



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

AISLAMIENTO, CARACTERIZACION Y EVALUACION MICROBIOLÓGICA DE DITERPENOS TETRACICLICOS DE Iostephane madrensis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:

MARIBEL FABIAN CASTELLANOS

DIRECTOR: M. EN C. ARTURO EDUARDO CANO FLORES

MEXICO, D. F.

2002



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LA VERDADERA META

*Señálate metas elevadas, esfuérate por alcanzarlas,
empéñate por lograr rápida y correctamente lo que
ambicionas*

Sueña con ello, vive para ello, lucha por ello.

*Sé constante y fiel a ti mismo y, tan seguro como hay
estrellas en el cielo llegará a tiempo a la verdadera
meta de la vida.*

(Hernan Fitz)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

A mis Padres:

Porfirio e Isabel, GRACIAS por los valores y buenos principios que siempre me han dado, por ser parte fundamental en mi formación como persona y como profesionista, por todo su apoyo incondicional en todo momento de mi vida.

Gracias por todo lo que me han dado.

A mi Esposo:

Raúl Lara Cruz, Gracias por el apoyo, incondicional que siempre he recibido, su comprensión, su respeto y cariño, ya que siempre ha sido una persona muy importante en mi vida.

A mis Hermanos:

*Rosalía, Yolanda, Angélica y Alberto
Gracias, por cada momento compartido,
por cada palabra de aliento para que
saliera siempre adelante.*

*Al M. en C. Arturo E. Cano Flores
Gracias por la confianza que deposito
en mí, así como, los conocimientos
dados y por cada palabra de apoyo
otorgada, Gracias por ser como es
y no cambie Profesor.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A Erika García Salgado
Gracias, por estar en todo momento
conmigo por los conocimientos
compartidos, por ser una gran amiga
a la cual le tengo una profunda admiración.*

*A Ernesto Rivera Becerril
Gracias, por tu amistad incondicional
por que estuviste conmigo cuando te
necesite dándome siempre tu apoyo,
siempre tendrás en mí a una amiga.*

*A Román I. Vera Debray
Gracias, por compartir conmigo tus
conocimientos, tu amistad, tu lealtad y
tu respeto. Agradezco tu apoyo incondicional
que siempre me distes.*

*A mis compañeros:
Eliana, Gladys, José Manuel y Eloy
Gracias, por su apoyo, su amistad y por
compartir conmigo todo momento.*

*Al personal técnico académico del
Instituto de química, por el apoyo
brindado en la realización del
presente trabajo.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

FABIÁN CASTELLANOS MARIBEL

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Aislamiento, caracterización y evaluación microbiológica de diterpenos tetracíclicos de *Iostephane madrensis*.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO
VOCAL	Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN
SECRETARIO	M. en C. ARTURO E. CANO FLORES
SUPLENTE	Q.F.B. MA. GALIA MARTÍNEZ FLORES
SUPLENTE	M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 28 de Febrero de 2002.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. ANTECEDENTES.....	4
1. PROPIEDADES DE LA FAMILIA <i>Compositae</i> (<i>Asteraceae</i>).....	6
1.1 Características de la familia <i>Compositae</i> (<i>Asteraceae</i>).....	6
1.2 Habitat.....	6
1.3 Componentes aislados de la familia <i>Compositae</i>	7
2. <i>Iostephane madrensis</i>	8
2.1 Distribución en México.....	8
2.2 Características morfológicas.....	8
2.3 Farmacología.....	9
3. TERPENOIDES.....	10
3.1 Características generales.....	10
3.1.1 Usos y Propiedades.....	11
3.2 Monoterpenos.....	11
3.3 Sesquiterpenos.....	12
3.4 Diterpenos.....	13
3.4.1 Biosíntesis de Terpenoides.....	17
3.4.2 Diterpenos de <i>Viguiera</i> y <i>Tithonia</i>	22
4. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS.....	27
4.1 Método de dilución.....	28
4.2 Método de difusión.....	28
4.3 Método bioautográfico.....	29
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
IV. OBJETIVO GENERAL.....	31
I. Objetivos específicos.....	31
V. HIPÓTESIS.....	32
VI. MATERIAL Y EQUIPO.....	33
1. Material para estudio químico.....	33
2. Material para ensayo microbiológico.....	34

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. PARTE EXPERIMENTAL.....	36
1. Diagrama de flujo.....	36
2. Análisis químico del extracto cloroformico de <i>Iostephane madrensis</i>	37
2.2 Ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.....	37
2.3 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.....	37
2.4 Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.....	38
2.5 Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.....	38
3. Obtención del traquiloban-19-oato de metilo.....	38
4. Obtención del 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo.....	39
5. Obtención del Ácido 15 α -acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico.....	40
6. Determinación de la actividad antimicrobiana por el Método de Mitscher.....	41
6.1 Preparación de las muestras.....	41
6.2 Prueba microbiológica.....	42
VIII. RESULTADOS.....	43
1. Tabla de resultados: Espectro de Infrarrojo.....	43
2. Tabla de resultados: RMN.....	44
2.1 Tabla de resultados RMN- ¹ H 80 MHz CDCl ₃ , TMS.....	44
2.2 Tabla de resultados RMN- ¹ H 300 MHz, CDCl ₃ , TMS.....	45
2.3 Tabla de resultados RMN- ¹³ C 20 MHz, CDCl ₃ , TMS.....	46
3. Tabla de resultados: Espectro de masas (I. E. m/z).....	47
4. Tabla de resultados: Evaluación microbiológica.....	48
IX. ESPECTROS.....	49
1. Espectro IR (CHCl ₃) del Ácido traquiloban-19-oico.....	49
2. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del Ácido traquiloban-19-oico.....	50
3. Espectro IR del Traquiloban-19-oato de metilo.....	51
4. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del Traquiloban-19-oato de metilo.....	52
5. Espectro IR (CHCl ₃) del 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.....	53
6. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano.....	54
7. Espectro IR (CHCl ₃) del Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.....	55
8. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz, CDCl ₃ , TMS) del Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico.....	56
9. Espectro IR (CHCl ₃) del Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico.....	57
10. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico.....	58
11. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz CDCl ₃ , TMS) del Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico.....	59
12. Espectro de IR (CHCl ₃) del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.....	60
13. Espectro de RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.....	61
14. Espectro RMN- ¹³ C (20 MHz CDCl ₃ , TMS) del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.....	62

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

15. Espectro IR (CDCl ₃) del Ácido 15 α -acetoxi-traquiloban-19-oico.....	63
16. Espectro RMN- ¹ H (80 MHz CDCl ₃ , TMS) del Ácido 15 α -acetoxi- traquiloban19-oico.....	64
X. ANALISIS DE RESULTADOS	65
XI. CONCLUSIONES.....	81
XII. SUGERENCIAS.....	82
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	83

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

[]	Bibliografía
Acetil-SCoA	Acetil succinilcoenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
AST	Agar Soya Tripticasa
HCl	Ácido clorhídrico
ATCC	American Type Culture Collection
CST	Caldo Soya Tripticasa
CHCl ₃	Cloroforno
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
J	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCV	Cromatografía en columna a vacío
c	Cuarteto
δ	Desplazamiento químico
CH ₂ N ₂	Diazometano
NADPH	Dinucleótido de niacina-adenina-fosfato reducido
d	Doblete
EtOH	Etanol
LiAlH ₄	Hidruro de litio y aluminio
m	Múltiplete
mg	Miligramos
mL	Mililitros
v	Número de onda
APT	Prueba de protón unido
pf	Punto de fusión
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
S	Singulete
TMS	Tetrametilsilano
ATP	Trifosfato de adenosina
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

México ocupa un lugar privilegiado en el panorama mundial de la diversidad biológica, la cual tiene su origen en una intensa historia geológica, que ha dado como resultado un territorio que posee una enorme variedad de ambientes, donde habitan una amplia gama de especies vegetales y animales, lo que hace que México ocupe el cuarto lugar en el mundo con 26, 000 especies de plantas superiores. A esta gran riqueza biológica, se añade otra de igual valor, que es producto de la interacción de las sociedades humanas que habitaron este territorio con su medio ambiente.

Los pueblos indígenas poseen todavía un conocimiento considerable de su entorno natural, son ellos los que siguen preservando y acrecentando la gran variedad de especies cultivadas que le heredaron sus antepasados. Dichas especies adaptadas a muy diversas condiciones climáticas, altitudes, relieves y suelos, constituyen una importante reserva de genes. Se estima que más del 25% del total de especies de plantas superiores que hay en el país poseen algún uso, lo que las convierte en un recurso de gran valía, como fuente de sustancias químicas importantes desde diversos puntos de vista —*biológicas, económicas, farmacológicas, químicas, entre otras*—.

Todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud y una gran mayoría, desarrollados y en desarrollo, siguen haciendo uso de ellas actualmente. En las últimas dos décadas se ha producido un enorme cambio en las estrategias y políticas, tanto de los gobiernos, como en los ministerios y los organismos multilaterales encargados de atender la salud. Los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente y comienzan a establecerse programas y proyectos, para la investigación, aplicación e industrialización de los productos.

Los datos indican que la medicina tradicional y las plantas medicinales, serán de mayor importancia en los años venideros y se realizarán esfuerzos inusitados en este siglo, para llevar a cabo su complementación y articulación, dentro de los sistemas nacionales de salud, en decenas de países. Las plantas medicinales son el recurso material más amplio y

valioso de la medicina tradicional indígena. Su estudio es un tema recurrente en la historia de México tarea compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país.

A pesar de esta riqueza biológica y de este enorme acervo cultural, existe relativamente poca información científica acerca del empleo, composición química, ecológica, etnobioidiversidad y evaluación biológica de la mayoría de las especies empleadas en la medicina tradicional en México. El empleo de tales plantas es enormemente empírico y por lo tanto, existen muchas variables que influyen en la eficiencia de las preparaciones que de ellas se hacen. Es importante señalar que la mayoría de los prototipos farmacéuticos son sustancias de origen natural principalmente vegetal, ya que la búsqueda y caracterización de los constituyentes químicos bioactivos de la flora medicinal, puede cristalizarse en el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos que superan en eficiencia a los ya conocidos, con respecto a su toxicidad, resistencia o mecanismos de acción. Este hecho justifica la importancia de generar conocimientos —*botánicos, etnobotánicos, químicos, ecológicos, farmacológicos, entre otros*— sobre los recursos vegetales con que cuenta nuestro país, ya que esto permitirá valorar y utilizar racionalmente dicho recurso.

Dentro de este recurso vegetal se encuentra la familia *Compositae (Asteraceae)*, una de las más abundantes de la flora fanerógamica de México y a la cual pertenece *Iostephane madrensis* (cachana), está crece en la parte Norte, Centro y Sur de México y es empleada para el tratamiento de diferentes enfermedades, dentro de las que se encuentran: complicaciones gastrointestinales, enfermedades del hígado, úlceras estomacales, padecimientos del riñón, la esterilidad, "*mal del espanto*"; además es utilizada como cataplasma para el tratamiento de heridas e inflamaciones.

Por lo tanto el presente trabajo tiene como finalidad la extracción, aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Iostephane madrensis* (cachana) y determinar la actividad microbiológica del extracto crudo y sustancias puras con la finalidad de convalidar su uso popular.

II. ANTECEDENTES

En México, al igual que en otros países, ha permanecido el uso de las plantas medicinales a través de los siglos. El aprovechamiento de los recursos vegetales ha estado de acuerdo con las múltiples observaciones y numerosas experiencias acumuladas, por grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país, enmarcados dentro de las facilidades y circunstancias que otorga el ecosistema, el intercambio social, las enfermedades más comunes de la región y por la disponibilidad práctica del recurso. De esta manera existen tradiciones que han contribuido a la salud y bienestar de diferentes culturas [1, 2].

Aunque no existen datos precisos que aseguran el valor y extensión del uso de las plantas medicinales. La OMS ha calculado que aproximadamente el 80% de la población del mundo hace uso en alguna medida de este recurso para resolver sus necesidades de atención primaria de salud; ya sea como único medio de curación o como un medio alternativo. Por lo que en los últimos años, se ha logrado revalorar los recursos vegetales de nuestro país, el cual debido a su situación geográfica permiten tener una gran riqueza florística, donde se incluyen a las plantas medicinales, las cuales pertenecen a una gran variedad de familias y especies distribuidas en diferentes regiones.

La investigación de los constituyentes químicos aislados de las plantas medicinales, representa solo un pequeño porcentaje (48,000) de las 250,000 especies existentes, mientras que la fracción sometida a un rastreo biológico o farmacológico es aún más pequeña (15,000) [3,4]. Cabe mencionar que el proceso que conduce a obtener de las plantas constituyentes puros y activos farmacológicamente es muy largo y minucioso. Además requiere de una colaboración multidisciplinaria de botánicos, químicos, farmacólogos y toxicólogos.

De esta manera, al conjugar los resultados de las diversas investigaciones se contribuye al conocimiento de nuevas alternativas de agentes terapéuticos más eficaces, los cuales pueden formar estructuras conocidas o novedosas.

Cabe señalar, que los productos bioactivos de las plantas pueden ser utilizados como prototipos en síntesis químicas [4, 5]. Sin embargo, es pertinente señalar que actualmente hay una gran aceptación por los fitofármacos, a los cuales se les atribuyen menos efectos secundarios.

Por lo anterior, en el presente trabajo se describe el estudio químico de *I. madrensis* (cachana) planta medicinal empleada por los Tarahumaras para el tratamiento del reumatismo y de las úlceras digestivas. Esta planta, junto con la arnica, yerba mora y siricua, son los ingredientes del té ulcero, el cual es muy popular en la ciudad de Chihuahua para el tratamiento de las úlceras estomacales [6].

1. PROPIEDADES DE LA FAMILIA *Compositae*

1.1 Características morfológicas de la familia *Compositae* (*Asteraceae*)

Existen en el mundo una gran cantidad de familias de plantas, distribuidas conforme a su habitat natural. La familia *Compositae* (*Asteraceae*) es la más vasta dentro de las fanerógamas y la mejor distribuida en el mundo. Dicha familia esta constituida por hierbas, arbustos y árboles, con hojas alternadas y opuestas, las flores son hermafroditas, unisexuales o estériles, actinomorfas o cigomorfas, con caliz ausente o sustituido por el papus o vilano, que sirve para la diseminación de los frutos, las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas o capítulos. Estas poseen un involucre formado de brácteas, en receptáculo plano, cóncavo, convexo o globoso sobre el que se encuentran implantadas las flores, protegidas por brácteas, llamadas páleas. Las cabezuelas que tienen flores del mismo sexo se llaman homógamas, si son de diferente sexo se llaman heterógamas [7-8].

1.2 Habitat

Se conocen 316 géneros en la familia *Compositae*, distribuidos en 13 tribus, estas son; *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae*, *Eupatorieae*, *Inuleae*, *Anthemideae*, *Calenduleae*, *Cardueae*, *Mittisaeae*, *Cichorieae*, *Senecioneae*, *Vernonieae* y *Arctoteae*. Donde en México, la *Heliantheae*, *Helenieae*, *Astereae* y *Eupatorieae* son las más importantes y abundantes, que en conjunto dan a estas plantas mexicanas un matiz fuertemente americano; las demás tribus tienen una importancia cuantitativa secundaria, pues son grupos cuyos centros principales de diversificación se encuentran en otras partes del mundo. La participación de estas plantas en la flora fanerogámica de México a nivel de géneros alcanza un 13.2% del número total, aumentando la familia del Sureste a Noroeste. Los valores máximos encontrados (19.9%) se localizan en la parte altiplana correspondientes a Durango y en el Sur de California, el mínimo (4.4%) en la región de Tuxtepec (Oaxaca), sobre la planicie costera del Golfo de México [8].

El bosque tropical perennifolio, característico de clima cálido y húmedo, representa el habitat menos propicio para los miembros de la familia, en cambio los matorrales xerófilos, los pastizales y los bosques de pino y encino los favorecen particularmente. Los valores mínimos (0.0 y 0.9%) corresponden al bosque tropical en Campeche y la región de Tuxtepec (Oaxaca) respectivamente, los valores máximos, al matorral desértico en el norte de Chihuahua (23.5%) y al pinar en el sur de Sonora (22.7%). Asimismo se registran porcentajes altos en los pastizales de Durango (19.9%) y en las zonas alpinas de los altos picos montañosos (20.0%) [8].

En México, al igual que en la mayor parte del Continente Americano, la tribu *Heliantheae* forma el grupo dominante de la familia *Compositae*, alcanzando una mayor diversificación y abundancia en las partes montañosas entre 1000 y 2000 m de altitud, escasa a más de 3000 m e inexistente en el norte de Alaska; de esta circunstancia cabe establecer la afinidad por las regiones templado-cálidas y tropicales de montaña, mismas que pueden haber sido el lugar de origen de la tribu *Heliantheae*, la cual constituye la base del árbol genealógico de la familia *Compositae* [8].

1.3 Componentes aislados de la familia *Compositae*

La familia *Compositae* está conformada por una gran diversidad de especies, de los cuales se han aislado y caracterizado una infinidad de metabolitos secundarios, que han sido clasificados en los siguientes grupos; los aceites esenciales de ácidos grasos, diterpenos, triterpenos, compuestos acetilénicos, flavonas, flavonoles metilados, lactonas sesquiterpénicas, fructanos tipo inulina, los ciclotoles, 1-inositol y escillitol.

Los aceites esenciales y los diterpenoides son distribuidos en la mayoría de las especies vegetales. Sin embargo, compuestos como los alcaloides, glucósidos cianogénicos, amidas, cumarinas y diversos constituyentes fenólicos tienen una distribución más limitada, lo cual los convierte en un carácter químico que puede ser de utilidad en la clasificación taxonómica del vegetal que los contiene (quimiotaxonomía) [9].

2. *Iostephane madrensis*

2.1 Distribución en México

Un estudio etnobotánico realizado con plantas originarias de la República Mexicana indica que éstas han sido agrupadas con base a su nombre común y características morfológicas, encontrándose que *Iostephane madrensis* forma parte de un complejo denominado "cachani" junto con otras tres especies de esta familia (*Leatris punctata*, *Peatum sp* y *Roldana sessifolia*) [6].

Iostephane madrensis pertenece a la subtribu *Helianthinae* [10] (*Heliantheae*, *Compositae*), *Iostephane madrensis* (cachana) cuyos sinónimos son *Helianthella madrensis* o *Pinocarpus madrensis*, la cual esta constituida por cuatro especies que crecen en las montañas del Norte, Centro y Sur de México. Una de estas especies es *Iostephane heterophylla*, distribuida principalmente en el noroeste de los estados de Chihuahua, Sinaloa y en el sur de Oaxaca [11].

Aunque la cachana es común en el Mercado de la ciudad de Chihuahua, su distribución se encuentra limitada principalmente a poblaciones aisladas en las colinas Orientales de la Sierra Madre de Chihuahua [12].

2.2 Características Morfológicas

Iostephane madrensis conocida como cachana presenta raíces gruesas y carnosas, sus tallos son escasamente pubescentes o glabros, casi desnudos de 60 cm de largo, sosteniendo de tres a cinco flores penduladas. Las hojas en su mayoría son radicales, lineares y largamente pecioladas, agudas o acuminadas de 10.2 cm a 25.4 cm de longitud, también presenta hojas caulinales más cortas, enteras y glabras en el haz. Las flores se encuentran agrupadas en cabezuelas pequeñas (cinco a seis líneas de flores), involucreo finamente pubescente formado por brácteas. Las brácteas de las flores poseen nueve líneas

de longitud, son escamosas, delgadas y escariosas y el vilano tiene dos aristas delgadas y numerosamente desectadas. Los bosques de pinos sirven de nicho para la cachana [6].

2.3 Farmacología

La raíz de *Iostephane madrensis* es utilizada como cataplasma para el tratamiento de heridas e inflamaciones; la tintura alcohólica o el extracto acuoso para el reumatismo y la artritis; el té de esta raíz es utilizado para la diabetes, complicaciones gastrointestinales, enfermedades del hígado, úlceras estomacales, los padecimientos del riñón, la esterilidad y el “mal del espanto” [6].

La raíz seca de la cachana junto con el cuachalalate¹ (*Amphipterygium adstringens*), la árnica² (*Heterotheca inuloides*), la yerba mora³ (*Solanum sp*) y la siricua⁴ (*Plumbago scadens*) son los ingredientes para la preparación del té denominado úlcero, el cual es muy popular en el estado de Chihuahua [12].

- 1) El cuachalalate es utilizado para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas, también es utilizado en infecciones vaginales [13].
- 2) El árnica actúa como cicatrizante, desinfectante y/o analgésico para los dolores de úlcera, estómago, pulmón, pecho, muscular, renal o de reumas [14].
- 3) La yerba mora, es empleada en lavados vaginales y para la secreción de la leche, además interviene en la curación de dolor de muelas, fiebres, mal de boca y previene el vómito [15].
- 4) La siricua es antispasmodico intestinal, es además un cardiorinhibitorio, ayuda a la impotencia y es un sedante para los dolores de úlceras El aceite de las semillas del fruto es un remedio para varios tipos de tumores, además de tener actividad anticancerígena [16].

3. TERPENOIDES

3.1 Características Generales de los Terpenoides

Se conoce con el nombre de terpenoides a un grupo de sustancias químicas de gran interés por su uso tan variado. Posiblemente la química orgánica de productos naturales se inició con el aislamiento de terpenoides en forma de aceites esenciales que se usaron como perfumes o medicinales [17-19].

Los terpenoides se dividen en cinco grupos, de acuerdo con el número de unidades de isopreno (I) presentes en la molécula. Estos grupos se muestran en la tabla 1.

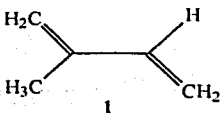


Tabla 1. Grupos de Terpenoides.

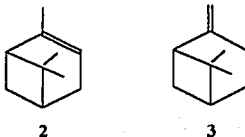
Terpenoide	Unidades de Carbono	Unidades de Isopreno
Monoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Politerpenos	n	n

n= Unidades de carbono y de isopreno

Los diferentes tipos de terpenoides antes mencionados son metabolitos secundarios de plantas, con excepción del grupo de los sesterpenos, ya que estas sustancias sólo se encuentran en hongos y en el insecto parásito *Cerooplastes albolineatus* [17-19].

3.1.1 Usos y propiedades de los Terpenoides

Los terpenos tienen numerosas aplicaciones, la industria del perfume los aísla de flores, hojas y raíces, para preparar perfumes de alto valor comercial. Algunos terpenos son intermediarios importantes en síntesis orgánicas, otros se usan como disolventes, tal es el caso del aguarrás [17-18], que es una mezcla de α y β -pineno (2, 3).



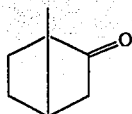
Los terpenos oxigenados tienen generalmente olor agradable, por lo que los aceites esenciales aumentan su valor, mientras mayor proporción de compuestos oxigenados contengan [17].

Es poco común que una especie en particular pueda tener todos los tipos de terpenoides, por eso es notable el caso del guayule (*Parthenium argentatum*), ya que contiene todas las clases de terpenoides; monoterpenos en su aceite esencial, sesquiterpenos (parteniol y guayulinas A y B), triterpenos (argentatinas A, B y C) [17-18, 21], además de politerpenos en forma de hule en un alto porcentaje.

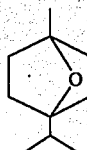
3.2 MONOTERPENOS

Los monoterpenos son elaborados por las plantas y pueden servir como inhibidores de la germinación de otras especies para así evitar la competencia por ciertos nutrientes, especialmente por el agua, si ésta es escasa. Como ejemplo se puede citar, a *Salvia leucophylla* y *Artemisia californica*, especies nativas de las zonas áridas del sur de California [17-18], dichas especies vegetales desprenden una mezcla de terpenos

simples entre los que se encuentran α y β pineno, el alcanfor (4) y el 1, 4 cineol (5), los cuales actúan como toxinas frente a otras especies.



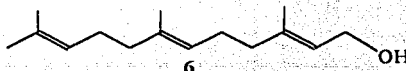
4



5

3.3 SESQUITERPENOS

Los sesquiterpenos son productos naturales con quince átomos de carbono, formados por tres unidades de isopreno. El sesquiterpeno más sencillo y al que se considera precursor de los demás sesquiterpenos es el farnesol (6), sustancia de olor agradable, que aunque se encuentra en numerosas plantas, siempre está en pequeñas cantidades [17, 18].



6

Se ha encontrado que las lactosas sesquiterpénicas poseen actividad herbicida, tales como la heliangina. Tanaka y colaboradores demostraron que estas sustancias tienen actividad biológica, debido al grupo carbonilo α , β -insaturado presente en su molécula [18-19].

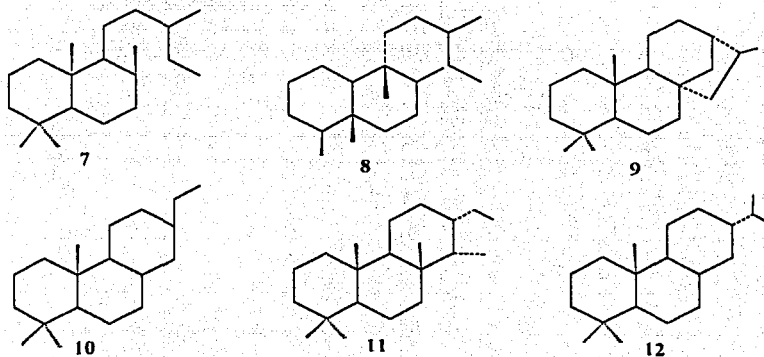
Estas sustancias, además de ser inhibitorias del crecimiento, tienen la importante propiedad de favorecer la formación de raíces en estacas, ayudando así a la reproducción vegetativa, lo que tiene la enorme ventaja sobre la reproducción por semilla de no alterar las características genéticas de la nueva planta.

3.4 DITERPENOS

Los diterpenos constituyen un grupo de sustancias formadas por la ciclización del geranil geranilo, lo que origina numerosos tipos de estructuras.

Muchos diterpenos con estructuras muy diversas son de gran interés debido a sus propiedades biológicas, entre las que destacan: la actividad reguladora del crecimiento vegetal, que tienen las giberelinas, la actividad antialimentaria para insectos que tienen algunos diterpenos *ent*-kauránicos, las propiedades tóxicas de los diterpenos con esqueleto de taxano y la interesante actividad biológica de los diterpenos oxepínicos del zoapatle (*Montanoa tomentosa*) [17-19].

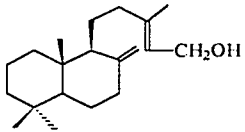
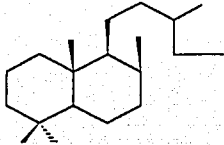
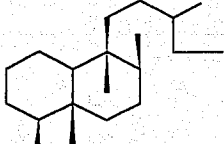
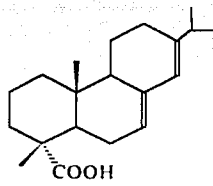
Los esqueletos más comunes presentes en los diterpenos, se encuentran descritos en el cuadro 1.



Cuadro 1. Estructuras de los diterpenos más comunes 7) Labdano, 8) Clerodano, 9) Kaurano, 10) Pimarano, 11) Cassano y 12) Abietano.

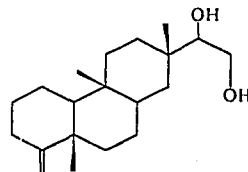
En la tabla 2, se enlistan las estructuras de algunos diterpenos aislados de plantas.

Tabla 2. Estructuras de Diterpenos [10, 17]

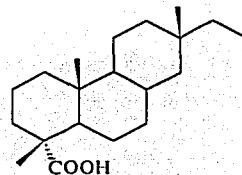
CICLOS	NOMBRE	ESTRUCTURA
Biciclo	Copalol 13	
	Labdano 14	
	Clerodano 15	
Tricíclico	Ácido abiético 16	

Continuación Tabla 2

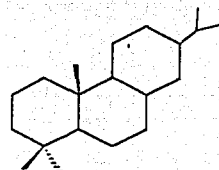
Allodevadarol 17



Pimarano 18

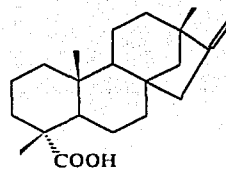


Abictano 19



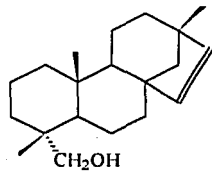
Tetracíclico

Esteviol 20

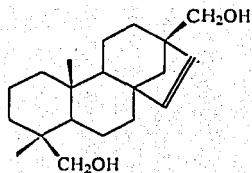


Continuación Tabla 2.

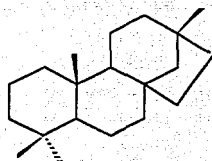
Monoginol 21



Hidroximoginol 22

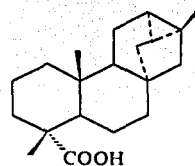


Kaurano 23



Pentacíclico

Traquilobano 24



3.4.1 Biosíntesis de los Diterpenos

La biosíntesis de los diterpenos puede ser descrita en dos etapas, las cuales se describen a continuación:

La primera etapa de la biosíntesis (Esquema 1) de los diterpenos tetracíclicos, se inicia con la condensación de tres unidades de acetyl-SCoA para formar el anión mevalonato (27). El proceso implica la formación inmediata de aceto acetyl-SCoA (25) y subsecuente generación de β -hidroxi- β -metil-glutaril-SCoA (26). Este último se convierte en mevalonato mediante un paso dependiente de dos unidades de NADPH. Una molécula de NADPH funciona en la reducción del grupo carbonilo a un grupo hidróxilo, y la segunda unidad participa en la ruptura reductiva del enlace disulfuro para dar CoASH y mevalonato (27) en su forma libre [20-25], como se muestra en el *esquema 1*.

La segunda etapa [20-25] se inicia con la activación del mevalonato por un trío de quinasas dependientes de ATP para dar 3-fosfo-5-pirofosfato de mevalonilo (28), el cual es muy inestable, sufre una descarboxilación y una desfosforilación para generar pirofosfato de isopentenilo, que se isomeriza posteriormente, formando pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo. El pirofosfato de isopentenilo (29) se condensa con una molécula de pirofosfato de γ,γ -dimetilalilo para obtener el pirofosfato de geranilo (30), el cual a su vez se condensa con el pirofosfato de isopentenilo para producir el pirofosfato de geranil-geranilo (33). Estas condensaciones no son directas, sino que pasan a través del pirofosfato de geranilo (31) y pirofosfato de farnesilo (32).

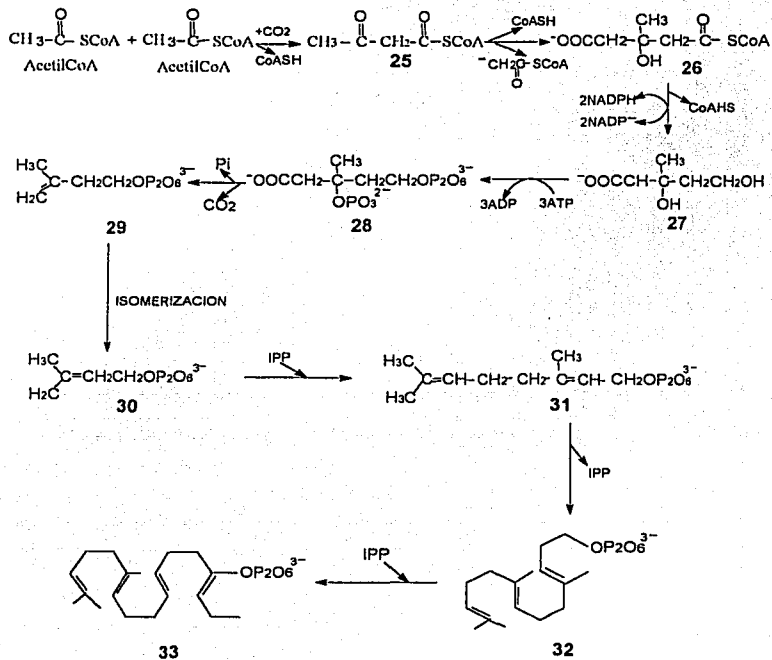
En términos generales se ha sugerido que la primera etapa de ciclización involucra el ataque electrofílico de un protón en el doble enlace terminal en C-14 del pirofosfato de geranil-geranilo (33) ver *esquema 2*, seguido de una serie de desplazamientos electrónicos de los dobles enlaces en C-6 y C-10 para formar dos anillos fusionados de seis miembros y posteriormente la eliminación de un protón del grupo metilo exocíclico y así formar un intermediario cíclico estable, conocido como pirofosfato de copalilo (34), el cual sirve como sustrato en varias ciclizaciones adicionales para formar diferentes tipos de

diterpenos. El ataque nucleofílico a C-13 en donde se observa el cambio en la numeración por el metileno exocíclico acoplado con la eliminación del grupo pirofosfato, produce, de acuerdo al arreglo espacial de la cadena de pirofosfato, dos carbocationes epiméricos (35 y 36), el cual está indicado en el *esquema 2*.

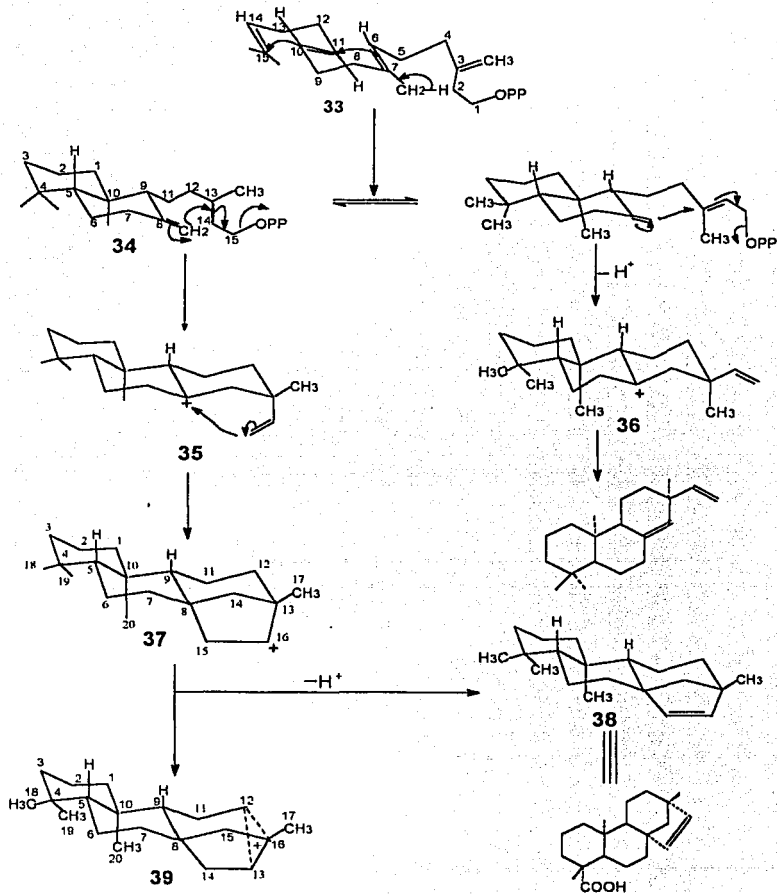
El ataque nucleofílico del doble enlace Δ^{15-16} al C-8 genera una ciclización adicional para formar un carbocatión en C-16 (37).

El intermediario (37) puede eliminar un protón del C-15 y formar un doble enlace C(15)-C(16), generándose así el esqueleto del *ent*-beyereno (38). Por otro lado, la ruptura parcial del enlace C(12)-C(13) y la formación parcial del enlace C(12)-C(16) genera un carbocatión no clásico (39), el cual es un intermediario importante en la formación del *ent*-kaureno, traquilobano y *ent*-atisano. El esqueleto de *ent*-kaureno se origina mediante la formación del enlace C(12)-C(16) del intermediario (39), para generar un carbocatión terciario (40) (observándose en el cambio de numeración), el cual se estabiliza por pérdida de un protón de C-17 para formar un metileno exocíclico (42). Alternativamente, a partir del intermediario (39), se da la formación del esqueleto del traquilobano (41), mediante la pérdida del protón en C-12 y la formación del enlace entre los C(12)-C(16), ver *esquema 2* [20-25].

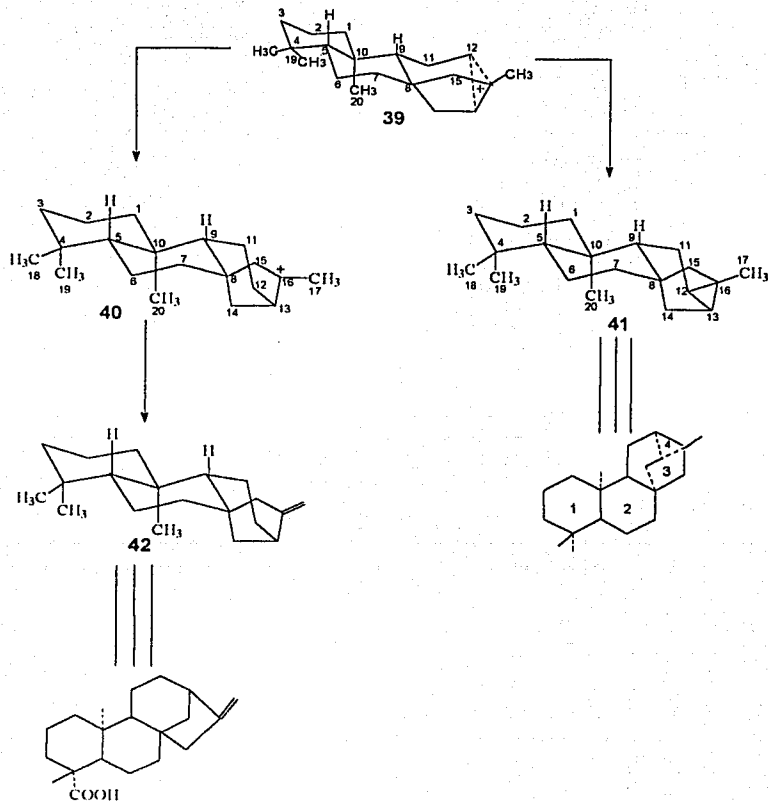
ESQUEMA I



ESQUEMA 2



CONTINUACIÓN DE ESQUEMA 2



3.4.2 Diterpenos de *Viguiera* y *Tithonia*

El género *Viguiera* es considerado como el origen de la familia *Compositae*, por lo que el estudio taxonómico de *Viguiera* y géneros relacionados con esta, tiene interés en cuanto al aspecto evolutivo de la familia *Compositae*. Este género produce lactonas sesquiterpénicas del grupo de las Heliangólidas; además de compuestos aromáticos como buteina y sulferitina, ácidos diterpénicos del tipo kaurano, estracheno y traquilobano; así como compuestos acetilénicos y flavanoles [26-30]. En la tabla 3, se enlistan los diterpenos aislados de varias especies de *Viguiera*, los cuales se encuentran relacionados con el género *Iostephane*.

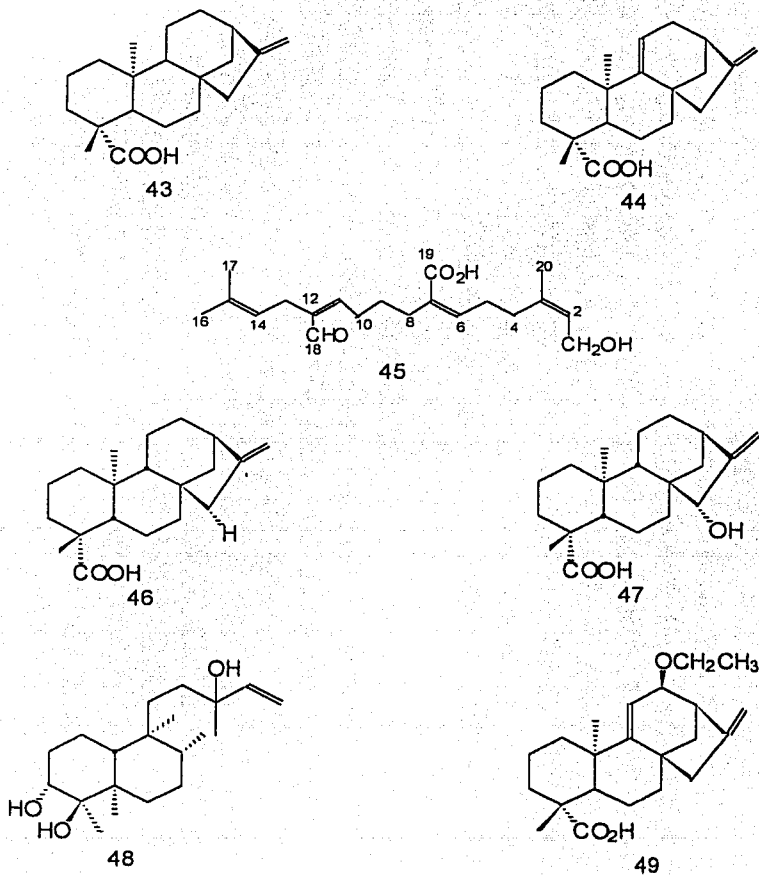
Dentro de la subtribu *Helianthinae* (*Heliantheae*, *Compositae*) [10], los géneros *Tithonia* y *Helianthus* están relacionados con el género *Viguiera*, siendo nativas de México y Centroamérica. En estos géneros se han identificado lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, flavanoles, compuestos acetilénicos y triterpenos en varias especies vegetales de estos géneros, lo cual indica que existe una notable relación filogénica entre ambos géneros. En la tabla 4, se enlistan los diterpenos aislados de los géneros *Tithonia* y *Helianthus*.

Tabla 3. Diterpenos aislados del género *Viguiera*.

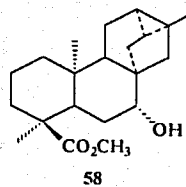
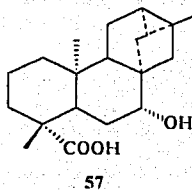
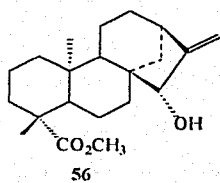
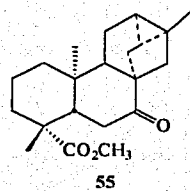
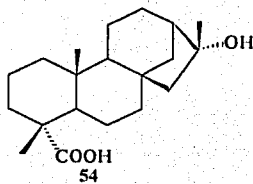
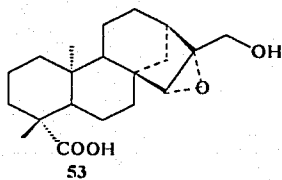
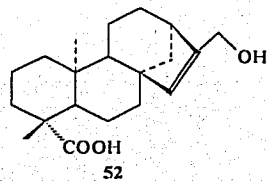
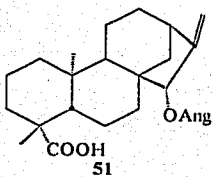
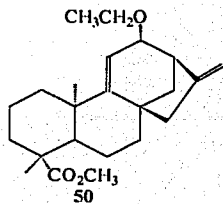
PRODUCTO	FUENTE	REFERENCIA
Ácido <i>ent</i> -kaurenico 43	<i>Viguiera linearis</i>	31
Ácido 9,11 dihidro- <i>ent</i> -kaurenico 44	<i>V. linearis</i>	31
(2Z, 6Z, 10E)-3,15-dimetil-7-carboxi-11-formil-	<i>V. laciniata</i>	32
2,6,10,14-hexadecatetra-en-1-ol (ácido viguierico)	<i>V. deltoidea</i>	33
45		
	<i>V. maculata</i>	34
Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico 46	<i>V. decurrens</i>	35
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico 47	<i>V. maculata</i>	34
Clerod-14-ene-3 α ,4 β ,13 ξ -triol 48	<i>V. tucumanensis</i>	36
		37
Ácido 12 β -etoxi- <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-oico 49	<i>V. excelsa</i>	36
12 β -etoxi- <i>ent</i> -kaur-9(11),16-dien-19-oato de metilo	<i>V. tucumanensis</i>	36
50		37
Ácido 15 α -angeliloxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico 51	<i>V. decurrens</i>	35

Tabla 4. Diterpenos aislados de *Tithonia* y *Helianthus*

PRODUCTO	FUENTE	REFERENCIA
Ácido <i>ent</i> -kauren-19-oico 46	<i>Tithonia longiradiata</i>	38
	<i>Helianthus niveus</i>	39
Ácido grandiflorico 47	<i>T. longiradiata</i>	38
	<i>H. niveus</i>	39
Ácido 17-hidroxi- <i>ent</i> -kaur-15-en-19-oico 52	<i>T. longiradiata</i>	38
Ácido <i>ent</i> -15 β ,16 β -epoxi-17-hidroxikauran-19-oico 53	<i>T. longiradiata</i>	38
Ácido 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kauran-19-oico 54	<i>T. pedunculata</i>	40
7oxo-4-epitraquilobanoato de metilo 55	<i>H. ciliaris</i>	41
<i>ent</i> -kauren-19-oato de metilo 56	<i>H. niveus</i>	39
Ácido ciliarico 57	<i>H. niveus</i>	39
7- α -hidroxi-4-epitraquilobanoato de metilo 58	<i>H. niveus</i>	39
	<i>H. ciliaris</i>	41

Esquema 3. Estructura de los diterpenos aislados por *Viguiera*, *Tithonia* y *Helianthus*

Continuación de Esquema 3



4. PRUEBAS ANTIMICROBIANAS

A pesar de la diversidad tan amplia de antibióticos que se usan clínicamente y sus análogos semisintéticos, aún continúan los estudios para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos; ya que la combinación genética y el uso excesivo de estos, han conducido a un incremento en la resistencia de microorganismos previamente sensibles y al surgimiento de nuevas infecciones.

Una de las posibles estrategias para encontrar nuevos fármacos antimicrobianos, involucra el estudio de compuestos de diferentes estructuras a los de uso actual. Estos compuestos deberán ser extraídos de orígenes que han sido menos explorados que los microorganismos tradicionales, como pueden ser las plantas superiores [42]. Estas han sido usadas por siglos como remedio para enfermedades humanas. De esta manera, tiende a fomentar en los científicos la búsqueda de plantas biológicamente activas, incluyendo efectos antibacteriales y antifúngicos [43].

Dada la complejidad de los extractos de plantas, existen trabajos relativamente limitados que conducen al aislamiento de sus agentes antibacteriales. El principal problema ha sido la interferencia en ensayos *in vitro* por la diversidad estructural o algunas veces compuestos altamente coloreados, las propiedades lipofílicas de algunas muestras, la insolubilidad en agua de aceites esenciales y extractos no polares, hace que sean muy difíciles para usarlos en un medio acuoso para el estudio de actividad antimicrobiana. Por otro lado, los resultados obtenidos son determinados por el microorganismo empleado, el volumen del inóculo, la composición del medio de cultivo, el pH y la temperatura de incubación [44-45].

Existen diversos métodos para detectar la actividad antimicrobiana, y pueden ser clasificados en tres grupos:

1. Método de dilución
2. Método de difusión
3. Método bioautográfico

4.1 Método de dilución

La técnica de dilución puede realizarse con medio líquido y un medio sólido, estos se basan en la dispersión homogénea de la muestra en un medio de cultivo. Se emplea, cuando es necesario ensayar muestras solubles en agua o muestras lipofílicas (aceites esenciales), suspensiones de sólidos o emulsiones y sustancias antimicrobianas que no difunden a través del medio de agar y que pueden ser incorporados directamente dentro del agar [45].

El método de dilución en medio líquido, es el más complicado pero también la técnica más precisa [46]. Este método es el más recomendado para la determinación de la CMI de una muestra pura y la CMB. En este método la turbidez es tomada como una indicación de la densidad bacteriana [47].

En el método de dilución en agar, se mezcla una cantidad de la muestra con el agar nutritivo. La ventaja de este método es su simplicidad, la posibilidad de usarlo con muestras solubles e insolubles en agua y de que seis microorganismos pueden ser usados en la caja de Petri.

4.2 Método de difusión

En este método se emplea un disco o un cilindro en el agar como reservorio y se basa en medir el diámetro de la zona de inhibición. Este método no es aceptable cuando las muestras no son altamente solubles en agua como en el caso de aceites esenciales o extractos no polares. Una de las ventajas es que se pueden usar cinco o seis compuestos por caja contra un simple microorganismo [45].

El método de cilindro, se usa para suspensiones acuosas de extractos de plantas. La precipitación de sustancias insolubles en agua en el cilindro o en el disco previene alguna

difusión de la sustancias antimicrobiana dentro del agar. El método de disco en papel filtro es satisfactorio y aceptable para ensayar antibióticos solubles en agua [48].

4.3 Método bioautográfico

Es un método para localizar la actividad antibacteriana en un cromatograma. Casi todos los procedimientos se basan en la técnica de difusión en agar, en el cual los compuestos antibacteriales son transferidos desde la capa cromatográfica a una caja de agar inoculado, seguido de un proceso de difusión del compuesto, las zonas de inhibición son después visualizadas; otra técnica consiste en realizar una suspensión del microorganismo en un caldo, para posteriormente ser aplicado a la CCF desarrollada [44]. La incubación en una atmósfera húmeda permite el crecimiento de la bacteria, las zonas de inhibición son después visualizadas con un reactivo de detección-actividad-deshidrogenasa, como las sales de tetrazolio, en el que las bacterias metabólicamente activas, convierten la sal en el correspondiente formazano intensamente coloreado [49], otros indicadores redox tales como 2,6-diclorofenol violeta es uno de los más sensibles para hidrolizar la esculina [50].

Sin embargo, en las últimas décadas un amplio programa de rastreo de extractos de plantas se han realizado, no solo para determinar la actividad antibacterial y antifúngica sino también para la actividad antiviral, antiparasitaria y otras actividades biológicas [51-55]. En la literatura se ha informado que los agentes antimicrobianos responsables de estas actividades en las plantas son: los polifenoles, taninos, saponinas esteroidales, saponinas triterpénicas, ácidos monoterpénicos y alcoholes sesquiterpénicos, ester de diterpenos e iridoides [51]. Considerando el número enorme y la sorprendente diversidad estructural de los constituyentes de las plantas con actividad antimicrobiana, hace pensar que los agentes antimicrobianos que actúan localmente y/o sistémicamente, pueden ser descubiertas en el vegetal.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México es un país vasto en recursos vegetales, donde destacan las plantas de uso medicinal, cabe señalar que aproximadamente 5000 especies tienen aplicaciones curativas, aunque muchos de los usos estén restringidos a determinadas regiones o localidades por condiciones como el medio ambiente, la existencia de la misma planta y el modo de vida de la población. Además, muchas de ellas carecen de estudios en el área de etnobotánica, química, farmacológica y de aplicación clínica.

Por tanto, el presente trabajo tiene como finalidad la extracción, aislamiento, caracterización y actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios mayoritarios de *Iostephane madrensis* (cachana), la cual es utilizada rutinariamente por los Tarahumaras para el tratamiento del reumatismo, de las úlceras digestivas, entre otros.⁵

⁵ Robert Bye. J. Botánico. UNAM. Comunicación Personal

IV. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio químico y determinar la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis* (cachana), con la finalidad de aislar y caracterizar a partir de dicho extracto sustancias químicas con actividad antimicrobiana.

1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.1 Realizar la investigación bibliográfica del periodo 1990-2001 sobre estudios químicos y biológicos de la familia *Compositae*, género *Iostephane* y géneros relacionados con él.
- 1.2 Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis*, frente a diversos microorganismos estandarizados.
- 1.3 Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios mayoritarios, presentes en el extracto clorofórmico de dicha especie vegetal
- 1.4 Evaluar la actividad antimicrobiana de las sustancias mayoritarias aisladas del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis*.

V. HIPÓTESIS

Iostephane madrensis (cachana) es una planta muy utilizada por grupos étnicos y sociales de nuestro país, para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el aparato reproductor y digestivo. Estudios previos a especies de la familia *Compositae*, han demostrado que estas poseen una gran variedad de metabolitos secundarios, donde destacan los flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y diterpenos tetracíclicos. Entonces, es muy posible que por medio de técnicas convencionales de laboratorio, se podrán aislar los metabolitos secundarios mayoritarios de la raíz de *Iostephane madrensis* y determinar la actividad microbiológica de los extractos crudos y sustancias puras, con la finalidad de convalidar su uso popular.

VI. MATERIAL Y EQUIPO

Material vegetal

➤ *Iostephane madrensis* (Mercado Juárez de la Ciudad de Chihuahua)

1. Material para el estudio químico (extracción, aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios)

Material de vidrio

- Cámaras de elución de diferentes tamaños
- Campanas de vacío
- Capilares
- Columnas cromatográficas de diferentes dimensiones
- Embudo Hirsch de porcelana
- Embudos de vidrio de diferentes tamaños
- Equipo para destilación simple y fraccionada
- Frascos viales (5 mL)
- Matraz bola (150 y 1000 mL)
- Matraz erlenmeyer (25, 50, 125 y 250 mL)
- Matraz kitazato (25, 250 y 1000 mL)
- Placa de toque de porcelana
- Probetas graduadas (10, 250, 500 y 1000 mL)

Sustancias

- Celita 545 (Merck)
- Cloruro férrico
- Sílica gel 60 GF para CCF (Merck)
- Sulfato cérico amoniacal (Aldrich)
- Sulfato de sodio anhidro (Aldrich)
- Diazald (Aldrich)

Disolventes

- Acetato de etilo, grado técnico (Disolventes y Mezclas)
- Acetona, grado técnico^o (Merck)
- Cloroformo, grado analítico (Monterrey)
- Diclorometano, grado analítico (Mallinckrodt)
- Etanol, grado técnico^o (Merck)
- Eter etílico, grado analítico (Mallinckrodt)
- Metanol, grado técnico^o (Merck)

- N-Hexano, grado técnico⁶ (Disolventes y Mezclas)

Otros

- Cromatofolios de Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck)
- Espátula de acero inoxidable

Equipo

- Aparato Fisher-Johns
- Balanza analítica (Ainsworth 100 A)
- Balanza granataria (OHAUS 700-800)
- Balanza semianalítica (OHAUS E 400)
- Baño de agua (Büchi B-481)
- Lámpara de UV 254/366 nm (Mineralight)
- Reostato (Staco Energy)
- Rotavapor (Büchi R-124)
- Equipo para Diazald
- Espectrofotómetro de IR (Perkin Elmer, modelo 283 y 681)
- Espectrómetro de Masas (Hewlett Packard 5985 GC/MS system 70 e V)
- Espectrofotómetro de RMN (Varian FT 8a y VxR-3005)

2. Material para el ensayo microbiológico

Material biológico

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2561
- *Escherichia coli* ATCC 536
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
- *Streptococcus faecalis* ATCC 6130
- *Salmonella typhi* ATCC 6539

⁶ El disolvente fue purificado mediante destilación fraccionada

Material de vidrio

- Frascos viales (5 mL)
- Matraz erlenmeyer (125, 250, 500 y 1000 mL)
- Cajas Petri
- Probeta graduada (50 mL)
- Pipeta graduada (1 y 5 mL)
- Tubos de ensayo con tapón de rosca (18/100 mL)
- Termómetro (-10 – 100°C)

Sustancias

- Twin 80
- Solución salina 0.8%
- Agar soya tripticasa
- Caldo soya tripticasa

Equipo

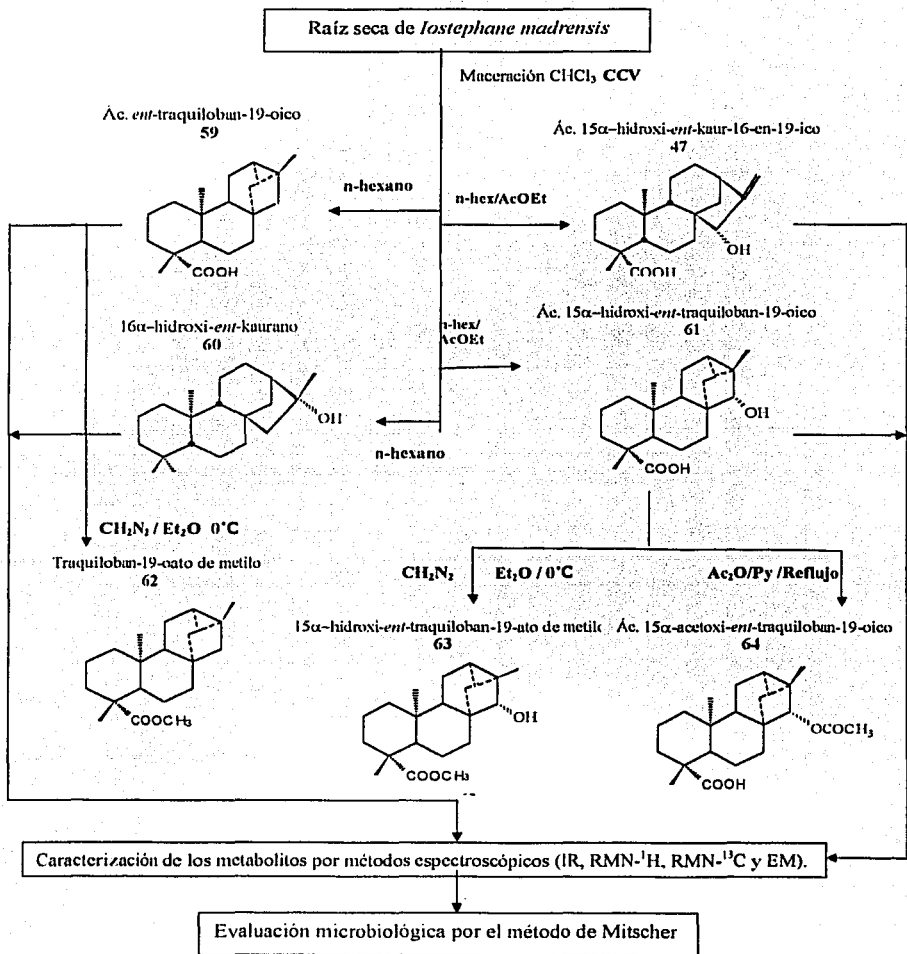
- Balanza analítica (Ainsworth 100 A)
- Estufa (FELISA Aut. SC DGE-11524)
- Autoclave (IECSA)

Otros

- Gradilla de metal
- Asa bacteriológica
- Espátula de acero inoxidable
- Mechero bunsen
- Algodón
- Papel destraza
- Maskintape
- Marcador de aceite
- Regla (30 cm)
- Gasa no estéril

*VII. PARTE
EXPERIMENTAL*

1. Diagrama de flujo



2. Análisis químico del extracto clorofórmico de la raíz de *Iostephane madrensis*.

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios del extracto clorofórmico (53.87 g) de la raíz de *Iostephane madrensis* (cachana),^{7, 8} por medio de CCV (9.7 cm de diámetro y 14 cm de altura), empleando como fase estacionaria 187.1 g de florisil y como fase móvil n-hexano, para continuar eluyendo con mezclas de n-hexano/AcOEt de polaridad creciente, hasta finalmente eluir con AcOEt puro; de donde se obtuvieron 425 fracciones de 100 mL cada una, el desarrollo cromatográfico de la columna se siguió por medio de CCF, utilizando como revelador sulfato cérico amónico.

2.1 Ácido traquiloban-19-oico (59).

De las fracciones 1-17, obtenidas al eluir la columna con n-hexano se aisló un sólido, que fue recristalizado por par de disolventes AcOEt-EtOH, obteniéndose 3.47 g {6.44%} de un sólido blanco de pf. 132-135°C, el cual fue identificado y caracterizado con base en sus propiedades espectroscópicas.

2.2 16- α -hidroxi-*ent*-kaurano (60).

De las fracciones 18-55 [n-hexano], se aisló un sólido cristalino en forma de agujas, el cual fue recristalizado por par de disolventes n-hexano-EtOH, obteniéndose 54.6 mg {0.101%} de un sólido blanco de pf. 212-215°C, que fue identificado por comparación con muestra auténtica, y en base en sus propiedades espectroscópicas y características físicas.

⁷ *I. madrensis* (S. Watson) Strother, obtenida en el mercado de la Reforma en el municipio de Chihuahua, 4 de Octubre de 1985.

⁸ Fue identificada por los profesores Robert Bye y Edelmira Linares colección 14147, del Instituto de Biología de la UNAM.

2.3 Ácido 15- α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (47).

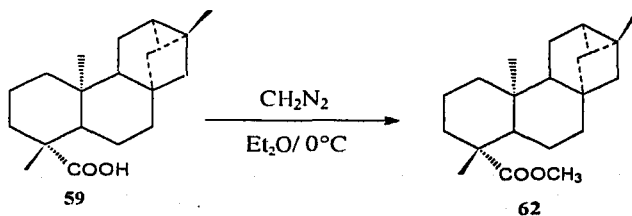
De los eluatos 143-154, obtenido al eluir la columna con mezcla de n-hexano: AcOEt de polaridad creciente, se aisló un sólido cristalino, el cual fue recrystalizado por par de disolventes AcOEt-n-Hexano, obteniéndose 1.36 g {2.53%} de un sólido blanco de pf. 156-159°C, que por sus propiedades espectroscópicas y propiedades físicas corresponden al compuesto 47.

2.4 Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (61).

De los eluatos 155-303, obtenidos al eluir la columna con mezclas de disolventes n-hexano-AcOEt de polaridad creciente, se aisló un sólido cristalino que fue recrystalizado a partir de una mezcla CHCl_3 /n-hexano y lavado posteriormente con éter isopropílico, de esta operación se aislaron 1.03 g {1.93%} de un sólido blanco de pf. 222-224°C, el cual fue caracterizado como el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (61).

3. Obtención del *ent*-traquiloban-19-oato de metilo

A 501.1 g del ácido *ent*-traquiloban-19-oico (59), fueron tratados con diazometano (CH_2N_2) en éter etílico a 0°C. El curso de la reacción fue seguido por CCF, obteniéndose 390.2 mg {77.87 %} del *ent*-traquiloban-19-oato de metilo (62), el cual tiene un pf. 88-91°C y fue recrystalizado por par de disolventes n-hexano-AcOEt, (esquema 5).



Esquema 5. Obtención del *ent*-traquiloban-19-oato de metilo (62).

El diazometano se preparó en un equipo expreso para el caso. Se pesaron 10.75 g de diazald (N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida) disolviéndose en 75 mL de éter etílico, posteriormente se colocó en un embudo de adición y se agregó lentamente a un matraz balón que contenía una mezcla compuesta por 4.01 g de KOH, 10 mL de éter etílico, 10 mL de H₂O y 15 mL de etanol. Simultáneamente se recolectó el diazometano en un matraz balón que contenía de 75 mL a 100 mL de éter etílico sumergido en un baño de hielo, ver figura 1.

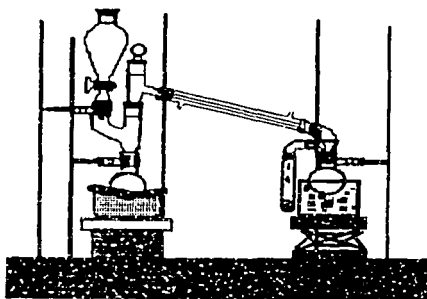
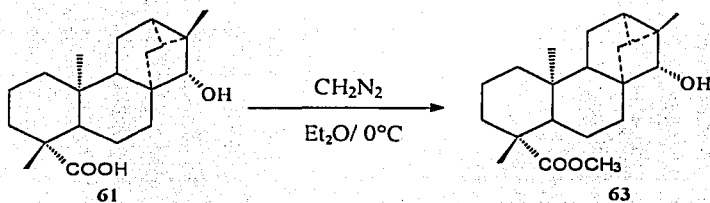


Figura 1. Equipo para preparar diazometano

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

A 147.6 mg del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (61) fueron tratados con CH₂N₂ en éter etílico a 0°C, el curso de la reacción se siguió por CCF. Una vez evaporado el disolvente se obtuvieron 120.9 mg (80.91%) del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo (63), ver *esquema 6*.

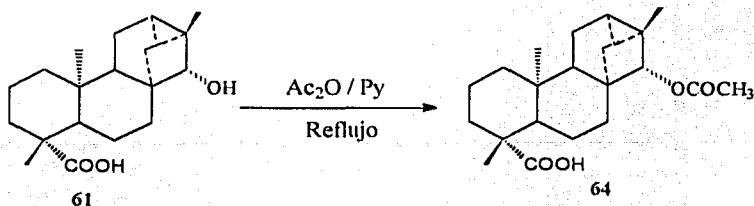
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Esquema 6. Obtención del 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo (63).

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

A 52.7 mg del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico (61) se hicieron reaccionar con 0.75 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina a reflujo durante una hora, siguiendo el curso de la reacción por CCF, concluida la transformación se adicionó hielo a la mezcla de reacción, para posteriormente llevar a cabo la extracción del producto, lo cual se logró por extracciones sucesivas con AcOEt, la fase orgánica total obtenida se lavó con una solución de HCl al 10% para eliminar la piridina en forma de clorhidrato, el exceso de ácido en el medio de reacción fue eliminado al tratarlo con una solución sobresaturada de bicarbonato de sodio, y cualquier exceso de reactivo presente en el medio se eliminó al lavarlo con agua, para posteriormente secar la fase orgánica obtenida con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose 47.8 mg {90.70%} del Ácido 15 α -acetoxi-*ent*-traquiloban-19-oico (64), ver esquema 7.



Esquema 7. Obtención del Ácido 15 α -acetoxi-*ent*-traquiloban-19-oico (64).

6. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de Mitscher [56]

6.1 Preparación de los microorganismos.

Los microorganismos utilizados para la prueba antimicrobiana son los siguientes:

1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
2. *Candida albicans* ATCC 10231
3. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 2561
4. *Escherichia coli* ATCC 536
5. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
6. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
7. *Streptococcus faecalis* ATCC 6130
8. *Salmonella typhi* ATCC 6539

Dichos microorganismos deben ser mantenidos en agar nutritivo, siendo inoculados al medio de cultivo caldo soya tripticasa (CST), dejando incubar a 37°C de 24-48 h, para ser utilizados posteriormente en el bioensayo, realizándose una dilución 1:100 en solución salina al 0.8% estéril.

6.2 Preparación de las muestras para la prueba.

40 mg del extracto o 4 mg de producto puro, se disolvieron en 0.5 mL de Tween-80 y 1.5 mL de solución salina al 0.8% estéril en un vial de 10 mL, una vez solubilizado se adicionó la mezcla a un matraz erlenmeyer que contenía 38 mL del medio agar soya tripticasa (AST) a una temperatura de 50°C, se mezcló y se vertió por partes iguales en dos cajas Petri. Una vez solidificado el agar, se incubó a 37°C durante 24 h para realizar la prueba de esterilidad (consiste en mantener las cajas en las condiciones anteriores y después de transcurrido el tiempo, observarlas y si se encuentran UFC en las cajas, ya no son utilizadas en el bioensayo).

6.3 Prueba microbiológica.

Las dos cajas con el extracto⁹ se dividen en ocho sectores cada una, para proceder a realizar la siembra de cada microorganismo de prueba, por la técnica de estría, como se indica en la figura 2. Finalmente se deja incubar las muestras a 37°C por 24 h y se procede a observar la actividad (inhibición de crecimiento del microorganismo) o inactividad (crecimiento del microorganismo) del extracto o producto puro frente a los diversos microorganismos de prueba. A la par fue realizado un blanco (contiene todo menos un sustrato, y es donde crecen todos los microorganismos) y un control positivo con sulfato de estreptomicina. Además se realizó un control microbiológico del área de trabajo, la cual consiste en mantener una caja de Petri con AST abierta durante todo el tiempo del bioensayo. Realizándose la prueba antimicrobiana por triplicado, considerando que cada una de las muestras se divide en dos.

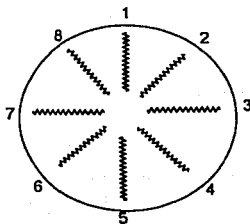


Figura 2. Forma del sembrado de los diferentes microorganismos por caja.

⁹ De acuerdo con la prueba de esterilidad se procedió a realizar el bioensayo.

Tabla 5. Datos de IR CHCl_3 ν (cm^{-1}) para los metabolitos secundarios de *Iostephane madrensis*.

COMPUESTO	ν (cm^{-1})
Ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico <i>ver espectro 1</i>	3601, 3506, 2999, 2982, 2869, 1731, 1692, 1497, 1384, 1263
16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano <i>ver espectro 5</i>	3609, 3001, 2987, 2868, 1728, 1602, 1462, 1379, 1121, 1048
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico <i>ver espectro 7</i>	3602, 3064, 2936, 1683, 1189, 1468, 1258, 1183, 998, 905
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico <i>ver espectro 9</i>	3689, 3601, 3508, 2932, 2869, 1731, 1693, 1466, 1262, 1124
15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo <i>ver espectro 12</i>	3600-3400, 2915, 2860, 1725, 1460, 1465, 1232, 1150, 1015, 1000, 800
Ácido 15 α -acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico <i>ver espectro 15</i>	3500, 2994, 2954, 2932, 2869, 1722, 1693, 1371, 1254, 1124

VIII. RESULTADOS

Tabla 6(a). Desplazamiento químico de RMN-¹H 300 MHz, CDCl₃, TMS para los metabolitos secundarios de *I. madrensis*.

COMPUESTO Carbono No.	Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico		Ácido 15 α -hidroxi- traquiloban-19-oico <i>ver espectro 11</i>	Ácido 15 α -acetoxi- traquiloban-19-oico
	300 MHz	300 MHz, Py-d ₅		
H-13	2.75 (s. a., W _{1/2} =15 Hz, 1H)	2.68 (s. a., W _{1/2} =15 Hz, 1H)	_____	_____
H-15	3.81 (s. a., W _{1/2} =5 Hz, 1H)	4.19 (s. a., W _{1/2} =5 Hz, 1H)	3.25 (s, 1H)	4.76 (s, 1H)
H-17	5.08 y 5.22 (s. a., W _{1/2} =6 Hz, 1H, Ha y Hb)	5.23 y 5.52 (s. a., W _{1/2} =6 Hz, 1H, Ha y Hb)	1.20 (s, 3H)	1.06 (s, 3H)
H-18	1.26 (s, 3H)	1.39 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)
H-20	0.96 (s, 3H)	1.18 (s, 3H)	0.91 (s, 3H)	0.88 (s, 3H)
CH ₃ -CO-	_____	_____	_____	2.06 (s, 3H)

Tabla 6(b). Desplazamiento químico de RMN-¹³C (20 MHz, CDCl₃, TMS) para el 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo aislado de *Iostephane madrensis*.

Carbono No.	Desplazamiento químico 63 (8 ppm) ver espectro 14
C-1	39.79 (t)
C-2	19.15 (t)
C-3	38.15 (t)
C-4	43.82 (s)
C-5	56.76 (d)
C-6	20.99 (t)
C-7	33.94 (d)
C-8	44.96 (d)
C-9	52.12 (t)
C-10	38.58 (s)
C-11	18.87 (t)
C-12	25.12 (d)
C-13	23.59 (d)
C-14	29.72 (t)
C-15	86.76 (d)
C-16	27.87 (s)
C-17	16.02 (s)
C-18	28.69 (c)
C-19	177.82 (s)
C-20	12.74 (c)
C-21	51.06 (c)

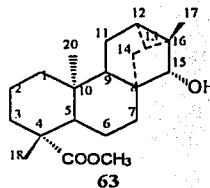


Tabla 7. Espectro de masas (I. E. m/z) para los metabolitos secundarios de *Isoephane madrensis*.

Compuesto	M / z (%)
Ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-oico	302 [M+, 100%], 246 (85.4), 231 (34.15), 119 (41.5), 93 (65.9), 91 (85.4), 79 (51.2), 41 (41.5)
16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano	209 [M+, 7.32], 275 [M+- H ₂ O, 41.4], 257 [M+- H ₂ O-CH ₃ , 20], 232 [M+-C ₃ H ₆ O, 29.3], 229 (7.3) 217 [M+-C ₃ H ₆ O-CH ₃ , 12.02], 123 (39), 105 (36.6), 69 (63.4), 55 (65.9), 43 (100), 41 (63.2)
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico	318 [M+, 26.8], 303 [M+- CH ₃ , 17.1], 300 [M+- H ₂ O, 41.5], 285 [M+- H ₂ O-CH ₃ , 61], 272 [M+- HCOOH, 14.6], 260 [M+-C ₃ H ₆ O-CH ₃ , 95.1], 257 [M+- HCOOH-CH ₃ , 24.4], 245 [M+-C ₃ H ₆ O-CH ₃ , 31.8], 91 (90.2), 84 (90.2), 79 (100), 55 (85.4)
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico	318 [M+, 100], 300 [M+- H ₂ O, 31.71], 285 [M+- H ₂ O-CH ₃ , 61], 261 (41.5), 151 (63.4), 145 (46.3), 123 (56.1), 107 (61), 105 (73.2), 97 (81.7), 95 (56.1), 93 (64.6), 91 (99), 79 (90.2), 41 (68.3)
15 α -hidroxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oato de metilo	317 [M+-CH ₃ , 4.48], 314 (7.3), 275 (9.8), 239 (6.1), 236 (6.1), 215 (7.3), 182 (14.6), 159 (8.5) 147 (2.7), 145 (20), 135 (13.4), 121 (28.6), 107 (36.6), 105 (43.9), 91 (78.1), 81 (51.2), 79 (73.2), 43 (92.7), 41 (100)
Ac. 15 α -acetoxi- <i>ent</i> -traquiloban-19-oico	361 [M+], 360 (30), 318 (3), 313 (1.3), 105 (23.2), 91 (29.3), 79 (24.4), 60 (17.07), 57 (18.3), 55 (26.83), 45 (28.05), 43 (100)

Tabla 8. Evaluación microbiológica por el método de Mitscher, de los metabolitos secundarios (0.1 mg/mL) obtenidos del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis*.

Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8
Extracto CHCl ₃ de <i>Iostephane madrensis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
Ácido traquiloban-19-oico (59)	-	+	-	+	-	-	-	-
Traquiloban-19-oato de metilo (62)	-	+	-	-	-	-	-	-
16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaurano (60)	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-oico (47)	+	+	-	-	-	-	-	-
Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico (61)	+	+	-	-	-	-	-	-

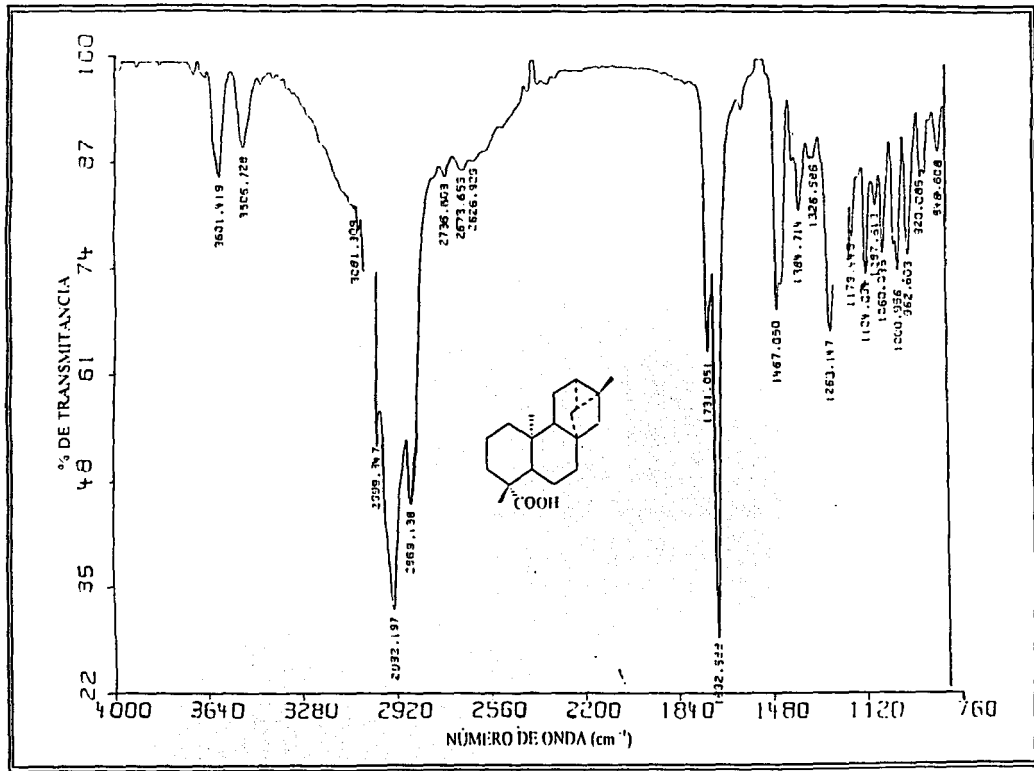
(+) Inhibición del crecimiento (-) No hay inhibición del crecimiento

Microorganismos utilizados para la evaluación microbiológica.

1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
2. *Candida albicans* ATCC 10231
3. *Escherichia coli* ATCC 536
4. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 2561
5. *Micrococcus luteus* ATCC 9341
6. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p
7. *Streptococcus faecalis* ATCC 6130
8. *Salmonella typhi* ATCC 6539

IX. ESPECTROS

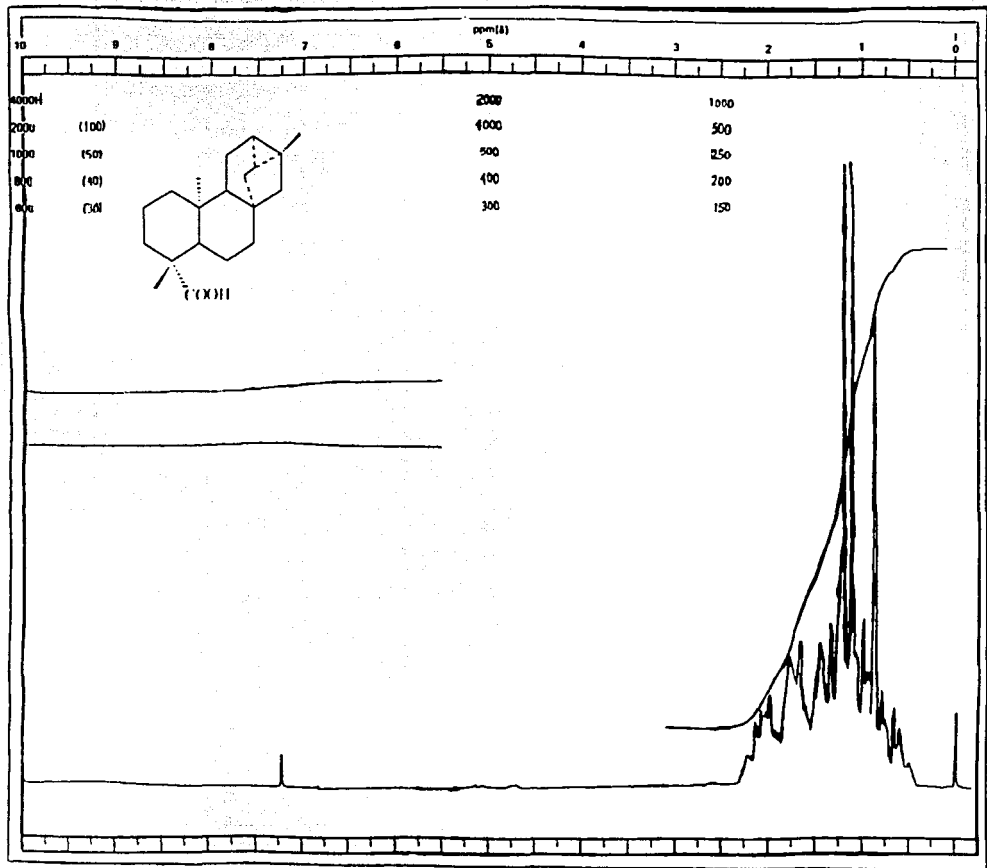
Espectro 1. IR (CHCl₃) del Ácido traquiloban-19-oico.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

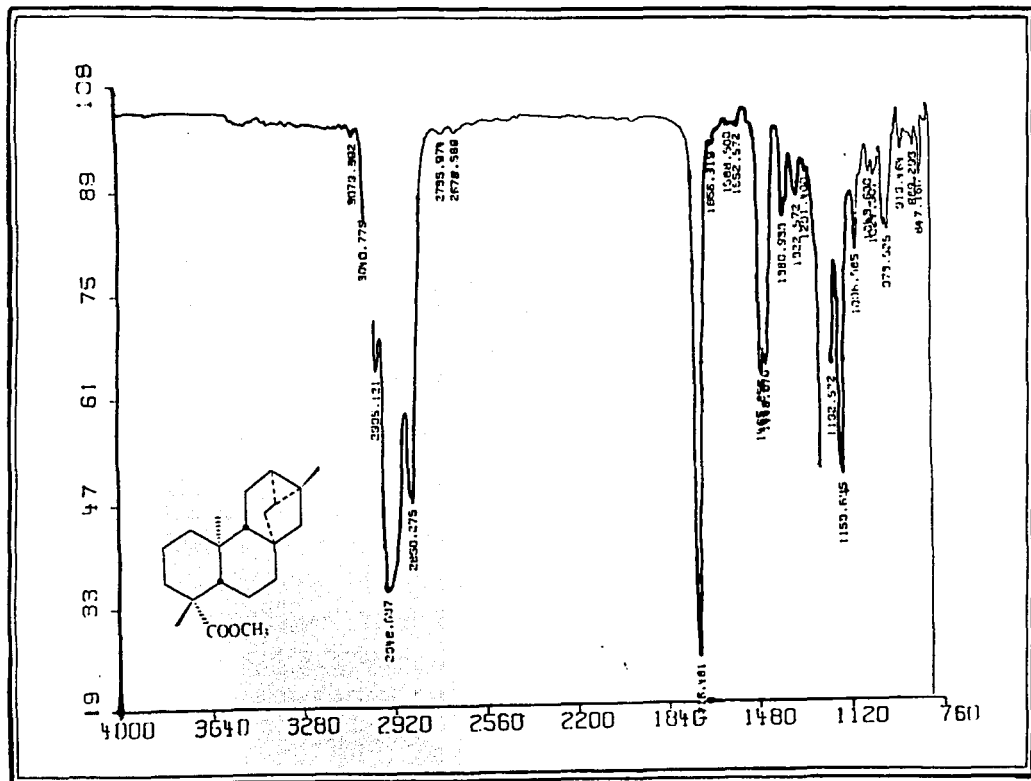
Asiamiento, caracterización y evaluación microbiológica de dispersos tetracíclicos de *Isostephane madrasensis*

Espectro 2. RMN-¹H (80 MHz, CDCl₃, TMS) del Ácido Traquiloban-19-oico.

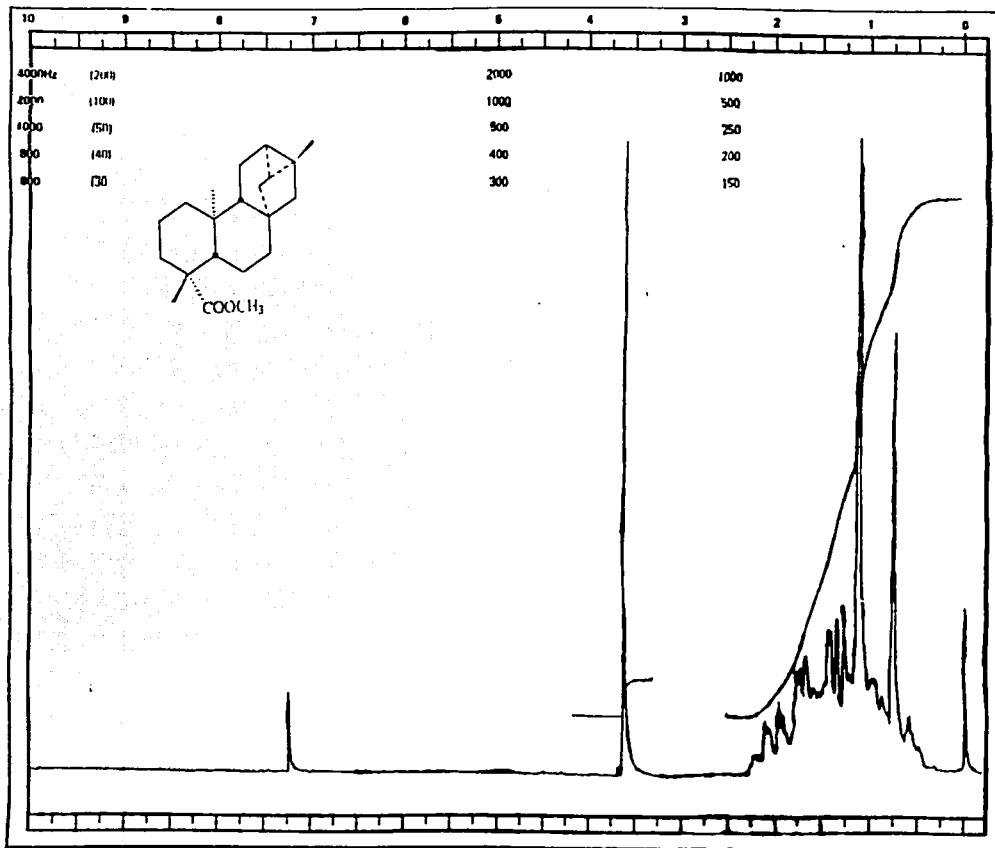


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

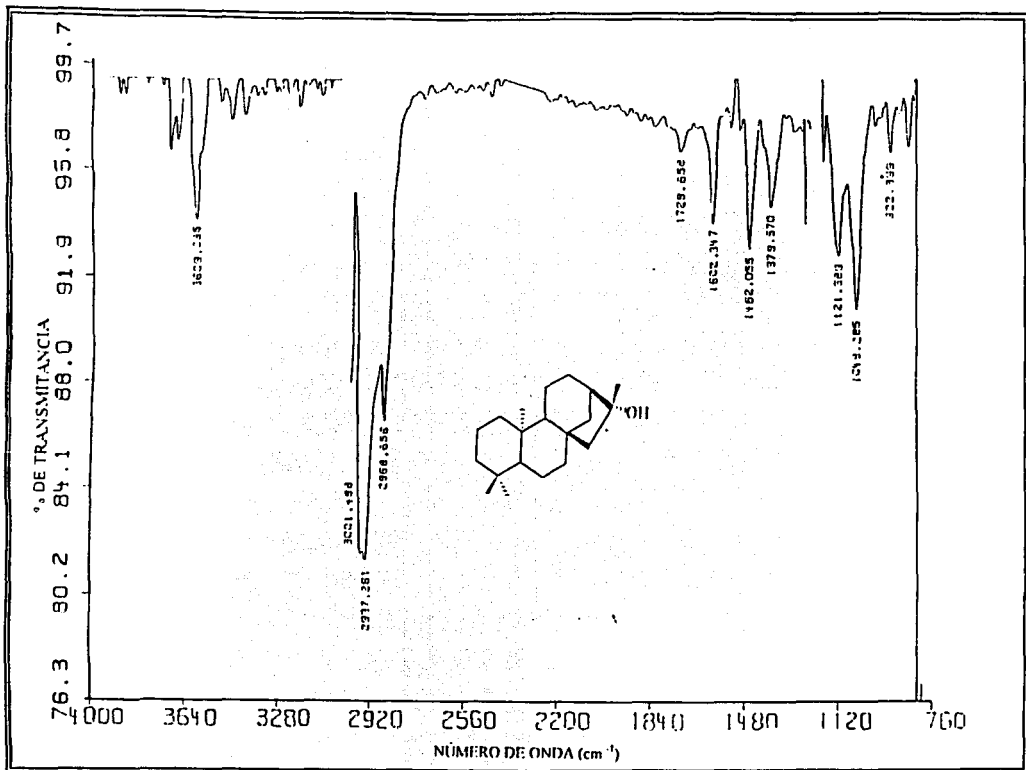
Espectro 3. IR (CHCl₃) del Traquiloban-19-oato de metilo.



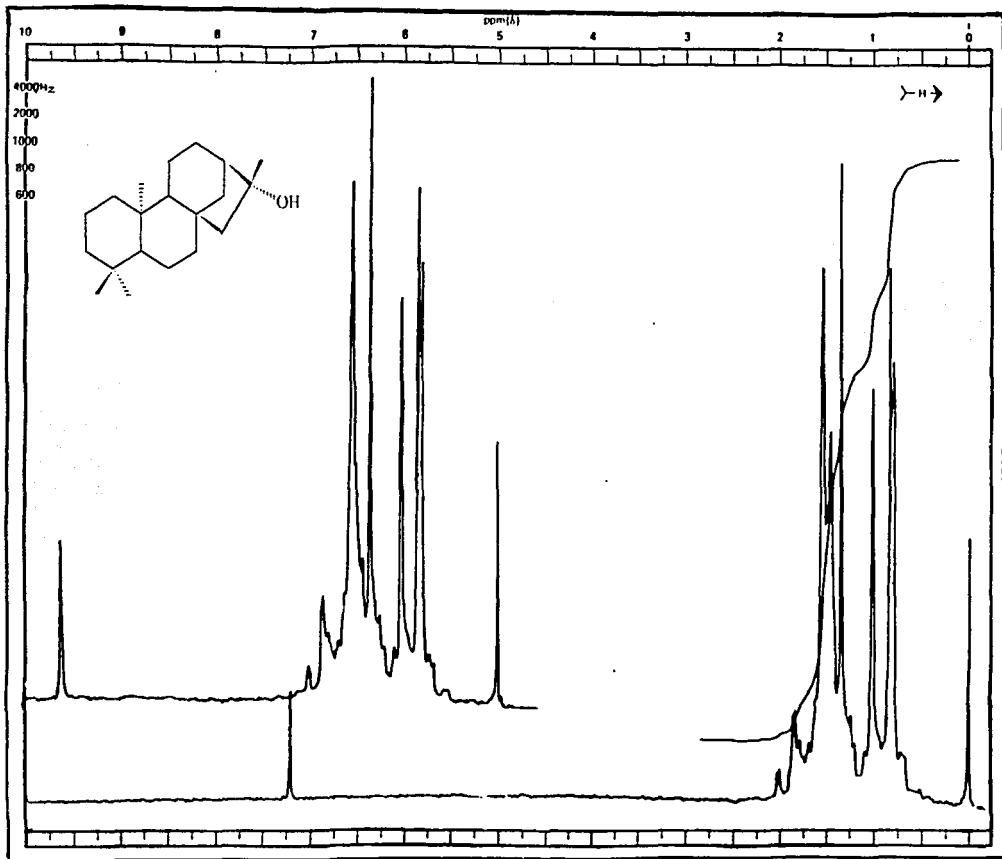
Espectro 4. RMN-¹H (80 MHz CDCl₃, TMS) del Traquiloban-19-oato de metilo.



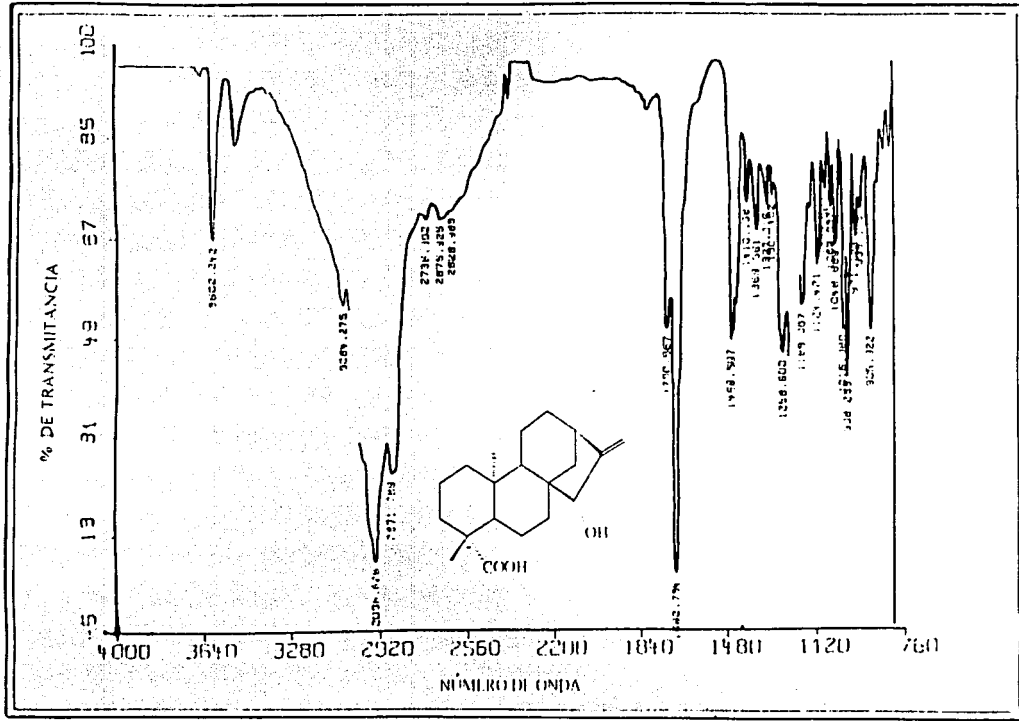
Espectro 5. IR (CHCl₃) del 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano.



Espectro 6. RMN- ^1H (80 MHz CDCl_3 , TMS) del 16α -hidroxi-*ent*-kaurano.

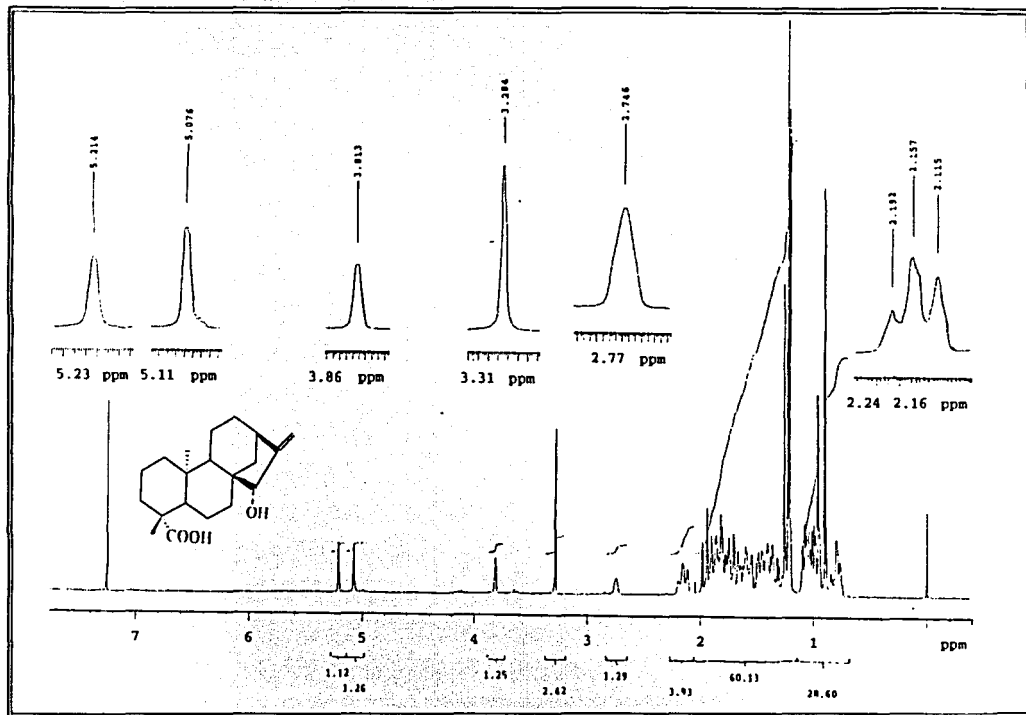


Espectro 7 IR (CHCl₃) del Acido 15 α -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico.

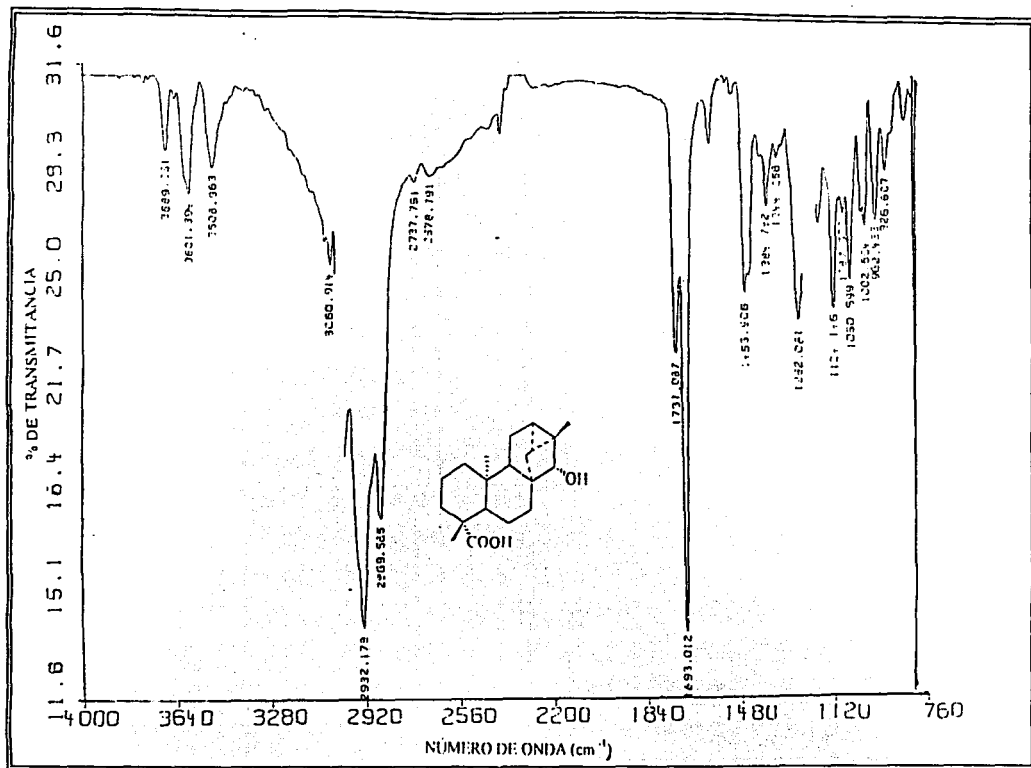


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Espectro 8. RMN-¹H (80 MHz CDCl₃, TMS) del Acido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico.

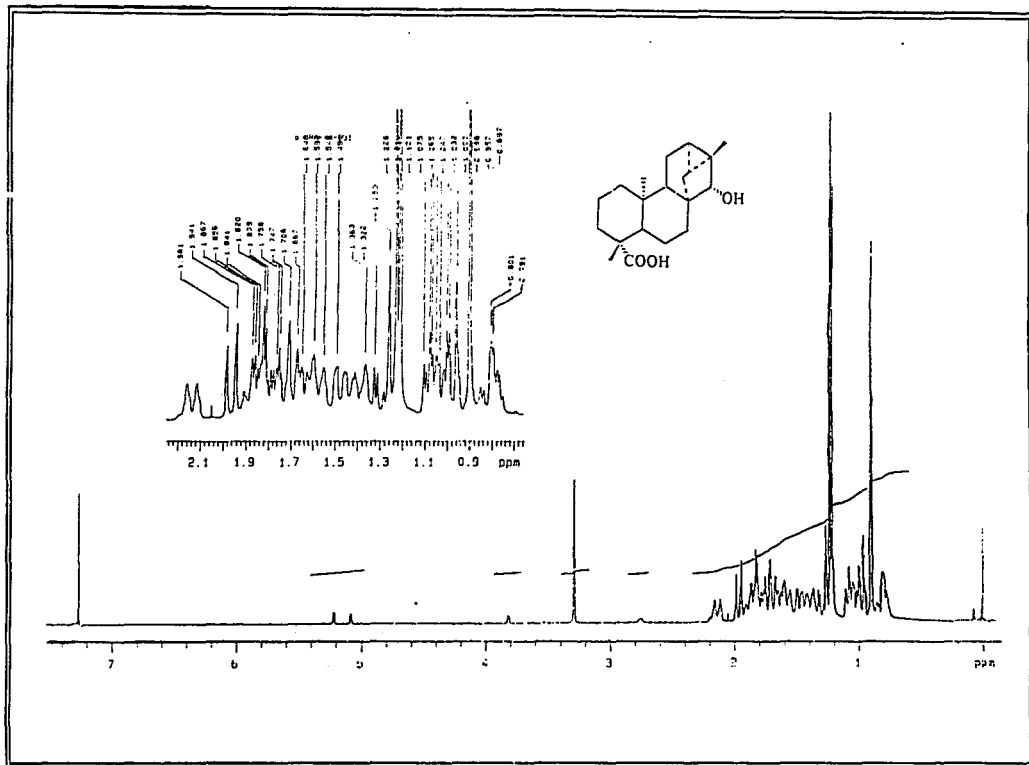


Espectro 9. IR (CHCl₃) del Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico:

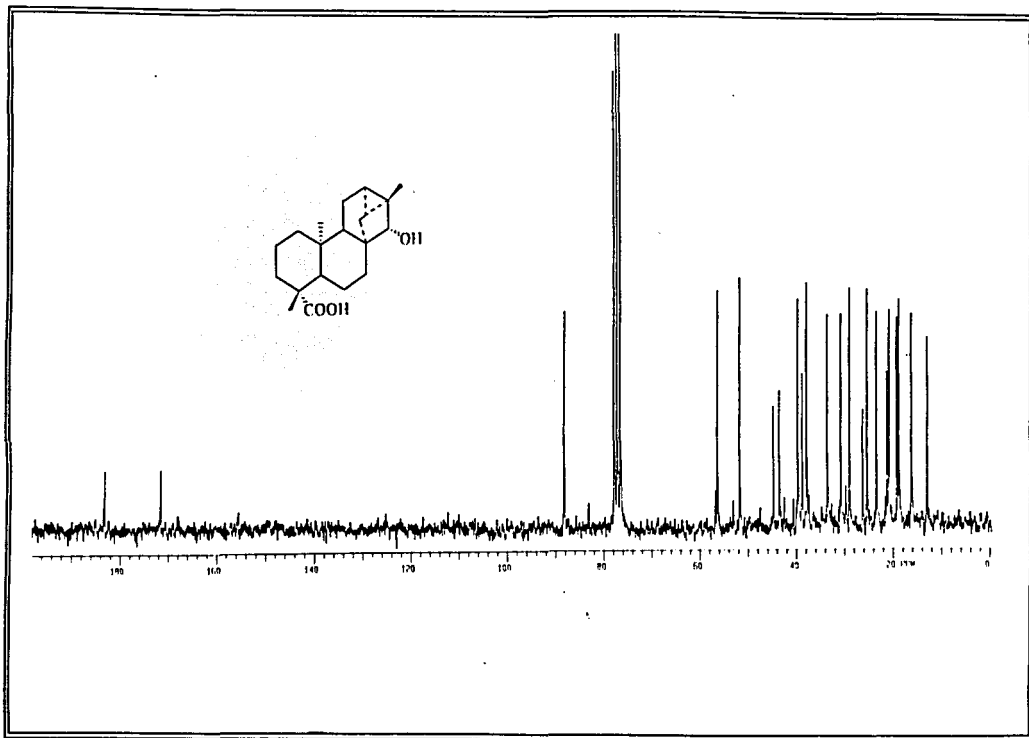


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

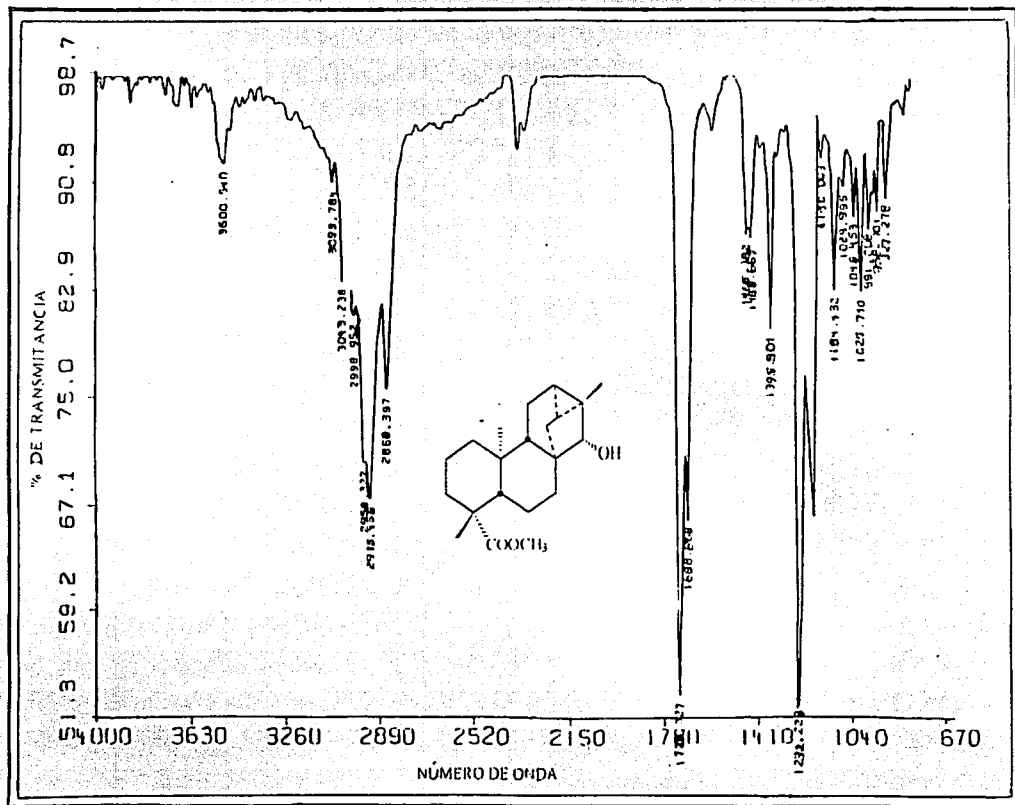
Espectro 10. RMN-¹H (80 MHz CDCl₃, TMS) del Ácido 15 α -hidroxitraquiloban-19-oico.



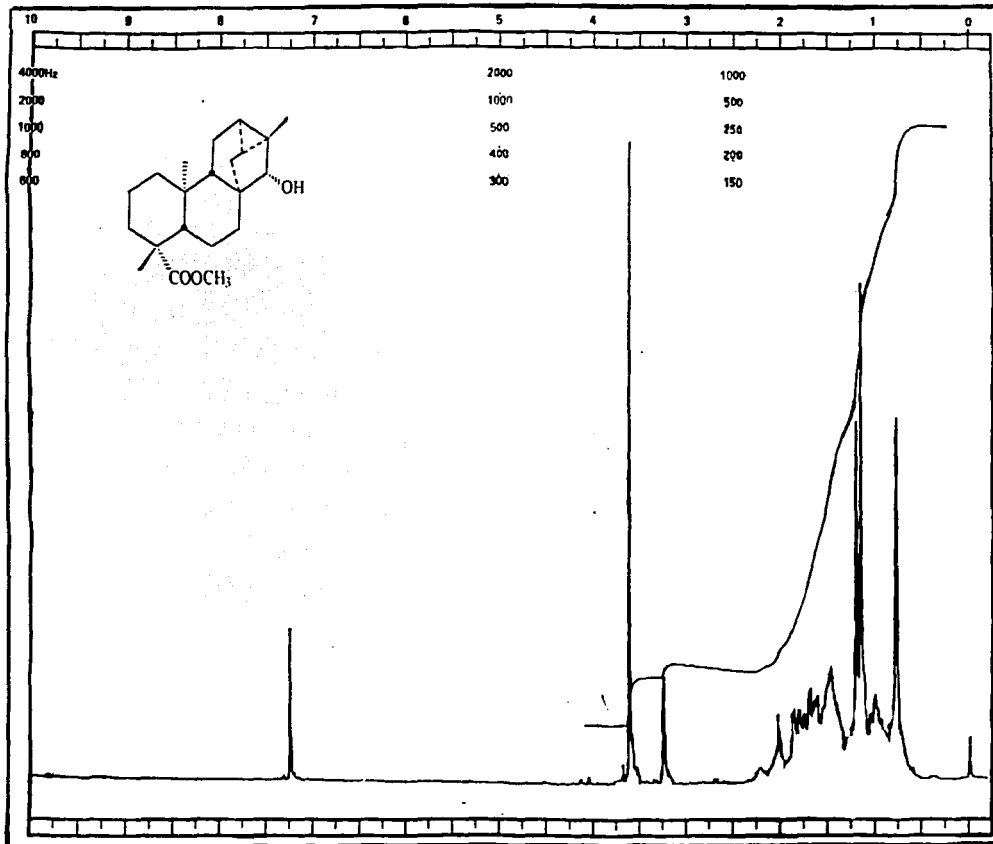
Espectro 11. RMN-¹³C, (300 MHz, CDCl₃, TMS) del Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico.



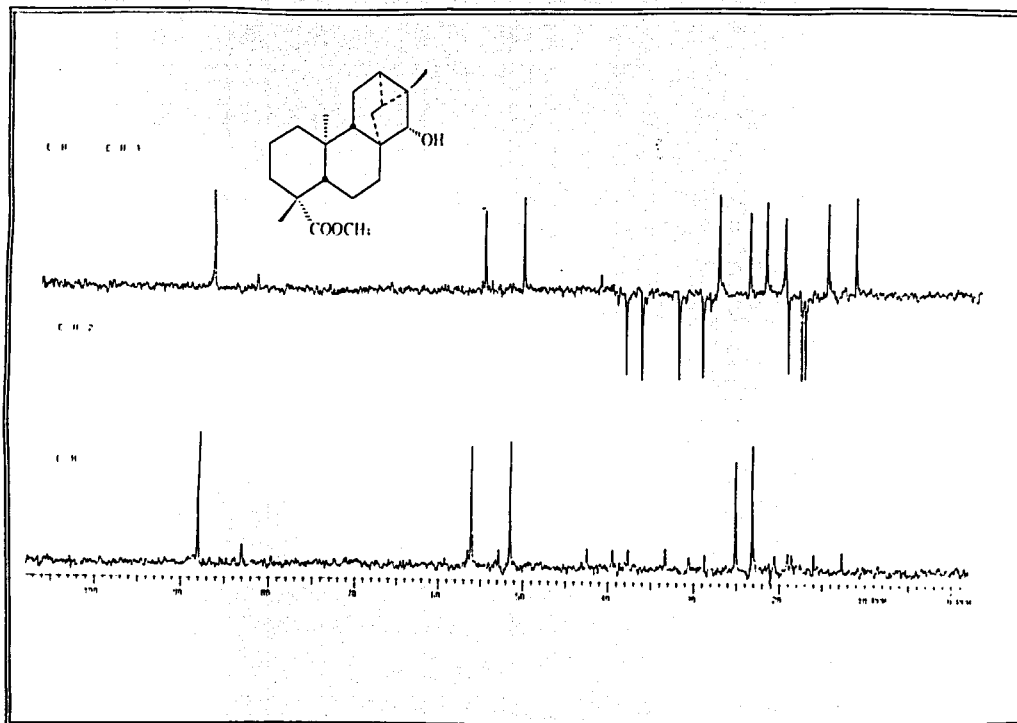
Espectro 12. IR (CHCl₃) 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.



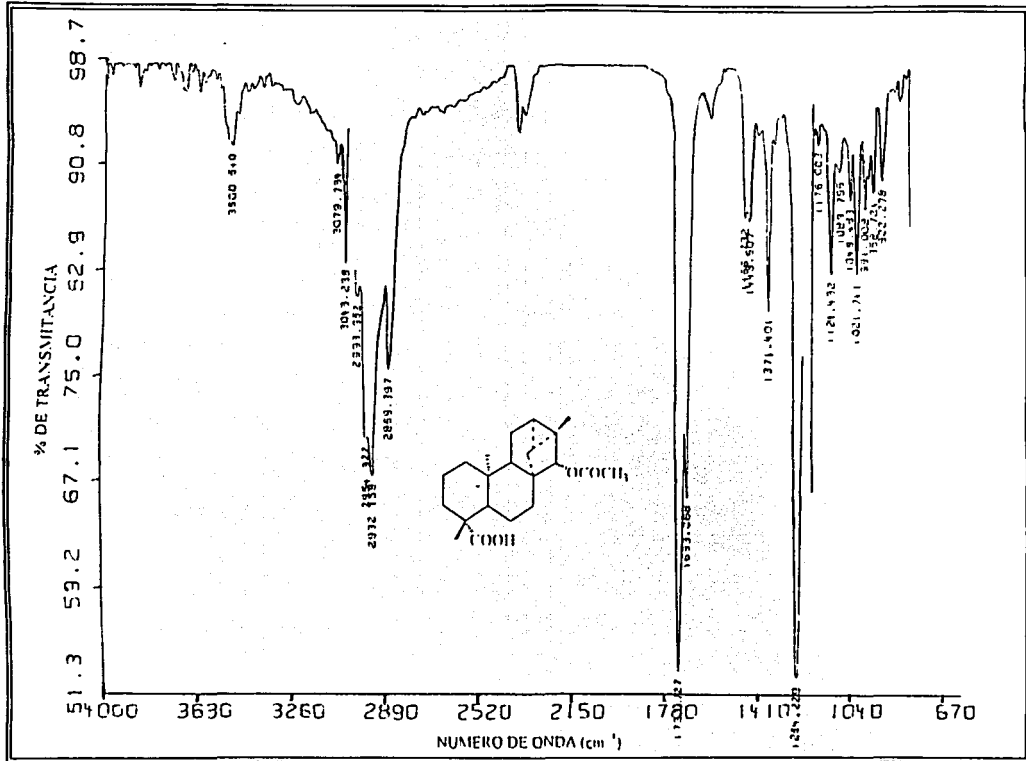
Espectro 13. RMN-¹H (80 MHz CDCl₃, TMS) del 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo.



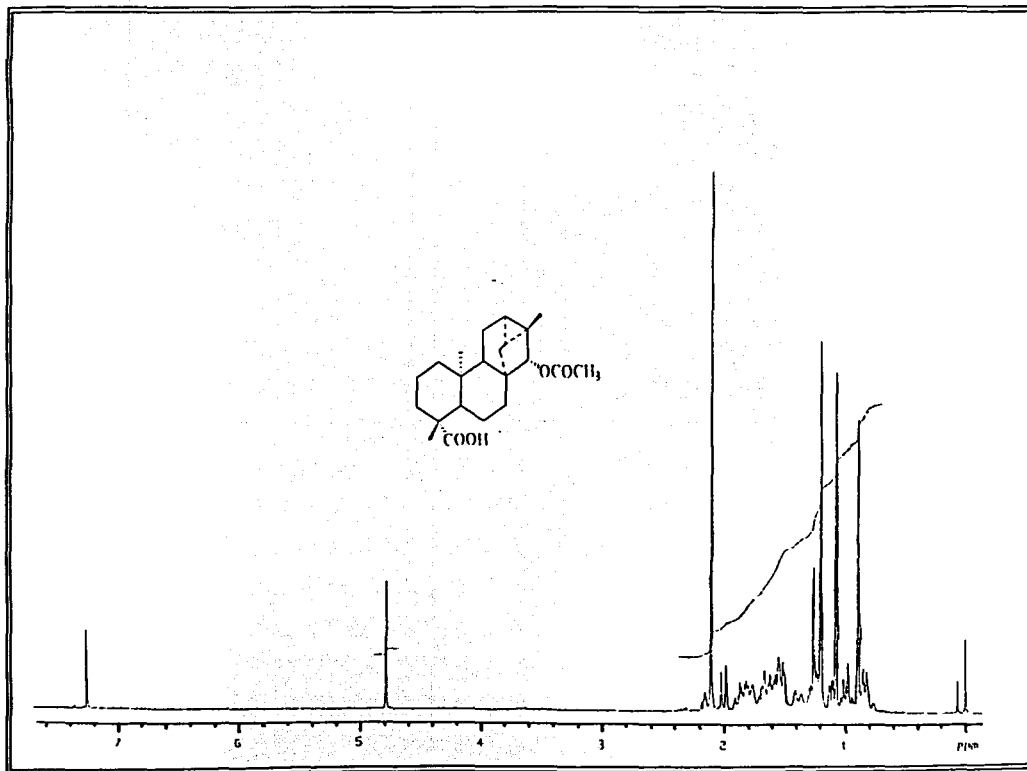
Espectro 14. RMN-¹³C Técnica APT (20 MHz CDCl₃, TMS) de 15α-hidroxi-
traquiloban-19-oato de metilo.



Espectro 15. IR (CHCl₃) del Ácido 15 α -acetoxi-traquiloban-19-oico.



Espectro 16. RMN-¹H (80 MHz CDCl₃, TMS) del Ácido 15 α -acetoxi-
traquiloban-19-oico.



*X. ANALISIS DE
RESULTADOS*

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

➤ **Ácido traquiloban-19-oico (59)**

De las fracciones 1-17, obtenidos al eluir la columna con n-hexano se aisló un producto cristalino de pf. 132-135°C, que en su espectro de masas por impacto electrónico muestra un ion molecular de m/z 302. En el espectro de Infrarrojo (espectro 1), se observa una banda para ν (O-H) en 3506-2626 cm^{-1} y dos bandas que corresponden ν (C=O) en 1731-1692 cm^{-1} , lo cual indica que en la molécula esta presente un grupo carboxilo, el cual se comprobó químicamente al obtener el éster correspondiente por metilación con CH_2N_2 en condiciones normales (espectro 3).

El espectro de RMN- ^1H (espectro 2) de este compuesto muestra tres singuletes a campo alto que integran para 3H, lo cual indica la presencia de tres metilos unidos a un carbono cuaternario. Además se observan dos señales múltiples a campo alto (δ 0.63- δ 0.77) que por su desplazamiento químico corresponden a los protones que forman parte de un ciclopropano [57].

Por lo anterior, se propuso como hipótesis estructural un diterpeno tetracíclico con esqueleto del traquilobano, ya que este incorpora en su arreglo molecular un ciclopropano (figura 3). De esta manera se explican los seis grados de insaturación de esta molécula, una debido al grupo carboxilo y cinco al esqueleto del traquilobano.

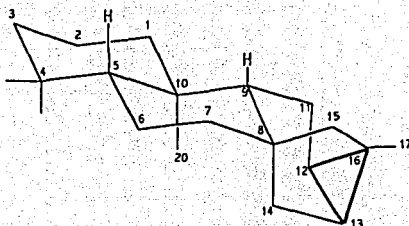


Figura 3. Esqueleto base del traquilobano, el cual incorpora a un ciclopropano.

La asignación para los tres singuletes observados en el espectro de RMN- ^1H (espectro 2) que corresponde a los grupos metilo unidos a carbonos cuaternarios son $\text{CH}_3\text{-17}$ (δ 1.11), $\text{CH}_3\text{-20}$ (δ 0.86), tales asignaciones se argumentan al considerar el efecto de anisotropía causada por el grupo carboxilo en posición axial sobre el $\text{CH}_3\text{-20}$.

El efecto de un grupo carboxilo axial sobre un grupo metilo unido al mismo átomo de carbono es desprotección, debido a que el grupo metilo se encuentra espacialmente muy cercano al grupo electroattractor. De ahí que la señal que se encuentra a campo mas bajo haya sido asignada al $\text{CH}_3\text{-18}$ (δ 1.2). Mientras que al grupo $\text{CH}_3\text{-17}$ se le asigno la señal en δ 1.11, al considerar el efecto de desprotección que causa el anillo de ciclopropano.

De acuerdo a lo anterior y con base en la comparación de las propiedades físicas y constantes espectroscópicas (espectros 1-4) informadas en la literatura para el traquiloban-19-oato de metilo, se puede concluir que la sustancia aislada de *Iostephane madrensis* es el ácido traquiloban-19-oico [57-59].

➔ 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano (60)

De las fracciones 18-55 eluidas con n-hexano se obtuvo un sólido blanco con $\text{p.f. } 212\text{-}215^\circ\text{C}$, que corresponde al 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano.

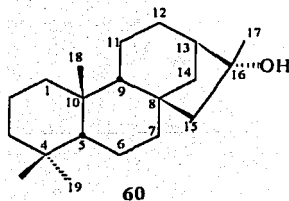
Para la identificación y caracterización de esta sustancia se tomaron en cuenta las vibraciones que se observan en el espectro 5 (IR) que muestra la presencia de un grupo

hidroxilo, en 3411 cm^{-1} ν (O-H); además se observa una señal doble en 1379 cm^{-1} y 1462 cm^{-1} que sugiere la presencia de un gem dimetilo que corresponde ν (C-H). En su espectro RMN- ^1H , se observan cuatro señales simples que integran para tres protones, las cuales corresponden a cuatro metilos unidos a carbonos cuaternarios. Los datos descritos permitieron proponer una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$, a la cual le corresponden cuatro grados de insaturación y como hipótesis estructural un diterpeno tetracíclico con esqueleto del tipo del *ent*-kaurano con un grupo hidroxilo como sustituyente en el C-16.

Las asignaciones a las diferentes señales que aparecen en su espectro RMN- ^1H (espectro 6) se hicieron de la siguiente manera: δ 0.86 (s, 3H) se asignó al CH_3 -18 en posición ecuatorial, mientras que la señal δ 0.81 (s, 3H) se le adjudicó al CH_3 -19 en posición axial, tomando en consideración que los grupos metilo en posición ecuatorial sufren un efecto de desprotección debido a los electrones que forman un enlace sigma C-C [60].

Por otro lado, al CH_3 -20 se le asignó la señal δ 1.04 (s, 3H), debido al efecto de desprotección originado por las interacciones 1, 3-diaxiales que tienen con el grupo metilo de la posición número diez. La señal δ 1.37 (s, 3H) y la señal δ 1.45 (s, 1H) fueron asignados al CH_3 -17 y al hidrógeno del grupo hidroxilo del C-16 respectivamente.

De la discusión anterior y comparando el patrón de fragmentación del espectro de masas [61], se pudo concluir que el compuesto aislado de *Iostephane madrensis* es el 16α -hidroxi-*ent*-kaurano [61-63].



➔ **Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico**

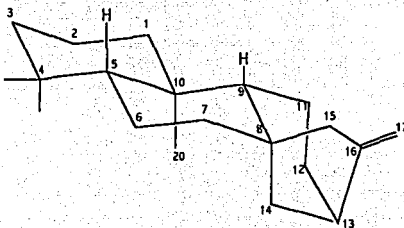
De los eluatos 143-154, se obtuvo un sólido de pf. 156-159°C, que por sus propiedades espectroscópicas y físicas corresponden al Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (47).

Esta sustancia tiene una fórmula molecular C₂₀H₃₀O₃, a la cual le corresponde un peso molecular de 318 uma y seis grados de insaturación. En su espectro de infrarrojo (espectro 7) muestra la presencia de un grupo carboxilo por las bandas 3200-2500 cm⁻¹ para la ν (O-H) y una banda en 1692 cm⁻¹ para la ν (C=O).

La presencia del metileno exocíclico se corrobora por las bandas en 3064 y 906 cm⁻¹ ν (C=C-H), la absorción del grupo hidroxilo aparece en 1016 cm⁻¹ ν (C-O) y 1258 cm⁻¹ ν (C-H).

En el espectro de RMN-¹H (espectro 8), se observa en δ 0.95 una señal simple (3H), la cual corresponde al CH₃-20, debido al efecto de anisotropía (protección) ejercida por el grupo carboxilo, esto se debe al arreglo espacial que presenta el sistema sp² (plano trigonal), el cual tiene libre rotación y tiende a estar equidistante del CH₃-20 [62].

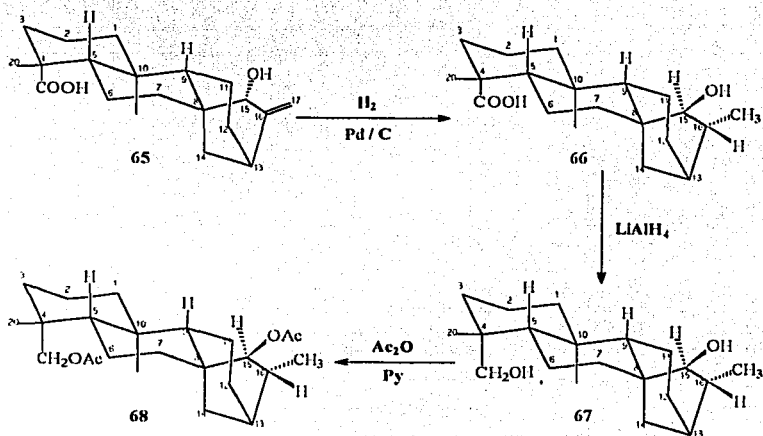
Otro efecto observado es la desprotección sobre el CH₃-20, debido a las interacción 1,3-diaxiales, entre dicho grupo metilo con el grupo carboxilo del C-4, esta debido al arreglo espacial de los anillos que forman el esqueleto del *ent*-kaurano —*trans*, *anti*, *cis*—, dichas interacciones corresponde a un desplazamiento a campo bajo en aproximadamente 0.12 ppm (tabla 9 y figura 4).

Figura 4. Esqueleto del *ent*-kaurano.Tabla 9. Desplazamientos químicos de los grupos metilo en derivados del *ent*-kaurano.

Grupo en C-4 axial (R)	CH ₃ -18	CH ₃ -20	Compuestos
- CH ₃	0.85-0.81	1.01-1.00	20: R' = CH ₃ - CH ₂ OH - COOH
- CH ₂ OH	0.96-0.95	0.99	21: R' = CH ₃ - COOCH ₃
- COOCH ₃	1.17	0.82-0.81	22: R' = CH ₃ -COOCH ₃
- COOH	1.24-1.23	0.94-0.93	23: R' = COOCH ₃

Por otro lado, la señal en δ 2.70 (*s.* α . $W_{1/2}$ = 10 Hz) fue asignada al protón unido al C-15, el cual se encuentra en posición alílica con respecto a los C(16)-C(17).

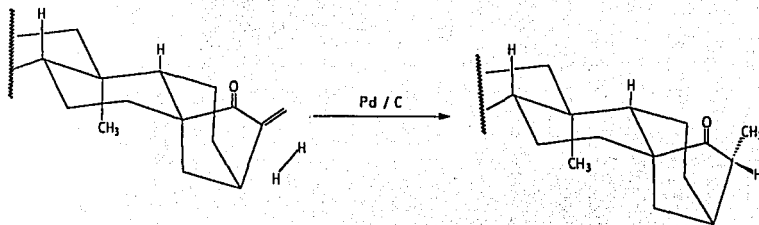
La orientación α del grupo hidroxilo fue establecida por Piozzi y colaboradores [64] como se describe a continuación. Primeramente efectuaron una reducción catalítica del ácido grandiflorico (15 α -hidroxi-*ent*-kauran-19-oico **65**), obteniéndose como producto el dihidroderivado, [15 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-oico (**66**)], el cual posteriormente se trató con LiAlH_4 para obtener el diol (**67**), ver esquema 8.



Esquema 8. Derivatización del ácido grandiflorico realizada por Piozzi y colaboradores para establecer la estereoquímica en C-15.

Este último fue acetilado y el producto obtenido de esta reacción **68** permitió deducir la posición entre el grupo metilo del C-17 y el grupo hidroxilo del C-15, los cuales guardan una relación *trans* debido a la constante de acoplamiento $J = 4\text{Hz}$ de los H-15 y H-16 [64-67].

El CH_3 -17 tiene una orientación β , ya que la hidrogenación catalítica del doble enlace de C-16 y C-17 procede por la cara *si* de la olefina (69), como se ilustra en el esquema 9.



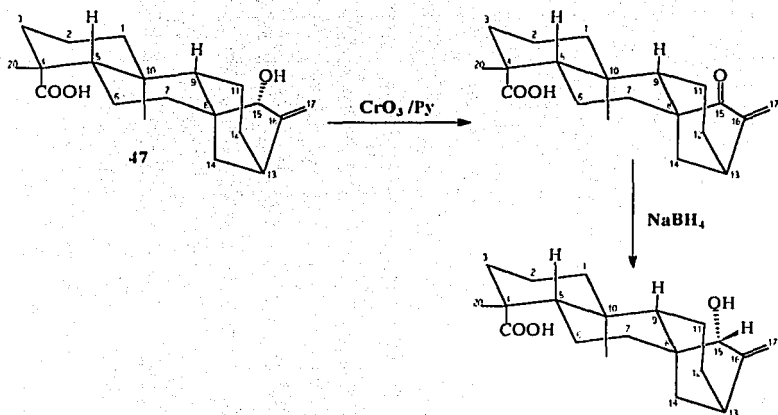
69

Esquema 9. Reacción de hidrogenación catalítica.

Con base en lo anterior y comparando las propiedades físicas y espectroscópicas con las informadas en la literatura se dedujo que se trataba del ácido 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico [62, 64-66].

Por otro lado, la estereoquímica del epímero en el C-15 del ácido 15α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, ha sido determinado por correlación química de la siguiente manera:

1. La oxidación del alcohol alílico produce la enona correspondiente
2. Esta al ser tratada con NaBH_4 , produce el producto original, como se observa en el esquema 10, donde la entrada del hidruro al C-15 es por el lado menos impedido de la molécula por lo que el grupo hidroxilo tiene una orientación β [66].



Esquema 10. Oxidación y reducción del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-19-oico para determinar la orientación del grupo hidroxilo en C-15.

Así mismo en el espectro 8 de RMN- ^1H se observan las señales correspondientes de ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico, δ 3.28, H-C $_{14}$, lo cual indica que se trata de una mezcla de ambos ácidos.

◆ Ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico

De los eluatos 153-303, (n-hexano-AcOEt) de polaridad creciente se aisló un producto cristalino de pf. 222-224°C.

En el espectro de masa por impacto electrónico muestra una señal correspondiente a su ion molecular de m/z 318. El espectro de infrarrojo (espectro 9) muestra la presencia de una banda ancha en 3300-2500 cm^{-1} que se asigna a la ν (O-H) y dos bandas a 1731 cm^{-1} y 1693 cm^{-1} que corresponde a la señal ν (C=O), lo cual sugiere la presencia de un grupo

carboxilo, que fue confirmada al tratar una muestra de este compuesto con CH_2N_2 en éter etílico, y obtener el derivado metilado correspondiente de este metabolito secundario (espectro de IR, 12), la presencia del grupo hidroxilo fue determinada por la banda ancha 1360 cm^{-1} , la cual corresponde a la $\nu_r(\text{O-H})$, la presencia de este grupo fue confirmada al acetilar una muestra de este compuesto en condiciones normales para obtener su correspondiente derivado acetilado (espectro IR, 15).

El espectro de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (espectro 14) de su derivado metilado muestra un total de 21 átomos de carbono. La naturaleza de un grupo funcional y el grado de hidrogenación de los átomos de carbono, se deduce con base en su desplazamiento químico, de donde se dedujo la presencia de un grupo hidroxilo, cinco cuaternarios, cinco metinos, siete metileno y cuatro metilos. Por lo que la molécula posee una fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2$.

El espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (espectro 10) de este compuesto muestra la presencia de tres señales simples, las cuales fueron asignadas de la siguiente manera: $\delta\ 0.90$ para CH_3 -20, el cual sufre una protección ($\Delta\delta = 0.13\text{-}1.12\text{ ppm}$), cuando el ácido carboxílico es transformado al éster metílico. En la tabla 10, se muestran los desplazamientos químicos observados para dos compuestos diferentes con esqueleto de traquilobano aislados de *Iostephane madrensis*.

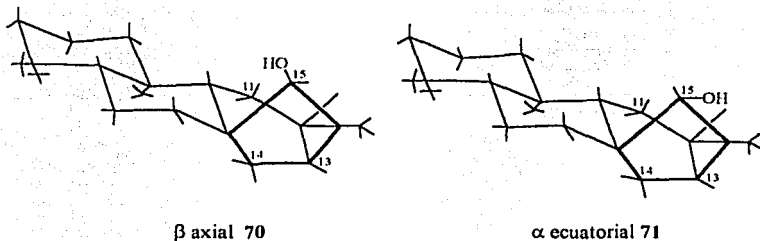
Tabla 10. Desplazamientos químicos de los grupos metilos en compuestos con esqueleto del tipo de traquilobano.

Compuesto	CH ₃ -20	CH ₃ -18	CH ₃ -17	CH ₃ -21
Ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico *	0.90	1.21	1.23	-----
15 α -hidroxi-traquiloban-19-oato de metilo *	0.77	1.15	1.20	3.61
Ácido traquiloban-19-oico *	0.86	1.20	1.11	-----
Traquiloban-19 oato de metilo	0.74	1.12	1.10	3.61
15 α -acetoxi-traquiloban-19-oico *	0.88	1.18	1.06	-----
Ácido 7 α -hidroxi-traquiloban-19-oico **	0.79	1.15	1.15	-----

* Compuestos aislados de *lostephane madrensis*.

** Compuesto aislado de *Helianthus ciliaris*.

Por otro lado, la señal δ 1.21 corresponde al CH₃-18 y al CH₃-17 le corresponde la señal de δ 1.23, mientras que la señal de δ 3.21 (*s*, 1H) se asignó al átomo del hidrógeno del C-15 base de un grupo hidroxilo. Tal asignación fue apoyada al observar en el espectro de RMN-¹H (espectro 16) del derivado acetilado de este compuesto, una señal simple que integra para un hidrógeno en δ 4.76; mientras que la señal del CH₃-17 es de δ 1.07 ($\Delta\delta$ = 0.16). La posición y el arreglo espacial del grupo hidroxilo fueron confirmados con base en los desplazamientos químicos de C¹³. En un esqueleto del tipo de traquilobano el grupo CH₃-17, tiene una orientación β ecuatorial, mientras que el grupo hidroxilo en el C-15 puede tomar dos diferentes orientaciones β axial 70 y α ecuatorial 71.



El efecto de un grupo sustituyente separado por tres enlaces de un átomo de carbono depende de la orientación relativa; por ejemplo un átomo de carbono en su conformación *eclipsada* o *alternada* sufre una protección mayor que su configurómero *anti* [68], por lo que los átomos de carbono y al grupo hidroxilo, con orientación β-axial, deben de sufrir un desplazamiento a campo alto, debido al efecto de compresión estérico originado por el grupo hidroxilo.

Sin embargo, en la tabla 11, se muestra un $\Delta\delta$ mayor para los átomos de C-7, C-14 y C-17, lo cual indica que existe un mayor efecto de compresión estérica entre estos átomos de carbono y el grupo hidroxilo. En la figura 5a y 5b, se muestra la disposición del grupo hidroxilo con respecto a estos átomos de carbono, encontrándose que únicamente el C-14, tiene la conformación adecuada con respecto al grupo hidroxilo (5b).

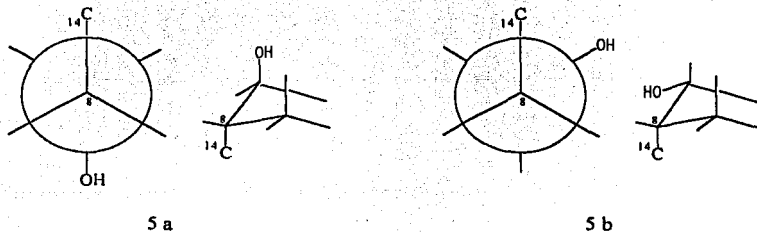


Figura 5. Configuromero *anti* (5 a) y configuromero *syn* (5 b).

El configuromero *anti* en donde el grupo hidroxilo es β -axial y en el cual el efecto γ -gauche sería nulo (figura 5a), y el configuromero *syn* en el cual el grupo hidroxilo es α -ecuatorial en el C-15, siendo este donde se observa un efecto γ -gauche que protege al C-14 [67-69].

La discusión anterior confirma la estructura y esteoquímica de este metabolito secundario aislado de *Iostephane madrensis* y que fue identificado como ácido 15 α -hidroxi-traquiloban-19-oico [67, 69-70].

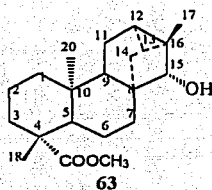
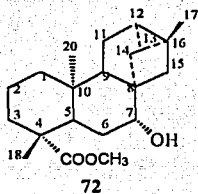
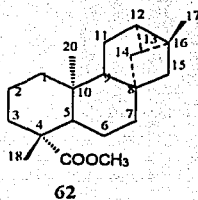


Tabla 11. Desplazamientos químicos en Carbonos para tres diferentes compuestos con esqueleto del traquilobano (CDCl₃, TMS).

Carbono	Traquiloban-19-oato de metilo 62	7 α -hidroxitraquiloban-19-oato de metilo 72	15 α -hidroxitraquiloban-19-oato de metilo 63	$\Delta\delta$ *	$\Delta\delta$ **
1	39.5	39.7	39.79	-0.2	-0.29
2	18.8	19.4	19.15	-0.6	-0.35
3	38.1	38.5	38.15	-0.4	-0.05
4	43.7	43.6	43.82	0.1	-0.12
5	57.0	54.0	36.73	3.0	0.27
6	21.8	24.9	20.99	-3.1	0.81
7	39.3	74.2	33.94	-34.9	5.36
8	40.8	47.4	44.96	-6.6	-4.16
9	52.7	52.2	52.12	0.5	0.58
10	38.6	39.3	38.58	-0.7	0.02
11	19.7	22.3	18.87	-2.6	0.83
12	20.5	24.0	25.12	-3.5	-4.62
13	24.2	21.0	23.59	3.2	0.61
14	33.1	32.2	29.72	0.9	3.38
15	50.4	45.4	86.76	5.0	-36.36
16	22.4	20.1	27.87	2.3	-5.47
17	20.5	20.9	16.02	-0.4	4.48
18	28.7	29.2	28.69	-0.5	0.01
19	177.9	179.9	177.82	-2.1	0.02
20	12.3	13.1	12.74	-0.8	-0.44
21	-----	-----	51.06	-----	-----

 $\Delta\delta$ * (δ del compuesto (62) - δ del compuesto 72) $\Delta\delta$ ** (δ del compuesto (62) - δ del compuesto 63)

Método de Mitscher

La actividad antimicrobiana de plantas puede ser detectada por observación de la inhibición del crecimiento de varios microorganismos, como respuesta al contacto de los extractos de las plantas y los metabolitos secundarios aislados de los productos naturales [71].

La concentración utilizada generalmente para el ensayo antimicrobiano, en la evaluación de extractos crudos de plantas es de 0.1 mg/mL y el criterio utilizado para indicar actividad antimicrobiana en la prueba es la inhibición del crecimiento de uno o mas de los microorganismos [42].

El método de Mitscher, ha sido utilizado para probar algunas sustancias con actividad antimicrobiana y para el descubrimiento de estas propiedades en los productos naturales, en los cuales, se ignora dicha propiedad [42].

Al realizar la evaluación microbiológica de los diferentes metabolitos secundarios aislados de *Iostephane madrensis* por el método de Mitscher y utilizando los microorganismos estandarizados {cuatro bacterias grampositivas: *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. faecalis* y *M. luteus*; tres bacterias gramnegativas: *E. coli*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*; y una levadura *C. albicans*} y de acuerdo con la tabla 8, (pp 47), puede mencionarse que el extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis*; y las sustancias aisladas no tuvieron actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. faecalis* y *S. typhi*. Sin embargo, los metabolitos secundarios aislados de *I. madrensis* presentan actividad inhibitoria, frente a *C. albicans*, con excepción de la sustancia 60 en el cual se observa que hay crecimiento del microorganismo. El extracto clorofórmico de *I. madrensis* y los ácidos 47 y 61 mostraron tener actividad antimicrobiana, por lo tanto, inhibición del crecimiento, frente a *B. subtilis*. La sustancia pura 59, mostró tener inhibición del crecimiento del microorganismo *P. aeruginosa*.

El microorganismo *C. albicans*, coloniza la piel, las mucosas y el tracto gastrointestinal; produciendo infecciones en la vagina, cavidad bucal, entre otras, por lo tanto, como se puede observar en la tabla 8, el extracto clorofórmico de *I. madrensis* y

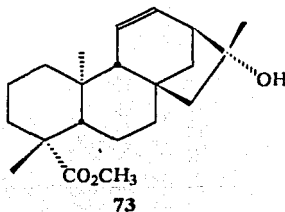
sustancias aisladas de esta, presentaron actividad frente a *C. albicans* y hubo crecimiento del microorganismo en el compuesto **60**; considerando que *I. madrensis* es utilizado para complicaciones gastrointestinales, úlceras estomacales, entre otras [6], los resultados obtenidos en esta prueba preliminar (método de Mitscher), indican que puede haber una correlación entre el uso de la planta *I. madrensis* en la medicina tradicional y los resultados obtenidos con respecto a *C. albicans*, pero debido a que esta es una prueba cualitativa, se sugiere hacer ensayos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), en cada producto aislado del extracto clorofórmico de *I. madrensis*.

En la literatura se informa la actividad antimicrobiana del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**43**), aislado de *Mikania monagasensis* el cual presenta actividad frente a *S. aureus* y *C. albicans*, a diferentes concentraciones [72].

En estudios realizados en *Mikania obtusata*, *Viguiera aspilloides* y *Wedelia paludosa*, fueron aisladas sustancias con esqueleto del *ent*-kaurano las cuales presentan actividad frente al parásito *Trypanosoma cruzi* en la etapa de tripomastigote [73-75].

De *Viguiera decurrens* [35] fueron aislados productos que poseen en su estructura el esqueleto del *ent*-kaurano, como la sustancia **47** presentando actividad insecticida.

Además, se ha descrito en otro estudio químico realizado a *Iostephane heterophylla* [11], se obtuvieron constituyentes químicamente similares a los encontrados en *I. madrensis*, donde se evalúa la toxicidad (*Artemia salina*), obteniéndose para el 16 α -hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oato de metilo (**73**) LC₅₀: 4.3 y el ácido traquiloban-19-oico (**59**) LC₅₀: 945.7.



ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

La información anterior confirma la utilidad del método para detectar actividades antimicrobianas en sustancias puras y extractos de plantas independientemente del tipo estructural que presentan las sustancias aisladas: es una evaluación cualitativa, es decir, una prueba preliminar de los efectos antimicrobianos.

XI. CONCLUSIONES

1. Del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis* se aislaron cuatro diterpenos tetracíclicos con esqueleto del *ent*-kaurano y traquilobano, los cuales son: ácido *ent*-traquiloban-19-oico, 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano, ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico y el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico.
2. Se obtuvieron el traquiloban-19-oato de metilo y dos derivados del ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico, siendo el 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oato de metilo y el ácido 15 α -acetoxi-*ent*-traquiloban-19-oico, para poder confirmar su estructura química y los desplazamientos químicos de los metilos angulares en dichos compuestos.
3. Por medio de técnicas espectroscópicas (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EM-IE), se logró caracterizar a los metabolitos secundarios antes mencionados, aislados del extracto clorofórmico de *Iostephane madrensis*.
4. Por medio del método de Mitscher, se evaluó la actividad antimicrobiana, frente a varios microorganismos estandarizados, encontrándose que todas las sustancias aisladas de *Iostephane madrensis*, no mostraron actividad inhibitoria frente *E. coli*, *M. luteus*, *S. aureus*, *S. faecalis* y *S. typhi*, además, frente a *C. albicans*, todos las sustancias resultaron ser activas con excepción de la sustancia 16 α -hidroxi-*ent*-kaurano; frente a *B. subtilis* el extracto clorofórmico de *I. madrensis*, y los ácidos, ácido 15 α -hidroxi-*ent*-traquiloban-19-oico y el ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico, resultaron ser activos. Por otro lado, el ácido *ent*-traquiloban-19-oico, presentó inhibición del crecimiento del microorganismo *P. aeruginosa*.
5. Por lo tanto, se puede afirmar que los objetivos planteados para este trabajo fueron alcanzados; sin embargo, se requiere de complementación del proyecto, con las biotransformaciones pertinentes a las sustancias mayoritarias del extracto clorofórmico de *I. madrensis*.

XII. SUGERENCIAS

1. Se requiere de la evaluación y del análisis químico del extracto etanólico y hexánico de *Iostephane madrensis*.
2. Se sugiere realizar además de las pruebas antimicrobianas, otras evaluaciones como: toxicidad (*Artemia salina*), pruebas antiinflamatorias, larvicidad, entre otras.
3. Se propone estudiar una cantidad mayor de material vegetal y poder realizar las evaluaciones a nivel de músculo liso.
4. Realizar un análisis más minucioso de las fracciones menos polares de la diferenciación cromatográfica, empleándose técnicas más precisas (HPLC)
5. Las sustancias aisladas pueden ser objeto de biotransformaciones con hongos filamentosos ya que hasta hoy los diterpenos son las sustancias más estudiadas a este respecto [76-79].

*XIII. REFERENCIAS
BIBLIOGRAFICAS*

1. Samulssin, H., (1991); Bioassay-guided isolation of pharmacologically active compounds. *Rev. Latinoamericana Química*, **22** 41.
2. Namburger, M. and Hostettmann, K. (1991); Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine, *Phytochemistry*, **30**, 3864.
3. Hostettmann, K, Marston, L and Wolfender, J. L., (1995); Strategy in the search for new physiologically active plant constituents. *Phytochemistry of plant and in traditional medicine*. Ed. Oxford University Press. USA 1.
4. Cordell, G. (1995); Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**, 1585.
5. Lozoya, X., Rivera Arce, E. and Dominguez, F. (1999); *Phytopharmaceuticals and the Medicine of the New Century Symposium 3, IMSS-Farma Schawefe, The Phytopharmaceuticals of the next century, México* 19.
6. Linares, E. and Bye, R. (1987); A study of four plants complex of Mexico and adjacent United States. *J. of Ethnopharm*, **19**, 153.
7. Sánchez, S. O. (1972); *La Flora del Valle de México*. Herrero, México, 390-391.
8. Rzedowski, J. (1972); *Contribuciones a la fitogeografía florística e historia de México. III; Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. Ciencia* **26**, 123.
9. Williams, D. H., Stone, M. J., Hauck, P. R. and Rahman, S. K. (1989); Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized. *J. Nat. Prod.*, **52**, 1189.

10. Swain, Tony and Williams C. A., (1977); The biology and chemistry of the compositae. Academic Press, Great Britain; 177.
11. Aguilar, M. I., Delgado G., Bye, R and Linares E.; (1993); Bisabolones, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, 33, 1161-1163.
12. Bye, R. A., (1986); Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and mexican market plants. *Economic Botany*, 40, 103.
13. Argueta, V. A., (1995); Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana Tomo I, Instituto Nacional Indigenista, México, pp 16.
14. *Idem* Vol. II pp 165 y 167.
15. *Idem* Vol. III pp 542.
16. *Idem* Vol. IV pp 1017.
17. Romo de Vivar, A., (1985); Productos Naturales de la Flora Mexicana, Ed. Limusa, México, 59-140.
18. Thomson, R. H., (1993); The Chemistry of Natural Products, Ed. Blackie Academic professional, London, 106.
19. Stumpf, P. K., (1980); The Biochemistry of Plants, Vol. 4, Academic Press, New York, 364.
20. Upper, Ch. D. and West, Ch. A., (1967); Biosynthesis of gibberellins. Enzymic cyclization of geranylgeranyl-pyrophosphate to kaurene. *J. Biol. Chemistry*, 242, 3285.

21. Shechter, I. and West, Ch. A., (1969); Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl-pyrophosphate. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3200.
22. Goodwin, T. W. and Mercer, E. I., (1983); Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, 2ª Ed., Great Britain 420-433 y 586-590.
23. Robinson, D. R. and West, Ch. A., (1970); Biosynthesis of cyclic diterpenes in extracts from seedlings of *recinus communis* L. II. Conversion of geranylgeranyl-pyrophosphate into diterpene hydrocarbons and partial purification of the cyclization enzymes. *Biochemistry*, **9**, 80.
24. Cano, F. A. E., (1988); Estudio Fitoquímico de *I. madrensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
25. Rojas, M. R., (1994); Análisis Químico de *Iostephane madrensis*. Tesis de Licenciatura. FES-Zaragoza, UNAM.
26. Hegnauer, R., (1973); Chemitaxonomic der pflazen, Vol. VII, Edit. Berkhausen Verlag Masil. London, pp 174-239.
27. Delgado, G., Álvarez, L. and Romo de Vivar, A., (1984); Terpenoides and a flavan-3-ol from *Viguiera quinquerediata*. *Phytochemistry*, **23**, 675-678.
28. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Grenz, M., Suding, H., Robinson, H. and King, R. M., (1981); Germacranolides diterpenes from *Viguiera* species. *Phytochemistry*, **20**, 113-116.
29. Cuevas, L. A., García J., F. y Romo de Vivar, A., (1972); Estructura de la estenolobina. *Rev. Latinoamericana Quim.*, **3**, 22-27.

30. Bohlmann, F., Zdero, C. und Mahanta, P., (1977); Neuediterpene aus dimorphotheca und *Viguiera* arten. *Phytochemistry*, **16**, 1073-1075.
31. Romo de Vivar, A., Bratoeff, E., Ontiveros E., Lankin, D. C. and Bhacca, N. S., (1980); Vigulenin, a germacranolide from *Viguiera linearis*, *Phytochemistry*, **19**, 1795.
32. Gao, F., Wang, H., Mabry, J. T., Abboud, A. K. and Simonsen, H. S., (1989); Sesquiterpenes lactones, flavonones and a diterpenes acid from *Viguiera laciniata*, *Phytochemistry*, **28**, 2409.
33. Gao, F. and Mabry, J. T., (1985); An acyclic diterpene from *Viguiera deltoidea*, *Phytochemistry*, **24**, 3061.
34. Delgado, G., Álvarez, L. and Romo de Vivar, A., (1984); 15-oxo-zoapatlin, a diterpene lactone from *Viguiera maculata*, *Phytochemistry*, **23**, 2674.
35. Marquina, S., Maldonado N. and Garduño, M. L., (2001); Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*, *Phytochemistry*, **56**, 93.
36. Meragelman, M. K., Ariza, E. L., Sosa, E. V., Uriburu, L. M. and De la Fuente, J. R., (1996); Terpenoid constituents of *Viguiera tucumanensis*, *Phytochemistry*, **41**, 499.
37. Estrada, V. C., Mendez, P. S., and Espinoza, S. V., (1999); Phyto-growth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*, *Phytochemistry*, **50**, 227.
38. Pérez, A. L., Lara, M. O. and Romo de Vivar, A., (1992); Sesquiterpenoids and diterpenoids from *Tithonia longiradiata*, *Phytochemistry*, **31**, 4227.

39. Ohno, N. and Mabry, T. J., (1980); Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids in *Helianthus niveus subspecies canescens*, *Phytochemistry*, **19**, 609.
40. Pérez, A. L., Ortega, A. and Romo de Vivar, A., (1988); An acyclic diterpene and sesquiterpene lactones from *Tithonia pedunculata*, *Phytochemistry*, **27**, 3897.
41. Leonard, F. B. and Geissman, T. A., (1972); Constituents of *Helianthus ciliaris*, *Phytochemistry*, **11**, 327.
42. Vanden, D., and Vlietinck A., (1991); Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agent from Higher Plants, *Methods in Plant Biochemistry*, vol., 6 Assay for Bioactivity, Academic Press, 47.
43. Nadir, T. M., Abdualbaqui, J. D., Al-Sarraj, M. S. and Hussein A. W., (1986); The effect of different methods of extraction on the antimicrobial activity of medicinal plants, *Fitoterapia*, **57**, 359.
44. Hamburger, O. M. and Cordell, A. G., (1987); A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *J. Nat. Prod.*, **50**, 19.
45. Ríos, L. J., Recio, M. C., and Villar, A., (1988); Screening methods for natural products with the microtitrator system. *Amer. J. Clin. Patho.*, **45**, 548.
46. Marymont, H. J., and Wentz, M. B., (1988); Serial dilution antibiotic sensitivity testing with the microtitrator system. *Amer. J. Clin. Patho.*, **45**, 548.
47. Sokomba, E., Wambee, Ch., Chowdhury, K. B. Iriah, J., Ogbeibe, N. O. and Orkor, D., (1986); Preliminary phytochemical, pharmacological and

- antibacterial studies of the alkaloidal extracts of the leaves of *Synclitaea scabrida* miers. *J. Ethnopharm*, **18**, 173.
48. Bauer, W. A., Kirby, M. M., Sherris, C. J. and Turck M., (1966); Antimicrobial susceptibility testing by standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493.
49. Begue, J. M. and Kline, M. R., (1972); The use of tetrazolium salts in bioautographic procedures. *J. Chromatogr.*, **64**, 182.
50. Lund, M. B. and Lyon D. G., (1975); Detection of inhibitors of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, **110**, 193.
51. Ieven, M., Vanden, A. D., Mertens, F., Vlietinck, A. and Lemmens E., (1979); Screening of higher plants for biological activities I. Antimicrobial activity. *Planta Medica*, **36**, 311.
52. Ikram, M. and Inamul, H., (1980); Screening of medicinal plants for antimicrobial activity Part I. *Fitoterapia*, **51**, 231.
53. *Idem* Part II, 281.
54. Ross, A. S., Megalla, E. S., Bishay, W. D. and Awad H. A., (1980); Studies for determining antibiotic substances in some Egyptian plants, Part I. Screening for antimicrobial activity. *Fitoterapia*, **52**, 213.
55. Gutking, O. G., Martino, V., Graña N., Coussio, D. J. and De Torres, A. R., (1981); Screening of south American plants for biological activities, I. Antibacterial and antifungal activity. *Fitoterapia*, **52**, 303.

56. Mitscher, L. A., Ruey-Ping, Mohingar, S. and Bathala, W. W., (1972); Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology, *Lloydia*, 35, 157.
57. Hugel, G., Lods, L., Mellor, J. M., Theodald, D. N. et Purison, G., (1965); Diterpenes de trachylobium, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2888.
58. Bory, S. et Fetizon, M., (1964); Determination de la configuration de esters di ou triterpeniques par spectroscopie infrarouge. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 570.
59. Pyrek, S. St., (1970); New pentacyclic diterpene trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron*, 26, 5029.
60. Franklin, N. C. and Feltkamp, H., (1979); Conformational analysis of cyclohexane by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 4, 774.
61. Kalinovsky, A. I., and Serebryaov, E. P., (1970); Mass spectroscopy of kaurene derivatives. *Organic Mass Spectrometry*, 3, 1393.
62. Esahak, A. P., Ghosh, D. P. and Pakrashi, S. C., (1978); Studies on Indian medicinal plants. Part XXIX. Diterpenoid and other constituents of *Enhydra fluctuans* Lour. *J. Indian Chem. Soc.*, 51, 409.
63. Chien, J. C. C. W., (1960); Resonance spectra of resin acid, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 4762.
64. Piozzi, F., Sprio, V., Passannanti, J. e Mondelli, R., (1968); Struttura dell' acid grandiflorilico. *Gazz. Chim. Ital.*, 98, 907.

65. Cannon, J. R., Chow, P. W., Jefferies, P. R. and Meehan, G. V., (1966); Isolation of (-)-kaur-16-en-19-oic acid and 15 α -hidroxi(-)-kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude*. *J. Aust. Chem.*, 19, 981.
66. Dauden, W., Fonken, G. and Noyce, D., (1956); The stereochemistry of hydride reductions. *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2579.
67. Bohlmann, F., Zdero, Ch., Schmeda-Hirschmann, G., Jakupovic, J., Castro, V., King, R. M. und Robinson, H., (1984); Heliganolide trachyloban und villanoban, derivates aus *Viguiera* *arten*. *Liedbigs. Ann. Chem.*, 495.
68. Grover, S. H. and Stothers, J. B. (1974); C-13 Nuclear magnetic resonance studies. Examination of the long-range shielded effects of the hydroxyl grouping alicyclic system. *Can. J. Chem.*, 52, 870.
69. Ferguson, G., Mc Crindle, R., Murphy, S. T. and Parvaez, M., (1982); Further diterpenoid constituents of *helianthus annuus*, L., crystal and molecular structure of methyl *ent*-15 α -hydroxy-trachyloban-19-oate. *J. Chem. Research*, 200.
70. Faulkner, D. F., Leiby, V. and Waterman, P. G., (1985); Further diterpenes from the bark of *Xilopia acthiopica*, *Planta Medica*, 354.
71. Barahona, M., Cano, M. and Sánchez-Fortun, S., (1994); Toxicidad de cuatro solventes orgánicos sobre tres estadios de desarrollo larvario de *Artemia salina*, *Revista de Toxicología*, 11, 92.
72. Mathur, S. B., Garcia, T. P., Bermin, M. and Mora-Arellano V., (1975); Terpenoids of *Mikania monagasensis* and their biological activities, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 6, 201.

73. Alves, T. M., Chaves, P. G., Santos, S. T., Nagem, J. T., Murta, M. F., Ceravolo, P. I., Romanha, J. A. and Zani, L. C., (1995); A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*, *Planta Medica*, **61**, 85.
74. Da Costa, B. F., Albuquerque, S. and Vichnewski, W., (1996); Diterpenes and synthetic derivatives from *Viguiera aspilloides* with Trypanomicidal activity, *Planta Medica*, **62**, 557.
75. Batista, R., Chiari, E. and Braga de Oliveira A., (1999); Trypanosomicidal kaurane diterpenes from *Wedelia paludosa*, *Planta Medica*, **65**, 283.
76. Fraga, M. B., González, P., Hernández, G. M., Tellado, G. F. and Perales, A., (1985); The microbiological transformation of candidiol *ent*-15 β ,18-dihydroxy-kaur-16-ene, by *Gibberella fujikuroi*, *Phytochemistry*, **25**, 1235.
77. García, G. A. Martínez A. and Ortiz, A. (1990); Microbial transformation of tetracyclic diterpenes: conversion of *ent*-kaurenones by *Curvularia* and *Rhizopus* strains, *J. of Natural Products*, **53**, 441.
78. García, G. A., (1994); Biotransformación de sesquiterpenos y diterpenos: una herramienta para la semisíntesis de productos naturales, *Rev. Latinoamer Quim.*, **23**, 50.
79. Silva, E. A., Takahashi, J. A., Boaventura, M. A. D. and Oliveira, A. B., (1999); The biotransformation of *ent*-kaur-16-en-19-oic acid by *Rhizopus stolonifer* *Phytochemistry*, **52**, 397.