8:2, 75:25	92-99	M'Ñdmv
Benceno-AcOEt 75:25	100-105	N'Ñdmv

Tabla 7. Datos del desarrollo cromatográfico de la fracción Ñdmv

Las primeras fracciones fueron eliminadas debido a que no constituyeron metabolitos secundarios característicos.

En la fracción G'Ñdmv se observaron 2 manchas uniformes. Parte de esta fracción (300 mg) se adsorbió en sílice 70-230 y fue aplicada a una columna de 3 cm de diámetro empacada por gravedad en relación 1:100 con sílice 70-230, empleando una polaridad constante de elución de hexano-AcOEt 3:2. Se colectaron 38 fracciones de 50 mL cada una, las cuales se evaporaron a presión reducida y fueron reunidas de acuerdo a su Rf, como se muestra en la tabla 8.

Eluyente	Fracción	Clave asignada
Hexano-AcOEt 3:2	7	G'dmv1
Hexano-AcOEt 3:2	8-10	G'dmv2
Hexano-AcOEt 3:2	11-13	G'dmv3
Hexano-AcOEt 3:2	14-18	G'dmv4
Hexano-AcOEt 3:2	19-27	G'dmv5
Hexano-AcOEt 3:2	28-38	G'dmv6

Tabla 8. Datos del desarrollo cromatográfico de la fracción G'dmv

Las primeras fracciones fueron eliminadas, debido a que no constituyeron sustancias homogéneas.

En la subfracción G'dmv1 se observó un sólido que presentaba una mancha homogénea, la cual se procedió a cristalizar por par de disolventes (hexano-diclorometano), permitiendo la obtención de un sólido amorfo de color amarillo opaco, que se lavó con hexano y se cristalizó nuevamente. El compuesto obtenido se identificó como Neurolenina C (4). Los datos físicos y espectroscópicos de 4 se muestran a continuación.

Pf: 95-100 °C

UV (EtOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ nm: 212.0 (14810)

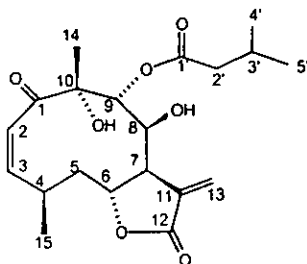
Rf: 0.29 (Hexano-AcOEt 7:3)

IR (CHCl₃) $\nu_{m\acute{a}x}$: 3624, 3477, 2965, 2932, 1763, 1692, 1460.74 cm⁻¹.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ): 6.590 (1H, *d*, $J= 12$, H-2), 6.316 (1H, *d*, $J=1.5$, H-13a), 5.990 (1H, *t*, $J= 12$, H-3), 5.704 (1H, *d*, $J= 1.5$, H-13b), 5.470 (1H, *d*, $J= 9.5$, H-9), 4.487 (1H, *dd*, $J= 5.5, 11.5$, H-6), 4.060 (1H, *t*, $J= 6.5$, H-8), 3.089 (1H, *m*, H-4), 2.498 (1H, *s*, H-7), 2.296 (2H, *dd*, $J= 1.5, 2, 7$, H-2'a y 2'b), 2.143. (1H, *m*, H-3'), 1.838 (1H, *ddd*, $J= 5, 13, 13$, H-5a), 1.439 (1H, *ddd*, $J= 6, 13, 13$, H-5b), 1.328 (1H, *s*, H-14), 1.129 (1H, *d*, $J= 6.5$, H-15), 0.984 (2H, *dd*, $J= 2, 6.75$, H-4' y 5').

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ): 205.17 (C-1), 172.93 (C-1'), 169.59 (C-12), 148.04 (C-3), 137.56 (C-11), 125.32 (C-2), 123.68 (C-13), 79.37 (C-10), 77.25 (C-6), 77.00 (C-8), 76.74 (C-9), 43.05 (C-2''), 42.35 (C-7), 40.32 (C-5), 28.35 (C-4), 25.59 (C-3'), 23.99 (C-14), 22.37 (C-5' y 4'), 19.71 (C-15).

EM *m/z*: 380 [M+], 362 [M+-18], 337[M+-43];297 (10); 296 (28); 292 (8); 278 (16); 260 (5); 232 (20); 217 (14); 195 [M+-85];193 (20); 192 (15); 181 (4); 165 (14); 85 (100); 85 [C₄H₉CO]⁺; 57 (86); 43 (49).



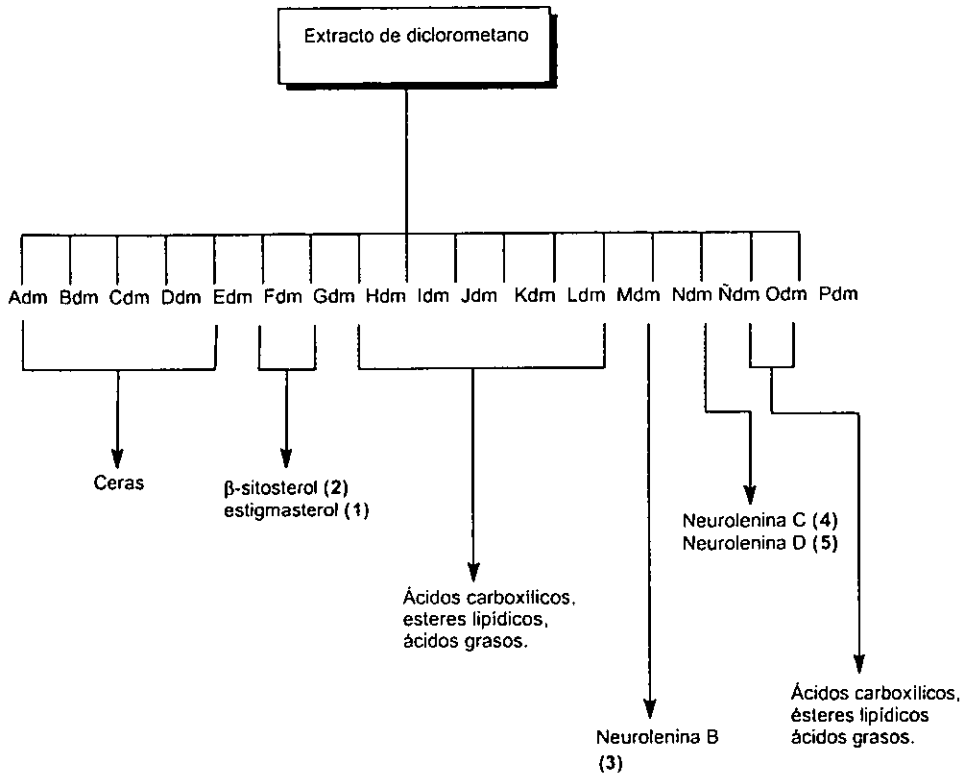
Neurolenina C (4)

Se realizó el estudio de las fracciones Hdm, Idm, Jdm, Kdm, Ldm, Mdm, Odm y Pdm, pertenecientes a la columna principal de diclorometano. El análisis cromatográfico de estas fracciones se realizó empleando técnicas de cromatografía en columna, y cromatografía en capa fina, utilizando sílica para placa, sílice 70-230, así como cromatofolios. Las columnas de cada una de las fracciones fueron eluidas a presión reducida, empleando mezclas de hexano y acetato de etilo, como sistema de elución.

De acuerdo con el análisis cromatográfico realizado, se observó que en estas fracciones no estaban presentes metabolitos característicos de *Neurolaena lobata*, de

esta manera, se encontraron componentes como ácidos carboxílicos, ésteres lipídicos y ácidos grasos.

En el esquema 3 se muestra el resumen de los compuestos encontrados en el extracto de diclorometano.



Esquema 5. Procedimiento de extracción y aislamiento de los constituyentes de *Neurolaena lobata* en el extracto de diclorometano.

DERIVATIZACIÓN DE NEUROLLENINA B.

De acuerdo con los metabolitos aislados experimentalmente de *Neurolaena lobata*, neurolenina B esta presente en mayor cantidad que las neuroleninas C y D, por lo que se procedió a realizar reacciones químicas empleando neurolenina B como materia prima, para la obtención de derivados de ésta, y así realizar ensayos biológicos, con la finalidad de establecer, de manera preliminar, una comparación entre la estructura molecular y la actividad biológica.

Reacciones de Hidrólisis Básica.

Procedimiento A. Se prepara una disolución de **3** (24 mg, 0.056 mmol) en MeOH (2 mL). Esta disolución se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min, y en esta atmósfera se adicionan 5 mL de una solución de K_2CO_3 (90 mg en 6 mL de agua destilada, 0.108 M). Esta mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente y en atmósfera inerte durante 2.5 h. En ese momento, por análisis de CCF se observa la aparición de una mancha muy tenue más polar que la materia prima.

La reacción se detiene neutralizando con una solución de HCl al 10%. El crudo de la reacción es extraído varias veces con CHCl_3 y se seca con Na_2SO_4 anhidro; el disolvente se elimina por concentración a presión reducida.

Al observar el análisis cromatográfico del producto, se observa que la materia prima prácticamente no reaccionó, y que la intensidad de la mancha tenue descrita arriba era prácticamente nula.

Procedimiento B. En un matríz de bola de 2 bocas de 25 mL se coloca **3** (24 mg, 0.056 mmol), y se disuelve en MeOH (2 mL). Esta disolución se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min. En estas condiciones se adicionan 5 mL de una solución de K_2CO_3 (90 mg en 6 mL de agua destilada, 0.108 M). Esta mezcla de reacción se deja en agitación, a reflujo, a una temperatura de 70 °C y en atmósfera inerte durante 30 min. En ese momento se observa por análisis en CCF la aparición de varios derivados y el consumo de materia prima. La reacción se detiene neutralizando hasta pH 6-7 con una solución de HCl al 10%. El crudo de la reacción se extrae varias veces con CH_2Cl_2 , y se

seca con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se elimina por concentración a presión reducida.

El análisis por CCF permite observar la descomposición de la materia prima y la aparente formación de cuatro derivados principales, este producto de reacción (7.4 mg, lo que representa el 29.6 % de rendimiento) se aplicó en una cromatoplaaca analítica de 7 x 20 cm. Esta cromatoplaaca fue eluida en una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en una polaridad de 95:5. Una vez terminada la elución, se procede a raspar las partes de la cromatoplaaca en las que se presentan los derivados y se extraen varias veces con acetona, obteniéndose entre 0.7-1.5 mg de cada uno (4.58 % de rendimiento promedio).

Sin embargo, el análisis por RMN ^1H de estos derivados, mostró que se trataba de residuos grasos [(300 MHz, CDCl_3), δ , 1.6 (señal de humedad), 1.2 (señal de ceras)].

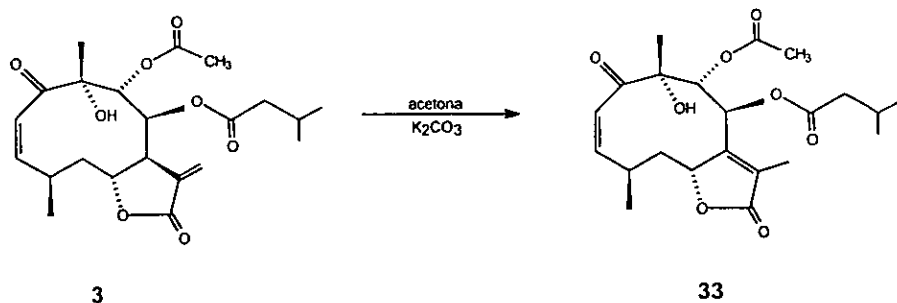
Procedimiento C. Se procede a preparar una disolución de **3** (24 mg, 0.056 mmol), en THF (2 mL), esta disolución se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min, en estas condiciones se adicionan 2 mL de una solución de K_2CO_3 (90 mg en 6 mL de agua destilada, 0.108 M), se observó que al adicionar ésta solución, la materia prima solidifica. Esta mezcla de reacción se deja en agitación, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte durante 3 h. La reacción se detiene neutralizando hasta pH 6-7, con una solución de HCl al 10%. El crudo de la reacción se extrae varias veces con CHCl_3 y se seca con Na_2SO_4 , el disolvente se elimina por concentración a presión reducida. El análisis cromatográfico del producto muestra que la materia prima no reaccionó.

Obtención de Isoneurolenina B (**33**).

Procedimiento D. En un matríz de bola de dos bocas se coloca **3** (15 mg, 0.035 mmol), disuelto en acetona (1 mL), la disolución se desoxigena con burbujeo de gas inerte (N_2) durante 5 min. En esta atmósfera se adicionan 2 mL de una disolución de K_2CO_3 al 20% (0.001 M), esta mezcla de reacción se deja a reflujo a 70 °C, y en agitación durante 45 min. Transcurrido este tiempo se observa que la mezcla de reacción se torna amarillenta. Por análisis en CCF de la reacción, se observa que la materia prima esta consumida casi en su totalidad, y se manifiesta la aparición de varios derivados de mayor y menor polaridad que la materia prima. En este momento la reacción se detiene neutralizando con una solución de HCl al 10% hasta pH 6-7. El crudo de la reacción fue extraído varias

veces con CH_2Cl_2 y se secó con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se elimina por concentración a presión reducida.

De esta forma, se aplicó el producto de reacción (13 mg, lo que representa el 86.6 % de rendimiento) en una cromatoplaaca analítica de 7.5 x 20 cm, esta cromatoplaaca se eluyó con una mezcla de hexano-acetato de etilo en una proporción 2:3. El procedimiento usual de extracción de los productos, sólo permitió el aislamiento del aceite **33** (1.5 mg, 10%). En el esquema 6 se presenta la reacción realizada.



Esquema 6. Reacción de hidrólisis básica. Obtención de **33**.

Datos físicos y espectroscópicos de **33**.

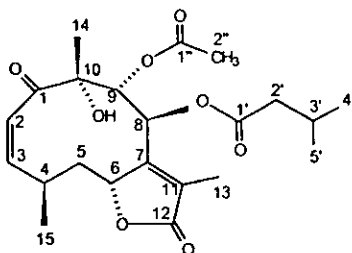
Rf: 0.26 (hexano-AcOEt 2:3)

IR CHCl_3 ν_{max} : 2928, 2854, 1742, 1463 cm^{-1}

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ): 6.572 (1H, *d*, $J = 11.5$, H-2), 5.969 (1H, *t*, $J = 11.5$, H-3), 5.593 (1H, *d*, $J = 9.5$, H-9), 5.487 (1H, *d*, $J = 9.5$, H-8), 4.493 (1H, *dd*, $J = 5.5$, 12, H-6), 3.069 (1H, *m*, H-4), 2.174 (3H, *s*, H-13), 2.099 (3H, *s*, H-2''), 1.279 (3H, *d*, $J = 24.5$, H-14), 1.156 (3H, *d*, $J = 6.5$, H-15), 0.901 (6H, *dd*, $J = 2, 6.5$, H-4' y 5')

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ): 170.3 (C-1''), 149.2 (C-3), 127.2 (C-13), 125.6 (C-2), 74.5 (C-6), 42.8 (C-2'), 37.9 (C-7), 29.6 (C-4), 23.6 (C-14), 22.4 (C-4' y C-5'), 19.8 (C-2''), 18.2 (C-15).

EM *m/z* (IE, 70 eV): 422 [M^+], 335 [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_9\text{O}$], 379 [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_3\text{O}$].



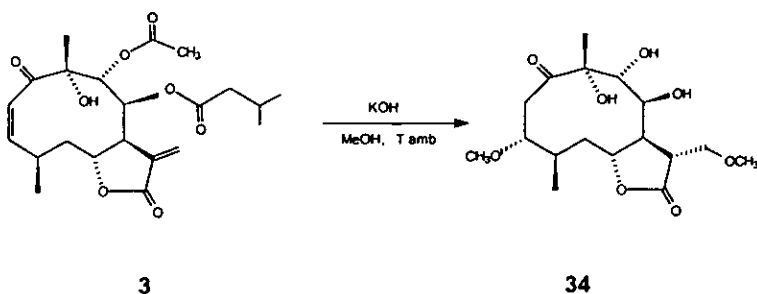
33

Obtención de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (**34**).

Procedimiento E. En un matr az de bola de 50 mL se coloca **3** (50 mg, 0.118 mmol) y se disuelve en MeOH (5 mL). Posteriormente se adiciona KOH (50 mg, 0.892 mmol), esta mezcla de reacción se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min y se deja en agitación, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte por 30 min. En este momento, se observa por análisis cromatográfico, que ya se han formado varios derivados. La reacción se suspende neutralizando hasta pH 6-7, con una solución de HCl al 10%, el crudo de la reacción fue extraído varias veces con CHCl_3 y se seca con Na_2SO_4 , el disolvente fue eliminado por concentración a presión reducida

El análisis del producto por CCF permite observar la aparición de cinco derivados principales. El producto obtenido (8.3 mg, lo que representa el 33.2 % de rendimiento) se aplicó en una cromatoplaqueta analítica de 7 x 20 cm, esta fue eluida con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH en una proporción 96:4. Al finalizar la elución de la placa, se procedió a raspar las bandas en las que se encontraban los derivados y se extrajeron varias veces con acetona, obteniéndose así entre 0.8-1.2 mg de cada uno (2 %). Sin embargo, sólo uno de los derivados de mayor polaridad que la materia prima presentó señales interpretables en el espectro de RMN ^1H .

De acuerdo con el análisis de los datos de RMN ^1H , este compuesto fue identificado como el aceite triol **34**. En el esquema 7 se presenta la reacción descrita.



Esquema 7. Reacción de hidrólisis básica de neurolepin B. Obtención de **34**.

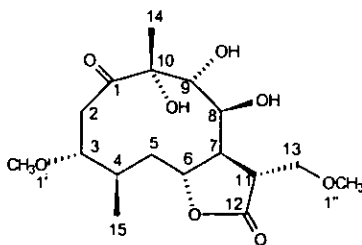
Datos físicos y espectroscópicos de **34**.

Rf: 0.37 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)

IR CHCl₃ ν_{máx}: 2929, 2854, 1776, 1726 cm⁻¹.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 4.888 (1H, *d*, J= 7.5, H-9), 4.503 (1H, *m*, H-6), 4.194 (1H, *s*, H-8), 3.709 (1H, *dd*, J= 4.8, 9, H-13a), 3.548 (1H, *dd*, J= 3.6, 9.3, H-13b), 3.362 (3H, *s*, -OCH₃), 3.116 (3H, *s*, -OCH₃), 2.833 (1H, *m*, H-4), 1.253 (3H, *s*, H-14), 0.926 (3H, *d*, J= 7.2, H-15).

EM (int. rel., 70 eV): 299 (24), 283 (4), 267 (8), 255 (11), 241 (22), 131 (33), 113 (65), 91 (23), 85 (27), 81 (20), 45 (100), 43 (66).



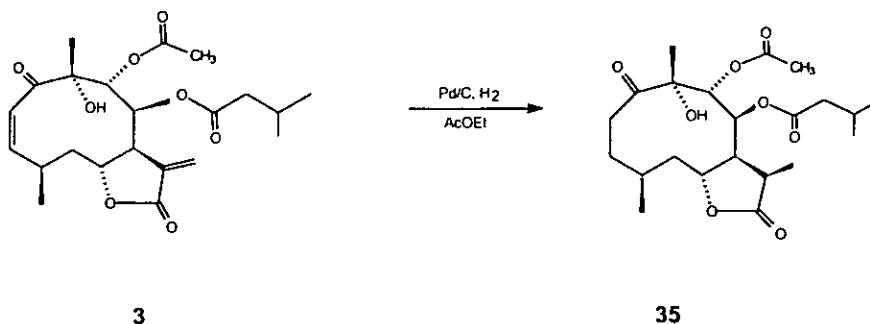
34

Reacción de Reducción Catalítica.

Obtención de (11*R*)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (**35**).

El catalizador Pd/C al 10% (5 mg), fue suspendido en acetato de etilo (10 mL). Esta suspensión se prehidrogena por 1.5 h a temperatura ambiente y con agitación. Al cabo de este tiempo se adiciona **3** (50 mg, 0.118 mmol) disuelto en acetato de etilo (5 mL). Esta mezcla de reacción se mantiene por 2 h, después de este tiempo se logra observar por medio del análisis de CCF la desaparición de materia prima y la aparición de un compuesto que no absorbe luz UV.

La eliminación del catalizador por filtración sobre celita y sílice, y la posterior eliminación del disolvente por concentración a presión reducida permite obtener un compuesto cristalino blanco **35**, que corresponde al (11*R*)-2,3,11,13-tetrahydro-neurolenina B, con un rendimiento del 100%. A continuación en el esquema 8 se muestra el curso de la reacción y los datos espectroscópicos de este compuesto.



Esquema 8. Reacción de reducción catalítica. Obtención de **35**.

Datos físicos y espectroscópicos de **35**.

Pf: 146-149 °C.

UV λ_{Max} : 209.0 nm ($426.075 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

RO: $[\alpha]_{\text{D}}$ +6 (MeOH, 0.002 g/mL)

Rf: 0.6 (hexano-Acetato de etilo 1:1).

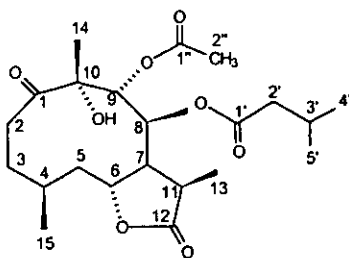
IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$: 2965, 2932, 2876, 1749, 1707 cm⁻¹.

RMN ¹H: (500 MHz, CDCl₃, δ): 5.779 (1H, *d*, J= 9, H-9), 5.480 (1H, *dd*, J= 2, 9, H-8), 4.934 (1H, *dd*, J= 5, 10, H-6), 3.069 (1H, *ddd*, J= 4, 12.5, 18.5, H-2a), 2.699 (1H, *m*, H-11), 2.581 (1H, *dt*, J= 2.5, 18.5, H-2b), 2.180 (1H, *m*, H-3a), 2.116 (3H, *s*, H-2''), 2.047 (1H, *d*, J= 1, H-2'b), 2.040 (1H, *m*, H-7), 2.023 (1H, *m*, H-2'a), 1.865 (1H, *m*, H-4), 1.862 (1H, *m*, H-5a), 1.596 (1H, *t*, J= 11.5, H-5b), 1.401 (1H, *m*, H-3b), 1.215 (3H, *s*, H-14), 1.085 (3H, *d*, J= 7.5, H-13), 1.030 (3H, *d*, J= 6, H-15), 0.918 (3H, *d*, J= 6.5, H-5'), 0.914 (3H, *d*, J= 7, H-4')

RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N, δ): 6.294 (1H, *d*, J= 9.33, H-9), 6.073 (1H, *d*, J= 9.33, H-8), 5.341 (1H, *dd*, J= 6.6, 10.4, H-6), 3.193 (1H, *ddd*, J= 3.7, 12.1, 17.6, H-2a), 2.989 (1H, *quint*, J= 7.4, H-11), 2.692 (1H, *m*, H-3a), 2.630 (1H, *d*, J= 8.5, H-2b), 2.280 (1H, *t*, J= 7.14, H-5b), 2.202 (1H, *d*, J= 3.3, H-2'b), 2.178 (1H, *m*, H-7), 2.134 (3H, *s*, H-2''), 2.066 (1H, *m*, H-2'a), 1.837 (1H, *m*, H-4), 1.734 (1H, *m*, H-5a), 1.410 (3H, *s*, H-14), 1.321 (1H, *m*, H-3b), 1.133 (3H, *d*, J= 7.1, H-13), 0.894 (3H, *d*, J= 1.1, H-5'), 0.872 (3H, *d*, J= 1.1, H-4').

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃, δ): 212 (C-1), 177 (C-12), 171 (C-1''), 170 (C-1'), 80 (C-10), 76.8 (C-6), 75 (C-9), 68.8 (C-8), 42.8 (C-2'), 40.8 (C-5), 39.6 (C-7), 35.2 (C-11), 33.6 (C-2), 30.2 (C-3), 26.7 (C-4), 24.5 (C-14), 23.7 (C-15), 22.5 (C-4'), 22.5 (C-5'), 20.6 (C-2''), 8.6 (C-13).

EM *m/z* (IE 70 eV): 426 [M⁺], 398 [M⁺ - (CO)], 366 [M⁺ (C₂H₃O)], 325 [M⁺ - (C₅H₉O₂)], 282 [- C₂H₃O], 366 [- O₂].

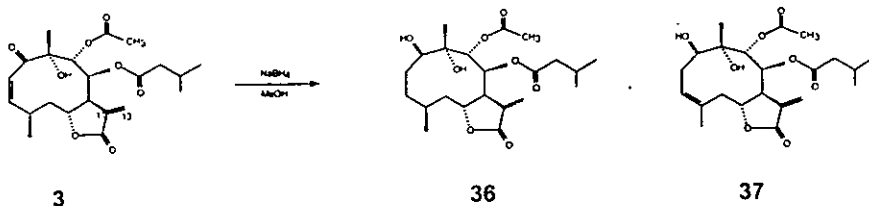


35

Reacciones de Reducción Química

Obtención de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolenina B (36) y O1,1-iso-neurolenina B (37).

Procedimiento A. En un matr az de bola de 25 mL se coloca 3 (25 mg, 0.059 mmol), disuelto en MeOH anhidro (5 mL). A esta disolución se adiciona NaBH₄ (8 mg, 0.211 mmol), y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 20 min, después de los cuales, por seguimiento en CCF, se observa una mancha homogénea de mayor polaridad que la materia prima. Se adiciona agua destilada (10 mL). El crudo de la reacción se extrae varias veces con CH₂Cl₂ y se seca con sulfato de sodio anhidro, el disolvente se elimina por concentración a presión reducida. Finalmente, el producto obtenido (14.6 mg, lo que representa un 58.4% de rendimiento) se aplicó en una placa analitica de 10 x 20 cm y se eluyó en una mezcla de hexano-acetato de etilo 2:3. Una vez que termin  la elución, se sigue el procedimiento usual, obteniéndose así 6 mg de producto (24 %), que es una mezcla de 36 y 37, en proporción 2:1, como un sólido de pf 207-210  C. En el esquema 9 se muestra el curso de la reacción.



Esquema 9. Reacción de reducción química de Neurolenina B. Obtención de 36 y 37.

36 y 37

Rf: 2.6 (CH₂Cl₂-MeOH, 95:5)

pf: 207-210 °C.

IR CHCl₃ ν_{max} : 3564, 2965, 2929, 2874, 1751 cm⁻¹.

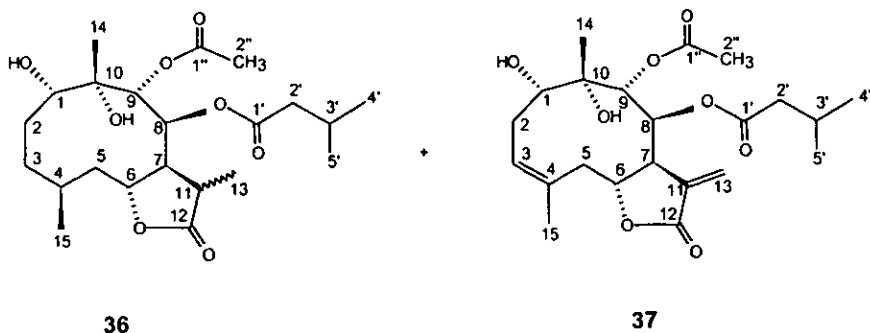
EM (int. rel., 70 eV): 427 (14), 323 (8), 382 (58), 280 (36), 239 (30), 197 (43), 137 (20), 125 (11), 95 (32), 85 (100), 57 (75), 43 (82), 41 (25).

(36)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 5.397 (2H, s, H-8 y H-9), 4.659 (1H, *dd*, J=6, 11.4, H-6), 4.200 (1H, s, OH), 3.600 (1H, s, OH), 3.230 (1H, s, OH), 2.827 (1H, *m*, H-11), 2.034 (3H, s, H-2''), 1.286 (3H, s, H-14), 1.094 (3H, *d*, J= 7.2, H-13), 1.032 (3H, *d*, J= 6.3, H-15), 0.922 (6H, *d*, J= 6.6, H-4' y H-5').

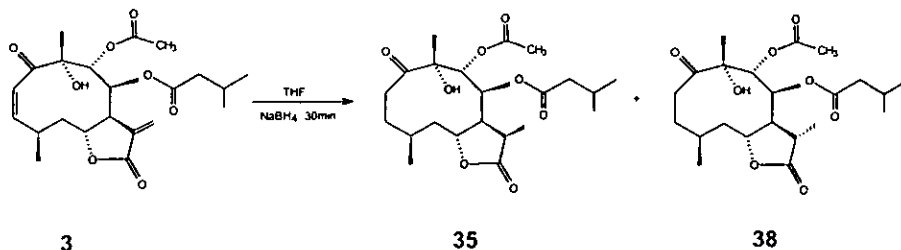
(37):

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 6.233 (1H, *d*, J= 2, H-13a), 5.990 (1H, *dd*, J= 3.6, 6.9, H-3), 5.814 (1H, *d*, J= 2, H-13b), 5.397 (2H, s, H-8 y H-9), 4.497 (1H, *dd*, J= 1.5, 2.4, 4.5, H-6), 4.285 (1H, *d*, J= 8.7, H-1), 4.200 (1H, s, OH), 3.600 (1H, s, OH), 3.230 (1H, s, OH), 2.175 (1H, s, H-7), 2.106 (3H, s, H-15), 2.034 (3H, s, H-2''), 1.234 (3H, s, H-14), 0.922 (6H, *d*, J= 6.6, H-4' y H-5').



Obtención de (11*R*) y (11*S*)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (**35** y **38**).

Procedimiento B. En un matraz de bola de 25 mL se coloca **3** (50 mg, 0.118 mmol), disuelto en THF (5 mL), posteriormente se adiciona NaBH₄ (8 mg, 0.211 mmol). Esta mezcla de reacción se deja en agitación a temperatura ambiente durante 30 min, después de los cuales se observa por análisis en CCF el consumo de materia prima y la aparición de 2 manchas principales que no absorben luz UV. En este momento la reacción se detiene con la adición de agua destilada (10 mL), y el crudo de la reacción se extrae varias veces con CH₂Cl₂. El disolvente es eliminado por concentración a presión reducida, obteniéndose 48 mg de residuo (lo que representa el 96 % de rendimiento). El residuo fue purificado mediante CCF, aplicándolo en una cromatoplaaca analítica en proporción 99:1. Después de la elución, se procedió a raspar la cromatoplaaca en donde se ven las dos manchas principales y se extraen los raspados varias veces con mezclas de CH₂Cl₂-acetona, obteniéndose (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (**35**, 11 mg, 22 %) y (11*S*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (**38**, 2.5 mg, 5 %). A continuación en el esquema 10 se muestran los productos obtenidos en ésta reacción.



Esquema 10. Reacción de reducción química de Neurolenina B. Obtención de **35** y **38**.

Como se ve en el esquema 10, el derivado (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (35) en esta reacción es el mismo que se obtiene como producto único al realizar la reacción de reducción catalítica.

Datos físicos y espectroscópicos de (11*S*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (38).

Pf: 131-133 °C.

Rf: 0.63 (hexano-acetato de etilo 5:5)

IR: 3467, 3040, 2962, 2933, 1768, 1746, 1708 cm^{-1} .

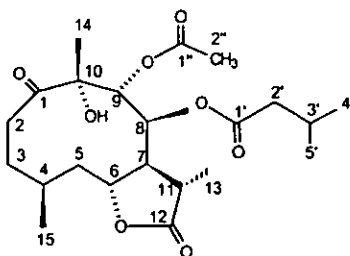
RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3 , δ): 5.718 (1H, *d*, $J=10$, H-9), 5.613 (1H, *d*, $J=10.5$, H-8), 4.583 (1H, *dd*, $J=2, 5$, H-6), 3.192 (1H, *ddd*, $J=5, 12.5, 17.5$, H-2a), 2.449 (1H, *dq*, $J=2.5, 5.5, 17.5$, H-2b), 2.251 (1H, *m*, H-4), 2.195 (1H, *d*, $J=7$, H-2'a), 2.160 (1H, *m*, H-2'b), 2.158 (1H, *s*, H-3a), 2.133 (3H, *s*, H-2''), 2.059 (1H, *m*, H-11), 1.875 (1H, *m*, H-5a), 1.670 (1H, *m*, H-5b), 1.629 (1H, *m*, H-7), 1.387 (1H, *m*, H-3b), 1.260 (3H, *d*, $J=7$, H-15), 1.236 (3H, *s*, H-14), 1.055 (3H, *d*, $J=6.5$, H-13), 0.956 (3H, *d*, $J=4.5$, H-4'), 0.943 (3H, *d*, $J=4$, H-5').

RMN ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, δ): 6.211 (1H, *d*, $J=10.17$, H-9), 6.124 (1H, *d*, $J=10.17$, H-8), 3.123 (1H, *ddd*, $J=3.8, 11, 17.6$, H-2a), 2.681 (1H, *m*, H-2b), 2.540 (1H, *m*, H-2b), 2.377 (1H, *d*, $J=3.3$, H-2'a), 2.281 (1H, *s*, H-3a), 2.277 (1H, *m*, H-2'b), 2.165 (3H, *s*, H-2''), 2.014 (1H, *m*, H-5a), 1.425 (3H, *s*, H-14), 1.369 (3H, *d*, $J=6.9$, H-15), 0.956 (3H, *d*, $J=6.06$, H-13), 0.906 (3H, *d*, $J=6.3$, H-4'), 0.873 (3H, *d*, $J=6.9$, H-5').

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , δ): 212.7 (C-1), 176.8 (C-12), 171.8 (C-1''), 170.3 (C-1'), 80.6 (C-10), 77 (C-6), 73.5 (C-9), 68.8 (C-8), 44.8 (C-7), 42.9 (C-2'), 38.8 (C-4), 33.6 (C-5), 32.6 (C-2), 30.6 (C-3), 25.3 (C-11), 24.5 (C-13), 23.6 (C-3'), 23.3 (C-14), 22.4, (C-4' y C-5'), 20.4 (C-2''), 12.8 (C-15).

EM m/z (IE, 70 ev): 426 [M^+], 341 [$\text{M}^+ - (\text{C}_5\text{H}_9\text{O})$], 398 [$\text{M}^+ - (\text{CO})$], 325 [$\text{M}^+ - (\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2)$], 341

$[-C_2H_3O]$, 325 $[-C_2H_3O_2]$.



38

Intento de la Reacción de Epoxidación.

En un matr az de bola de 25 mL se coloca **3** (50 mg, 0.118 mmol), posteriormente se adiciona AMCPB (20 mg, 0.115 mmol), y ambos se disuelven en CH_2Cl_2 . Esta mezcla de reacción se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min y se deja en agitación, a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido este tiempo, el crudo de la reacción fue lavado con una solución saturada de sulfito de sodio, luego se procedió a lavar con una solución saturada de bicarbonato de sodio, y finalmente con agua. El producto es secado con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se elimina por concentración a presión reducida. El análisis por CCF mostró que la materia prima no reaccionó.

Intento de la Reacción de Hidrólisis  cida.

Se prepara una disolución de **3** (25 mg, 0.059 mmol) en acetona (20 mL). Ésta se desoxigena con burbujeo de gas inerte (He_2) durante 5 min. En estas condiciones se adiciona $HClO_4$ (0.3 mL), y la mezcla de reacción se deja en agitación, a temperatura ambiente y en atmósfera inerte durante 40 min. En ese momento adquiere una coloración amarillenta. El análisis por CCF de ésta reacción permite ver la aparición de una mancha de menor polaridad que la materia prima. La reacción se detiene neutralizando con una

38

solución de K_2CO_3 20% (0.001 M). El crudo de la reacción se extrajo varias veces con $CHCl_3$, las fases orgánicas se reunieron, se secaron con Na_2SO_4 anhidro, y se concentró a presión reducida. El análisis por CCF permite observar que se forma un derivado de menor polaridad que la materia prima, este producto (23 mg) se aplicó en una cromatoplaça de 20 x 20 cm, misma que fue eluída en una mezcla de hexano-acetato de etilo a una polaridad 1:1. El procedimiento usual de extracción del producto permitió la obtención de un sólido que resultó idéntico a la materia prima, de acuerdo al análisis químico convencional.

ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Bioensayo de letalidad frente a Artemia salina.

El bioensayo de toxicidad frente a *Artemia salina* representa una alternativa para la detección de compuestos con posible actividad biológica y proveen información preliminar para realizar pruebas posteriores. Es muy utilizado para realizar fraccionamientos dirigidos de extractos crudos, debido a que la técnica que se emplea es sencilla y produce resultados rápidos y reproducibles. Si bien no se ha logrado comprobar que la toxicidad para *A. salina* correlacione directamente con actividad citotóxica o antimicrobiana, un resultado positivo puede ser indicativo de estas propiedades [32, 33].

MATERIAL.

- Huevecillos de *A. salina*.
- Sal de mar.
- Estufa.
- Lámpara.
- Jeringas de 5 μL , 10 μL y 100 μL .
- Viales limpios.

PROCEDIMIENTO.

Se preparan 250 mL de agua de mar de acuerdo a las instrucciones de la caja (aproximadamente 38 g para 1 L). Esta solución se calienta en la estufa hasta que alcance una temperatura de 28 °C, en estas condiciones se colocan los huevecillos de *A. salina* y se dejan incubar a esa temperatura por 48 h para permitir la maduración de los huevecillos.

Respecto a la preparación de las muestras, los viales para el análisis de cada compuesto deben estar limpios, se preparan 12 viales por cada compuesto, tres para cada concentración y tres para los controles.

Se pesan 20 mg de muestra y se disuelven en 2 mL de disolvente (generalmente acetona). De esta solución se toman tres muestras de 500 μL , tres muestras de 50 μL y tres muestras de 5 μL , se colocan en los viales y se etiquetan correctamente, a la par se preparan tres viales que servirán como blanco, mismos que contendrán el disolvente en el

que se disolvió la muestra.

Se deja que el disolvente se evapore por 48 h, una vez transcurrido este tiempo, las artemias ya han nacido, entonces se colocan 5 mL de agua de mar en cada uno de los viales. Posteriormente se colocan cuidadosamente con una pipeta pasteur 10 artemias en cada vial y se dejan ahí por 24 h.

A las 24 h transcurridas, se procede a leer la prueba, esto es, se cuenta el número de artemias vivas en cada vial. Los datos obtenidos se analizan en el programa Finney de cómputo para determinar el valor de concentración letal media (CL₅₀).

RESULTADOS.

Compuesto	CL ₅₀ (µg/mL)
Neurolenina B (3)	>1000
(11R)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (35)	>1000

Tabla 9. Resultados del bioensayo de letalidad frente a *A. salina*.

Bioensayo de actividad antiinflamatoria.

El proceso inflamatorio incluye una serie de fenómenos que pueden ser desencadenados por diversos estímulos (agentes infecciosos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo y lesiones térmicas o físicas). A nivel macroscópico, la respuesta por lo común se acompaña de los conocidos signos clínicos como eritema, edema, calor y dolor.

La habilidad para desencadenar una respuesta de esta índole es esencial para la supervivencia, dados los innumerables agentes patológicos y lesivos ambientales existentes, aunque en algunas ocasiones puede transformarse en un proceso perjudicial [34].

La evaluación de fármacos con actividad antiinflamatoria se lleva a cabo por diferentes métodos, siendo la prueba de la Carragenina en las patas traseras de rata y el edema inducido por el TPA los más usados por ser confiables y reproducibles, además de que no se requiere mucho material [35, 36].

La evaluación antiinflamatoria de los compuestos se llevó a cabo mediante el ensayo de TPA.

El ensayo de TPA consiste en tratar una oreja con este agente flogístico y después probar la actividad antiinflamatoria de la sustancia, ésta se determina comparando el peso

de la oreja tratada con la no tratada.

Este ensayo involucra

1. Dependencia de la liberación de ácido araquidónico y metabolitos.
2. Interacción con un sitio receptor en la proteína cinasa C.
3. Un incremento en la enzima biosintética poliamina ODC (Ornitina descarboxilasa).

MATERIAL.

- Ratas macho de 25-30 g.
- Microjeringas.
- Balanza analítica.
- Anestésico Imalgen.
- TPA.
- Indometacina.
- Sacabocado

PROCEDIMIENTO

Se utilizan tres ratas macho por cada compuesto, los ratones se anestesian con imalgen. Con una microjeringa se aplican 2.5 µg de TPA disueltos en 10 µL de etanol en la superficie interna y externa de la oreja derecha. La oreja izquierda se toma como control y se aplican 10 µL de etanol.

Después de 10 minutos del tratamiento con TPA se aplica tópicamente una solución de 0.5 mg del compuesto a evaluar en 20 mL de acetona. En la oreja izquierda se aplican 20 mL de acetona.

De manera conjunta se maneja un grupo testigo, en el cual se aplica en la oreja izquierda Indometacina, cabe señalar que éste es el fármaco de referencia.

Después de 4 h se procede a sacrificar a los animales por dislocación cervical. Utilizando un sacabocado se toma una porción central de ambas orejas (aproximadamente 9 mm de diámetro). Estos fragmentos se pesan y por diferencia de peso se calcula la respuesta antiedematosa. El porcentaje de inhibición de la inflamación se calcula mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición} = [(\text{edema A} - \text{edema B}) / \text{edema A}] \times 100$$

En donde

Edema (mg) = peso de la oreja tratada con TPA - peso de la oreja sin tratar.

Edema A = edema del grupo control.

Edema B = edema del grupo tratado con el compuesto a evaluar.

RESULTADOS.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiinflamatoria de Neurolenina B y de (11*R*)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B.

Compuesto	% Inhibición del edema
(11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (35)	12.56
Neurolenina B (3)	9.02

Tabla 10. Resultados de actividad antiinflamatoria.

Bioensayo de la actividad citotóxica.

Se ensayaron los compuestos: neurolenina B (3) y (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (35) en cinco líneas celulares: tumor cérvico-uterino (HeLa), cáncer epitelial nasofaríngeo (HEp-2), cáncer de próstata (PC-3), cáncer del sistema nervioso central (U251) y células de leucemia (K562).

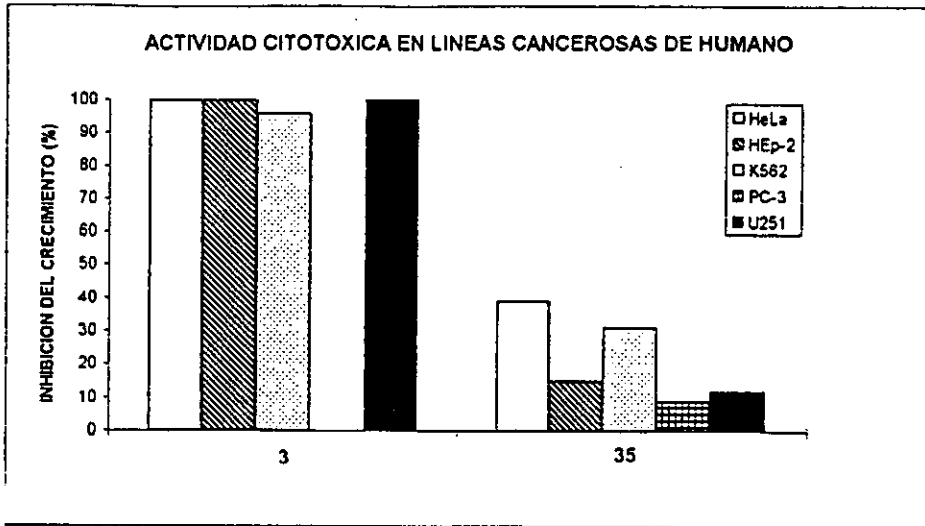
La evaluación de la actividad citotóxica se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de la sulforrodamida [37]. A continuación se muestran los resultados de los compuestos ensayados.

Compuesto	% De inhibición del crecimiento en				
	HeLa	HEp-2	K562	PC-3	U251
Neurolenina B (3)	100	100	96	0	100
(11 <i>R</i>)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (35)	39	15	31	9	12

Cuadro 2. Resultados del bioensayo de toxicidad frente a cinco líneas celulares cancerígenas.

A continuación se muestra una gráfica de la actividad citotóxica presentada por neurolenina B (3) y (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (38).

Clave	Línea celular
HeLa	Tumor cérvico-uterino
HEp-2	Cáncer epitelial
K562	Células de leucemia
PC-3	Cáncer de próstata
U251	Cáncer de sistema nervioso central



Grafica 1. Resultados de actividad citotóxica en líneas cancerosas de humano.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El análisis químico de los extractos hexánico y de diclorometano de *Neurolaena lobata*, permitió el aislamiento y la caracterización de varias lactonas sesquiterpénicas, β -sitosterol, estigmasterol, así como de ácidos carboxílicos, ésteres lipídicos y ácidos grasos. La elucidación de la estructura molecular se logró por medio de los análisis espectroscópicos convencionales.

A continuación se presenta la discusión de la determinación estructural de los metabolitos secundarios característicos aislados, así como de los derivados químicos obtenidos.

Neurolenina B.

De las fracciones Khv y Lhv del extracto hexánico y de la fracción Ndm del extracto de diclorometano, se aisló un sólido blanco cristalino.

A continuación se describen las principales señales de RMN ^1H (espectro 1) que presenta la neurolenina B. Se observan dos dobletes característicos de hidrógenos vinílicos conjugados con γ -lactona en δ_{H} 6.320 y δ 5.815; un tercer doblete en δ_{H} 6.593 integra para un hidrógeno y corresponde a H-2; un triplete en δ_{H} 6.008 integra para un hidrógeno y corresponde a H-3, un singulete en δ_{H} 5.560 integra para dos hidrógenos, y es el centro de un sistema AB, esta señal corresponde a los hidrógenos H-9 y H-8, un primer doble de doble en δ_{H} 4.550 integra para un hidrógeno y corresponde a H-6, un singulete en δ_{H} 4.095 corresponde al protón hidroxílico. En δ_{H} 3.110 existe un multiplete, el cual integra para un hidrógeno y corresponde a H-4, un sistema A_3 se presenta en δ_{H} 2.100 y corresponde al metilo de acetato, un segundo sistema A_3 se presenta en δ_{H} 1.330 y corresponde a un metilo, tres dobletes en δ_{H} 1.135, δ_{H} 0.870 y δ_{H} 0.870 corresponden también a hidrógenos metílicos que son H-15, H-4' y H-5' respectivamente.

El análisis de los espectros de RMN ^1H modalidad COSY, permitió la asignación de todos los hidrógenos presentes en este compuesto. De igual forma, por medio del análisis

de RMN multidimensional, en la modalidad HMQC fue posible asignar las señales correspondientes a los carbonos protonados, los carbonos cuaternarios se asignaron por medio del experimento HMBC.

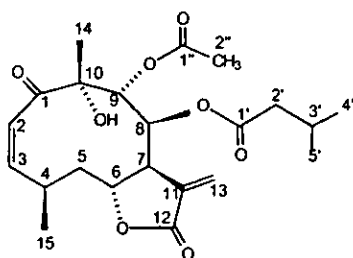
Estos valores experimentales fueron comparados con los informados en la literatura. De esta forma pudo ser posible la identificación de este compuesto como Neurolenina B (3).

En la tabla 11 se muestra datos de los desplazamientos, multiplicidad y constantes de acoplamiento obtenidos experimentalmente en comparación con los informados en la literatura [4].

H	Datos experimentales			Datos informados en la literatura		
	δ	m	J	δ	m	J
2	6.593	<i>d</i>	12.5	6.59	<i>d</i>	11.8
3	6.008	<i>t</i>	12	6.00	<i>t</i>	11.8
4	3.110	<i>m</i>	-	3.11	<i>m</i>	-
5a	1.830	<i>ddd</i>	5, 13, 13.5	1.83	<i>ddd</i>	4.8, 12, 13.7
5b	1.427	<i>ddd</i>	5.5, 13, 13.5	1.42	<i>ddd</i>	5.4, 12.1, 13.7
6	4.550	<i>dd</i>	5, 12	4.56	<i>dd</i>	4.8, 12.1
7	2.590	<i>s</i>	-	2.58	<i>s</i>	-
8	5.560	<i>s</i>	-	5.55	<i>d*</i>	10
9	5.560	<i>s</i>	-	5.55	<i>d*</i>	10
13a	6.320	<i>d</i>	1.5	6.31	<i>s</i>	-
13b	5.815	<i>d</i>	1.5	5.81	<i>s</i>	-
14	1.330	<i>s</i>	-	1.33	<i>s</i>	-
15	1.135	<i>d</i>	6.5	1.14	<i>d</i>	6.28
2'a	2.090	<i>s</i>	-	2.09	-	-
2'b	1.960	<i>m</i>	-	1.96	<i>m</i>	-
3'	1.950	<i>m</i>	-	1.95	<i>m</i>	-
4'	0.87	<i>d</i>	6.5	0.87	<i>d</i>	6
5'	0.87	<i>d</i>	6.5	0.87	<i>d</i>	6
2''	2.10	<i>s</i>	-	2.10	<i>s</i>	-

* centro de un sistema AB.

Tabla 11. Tabla comparativa de los valores espectroscópicos de Neurolenina B (3) obtenidos experimentalmente con los informados en la literatura [4].



Neurolenina B (3)

Neurolenina C.

De la fracción $\tilde{N}dm$ del extracto de diclorometano se aisló un sólido amarillento, y mediante cristalizaciones sucesivas, se obtuvieron cristales blancos

A continuación se mencionan las principales señales presentadas por este compuesto en el espectro de RMN 1H (espectro 2)

En δ_H 6.316 y δ_H 5.704 se observan los dobletes característicos de hidrógenos vinílicos conjugados con γ -lactona. Se observa un sistema ABX en donde en δ_H 6.598 resuena un hidrógeno vinílico (H-2) acoplado a una señal en δ_H 5.986 (H-3), y la cual a su vez interactúa con H-4, que resuena en δ_H 3.089. Un doblete en δ_H 5.470 corresponde a un hidrógeno geminal al oxígeno etéreo de un éster (H-9); un doble de doble en δ_H 4.487 integra para un hidrógeno, correspondiente a H-6. En δ_H 4.060 se encuentra un triplete que integra para un hidrógeno, correspondiente a H-8. Finalmente, un doble de doble en δ_H 2.333 integra para dos hidrógenos de metileno, un sistema A_3 el cual se presenta como singulete en δ_H 1.328 que corresponde a un metilo, y dos dobletes (en δ_H 1.129 y δ_H 0.984) que corresponden también a metilos.

Por medio del análisis de RMN modalidades COSY, HMQC y HMBC fue posible asignar los hidrógenos, carbonos protonados y carbonos cuaternarios de este compuesto.

Las asignaciones obtenidas experimentalmente fueron comparados con las

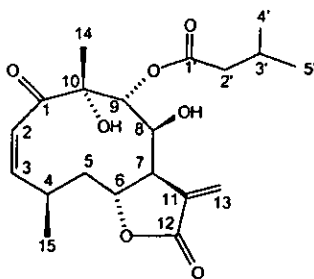
asignaciones informadas en la literatura, identificando a este compuesto como Neurolenina C (4).

A continuación se presenta una tabla comparativa en la que se presentan los datos de desplazamiento, multiplicidad y constantes de acoplamiento de Neurolenina C obtenidos experimentalmente y los datos informados en la literatura [4].

H	Datos experimentales			Datos informados en la literatura		
	δ	<i>m</i>	J	δ	<i>m</i>	J
2	6.590	<i>d</i>	12	6.52	<i>d</i>	11.8
3	5.986	<i>t</i>	11.5	5.92	<i>t</i>	11.5
4	3.089	<i>m</i>	-	3.02	<i>m</i>	-
5a	1.838	<i>ddd</i>	5, 13, 13	1.77	<i>ddd</i>	4.9, 12, 13.5
5b	1.439	<i>ddd</i>	6, 13, 13	1.37	<i>ddd</i>	5.4, 11.8, 13.5
6	4.487	<i>dd</i>	5.5, 11.5	4.42	<i>dd</i>	4.9, 11.8
7	2.498	<i>s</i>	-	2.43	<i>d</i>	0.98
8	4.060	<i>t</i>	6.5	3.99	<i>dd</i>	9.4
9	5.470	<i>d</i>	9.5	5.40	<i>d</i>	9.4
13a	6.316	<i>d</i>	1.5	6.25	<i>s</i>	-
13b	5.704	<i>d</i>	1.5	5.64	<i>d</i>	0.98
14	1.328	<i>s</i>	-	1.26	<i>s</i>	-
15	1.129	<i>d</i>	6.5	1.06	<i>d</i>	*
2'a	2.333	<i>dd</i>	1.5, 2, 7	2.26	<i>m</i>	-
2'b	2.333	<i>dd</i>	1.5, 2, 7	2.26	<i>m</i>	-
3'	2.143	<i>m</i>	-	2.05	<i>m</i>	-
4'	0.984	<i>dd</i>	2, 6, 7.5	0.92	<i>d</i>	6.8
5'	0.984	<i>dd</i>	2, 6, 7.5	0.92	<i>d</i>	6.8

* dato no informado.

Tabla 12. Tabla comparativa de los valores espectroscópicos de Neurolenina C (4) y los valores informados en la literatura [4].



Neurolenina C (4)

Neurolenina D.

De la fracción \bar{N} dm del extracto de diclorometano fue aislado un sólido verdoso, el cual se purificó por recristalizaciones sucesivas, obteniéndose esta sustancia como cristales blancos finos.

De acuerdo al análisis del espectro de RMN ^1H de este compuesto (espectro 3) se observan dos dobletes característicos de hidrógenos vinílicos conjugados con la γ -lactona, α , β -insaturada (δ_{H} 6.280 y δ_{H} 5.757); en δ_{H} 6.509 se manifiesta un doblete que se asigna a un hidrógeno vinílico (H-2), un triplete en δ_{H} 5.993, el cual se asigna a H-3; un doble de doble en δ_{H} 5.303, el cual integra para un hidrógeno, corresponde a H-8, el cual es geminal al oxígeno etéreo de un éster y vecino a hidroxilo. En δ_{H} 4.446 hay otro doble de doble correspondiente a H-6. En δ_{H} 3.896 se observa un triplete correspondiente a H-9, el cual esta geminal a hidroxilo. Se presenta un sistema A_3 en δ_{H} 1.519, este singulete corresponde a H-14. Tres dobletes en δ_{H} 1.126, δ_{H} 0.913 y δ_{H} 0.913 corresponden a H-15, H-4' y H-5', respectivamente.

La asignación de los hidrógenos fue posible mediante el análisis de los espectros de RMN ^1H modalidad COSY. De igual forma, la asignación de los carbonos protonados se realizó por medio del análisis de los espectros de RMN modalidad HMQC, y los carbonos cuaternarios se asignaron empleando los espectros de RMN modalidades HMBC y DEPT.

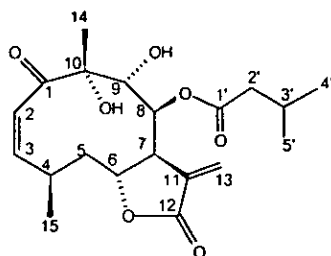
La comparación de los análisis espectroscópicos obtenidos experimentalmente, con

los reportados en la literatura, hizo posible la identificación de este compuesto como Neurolenina D.

En la siguiente tabla se muestran los análisis espectroscópicos experimentales de RMN ^1H de Neurolenina D y los datos informados en la literatura [4].

Datos experimentales				Datos informados en la literatura		
H	δ	<i>m</i>	J	δ	<i>m</i>	J
2	6.509	<i>d</i>	12	6.44	<i>d</i>	11.9
3	5.993	<i>t</i>	11.5	5.87	<i>t</i>	11.8
4	3.174	<i>m</i>	-	3.11	<i>m</i>	-
5a	1.799	<i>ddd</i>	5.5, 12.5, 13	1.73	<i>ddd</i>	4.9, 11.9, 13.3
5b	1.421	<i>ddd</i>	5.5, 12.5, 13	1.34	<i>ddd</i>	5.4, 11.8, 13.3
6	4.446	<i>dd</i>	5.5, 11.5	4.38	<i>dd</i>	4.9, 11.8
7	2.621	<i>s</i>	-	2.56	<i>d</i>	1.6
8	5.303	<i>dd</i>	2.5, 9	5.24	<i>dd</i>	1.6, 9.5
9	3.896	<i>t</i>	10	3.82	<i>d</i>	9.5
13a	6.280	<i>d</i>	1.25	6.21	<i>s</i>	-
13b	5.757	<i>d</i>	1.5	5.69	<i>d</i>	0.98
14	1.519	<i>s</i>	-	1.45	<i>s</i>	-
15	1.126	<i>d</i>	6.5	1.06	<i>d</i>	6.3
2'a	2.146	<i>m</i>	-	2.07	<i>m</i>	-
2'b	2.146	<i>m</i>	-	2.07	<i>m</i>	-
3'	2.041	<i>m</i>	-	1.98	<i>m</i>	-
4'	0.913	<i>d</i>	6.5	0.85	<i>d</i>	6.5
5'	0.913	<i>d</i>	6.5	0.85	<i>d</i>	6.5

Tabla 13. Tabla comparativa de los valores espectroscópicos de Neurolenina D y los valores informados en la literatura [4].



Neurolenina D (5)

Discusión de resultados de las reacciones químicas.

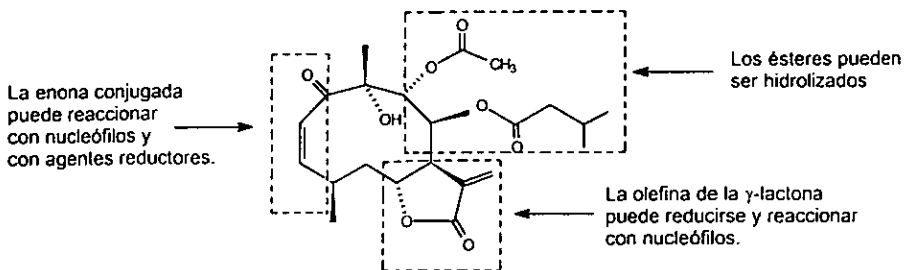
Se conocen las estructuras moleculares de numerosos productos naturales, las cuales se determinan por métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiro-ópticos y cristalográficos. Sin embargo, poco se conoce de la reactividad química de los mismos, debido, al menos en parte, a los bajos rendimientos con que se obtienen a partir de las fuentes naturales.

Con el objetivo de explorar la reactividad química de la neurolenina B en diferentes medios de reacción, se procedió a la obtención de algunos derivados. Por otro lado, una justificación adicional para derivatizar la neurolenina B, consiste en la posibilidad de que los productos de reacción resulten sustancias con mejor bioactividad.

El análisis estructural de la neurolenina B (3) indica varias funcionalidades presentes (éster, lactona, olefina, cetona, alcohol), las cuales pueden agruparse colectivamente en

- a) la γ -lactona α , β -insaturada
- b) los ésteres en C(8) y C(9) y
- c) la enona conjugada.

Así, la lactona podría reaccionar en condiciones de adición nucleófila o en condiciones de reducción. Los ésteres podrían hidrolizarse en condiciones ácidas o alcalinas, y la enona conjugada podría ser susceptible a reducirse selectivamente, o a aceptar nucleófilos. Esto se muestra en el esquema 11.

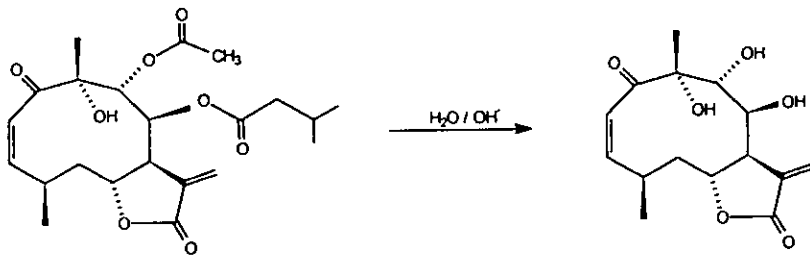


Esquema 11. Partes estructurales de neurolenina B (3).

A continuación se presentan y discuten las reacciones químicas efectuadas sobre neurolenina B.

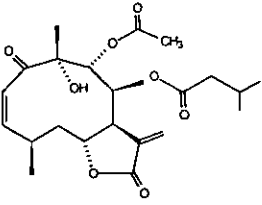
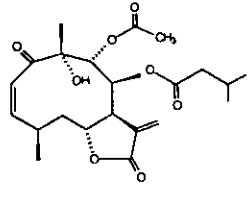
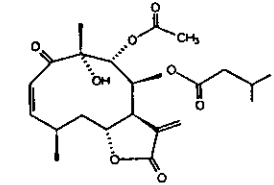
Reacciones de hidrólisis básica.

Las reacciones de hidrólisis en medio básico de los ésteres de lactonas sesquiterpénicas están bien documentadas en la literatura [6, 38, 39]. Generalmente los rendimientos son moderados y las condiciones de reacción deben ajustarse mediante experimentación exhaustiva, debido a la variabilidad de los resultados. La hidrólisis alcalina de la neurolenina B generaría, presumiblemente, el diol correspondiente, como se ilustra en el esquema 12.



Esquema 12. Presumible reacción de hidrólisis alcalina de neurolenina B (3).

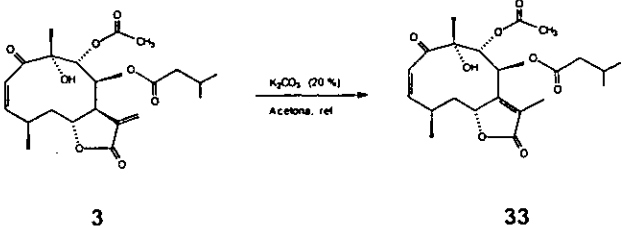
Se efectuaron varios ensayos de hidrólisis básica sobre neurolenina B, los cuales se reseñan y se muestran esquemáticamente en los cuadros 3-5.

Ensayo	Reacción
1	 $\xrightarrow[\text{MeOH, T amb.}]{\text{K}_2\text{CO}_3 (90 \text{ mg/6 mL})}$ No reaccionó
2	 $\xrightarrow[\text{MeOH, Ref}]{\text{K}_2\text{CO}_3 (90 \text{ mg/6 mL})}$ Varios derivados inseparables y descomposición de la materia prima
3	 $\xrightarrow[\text{THF, T amb}]{\text{K}_2\text{CO}_3 (90 \text{ mg/6 mL})}$ No reaccionó

Cuadro 3. Intentos de hidrólisis básica realizados sobre neurolepenina B

De acuerdo a los resultados mostrados en el cuadro 3, se observa que la reacción no procede utilizando como base K_2CO_3 . Aún variando condiciones tales como disolvente y temperatura, no se obtuvo el derivado de hidrólisis. Es evidente que la neurolepenina B es estable bajo los tratamientos 1 y 3. La elevación de la temperatura tampoco conduce a la obtención del derivado esperado.

Por lo anterior, se decidió variar factores tales como el disolvente y el tipo de base. A continuación de muestran las reacciones efectuadas.

Ensayo	Reacción
4	 <p style="text-align: center;"> <chem>CC(C)CC(=O)OC1C(O)C(=O)C2C(C)C=C(C)C2O1C(=O)C</chem> $\xrightarrow[\text{Acetona, ref}]{\text{K}_2\text{CO}_3 (20\%)}$ <chem>CC(C)CC(=O)OC1C(O)C(=O)C2C(C)C=C(C)C2O1C(=O)C</chem> </p> <p style="text-align: center;"> 3 33 </p>

Cuadro 4. Reacción de hidrólisis básica sobre neurolenina B.

De acuerdo a lo que se presenta en el cuadro anterior, al hacer reaccionar la neurolenina B con K_2CO_3 al 20%, utilizando como disolvente acetona y en condiciones de reflujo, se forma un isómero de neurolenina B (**33**), en el que el doble enlace exocíclico de la γ -lactona se ha transpuesto para estar endocíclico en las posiciones 7-11.

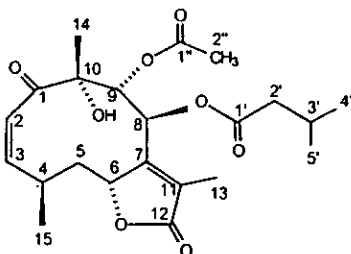
Isoneurolenina B (**33**).

El espectro de IR (espectro 4) muestra dos bandas en $\nu_{\text{máx}}$ 2928 y 2854 cm^{-1} , mismas que corresponden a enlaces carbono-hidrógeno alifáticos, y una banda ancha en 1749 cm^{-1} sugiere la presencia de varios grupos carbonilo.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 8) muestra un ion molecular en m/z de 422, que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_8$. A partir de este ion se observa la pérdida de 87 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{O}^+]$. También se observa la pérdida de 47 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+]$.

El espectro de RMN ^1H (espectro 5) muestra una gran similitud con el espectro de RMN ^1H que presenta la neurolenina B (espectro 1). A diferencia del espectro de RMN ^1H que presenta la neurolenina B, en este espectro no se observan los dos dobletes característicos de los hidrógenos vinílicos conjugados con γ -lactona, y desaparece la señal simple de los hidrógenos 8 y 9, y en su lugar, se observan dos dobletes para cada

hidrógeno. En δ_H 5.593 se observa el primer doblete que corresponde a H-9, y en δ_H 5.487 se encuentra el segundo doblete, que se asigna a H-8. También aparece un singulete en δ_H 2.174 correspondiente a los hidrógenos del metilo vinílico (H-13).



33

Ensayo	Reacción
5	<p>The reaction shows the conversion of neuroelenina B (3) to a diester (34). The reagents are KOH in MeOH at room temperature. The product 34 has methyl ester groups at C-3 and C-13, and hydroxyl groups at C-8 and C-9.</p>

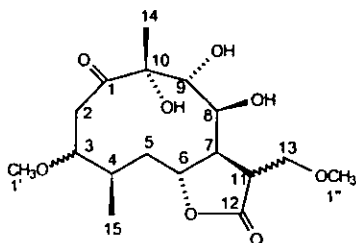
Cuadro 5. Reacción de hidrólisis básica sobre neuroelenina B.

De acuerdo al cuadro 5, el tratamiento con KOH/MeOH de la neuroelenina B, forma un derivado diéster metílico en las posiciones 3 y 13. Es manifiesto que en estas condiciones fue posible hidrolizar los ésteres de neuroelenina B, obteniendo así el derivado 34. Es interesante notar que adicionalmente a la hidrólisis de los ésteres en C-8 y C-9, la materia prima sufrió reacción de adición de Michael de metanol en las enonas. Esta transformación está informada en la literatura [40] En este caso, se indica la orientación preferente de los centros quirales formados (3*S*, 11*R*), dadas las condiciones de equilibración en que se lleva a cabo la reacción.

Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahidro-3,13 dimetoxi-neurolenina B (34).

El espectro de IR de este compuesto (espectro 9) muestra bandas en 3041, 2929 y 2854 cm^{-1} , las cuales se asignan a enlaces carbono hidrógeno alifáticos; en 1776 cm^{-1} se observa una banda que indica la presencia de un grupo carbonilo de éster y finalmente en 1726 cm^{-1} se observa una banda correspondiente a un carbonilo de cetona.

En comparación con el espectro de RMN ^1H de neurolenina B (espectro 1), el espectro de RMN ^1H de este compuesto (espectro 10) no muestra los dobletes característicos de los hidrógenos vinílicos conjugados con γ -lactona α , β -insaturada, en lugar de estas señales se observan dos dobles de dobles en δ_{H} 3.709 y 3.548, que corresponden a los hidrógenos metilénicos de H-13a y H-13b respectivamente, también se observan dos singuletes en δ_{H} 3.362 y 3.116 que corresponden a metilos de grupo metoxilo.



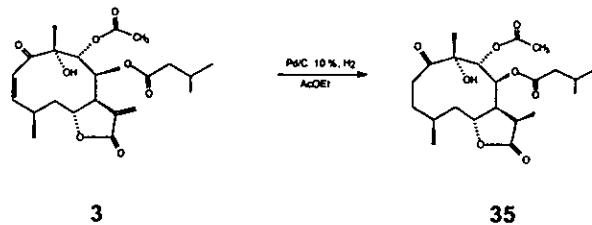
34

Debido a que las condiciones ensayadas no resultaron apropiadas para la obtención eficiente de un derivado homogéneo, y dado el consumo ostensible de materia prima, se optó por ensayar otras reacciones.

Reacciones de reducción.

Con el objetivo general de saturar selectivamente los enlaces múltiples presentes en neurolenina B (3), se ensayaron distintas condiciones de reducción, en las que se

pretendía reducir el grupo carbonilo de la posición 1 a alcohol y los dos dobles enlaces presentes en la molécula. A continuación se muestran los ensayos realizados.

Ensayo	Reacción
1	

Cuadro 6. Reacción de reducción catalítica sobre neurolepin B.

En la reacción de reducción catalítica sobre neurolepin B en las condiciones descritas, se obtiene el derivado (11*R*)-2,3,11,13 tetrahidro-neurolepin B (35). Esta reacción resultó muy eficiente, ya que se obtiene un solo producto con un rendimiento cuantitativo.

(11*R*)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolepin B (35).

El espectro de IR (espectro 12), muestra una banda en 3485 cm^{-1} , correspondiente a hidroxilo, tres bandas en 2965, 2932 y 2876 cm^{-1} indican la presencia de enlaces carbono-hidrógeno alifáticos. En 1750 cm^{-1} se ve una banda que corresponde al carbonilo de γ -lactona, también se observa una banda en 1749 cm^{-1} que indica la permanencia de ésteres, finalmente se ve una banda en 1707 cm^{-1} atribuible al carbonilo de cetona.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 20) mostró para (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolepin B (35) el ion molecular en m/z de 426, que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_6$, y a partir de ese ion se observa la pérdida de 28 unidades de masa, correspondientes al fragmento $[\text{CO}]^+$, a partir de este ion se observa la pérdida de 32 unidades de masa, correspondientes a un fragmento $[\text{O}_2]^+$, también se observa la pérdida de 59 unidades de masa que corresponden al fragmento $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^+$. Se observa la pérdida de 101 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2]^+$.

a partir de este fragmento se observa la pérdida de un fragmento $[C_2H_3O^+]$, observándose una señal en 282 m/z , una señal que aparece en 384 m/z supone de la pérdida de un fragmento $[C_2H_2O^+]$.

El espectro de RMN 1H (espectro 13) muestra que hay dos dobletes en δ_H 5.779 y 5.480, los cuales corresponden a metinos geminales a oxígeno etéreo de éster. A campo alto se observan señales en δ_H 1.215, 1.085, 1.030, 0.918 y 0.914, las cuales pueden atribuirse a los metilos presentes. La señal en δ_H 2.116 integra para tres hidrógenos y corresponde al metilo del grupo acetilo.

Se observa un multiplete en δ_H 1.865, que integra para un hidrógeno y corresponde al hidrógeno del metino vecino a un metilo.

El espectro de RMN ^{13}C (espectro 15), muestra que la molécula cuenta con 22 carbonos, lo que concuerda con la fórmula molecular. Mediante el experimento DEPT se puede identificar el grado de protonación de cada carbono y de esta forma, en el espectro de RMN ^{13}C en la modalidad DEPT, se observan siete metinos, cuatro metilenos y seis metilos. Además aparecen cuatro singuletes en la región de carbonilos: en δ 211 se observa un singulete que corresponde a carbonilo de cetona, en δ 177 aparece la señal del carbonilo de lactona y los dos carbonilos de éster se encuentran en δ 171 y 170.

La elucidación estructural de la molécula se llevó a cabo mediante el análisis del espectro de RMN 1H modalidad COSY (espectros 16 y 17), el análisis de estos espectros permite observar la correlación del doblete en δ_H 5.779 con la señal en δ_H 5.480 (*d*), éste a su vez correlaciona con un multiplete en δ_H 2.040. De igual forma, se observa una correlación de un *ddd* en δ_H 3.069 con un *dt* en δ_H 2.581 y con un *m* en δ_H 2.180, éste a su vez correlaciona con un *m* en δ_H 1.401 y con otro *m* en δ_H 1.865.

De acuerdo con este análisis, las señales en δ_H 5.779 (*d*), 5.480 (*d*) y 2.040 (*m*) se asignan a H-9, H-8 y H-7 respectivamente. Asimismo, las señales en δ_H 3.069 (*dd*), 2.581 (*dt*), 2.180 (*m*), 1.401 (*m*), 1.865 (*m*), se asignan a H-2a, H-2b, H-3a, H-3b y H-4 respectivamente.

Existe una correlación de un *dd* en δ_H 4.934 con un *m* en δ_H 1.862 y con un *t* en δ_H 1.596. La señal en δ_H 2.040 asignada para H-7 correlaciona con un *m* en δ_H 2.699, éste a

su vez correlaciona con un d en $\delta_H 1.085$, de acuerdo con ésto, las señales en $\delta_H 4.934$, 1.862, 1.596, 2.699 y 1.085 corresponden a H-6, H-5a, H-5b, H-11 y H-13 respectivamente. En la figura 1 se muestran algunas correlaciones COSY de **35**. La configuración del metilo en C-11 será discutida más adelante, junto con el compuesto **38**.

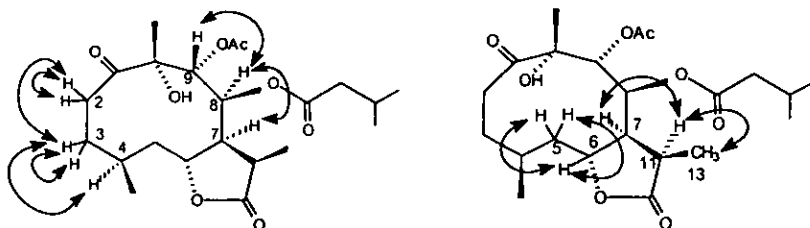


Figura 1. Algunas asignaciones COSY de **35**.

El experimento HMQC (espectros 18 y 19) confirma las asignaciones anteriores correlacionando señales de metilenos situadas en $\delta 42.8$, 40.8, 33.6, 30.2 con las señales para los hidrógenos H-2'a y H-2'b, H-5a y H-5b, H-2a y H-2b, H-3a y H-3b respectivamente.

En este mismo espectro se observan las correlaciones de las señales de los carbonos en $\delta 76.8$, 75, 68.8, 39.6, 35.2 y 26.7, con las señales para los hidrógenos H-6, H-9, H-8, H-7, H-11 y H-4 respectivamente, estableciendo las asignaciones mostradas en la figura 2.

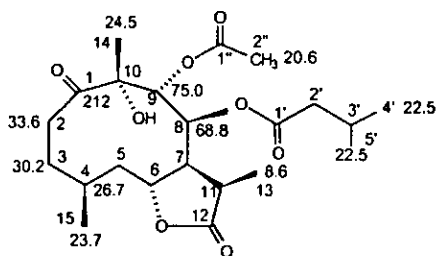
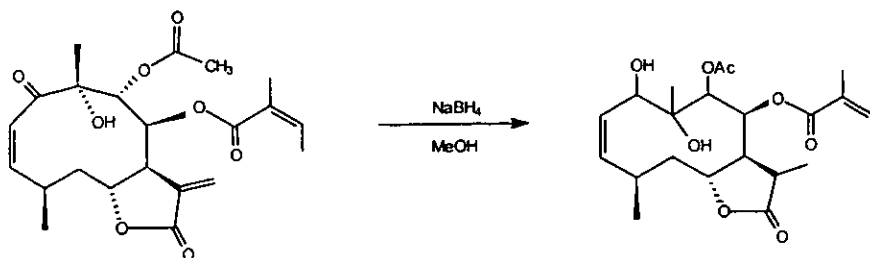


Figura 2. Asignaciones de RMN ^{13}C de **35** realizadas de acuerdo con el análisis del espectro HMQC

Por otro lado, se ensayó también la reacción de reducción química con NaBH_4 , con lo que se esperaba reducir el grupo carbonilo de la posición 1 a un grupo hidroxilo, tal como se informa en la literatura [41] para la caleína A. Esta reacción se ejemplifica en el esquema 13.



Esquema 13. Reducción química de la caleína A.

Dada la similitud estructural de las caleínas con la neurolenina B, se pensó que la reacción podría proceder de igual manera que la descrita en la referencia. A continuación se muestran los resultados de los ensayos realizados.

Ensayo	Reacción
2	

Cuadro 7. Reacción de reducción química sobre neurolenina B.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la reacción de reducción química, que se muestran en el cuadro 7, se observa que la reacción no siguió el mismo camino que se informa en la literatura para las caleínas [41], sino que se obtuvieron dos compuestos reducidos: O1,1,2,3,11,13 hexahidro-neurolenina B (36) y O1,1-iso-neurolenina B (37). Cabe señalar que esta mezcla no pudo ser separada por CCF, ya que ambos

compuestos tienen el mismo Rf en varias mezclas de eluyentes. A continuación se describen las evidencias espectroscópicas que determinan las estructuras de **36** y **37**.

Mezcla de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolenina B (**36**) y O1,1-Iso-neurolenina B (**37**).

El espectro de IR de esta mezcla (espectro 21), muestra una banda ancha en $\nu_{\text{máx}}$ 3564 cm^{-1} , correspondiente a hidroxilo, tres bandas en 2965 , 2929 y 2874 cm^{-1} indican la presencia de enlaces carbono-hidrógeno alifáticos. También se observa una banda en 1751 cm^{-1} que determina la presencia de carbonilos.

El espectro de RMN ^1H (espectros 22 y 23) da evidencias de que el producto obtenido en esta reacción corresponde a una mezcla de dos compuestos, ya que prevalecen algunas señales características de la materia prima a la vez que aparecen otras nuevas, esto aunado a que la proporción de las señales sugiere que uno de los derivados se encuentra en mayor proporción. En el espectro se observan los dos dobletes característicos de la γ -lactona en δ_{H} 6.233 ($J=2$) y 5.814 ($J=2$), lo que indica que en uno de los derivados permanece el doble enlace exocíclico a la γ -lactona.

A diferencia del espectro de RMN ^1H que presenta la neurolenina B, (espectro 1), en el que el H-3 presenta un triplete en δ_{H} 6.008 , en éste espectro, se observa un doble de doble en δ_{H} 5.990 , que puede atribuirse, de acuerdo a la comparación con la lobatina A [4], a un hidrógeno vinílico en C(3), por lo que se deduce la presencia de una olefina en C(3)-C(4). También se observa que, en comparación con la materia prima, en este espectro una señal correspondiente a H-15 se desplaza a campo más bajo y se presenta como un singulete en δ_{H} 2.106 , lo cual está de acuerdo con la presencia de la olefina en C(3)-C(4).

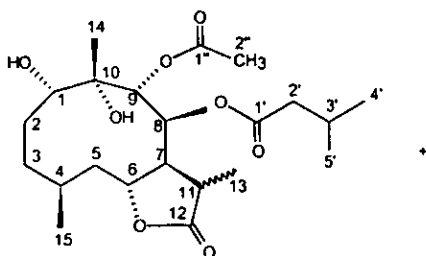
Así mismo, se observa, en comparación con la materia prima, la aparición de una señal doble en δ_{H} 1.094 , la cual se atribuye a un metilo y corresponde a H-13 del segundo derivado. En δ_{H} 1.286 Y 1.234 se observan dos señales simples que corresponden a metilos de grupo acetilo, lo cual hace evidente que en los dos derivados formados prevalece el grupo acetato en C(9).

En el espectro de RMN ^1H que presenta neurolenina B, se observa una señal en

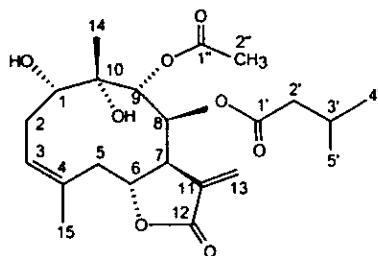
δ_H 1.135 (*d*, *J*= 6.5), asignada a H-15, esta misma señal prevalece en δ_H 1.032 (*d*, *J*= 6.3), lo que concuerda con la hipótesis de que en uno de los derivados no se forma la olefina en C(3)-C(4).

El análisis por espectrometría de masas (espectro 24), mostró para **36** y **37** un ion molecular en *m/z* de 428, que corresponde a la fórmula molecular $C_{22}H_{36}O_8$, a partir de este ion se observa la pérdida de 101 unidades de masa, que corresponde al fragmento $[C_5H_9O_2^+]$, a partir de este ion, se observa la pérdida de 43 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_2H_3O^+]$ y de 44 unidades de masa que corresponden a la pérdida del fragmento $[CO_2^+]$. A partir del ion molecular, también se observa de 343 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_5H_9O^+]$, a partir de este ion se observa la pérdida de 59 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_2H_3O_2^+]$.

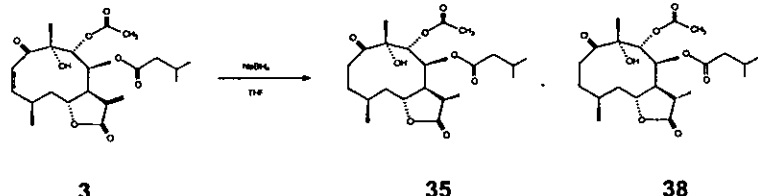
En el espectro, no se logra observar con claridad el ion molecular de **37**, sin embargo, el patrón de fragmentación muestra que si existe. En un ion molecular de 424 *m/z*, que corresponde a la fórmula molecular $C_{22}H_{32}O_8$, se observa la pérdida de 101 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_5H_9O_2^+]$, a partir de este fragmento se observa la pérdida de otro fragmento de 43 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_2H_3O^+]$, a partir del ion molecular, también se observa la pérdida de 59 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[C_2H_3O_2^+]$.



36



37

Ensayo	Reacción
3	

Cuadro 8. Reacción de reducción química de neurolepin B.

Como se muestra en el cuadro 8, se realizó por segunda ocasión la reacción de reducción química, pero esta vez hubo un cambio de disolvente, ya que se empleó THF (en lugar de MeOH). El resultado fue una mezcla de dos productos reducidos que pudieron separarse por CCF y se identificaron como (11*R*)-2,3,1,13-tetrahydro-neurolepin B (**35**) y (11*S*)-2,3,11,13-tetrahydro-neurolepin B (**38**).

El compuesto **35** es el mismo que se obtiene al ensayar la reacción de reducción catalítica sobre neurolepin B, ya que los análisis de CCF, IR y RMN ¹H así lo demuestran.

(11*S*)-2,3,11,13-tetrahydro-neurolepin B (**38**).

El espectro de IR de **38** (espectro 25), muestra una banda ancha en $\nu_{\text{máx}}$ 3467 cm^{-1} , que corresponde a hidroxilo, se observan dos bandas en 2962 y 2933 cm^{-1} , que corresponden a enlaces carbono-hidrógeno alifáticos, en $\nu_{\text{máx}}$ 1768 cm^{-1} se presenta una banda que se corresponde al carbonilo de lactona, en $\nu_{\text{máx}}$ 1746 cm^{-1} se observa una banda intensa que corresponde a éster. Finalmente, una banda en $\nu_{\text{máx}}$ 1708 cm^{-1} corresponde a carbonilo de cetona.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 33) mostró para **38** el ión molecular en m/z de 426, que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_8$, a partir de ese ion se observa la pérdida de 28 unidades de masa; correspondientes al fragmento $[\text{CO}]^+$, se observa también la pérdida de 42 unidades de masa, que corresponden al fragmento $[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$. En m/z de 341 se observa una señal que corresponde a la pérdida del fragmento $[\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^+$, otra señal en 325 m/z corresponde a la pérdida de un fragmento

[C₅H₉O₂⁻].

El espectro de RMN ¹H (espectro 26), muestra dos dobletes en δ_H 5.718 y 5.613, los cuales corresponden a los hidrógenos geminales a los ésteres. Se observan señales en δ_H 1.26, 1.236, 1.055, 0.956 y 0.943, las cuales integran para tres hidrógenos y corresponden a hidrógenos metílicos. Una señal en δ_H 2.133 integra para tres hidrógenos y corresponde a hidrógenos de un grupo acetilo. Se observa un multiplete en δ_H 2.251 que integra para un hidrógeno y que corresponde a un hidrógeno de metino geminal a metilo.

El espectro de RMN ¹³C (espectro 28) muestra que la molécula cuenta con 22 carbonos, lo que concuerda con la fórmula molecular. Mediante el experimento DEPT se logra observar que existen siete metinos, cuatro metilenos y seis metilos, además aparecen cuatro singuletes en la región de carbonilos, en δ 212.7 se observa un singulete que corresponde a carbonilo de cetona, en δ 176.8 aparece la señal de carbonilo de lactona, dos carbonilos de éster se encuentran en δ 171.8 y 170.3.

El establecimiento de la vecindad de los hidrógenos se llevó a cabo mediante el análisis de la modalidad COSY del espectro de RMN ¹H (espectros 29 y 30). En este espectro se puede observar la correlación de un *ddd* en δ_H 3.192 con un *dq* en δ_H 2.449, así como con un *s* en δ_H 2.158 y un *m* en δ_H 1.387, ésta última señal, a su vez correlaciona con un *m* en δ_H 2.251. De acuerdo a esto, las señales en δ_H 3.192 (*ddd*), 2.449 (*dq*), 2.158 (*s*), 1.386 (*m*) y 2.251 (*m*), se asignaron a los hidrógenos H-2a, H-2b, H-3a, H-3b y H-4 respectivamente.

También se observa la correlación de la señal en δ_H 2.251, que se asignó a H-4, con un *m* en δ_H 1.670, esta última señal, a su vez correlaciona con un *m* en δ_H 1.875 y con un *dd* en 4.583, de igual forma se observa la correlación de ésta última señal con un *m* en δ_H 1.629. Dadas las correlaciones mencionadas, las señales en δ_H 1.670 (*m*), 1.875 (*m*), 4.583 (*dd*, J=2) y 1.629 (*m*), se asignaron para H-5b, H-5a, H-6 y H-7 respectivamente. Se observa la correlación de un doblete en δ_H 1.055 con un multiplete en δ_H 1.550, de acuerdo con estas correlaciones, se asignan las señales en δ_H 1.055 (*d*, J=6.5) y 1.550 (*m*) a H-13 y H-11 respectivamente. En la figura 3 se muestran las

interacciones COSY mencionadas.

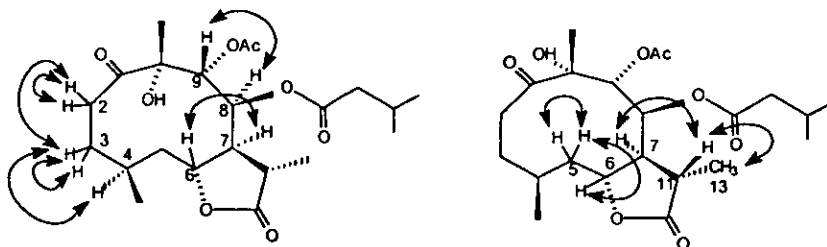


Figura 3. Algunas interacciones COSY de **38**.

El experimento HMQC (espectros 31 y 32), confirma lo anterior correlacionando señales de metilenos situadas en δ 42.9, 33.6, 32.6 y 30.6 con las señales para los hidrógenos H-2'a y H-2'b, H-5a y H-5b, H-2a y H-2b, H-3a y H-3b respectivamente. De igual forma, se observa la correlación de señales de metinos situadas en δ 77, 73.5, 68.8, 44.8, 38.8 y 25.3 con las señales para los hidrógenos H-6, H-9, H-8, H-7, H-4 y H-11 respectivamente. En la figura 4 se muestran las interacciones anteriormente señaladas.

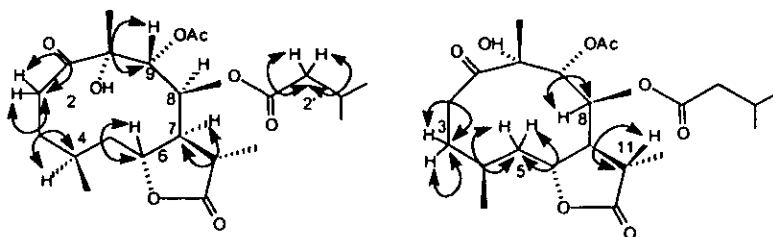


Figura 4. Algunas interacciones HMQC de **38**.

En el espectro de RMN ^1H del compuesto **38** (espectro 26), se puede apreciar que tiene características espectroscópicas similares al compuesto **35** (espectro 13) teniendo como diferencia fundamental el desplazamiento de la señal múltiple asignada a H-11, que en el compuesto **38** se desplaza (δ_{H} 1.550) 1.149 ppm a campo más alto en comparación con el desplazamiento del H-11 de **35** (δ_{H} 2.699).

Por otro lado, el desplazamiento a campo bajo del CH₃-13 en piridina ($\Delta\delta=0.05$) (espectro 14) puede explicarse por la interacción de la piridina con la cara β de la estructura, ya que podría interactuar con grupos polares (éster en C-8) y presumiblemente con el hidroxilo en C-10. Por lo tanto, el metilo en C-13 en el producto de hidrogenación catalítica (**35**) tiene orientación β . En la figuras 5 se muestra la estereoquímica de los compuestos **35** y **38**.

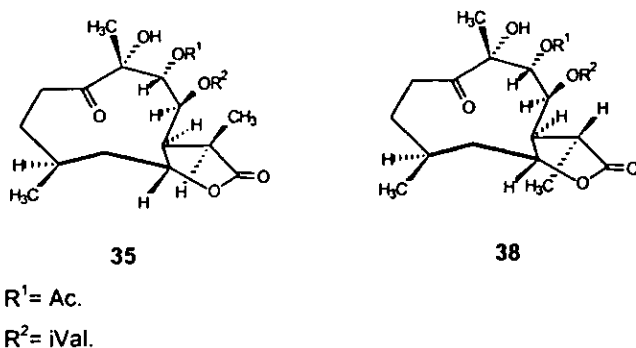


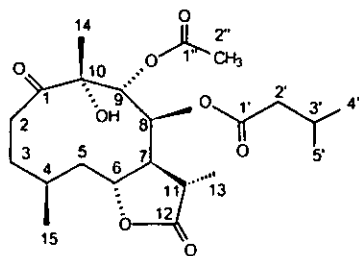
Figura 5. Estereoquímica de los compuestos **35** y **38**.

De acuerdo con esto, se observa que los desplazamientos de los hidrógenos H-11 y H-13 de **35** y **38** en C₅D₅N (espectros 14 y 27 respectivamente) y en CDCl₃ (espectros 13 y 26 respectivamente) no indican claramente, qué caras de las moléculas se ven más afectadas, por la complejación de la piridina con las mismas. Por lo que a continuación se muestra una tabla comparativa de los desplazamientos de los hidrógenos de **35** y **38**, en C₅D₅N y el CDCl₃.

(11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neuroleolina B (35)							(11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neuroleolina B (38)						
δ en CDCl_3				δ en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$			δ en CDCl_3			δ en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$			
H	δ	<i>m</i>	J	δ	<i>m</i>	J	δ	<i>m</i>	J	δ	<i>m</i>	J	
2a	3.069	ddd	12.5, 18.5	3.194	ddd	3.8, 12.0, 17.5	3.192	ddd	5, 12.5, 17.5	3.123	ddd	3.8, 11, 17.6	
2b	2.581	dt	2.5, 18.5	2.630	d	8.5	2.449	dq	2.5, 5.5, 17.5	2.540	m		
3a	2.180	m		2.692	m		2.158	s		2.281	s		
3b	1.401	m		1.320	m		1.387	m		*			
4	1.865	m		1.837	m		2.251	m		2.681	m		
5a	1.862	m		1.734	m		1.875	m		2.014	m		
5b	1.596	t	11.5	2.280	t	7.1	1.670	m		*			
6	4.934	dd	5, 10	5.342	dd	6.6, 10.4	4.583	dd	2, 5	*			
7	2.040	m		2.177	m		1.629	m		*			
8	5.480	dd	2, 9	6.073	d	9.33	5.613	d	10.5	6.124	d	10.1	
9	5.779	d	9	6.294	d	9.33	5.718	d	10	6.211	d	10.1	
11	2.699	m		2.988	q	7.4	2.059	m		*			
13	1.085	d	7.5	1.133	d	7.14	1.055	d	6.5	0.956	d	6.0	
14	1.215	s		1.410	s		1.236	s		1.425	s		
15	1.030	d	6	*			1.260	d	7	1.369	d	6.8	
2'a	2.023	m		2.066	m		2.195	d	7	2.373	d	3.3	
2'b	2.047	d	1	2.202	d	3.3	2.160	m		2.277	m		
4'	0.914	d	7	0.872	d	1.1	0.943	d	4	0.873	d	6.8	
5'	0.918	d	6.5	0.894	d	1.1	0.956	d	4.5	0.906	d	6.3	
2''	2.116	s		2.134	s		2.133	s		2.165	s		

*Señal no observada.

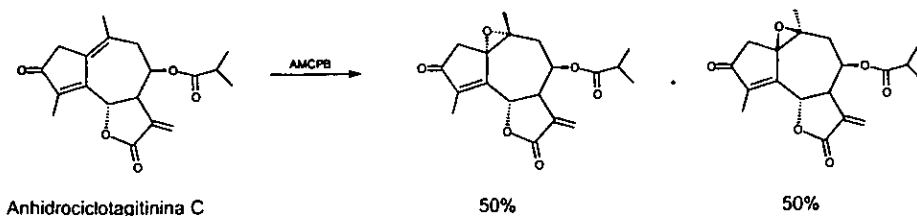
Tabla 14. Comparación de los desplazamientos en CDCl_3 y $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de 35 y 38



38

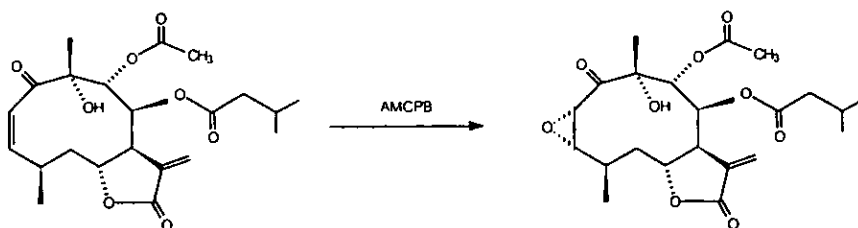
Reacción de epoxidación.

Con la finalidad de observar la reactividad de neurolenina B para formar epóxidos, se realizó una reacción de este tipo. De acuerdo con la literatura, se pensó que la reacción de epoxidación podría proceder de manera análoga a como ocurre con la anhidrociclotagitinina C [42], tal como se muestra en el esquema 14.



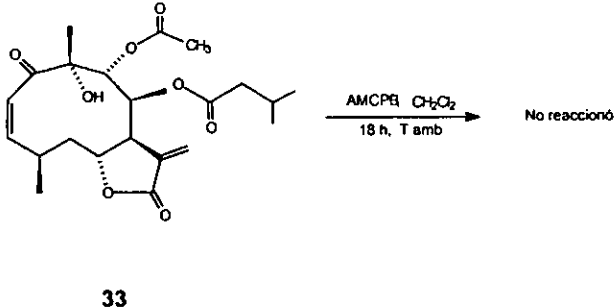
Esquema 14. Reacción de epoxidación de anhidrociclotagitinina C.

Por consiguiente, es predecible, para la neurolenina B, la formación del epóxido correspondiente. En el esquema 15 se muestra el posible producto de epoxidación de neurolenina B.



Esquema 15. Posible reacción de epoxidación sobre neurolenina B.

En en cuadro 9 se muestra el resultado de la reacción de epoxidación efectuada sobre neurolenina B, y se observa que es evidente la estabilidad de neurolenina B (3) en estas condiciones de reacción.

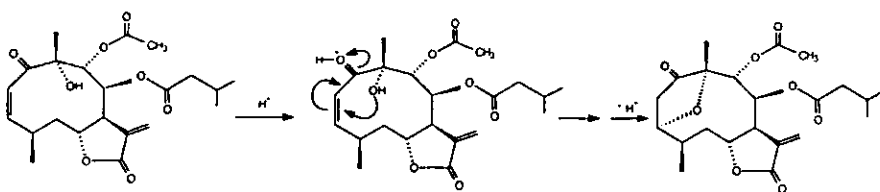
Ensayo	Reacción
1	 <p style="text-align: center;">33</p>

Cuadro 9. Reacción de epoxidación de neurolenina B.

Reacción de hidrólisis ácida.

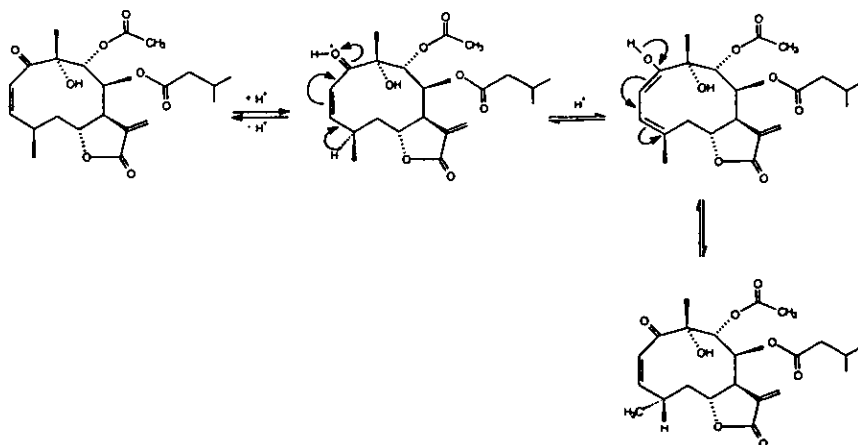
Con el fin de ponderar la reactividad de la neurolenina B en medio ácido, se sometió a tratamiento con HClO_4 [43].

Presumiblemente puede formarse el tetrahidrofurano mediante la protonación de la cetona seguido de la adición (tipo Michael) del hidroxilo, para formar el enol correspondiente, el cual se tautomeriza para formar el sistema cíclico presente en varias lactonas sesquiterpénicas.



Esquema 16. Formación hipotética de tetrahidrofuranona en medio ácido

Otra posibilidad de reacción consiste en la epimerización de C-4 por medio de un intermediario enólico y posterior tautomerización como se muestra en el esquema 17.



Esquema 17. Posible epimerización de neurolenina B en medio ácido.

En el cuadro siguiente se muestra el resultado obtenido de la reacción de hidrólisis ácida sobre neurolenina B.

Ensayo	Reacción
1	<p style="text-align: center;">33</p>

Cuadro 10. Reacción de hidrólisis ácida sobre neurolenina B.

Como se ve en el cuadro 10, en las condiciones descritas sólo se recupera la materia prima, aún en tiempos largos de reacción (16 h), lo cual da evidencia de la estabilidad de neurolenina B en estas condiciones.

Discusión de resultados de las bioevaluaciones preliminares.

Se realizaron tres bioevaluaciones preliminares:

A) toxicidad frente a *Artemia salina*,

B) actividad antiinflamatoria y

C) actividad citotóxica frente a cinco líneas celulares [tumor cervico-uterino (HeLa), cáncer epitelial nasofaríngeo (Hep-2), cáncer de próstata (PC-3), cáncer del sistema nervioso central (U251) y células de leucemia (K562)],

para las sustancias: neurolenina B (3) y (11R)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (35).

La prueba de toxicidad frente a *A. salina* muestra baja toxicidad para neurolenina B ($CL_{50} = >1000$) y para (11R)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B ($CL_{50} = >1000$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación antiinflamatoria, se observó que la actividad manifestada por el extracto de diclorometano fue considerablemente alta (95.22%), al contrario de la actividad presentada por el extracto hexánico, que no resultó muy alta (32.86%). La actividad presentada por 3 (12.56 %) y por 35 (9.02 %) no fue relevante, aunque comparativamente, fue mayor la actividad presentada por 3.

Los extractos de diclorometano y hexánico fueron evaluados contra varias especies de microorganismos (*E. coli*, *S. aureus*, *M. esmegmatis*, *T. viride* y *A. niger*), pero la actividad inhibidora del crecimiento que manifestaron ambos extractos, fue prácticamente nula.

Los resultados de la prueba de citotoxicidad frente a las cinco líneas celulares ensayadas, indican que el compuesto más activo fue 3, que presentó una inhibición del cien por ciento en el crecimiento en cuatro de las cinco líneas celulares [no manifestó inhibición del crecimiento en las células cancerígenas de próstata (PC-3)], con esto se observa que existe cierta especificidad en la actividad citotóxica de neurolenina B. En cambio, (11R)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B, exhibió una mínima actividad citotóxica en todas las líneas celulares ensayadas.

Aunque no fue posible bioevaluar las neuroleninas C y D, así como los demás derivados químicos obtenidos; debido a la ausencia de material, con los resultados de las bioevaluaciones realizadas, se observa que la bioactividad está ligada a la presencia del doble enlace exocíclico a la γ -lactona y a la olefina en C(2)-C(3), ya que sin estos elementos, la bioactividad disminuye considerablemente. Estos resultados son congruentes con otros obtenidos previamente, los cuales indican la estrecha relación entre los sitios aceptores de Michael de las lactonas sesquiterpénicas (C-3 y C-13) para neurolenina B y la actividad biológica [8, 40].

De acuerdo con la informado en la literatura, *Neurolaena lobata*, es utilizada por las comunidades indígenas como infusión para curar diversos padecimientos, principalmente malaria, amibiasis, resfriados, e infecciones. La actividad principal manifestada por neurolenina B (principal componente de *N. lobata*), fue citotóxica, con lo que se observa que efectivamente existe una correlación de los resultados obtenidos con el uso popular.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

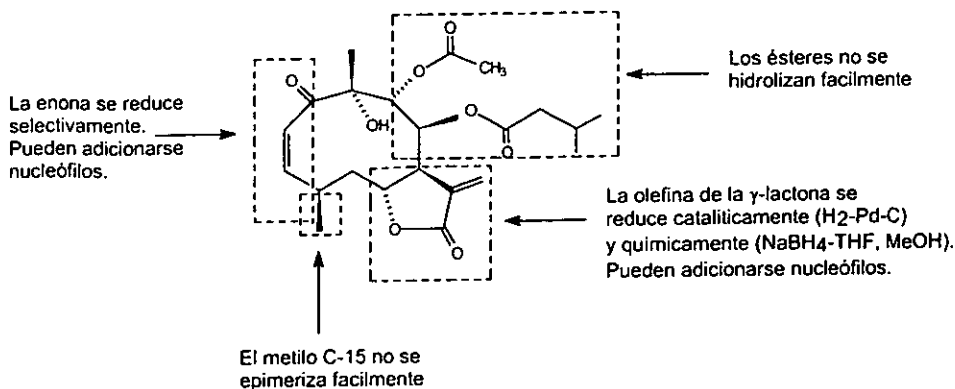
El análisis químico de *Neurolaena lobata*, permitió el aislamiento y caracterización de tres lactonas sesquiterpénicas del tipo de las germacranólidas: neurolenina B (3), neurolenina C (4) y neurolenina D (5), además de otros constituyentes no característicos de la planta como ácidos carboxílicos, ésteres lipídicos y ácidos grasos. Estos resultados muestran la variabilidad que existe en los constituyentes de esta especie, ya que varios metabolitos aislados previamente, no se aislaron en esta ocasión, tales como furanoheliangólidas, flavonoides y derivados del timol. Este cambio en el contenido metabólico puede deberse a variaciones tales como el estado de madurez, climáticas, geográficas, factores ecológicos, entre otros.

El componente mayoritario de *N. lobata* fue neurolenina B (3), mismo que se sometió a varias condiciones de reacción (hidrólisis básica y ácida, reducción química y catalítica, epoxidación) con el fin de ponderar su reactividad química. De ésta forma se obtuvieron los siguientes derivados: isoneurolenina B (33), bis-desacil-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (34), (11*R*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (35), O1,1,2,3,11,13-hexahidro-neurolenina B (36), O1,1-iso-neurolenina B (37), (11*S*)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (38).

Los rendimientos en los que se obtuvieron los derivados 33, 34, 36, 37 y 38, fueron muy bajos (del 1.5-24 %); el único compuesto que pudo ser obtenido con un rendimiento cuantitativo, fue 35 (100 %). De acuerdo con esto, puede decirse que, dado que los rendimientos son bajos, deben ajustarse las condiciones de reacción mediante experimentación exhaustiva.

En base a los resultados obtenidos, se observa que la neurolenina B cuenta con varios sitios de reactividad, que bajo ciertas condiciones, son susceptibles de reaccionar.

En el siguiente esquema se muestra un resumen sobre la reactividad manifestada por neurolenina B (3).



Esquema 18. Resumen sobre la reactividad química de neurolenina B (3).

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los derivados fueron obtenidos con bajo rendimiento, al igual que las neuroleninas C (4) y D (5), por lo que se sometieron a una evaluación biológica preliminar únicamente los compuestos 3 y 35.

El estudio de letalidad frente a *Artemia salina*, mostró que la actividad exhibida tanto por la neurolenina B (3), como por (11R)-2,3,11,13-tetrahidro-neurolenina B (35), fue poco relevante, ya que ambos compuestos exhibieron una CL_{50} mayor a 1000 ppm, con lo que puede afirmarse que ninguno de los dos compuestos ensayados es tóxico.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria manifestada, se observó que ninguno de los dos compuestos ensayados [3 (9.02 %) y 35 (12.56)] manifestó una alta actividad, aunque neurolenina B exhibió una actividad relativamente más baja.

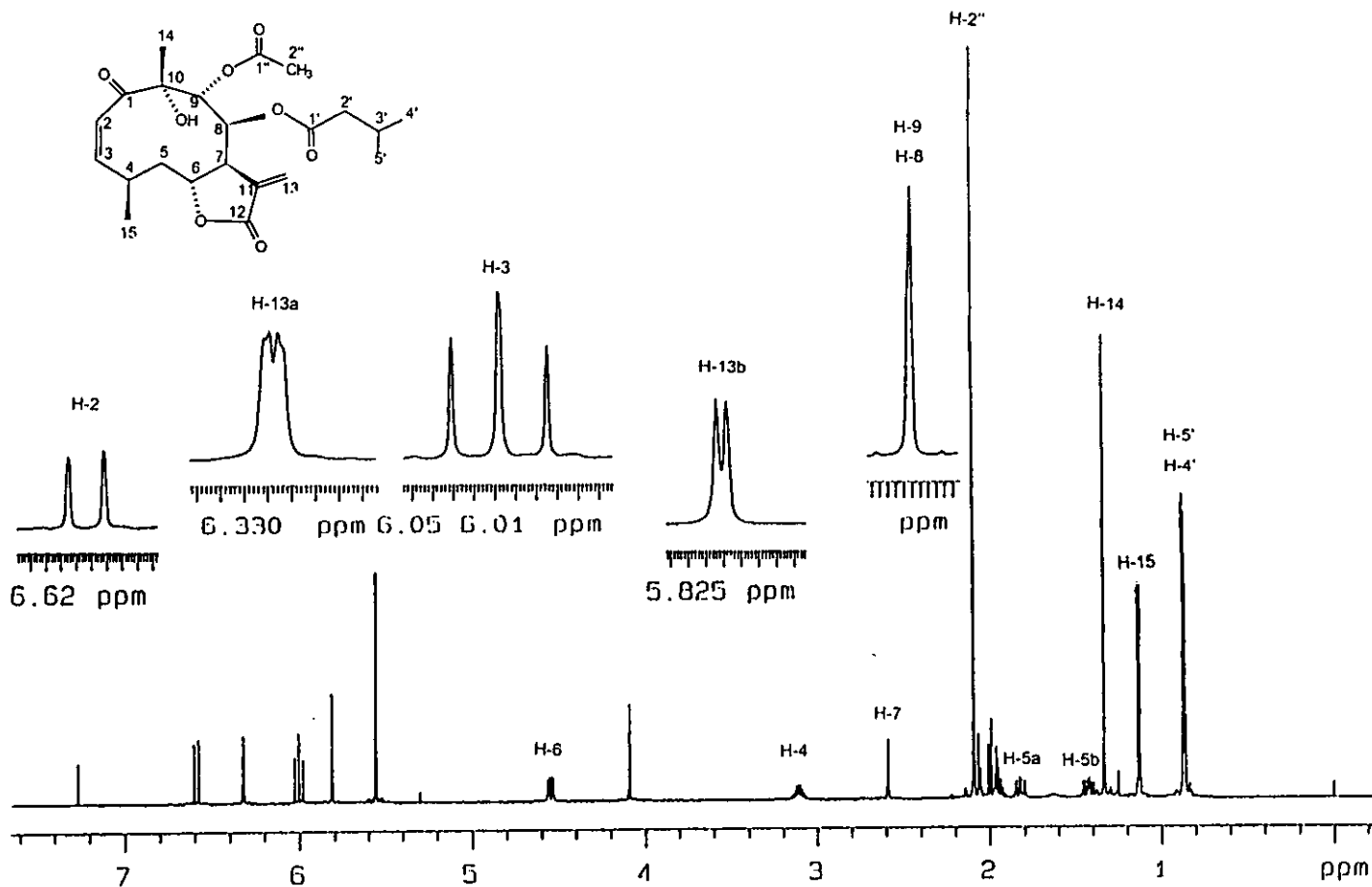
La neurolenina B (3) fue el compuesto más citotóxico frente a las líneas celulares cancerígenas utilizadas: tumor cervico-uterino (HeLa), tumor epitelial nasofaríngeo (Hep-2), células de leucemia (K562) y cáncer de sistema nervioso central (U251).

Con estos resultados, se puede concluir que la estructura de neurolenina B (3), es fundamental para manifestar actividad biológica, ya que, como se observó, sin el doble enlace exocíclico a la γ -lactona y la olefina presente en C(2)-C(3), la actividad biológica

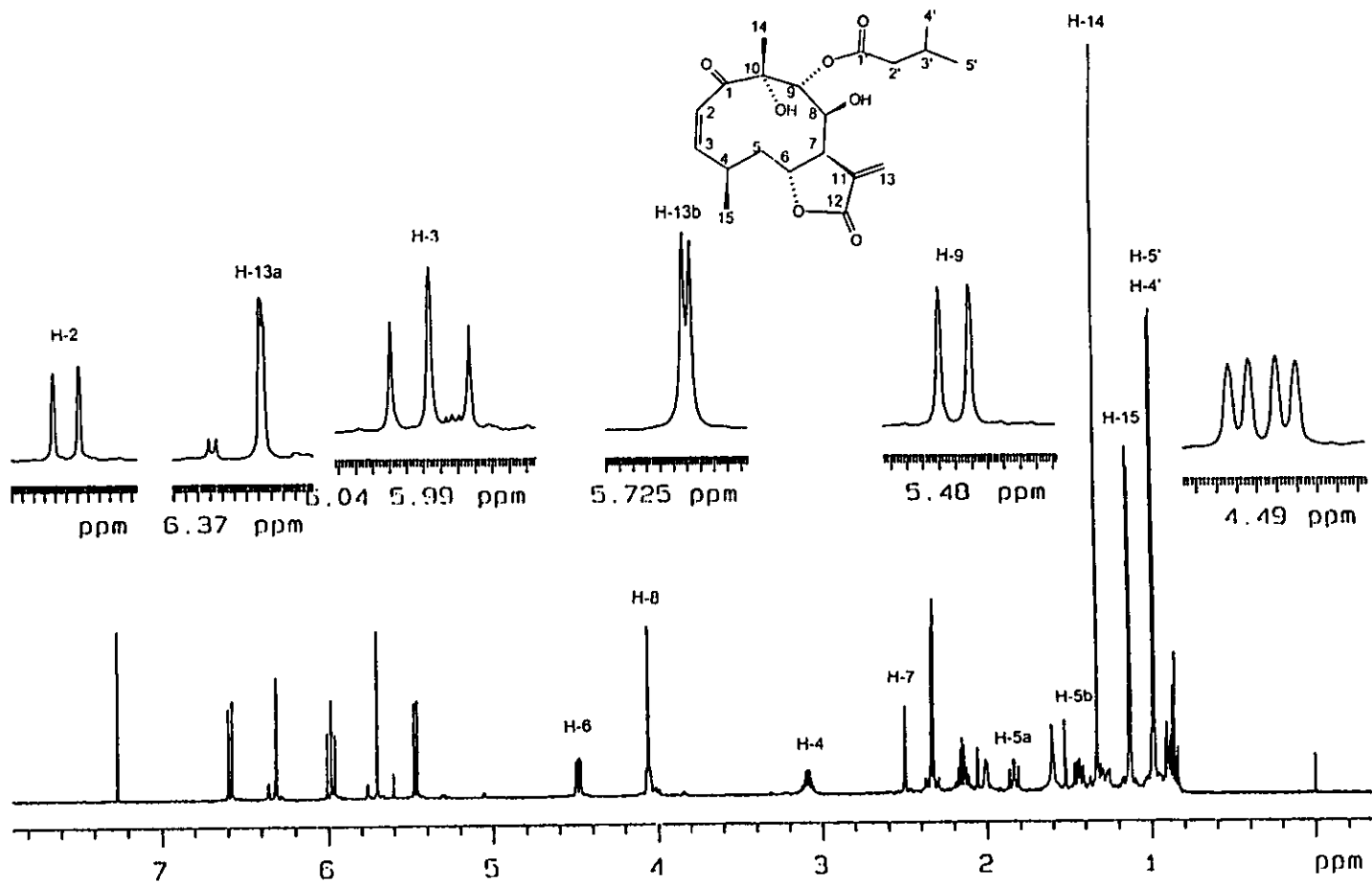
disminuye considerablemente.

Se ha informado previamente en la literatura [4, 10-12, 14, 18, 19, 25-26] que *N. lobata* es utilizada por las comunidades indígenas para curar diversos padecimientos, principalmente malaria, amibiasis e infecciones. De acuerdo con los resultados de actividad biológica presentados por *N. lobata*, se observa que su principal componente: neurolenina B, manifiesta una alta actividad citotóxica y una relativamente baja actividad antiinflamatoria, lo que indica que la planta efectivamente debe manifestar cierta actividad medicinal y por ello es utilizada por las comunidades indígenas.

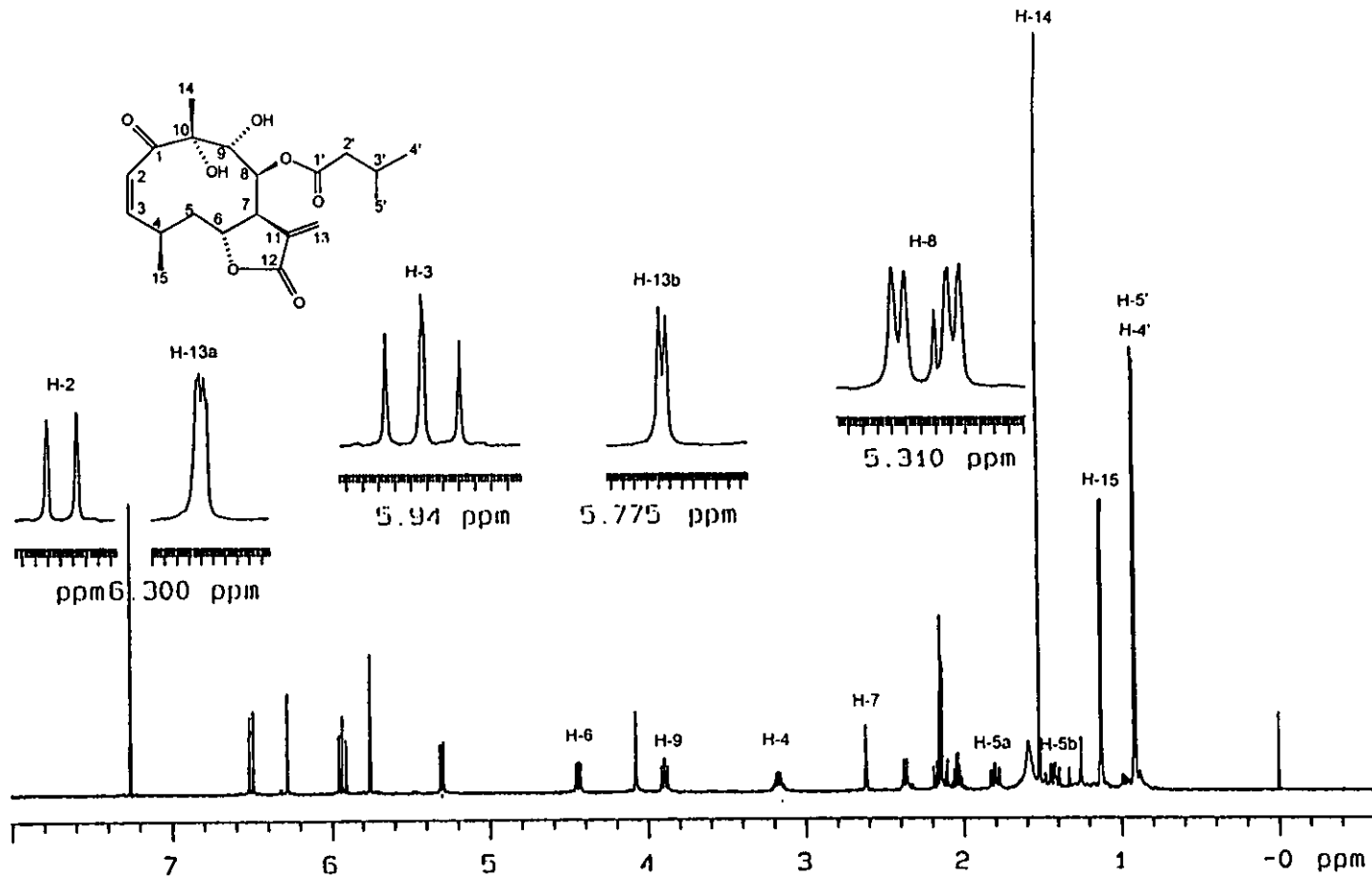
En el conocimiento de que *N. lobata* cuenta con una lactona sesquiterpénica citotóxica frente a algunas líneas celulares anticancerígenas (neurolenina B), es conveniente conocer la actividad citotóxica de éste compuesto en otras líneas celulares, así como bioevaluar otras lactonas sesquiterpénicas presentes en ésta especie, para poder establecer una relación entre la estructura molecular y la actividad biológica.



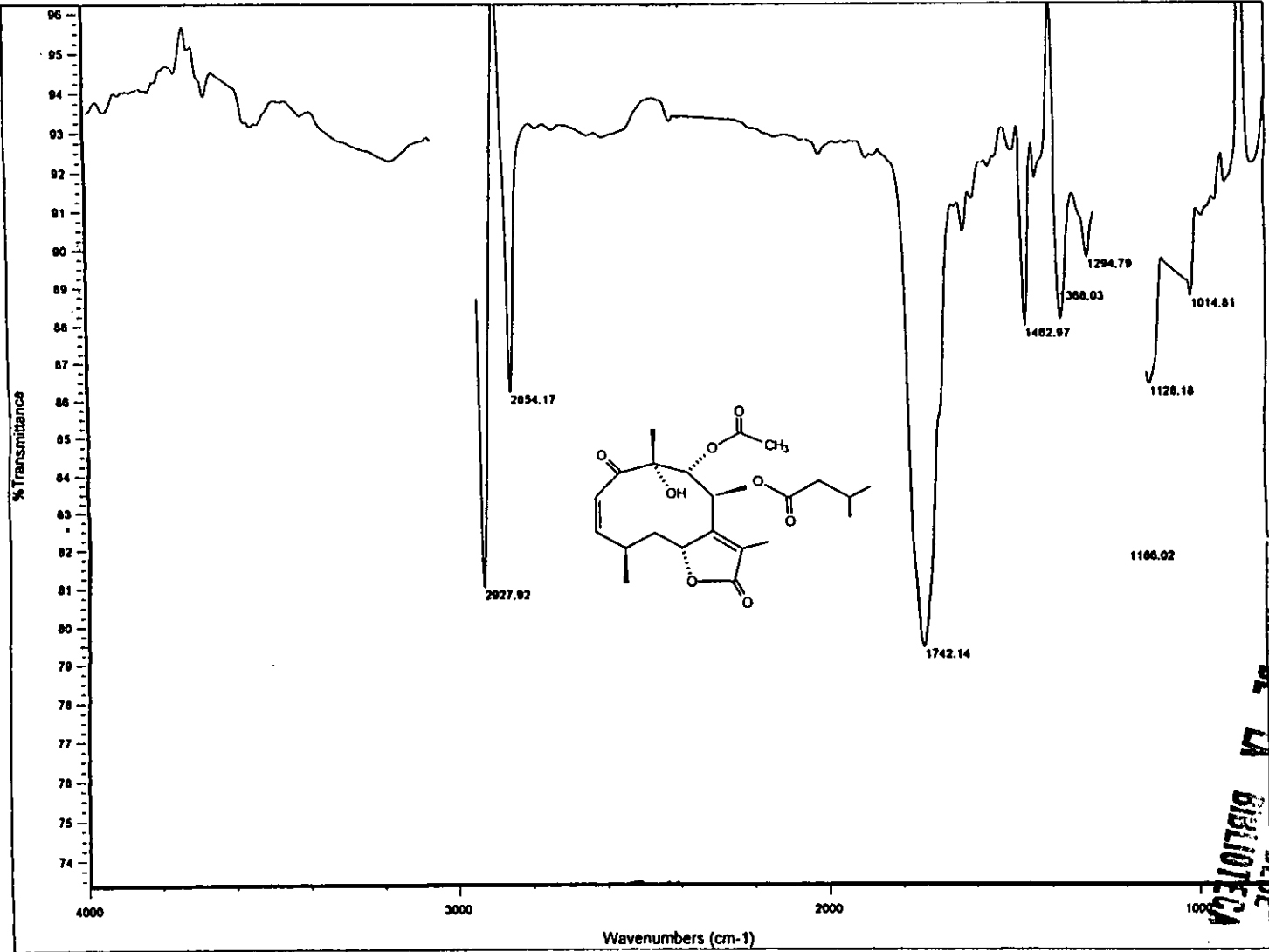
Espectro 1. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Neurotenina B (3).



Espectro 2. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Neurolenina C (4).

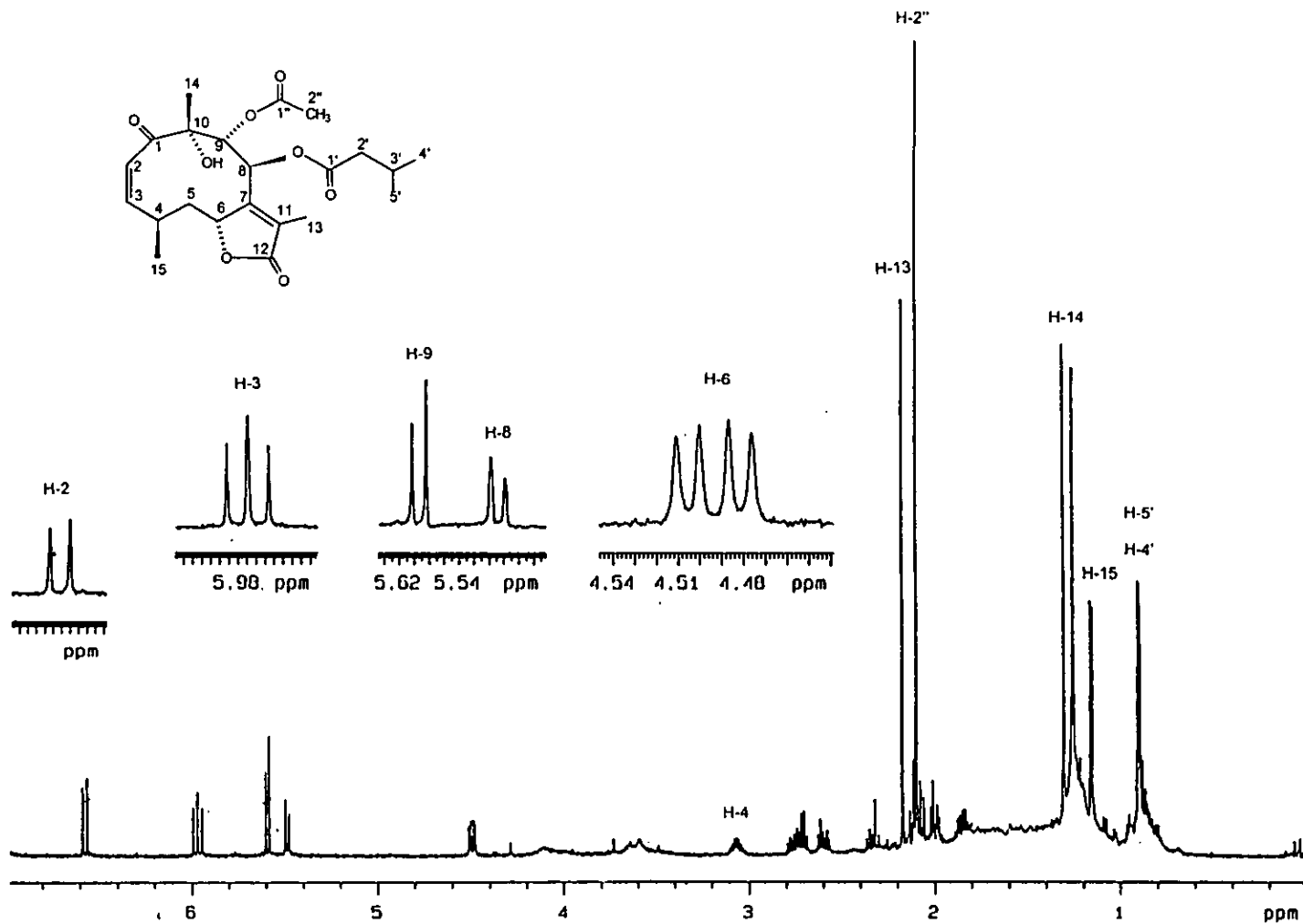


Spectro 3. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Neurolenina D (5).

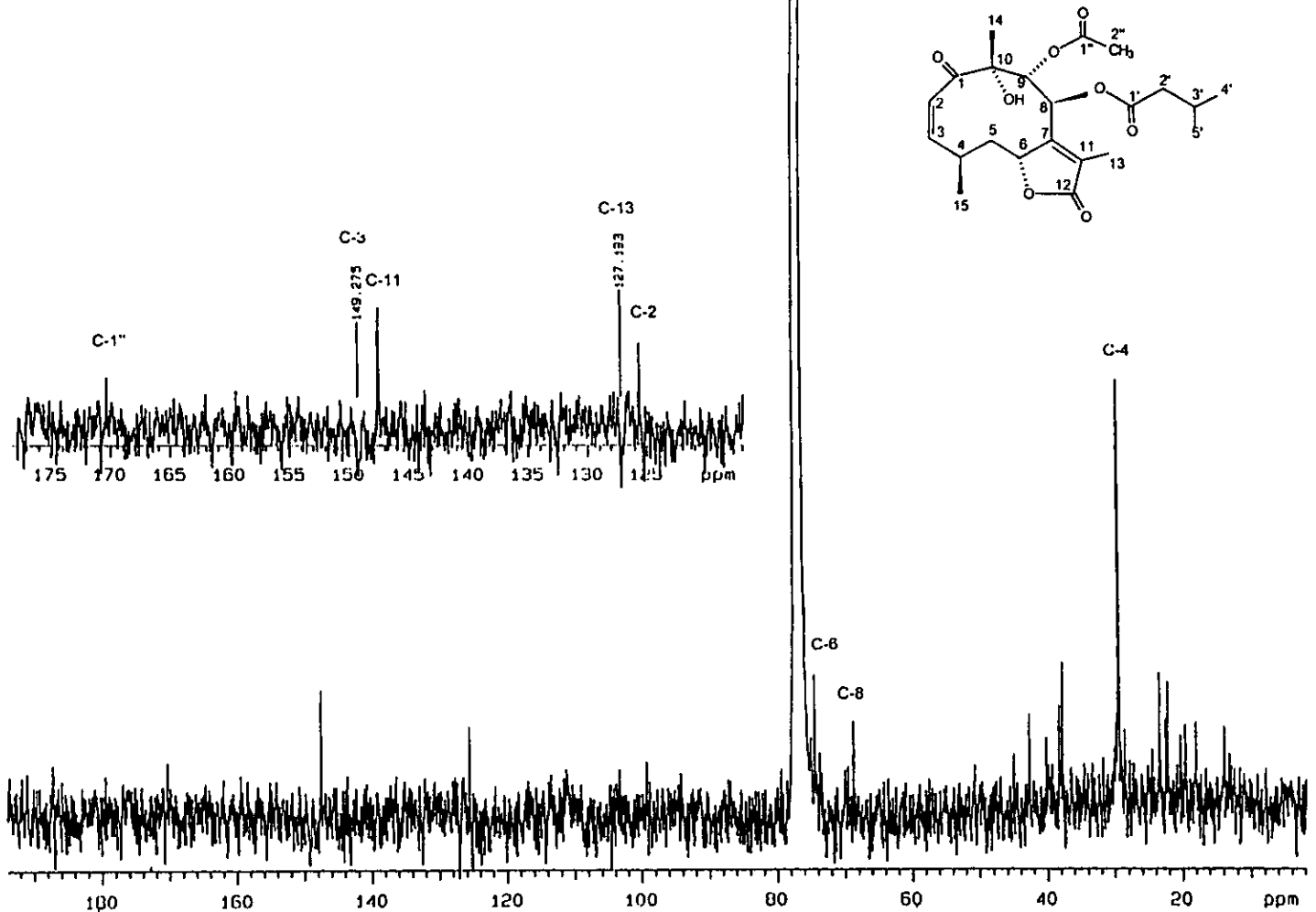


Espectro 4. IR (CHCl_3 , cm^{-1}) de Isoneurolelina B (33).

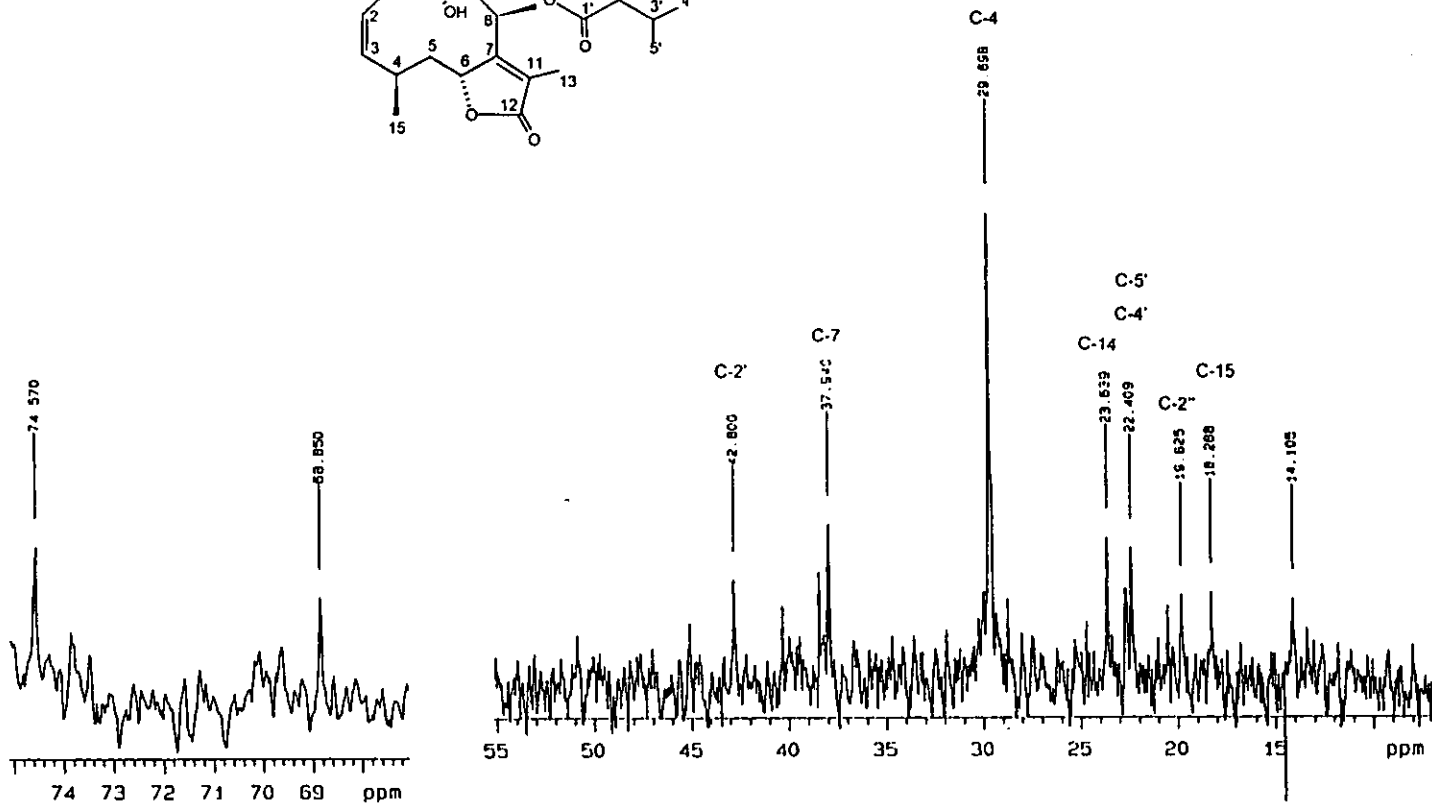
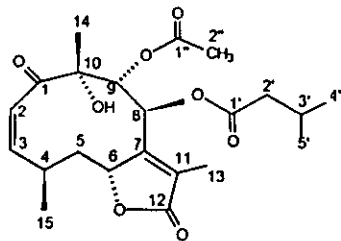
ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



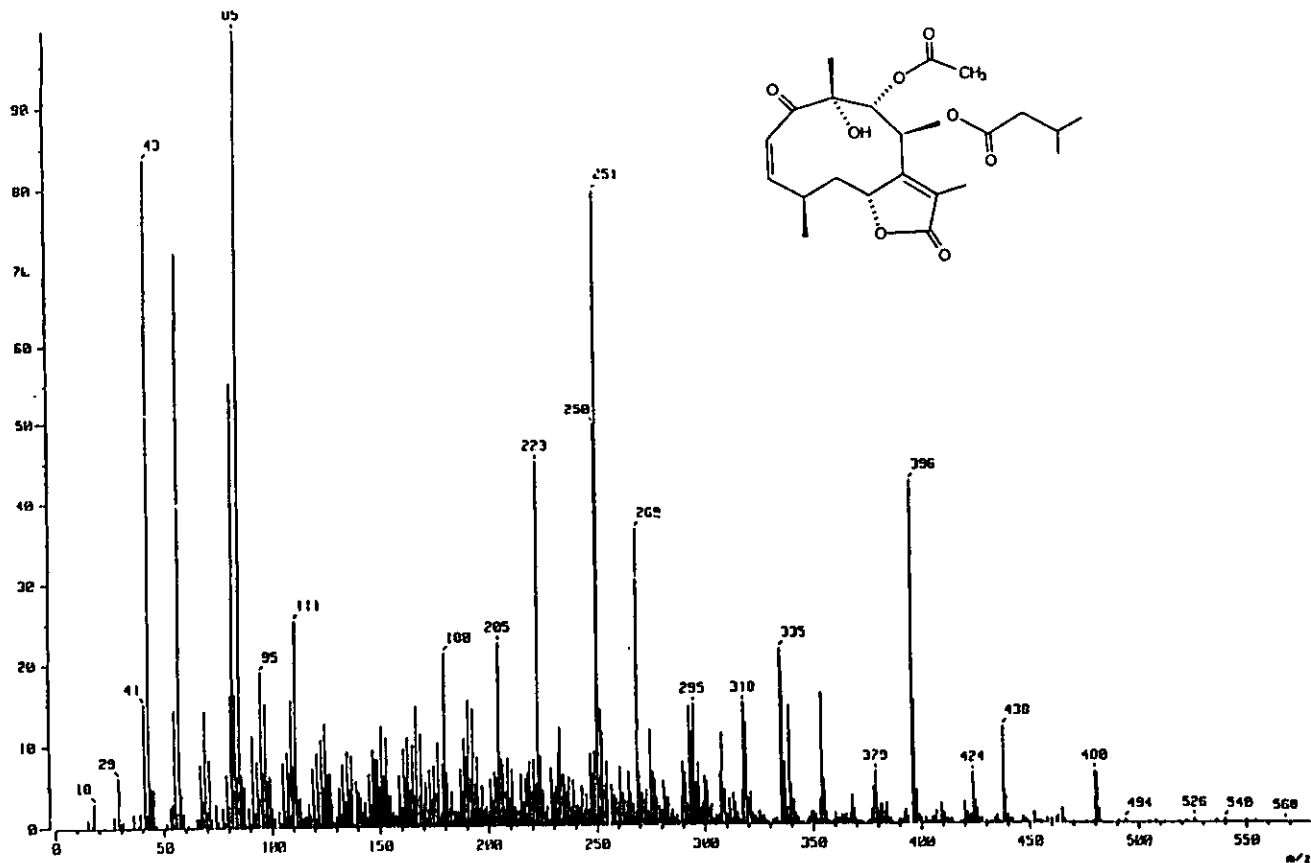
Espectro 5. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de Istoneurotenina B (33).



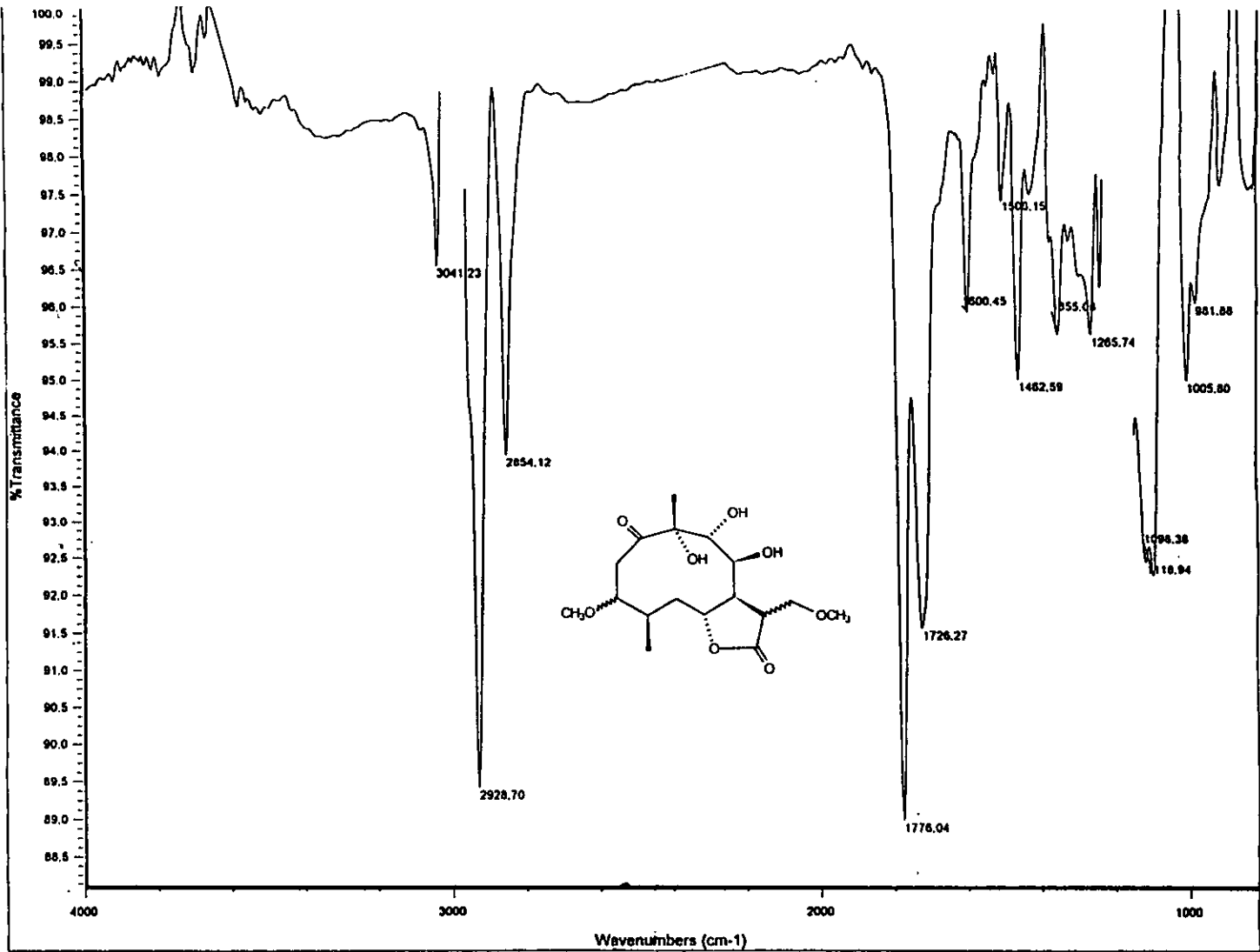
Espectro 6. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de Istoneurolenina B (33).



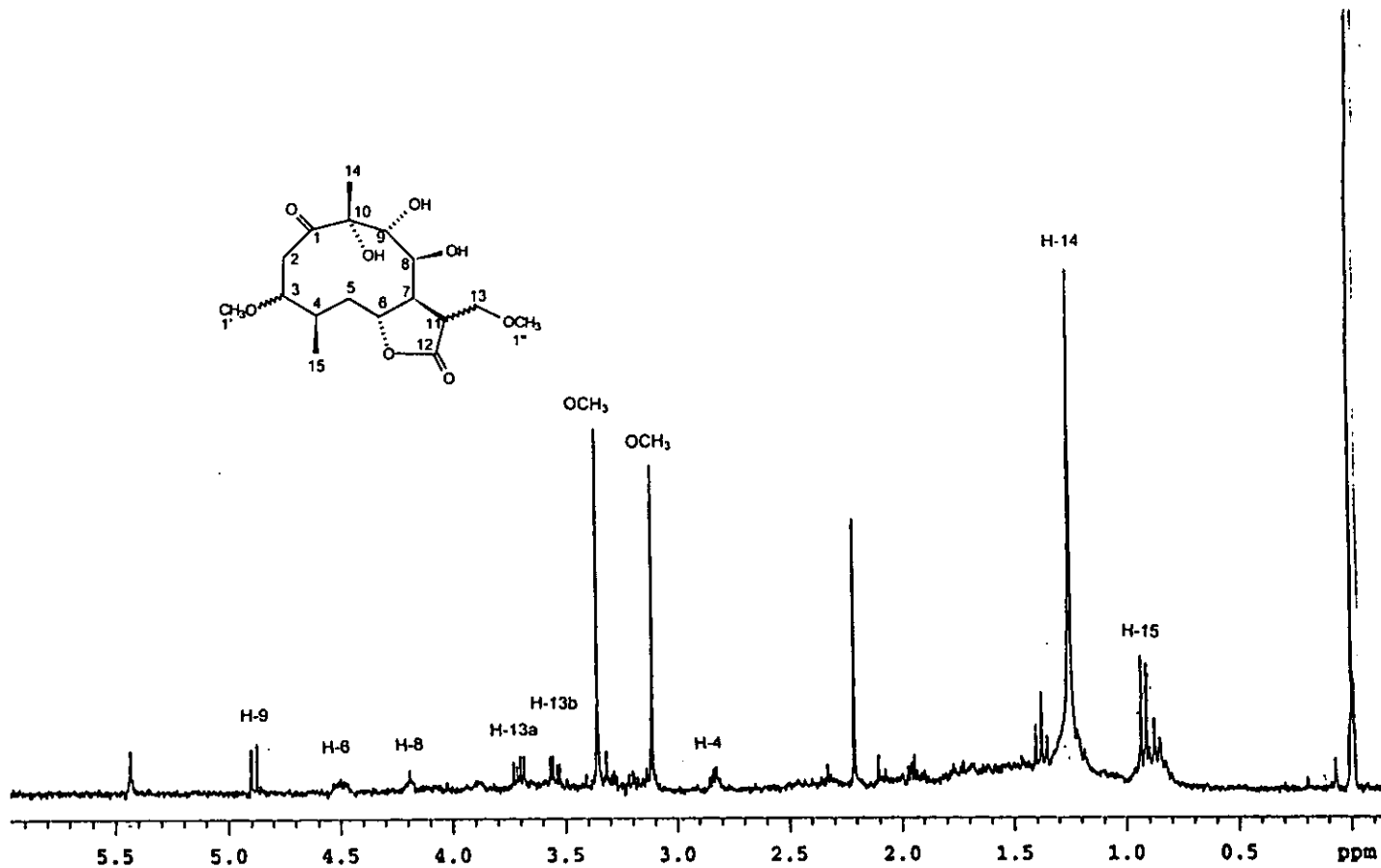
Espectro 7. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de Isoneurolepin B (33).



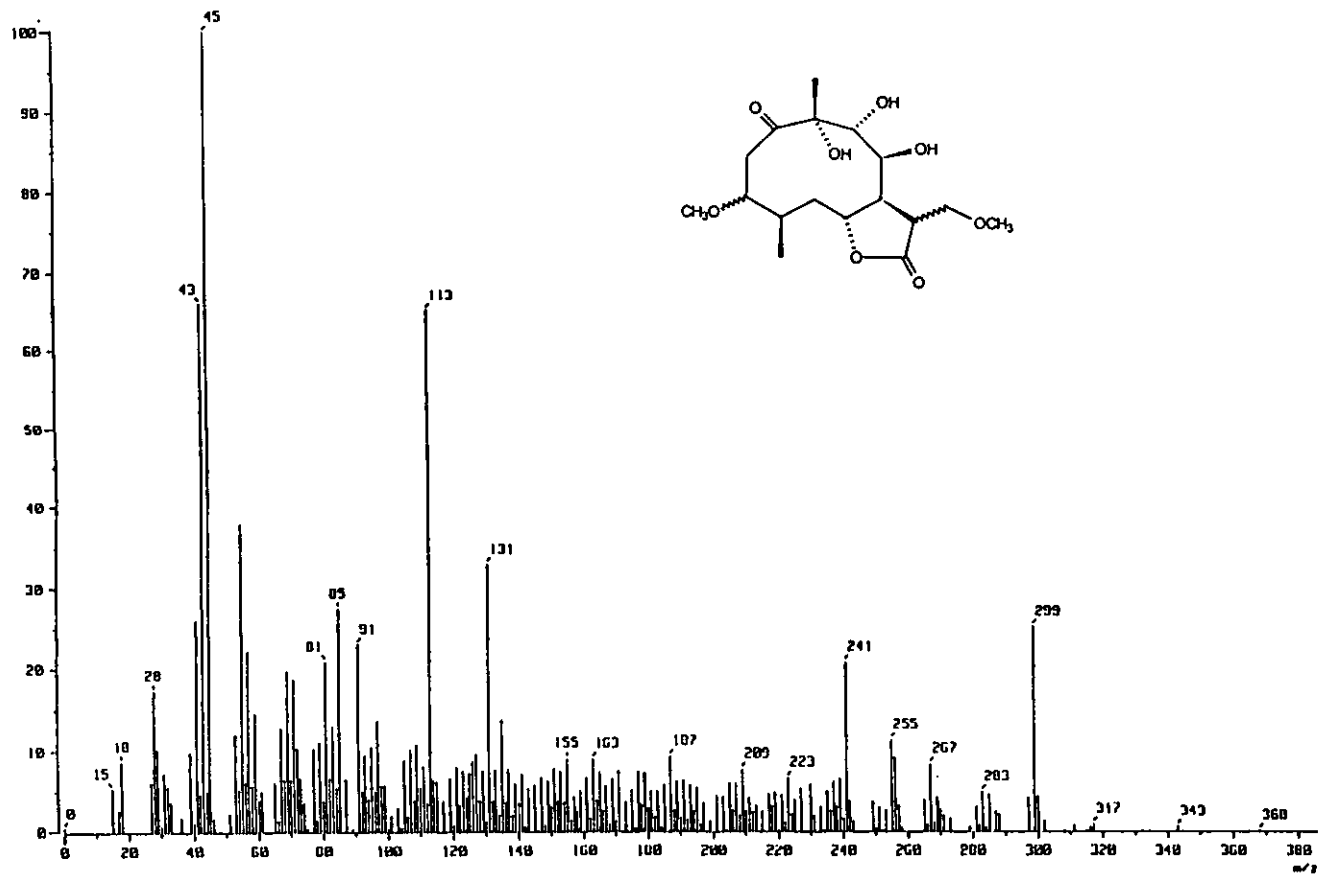
Espectro 8. EM (70 eV) de Isoneurolenina B (33).

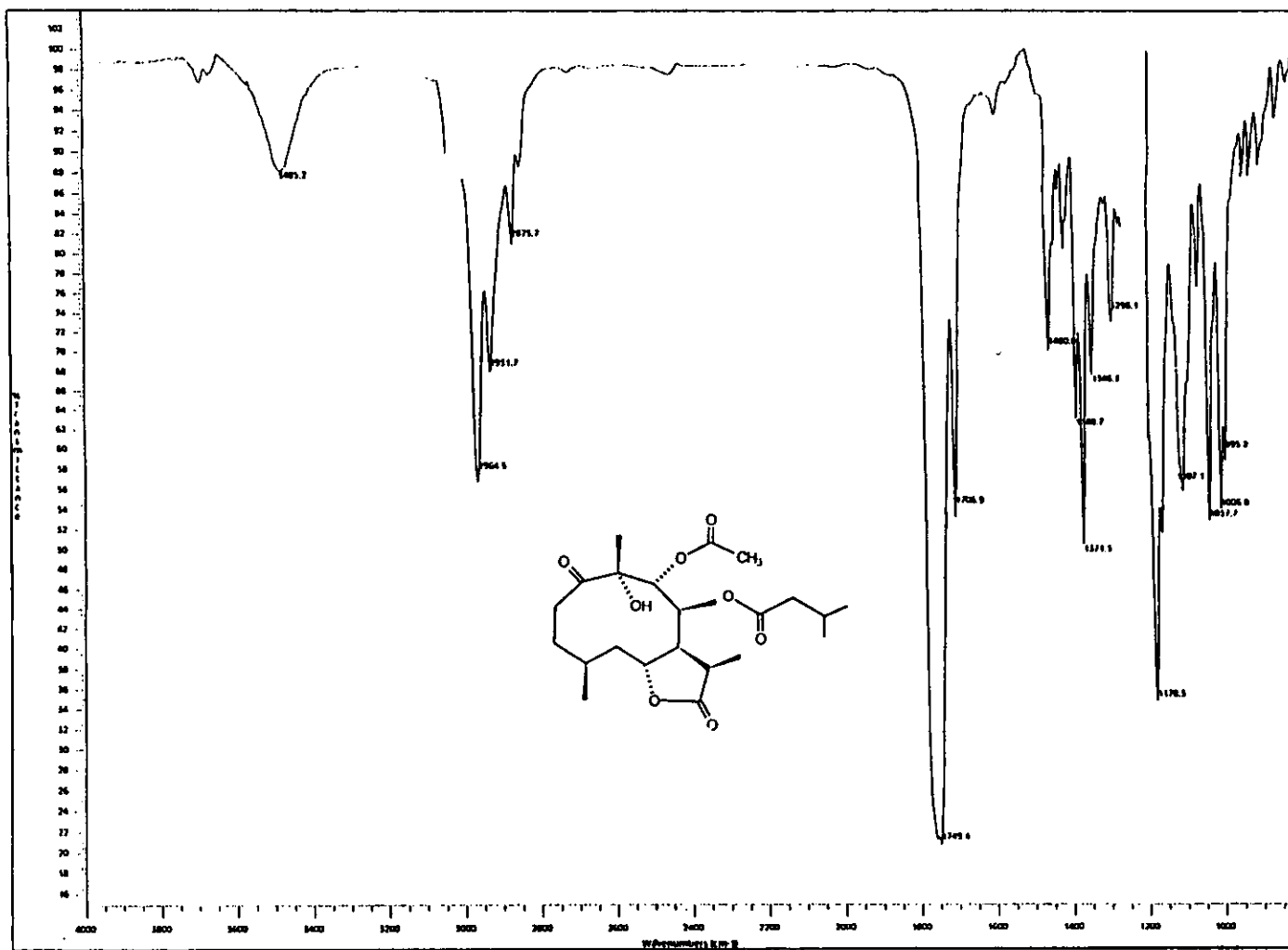


Espectro 9. IR (CHCl_3 , cm^{-1}) de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahydro-neurolenina B (34)

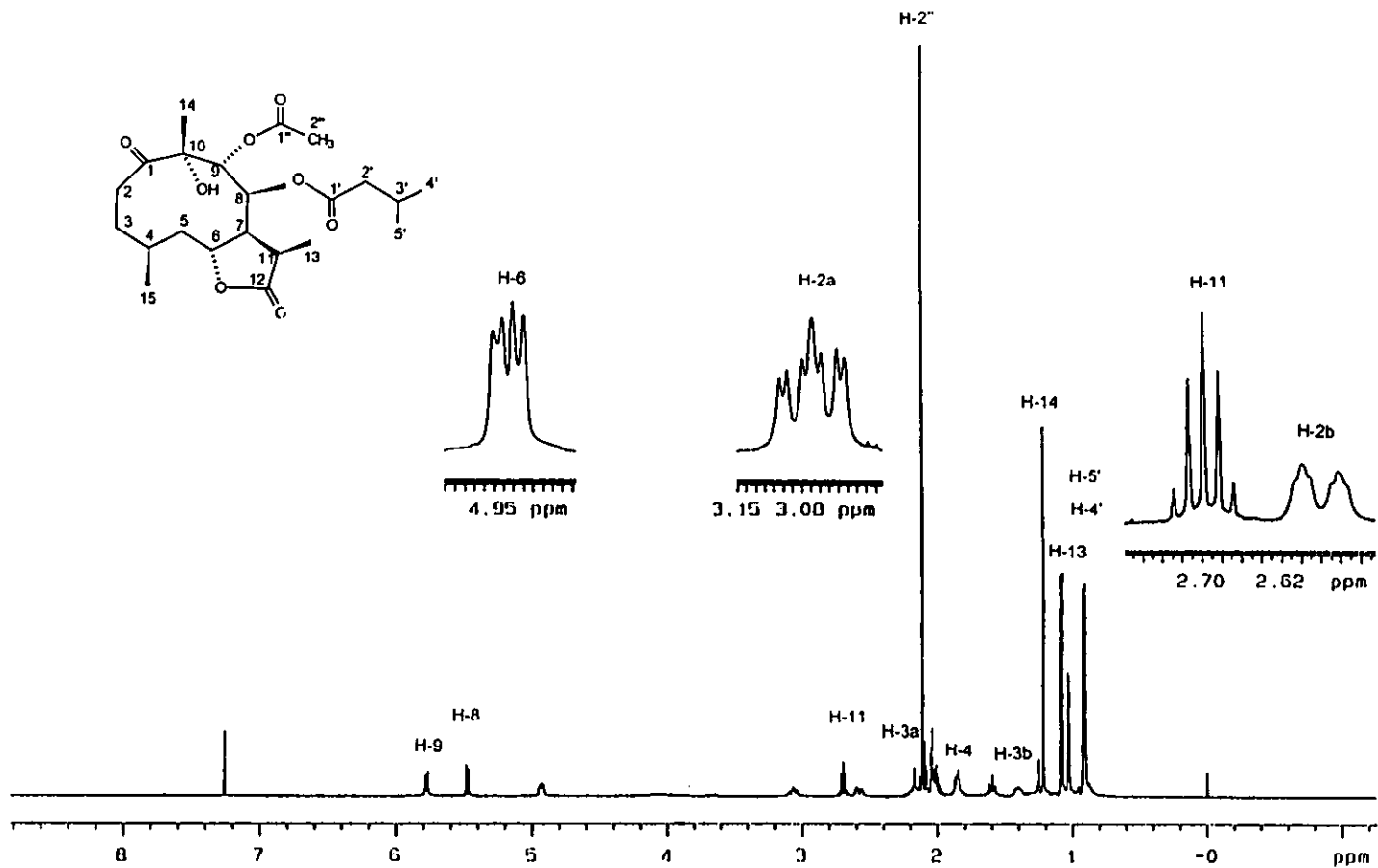


Espectro 10. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de Bis-desacil-2,3,11,13-tetrahydro-neurotenina B (34).

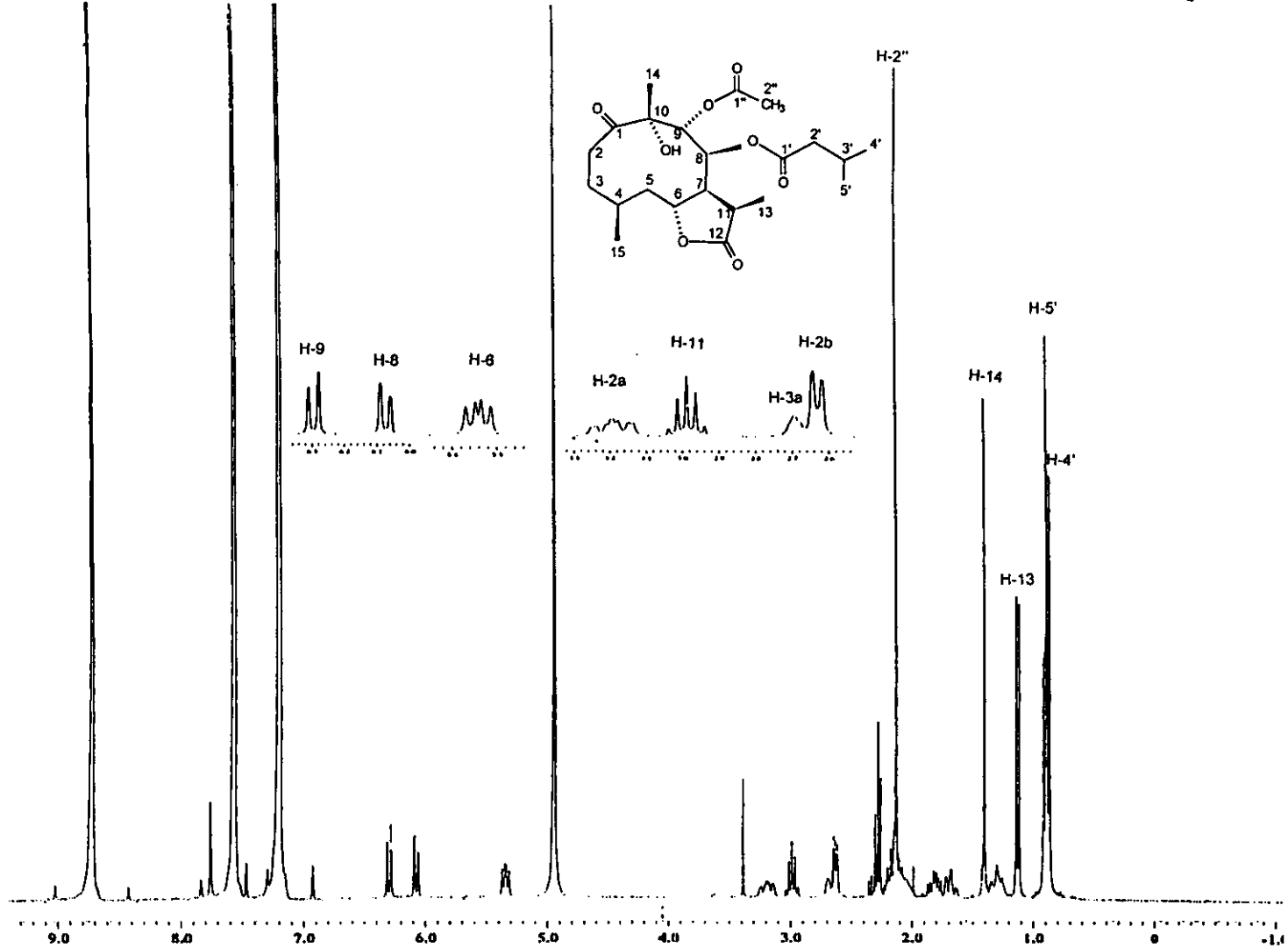


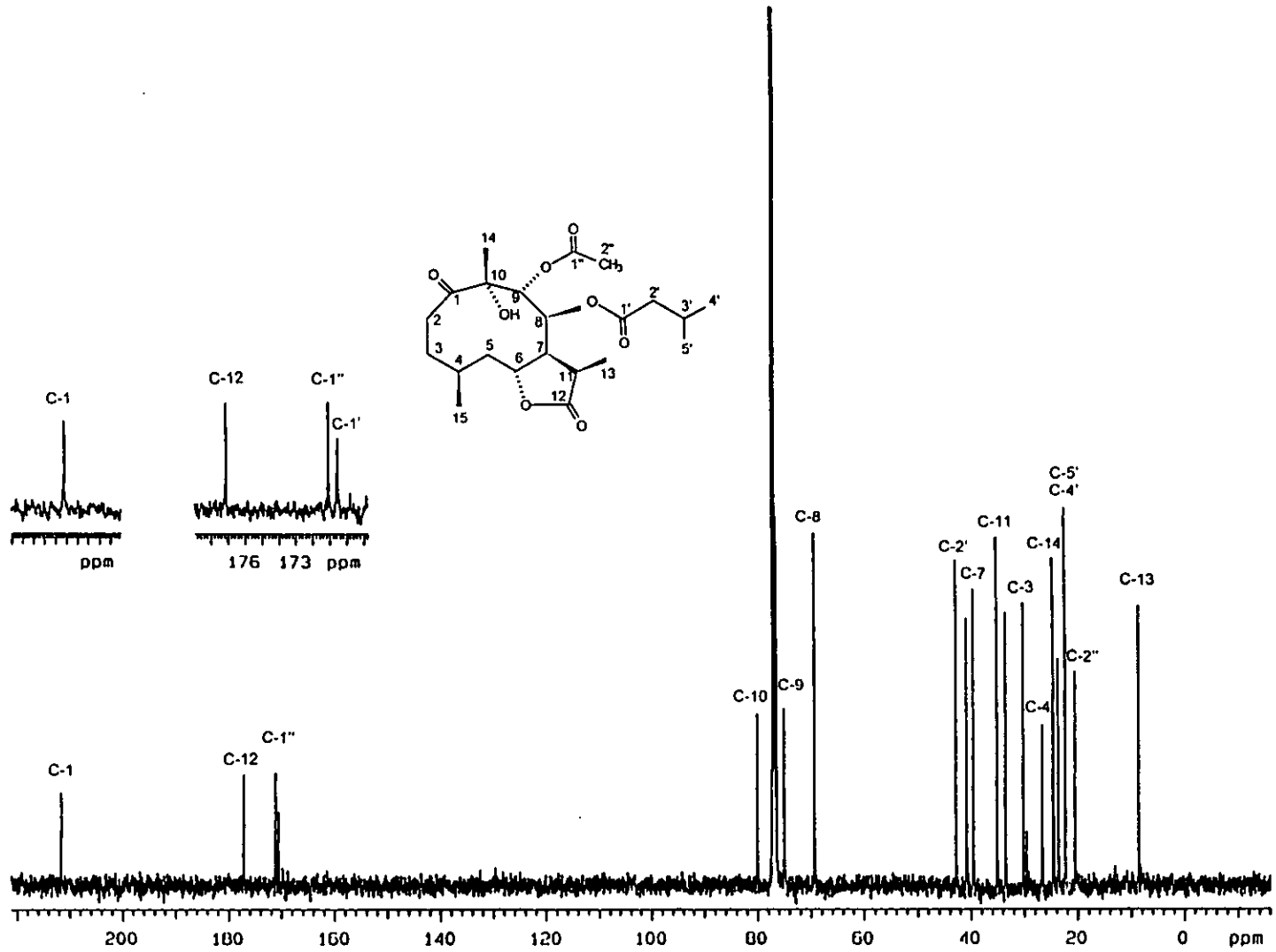


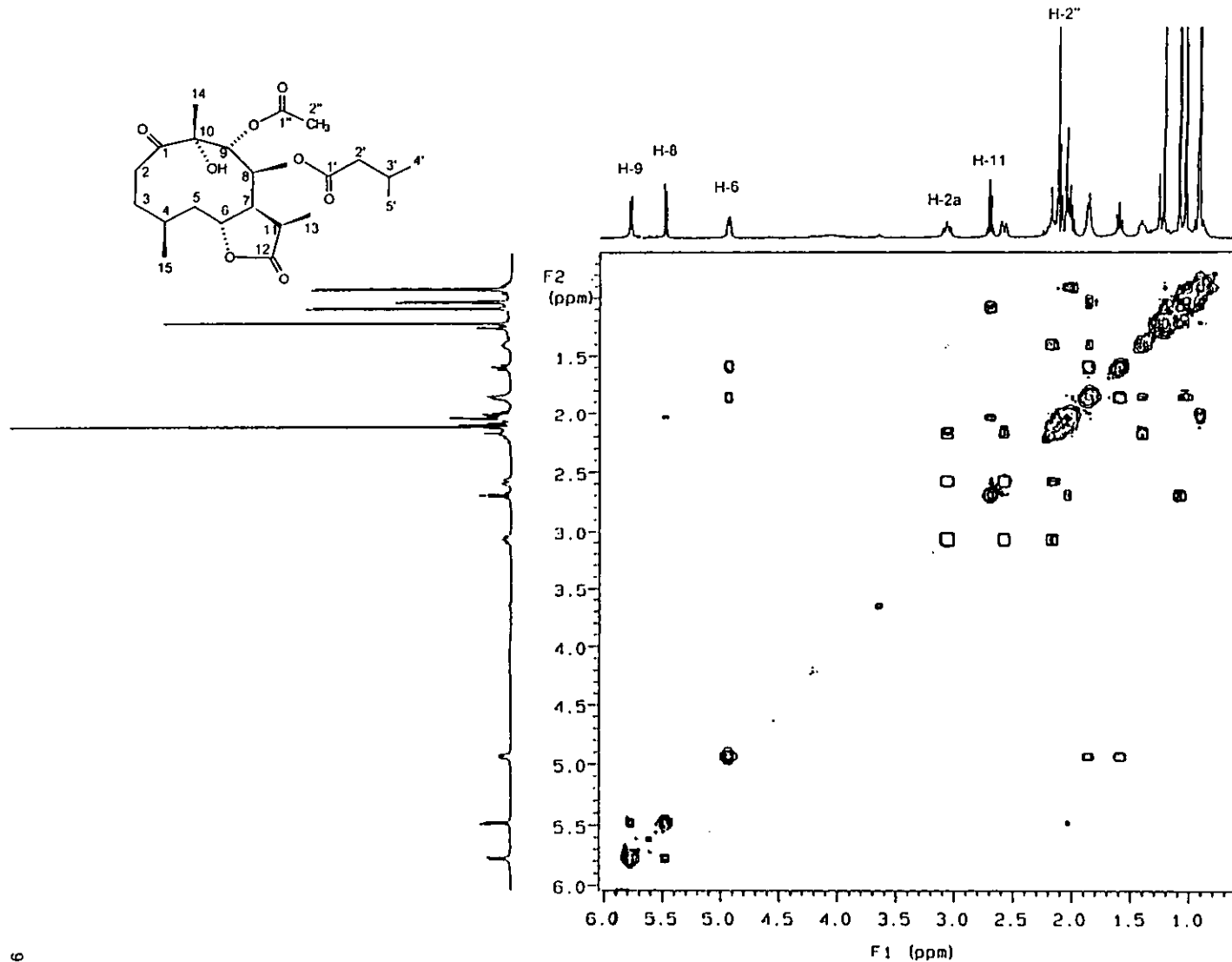
Espectro 12. IR (CHCl_3 , cm^{-1}) de (11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (35).



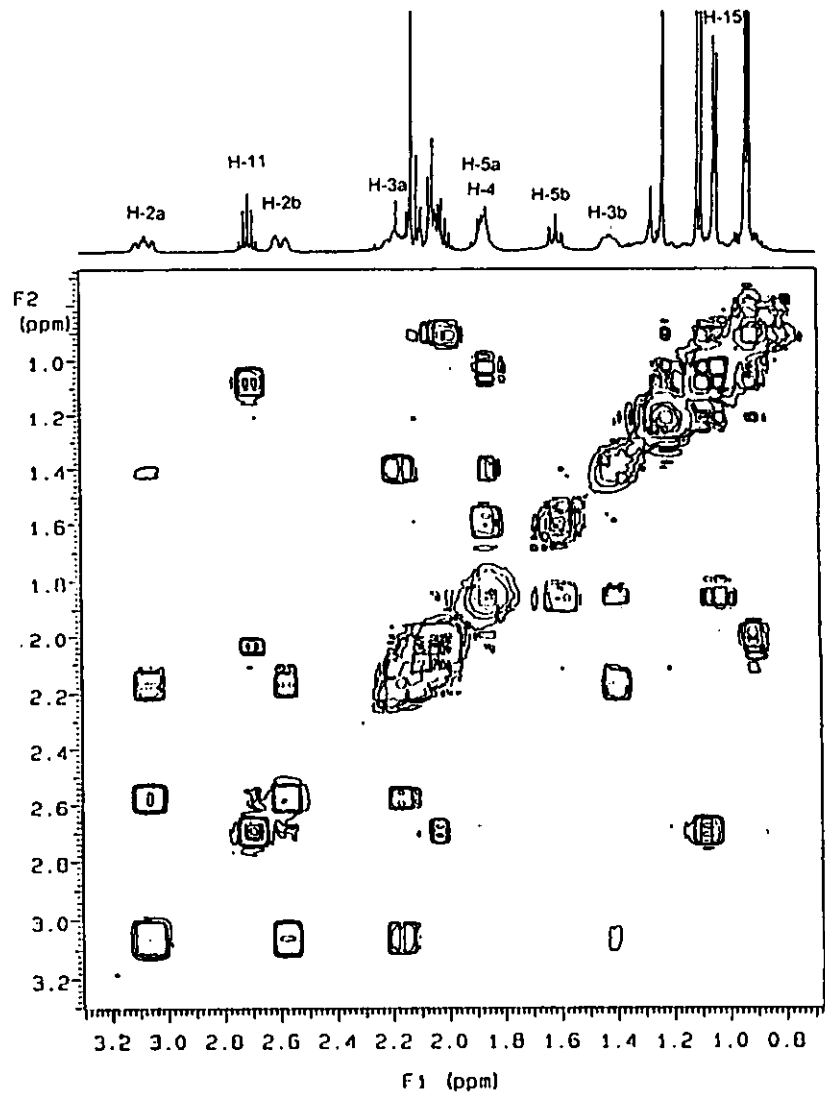
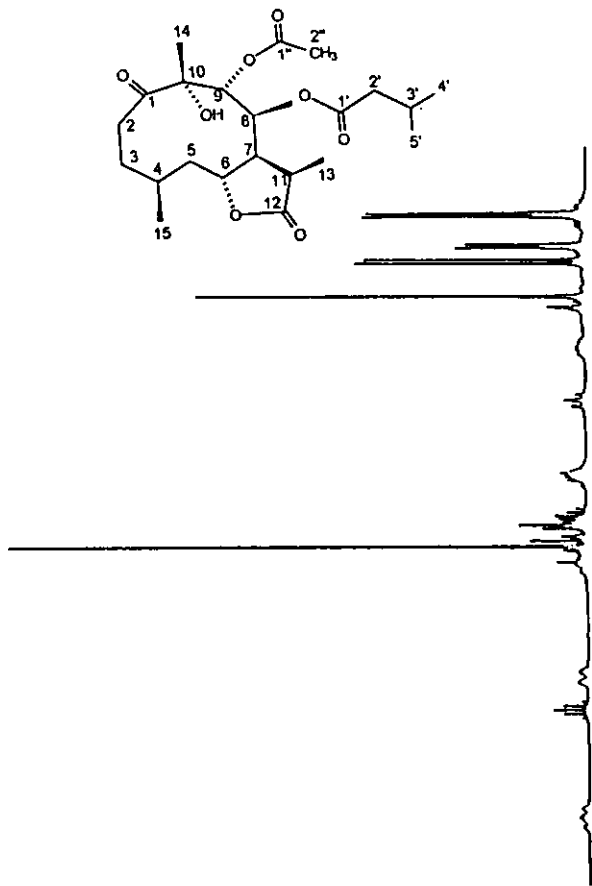
Espectro 13. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de (11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).



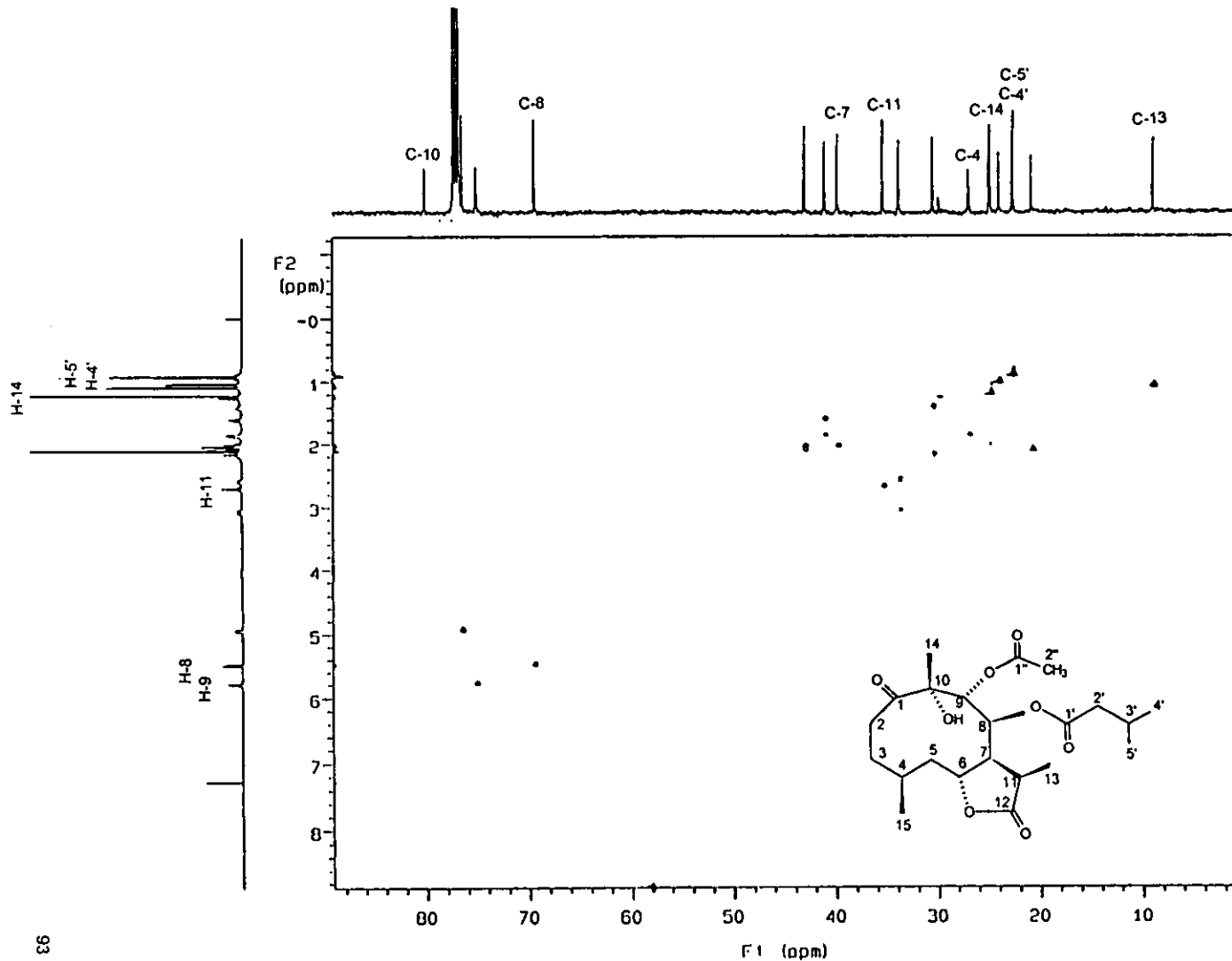




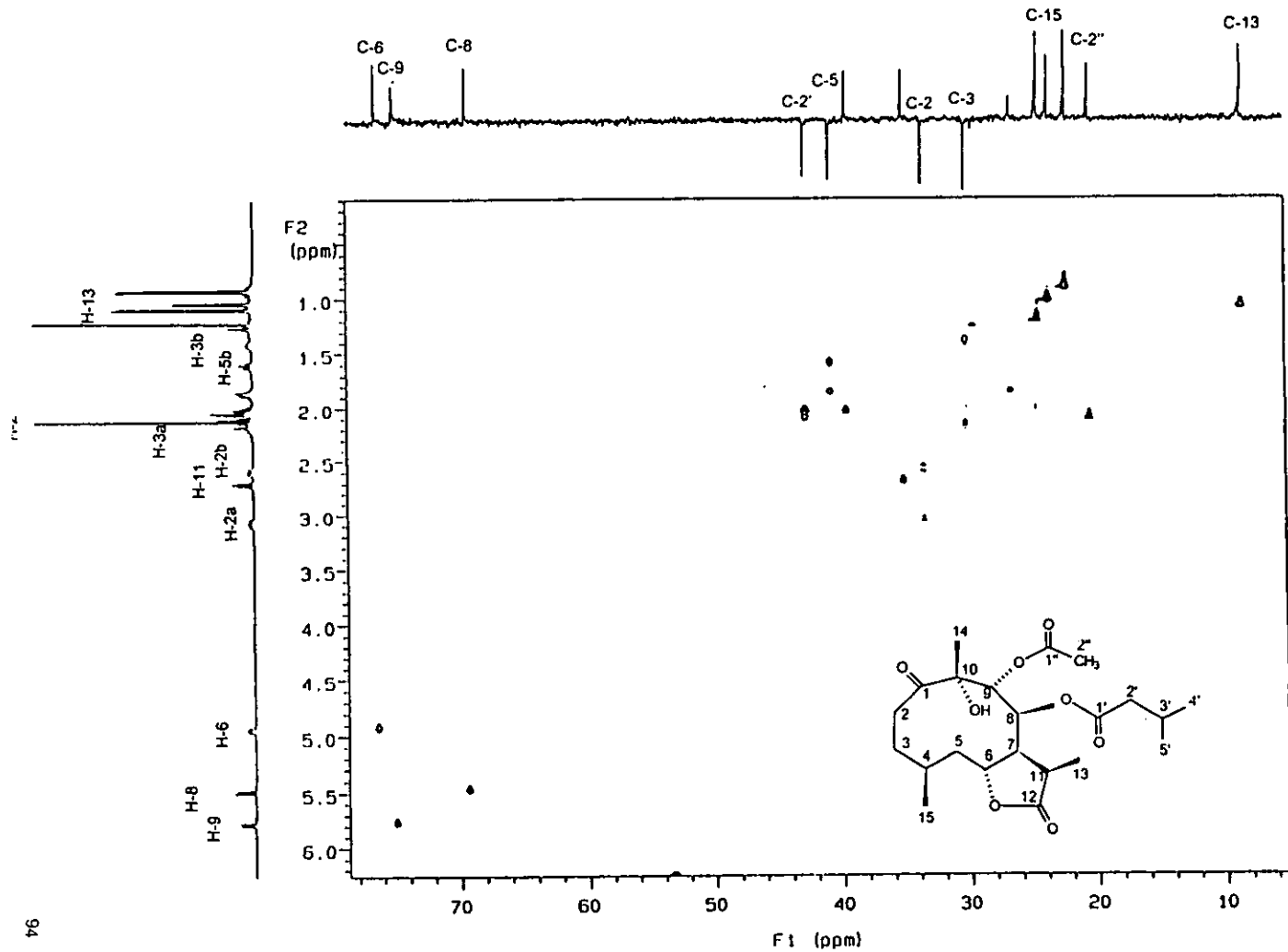
Espectro 16. COSY de (11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).



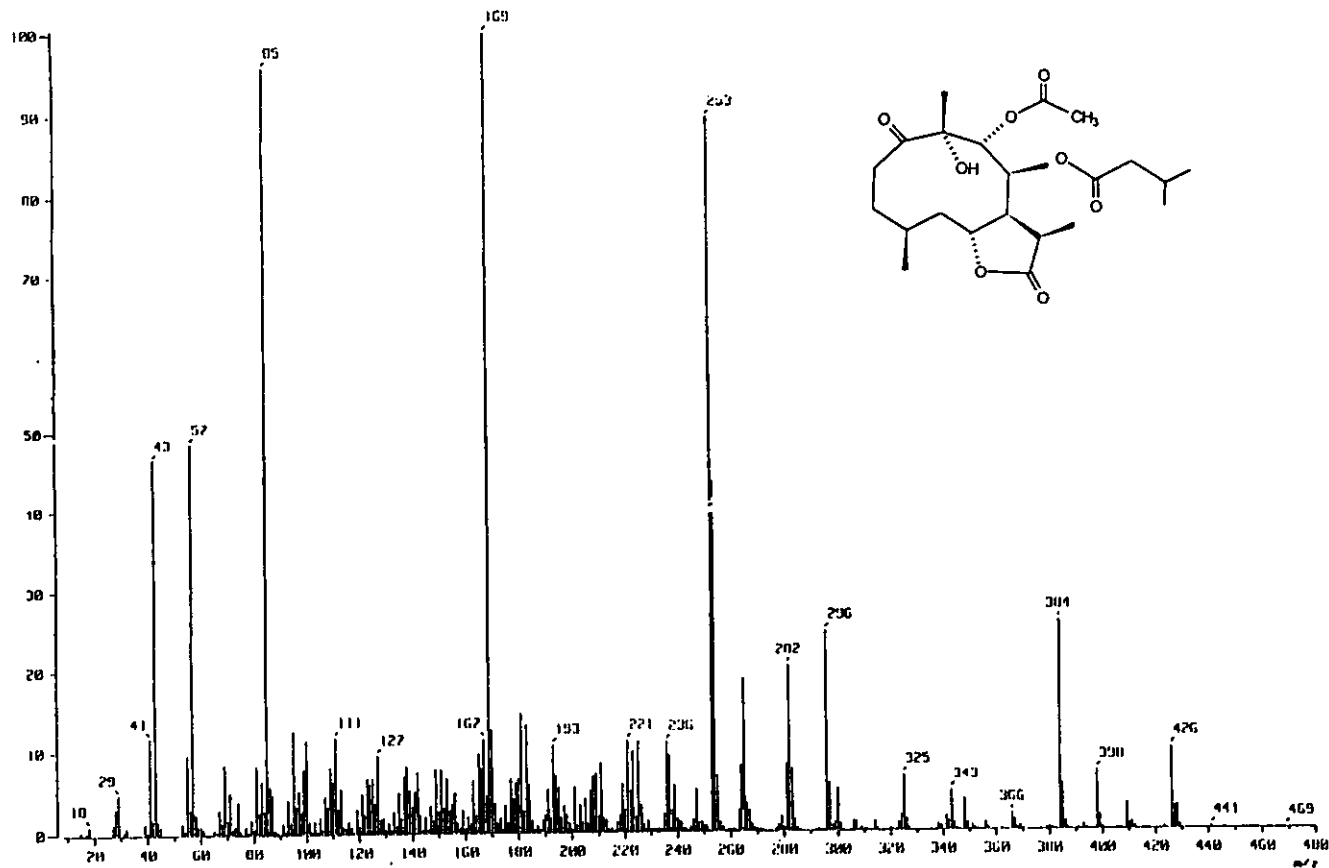
Espectro 17. COSY de (11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (35).



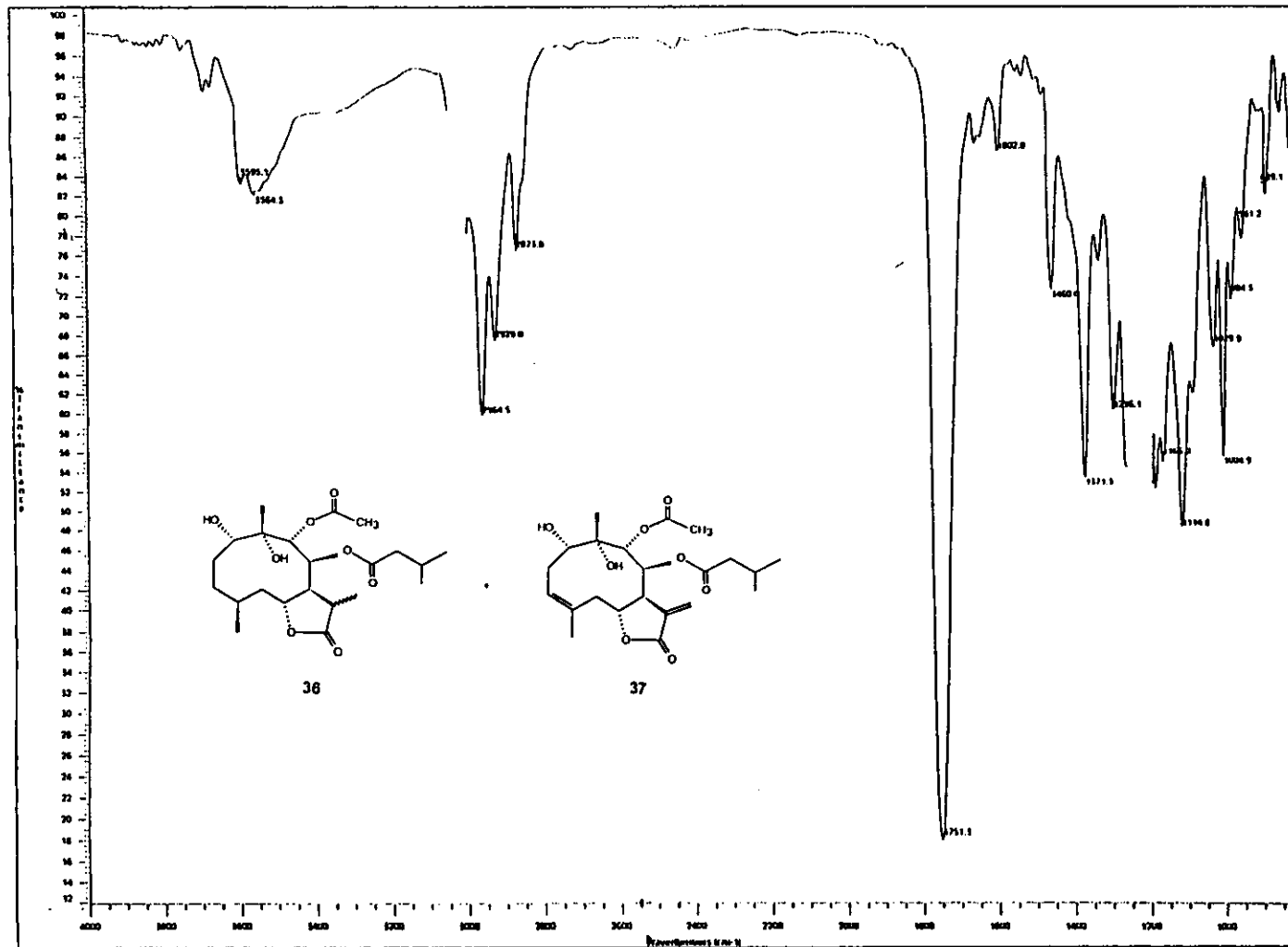
Espectro 18. HMBC de (11*R*)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (35).



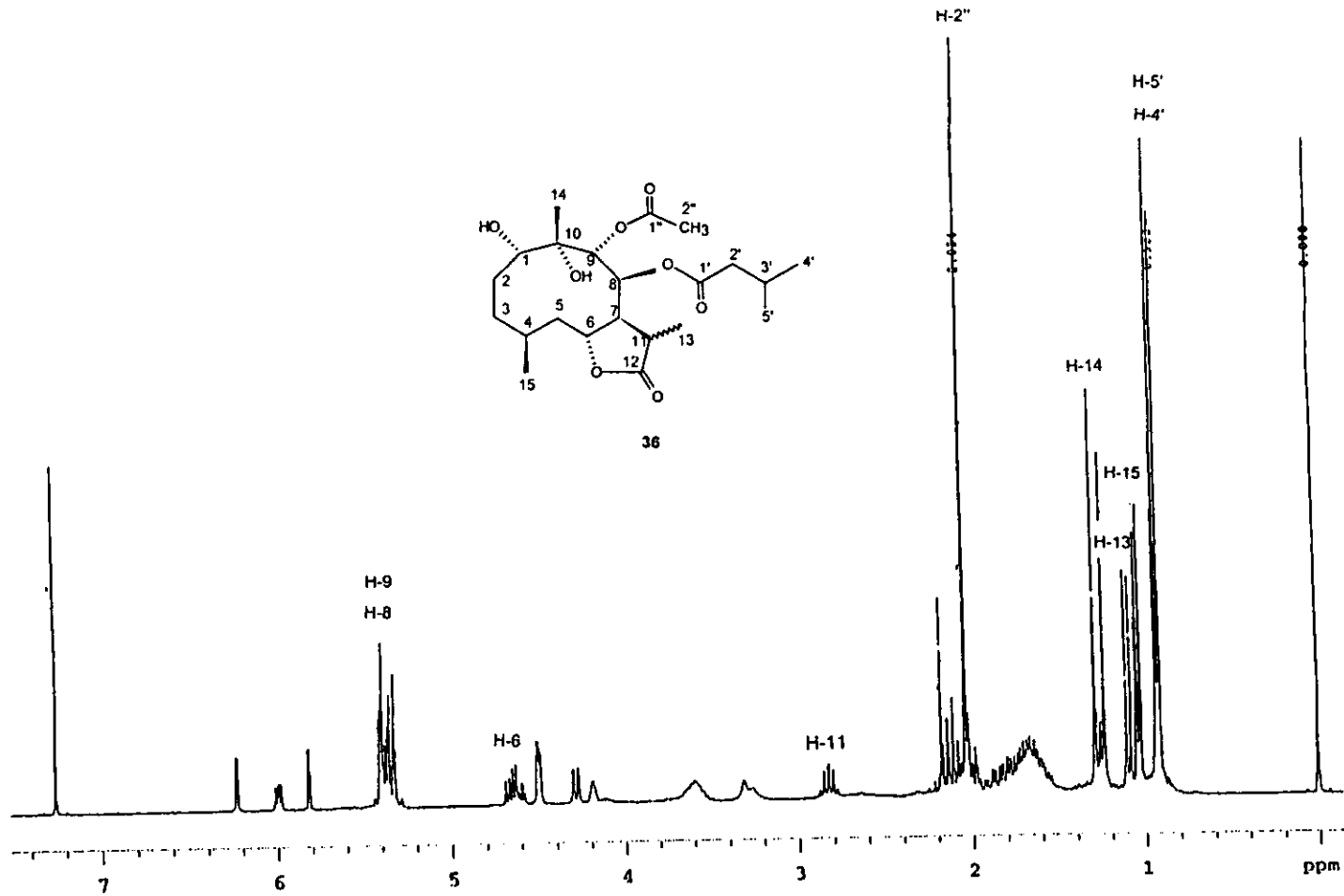
Espectro 19. HMBC de (11R)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolenina B (35).



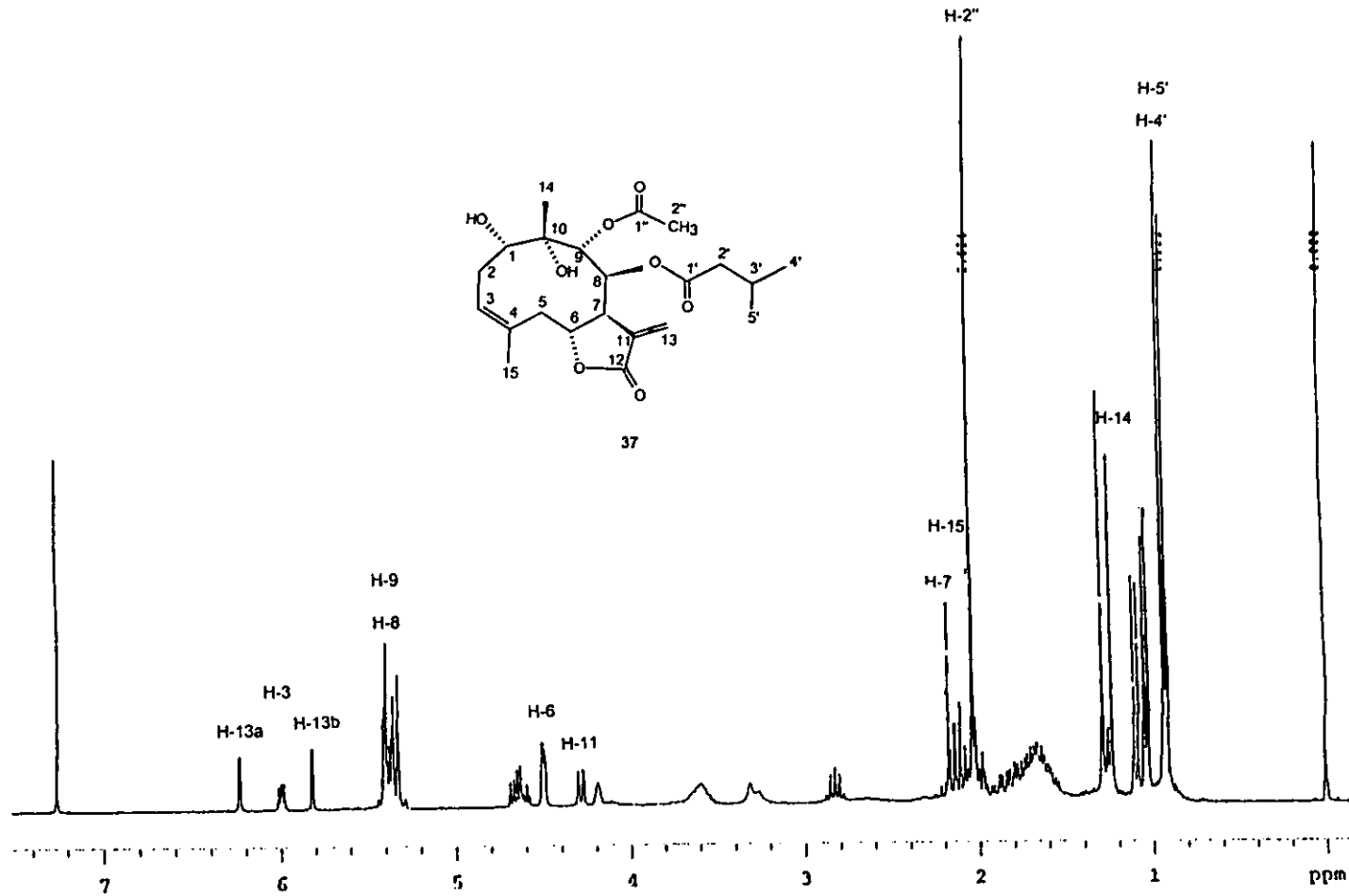
Espectro 20. EM (70 eV) de (11R)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (35).



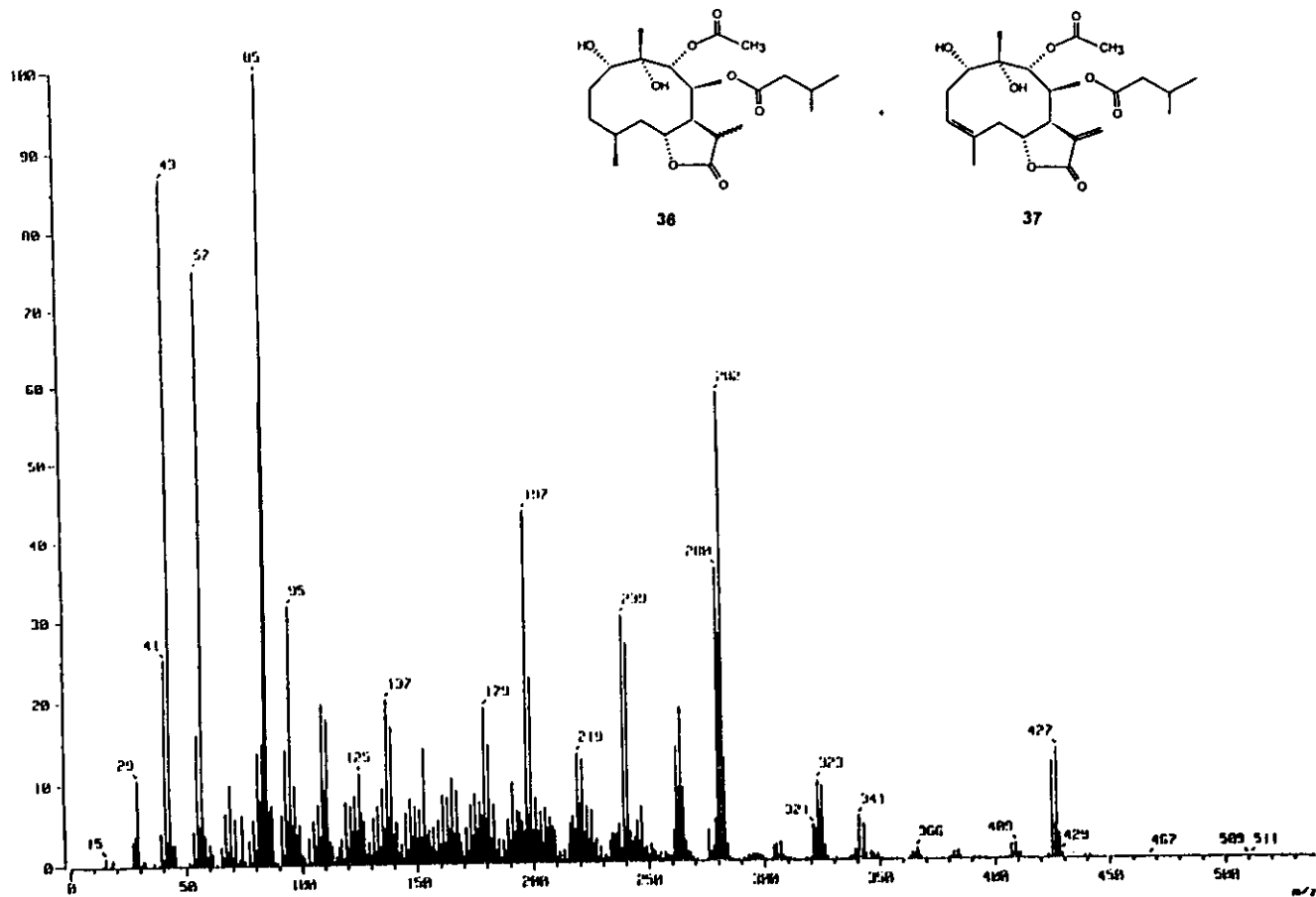
Espectro 21. IR (CHCl₃, cm⁻¹) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolelina B (36) y O1,1-Iso-neurolelina B (37).



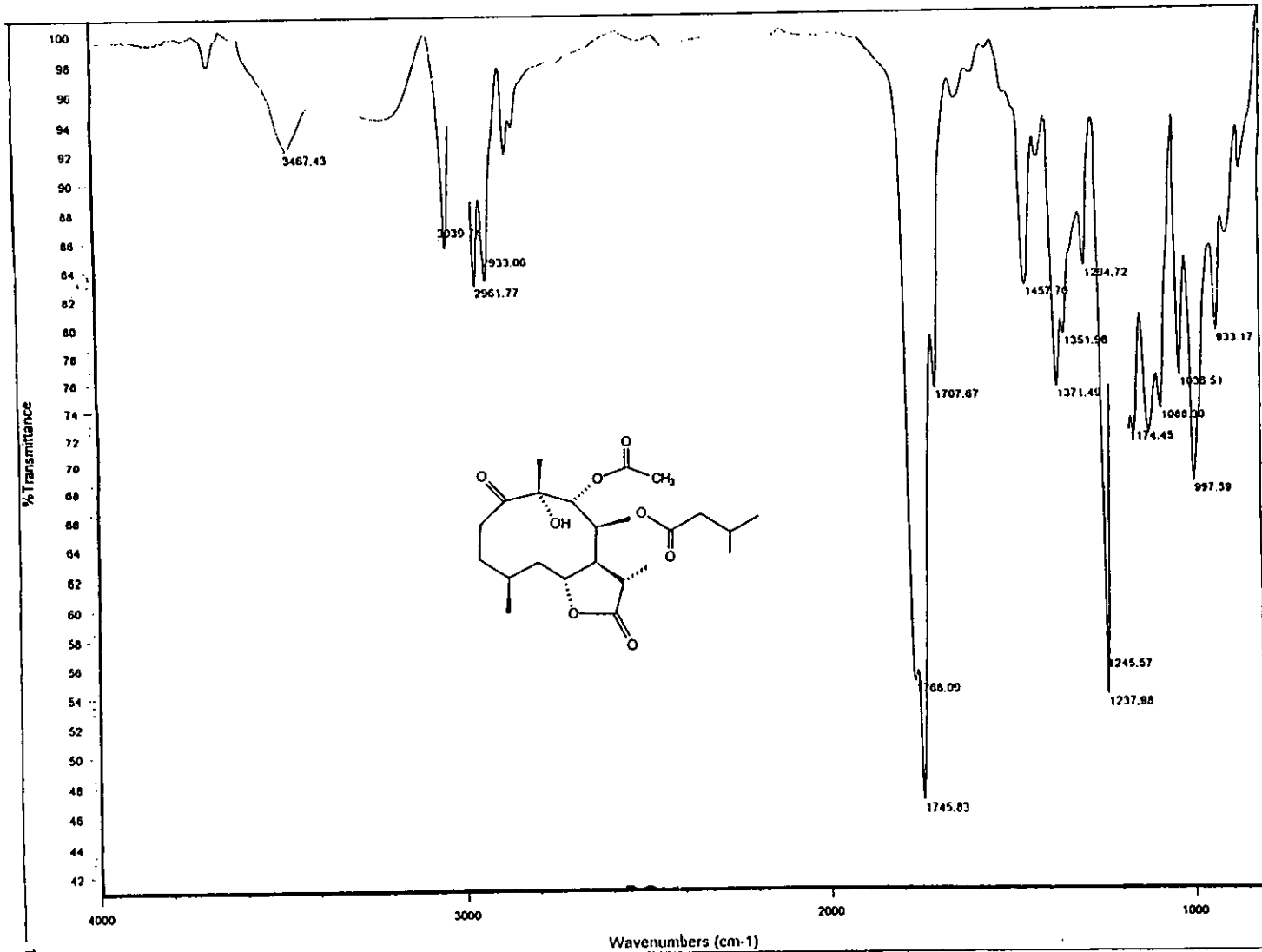
Espectro 22. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolelina B (36).



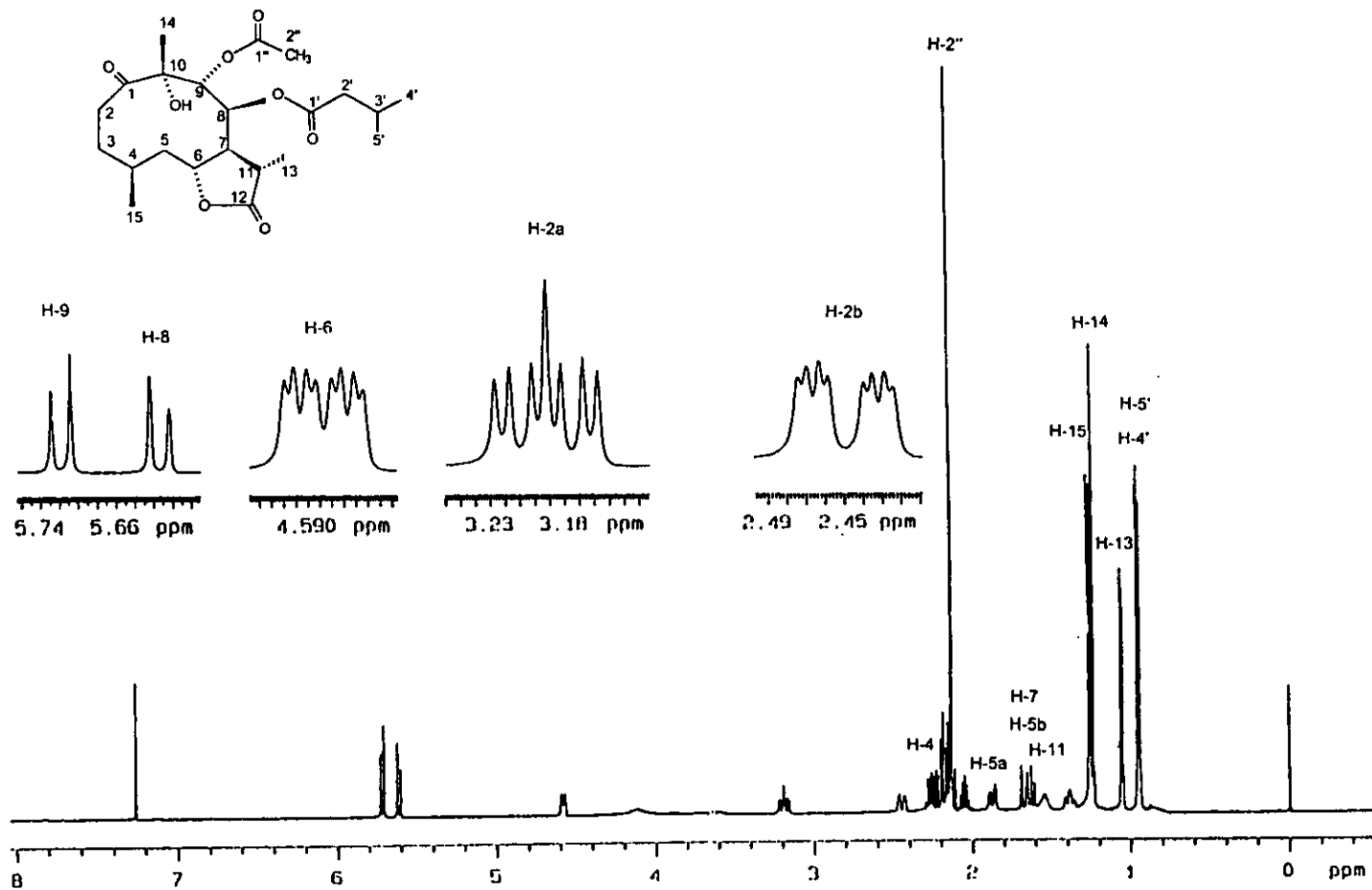
Espectro 23. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) de O1,1-Iso-neurolelina B (37).



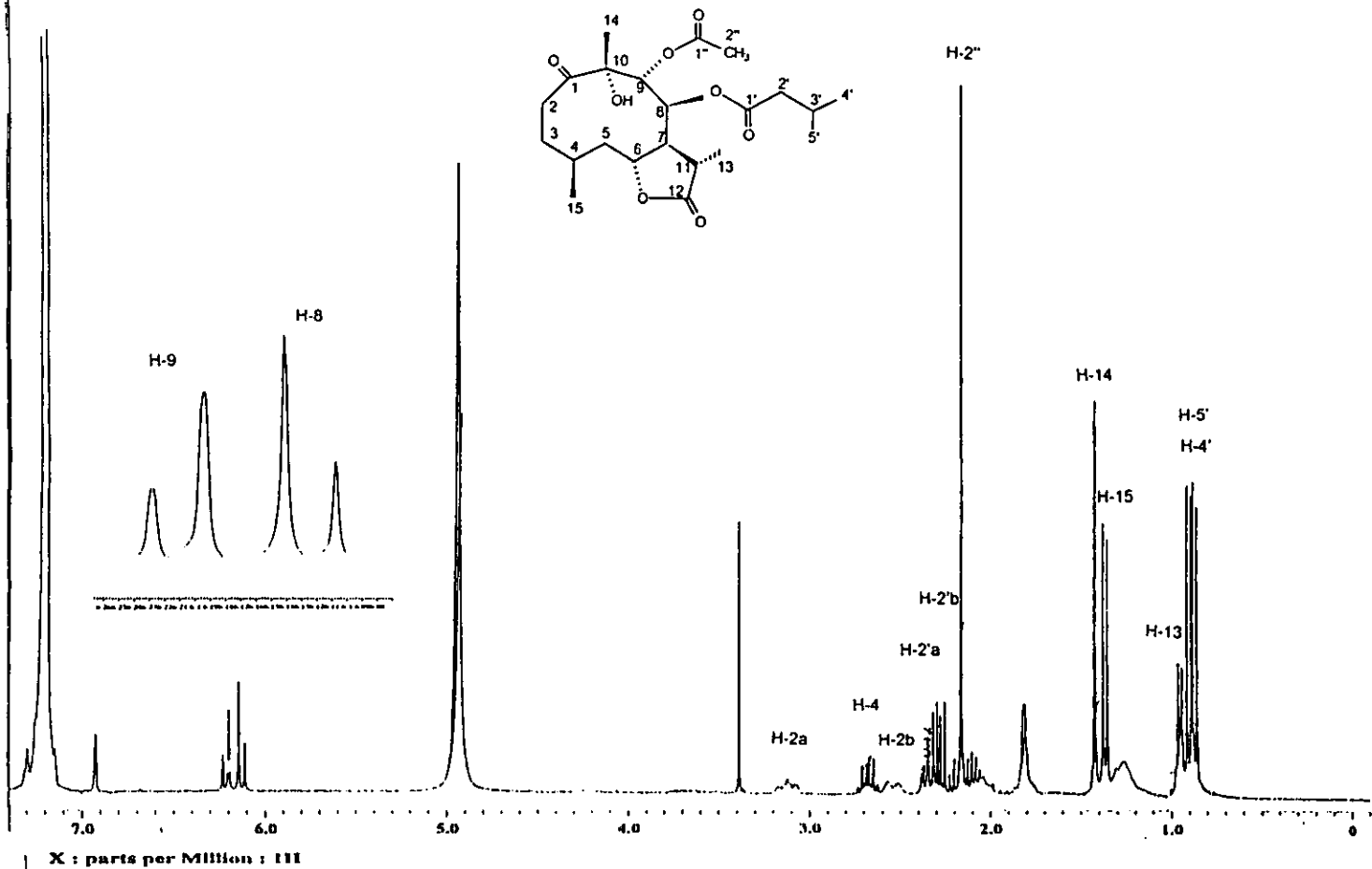
Espectro 24. EM (70 eV) de O1,1,2,3,11,13-Hexahidro-neurolelina B (36) y O1,1-Iso-neurolelina B (37).



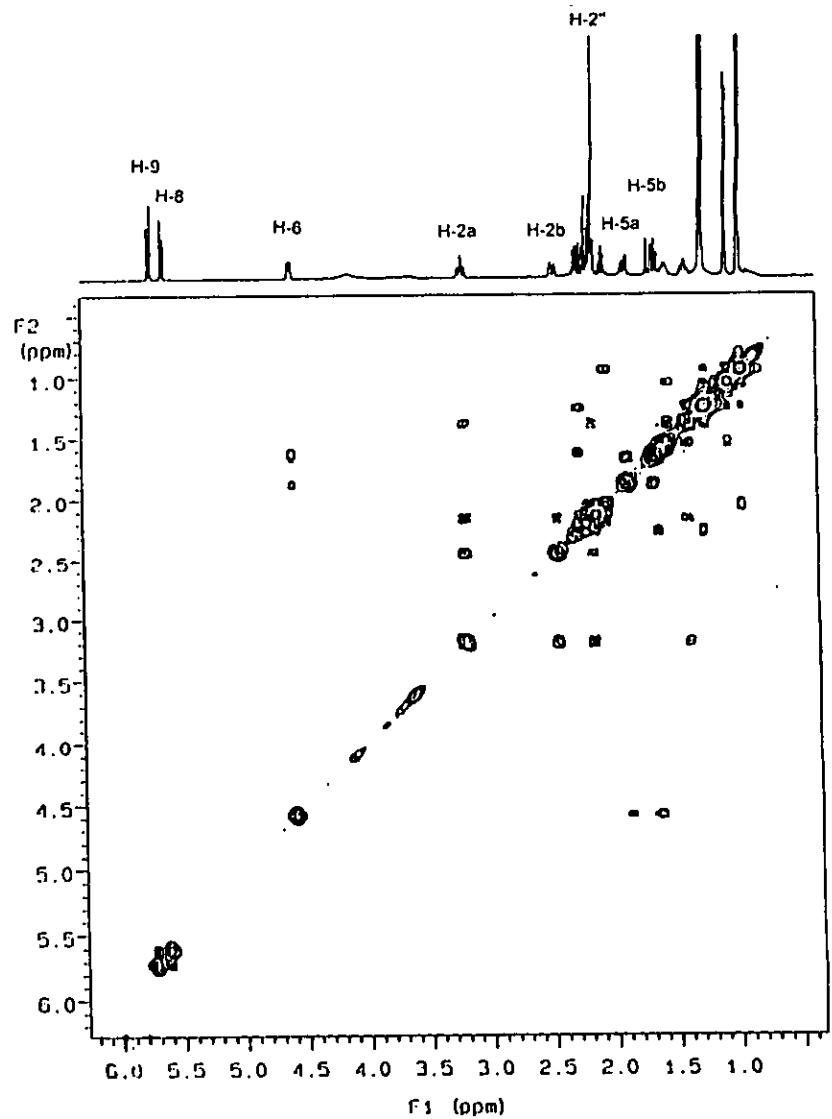
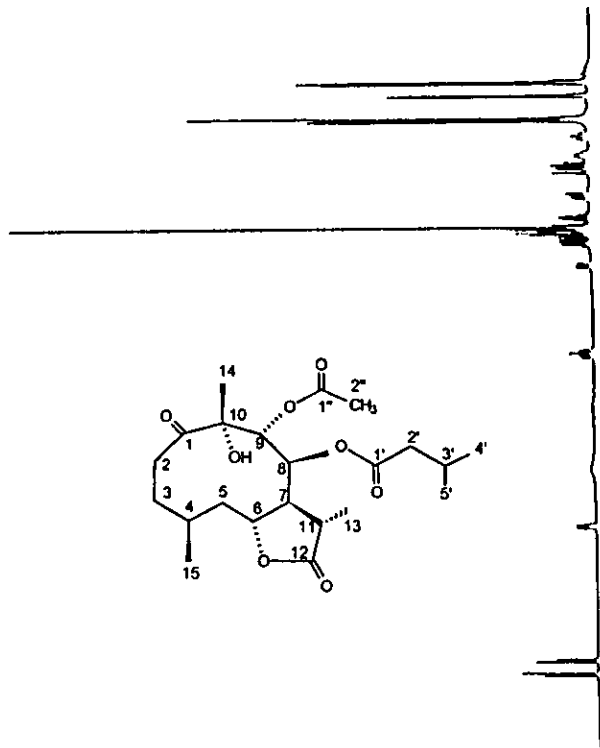
Espectro 25. IR (CHCl₃, cm⁻¹) de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (38).



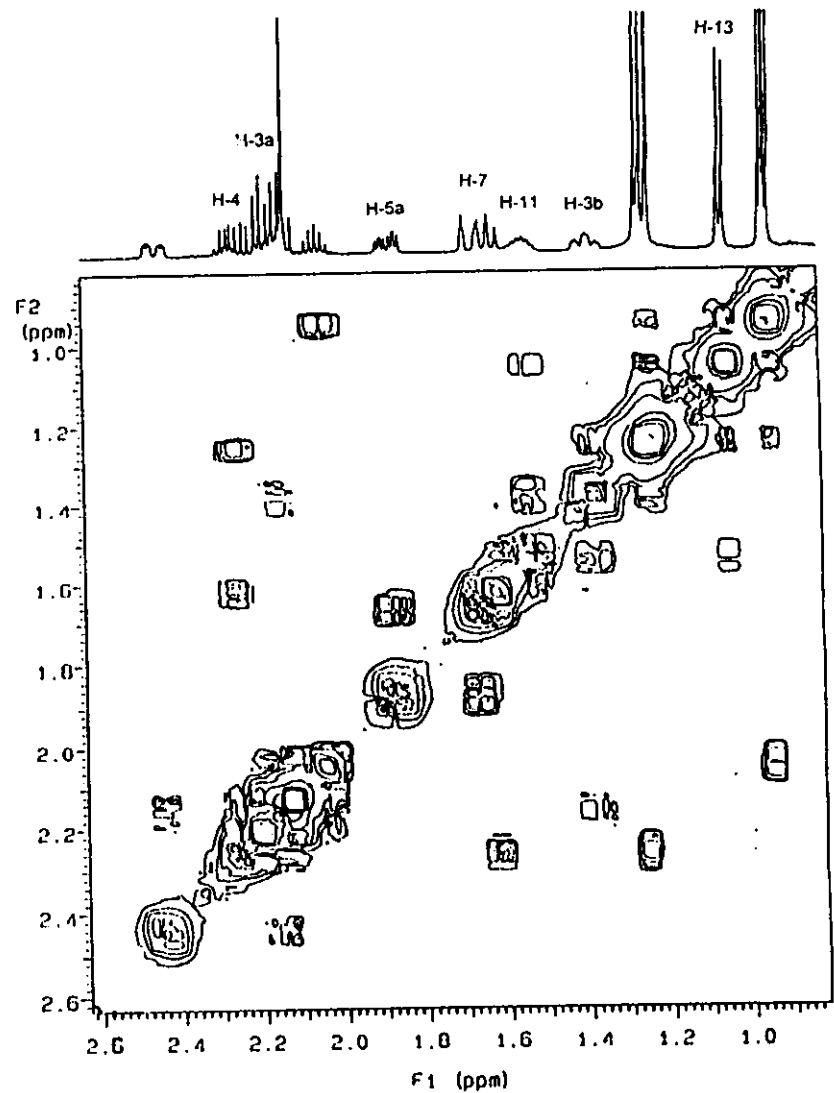
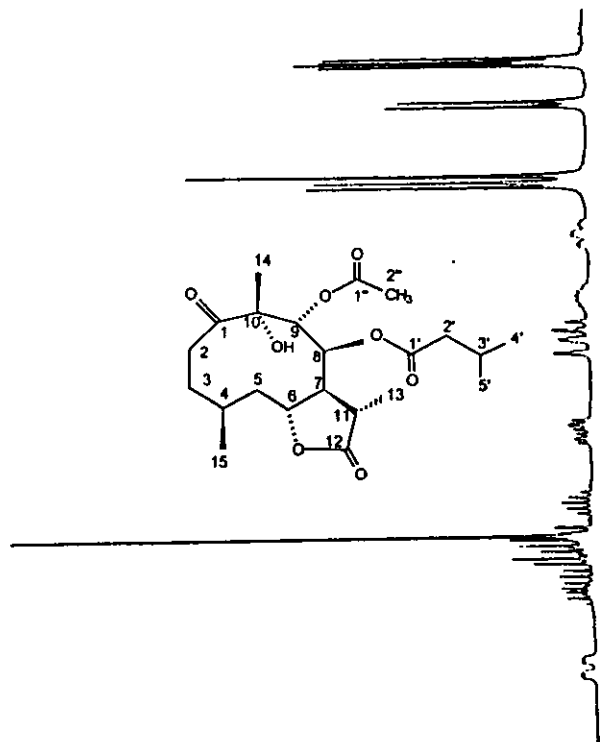
Espectro 26. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (38).



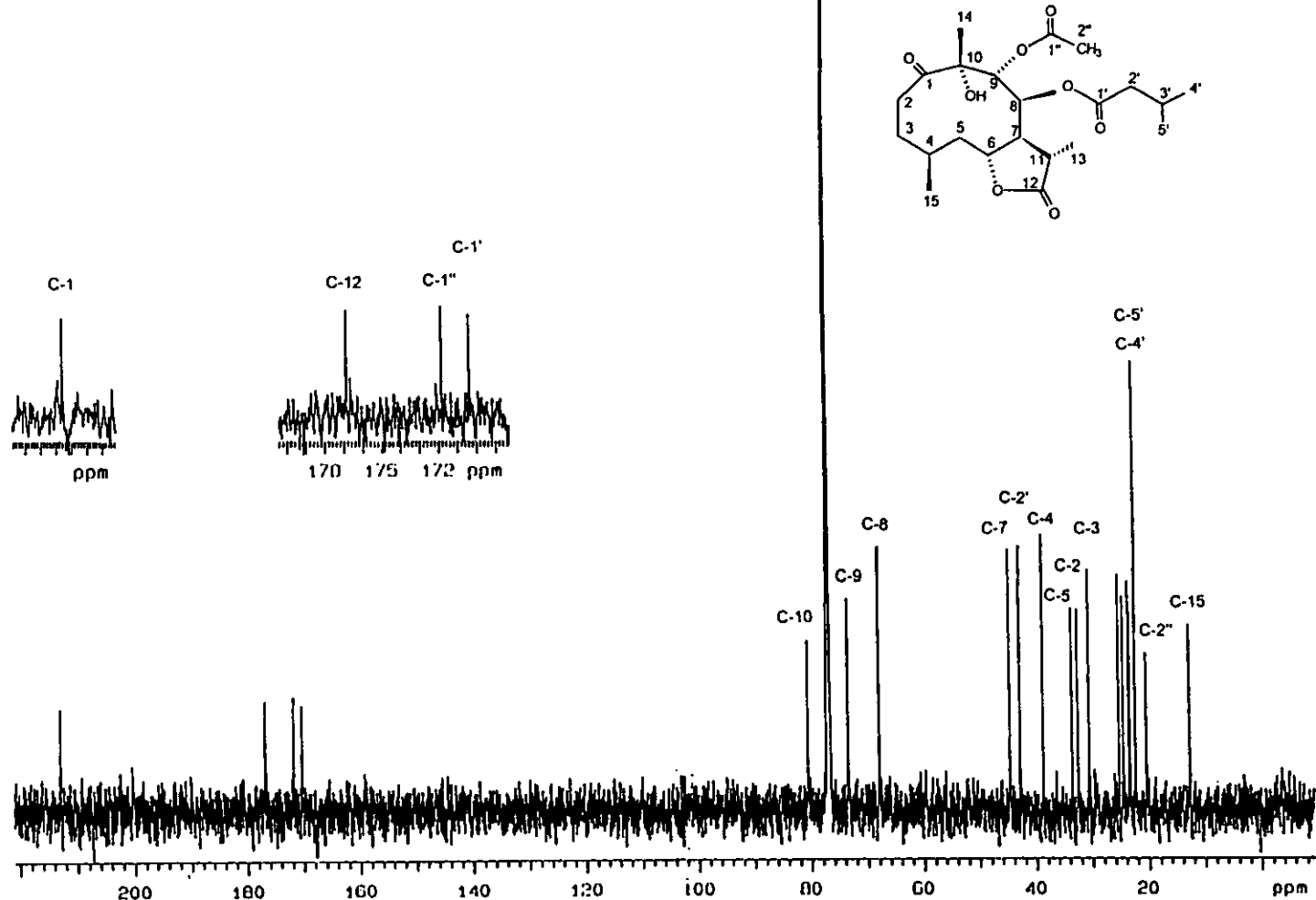
Espectro 27. RMN ¹H (300 MHz, C₅D₅N) de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (38).



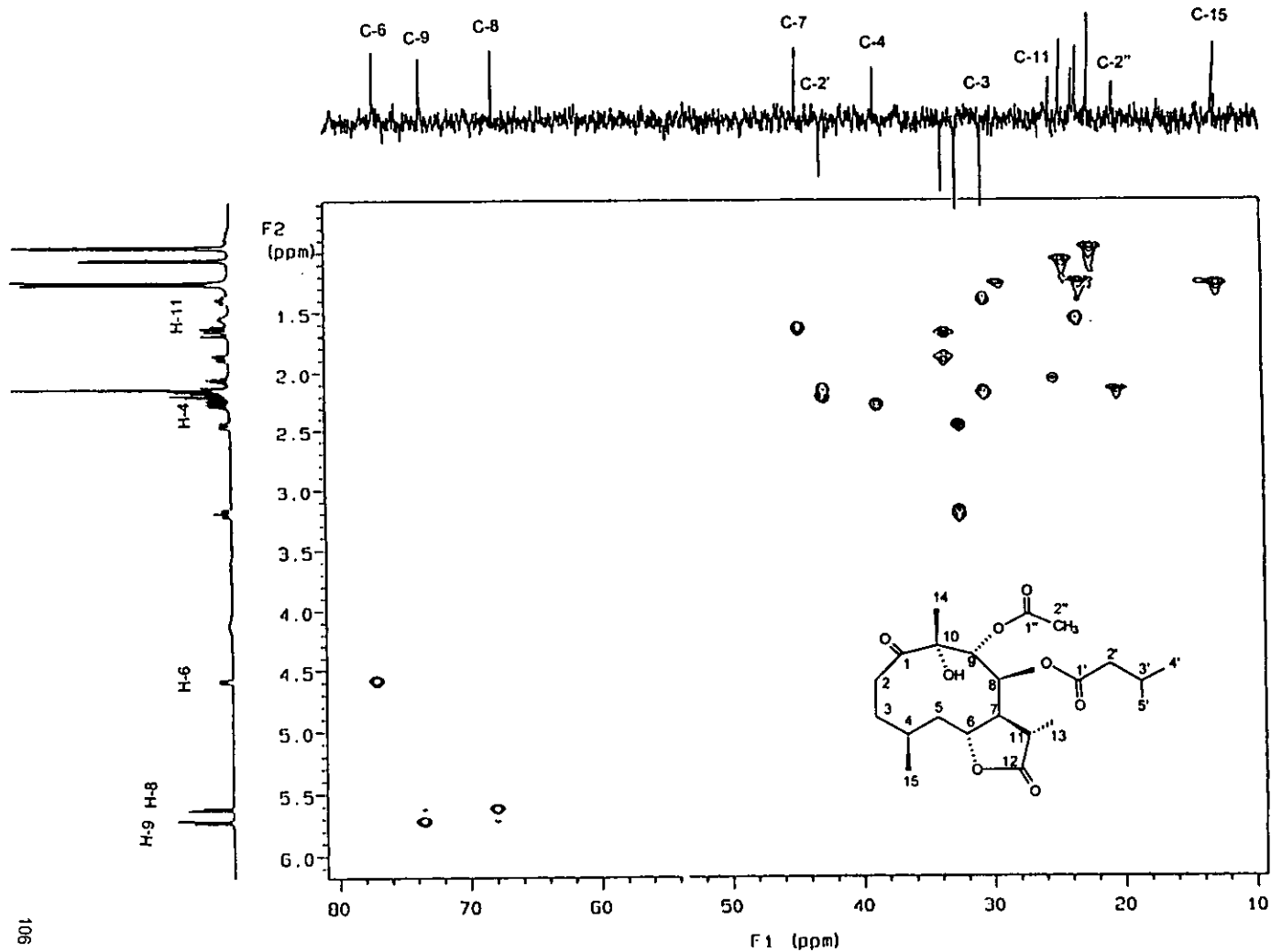
Espectro 30. COSY de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).



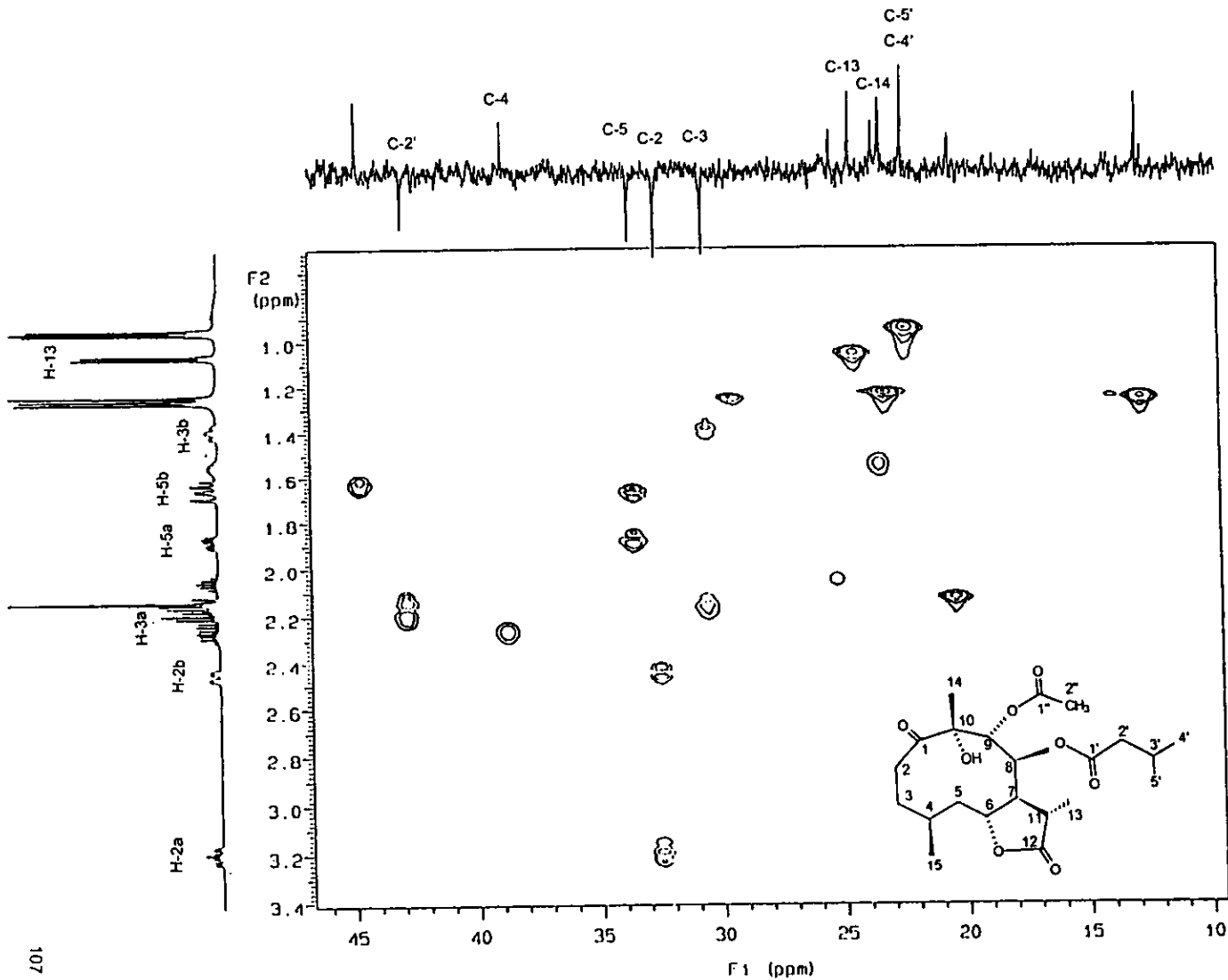
Espectro 29. COSY de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolelina B (38).



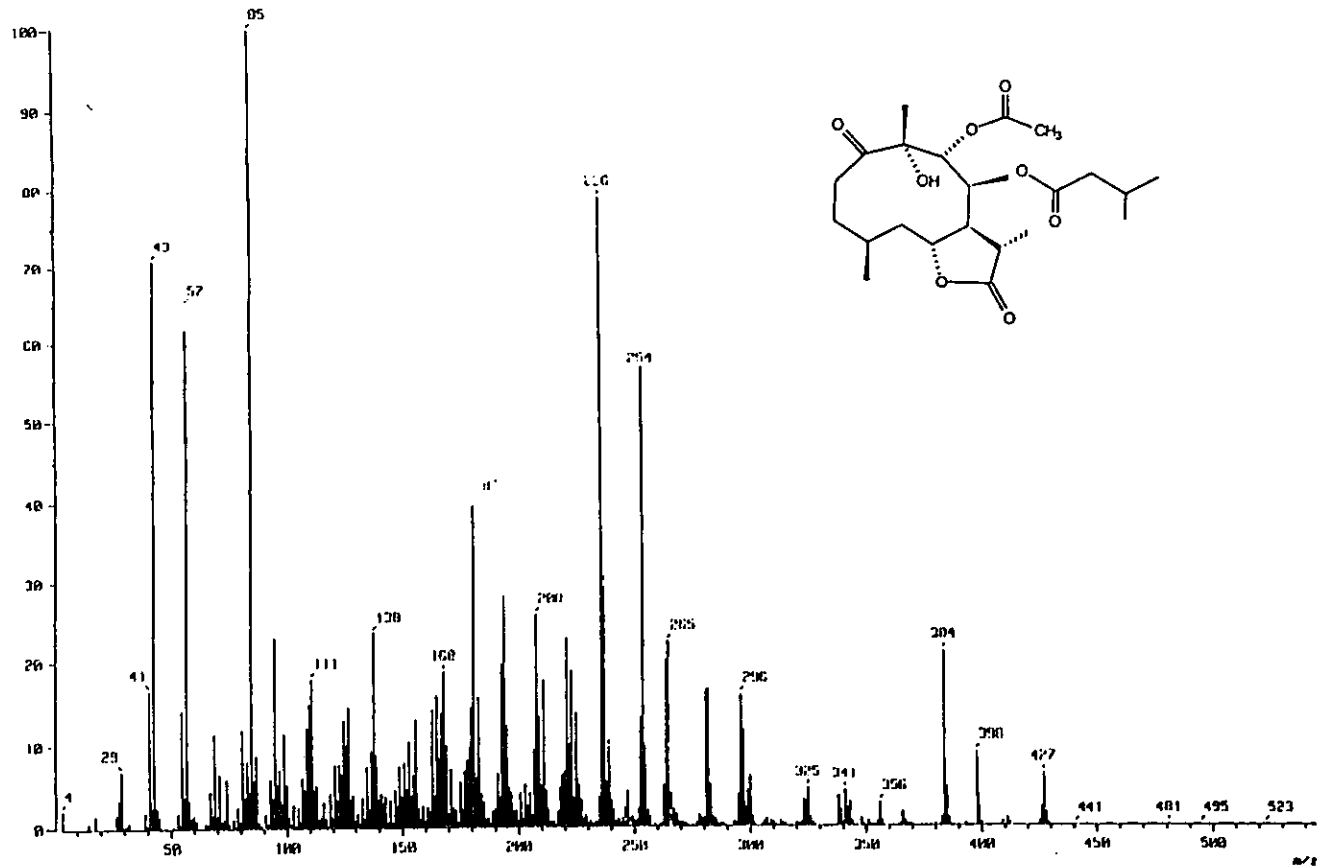
Espectro 28. RMN ^{13}C (125MHz, CDCl_3) de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).



Espectro 31. HMQC de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).



Espectro 32. HMQC de (11S)-2,3,11,13-Tetrahydro-neurolenina B (38).



Espectro 33. EM (70 eV) de (11S)-2,3,11,13-Tetrahidro-neurolepin B (38).

BIBLIOGRAFÍA.

1. Houghton, P. Roots of Remedies: Plants, People and Pharmaceuticals. *Chemistry and Industry* **1999**, 15-19.
2. Cox, P.; Balick, M. The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *Scientific American* **1994**, 60-65.
3. Espinoza, F.; Delgado, G. Relationship Between Ecology of Plant Defense and The Prospection of Secondary Metabolites with Potential Medicinal or Agricultural Application. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1998**, 26, 13-29.
4. Passreiter, C.; Wendisch, D.; Gondol, D. Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. *Phytochemistry* **1995**, 39, 133-137.
5. Nakanishi, K. Natural Products Chemistry. Vol 1, Academic Press, INC, Tokio, **1974**.
6. a) Fischer, N. H.; Fischer, H. D.; Franck, R. W.; Olover, E. J. Progress in The Chemistry of Organic Natural Products. Vol 38, Springer Verlag, Austria, **1979**.
b) Guzmán, S. Síntesis Estereoselectiva de Oplopanos a partir de Reacciones Transanulares de Germacradienos. Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM. **2000**.
7. Romo de Vivar, A. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Ed. Limusa, 1a. edición, México D. F., **1985**, pp. 69, 76-77.
8. Rodriguez, E.; Towers, G.; Mitchell, J. Biological Activities of Sesquiterpene Lactones. *Phytochemistry* **1976**, 15, 1573-1580.
9. Nuñez Meléndez E. Plantas Medicinales de Costa Rica y su Folclore. Ed. Universidad de Costa Rica, 2a. edición, Costa Rica, **1978**, pp. 130-131.
10. Passreiter, C. Pyrrolizidine Alkaloids from *Neurolaena lobata*. *Biochemical Systematics*

and Ecology 1998, 26, 839-843.

11. Borges del Castillo, J.; Manresa, T.; Rodríguez, L.; Vázquez, P. Panama Flora. II. New Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 762-765.
12. Lentz, D.; Clark, A.; Hufford, C.; Meurer, B.; Passreiter, C.; Cordero, J.; Ibrahim, O.; Okunade, A. Antimicrobial Properties of Honduran Medicinal Plants. *J. Ethnopharm.* 1998, 63, 253-263.
13. Berger, I.; Barrientos, A.; Cáceres, A.; Hernández, M.; Rastrelli, L.; Passreiter, C.; Kubelka, W. Plants Used in Guatemala for the Treatment of Protozoal Infections. II. Activity of Extracts and Fractions of Five Guatemalan Plants Against *T. cruzi*. *J. Ethnopharm.* 1998, 62, 107-115.
14. Manchand, P. S.; Blount, J. F. Stereostructures of Neurolenins A and B, Novel Germacranolide Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. *J. Org. Chem.* 1978, 43, 4352-4354.
15. Turner, B. Taxonomy of *Neurolaena* (Asteraceae-Heliantheae). *Pl. Syst. Evol.* 1982, 140, 119-139.
16. Kerr, K.; Mabry, T.; Yoser, S. 6-Hydroxy-6-methoxyflavonoids from *Neurolaena lobata* and *N. macrocephala*. *Phytochemistry* 1981, 20, 791-794.
17. Passreiter, C.; Sandoval, J.; Wright, C. Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena oaxacana*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 1093-1095.
18. Ulubelen, A.; Kerr, K.; Mabry, T. New 6-Hydroxyflavonoids and their Methyl Ethers and Glycosides from *Neurolaena oaxacana*. *Phytochemistry* 1980, 19, 1761-1766.
19. Passreiter, C.; Stoeber, S.; Ortega, A.; Maldonado, E.; Toscano, R. Germacranolide Type Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena macrocephala*. *Phytochemistry* 1999, 50, 1153-

1157.

20. Turner, B. A New Species of *Neurolaena* (Asteraceae, Heliantheae) from Southern Mexico. *Phytologia* **1990**, *69*, 172-174.
21. Passreiter, C. Quantification of Sesquiterpene Lactones in Leaves of *Neurolaena lobata*. *Phytochem. Anal.* **1998**, *9*, 67-70.
22. Bohlmann, F.; Natu, A.; Kerr, K. Thymol-Derivate aus *Neurolaena*-Arten. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 489-490.
23. Gupta, M.; Solis, N.; Avella, M.; Sanchez, C. Hypoglycemic Activity of *Neurolaena lobata* (L.) R. BR. *J. Ethnopharm.* **1984**, *10*, 323-327.
24. Passreiter, C.; Medinilla, B. Variability of Sesquiterpene Lactones in *Neurolaena lobata* of Different Origin. *Planta Med.* **1998**, *64*, 427-430.
25. Giron, L.; Freire, V.; Alonzo, A.; Cáceres, A. Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora Used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharm.* **1991**, *34*, 173-187.
26. Francois, G.; Passreiter, C.; Woerdenbag, H.; Van Looveren, M. Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 126-129.
27. Castro, O.; Barrios, M.; Chinchilla, M.; Guerrero, O. Evaluación Química y Biológica del Efecto de Extractos de Plantas Contra *Plasmodium berghei*. *Rev. Biol. Trop.* **1996**, *44*, 361-367.
28. Franssen, F.; Smeijsters, L.; Berger, I.; Medinilla, B. In Vivo and In Vitro Antiplasmodial Activities of Some Plants Traditionally Used in Guatemala Against Malaria. *Antrimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 1500-1503.

29. Cáceres, A.; López, B.; González, S.; Bereger, I.; Tada, I.; Maki, J. Plants Used in Guatemala for the Treatment of Protozoal Infections. I. Screening of Activity to Bacteria, Fungi and American Trypanosomes of 13 Native Plants. *J. Ethnopharm.* **1998**, *62*, 195-202.
30. Seaforth, C.; Ballah, S.; Rollocks, S.; Craig-James S. Medicinal Plants Used in Tobago. *Fitoterapia* **1998**, *69*, 523-527.
31. Heinrich, M. Ethnobotany of Mexican Compositae: An Analysis of Historical and Modern Sources. Compositae: Biology and Utilization Proceedings of the International Compositae Conference. Royal Botanic Gardens, Kew, Vol 2, UK, **1994**, pp. 475-503.
32. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Jacobsen, L.; Putnam, J.; McLaughlin, J.; Nichols, D. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plants Constituents. *Planta Med.* **1982**, *45*, 31-34.
33. Solis, P.; Wright, C.; Anderson, M.; Gupta, M.; Phillipson, D. A Microwell Cytotoxicity Assay Using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Panta Med.* **1993**, *59*, 250-252.
34. Hardman, J.; Limbird, L.; Perry, B. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9a. ed. Vol. 1, McGraw-Hill Interamericana. **1996**. pp. 661-731.
35. Merlos, M.; Gómez, L.; Giral, M.; Vericat, M.; Garcia-Rafanell, J.; Forn, J. Effects of PAF-Antagonists in Mouse Ear Edema Induced by Several Inflammatory Agents. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *104*, 990-994.
36. Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Della, R. The Croton Oil Ear Test Revisited. *Agents and Actions* **1985**, *17*, 347-349.
37. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82*, 1107-1112.

38. Vogel, A. A Text-book of Practical Organic Chemistry. 3a. ed. Ed. Longmans, Inglaterra, 1961, pp. 390-391, 486-488.
39. Adams, R.; Johnson, J.; Wilcox, Ch. Laboratory Experiments in Organic Chemistry. 7a. ed. Ed. McMillan Publishing AC. USA, 1979, pp. 227-231.
40. March, J. Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 3a. ed. Ed. John Wiley and Sons. USA, 1985, p. 684.
41. Quijano, L.; Romo de Vivar, A.; Rios, T. Revision of the Structures of Caleine A and B, Germacranolide Sesquiterpenes from *Calea zacatechichi*. *Phytochemistry* 1979, 18, 1745-1747.
42. Pritish, K.; Barua, N.; Sharma, P.; Barua, J.; Herz, W.; Watanabe, K.; Blount, J. Cyclotagitinin C and its Transformations. *J. Org. Chem.* 1983, 48, 732-738.
43. Delgado, G. Guzmán, S. Stereoselective Entry to the Bicycle [4.3.0] Skeleton of Oplopanes Using a Trnasannular Cyclization Strategy. *Synlett* 1991, S1, 1006-1008.
44. Turner, B. A new species of *Neurolaena* (Asteraceae) from Oaxaca, Mexico. *Phytologia* 1998, 84, 87-92.