



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *LAENNECIA SCHIEDEANA*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. LUIS ANGEL POLINDARA GARCÍA



TUTOR: DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO

AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 2-7 del Instituto de Química de la UNAM,
bajo la dirección del Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR ROMO y con el apoyo
financiero de la beca otorgada por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI)
como ayudante de investigador

Este trabajo fue presentado en el XLII CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA,
realizado en Guadalajara-Jalisco entre el 22 – 26 de septiembre de 2007.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle de manera especial a el **Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo** por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

A la Maestra **Amira Arciniegas Arciniegas** por su gran ayuda en el presente trabajo y acertadas observaciones.

A las maestras **Ana Lidia Pérez-Castorena** y **Emma Maldonado Jiménez** del Instituto de Química de la UNAM, por su colaboración y consejos.

Al Dr. **Guillermo Ávila** de la FES-Iztacala.

A cada uno de los miembros del jurado por las observaciones y sugerencias realizadas durante la revisión de la presente tesis.

A todo el personal académico y administrativo del Instituto de Química, y del Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por la beca otorgada como ayudante de investigador Nivel III durante mis estudios de Maestría, a través del Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo.

DEDICATORIAS

A mi esposa Luz Angela y mi pequeña Sofía.

Por ser la luz que guía mi camino.

A mi madre Blanca Flor

por deberle lo que soy.

A toda mi familia.

La distancia no es obstáculo para llevarlos siempre en mis pensamientos.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Generalidades familia Asteraceae	3
Descripción morfológica de la familia Asteraceae	4
Química de la familia Asteraceae	4
Tribu Astereae	5
Química del género <i>Conyza</i> (Asteraceae) y su relación con <i>Laennecia</i>	6
Género <i>Laennecia</i> (Asteraceae, Astereae)	11
Morfología general de <i>Laennecia</i>	12
Distribución del género	13
Química del género <i>Laennecia</i>	15
Descripción <i>Laennecia schiedeana</i>	16
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
PARTE EXPERIMENTAL	19
Equipo utilizado	19
Material vegetal	20
Preparación de extractos	20
Fraccionamientos de los extractos	21
Pruebas de actividad biológica	31
RESULTADOS	38
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS (Espectroscopia)	95

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el área de productos naturales, es comprender la relación entre el conocimiento empírico adquirido a través de tiempo por diferentes grupos étnicos, en la utilización de diferentes especies de plantas para el tratamiento de enfermedades y la química. Este conocimiento sobre las virtudes curativas de las plantas, es en la actualidad un pilar fundamental en la búsqueda de nuevos compuestos activos, capaces de proporcionar a la humanidad herramientas que puedan ser utilizadas para combatir la delgada línea divisoria entre la vida y la muerte.

Con el avance científico, novedosas técnicas de purificación y caracterización han sido un punto clave para poder revelar los secretos de la naturaleza y comenzar a comprender y relacionar dichas propiedades con su composición química; comenzando una nueva etapa en la historia de la química en la que el método científico se convirtió en pieza fundamental del rompecabezas.¹⁻²

México, es un país con gran biodiversidad y de una gran historia en medicina tradicional, adquirida fundamentalmente en la época precolombina. Fue tan importante este conocimiento, que grandes esfuerzos fueron hechos en la recolección y clasificación de datos acerca de la flora medicinal en la época de la colonia, permitiendo así salvar un legado de la civilización indígena.³

En la actualidad, el estudio fitoquímico de especies Mexicanas ha ganado gran validez como fuente de moléculas con aplicaciones farmacológicas interesantes.³

Basados en lo anterior, se hace importante el estudio de un género como *Laennecia*, el cual está constituido por 22 especies distribuidas a lo largo del continente Americano. Cabe anotar que en México hay presentes 10 especies de este género⁴ y que hasta la fecha solo se ha estudiado fitoquímicamente una especie.⁵

Las especies de *Laennecia* fueron segregadas de *Conyza* (Asteraceae, Astereae), debido a diferencias morfológicas.⁴ Es importante recalcar que especies de

Conyza se han utilizado ampliamente en medicina tradicional Mexicana, tal es el caso de *Conyza filaginoides*, comúnmente conocida como simonillo. Esta planta ha sido utilizada desde tiempos inmemoriales en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales y enfermedades cutáneas principalmente¹. Por tal motivo, es de interés establecer algún patrón quimiotaxonómico entre *Laennecia* y *Conyza*, o géneros cercanos, además de la posible actividad biológica de sus metabolitos.

El presente trabajo, describe el estudio fitoquímico de la parte aérea de *Laennecia schiedeana*, además de los resultados de actividad biológica de los metabolitos aislados.

ANTECEDENTES

GENERALIDADES FAMILIA ASTERACEAE

Asteraceae es la segunda familia mas grande en la división Magnoliófitas (plantas con flores). Se divide en 13 tribus las cuales están conformadas por alrededor de 1300 géneros y 30,000 especies distribuidas en los 5 continentes a excepción de la antártica.⁶ Existen alrededor de 380 géneros de Asteraceas con cerca de 3000 especies presentes en México, siendo la familia mas ampliamente distribuida.⁷

La diversificación ecológica de Asteraceae ha permitido que esta familia de plantas con flores se adapte a diferentes tipos de hábitats, como en montañas a latitudes tropicales y subtropicales, mostrando mayor diversidad en áreas montañosas que en regiones semiáridas o desérticas.

Esta flexibilidad ecológica ha permitido que se desarrollen géneros como *Cuchumatanea* (Heliantheae) los cuales se caracterizan por ser reducidos arbustos anuales de 1 cm de alto, hasta árboles tropicales con 20 m de alto como *Brachylaena* (Inuleae) y *Montanoa* (Heliantheae). También existen géneros como *Erigeron* y *Coreopsis* cuyas especies se han adaptado a regiones desérticas, lo anterior hace de Asteraceae una de las familias de plantas mas importantes a nivel mundial.⁶

De esta forma la familia Asteraceae ha adquirido a través del tiempo una importancia etnobotánica y química, ya que desde tiempos ancestrales se han utilizado especies de esta familia para el tratamiento de diferentes padecimientos, tal es el caso de México, en donde la etnofarmacología ha alcanzado un nivel importante. México posee una amplia presencia de especies pertenecientes a Asteraceae (alrededor de 3000)⁷ lo cual ha hecho que su uso en medicina tradicional sea extenso, como por ejemplo el estafiate (*Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*), zoapatle (*Montanoa tomentosa*) y la árnica Mexicana (*Heterotheca inuloides*), entre otros.³

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LA FAMILIA ASTERACEAE

Las especies de esta familia se caracterizan por ser generalmente herbáceas o arbustivas, rara vez arbóreas, trepadoras o acuáticas. Sus raíces son fibrosas, sus tallos son usualmente erectos, algunas veces ascendentes con rizomas lanosos. Sus hojas usualmente alternas u opuestas, raramente estipuladas, usualmente pecioladas, algunas veces sésiles. Inflorescencias primarias constituidas por una cabezuela pseudántica. Sus frutos tienen forma de aquenio llevando en la parte superior un vilano, flores en forma de disco o tubulares actinomorfas (radialmente simétricas).

El cáliz de las flores se han modificado para formar un vilano, un mechón de pelos, que a menudo aparece en la fruta madura. El fruto tiene forma de aquenio (fruto de paredes delgadas).⁶

QUÍMICA DE LA FAMILIA ASTERACEAE

Como se mencionó antes, la importancia de la familia Asteraceae en medicina tradicional ha hecho que día a día aumente el interés en conocer los constituyentes activos de estas plantas. Distintas clases de especies pertenecientes a esta familia se han estudiado, encontrando que en general se encuentran en todas las tribus compuestos de tipo inulina, ácidos grasos, lactonas sesquiterpénicas presentes en hojas, triterpenos pentacíclicos, ésteres de ácido cafeico y flavonoides, entre otros.

También en muchas de sus tribus se pueden encontrar compuestos acetilénicos (raíces y hojas), monoterpenos fenólicos (hojas y fruto), ciclitoles y coumarinas (hojas y flores), alcaloides pirrolizidínicos (todos los tejidos, Senecionae), triterpenos ácidos (en flores), amidas de ácidos grasos y cromonas (raíces) y diterpenos presentes en todos los tejidos.⁸

Sin embargo, con esta información aun no es posible hacer una delimitación clara basada en la composición química de la familia Asteraceae. Lo que es claro es que las lactonas sesquiterpénicas son los compuestos de mayor distribución en la

familia y que la ausencia de estas en diferentes tribus ha hecho posible una delimitación mas clara como es el caso de la tribu Astereae.⁹

TRIBU ASTEREAE

Astereae es una tribu que comprende 135 géneros y alrededor de 2500 especies distribuidas a nivel mundial principalmente en regiones tropicales.

Las especies de la tribu Astereae, como por ejemplo las del género *Laennecia* y *Conyza*, se caracterizan por el estilo de las flores bisexuales en forma de disco, las anteras son obtusas en la base, con el apéndice triangular. Sus hojas son, enteras o dentadas, ocasionalmente divididas y en zonas secas las hojas se tornan resinosas. La tribu astereae se conforma de especies arbóreas, arbustos y hierbas que pueden ser perenes o anuales, de tamaño pequeño a medio.¹⁰

La clasificación y la filogenia de la tribu Astereae ha sido objeto de recientes estudios morfológicos y moleculares, demostrando que por ejemplo muchos de los géneros presentes en el continente americano son monofiléticos.¹¹

Una serie de estudios subsecuentes conllevaron a que varios grupos o subtribus fueran redefinidos en otros géneros y por esto la transferencia de especies entre los mismos basados en características morfológicas, como por ejemplo sus flores, determinando que grandes géneros como *Erigeron*, *Symphyotrichum* y *Solidago* son originarios del continente americano y que posteriormente fueron esparcidos a Europa y Asia.¹²

Hasta el momento, es muy limitada la información disponible en cuanto a composición química de los géneros pertenecientes a la tribu Astereae, haciendo difícil plantear un patrón quimiotaxonómico adecuado. Sin embargo, se ha estudiado principalmente la raíz de las especies pertenecientes a diferentes subtribus, como por ejemplo la Asterinae, en donde se pueden notar que los compuestos poliacetilénicos y las cumarinas son sus principales constituyentes.

De Astereae, se han aislado monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, además de triterpenoides y esteroides, flavonoides y otros derivados fenólicos. Sin embargo la rareza o ausencia de lactonas sesquiterpénicas y alcaloides, parece distinguir Astereae de otras tribus de Asteraceae.¹³

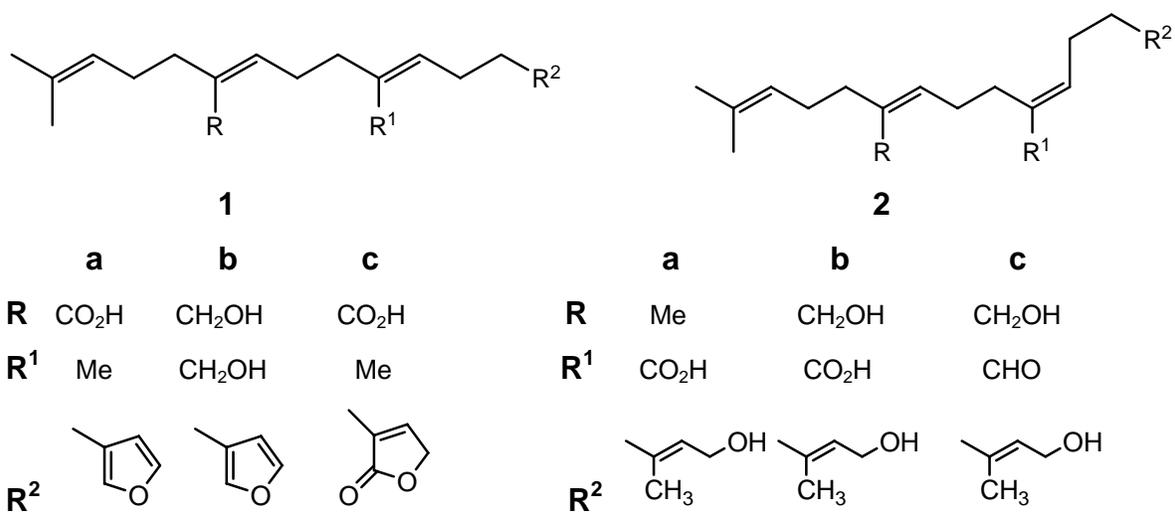
En México están presentes alrededor de 38 géneros de la tribu Astereae con alrededor de 380 especies identificadas hasta la fecha.⁷

LA QUÍMICA DEL GÉNERO CONYZA (Asteraceae, Astereae) Y SU RELACIÓN CON LAENNECIA

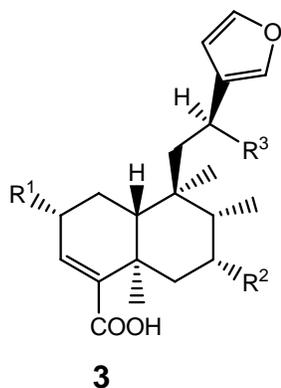
Un punto importante para entender adecuadamente la composición química del género *Laennecia*, es poder establecer un paralelo con los metabolitos aislados del género *Conyza*, debido a que *Laennecia* fue segregado de *Conyza* por Zardini¹⁴ en 1981 y complementado por Nesom⁴ en 1990, basándose en diferencias morfológicas y creando desde entonces un género emergente al cual se le han ido adicionando nuevas especies. Así que se podría esperar un patrón químico similar o cercano entre ambos géneros de la tribu Astereae.

El género *Conyza* (Asteraceae, Astereae) consiste en alrededor de 50 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Son plantas herbáceas perennes, que crecen entre 1-2 m de alto. Los tallos son erectos y ramificados con hojas alternas dentadas, sus flores son pistiladas monomórficas, de lígulas ausentes o presentes aunque estas casi nunca exceden la distancia del involucre.¹³

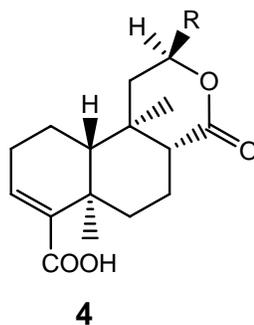
Entre los compuestos reportados en *Conyza*, aislados principalmente de la parte aérea, figuran diterpenos de tipo furano acíclicos **1a**^{15,16}, **1b**¹⁷, **1c**¹⁸ y derivados de geranil geranilo **2a-c** aislados de *Conyza pyrifolia* y *C. schimperi*.¹⁹



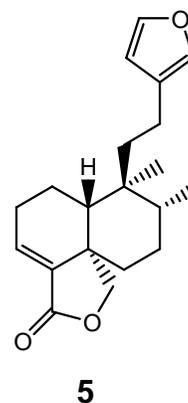
También se han reportado diterpenos de tipo clerodanos (**3a**^{18,20}, **3b**^{16,20}, **3c**¹⁸, **4a-b**¹⁸, **5**²¹), *seco*-clerodanos (**6a-b**¹⁸, **6c**^{18,20}, **7a-b**¹⁹) y labdano con grupos xilósidos (**8**^{22, 23, 24}).

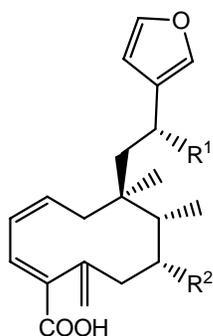


- a** R¹ = OH, R² = H, R³ = H
b R¹ = β-OH, R² = H, R³ = H
c R¹ = H, R² = H, R³ = OH



- a** R =
- b** R = Furano



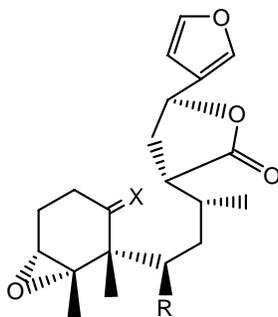


6

a R¹ = OH, R² = H

b R¹ = H, R² = OH

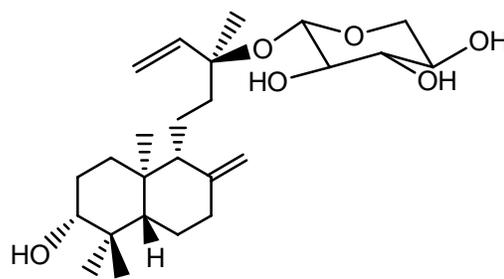
c R¹ = H, R² = H



7

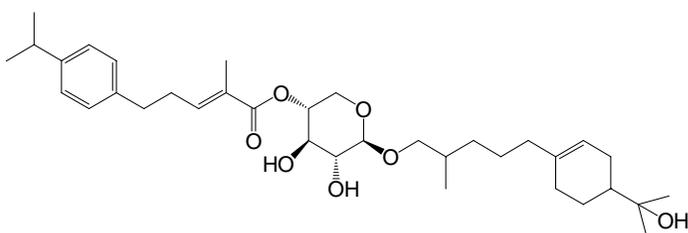
a X = O, R = H

b X = O, R = OAng

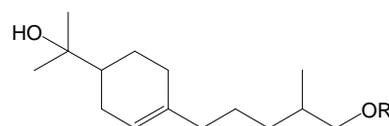


8

Se han reportado diferentes sesquiterpenos de especies del Este de África, de *Conyza aegyptica* (L) se aislaron los compuestos (**9**¹⁹, **10a-b**¹⁹) y de *Conyza schimperi* Sch. Bip. se aisló el metabolito **11**.¹⁹

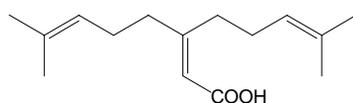


9



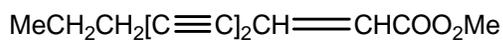
10

a R = H **b** R = Xyl



11

Los derivados acetilénicos de 10 carbonos son otro grupo de compuestos reportados en *Conyza*. De *C. canadiensis* se aislaron los compuestos (**12**, **13**)²⁵, igualmente de *C. bipinata* se reportan los metabolitos (**14**, **15**).²⁵ También en *C. pallidiflora* se reportan compuestos acetilénicos de este tipo, pero no diterpenos.²⁵



Cis

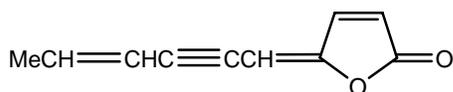
12



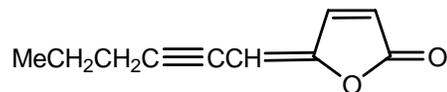
Cis

Cis

13



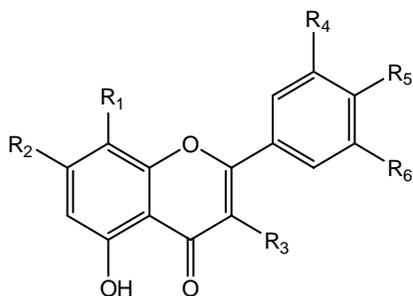
14



15

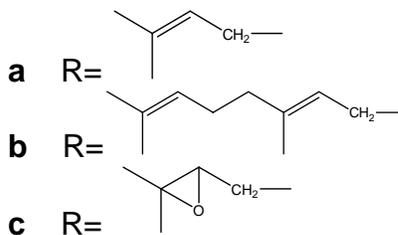
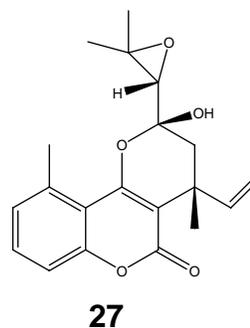
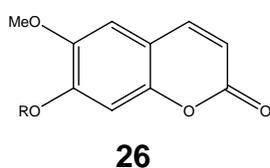
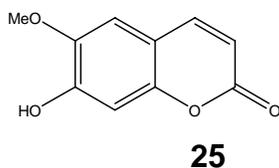
También se han aislado flavonoides como rutina (**16**), 3-O-glucósido de quercetina (**17**), y el 5,8-dihidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona (**18**) de *Conyza blinii*.²⁶ Recientemente se reportó de *C. filaginoides*²⁷ astragalina (**19**) y nicotriflorina (**20**). De *C. bonariensis* se aislaron las flavonas 7-O-glucósido de luteolina (**21**) y 7-O-rutinósido de luteolina (**22**).²⁸

De igual forma se ha reportado en *C. linifolia* el compuesto vitexina (**23**)²⁹ y en *C. stricta* el metabolito conizatin (**24**).³⁰



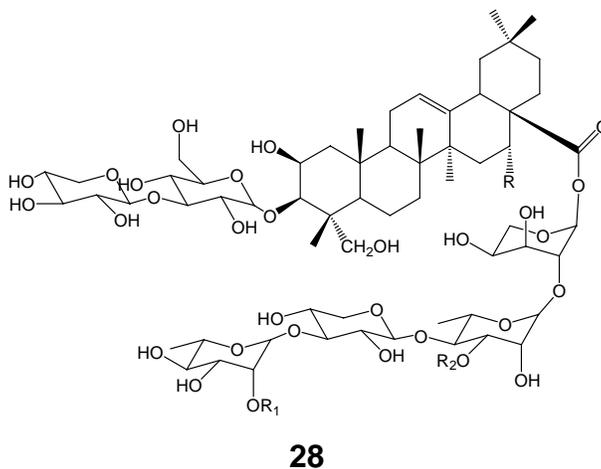
- | | |
|--|--|
| 16 R ₁ = R ₄ = H R ₂ =R ₅ =R ₆ =OH R ₃ = O-Glu-Ram | 21 R ₁ = R ₃ = R ₄ = H R ₂ = O-Glu R ₅ =R ₆ =OH |
| 17 R ₁ = R ₄ = H R ₂ =R ₅ =R ₆ =OH R ₃ = O-Glu | 22 R ₁ = R ₃ = R ₄ = H R ₂ = O-Glu-Ram R ₅ =R ₆ =OH |
| 18 R ₁ =OH R ₂ =R ₅ =R ₆ =OMe R ₃ = R ₄ = H | 23 R ₁ = O-Glu R ₂ = R ₅ = OH R ₃ =R ₄ =R ₆ = H |
| 19 R ₁ = R ₄ = R ₆ = H R ₂ =R ₅ =OH R ₃ = O-Glu | 24 R ₁ = R ₃ = R ₄ =R ₅ = R ₆ = OMe R ₂ = OH |
| 20 R ₁ = R ₄ = R ₆ = H R ₂ =R ₅ =OH R ₃ = O-Glu-Ram | |

También se han reportado del género *Conyza* diferentes cumarinas, a las cuales se les han atribuido una amplia gama de actividades farmacológicas, como antibacteriales³¹, antitumorales^{32,33} y anti HIV-PR³⁴, entre otras. De *C. linifolia*²⁹ se obtuvo escopoletina (**25**), de *C. obscura*²⁵ se han aislado diferentes cumarinas (**26a-c**) y en 1996 de *C. bovey*³⁵ se reportó el aislamiento de ethuliacumarina A (**27**).



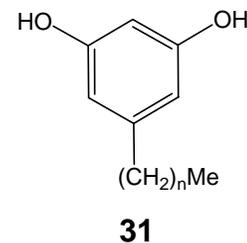
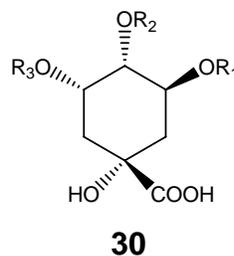
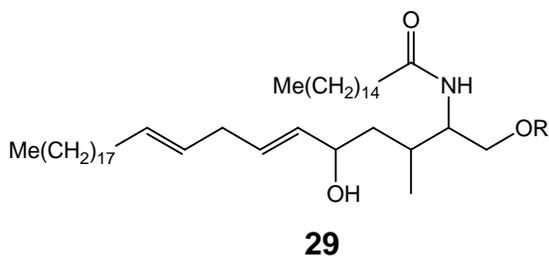
Estudios recientes han revelado la presencia de saponinas triterpénicas (**28a-b**) en *Conyza blinii*³⁶. Esta es una planta herbácea distribuida principalmente en la región suroeste de China y es usada en medicina tradicional demostrando tener propiedades sedativa, antipirética, antiinflamatoria, entre otras.³⁷

Dentro de los compuestos menos comunes presentes en el género *Conyza* se encuentran los esfingolípidos (**29a-b**) aislados en 2002 de *C. canadiensis*,³⁸ los derivados de ácido quínico (**30a**^{28,29}, **30b-d**²⁸) y derivados de resorcinol (**31a-b**^{17,23}).



a R=R₁=R₂= H

b R=OH R₁=R₂= H



a R =H

b R= β -D-Glucopiranósido

a R₁= Cafeil R₂= R₃=H

b R₁= R₂= Cafeil R₃=H

c R₁= R₃= Cafeil R₂=H

d R₂= R₃= Cafeil R₁=H

a n=14

b n=15

GÉNERO *LAENNECIA* (Asteraceae: Astereae)

El género *Laennecia* está constituido de 22 especies distribuidas principalmente en Norte, Centro y Sur América, las cuales fueron segregadas del género *Conyza* por Zardini.¹³ Aunque las relaciones genéricas aún no son claras, se cree que este género está más relacionado a *Nidorella* o a miembros de la subtribu Grangeinae que con *Conyza* o *Erigeron*, aunque esto es apenas una hipótesis.

Zardini propuso segregar dos especies del género *Conyza* a *Laennecia* basado en diferencias morfológicas. Estas primeras especies fueron *L. filaginoides* D.C y *L. gnaphalioides*. Las razones fueron las siguientes:

1 *Conyza* : Plantas generalmente no lanosas; aquenio con tricomas dobles muy esparcidos, vilano uniseriado, nervadura principal naranja, corolas naranjas nervadas

2 *Laennecia*: Plantas lanosas, aquenio con tricomas dobles densos o cubriendo solo la parte central y los márgenes; vilano biseriado, nervadura principal algunas veces amarillas pero no naranjas, corolas nervadas no naranjas.

Laennecia y *Conyza* han sido consideradas como co-genéricas por la posesión de flores con cortas lígulas pistiladas en numerosas series y sus aquenios con vilanos en forma de cerdas que se elongan hasta la madurez del fruto.

Estas semejanzas puedan ser interpretadas como resultado de una evolución convergente o paralela.

Otras diferencias morfológicas como la presencia de una resina naranja en la nervadura principal de los filarios, los cuales son invariablemente presentes en *Conyza* y *Erigeron*, y que están ausentes en *Laennecia*. Además de las diferencias en la forma de sus corolas, dando indicio que *Laennecia* está mas relacionado por ejemplo con *Baccharis* u otros géneros de América del Sur pertenecientes a la tribu Astereae que con *Conyza*.⁴

MORFOLOGÍA GENERAL DE LAENNECIA

Todas las especies de este género se caracterizan por ser plantas perenes o anuales, lanosas, comúnmente cubierta de pubescencias muy largas y erectas, glándulas cortas estipitadas al menos sobre las hojas de muchas especies, capítulo resinoso naranja, filarios con la región media verdosa, nervadura principal algunas veces amarillas pero no en forma de resina naranja, corolas en forma de disco con venas y no naranjas. Lóbulos lanceolados, aquénios usualmente glandulares, algunas veces eglandulares, densamente seríceos, vilano uniseriado o fuertemente biseriado.

El género *Laennecia* ha sido dividido en dos secciones, estas son *Laennecia* y *Sophiifolium* (Nesom). Esto se debe a que existen pequeñas diferencias morfológicas dentro del mismo género, así:

Las especies que están dentro de la sección ***Laennecia***, se caracterizan por tener sus hojas mas oblongas-lanceoladas, dentadas, glandulares o eglandulares, hierbas glandulares o eglandulares, con vestimenta blanca tomentosa muy densa. Aquenios con glándulas resinosas persistentes, sésiles y eglandulares. Unas de estas son: *Laennecia chihuahuana* Nesom, *L. confusa*, *L. eriphylla* (A. Gray)

Nesom, *L. filaginoides*, *L. gnaphalioides*, *L. lasseriana* (Aristeg) Nesom, *L. microglossa* (S. F Blake) Nesom, *L. mima* (S. F Blake) Nesom, *L. pimana* Nesom-Laferrière, *L. prolialba* (Cuatr.) Nesom y ***L. schiedeana***.(Less.) Nesom.

Las especies que están en la sección ***Sophiifolium*** (Nesom). Se caracterizan por poseer sus hojas pinnatífidas o bipinnatífidas (dentadas en *L. coulteri*), glandulares, con vestimenta hirsuta-pilosa. Aquenos con pequeñas glandulas suavemente levantadas. Algunas de estas son: *Laennecia altoandina* (Cabrera) Nesom, *L. artemisiifolia* (Meyen y Walp.) Nesom, *L. sophiifolia*, y *L. coulteri* (A. Gray) Nesom.⁴

DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO

Las 22 especies reportadas hasta el momento en el género *Laennecia* están distribuidas principalmente en el sur de Norte América, Centro y Sur América.

Se pueden encontrar en diferentes hábitat como praderas, bosques rocosos, de pino encino, desérticos, entre otros. Todos estos ubicados a una altitud entre los 1000-4300 m.s.n.m.⁴

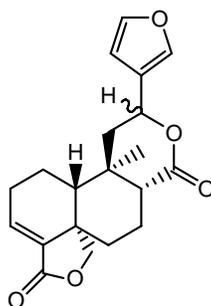
En México están presentes 10 de estas especies, las cuales se relacionan en la tabla 1. Cabe anotar que *L. schiedeana* esta presente además de México en Guatemala ,Costa Rica y en Norte América en los estados de Arizona, Nuevo México y Colorado.⁴

Tabla 1. Distribución de especies del género *Laennecia* en México⁴

Especie	Distribución en México
<i>L. schiedeana</i> (Less.) Nesom	Baja California Norte, Chihuahua, Sinaloa, Coahuila, Nuevo León, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, San Luis Potosí, Hidalgo, Ed. México, Morelos, Puebla, Veracruz
<i>L. chihuahuana</i> Nesom.	Chihuahua (Endémica)
<i>L. confusa</i> (Cronq) Nesom.	Durango, Chihuahua
<i>L. coulteri</i> (A. Gray) Nesom.	Chihuahua, Durango, Zacatecas, Jalisco, Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas
<i>L. eriophylla</i> (A. Gray) Nesom	Sonora, Chihuahua
<i>L. filaginoides</i> D.C	Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, San Luis Potosí, Aguascalientes, Nuevo León, Hidalgo, Ed. México, Veracruz, Oaxaca, Chiapas
<i>L. gnaphaloides</i> (Kunth) Cass.	Chihuahua, Durango, Jalisco, Aguascalientes, Michoacán, México, San Luis Potosí, Veracruz, Oaxaca, Chiapas.
<i>L. microglosa</i> (S. F Balke) Nesom.	Chihuahua, Durango, Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí (Endémica)
<i>L. sophiifolia</i> (Kunth) Nesom.	Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Durango, Nayarit, Michoacán, Zacatecas, Jalisco, San Luis Potosí, Aguascalientes, Guerrero, Hidalgo, Ed. México, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas
<i>L. pimana</i> Nesom- Laferrière	Chihuahua (Endémica)

QUÍMICA DEL GÉNERO *LAENNECIA*

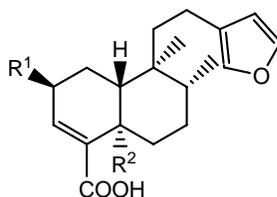
Hasta el momento, la única especie del género estudiada fitoquímicamente ha sido *Laennecia sophiifolia*⁵ (Kunth) Nesom, aislandose de la parte aérea los diterpenos de tipo *neo-clerodanos* (**32a-b**, **3b**, **33b**), los furanos acíclicos (**34**, **1a**), el flavonoide apigenina (**35**) y el β -sitosterol.



32

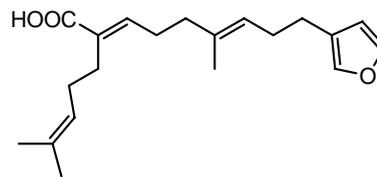
a = 12-S

b = 12-R

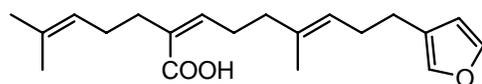


33b R¹ = H R² = CH₂OH

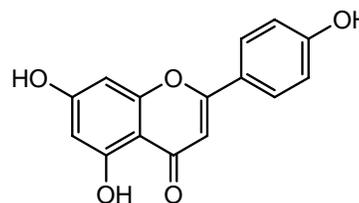
3b R¹ = OH R² = Me



34



1a



35

También, se ha reportado la actividad antiinflamatoria de los extractos de acetona y cloroformo de la parte aérea de *Laennecia sophiifolia* (Kunt) Nesom, evaluada en ratones utilizando el modelo de edema inducido con carragenina.³

***Laennecia schiedeana* (Less.) Nesom⁴**

CLASIFICACIÓN

Familia: Asteraceae

Tribu: Astereae

Género: *Laennecia*

Especie: *schiedeana*



Esta planta es una hierba anual entre 20 y 50 cm de alto, la mayoría de la planta está cubierta moderada o densamente por delgadas pubescencias multicelulares, los cuales pueden prolongarse filiformes (de forma prolongada y delgada), ápices (punta de la hoja o foliolo) encrespados produciendo una pubescencia (pelos simples, delgados y rectos) lanosa-arenosa (pelos entrecruzados como una telaraña).

Los pelos de los filarios son continuos en espesor y están articulados a lo largo.

Sus hojas son lanceoladas-oblongas (de base mas o menos amplia y atenuada hacia el ápice) de 2-8 mm de ancho, entera o someramente dentadas cerca del ápice o algunas veces someramente lobuladas (división redondeada de la lámina), abrazadora (que rodea parcialmete el tallo), con corto estipitado y con glándulas resinosas naranjas.

Capítulos usualmente angostos en forma de espiga (inflorescencia definida simple con las flores sésiles sobre un eje prolongado) como panícula (inflorescencia muy ramificada). Pétalos pistilados (individuo con flores femeninas solamente) con lígulas (limbo alargado laminar de las flores gamopétalas) entre 0.3-1.4 mm de longitud. Aquenios (fruto simple seco, monocarpo, derivado de un ovario súpero) café a ligeramente púrpuras, lustrosos, glanduloso cerca del ápice o algunas veces aparentemente eglandular, vilanos como series simples de 15-20 cerdas.

Esta planta se encuentra en alturas entre 1750-4000 m.s.n.m y su época de floración se encuentra entre agosto y noviembre.⁴

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El género *Laennecia* comprende un grupo de 22 especies segregadas recientemente del género *Conyza*^{4,14}, las que se encuentran distribuidas principalmente en Norte, centro y Sur América. De todas las especies del género, diez se encuentran representadas en territorio Mexicano⁴. Hasta el momento, solo se ha estudiado químicamente una especie de este género, de donde se aislaron diterpenos del tipo *neo-clerodanos* y furanos alicíclicos, observando cercana relación quimiotaxonómica con los metabolitos aislados del género *Conyza*.^{5,39} Diferentes especies de este último, han sido investigadas químicamente obteniendo principalmente diterpenos de tipo furoclerodanos,^{16,18,20} seco-clerodanos,¹⁸⁻²⁰ labdanos glicosilados,²²⁻²⁴ diterpenos alicíclicos¹⁵⁻¹⁹ y sesquiterpenos,¹⁹ además se ha reportado la actividad antiprotozoaria del crudo de algunos miembros de *Conyza* que han sido ampliamente usados en medicina tradicional Mexicana para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales^{1,50}. Con el fin de contribuir al establecimiento de un patrón quimiotaxonómico entre las especies del género *Laennecia* y *Conyza*, y con el objeto de evaluar la posible actividad biológica sus metabolitos, se consideró pertinente el estudio químico de la parte aérea de *Laennecia Schiedeana*.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio fitoquímico de las especies del género *Laennecia* y establecer una relación quimiotaxonómica con la única especie del género *Laennecia* estudiada y su relación química con el género *Conyza*, además de explorar el potencial farmacológico de la misma con la finalidad de corroborar las propiedades etnofarmacológicas reportadas para este género.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar los principales componentes de la parte aérea de *Laennecia schiedeana* mediante diversos métodos cromatográficos y químicos convencionales.
- Identificar los metabolitos aislados mediante técnicas espectroscópicas de IR, EM y RMN-¹H, ¹³C; esta última incluye técnicas mono y bidimensionales, además por comparación con los datos espectroscópicos y físicos con los reportados en la literatura .
- Realizar pruebas de actividad biológica de los compuestos aislados mediante el ensayo de citotoxicidad (usando el método colorimétrico de la sulforrodamina B) frente a seis líneas celulares cancerosas humanas: mama (MCF-7), leucemia (K-562), pulmón (SKLU-1), sistema nervioso central (U-251), próstata (PC-3) y colon (HCT-15). Además se harán pruebas de actividad antitumoral (usando el modelo de edema inducido por TPA), bioensayos con hongos fitopatógenos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

PARTE EXPERIMENTAL

EQUIPO UTILIZADO

Para la caracterización total de los metabolitos secundarios aislados en el presente trabajo, se utilizaron los siguientes equipos y materiales:

Para la cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice 60 G (90 % < 45 μm), silica gel 230-400 mesh (37-62 μm), sephadex LH-20 y Resina diaionica HP-20 (200-600 mm, Mitsubishi, Chemical Co., Tokyo, Japan).

En la cromatografía de capa fina se usaron cromatofolios conformados por gel de sílice ALUGRAM SIL G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor. Para las cromatografías en placa preparativa se utilizaron placas Macherey-Nagel SIL G 200/UV₂₅₄ y G 100/UV₂₅₄ y G 50/UV₂₅₄.

El monitoreo de las placas se llevó a cabo mediante exposición de luz UV con una lámpara de UV spectroline CX-20 a dos longitudes de onda (254 nm y 365 nm) y utilizando como revelador una solución de sulfato cérico a 3% en ácido sulfúrico 2N.

Los puntos de fusión no corregidos fueron determinadas en un aparato Fisher-Jhons serie N°. 591 y las rotaciones ópticas en un polarímetro Jasco DIP-360.

Las muestras fueron concentradas un evaporador rotatorio BÜCHI R-114 y un baño de agua BÜCHI B-480

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de impacto electrónico en un espectrómetro JEOL JMS-AX5505HA (70 eV) y FAB en un JEOL MS-SX1102A (10 KV)

Los espectros en el IR se obtuvieron en los equipos Perkin-Elmer 337 y Bruker Tensor 37, utilizando técnicas de suspensión, disolución y pastilla de KBr.

Los datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C se obtuvieron en los espectrofotómetros Varian Unity (300 MHz ¹H, 75 MHz ¹³C), Varian-Gemini 200 M

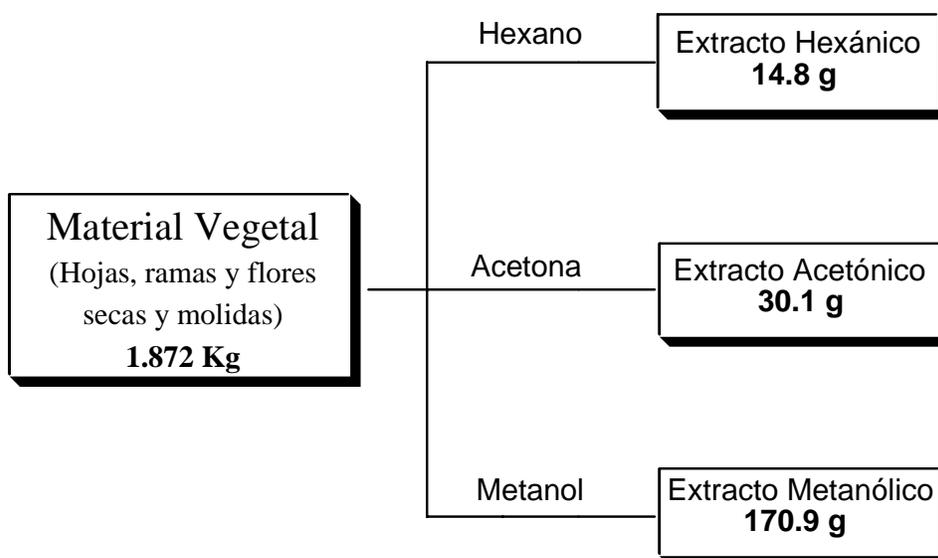
(200 MHz ^1H , 75 MHz ^{13}C) y Varian-Unity Inova (500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C), utilizando en todos los casos disolventes deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm con respecto a TMS que se usó como referencia interna.

MATERIAL VEGETAL (*Laennecia schiedeana*)

La especie *Laennecia schiedeana* (Less.) Nesom se recolectó en el municipio de Ozumba-Estado de México, el 21 de septiembre de 2004. El material vegetal fue identificado por el Dr. José Luis Villaseñor y una muestra del mismo fue depositado en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, con número de registro MEXU 95988.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

1.872 Kg de ramas, hojas y flores previamente secas y molidas se extrajeron sucesivamente por maceración con disolventes de polaridad creciente, usando hexano, acetona y metanol, obteniéndose 14.89 g, 30.1 g y 170.9 g de cada extracto respectivamente (Esquema 1).



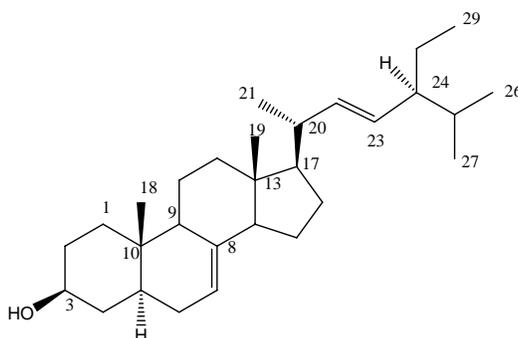
Esquema 1. Preparación de extractos de la parte aérea.

Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas.

El extracto hexánico se adsorbió en celita y se colocó sobre una columna empacada con gel de sílice (150 g). La columna se eluyó con mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona y al final se lavó con metanol.

En total se obtuvieron 94 fracciones de 250 ml c/u. De las fracciones 7-32-H eluidas con hexano-acetona 98:2 se colectaron 0.0201 g (0.0011%) de un producto cristalino en forma de agujas planas que luego de filtración y posterior recristalización con metanol, se identificó como espinasterol **(36)**.⁴³⁻⁴⁷

Espinasterol (36). Agujas incoloras, p.f 170-172°C, $[\alpha]_D^{25} -0.70^\circ$ (CHCl₃, c 1.0); IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3387, 2935, 2870, 1450, 1374, 1041, 969; EM-IE m/z (% intensidad relativa): 412 (24) [M]⁺, 369 (15), 271(100), 255 (41), 253 (20); RMN-¹H: Espectro 1, Tabla 7; RMN-¹³C: Espectro 2, Tabla 7.

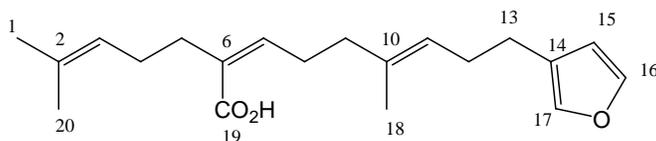


Espinasterol **(36)**

Las fracciones 2-6-H (0.90 g) obtenidas con hexano fueron absorbidas en celita y sometidas a CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetato de etilo, recolectando un total de 130 fracciones de 5 ml c/u.

Las fracciones 2-6-H-(117-125) (0.060 g) eluidas con hexano-AcOEt 95:5, se purificaron por cromatografía en placa preparativa (Macherey-Nagel SIL G 200/UV₂₅₄) utilizando benceno-acetona 9:1 (2x), aislando 0.025 g (0.0013 %) de un aceite amarillo identificado como ácido centipédico **(1a)**.^{15-16, 38, 57}

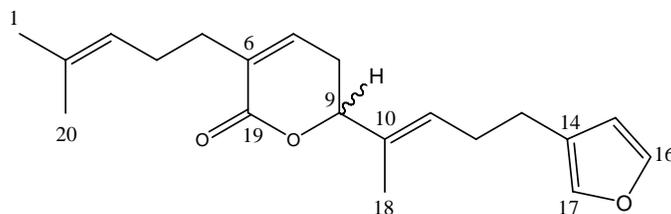
Ácido centipédico (1a). Aceite amarillo, IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3500, 2925, 1728, 1688, 1634, 873 (furano); EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 316 (5)[M]⁺, 247 (35), 81 (80), 69 (100); RMN-¹H: Espectro 3, Tabla 8; RMN-¹³C: Espectro 4, Tabla 8.



Ácido centipédico (1a)

Las fracciones 7-32H (5.14 g) que fueron eluidas con hexano-acetona 98:2 se adsorbieron en celita y se sometieron a CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona-metanol. En total se obtuvieron 81 fracciones de 75 ml c/u. Las fracciones 7-32H-(30-37) (0.3321 g) eluidas con mezclas de hexano-acetona 99:1, se adsorbieron en celita y se purificaron por CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-diclorometano, obteniendo un total de 30 fracciones de 10 ml c/u. Las fracciones 7-32H-(30-37)-(25-29) (0.2554 g) colectadas con hexano-diclorometano 9:1 se aplicaron sobre 3 placas preparativas (Macherey-Nagel SIL G 200/UV₂₅₄) que fueron eluidas con benceno-AcOEt 96:4 (1x) y finalmente aislando 0.0635 g (0.0034 %) de un aceite café identificado como conizaleucólida A (**37**).¹⁸

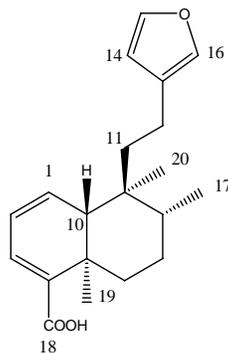
Conizaleucólida A (37). Aceite café, [α]_D²⁵ +1.70° (CHCl₃, c 1.0); IR(CHCl₃) cm⁻¹: 2922, 2850, 1718 (lactona), 872; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 314 (10) [M]⁺, 299 (5) [M-Me]⁺, 245 (35), 81 (100), 69 (41); RMN-¹H: Espectro 6, Tabla 9; RMN-¹³C: Espectro 7, Tabla 9.



Conizaleucólida A (37)

Las fracciones 7-32H-(69-75) (0.2724 g) eluidas con hexano-acetona 8:2 se aplicaron sobre tres placas preparativas (Macherey-Nagel SIL G 200/UV₂₅₄) y fueron eluidas 6 veces con diclorometano-hexano 8:2, obteniéndose 0.0222 g (0.0012 %) de un sólido café pálido identificado como ácido 5(*S*)-8(*R*)-9(*R*)-10(*S*)-nidoresédico (**38**).²⁰

Ácido 5(*S*)-8(*R*)-9(*R*)-10(*S*)-nidoresédico (38**).** Sólido café pálido, p.f 81-83°C, $[\alpha]_D^{25} -131^\circ$ (CHCl₃, *c* 1.0); IR(CHCl₃) cm⁻¹: 3500-3440, 2924, 1677, 1624, 1262, 1027; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 314 (4)[M]⁺, 299 (363), 95 (34), 81 (66); RMN-¹H: Espectro 10, Tabla 10; RMN-¹³C: Espectro 11, Tabla 10.



Ácido 5(*S*)-8(*R*)-9(*R*)-10(*S*)-nidoresédico (**38**)

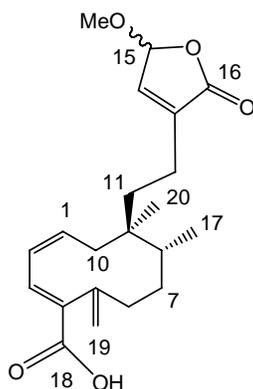
Las fracciones 33-84H (primera columna) (5.7481 g) eluidas con hexano-acetona (98:2, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3 y 1:1) fueron adsorbidas en celita y sometidas a CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona, obteniéndose un total de 49 fracciones de 150 ml c/u. De las fracciones 33-84H-(4-5) eluidas con hexano-acetona 95:5 se obtuvo nuevamente espinasterol (**36**) (0.0236 g) como cristales en forma de agujas planas.

Las fracciones 33-84H-(22-31) (0.7851g) obtenidas con hexano-acetona 8:2 se fraccionaron mediante CC (gel de sílice) empleando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona, obteniendo en total 30 fracciones de 30 ml c/u.

Las fracciones 33-84H-(22-31)-(17-23) (0.1139 g) colectadas con hexano-acetona 8:2 fueron purificadas por cromatografía de placa preparativa (Macherey-Nagel

SIL G 100/UV₂₅₄) y eluidas 4 veces en benceno-acetona 8.6:1.4, obteniendo 0.0100 g (0.0005 %) de un aceite amarillo identificado como el ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (**39**).⁵⁹

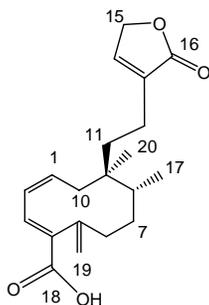
Ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39). Aceite amarillo, $[\alpha]_D^{25}$ -8.30 (CHCl₃, *c* 1.0); IR(CHCl₃) cm⁻¹: 3490, 2926, 1768, 1691, 1026; EM-IE, *m/z* (% intensidad relativa): 360 (3)[M]⁺, 149 (98); RMN-¹H: Espectro 13, Tabla 11; RMN-¹³C: Espectro 14, Tabla 11.



Ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (**39**)

De la misma placa preparativa de la fracción 33-84H-(22-31)-(17-23) anteriormente descrita, se aisló 0.0180 g (0.0010 %) de un aceite amarillo de mayor polaridad el cual se identificó como el ácido 15-desoxipúlico (**40**).^{63a-b}

Ácido 15-desoxipúlico (40). Aceite amarillo, $[\alpha]_D^{25}$ -7.25 (CHCl₃, *c* 1.0); IR(CHCl₃) cm⁻¹: 3460, 2926, 1738, 1051; EM-IE, *m/z* (% intensidad relativa): 330 (2)[M]⁺, 149 (36); RMN-¹H: Espectro 19, Tabla 12; RMN-¹³C: Espectro 20, Tabla 12.



Ácido 15-desoxipúlico (**40**)

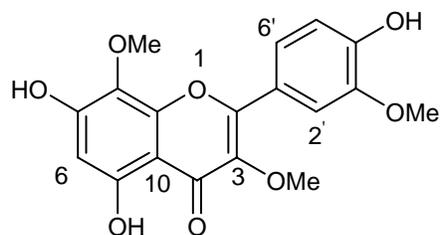
Fraccionamiento del extracto acetónico de hojas.

El extracto acetónico (30.1 g) se adsorbió sobre celita y se fraccionó mediante CC (gel de sílice) empleando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona, obteniéndose un total de 138 fracciones de 250 ml c/u. De las fracciones 15-24A se obtuvo un sólido blanco (0.0158 g) el cual fue identificado como espinasterol (**36**) mediante comparación con la muestra original.

Las fracciones 73-96A (3.3075 g) se sometieron a fraccionamiento por CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona, obteniendo un total de 58 fracciones de 125 ml c/u. Las fracciones 73-96A-(28-45) (1.309 g) eluidas con hexano-acetona 8:2 fueron sometidas a CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de hexano-acetona. En total se obtuvieron 42 fracciones de 50 ml c/u. Las fracciones 73-96A-(28-45)-(24-39) (0.3815 g) se fraccionaron en CC (gel de sílice) empleando CH₂Cl₂-acetona 98:2. En total se obtuvieron 35 fracciones de 10 ml c/u.

Las fracciones 73-96A-(28-45)-(24-39)-(12-20) (0.0836 g) eluidas con CH₂Cl₂-acetona 98:2 se sometieron a CC (gel de sílice) usando el sistema CH₂Cl₂-acetona 98:2. Obteniendo en total 30 fracciones de 6 ml c/u. En las fracciones 73-96A-(28-45)-(24-39)-(12-20)-(8-14) eluidas con CH₂Cl₂-acetona 98:2, se obtuvo 0.0306 g (0.0016 %) de un sólido amarillo identificado como 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (**41**).⁶⁸

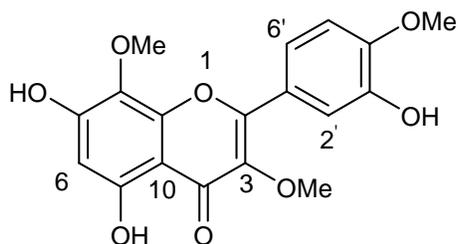
5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41). Sólido amarillo, p.f 220-222°C, IR (KBr) cm⁻¹: 3481, 2929, 1725, 1652, 1509, 1272, 1158, 1020; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 360 (69) [M]⁺, 345 (100); RMN-¹H: Espectro 21, Tabla 13; RMN-¹³C: Espectro 22, Tabla 13.



5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (**41**)

En las fracciones 73-96A-(28-45)-(24-39)-(12-20)-(21-24) eluidas con CH₂Cl₂-acetona 98:2, se obtuvo 0.0091 g (0.0005 %) otro sólido amarillo de mayor polaridad identificado como 5,7,3'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (**42**).⁶⁹

5,7,3'-Trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42). Sólido amarillo, p.f 220-223°C, IR (KBr) cm⁻¹: 3380, 2927, 1726, 1650, 1506, 1281, 1020; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 360 (69)[M]⁺, 345 (100); RMN-¹H: Espectro 25, Tabla 14; RMN-¹³C: Espectro 26, Tabla 14.



5,7,3'-Trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (**42**)

Fraccionamiento del extracto metanólico de hojas.

El extracto metanólico de hojas (170.9 g) se disolvió en MeOH y se adsorbió en celita. Este fue fraccionado por CC (gel de sílice) utilizando mezclas de polaridad creciente de AcOEt-MeOH. En total se obtuvieron 122 fracciones de 500 ml c/u.

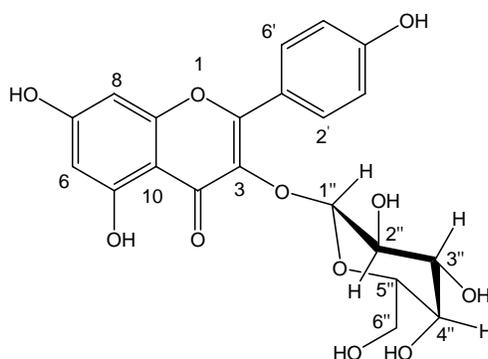
Las fracciones 33-106M (114.8 g) eluidas con AcOEt-MeOH 8:2, 7:3, 1:1 y 3:7, se reunieron y se fraccionaron por CC (gel de sílice) empleando mezclas de polaridad creciente de AcOEt-MeOH, obteniéndose un total de 145 fracciones de 500 ml c/u. Las fracciones 33-106M-(29-38) (2.60 g) eluidas con AcOEt-MeOH 95:5 fueron sometidas a purificación por columna de sephadex LH-20 (60 g) utilizando

MeOH-H₂O 3:1 como sistema de elusión. En total se obtuvieron 25 fracciones de 30 ml c/u.

Las fracciones 33-106M-(29-38)-(12-14) (0.1665 g) eluidas con MeOH-H₂O 3:1 se sometieron a CC (gel de sílice 230-400) utilizando mezclas de polaridad creciente AcOEt-MeOH. Se obtuvieron un total de 25 fracciones de 10 ml c/u.

De las fracciones 33-106M-(29-38)-(12-14)-(6-8) obtenidas con AcOEt-MeOH 95:5 se obtuvo 0.0217 g (0.0011 %) de un sólido amarillo, el cual fue recristalizado de acetona e identificado como astragalina (**19**).^{27, 66}

Astragalina (19). Sólido amarillo, p.f 135-137 °C, $[\alpha]_D^{25} +15.2^\circ$ (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm⁻¹: 3380, 2923, 1694, 1656, 1455, 1066 ; EM-FAB, m/z (% intensidad relativa): 154 (100);); RMN-¹H: Espectro 29, Tabla 15; RMN-¹³C: Espectro 30, Tabla 15.

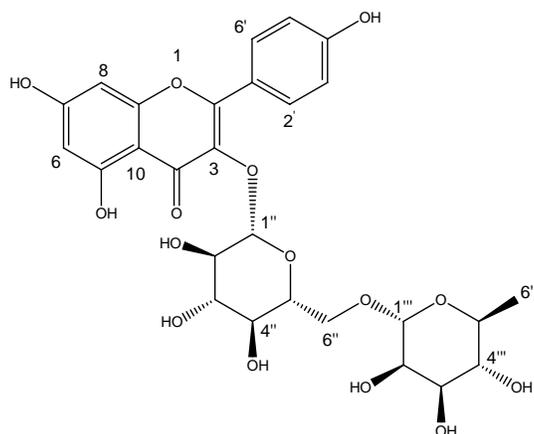


Astragalina (**19**)

Las fracciones 33-106M-(68-77) (2.3424 g) eluidas con AcOEt-MeOH 9:1 se fraccionaron en columna de sephadex LH-20 (60 g), utilizando una mezcla de MeOH-H₂O 3:1. En total se obtuvieron 29 fracciones de 30 ml c/u.

Las fracciones 33-106M-(68-77)-(13-15) (0.1545 g) eluidas con MeOH-H₂O 3:1 fueron sometidas a CC (gel de sílice 230-400) utilizando un sistema de polaridad creciente de AcOEt-MeOH, obteniéndose en total 38 fracciones de 150 ml c/u. Las fracciones 33-106M-(68-77)-(13-15)-(24-28) (0.0240 g) eluidas con AcOEt-MeOH 9:1 se sometieron a cromatografía en placa preparativa (Macherey-Nagel SIL G 50/uv₂₅₄) y eluidas 2 veces en AcOEt-MeOH-H₂O 8:1:1. Se obtuvo 0.0062 g (0.0003 %) de un sólido amarillo identificado como nicotiflorina (**20**).^{27,66,71}

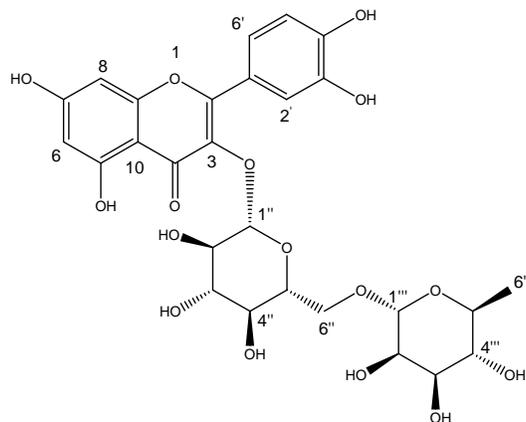
Nicotiflorina (20). Sólido amarillo, p.f 183-184 °C, $[\alpha]_D^{25}$ -14.9° (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm^{-1} : 3383, 2923, 1649, 1606, 1457, 1067; EM-FAB, m/z (% intensidad relativa): 595 (33) $[M^++1]$, 154 (78); RMN- ^1H : Espectro 31, Tabla 16; RMN- ^{13}C : Espectro 32, Tabla 16.



Nicotiflorina (20)

De la anterior placa preparativa descrita, también se aisló 0.0054 g (0.0003 %) de un sólido amarillo de mayor polaridad e identificado como rutina (16).⁷¹

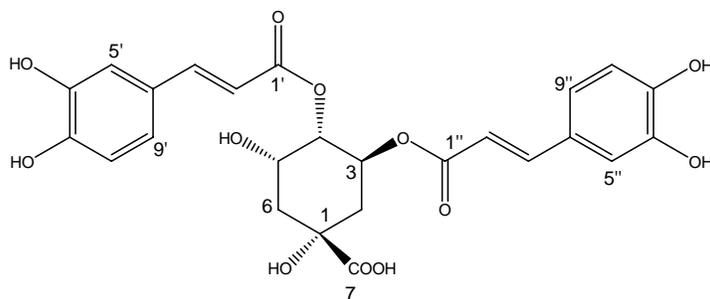
Rutina (16). Sólido amarillo, p.f 198-200 °C, $[\alpha]_D^{25}$ +10.2° (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm^{-1} : 3357, 2923, 1650, 1599, 1460, 1069; EM-FAB, m/z (% intensidad relativa): 611 (10) $[M^++1]$, 154 (66); RMN- ^1H : Espectro 33, Tabla 17; RMN- ^{13}C : Espectro 34, Tabla 17.



Rutina (16)

Las fracciones 33-106M-(68-77)-(22-26) (0.144 g) eluidas con MeOH-H₂O 3:1 fueron purificadas por cromatografía en placa preparativa (Macherey-Nagel SIL G 100/UV₂₅₄) eluida 4 veces con AcOEt-MeOH-H₂O 8:1:1, obteniéndose 0.0102 g (0.0005 %) de un sólido amarillo pálido identificado como el ácido 3,4-dicafeil-quínico (**30b**).^{28,72-74}

Ácido 3,4-dicafeil-quínico (30b). Sólido amarillo, p.f 204-206 °C [α]_D²⁵ -295° (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm⁻¹: 3373, 2922, 1695, 1603, 1282, 1163; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 154 (100), 136 (62); RMN-¹H: Espectro 35, Tabla 18; RMN-¹³C: Espectro 36, Tabla 18.

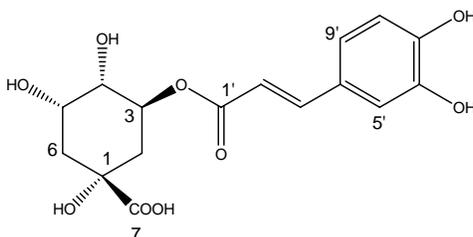


Ácido 3,4-dicafeil-quínico (**30b**)

Las fracciones 33-106M-(130-145) (32.2 g) eluidas con MeOH fueron fraccionadas utilizando una columna de resina diaiónica HP-20 (Mitsubishi, Chemical Co. Tokio, Japón) y usando mezclas de polaridad creciente de H₂O-MeOH. En total se obtuvieron 143 fracciones de 30 ml c/u.

Las fracciones 33-106M-(130-145)-(15-28) (3.3528 g) eluidas con H₂O se sometieron a CC (gel de sílice) utilizando un sistema de polaridad creciente de AcOEt-MeOH-H₂O. Se colectaron un total de 46 fracciones de 60 ml c/u. De las fracciones 33-106M-(130-145)-(15-28)-(10-30) eluidas de AcOEt-MeOH-H₂O 8:1:1, se obtuvo 0.0266 g (0.0014 %) de un sólido amarillo pálido luego de recristalización en MeOH, e identificado como el ácido clorogénico (**30a**).^{28-29, 72-74}

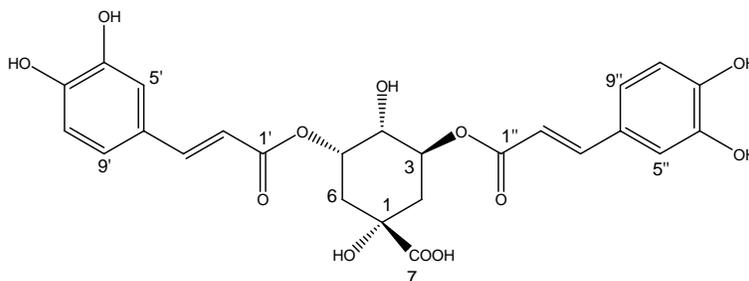
Ácido clorogénico (30a). Sólido amarillo, p.f 201-203 °C $[\alpha]_D^{25} -30.1^\circ$ (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm^{-1} : 3171, 2922, 1696, 1629, 1587; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 154 (100), 136 (61); RMN- ^1H : Espectro 39, Tabla 19; RMN- ^{13}C : Espectro 40, Tabla 19.



Ácido clorogénico (**30a**)

Las fracciones 33-106M-(130-145)-(71-113) (4.16 g) eluidas con H_2O -MeOH 9:1 fueron fraccionadas por CC (gel de sílice 230-400) utilizando mezclas de polaridad creciente de AcOEt-MeOH- H_2O , obteniendo un total de 82 fracciones de 50 ml c/u. Las fracciones 33-106M-(130-145)-(71-113)-(14-48) (1.6262 g) eluidas con AcOEt-MeOH- H_2O 8:1:1 fueron sometidas a CC (gel de sílice) empleando un sistema de polaridad creciente de AcOEt-MeOH- H_2O . En total se obtuvieron 68 fracciones de 30 ml c/u. De las fracciones de 33-106M-(130-145)-(71-113)-(14-48)-(5-6) eluidas con AcOEt-MeOH- H_2O 8:1:1 se obtuvo por recristalización en MeOH 0.0900 g (0.0050 %) de un sólido amarillo claro identificado como el ácido 3,5-dicafeil-quinico (**30c**).^{28, 72}

Ácido 3,5-dicafeil-quinico (30c). Sólido amarillo, p.f 201-203 °C $[\alpha]_D^{25} -180.2^\circ$ (MeOH, c 1.0); IR(Nujol) cm^{-1} : 3356, 2924, 1688, 1603, 1518, 1405, 1279, 1181 ; EM-IE, m/z (% intensidad relativa): 154 (100), 136 (62); RMN- ^1H : Espectro 42, Tabla 20; RMN- ^{13}C : Espectro 43, Tabla 20.



Ácido 3,5-dicafeil-quinico (**30c**).

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Con el fin de explorar posibles actividades biológicas de los metabolitos aislados de *Laennecia schiedeana*, estos se sometieron a pruebas de citotoxicidad en diferentes líneas celulares de cáncer humano (método colorimétrico de la sulforrodamina B), pruebas de actividad antiinflamatoria usando el modelo de edema inducido con TPA, bioensayos con hongos fitopatógenos, bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.

Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano

Determinación de % de inhibición de crecimiento por línea celular

Procedimiento

La citotoxicidad en líneas tumorales se determinó de acuerdo a los protocolos establecidos por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de Estados Unidos.⁴⁰

Las células se cultivaron en el medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SBF inactivado, 100 UI/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de streptomina, 0.25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO) y 2 mM de L-glutamina (GIBCO). Se conservaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

En una placa de 96 pozos se depositaron 100 µL de cada línea celular. Las densidades fueron las siguientes: 5x10⁴ células/pozo de K-562 y MCF-7, 7.5x10⁴ células de U-251, PC-3 y SKLU-1, y 10x10⁴ células/pozo de HCT-15.

Luego la placa se incubó durante 24 h, a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Posteriormente, se agregaron 100 µL de las sustancias de pruebas o fármacos de referencia. La placa se incubó por 48 h en las mismas condiciones. Los grupos testigos contenían solo un volumen igual de cada línea celular.

Posteriormente, las células se fijaron con una disolución acuosa de ácido tricloroacético al 50 % p/v (50 µL/pozo). La placa se incubó a 4°C durante 60 min. Los sobrenadantes se desecharon, la placa se lavó tres veces con agua destilada desionizada y se dejó secar. Las células se trataron con sulforrodamina B (SBR,

sigma) al 0.4 % durante 30 min, a temperatura ambiente. Luego, la placa fue lavada en tres ocasiones con una disolución de ácido acético al 1 %. El colorante se extrajo con una disolución 10 mM de base Tris (sigma) no amortiguada. Las absorbancias se determinaron en un lector de placas a una λ de 515 nm.

La intensidad del color es directamente proporcional al número de células vivas, de esta forma, a menor coloración mayor porcentaje de inhibición de crecimiento celular.

La citotoxicidad se calculó con base en la ecuación (1), donde A corresponde al valor de densidad óptica (DO) de las células sin tratar y B al valor de densidad óptica (DO) de las células tratadas con la sustancia de prueba o referencia.

$$\% \text{ IC} = 100 - [B/A \times 100] \quad (1)$$

Se construyó para algunos casos una curva concentración-respuesta, donde los valores de dosis y % IC eran las respectivas variables (X) y (Y). La dosis CE_{50} se determinó a partir de los datos relevantes que mostraron un efecto de la concentración y un valor de IC superior del 50 % en la última concentración de ensayo. Los valores obtenidos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ se muestran en la sección de resultados (Tabla 2).⁴⁰

Pruebas de actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido con TPA

Los animales empleados en los ensayos se adquirieron en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se manipularon de acuerdo a las condiciones establecidas por el comité de usos y cuidados de animales de experimentación, en el proyecto contenido en la ley General de Salud (PROY-NOM 087-ECOL-SSA1-2000). En esta se establece su colocación dentro de cajas de polipropileno traslúcidas, con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h, y en condiciones ambientales controladas (20-22 °C de temperatura y humedad entre 50-60 %). Los animales recibieron agua y dieta estándar de laboratorio *ab libitum*.

Procedimiento

Se utilizaron ratones machos de la cepa NIH con un peso comprendido entre 25-30 g. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos (n= 3): Control (recibieron TPA más el vehículo), Prueba (recibieron TPA más las sustancias problema) y Referencia (Recibieron TPA más indometacina)

Los ratones se anestesiaron con 0.25 mL de pentobarbital (sedalforte®, 0.063 g/mL) por vía intraperitoneal (*ip*). Luego una solución etanólica de 2.5 µg/10 µL de TPA (sigma) se administró en el pabellón de la oreja derecha vía tópica en todos los animales (5 µL en cada lado). Las sustancias de prueba y los fármacos de referencia se aplicaron luego de 10 min (20 µl por oreja). La oreja izquierda sirvió como control negativo; inicialmente se administraron 10 µL de etanol y luego 20 µL de acetona:diclorometano 1:1. Al cabo de 4 horas los animales se sacrificaron por dislocación cervical y de ambas orejas se obtuvieron las biopsias utilizando un sacabocados circular de 9 mm de diámetro.

El edema inducido por TPA se determinó de la diferencias de pesos (mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto del tejido no tratado (oreja izquierda).

Los porcentajes de inhibición del edema se calcularon de acuerdo a la ecuación (2). Donde A corresponde al valor promedio del edema en el grupo control y B al valor promedio del edema en el grupo de prueba o referencia.

$$\% \text{ IE} = 100 - [B/A - 100] \quad (2)$$

Los datos obtenidos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* student y los valores de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$ se consideraron como diferencia significativa con respecto al control (indometacina).⁴⁰ Estos valores se muestran en la sección de resultados (Tabla 4).

Bioensayos con bacterias

Método de difusión de agar o de Kirby-Baüer

A continuación se describe el método cualitativo para determinar la actividad antibacteriana de los metabolitos aislados en el presente estudio.

Procedimiento

Se utilizó un medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1) debido a que facilita la evolución de la mayoría de los aislamientos bacterianos significativos.

El proceso de inoculación se lleva a cabo tocando con un asa de siembra estéril las superficies convexas de los microorganismos a ensayar (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*). Luego esta se sumerge en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien y luego se retira el asa de siembra. Posteriormente se incuba el tubo de cultivo a 37 °C durante 24 horas, hasta que la turbidez del medio iguale la estándar (N° 5 de MacFarland) siendo esto equivalente a 1.5×10^8 bacterias/mL. Este procedimiento se realiza por cada microorganismo a evaluar.

El estándar de MacFarland se prepara adicionando 0.5 ml cloruro de bario en 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N.⁴¹

Una vez que el medio de cultivo haya alcanzado la concentración requerida de bacterias por mililitro, se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana. Se retira el hisopo eliminando el exceso de líquido y luego con este se inocula la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton (Bioxon 110-1) mediante forma de estría, al menos en tres direcciones rotando la placa 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, se lleva a cabo la aplicación de la muestra, la cual se realiza a través de sensidiscos de 5 mm de diámetro y hechos de papel Whatman N°5. Estos fueron impregnados con soluciones de las muestras a valorar hasta llegar a la concentración deseada por disco (2 mg).

Luego los discos secos son colocados manualmente en la superficie del agar utilizando unas pinzas estériles, guardando una distancia de 22 mm entre sensidiscos y a 14 mm de los bordes de la placa.

Como control negativo se utilizaron discos a los que se les agregó el vehículo y se dejaron evaporar durante 12 h. Como control positivo se utilizaron discos de Kanamicina de 30 µg (Bigaux E-30). Las placas se incubaron a 35 °C usando siempre control negativo.⁴¹

Interpretación de resultados

Las zonas de inhibición se midieron con una regla calibrada en milímetros. En todos los casos esta prueba se hizo por triplicado y se reportaron los valores promedio los cuales se muestran en la sección de resultados (Tabla 5).

Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

La solución con el agente antimicrobiano de trabajo se preparó diluyendo la droga en el caldo de Müller-Hinton (Bioxon 260) a la mayor concentración final deseada. La prueba se realizó en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa rosca o con tapones de algodón. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble, directamente en los tubos, de la siguiente forma: Se colocan 2 mL de solución de trabajo de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes es añadido 1 mL de caldo de Müller-Hinton (Bioxon 260). Con una pipeta esterilizada se transfiere 1 mL del primer tubo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 mL con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 mL, el

cual se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento.⁴¹

Inoculación e incubación de los tubos.

Se prepara el inóculo que contenga de 10^6 a 10^7 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se emplea el estándar 0.5 de McFarland). Posteriormente se diluyó 1:200 y se añadió a cada tubo 1 mL de este inóculo ajustado. Se incuban los tubos a 35 °C durante 16-20 horas. No se usó atmosfera de CO₂ debido a que se trabajaron bacterias aeróbicas.⁴¹

Interpretación de resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce inhibición completa del desarrollo visible, representó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez ligera o un pequeño botón de desarrollo de turbidez definida se consideró como si la droga hubiera sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración (Tabla 6).

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Para determinar la capacidad de un antimicrobiano para matar a una población de microorganismos se empleó el mismo sistema de la prueba de determinación de CMI. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, esta se inocula en una placa de agar de Müller-Hinton (Bioxon 110-1) para determinar el número de UFC/mL del inóculo. Luego de determinar la CIM, se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 mL) tomado de cada uno de los tubos de caldos que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müller-Hinton. El número de colonias que se

desarrolla en estos subcultivos se compara con el número de UFC/mL del cultivo original, luego de incubar por 24 horas. La mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1 % del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM)⁴¹ (Tabla 6).

RESULTADOS

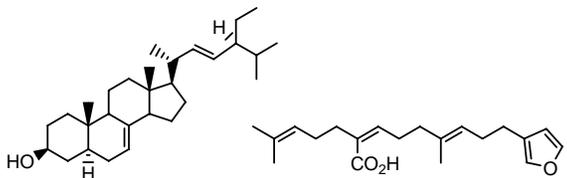
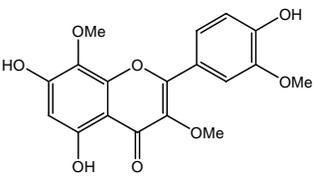
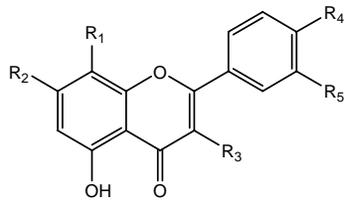
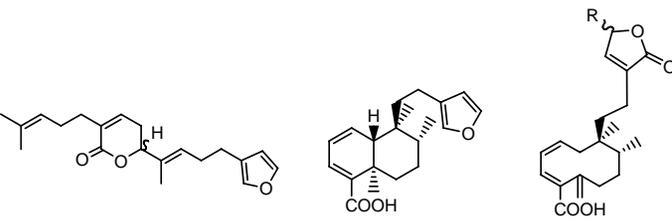
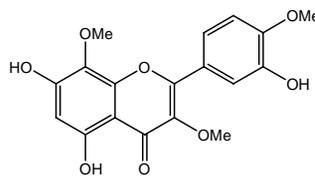
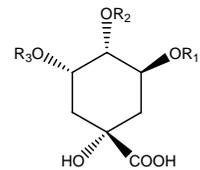
Como resultado del estudio fitoquímico de la parte aérea de *Laennecia schiedeana* se lograron aislar 14 compuestos previamente reportados en la literatura.

En el extracto hexánico de hoja se encontraron el triterpeno espinasterol (**36**)⁴³⁻⁴⁷, los diterpenos ácido centipédico (**1a**)^{15-16,37,57}, conizaleucólida A (**37**)¹⁸, ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (**38**)²⁰, ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (**39**)⁵⁹ y el ácido 15-desoxipúlico (**40**)^{63a-b}.

Del extracto acetónico se aislaron los compuestos 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (**41**)⁶⁸ y 5,7,3'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (**42**)⁶⁹, siendo esta última aislada por primera vez como metabolito vegetal, ya que hasta la fecha solo había sido reportada como producto de síntesis.

Del extracto metanólico se lograron purificar las flavonas astragalina (**19**)^{27,66}, nicotiflorina (**20**)^{27,66,71} y rutina (**16**)⁷¹. También se aislaron derivados de ácido quínico entre los que se encuentran el ácido clorogénico (**30a**)^{28-29,72-74}, el ácido 3,4-dicafeil-quínico (**30b**)^{28,72-74} y el ácido 3,5-dicafeil-quínico (**30c**)^{28,72}, siendo estos reportados por primera vez para el género *Laennecia*.

La elucidación estructural de los compuestos aislados se basó en el análisis de sus características espectroscópicas: IR, EM y RMN-¹H, ¹³C; esta última incluyó técnicas mono y bidimensionales, además por comparación de sus datos espectroscópicos y físicos con los reportados en la literatura.

Extracto Hexánico	Extracto Acetónico	Extracto Metanólico
 <p>36 (0.0011 %) 1a (0.0013 %)</p>	 <p>41 (0.0016 %)</p>	 <p>19 R₁=R₅= H, R₂=R₄= OH, R₃ = Glu (0.0011 %) 20 R₁=R₅= H, R₂=R₄= OH, R₃ = Glu-Ram (0.0003 %) 16 R₁= H, R₂= R₄= R₅= OH, R₃ = Glu-Ram(0.0003 %)</p>
 <p>37 (0.0034 %) 38 (0.0012 %) 39 R = OMe (0.0005 %) 40 R=H(0.0010%)</p>	 <p>42 (0.0005 %)</p>	 <p>30a R₁=Cafeil R₂= R₃=H (0.0014 %) 30b R₁=R₂= Cafeil R₃=H (0.0005 %) 30c R₁=R₃= Cafeil R₂=H (0.0050 %)</p>

Nota: % de Rto. se calculó con relación a el peso de la planta seca (1.872 g)

Figura 1. Metabolitos obtenidos de *Laennecia schiedeana*

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

A continuación se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de actividad biológica de los metabolitos aislados de *Laennecia schiedeana*, al igual que sus extractos.

Tabla 2. Rastreo primario de actividad citotóxica en líneas cancerosas humanas.

Compuesto (50 µg/mL)	U-251 (SNC)	PC-3 (Próstata)	K562 (Leucemia)	HCT-15 (Colon)	MCF-7 (Mama)	SKLU-1 (Pulmón)
Ext. Hexánico	9.63	6.32	s.a	s.a	s.a	22.06
Ext. Acetónico	4.8	0.4	s.a	s.a	s.a	18.6
Ext. Metanólico	s.a	s.a	s.a	4.65	23.01	42.26
Espinasterol (36)	s.a	2.0	s.a	s.a	s.a	3.2
Ácido centipédico (1a)	35.13	29.02	36.45	29.76	43.78	53.02
Conizaleucólida A (37)	22.6	13.77	84.77	s.a	27.87	43.86
Ácido nidoresédico (38)	44.93	28.75	s.a	31.78	15.78	73.4
Á. 15-metoxi-16-oxo-15,16 <i>H</i> -estríctico (39)	84.08	53.22	68.41	86.38	22.54	100
A. 15-desoxipúlico (40)	36.16	29.86	s.a	s.a	s.a	61.27
5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)	85.93	89.85	65.32	93.03	81.93	75.54
5,7,3'-Trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)	82.15	70.99	74.91	90.23	79.97	100
Astragalina (19)	4.6	5.0	12.21	6.0	s.a	s.a
Nicotiflorina (20)	10.8	24.4	54.67	s.a	s.a	s.a
Rutina (16)	13.3	30.5	61.07	s.a	s.a	s.a
Á. clorogénico (30a)	2.8	11.2	34.5	49.7	66.88	61.36
A. 3,5-dicafeil-quinico (30c)	4.9	6.8	27.8	s.a	29.3	13.7

Nota: Todos los valores están dados en (%) de inhibición de crecimiento celular a una concentración de 50 µg/mL. s.a :Sin actividad. Los valores resaltados corresponden a los cuales se les realizó la determinación de IC₅₀

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias medias* IC₅₀ (µg/mL ± E.S) de los compuestos mas activos

Compuesto	U-251 (SNC)	K562 (Leucemia)	HCT-15 (Colon)	SKLU-1 (Pulmón)
Conizaleucólida A (37)	N.E	21.53 ± 4.1	N.E	N.E
Á. 15-metoxi-estríctico (39)	15.05 ± 2.2	22.72 ± 2.0	54.68 ± 0.39	35.82 ± 0.80
5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'- trimetoxi-flavona (41)	N.E	N.E	N.E	26.95 ± 2.1
5,7,3'-Trihidroxi-3,8,4'- trimetoxi-flavona (42)	N.E	N.E	N.E	16.40 ± 1.3
Cisplatino	9.09 ± 0.88	15.20 ± 1.4	13.83 ± 0.79	7.13 ± 0.25

* Valores expresados en µg/mL ± el error estándar. N.E: No Evaluado

Tabla 4. Rastreo primario de actividad antiinflamatoria utilizando el modelo de edema Inducido por TPA

Compuesto	Dosis	Edema (mg)	Inhibición (%)
Testigo	-	13.53 ± 0.93	-
Ext. Hexánico	0.31 mg/oreja	5.17 ± 0.86	61.82
Ext. Acetónico	0.31 mg/oreja	5.37 ± 1.73	60.34
Espinasterol (36)	1 µmol/oreja	8.27 ± 0.03	38.31
Ácido centipédico (1a)	1 µmol/oreja	5.83 ± 1.48	56.47
Conizaleucólida A (37)	1 µmol/oreja	7.33 ± 1.01	45.27
Ácido nidoresédico (38)	1 µmol/oreja	4.43 ± 0.34	67.24
Á. 15-metoxi-16-oxo-15,16H- estríctico (39)	1 µmol/oreja	7.93 ± 0.34	41.37
A. 15-desoxipúlico (40)	1 µmol/oreja	10.20 ± 1.06	24.63

Nota: Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar de la Media. Vía de administración: Tópica, Vehículo: Acetona:diclorometano (1:1), Control Positivo Indometacina

Tabla 5. Actividad antibacteriana cualitativa utilizando el método de difusión de Agar o de Kirby-Baüer.

Compuesto	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (mm)
A. 3,4-dicafeil-quínico (30b)	8.3 ± 0.5	N.E
Á. clorogénico (30a)	9.6 ± 0.5	12.0 ± 0.5
A. 3,5-dicafeil-quínico (30c)	11.5 ± 0.5	N.E

Nota: Los datos representan el promedio de tres medidas ± el error estándar. N.E: No Evaluado, Control positivo: Kanamicina.

Tabla 6. Actividad antibacteriana cuantitativa del ácido clorogénico (**30a**)

Bacteria	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	650
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	650	800

Nota: CIM: Concentración inhibitoria mínima, CBM: Concentración bactericida mínima.

Bioensayo con hongos

Los extractos hexánico, acetónico y metanólico, al igual que los compuestos (**30a-c**) fueron evaluados frente a diferentes hongos fitopatógenos (*Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichopyton mentagrophytes*) y al bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae*, resultando ser inactivos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Identificación de los compuestos aislados en *L. schiedeana*.

Espinasterol (36)

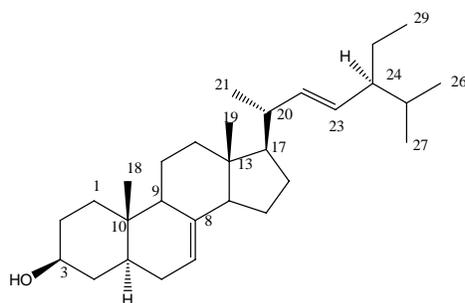
De la fracción 21-34H del extracto hexánico se aisló un producto cristalino en forma de agujas planas, solubles en cloroformo y de punto de fusión 170-172° C.

En el espectro en el IR se observa una banda de absorción ancha a 3387 cm⁻¹ indicando la presencia de un grupo hidroxilo, a 2935 y 2870 cm⁻¹ las bandas correspondientes a metinos alifáticos, y a 1450 cm⁻¹ la presencia de una banda característica de dobles enlaces.

En el espectro de RMN-¹³C (Espectro 2, Tabla 7) se observan la presencia de 29 carbonos, de los cuales se pudo identificar con base en el experimento DEPT la presencia de 6 metilos a campo alto, 9 metilenos, 7 metinos alifáticos, 1 metino base de oxígeno, 2 carbonos cuaternarios a campo alto, 1 carbono cuaternario y tres metinos a campo bajo, asociados a dobles ligaduras. Basados en lo anterior y dado que en el espectro de masas se observa el ion molecular de *m/z* 412, se obtiene una fórmula molecular de C₂₉H₄₈O y con grado de insaturación de 6, confirmando que la molécula está conformada por un sistema tetracíclico característico de un núcleo esteroideal con dos dobles enlaces adicionales.

Su espectro de RMN-¹H (Espectro 1, Tabla 7) muestra a δ 0.55 y 0.80 dos señales simples correspondientes a los metilos terciarios Me-18 y Me-19. A δ 0.80 y 0.85 dos señales dobles con constante de acoplamiento de 6.3 Hz asignadas a los metilos Me-27 y Me-26 del grupo isopropilo (estas señales pueden estar intercambiadas). A δ 0.81 se tiene una señal triple correspondiente al metilo Me-29 de un grupo etilo y a δ 1.03 una señal doble correspondiente al metilo Me-21.

En δ 3.59 se tiene un multiplete que integra para un protón y corresponde H-3, el cual es base de oxígeno. A δ 5.03 (dd, *J*= 8.5, 15.5 Hz) se observa la señal de H-22 y la cual se acopla con la señal en δ 5.16 (dd, *J*=8.4, 15.0 Hz) asignada al protón H-23, lo que permite concluir que estos hidrogenos se encuentran en la doble ligadura con una configuración (*E*). A δ 5.15 se observa un multiplete que integra para un protón y que corresponde a H-7.

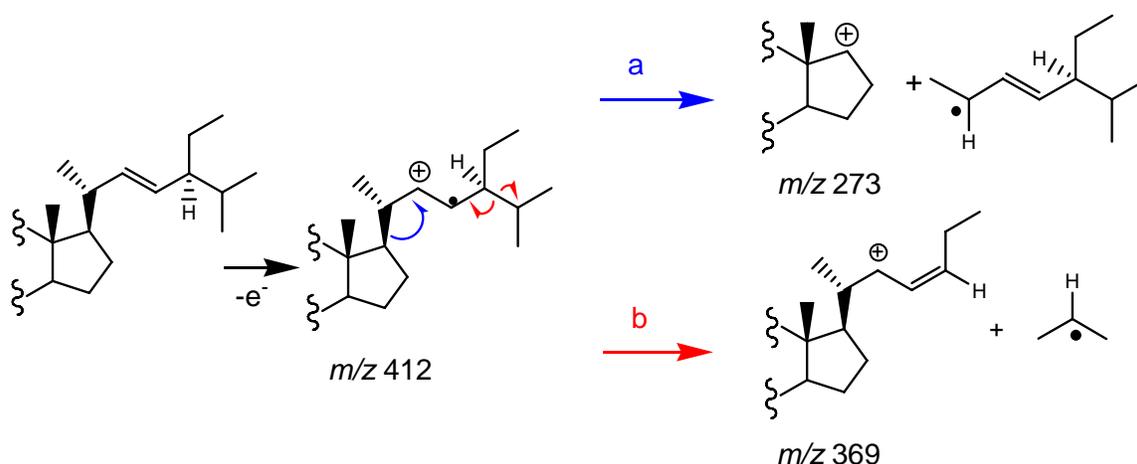


Espinasterol (36)

Tabla 7. Datos de RMN-¹H y ¹³C del espinasterol (36)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ
1	1.10-2.10 (2H, m)	37.2
2	1.10-2.10 (2H, m)	31.5
3	3.59 (1H, m)	71.1
4	1.10-2.10 (2H, m)	38.1
5	1.10-2.10 (1H, m)	40.3
6	1.10-2.10 (2H, m)	29.7
7	5.15 (1H, m)	117.5
8	-	139.6
9	1.10-2.10 (1H, m)	49.5
10	-	34.3
11	1.10-2.10 (2H, m)	21.6
12	1.10-2.10 (2H, m)	39.5
13	-	43.3
14	1.10-2.10 (1H, m)	55.2
15	1.10-2.10 (2H, m)	23.0
16	1.10-2.10 (2H, m)	28.5
17	1.10-2.10 (1H, m)	55.9
18	0.55 (3H, s)	12.2
19	0.80 (3H, s)	13.0
20	1.10-2.10 (1H, m)	40.8
21	1.03 (3H, d, J= 6.6 Hz)	21.1
22	5.03 (1H, dd, J= 8.5, 15.5 Hz)	138.1
23	5.16 (1H, dd, J= 8.4, 15.0 Hz)	129.5
24	1.10-2.10 (1H, m)	51.3
25	1.10-2.10 (1H, m)	31.9
26	0.85 (3H, d, J=6.3 Hz)	21.4
27	0.80 (3H, d, J= 6.3 Hz)	19.0 (C-27)
28	1.10-2.10 (2H, m)	25.4 (C-28)
29	0.81 (3H, t, J=7.3 Hz)	12.1 (C-29)

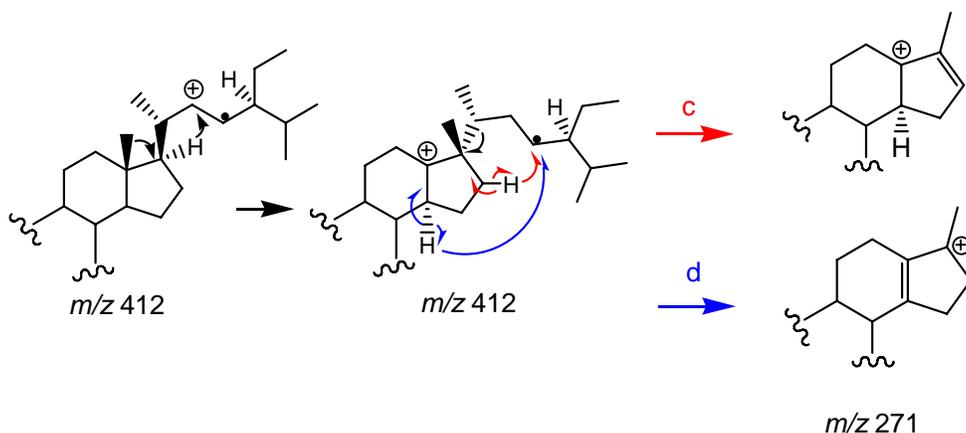
En el espectro de masas por impacto electrónico se observa el ion molecular de m/z 412 (24), además de dos fragmentos importantes originados mediante una ruptura alílica simple sin migración de hidrógeno; en el primer caso, la ruptura heterolítica del enlace C17-C20 generan un fragmento de m/z 273 (28) y en el segundo caso la ruptura del enlace C24-C25 da un fragmento de m/z 369 (15)⁴² (Esquema 2).



Esquema 2. Principales fragmentaciones observadas en el espinasterol (36)

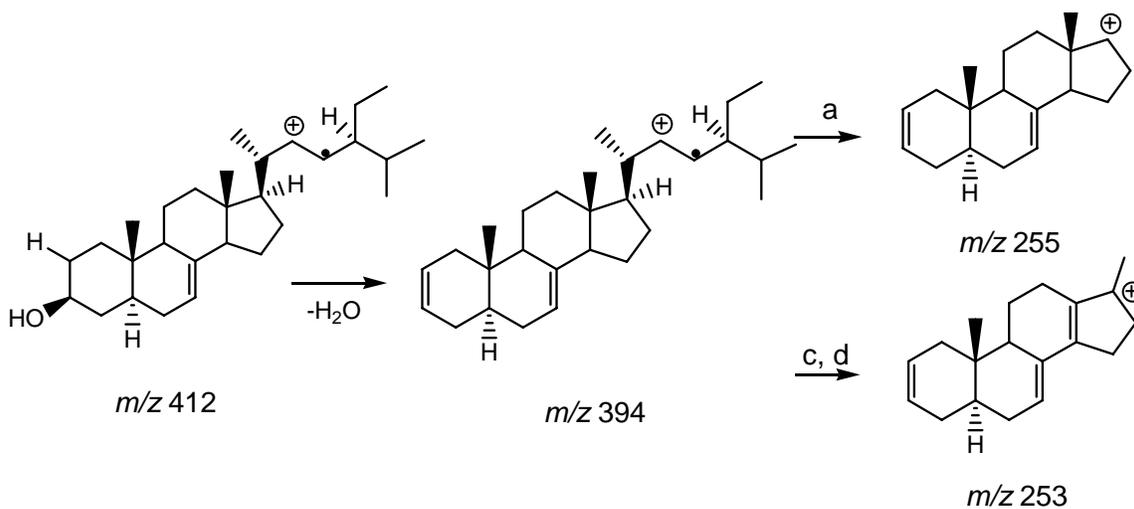
También se observó una fragmentación en el enlace C17-C20 con migración de hidrógeno al doble enlace C22-C23 de la cadena alifática a través de dos rutas (c, d, Esquema 3), con transposición del metilo Me-19 a C-17.

En este proceso se observa la formación de dos fragmentos de m/z 271 (100), los cuales contribuyen en el porcentaje de intensidad relativa observado (pico base),⁴² confirmando la unión de un fragmento de m/z 139 ($C_{10}H_{18}$) a través del carbono C-17 (Esquema 3).



Esquema 3. Principales fragmentaciones observadas en el espinasterol (**36**)

Otros fragmentos importantes, son los iones generados sobre el producto de eliminación de una molécula de H_2O a partir del grupo 3-hidroxi, en donde a través de una fragmentación sin migración de hidrógeno (Ruta a, Esquema 2) y otra con migración de hidrógeno sobre la doble ligadura mencionados anteriormente (ruta c y d, Esquema 3), son producidos los fragmentos de m/z 255 (41) y 253 (20) respectivamente, notando que el proceso inicial (Ruta a) es el principal, debido a su intensidad relativa (Esquema 4).



Esquema 4. Principales fragmentaciones observadas en el espinasterol (**36**)

Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó que el compuesto aislado es el espinasterol (**36**), el cual ha sido previamente reportado en la literatura.⁴³⁻⁴⁷ Basados en el punto de fusión reportado⁴⁵ que es de 172-173 °C y la perfecta correlación del espectro de RMN-¹³C⁴³ y RMN-¹H⁴⁷ publicados en la literatura, se pudo diferenciar el 24(S)-espinasterol de su epímero 24 (R)-chondriasterol (p.f: 168-169).^{48,49}

El espinasterol ha sido reportado también en el género *Conyza*, siendo aislado de *C. filaginoides*,⁵⁰⁻⁵¹ de *C. blinii*⁵² y *C. canadiensis*.⁵³

Recientemente del espinasterol se han reportado propiedades antitumorales^{47,54} e hipoglucemiantes,⁵⁵ entre otras. Sin embargo no se evidenció actividad citotóxica preliminar en las líneas celulares evaluadas en el presente trabajo (Ver Tabla 2).

Acido centipédico (1a)

Este compuesto fue aislado como un aceite amarillo soluble en diclorometano, de las fracciones eluidas con hexano-AcOEt 95:5.

En el espectro en el IR se observa una banda ancha a 3500 cm⁻¹ atribuible a un grupo hidroxilo, a 1728 cm⁻¹ una banda correspondiente al grupo C=O de ácido carboxílico y a 873 cm⁻¹ una banda característica de un grupo furano.⁵⁶ Además de las bandas características de metinos alifáticos y dobles ligaduras a 2925 y 1688 cm⁻¹.

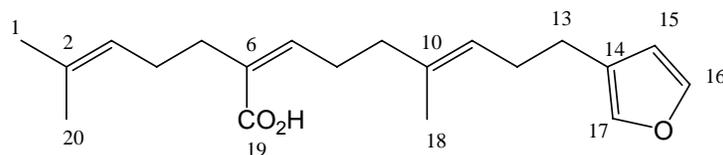
En el espectro de RMN-¹³C (Espectro 4, Tabla 8) se observa la presencia de 20 carbonos, los cuales de acuerdo con el experimento DEPT-135 corresponden a 3 metilos, 6 metilenos, 6 metinos y 4 carbonos cuaternarios asociados a dobles ligaduras. La presencia a δ 172.5 de un carbonilo de ácido carboxílico completa los 20 átomos de carbono.

Basados en lo anterior, y considerando el peso molecular (316 g/mol) obtenido por espectrometría de masas, se determinó la fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_3$ con grado de insaturación de 7, lo que concuerda con la presencia de 3 dobles enlaces, un carbonilo y un furano monosustituido en la molécula.

Un factor concluyente para determinar la presencia de un furano monosustituido en la molécula, fue el espectro de RMN- 1H (Espectro 3, Tabla 8). En este se observó a δ 6.27, 7.20 y 7.33 la presencia de 3 señales simples que integran para un protón cada uno y que son típicas de un anillo de furano 3-monosustituido, y corresponden a los protones H-15, H-17 y H-16, respectivamente. A δ 1.59 se observa una señal simple que es atribuible a los metilos Me-1 y Me-18, y a δ 1.68 otra señal simple asignada al metilo Me-20.

También se observan entre δ 2.12-2.64 una serie de señales múltiples que integran para 12 protones y que corresponden a los metilenos H-4, H-5, H-8, H-9 y H-12, H-13, previamente identificados en el experimento DEPT.

Finalmente a δ 5.09, 5.19 y 5.99 se observan 3 señales triples ($J= 6.9-7.2$ Hz) que corresponden a los metinos H-3, H-11 y H-7 respectivamente, y debido a su multiplicidad se infiere que cada uno de ellos está unido a un metileno. Lo anterior se confirmó por las interacciones en el experimento COSY (Espectro 5).

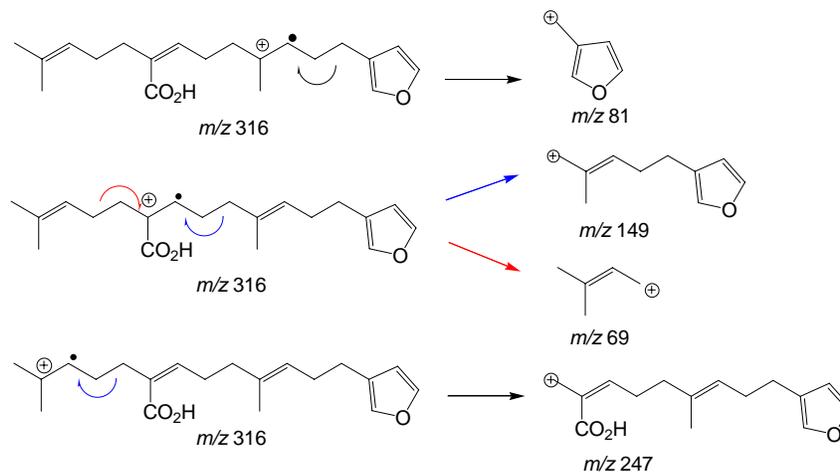


Acido centipédico (1a)

Tabla 8. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido centipédico (**1a**)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ
1	1.59 (3H, s)	17.7
2	-	130.6
3	5.09 (1H, ta, J= 6.9 Hz)	123.5
4	2.12 (2H, m)	27.9
5	2.25 (2H, m)	34.6
6	-	132.3
7	5.99 (1H, t, J= 7.2 Hz)	145.4
8	2.60 (2H, dt, J= 7.2, 7.5 Hz)	28.2
9	2.12 (2H, m)	39.1
10	-	134.9
11	5.19 (1H, td, J=1.2, 6.9 Hz)	124.5
12	2.25 (2H, m)	25.0
13	2.45 (2H, ta, J= 7.8 Hz)	28.5
14	-	124.9
15	6.27 (1H, s)	111.0
16	7.33 (1H, s)	42.6
17	7.20 (1H, s)	138.8
18	1.59 (3H, s)	15.9
19	-	172.5
20	1.68 (3H, s)	25.6

En el espectro de masas por impacto electrónico se observó el ion molecular de *m/z* 316, también fragmentos de *m/z* 69 (100), 81 (80), 149 (42) y 247 (35), típicos de una ruptura alílica simple (Esquema 5).



Esquema 5. Principales fragmentaciones observadas en el ácido centipédico (**1a**)

Basados en la información anterior y los datos espectroscópicos reportados en la literatura, se determinó que el compuesto es el ácido centipédico (**1a**) reportado por primera vez en *Centipeda orbicularis*⁵⁷, una especie de la tribu Astereae.

El ácido centipédico se ha reportado en el género *Conyza* en las especies *C. welwischii*,¹⁵ *C. coulteri*¹⁶ y la única *Laennecia* estudiada hasta ahora (*Laennecia sphiifolia*).⁵

Conizaleucólida A (37)

Este compuesto fue aislado como un aceite marrón de las fracciones eluidas con hexano-diclorometano 9:1.

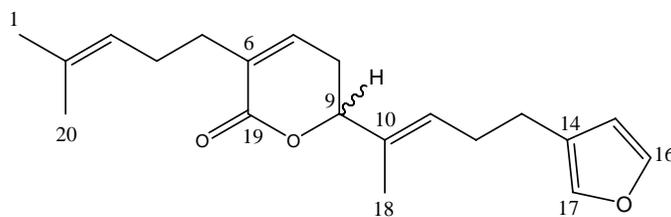
El espectro en el IR se observan a 2922 y 2854 cm^{-1} las bandas típicas de absorción de metinos alifáticos, a 1718 cm^{-1} una banda de absorción fuerte típica de lactona y a 848 cm^{-1} la banda de absorción media de un anillo de furano.⁵⁶

Su espectro de RMN-¹H (Espectro 6, Tabla 9) mostró al igual que el del ácido centipédico (**1a**) (Espectro 3), tres señales simples a δ 6.27, 7.21 y 7.34 características de un anillo furano 3-monosustituido. En δ 4.69 se observa una señal doble de dobles ($J= 3.6, 12.6$ Hz) correspondiente al protón H-9 base de oxígeno de la lactona, señal que interacciona en el espectro HMBC (Espectro 9) con los carbonos 11, 7, 8 y 18.

En δ 5.09 y 5.56 (Espectro 6, Tabla 9) se observan dos señales triples anchas ($J= 6.9$ Hz) que corresponden a los protones H-3 y H-11, respectivamente, y basados en el experimento COSY (Espectro 8) se pudo observar la correlación de H-3 con los metilos Me-1 (δ 1.60), Me-20 (δ 1.68) y de H-11 con el metilo Me-18 (δ 1.60).

A δ 6.55 (Espectro 6, Tabla 9) se encuentra una señal doble ($J= 6.6$ Hz) atribuible al protón H-7 y que está mas desplazada a campo bajo con respecto a los protones olefínicos H-3 y H-11, debido al efecto del grupo éster de la lactona.

Entre δ 2.00-2.60 se tienen señales múltiples que integran para 10 protones y que corresponden a los metilenos H-4, H-5, H-8, H-12 y H-13.



Conizaleucólida A (37)

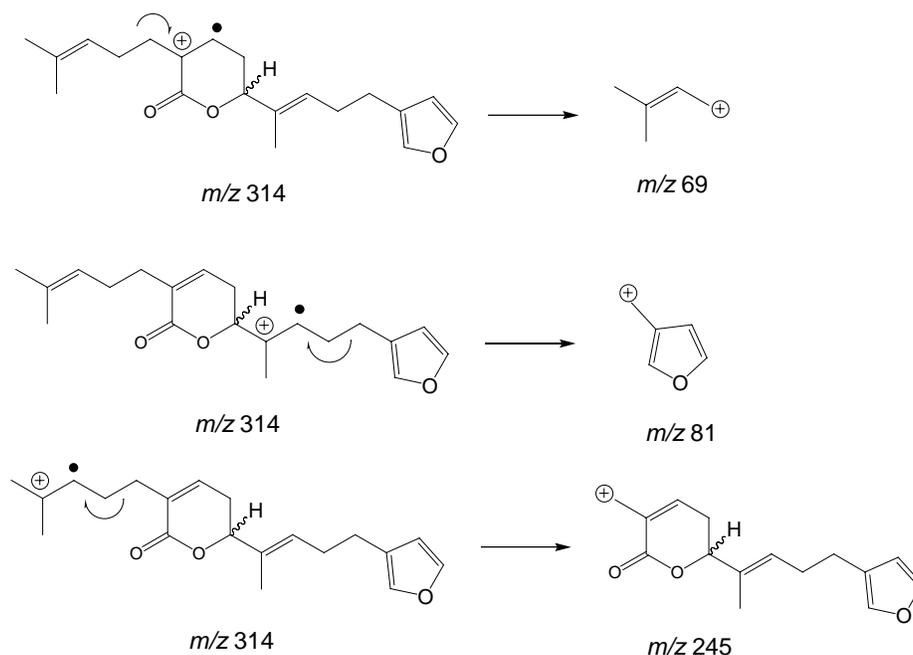
Tabla 9. Datos de RMN- ^1H y ^{13}C de conizaleucólida A (37)

Posición	RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) δ , mult., $J(\text{Hz})$	RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ
1	1.60 (3H, s)	17.8
2	-	132.4
3	5.09 (1H, ta, $J = 6.9$ Hz)	123.3
4	2.24-2.52 (2H, m)	28.7
5	2.49 (2H, m)	26.7
6	-	132.3
7	6.55 (1H, da, $J = 6.6$ Hz)	138.5
8	2.26-2.38 (2H, m)	30.9
9	4.69 (1H, dd, $J = 3.6$ Hz, 12.6 Hz)	82.7
10	-	138.9
11	5.56 (1H, ta, $J = 6.9$ Hz)	128.5
12	2.17 (2H, m)	24.4
13	2.31 (2H, m)	28.1
14	-	124.4
15	6.27 (1H, sa)	110.9
16	7.34 (1H, sa)	142.7
17	7.21 (1H, sa)	138.5
18	1.68 (3H, s)	12.2
19	-	165.5
20	1.68 (3H, s)	25.7

El espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 7, Tabla 9) confirma la presencia de 20 carbonos, los cuales corresponden a 5 metilenos, 3 metilos, 6 metinos, 1 carbono

alifático base de oxígeno, 4 carbonos cuaternarios a campo bajo y 1 carbonilo de lactona.

En el espectro de masas por impacto electrónico se observó la presencia del ión molecular de m/z 314, así como la presencia de otros fragmentos importantes de m/z 69 (41), 81 (100) y 245 (40) (Esquema 6) de acuerdo con la estructura planteada.



Esquema 6. Principales fragmentaciones observadas en conizaleucólida A (37)

Basados en la anterior información se pudo determinar que el compuesto es la conizaleucólida A (37) aislada por primera vez de *Conyza hypoleuca*.¹⁸ Los datos espectroscópicos reportados para este compuesto concuerdan con los del aislado en el presente trabajo.

Cabe destacar que esta es la segunda vez que se reporta la presencia de este compuesto en una fuente natural y la primera en el género *Laennecia*, confirmando la proximidad taxonómica entre *Laennecia* y *Conyza*.

Ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)

Este compuesto fue aislado como un sólido café pálido con punto de fusión 81-83°C y soluble en cloroformo.

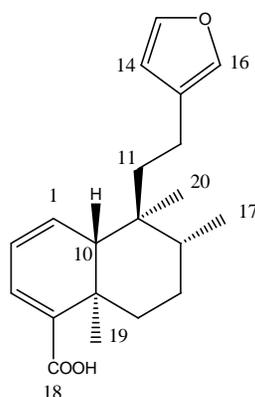
En el espectro en el IR se observa principalmente entre 3500-3440 cm^{-1} una banda de absorción ancha debida a un grupo hidroxilo, a 2924 cm^{-1} las bandas típicas de metinos alifáticos, en 1677 cm^{-1} una banda de absorción fuerte debida al carbonilo de un ácido carboxílico y en 873 cm^{-1} una banda de absorción débil típica de un anillo de furano.⁵⁶

El espectro de RMN-¹H de (38) (Espectro 10, Tabla 10) muestra dos señales simples en δ 1.05 y 0.89 características de los metilos terciarios Me-19 y Me-20, y en δ 0.85 ($J= 6.6$ Hz) una señal doble correspondiente al metilo secundario Me-17. En δ 6.16 y 6.19 (Espectro 10) se observa la presencia de dos señales doble de dobles ($J=3.0, 5.0$ Hz) y en δ 6.94 una señal doble características de un sistema diénico conjugado a un ácido carboxílico y atribuibles a los protones H-1, H-2 y H-3, respectivamente.

En δ 6.23, 7.18 y 7.33 (Espectro 10, Tabla 10) se observan tres señales simples características de un anillo de furano 3-monosustituido, cuyos carbonos aparecen en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 11, Tabla 10) en δ 142.7 (C-15), 138.4 (C-16), 125.4 (C-13) y 110.9 (C-14).

Entre δ 1.25 y 2.60 (Espectro 10, Tabla 10) se observan una serie de señales múltiples que integran para 8 protones y que corresponden a los metilenos H-6, H-7, H-11 y H-12, confirmados previamente por el experimento DEPT.

Una señal característica de este tipo de diterpenos, es el singulete en 2.17 ppm que integra para un proton y que corresponde a H-10 con orientación β , cuya señal del carbono aparece en δ 48.4 (C-10) en el espectro de RMN-C¹³.



Ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)

Tabla 10. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)

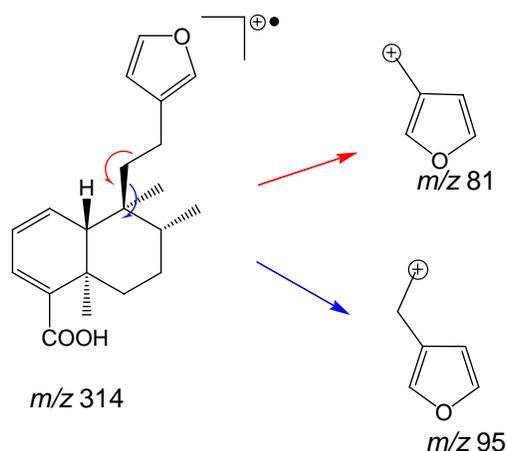
Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ
1	6.16 (1H, dd, J = 5.0, 3.0 Hz)	133.8
2	6.19 (1H, dd, J = 5.0, 3.0 Hz)	124.5
3	6.94 (1H, d, J = 5.1 Hz)	136.1
4	-	139.5
5	-	38.8
6a	1.43 (1H, dd, J = 6.6, 2.4 Hz)	38.3
6b	2.65 (1H, dd, J = 5.1, 5.1 Hz)	-
7a	1.25 (1H, m)	27.3
7b	1.57-1.71 (1H, m)	-
8	1.57-1.71 (1H, m)	35.7
9	-	38.5
10	2.17 (1H, sa)	48.4
11a	2.47 (1H, dd, J = 11.4, 4.8 Hz)	34.6
11b	1.57-1.71 (1H, m)	-
12a	2.28 (1H, dd, J = 12.0, 5.1 Hz)	18.2
12b	2.18 (1H, dd, J = 11.1, 5.5 Hz)	-
13	-	125.4
14	6.23 (1H, sa)	110.9
15	7.33 (1H, sa)	142.7
16	7.18 (1H, sa)	138.4
17	0.85 (3H, d, J = 6.6 Hz)	15.4
18	-	172.2
19	1.05 (3H, s)	19.4
20	0.89 (3H, s)	15.6

La determinación de la orientación de los metilos al igual que la del proton H-10 en la molécula, fue llevada a cabo por comparación directa de los espectros de RMN- ^1H , ^{13}C con otros isómeros estructurales,^{20, 57-62}, encontrando que los metilos Me-17, Me-19 y Me-20 tienen una orientación α^{20} y H-10 una orientación β^{20} .

Lo anterior, se logró debido a que existen pequeñas diferencias en el desplazamiento químico de los metilos Me-17, Me-19 y Me-20 en los diferentes isómeros estructurales, que fueron útiles para determinar la orientación de los metilos.^{20, 57-62}

En el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 11, Tabla 10) se observa la presencia de 20 carbonos, los cuales de acuerdo con el experimento DEPT corresponden a 3 metilos, 4 metilenos, 6 metinos olefínicos, 2 metinos alifáticos desplazados a campo alto, 2 carbonos cuaternarios a campo bajo y 2 a campo alto. Además se observó un carbonilo a δ 172.2 típico de un ácido carboxílico.

En el espectro de masas (Espectro 12) por impacto electrónico se observa la presencia del ión molecular de m/z 314, además de otros fragmentos de m/z 81 (66) y 95 (34) que ratifican la presencia del grupo furano y de acuerdo con la estructura planteada (Esquema 7).



Esquema 7. Principales fragmentaciones observadas en el ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (**38**)

Basados en lo anterior y en sus propiedades físicas se pudo identificar el compuesto aislado como el ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico previamente reportado en *Grangea maderaspatana*,²⁰ una especie de la tribu Astereae.

Ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16H-estríctico (39)

Este compuesto fue aislado como un aceite amarillo soluble en cloroformo.

En el espectro en el IR se observa una banda de absorción amplia en 3490 cm^{-1} de un grupo hidroxilo, en 2926 cm^{-1} se tienen típicas bandas de metinos alifáticos. En 1768 y 1691 cm^{-1} se observan dos bandas de absorción de intensidad fuerte atribuibles a grupos carbonilo de lactona y de ácido carboxílico conjugado.⁵⁶

Las señales del espectro de RMN-¹³C (Espectro 14, Tabla 11) muestran la presencia de 21 carbonos que corresponden a 2 metilos, 1 grupo metoxilo en δ 56.9, 5 metilenos, 1 metileno exocíclico en δ 118.2, 4 metinos oleofínicos a campo bajo, 1 metino alifático en δ 102.4 característico de un acetal y 1 metino alifático en δ 35.6. Se distinguen además, 1 carbonilo de ácido carboxílico en δ 171.4 y uno de lactona en δ 170.1, también se observa en el experimento DEPT la presencia de 4 carbonos cuaternarios, de los cuales hay tres desplazados a campo bajo y uno en campo alto.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 13, Tabla 11) se observa una señal simple en δ 0.72 que integra para tres protones y que corresponde al metilo terciario Me-20, y en δ 0.76 se tiene una señal doble ($J= 6.5\text{ Hz}$) que corresponde al metilo secundario Me-17.

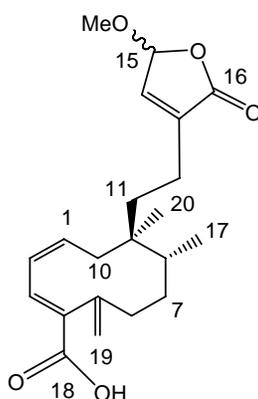
En δ 4.86 y 5.08 se tienen dos singuletes asignables al metileno exocíclico H-19 y en congruencia con lo observado en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 14, Tabla 11), cuyo carbono aparece a δ 118.2.

Entre δ 1.34-1.39 se observa una señal múltiple que integra para un protón y que corresponde a H-8, y cuyo carbono correlaciona con los metilos Me-17 y Me-20 en el experimento HMBC (Espectro 15).

En el espectro de RMN- ^1H también se observa un metino en δ 5.73 cuyo carbono asignado utilizando el experimento HSQC (Espectro 17), aparece en δ 102.4.

Este es el carbono acetálico del cierre lactónico, el cual correlaciona en el experimento HMBC (Espectro 15) con el grupo metoxilo (δ 3.57) y con el metino H-14 (δ 6.77), confirmando la presencia de la lactona.

También se observa la presencia de una señal triple de triple doble en δ 5.42, una señal doble en δ 5.94 ($J= 11.5$ Hz) y una simple ancha en δ 7.38 ppm correspondientes a los protones H-1, H-2 y H-3 respectivamente; siendo estas típicas señales de un sistema diénico conjugados con relación *cis* entre ellos. Se observa además en el experimento COSY (Espectro 16) la correlación entre el proton H-1 en δ 5.42 y el metileno H-10, confirmando la presencia de un anillo de 10 miembros.



Ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)

Tabla 11. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico
(39)

Posición	RMN- ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) δ
1	5.42 (1H, ttd, J = 12.0, 4.0, 2.0 Hz)	127.4
2	5.94 (1H, da, J = 11.5 Hz)	127.6
3	7.38 (1H, s)	143.4
4	-	144.6
5	-	136.1
6a	2.09 (1H, td, J = 14.0, 2.5 Hz)	33.8
6b	2.64-2.66 (1H, m)	-
7a	0.83 (1H, m)	29.1
7b	1.56 (1H, ta, J = 14 Hz)	-
8	1.34-1.39 (1H, m)	35.6
9	-	37.9
10a	1.79 (1H, t, J = 12 Hz)	35.8
10b	2.25 (1H, t, J = 13.0 Hz)	-
11	1.47 (2H, m)	34.9
12	2.28 (2H, t, J = 8.5 Hz)	20.3
13	-	139.4
14	6.68 (1H, s)	141.4
15	5.73 (1H, sa)	102.5
16	-	170.1
17	0.76 (3H, d, J = 6.5 Hz)	13.8
18	-	171.4
19a	4.86 (1H, sa)	118.3
19b	5.08 (1H, sa)	-
20	0.72 (3H, s)	18.5
OMe	3.57 (3H, s)	56.9

En el experimento NOESY (Espectro 18) se observan interacciones entre H-7b (ta, δ 1.56) con el metilo Me-20, 19a (s, δ 4.86) con H-2 y 19b con H-8. Utilizando el modelo Dreiding se pudo determinar que la molécula adquiere una conformación cercana a forma de bote y que los metilos Me-17 y Me-20 se encuentran en la molécula con orientación α (Figura 2). No se pudo determinar la orientación de H-15 utilizando este experimento.

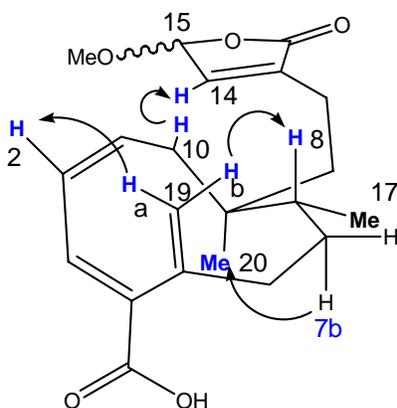


Figura 2. Principales correlaciones NOESY del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16H-estríctico (**39**)

Basados en lo anterior, se pudo identificar este compuesto como el ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16H-estríctico (**39**) aislado por primera vez de *Grangea maderaspatana*.⁵⁹ Cabe anotar que esta es la segunda vez que se reporta este compuesto de un género de la tribu Astereae y primera en el género *Laennecia*.

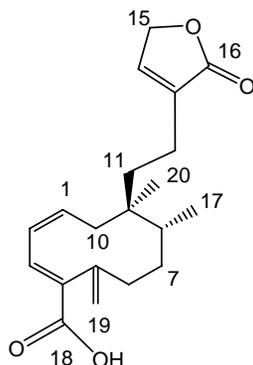
Ácido 15-desoxipúlico (**40**)

Este compuesto fue aislado como un acetite amarillo soluble en cloroformo.

El espectro en el IR muestra la presencia de una banda de absorción ancha en 3460 cm^{-1} característica de un hidroxilo, en 2926 cm^{-1} se observa la banda de metilenos alifáticos y en 1738 cm^{-1} dos bandas de absorción fuerte sobrepuestas atribuibles al carbonilo de ácido y de lactona.⁵⁶

Los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C de este compuesto fueron muy similares a los de **39**. En el ácido 15-desoxipúlico (**40**) no se observó la señal del grupo metoxilo, ni el acetal en posición 15, presentes en el ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16H-estríctico (**39**) (Espectro 13, Tabla 11). En lugar de estas, se observó una señal simple que integra para dos protones en δ 4.78 (Espectro 19, Tabla 12) y cuyo carbono en δ 70.2 (Espectro 20, Tabla 12) confirmó que está señal corresponde a un metileno base de oxígeno. También se observó una señal simple en δ 7.12 atribuible a H-

14, desplazada a campo bajo con un $\Delta\delta$ (0.35) con respecto al mismo protón en **39** (H-14, δ 6.77).



Ácido 15-desoxipúlico (40)

Tabla 12. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido 15-desoxipúlico (**40**)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS) δ , mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) δ
1	5.44 (1H, td, J = 11.4, 3.0 Hz)	127.5
2	5.94 (1H, da, J = 10.2 Hz)	127.5
3	7.39 (1H, s)	143.7
4	-	144.6
5	-	136.2
6a	2.10 (1H, t, J = 15.6 Hz)	33.7
6b	2.64 (1H, m)	-
7a	0.88 (1H, m)	29.1
7b	1.61 (1H, m)	-
8	1.41 (1H, m)	35.6
9	-	37.9
10	1.48 (2H, m)	35.8
11a	1.81 (1H, da, J = 14.1 Hz)	35.1
11b	2.26 (1H, m)	-
12	2.33 (2H, m)	20.4
13	-	135.1
14	7.12 (1H, s)	143.5
15	4.78 (1H, sa)	70.2
16	-	170.8
17	0.77 (3H, d, J = 6.6 Hz)	13.8
18	-	174.4
19a	4.86 (1H, sa)	118.3
19b	5.08 (1H, sa)	-
20	0.73 (3H, s)	18.5

Lo anterior, permitió determinar al compuesto como el ácido 15-desoxipulico (**40**). Este fue aislado de *Pulicaria angustifolia*^{63b} y *P. glutinosa*,^{63a} especies de Asteraceae y es la tercera vez que se reporta de un recurso natural y primera en el género *Laennecia*.

5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)

Este compuesto fue aislado como un sólido amarillo de p.f 220-222°C.

El espectro en el IR se observa una banda de absorción intensa en 3481 cm⁻¹ debida a grupos hidroxilos, en 1725 cm⁻¹ una banda característica de un grupo carbonilo, entre 1158-1312 cm⁻¹ las bandas de absorción media de grupos C-O fenólicos y en 1272 cm⁻¹ la absorción media correspondiente a los grupos metoxilos.⁵⁶

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 22, Tabla 13) confirma la presencia de 18 carbonos, los cuales corresponden a 3 metoxilos, 4 metinos aromáticos, 10 carbonos cuaternarios en campo bajo y la presencia de un carbonilo en δ 178.0.

En el espectro de masas por impacto electrónico se observa la presencia del ión molecular de m/z 360 (69) correspondiente a la fórmula molecular C₁₈H₁₆O₈, además del pico base de m/z 345 (100), el cual es producto de la pérdida de un grupo metilo.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 21, Tabla 13) se observan tres señales simples en δ 3.80, 3.82 y 3.85 correspondientes a los grupos metoxilos, los cuales se ratifican en el espectro de RMN-¹³C en δ 55.5, 59.7 y 60.9. La posición de estos grupos en la molécula fue determinada por las correlaciones observadas en el experimento FLOCK (Espectro 23) entre sus señales de hidrógeno y los carbonos 3', 3 y 8, ubicados en δ 147.5, 137.7 y 127.5 respectivamente.

En el espectro de RMN-¹H también se observó una señal simple en δ 6.26, que integra para un protón y que corresponde a H-6, el cual correlaciona con los carbonos 7, 5, 8 y 10 en el experimento FLOCK (Espectro 23) y los cuales están

ubicados en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 22, Tabla 13) en δ 157.1, 155.1, 127.5 y 103.9 respectivamente.

Otras correlaciones importantes observadas en el experimento FLOCK fueron entre H-2' y C-2 (δ 111.7), C-4' (δ 149.8) y C-6' (δ 122.1) (Figura 3).

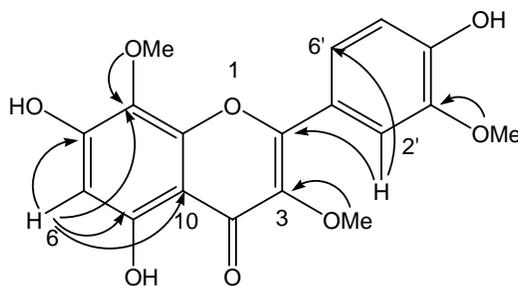
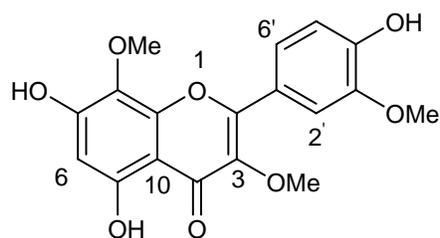


Figura 3. Principales interacciones observadas en el experimento FLOCK de (41)

Ademas se observa en el espectro RMN-¹H dos señales dobles en δ 6.98 ($J = 8.4$ Hz) y 7.66 ($J = 2.1$ Hz), una señal doble de doble en δ 7.61 ($J = 8.4, 2.1$ Hz) asignada a H-2', H-6' y H-5' respectivamente, y cuyos desplazamientos y multiplicidad caracterizan a un sistema aromático 1',3',4'-trisustituido.⁶⁴⁻⁶⁷



5,7,4'-Trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)

Tabla 13. Datos de RMN-¹H y ¹³C de la 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona
(41)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
2	-	155.1
3	-	137.7
4	-	178.0
5	-	155.9
6	6.28 (1H, s)	98.8
7	-	157.1
8	-	127.5
9	-	148.5
10	-	103.9
1'	-	120.9
2'	7.66 (1H, d, J = 2.1 Hz)	111.7
3'	-	147.5
4'	-	149.8
5'	6.98 (1H, d, J = 8.4 Hz)	115.8
6'	7.61 (1H, dd, J = 8.4, 2.1 Hz)	122.1
OMe-3'	3.80 (3H, s)	55.5
OMe-8	3.82 (3H, s)	60.9
OMe-3	3.85 (3H, s)	59.7
OH-5	12.31 (1H, sa)	-

El experimento NOESY (Espectro 24) muestra interacciones entre H-2' y los metoxilos 3' y 3, entre H-5' y H-6', y no se observa correlación alguna entre H-5' y un grupo metoxilo, lo que confirma la presencia de un OH en posición 4' del anillo B del flavonoide.

Basados en lo anterior y por comparación directa con los datos espectroscópicos y físicos (p.f: 215-217°C) reportados en la literatura,^{67,68} se determinó que el compuesto es la 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41) previamente aislado de *Cyanostegia angustifolia*,⁶⁸ una especie de la familia Verbenaceae y es la primera vez que se reporta este compuesto en el género *Laennecia*.

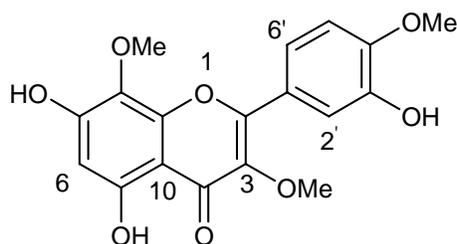
5,7,3-Trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42).

Este compuesto fue aislado como un sólido amarillo de p.f 220-223 °C.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 25, Tabla 14) se observa una señal simple en δ 6.28 asignada a H-6, la cual correlaciona con los carbonos C-5, C-8 y C-10 en el experimento COLOC (Espectro 27), los cuales aparecen en el espectro de RMN-¹³C en δ 155.9, 127.6 y 104.1 respectivamente.

Ademas en este experimento (Espectro 27) se observa la correlación entre la señal simple en δ 3.81 asignada a un metoxilo y el C-8 (δ 127.6), lo que indica que el patrón de sustitución en el anillo A de la flavona es similar que el compuesto (41).

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 25, Tabla 14) también se observan una señales doble en δ 7.13 ($J= 8.7$ Hz), una señal simple en δ 7.57 y una doble de doble en δ 7.59 ($J= 8.7, 2.4$ Hz), asignadas a los protones H-5', H-2' y H-6' respectivamente, siendo señales típicas de un anillo aromático 1',3',4'-trisustituido y pertenecientes al anillo B de una flavona.



5,7,3-Trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)

Tabla 14. Datos de RMN-¹H y ¹³C de la 5,7,3-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (**42**)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
2	-	155.1
3	-	138.0
4	-	178.1
5	-	155.9
6	6.28 (1H, s)	98.8
7	-	157.0
8	-	127.6
9	-	148.6
10	-	104.1
1'	-	122.4
2'	7.57 (1H, d, J = 2.4 Hz)	114.8
3'	-	146.4
4'	-	150.3
5'	7.13 (1H, d, J = 8.7 Hz)	112.7
6'	7.59 (1H, dd, J = 8.7, 2.4 Hz)	120.3
OMe-4'	3.78 (3H, s)	55.6
OMe-8	3.81 (3H, s)	61.0
OMe-3	3.85 (3H, s)	59.7
OH-5	12.32 (1H, s)	-

Para determinar la ubicación de los sustituyentes sobre la molécula, se recurrió al experimento COLOC (Espectro 27), en donde se observa la correlación de un metoxilo con el carbono en δ 150.3 asignado a C-4', confirmando la presencia de un grupo metoxilo en posición 4' del anillo B del flavonoide.

El experimento NOESY (Espectro 28) confirmó lo observado anteriormente, ya que existen correlaciones espaciales ¹H-¹H entre H-5' y un grupo metoxilo en posición 4', diferencia notable entre esta molécula y la flavona (**41**), la que por tener un grupo hidroxilo en la posición 4' de anillo no se observa dicha correlación. En el espectro de NOESY (Espectro 28) también se observó la correlación entre H-2' y un grupo metoxilo (3H, s, δ 3.85) ubicado en la posición 3 del anillo C.

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 26, Tabla 14) muestra la presencia de 18 carbonos con un patrón similar a la flavona (**41**). En el espectro de masas por impacto electrónico se observa la presencia del ion molecular de m/z 360 (69) y pico base de m/z 345 (100), permitiendo identificar a este compuesto como un isómero de la flavona (**41**) y de fórmula molecular C₁₈H₁₆O₈.

Lo anterior permitió concluir que la diferencia entre este compuesto y la flavona (**41**) era la posición del grupo metoxilo e hidroxilo en el sistema trisustituido del anillo B de la flavona, identificando al compuesto como la 5,7,3-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (**42**), la cual solo ha sido reportada como producto sintético⁶⁹ y es la primera vez que se aísla de un recurso natural (*Laennecia schiedeana*).

Astragalina (19)

Este compuesto fue aislado como un sólido amarillo de p.f 135-137 °C.

El espectro en el IR se observa la presencia a 3380 cm⁻¹ de una banda de absorción ancha debida grupos OH, en 2923 cm⁻¹ las bandas típicas de metinos alifáticos y en 1655 cm⁻¹ una banda de absorción correspondiente a un grupo carbonilo de flavonoide.⁵⁶

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 30, Tabla 15) presenta 21 átomos de carbonos de los cuales 6 metinos aromáticos y 9 carbonos cuaternarios a campo bajo, incluyendo un carbonilo en δ 177.4 corresponden al esqueleto básico de una flavona. Se observa además un metileno en δ 60.8 y cuatro metinos base de oxígeno y un carbono anomérico en δ 100.9, confirmando una estructura de flavonoide glicosilado.

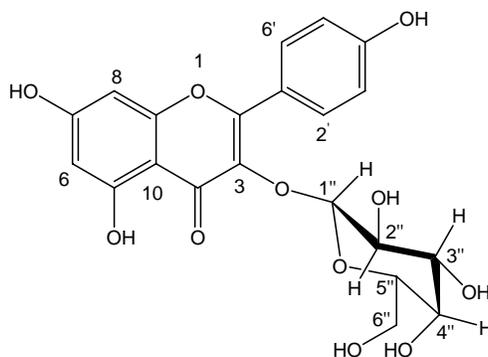
En el espectro de RMN-¹H (Espectro 29, Tabla 15) entre δ 3.08 y 3.56 se encuentran las señales múltiples de los metinos H-2'', H-3'', H-4'' y H-5'', y del metileno H-6''. Estas señales, junto con la señal a δ 5.44 ($J = 7.2$ Hz) asignada a

H-1'', corroboran la presencia de una β hexosa dada la constante de acoplamiento *diaxial* de H-1''.

Estas señales se ratifican en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 30, Tabla 15) por su ubicación en δ 100.9 (C-1''), 77.4 (C-3''), 76.4 (C-5''), 74.2 (C-2''), 69.9 (C-4'') y 60.8 (C-6'').⁶⁶

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 29, Tabla 15) también se observa la presencia de dos señales dobles en δ 6.19 ($J = 2.1$ Hz) y δ 6.42 ($J = 2.1$ Hz) y asignadas a H-6 y H-8 del anillo A de un canferol y las cuales se caracterizan por un acoplamiento *meta* de 2.1 Hz.⁷⁰ Estas se ratifican en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 30, Tabla 15) por su ubicación en δ 98.6 y 93.6 respectivamente.

También se observa dos señales dobles en δ 6.87 ($J = 9.0$ Hz) y 8.03 ($J = 9.0$ Hz) (Espectro 29, Tabla 15) correspondientes a los protones H-3',H-5' y H-2',H-6'; características de un sistema aromático *para* disustituido. Estas señales se confirmaron en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 30, Tabla 15) en δ 115.1 (C-3', C-5') y 130.8 (C-2', C-6'). Además se observa en δ 12.60 un singulete correspondiente al OH-5.



Astragalina (19)

Tabla 15. Datos de RMN-¹H y ¹³C de astragalina (**19**)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
2	-	156.3
3	-	133.2
4	-	177.4
5	-	161.2
6	6.19 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	98.6
7	-	164.1
8	6.42 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	93.6
9	-	156.2
10	-	103.9
1'	-	120.9
2'	8.03 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	130.8
3'	6.87 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	115.1
4'	-	159.9
5'	6.87 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	115.1
6'	8.03 (2H, d, <i>J</i> = 9.0 Hz)	130.8
1''	5.44 (1H, d, <i>J</i> = 7.2 Hz)	100.9
2''	3.16-3.26 (2H, m)	74.2
3''	3.08 (2H, m)	77.4
4''	3.08 (2H, m)	69.9
5''	3.16-3.26 (2H, m)	76.4
6a''	3.56 (1H, dd, <i>J</i> = 11.4, 4.2 Hz)	60.8
6b''	3.32 (1H, m)	-
OH-5	12.59 (1H, s)	-

El desplazamiento de C-3 (δ 133.2) y C-2 (δ 156) fue clave para determinar la posición de la hexosa en C-3, ya que normalmente este carbono se observa en δ 136.0 cuando tiene un grupo hidroxilo unido.⁶⁶

El espectro de masas FAB⁺ confirma la presencia del pico base de *m/z* 154 (100), producto de una fragmentación tipo Retro-Diels-Alder, característica de flavonoides que presentan un patrón de sustitución similar al anillo A de **19**.⁷⁰

Basados en el anterior análisis y por comparación de sus datos espectroscópicos^{27,66}, se determinó al compuesto aislado como astragalina (**19**), el cual ha sido previamente reportado en la literatura^{27, 66} y siendo la primera vez que se reporta en el género *Laennecia*.

Nicotiflorina (20)

Este compuesto fue aislado como un sólido amarillo de p.f 183-184 °C.

El espectro en el IR se observa la presencia a 3383 cm^{-1} de una banda de absorción ancha característica de grupos hidroxilos, en 2923 cm^{-1} se tiene una banda de absorción fuerte debida a metinos alifáticos y en 1659 cm^{-1} se observa la presencia de una banda de absorción debida al grupo carbonilo de una flavona.⁵⁶

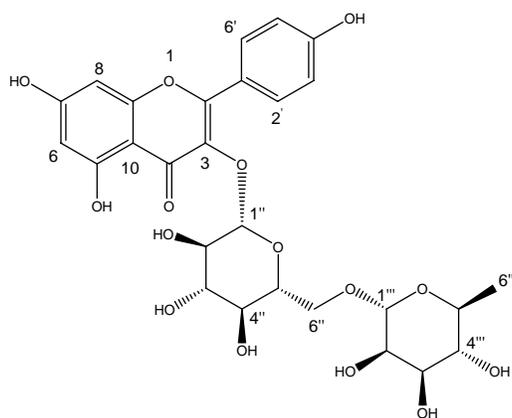
El espectro de RMN-¹³C (Espectro 32, Tabla 16) confirmó la presencia de 27 carbonos, los cuales de acuerdo con el experimento DEPT corresponden a 1 metilo en δ 17.9, 1 metileno en δ 68.6, 8 metinos base de oxígeno y 2 carbonos anoméricos en δ 105.1 y 102.4. También, se observó 4 metinos aromáticos en δ 101.6, 96.1, 116.2 y 132.3, además de la presencia de 8 carbonos cuaternarios en campo bajo y un carbonilo en δ 178.8.

El espectro de RMN-¹H (Espectro 31, Tabla 16) muestra la presencia de una señal doble en δ 1.13 ($J = 6.0$ Hz) asignada Me-6'' del grupo ramnósido, además se observa una señal múltiple entre δ 3.20-3.80 asignada a los protones del grupo rutinósido.

También se observa una señal simple en δ 4.50 y una señal doble en δ 5.03 ($J = 7.5$ Hz) asignadas a los protones anoméricos H-1''' y H-1'', confirmándose las anteriores en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 32, Tabla 16) por su ubicación δ 102.4 y 105.1 e indicando la presencia de dos hexosas en la molécula.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 31, Tabla 16) se observan dos señales dobles en δ 6.10 ($J = 2.1$ Hz) y 6.27 ($J = 2.1$ Hz) asignadas a H-6 y H-8, y por su constante de acoplamiento se deduce que están en posición *meta* una respecto a la otra, e indicando que esta molécula presenta un patrón de sustitución igual en el anillo A que la flavona (19).⁷¹

También se observan dos señales dobles en δ 6.87 ($J = 9.3$ Hz) y 8.05 ($J = 9.3$ Hz) asignadas a H-3', H-5' y H-2', H-6', y características de un sistema aromático *para* disustituido.



Nicotiflorina (20)

Tabla 16. Datos de RMN-¹H y ¹³C de nicotiflorina (20)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., <i>J</i> (Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
2	-	158.9
3	-	135.4
4	-	178.7
5	-	158.7
6	6.10 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	101.6
7	-	171.1
8	6.27 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	96.1
9	-	162.7
10	-	104.2
1'	-	122.8
2'	8.05 (1H, d, <i>J</i> = 9.3 Hz)	132.3
3'	6.87 (1H, d, <i>J</i> = 9.3 Hz)	116.2
4'	-	161.7
5'	6.87 (1H, d, <i>J</i> = 9.3 Hz)	116.2
6'	8.05 (1H, d, <i>J</i> = 9.3 Hz)	132.3
1''	5.03 (1H, <i>J</i> = 7.5 Hz)	105.1
2''	3.20-3.80 (1H, m)	75.7
3''	3.20-3.80 (1H, m)	78.2
4''	3.20-3.80 (1H, m)	73.9
5''	3.20-3.80 (1H, m)	77.2
6''	3.20-3.80 (2H, m)	68.6
1'''	4.50 (1H, sa)	102.4
2'''	3.20-3.80 (1H, m)	72.1
3'''	3.20-3.80 (1H, m)	72.2
4'''	3.20-3.80 (1H, m)	71.4
5'''	3.20-3.80 (1H, m)	69.7

6''	1.13 (3H, d, $J = 6.0$ Hz)	17.9
-----	----------------------------	------

La posición de C-3 en δ 135.4 y C-2 en δ 158.9 confirman que el grupo rutinósido esta unido en el C-3 a través de el grupo glucósido.^{66,72}

Basados en el anterior análisis y por comparación de sus datos espectroscópicos, se determinó que el compuesto aislado es nicotiflorina (**20**) previamente reportado en la literatura.^{27,66,72}

Rutina (16)

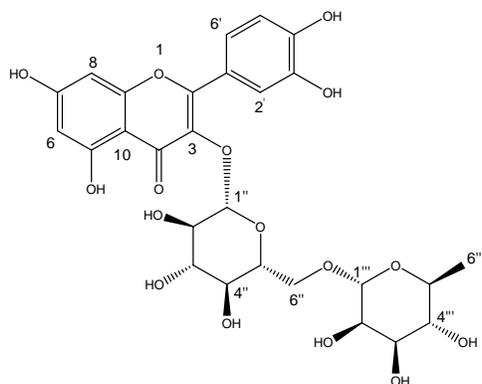
La rutina (**16**) fue aislada como un sólido amarillo con p.f 198-200 °C y de las mismas fracciones que nicotiflorina (**20**).

El espectro de IR mostró bandas similares que para nicotiflorina (**20**), en 3357 cm^{-1} (OH), 2923 cm^{-1} (metinos alifáticos) y 1650 cm^{-1} (C=O).

El espectro de RMN-¹H (Espectro 33, Tabla 17) mostró señales similares para el anillo A y el grupo rutinósido observadas en nicotiflorina (**20**), a diferencia del patrón de sustitución en el anillo B de la flavona.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 33, Tabla 17) se observaron dos señales dobles en δ 6.84 ($J = 8.7$ Hz) y 7.65 ($J = 2.1$ Hz) asignadas a H-5' y H-2', además de una señal doble de doble en δ 7.62 ($J = 8.4, 2.1$ Hz) atribuida a H-6'.

Lo anterior indicó que el anillo B es 1',3',4'-trisustituido, lo cual se confirmó en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 34, Tabla 17) por las señales en δ 150.4 (C-4'), 146.0 (C-3'), 123.5 (C-6'), 122.9 (C-1'), 117.4 (C-5'), 116.1 (C-2') pertenecientes al anillo B de la flavona.



Rutina (16)

Tabla 17. Datos de RMN-¹H y ¹³C de rutina (16)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., <i>J</i> (Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
2	-	158.9
3	-	135.4
4	-	178.6
5	-	158.6
6	6.08 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	101.9
7	-	166.1
8	6.23 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	96.3
9	-	162.6
10	-	103.8
1'	-	122.9
2'	7.65 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	116.1
3'	-	146.0
4'	-	150.4
5'	6.84 (1H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz)	117.4
6'	7.62 (1H, dd, <i>J</i> = 2.1, 8.4 Hz)	123.5
1''	4.98 (1H, d, <i>J</i> = 7.8 Hz)	105.5
2''	3.20-3.80 (1H, m)	75.7
3''	3.20-3.80 (1H, m)	78.3
4''	3.20-3.80 (1H, m)	74.0
5''	3.20-3.80 (1H, m)	77.2
6''	3.20-3.80 (2H, m)	68.6
1'''	4.50 (1H, s a)	102.5
2'''	3.20-3.80 (1H, m)	72.1
3'''	3.20-3.80 (1H, m)	72.2
4'''	3.20-3.80 (1H, m)	71.4
5'''	3.20-3.80 (1H, m)	69.7
6'''	1.13 (3H, d, <i>J</i> = 6.0 Hz)	17.9

Basados en lo anterior y en la comparación de sus datos espectroscópicos, se identificó a este compuesto como rutina (**16**), previamente reportada en la literatura.⁷²

Ácido 3,4-dicafeoil-quínico (30b)

El ácido 3,4-dicafeoil-quínico fue aislado como un sólido amarillo pálido y de p.f 204-206 °C.

El espectro en el IR mostró en 3373 cm^{-1} una banda de absorción fuerte debida a grupos hidroxilos fenólicos y de ácido carboxílico. En 1696 cm^{-1} se tiene una banda de absorción intensa debida a C=O y en 1603 cm^{-1} otra debida a C=C.⁵⁶

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 35, Tabla 18) se observaron dos señales doble de doble en δ 1.76 ($J = 14.4, 3.6$ Hz) y δ 2.10 ($J = 14.4, 3.6$ Hz) asignados a H-6a y H-6b, además de dos señales doble de doble en δ 1.93 ($J = 12.9, 4.5$ Hz) y 2.06 ($J = 12.9, 4.5$ Hz) asignadas a H-2a y H-2b, las anteriores se confirmaron en el experimento DEPT en 38.4 (C-2), 37.6 (C-6) y están en congruencia con la presencia de dos metilenos en la molécula.

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 35, Tabla 18) se observó una señal doble de doble de doble en δ 5.42 ($J = 9.4, 9.4, 4.5$ Hz) asignada a H-3, la cual muestra acoplamiento en el experimento COSY (Espectro 37) con las señales del metileno H-2a y H-2b. De igual manera, se observó una señal doble de doble de doble en δ 4.13 ($J = 4.5, 4.5, 3.0$ Hz) asignada a H-5 y la cual muestra acoplamiento en el experimento COSY con las señales del metileno H-6a y H-6b, y además con la señal doble de doble en 4.92 ($J = 9.4, 4.5$ Hz) asignada a H-4. En este experimento también se observó correlación entre H-4 y H-3.

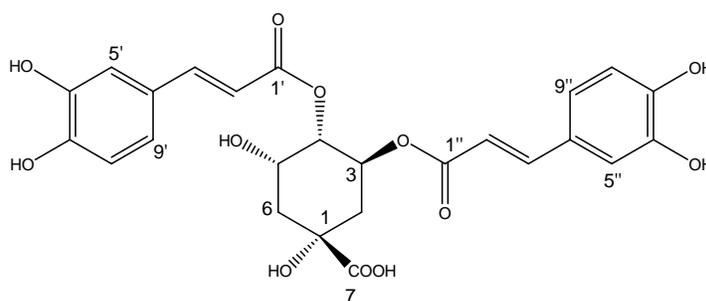
Basados en lo anterior, se determinó que la molécula estaba conformada por un anillo alifático 6 de miembros como núcleo principal, siendo esto congruente con la presencia de 3 metinos base de oxígeno en δ 74.7 (C-4), 68.0 (C-5), 67.6 (C-3), 2

metilenos previamente descritos, además de 1 carbono cuaternario base de oxígeno en δ 74.2 (C-1) y el cual está unido un carbonilo (δ 175.1, C-7) de ácido.

En el espectro de RMN- ^1H (Espectro 35, Tabla 18) también se observaron dos señales dobles en δ 6.14 ($J = 15.9$ Hz) y 6.21 ($J = 15.9$ Hz) asignadas a H-2' y H-2'', mismas que correlacionaron en los experimentos COSY (Espectro 37) y NOESY (Espectro 38) con las señales dobles en δ 7.46 ($J = 15.9$ Hz) y 7.40 (1H, d, $J = 15.9$ Hz) atribuidas a H-3' y H-3''. Los valores de las constantes de acoplamiento indican que estas señales hacen parte de una doble ligadura con configuración (*E*) y característicos de un sistema α,β -insaturado.⁷³⁻⁷⁵

También se observaron dos señales dobles en δ 6.71 ($J = 8.4$ Hz) y 6.71 ($J = 8.4$ Hz) asignadas a H-8' y H-8'', además de dos señales doble de doble en δ 6.93 ($J = 8.4, 2.1$ Hz) y 6.96 ($J = 8.4, 2.1$ Hz) asignadas a H-9' y H-9'', y una señal simple en δ 7.00 que integra para dos protones y asignadas a H-9' y H-9''.

Siendo las anteriores, señales características de dos sistemas aromáticos de 6 miembros trisustituídos.⁷³⁻⁷⁵ Estas se confirmaron en el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 36, Tabla 18) por su ubicación en δ 148.5 (C-7'), 148.5 (C-7''), 145.4 (C-6', C-6''), 125.4 (C-4', C-4''), 121.4 (C-9'), 121.3 (C-9''), 115.8 (C-8', C-8''), 114.9 (C-5', C-5'').



Ácido 3,4-dicafeil-quínico (30b)

Tabla 18. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido 3,4-dicafeil-quínico (**30b**)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
1	-	74.2
2a	1.93 (1H, dd, <i>J</i> = 12.9, 4.5 Hz)	38.4
2b	2.06 (1H, dd, <i>J</i> = 12.9, 4.5 Hz)	-
3	5.42 (1H, ddd, <i>J</i> = 9.4, 9.4, 4.5 Hz)	67.6
4	4.92 (1H, dd, <i>J</i> = 9.4, 4.5 Hz)	74.7
5	4.13 (1H, ddd, <i>J</i> = 4.5, 4.5, 3.0 Hz)	68.0
6a	1.76 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 3.6 Hz)	37.6
6b	2.10 (1H, dd, <i>J</i> = 14.4, 3.6 Hz)	-
7	-	175.1
1'	-	165.8
2'	6.14 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	113.7
3'	7.46 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	145.6
4'	-	125.4
5'	7.00 (1H, sa)	114.9
6'	-	145.4
7'	-	148.5
8'	6.71 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	115.8
9'	6.93 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.1 Hz)	121.4
1''	-	166.1
2''	6.21 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	113.8
3''	7.40 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	145.6
4''	-	125.4
5''	7.00 (1H, s)	114.9
6''	-	145.4
7''	-	148.5
8''	6.72 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)	115.8
9''	6.96 (1H, dd, <i>J</i> = 8.4, 2.1 Hz)	121.3

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 36, Tabla 18) confirmó la presencia de 25 carbonos, y de acuerdo con el experimento DEPT corresponden a 2 metilenos, 3 metinos base de oxígeno, 10 metinos olefínicos a campo bajo, 7 carbonos cuaternarios, de los cuales 6 a campo bajo y uno base de oxígeno. Además se observa la presencia en δ 175.1 de un carbonilo de ácido carboxílico y en δ 166.1 y 165.8 dos carbonilos de ester α,β-insaturados.

El experimento NOESY (Espectro 38) mostró correlaciones entre los protones aromáticos (H-9',9''), (H-5',5'') y los protones (H-3',3'' y H-2',2''), siendo mas fuerte la interacción con H-3',3'', demostrando que la molécula estaba conformada por dos grupos cafeilos⁷⁴ y los cuales estaban unidos al núcleo alifático de 6 miembros en las posiciones 3 y 4.

La orientación β de H-4 y H-5, se determinó debido a la interacción de tipo NOE (Espectro 38) presente entre estos protones. No se observó correlación espacial entre H-3 y H-4 o H-5, indicando que H-3 tiene una orientación α en la molécula, también confirmado por sus valores de constante de acoplamiento, en donde se observa la presencia de 2 acoplamientos axiales de 9.4 Hz entre H-3 con H-4 y H-2.

Basados en los anterior, y por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura⁷³⁻⁷⁵ y una muestra disponible en el laboratorio, se identificó al compuesto aislado como el ácido 3,4-dicafeil-quinico (**30b**).

Esta molécula es derivada de ácido quinico, el cual es un intermediario en la biogénesis de los flavonoides.⁷⁶ El ácido 3,4-dicafeil quinico ha sido reportado en el género *Conyza*,²⁷ y es la primera vez que este tipo de compuestos se reporta en el género *Laennecia*.

Ácido clorogénico (30a)

El ácido clorogénico (**30a**) fue aislado como un sólido amarillo pálido y de p.f 201-203 °C. El espectro en el IR muestra un banda de absorción fuerte debida a grupos OH en 3171 cm^{-1} . En 1696 cm^{-1} se tiene una banda de absorción fuerte debida a C=O y en 1629 cm^{-1} otra debida a C=C.⁵⁶

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 40, Tabla 19) confirma la presencia de 16 carbonos, y de acuerdo con el experimento DEPT corresponden a 2 metilenos, 3 metinos base de oxígeno, 5 metinos en campo bajo, 3 carbonos cuaternarios a campo bajo y uno a campo alto. Además de dos carbonilos en δ 175.6 y 165.9.

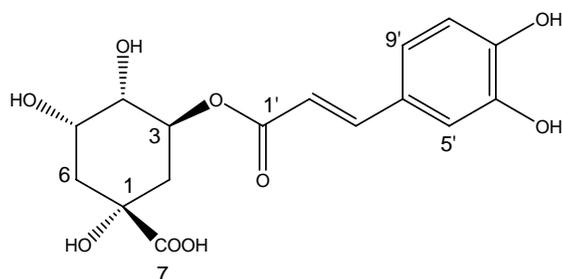
En el espectro de RMN-¹H (Espectro 39, Tabla 19) se observó una señal simple en δ 1.88 y dos señales dobles anchas en δ 1.72 ($J = 12.3$ Hz) y 2.00 ($J = 12.3$ Hz) asignadas a los metilenos H-2, H-6a y H-6b respectivamente, y confirmadas en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 40, Tabla 19) por las señales en δ 38.1 (C-6) y 37.6 (C-2).

En el experimento COSY (Espectro 41) se observaron las correlaciones entre el metileno H-2 con la señal doble de doble de doble en δ 5.14 ($J = 8.7, 8.7, 6.0$) asignada a H-3, y la cual a su vez está acoplada con una señal doble de dobles en δ 3.51 ($J = 8.7, 2.7$ Hz) correspondiente al protón H-4. En el espectro de RMN-¹H (Espectro 39, Tabla 19) también se observa una señal simple en δ 3.93 asignada a H-5.

Las señales atribuidas a H-3, H-4 y H-5 son confirmadas en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 40, Tabla 19) por la presencia de tres carbonos base de oxígeno en δ 72.0 (C-3), 71.1 (C-4) y 69.9 (C-5),⁷³⁻⁷⁵ los cuales conforman el anillo alifático de 6 miembros.

El espectro de RMN-¹H (Espectro 39, Tabla 19) también se observan dos señales dobles en δ 6.18 ($J = 15.9$ Hz) y 7.43 ($J = 16.2$ Hz) asignadas a H-2' y H-3', y las cuales son características de un sistema α,β -insaturado. Además de las señales dobles en δ 6.76 ($J = 8.1$ Hz) y 7.04 ($J = 2.1$ Hz) asignadas a H-8' y H-5', y la señal doble de doble en δ 6.96 ($J = 8.1, 1.8$ Hz) asignadas a H-9', Siendo las anteriores señales características de un sistema aromático trisustituido.⁷³⁻⁷⁵

La presencia del grupo cafeilo se confirma en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 40, Tabla 19) por las señales en δ 148.2 (C-7'), 145.5 (C-6'), 144.4 (C-3'), 125.5 (C-4'), 120.9 (C-9'), 115.7 (C-8'), 114.7 (C-5') y 114.5 (C-2'). Los carbonilos en δ 175.6 y 165.9 corresponden a C-7 (COOH) y C-1' (C=O).



Ácido clorogénico (30a)

Tabla 19. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido clorogénico (30a)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , TMS) δ, mult., <i>J</i> (Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ
1	-	74.5
2	1.88 (2H, sa)	37.6
3	5.14 (1H, ddd, <i>J</i> = 8.7, 8.7, 6.0 Hz)	72.0
4	3.51 (1H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.7 Hz)	71.1
5	3.93 (1H, sa)	69.9
6a	1.72 (1H, da, <i>J</i> = 12.3 Hz)	38.1
6b	2.00 (1H, da, <i>J</i> = 12.3 Hz)	-
7	-	175.6
1'	-	165.9
2'	6.18 (1H, d, <i>J</i> = 15.9 Hz)	114.5
3'	7.43 (1H, d, <i>J</i> = 16.2 Hz)	144.4
4'	-	125.5
5'	7.04 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	114.7
6'	-	145.5
7'	-	148.2
8'	6.76 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	115.7
9'	6.96 (1H, dd, <i>J</i> = 8.1, 1.8 Hz)	120.9

Por comparación con los datos espectroscópicos reportados,⁷⁵ se determinó que el grupo cafeilo estaba unido en la posición 3 del anillo base y que la configuración de la molécula era igual que para el ácido 3,4-dicafeil-quinico (**30b**), identificando al compuesto aislado como el ácido clorogénico (**30a**).⁷³⁻⁷⁵

Este compuesto ha sido previamente reportado en el género *Conyza*²⁸⁻²⁹ y es la primera vez que se reporta en el género *Laennecia*.

Ácido 3,5-dicafeil-quínico (30c)

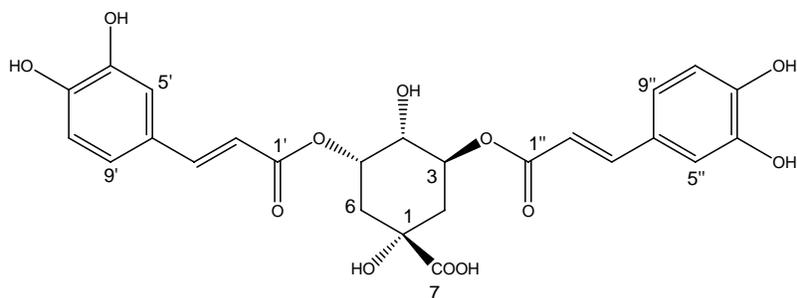
El ácido 3,5-dicafeil-quínico fue aislado como un sólido amarillo pálido de p.f 201-203 °C. El espectro en el IR mostró en 3356 cm^{-1} una banda de absorción intensa debida a grupos hidroxilos fenólicos y de ácido carboxílico, en 1688 cm^{-1} una banda de absorción fuerte debida a C=O y en 1603 cm^{-1} otra debida a C=C.⁵⁶

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 42, Tabla 20) se observó una señal doble de dobles en $\delta\ 3.97$ ($J = 8.0, 3.3\text{ Hz}$) asignada a H-4 y la cual correlaciona en el experimento COSY (Espectro 44) con la señal múltiple que integra para dos protones en $\delta\ 5.41$ y asignadas a H-3 y H-5, y estas a su vez se acoplan con la señal múltiple en $\delta\ 2.17-2.29$ (Espectro 42, Tabla 20) asignadas a los metilenos H-2 y H-6, las cuales se confirman en el espectro de RMN-¹³C (Espectro 43, Tabla 20) en $\delta\ 37.9$ (C-2), 36.1 (C-6).

En el espectro de RMN-¹H (Espectro 42, Tabla 20) también se observaron cuatro señales dobles en $\delta\ 6.26$ ($J = 15.9\text{ Hz}$), 6.35 ($J = 15.9\text{ Hz}$), 7.56 ($J = 15.9\text{ Hz}$) y 7.61 ($J = 15.9\text{ Hz}$) asignadas a H-2', H-3', H-2'' y H-3'' respectivamente. Además de la señal doble en $\delta\ 6.78$ ($J = 8.1\text{ Hz}$) que integra para dos protones y asignada a H-8' y H-8''.

También se observan dos señales doble de dobles en $\delta\ 6.94$ ($J = 8.1, 2.1\text{ Hz}$) y 6.97 ($J = 8.1, 2.1\text{ Hz}$) asignadas a H-9' y H-9'' respectivamente. Además se observó una señal doble en 7.06 ($J = 1.8\text{ Hz}$) que integra para dos protones y atribuida a H-5' y H-5''.

Lo anterior, confirmó la presencia de dos grupos cafeilos en la molécula ubicados en la posiciones 3 y 5 del anillo alifático de seis miembros.⁷³



Ácido 3,5-dicafeil-quínico (30c)

Tabla 19. Datos de RMN-¹H y ¹³C del ácido 3,5-dicafeil-quínico (30c)

Posición	RMN- ¹ H (300 MHz, CD ₃ OD, TMS) δ, mult., J(Hz)	RMN- ¹³ C (75 MHz, CD ₃ OD) δ
1	-	74.9
2	2.10-2.40 (4H, m)	37.9
3	5.41 (1H, m)	72.1
4	3.97 (1H, dd, J = 8.0, 3.3 Hz)	70.8
5	5.41 (1H, m)	72.7
6	2.10-2.40 (4H, m)	36.1
7	-	177.6
1'	-	168.4
2'	6.26 (1H, d, J = 15.9 Hz)	115.2
3'	7.56 (1H, d, J = 15.9 Hz)	147.2
4'	-	127.8
5'	7.05 (1H, d, J = 1.8 Hz)	115.1
6'	-	146.8
7'	-	149.6
8'	6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz)	116.4
9'	6.94 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz)	123.0
1''	-	168.9
2''	6.35 (1H, d, J = 15.9 Hz)	115.6
3''	7.61 (1H, d, J = 15.9 Hz)	147.0
4''	-	127.9
5''	7.06 (1H, d, J = 1.8 Hz)	115.1
6''	-	146.8
7''	-	149.5
8''	6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz)	116.4
9''	6.97 (1H, dd, J = 8.1, 2.1 Hz)	123.0

El espectro de RMN-¹³C (Espectro 43, Tabla 20) confirmó la presencia de 25 carbonos, y de acuerdo con el experimento DEPT corresponden a 2 metilenos, 3 metinos base de oxígeno, 10 metinos olefínicos en campo bajo, 7 carbonos

cuaternarios, de los cuales se tiene 6 a campo bajo y uno base de oxígeno. Además en δ 177.7 un carbonilo de ácido carboxílico y en δ 166.9 y 168.4 dos carbonilos de éster α,β -insaturados.

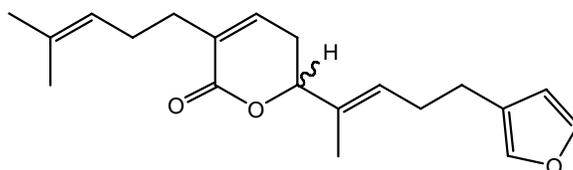
Basados en lo anterior y por comparación de los datos espectroscópicos reportados en la literatura,⁷³ se identificó la molécula aislada como el ácido 3,5-dicafeil-quínico (**30c**), isómero del compuesto (**30b**).⁷³

Este compuesto ha sido aislado también en el género *Conyza*²⁸ y es la primera vez que se reporta en el género *Laennecia*.

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Con el fin de explorar posibles actividades biológicas de los metabolitos aislados del estudio fitoquímico de *Laennecia schiedeana*, estos se sometieron a pruebas de citotoxicidad en diferentes líneas celulares de cáncer humano utilizando un protocolo establecido por el Instituto Nacional de Cáncer (INC) de los Estados Unidos.⁴⁰

En una primera etapa, se sometieron los compuestos (Ver Tabla 2) a un rastreo primario de citotoxicidad en diferentes líneas cancerosas humanas, encontrando que la lactona diterpénica conizaleucólida A (**37**)¹⁸ presentó una actividad citotóxica considerable en la línea cancerosa K562 (leucemia) con 84.77 % de actividad inhibitoria y un valor de IC_{50} de 21.53 ± 4.1



Conizaleucólida A (**37**)

Hasta la fecha no hay reportes de actividad citotóxica contra leucemia de furano diterpenos como conizaleucólida (**37**), lo que hace a esta molécula un objetivo interesante desde el punto de vista sintético, ya que se podría hacer transformaciones químicas sobre la misma con el objetivo de establecer una relación de estructura-actividad y así poder aumentar su citotoxicidad en esta línea cancerosa.

La leucemia es un grupo de enfermedades de la médula ósea (Cáncer hematológico) que implican un aumento incontrolado de glóbulos blancos (leucocitos). La leucemia es el cáncer más frecuente en la infancia, con 3-4 casos por cada 100,000 niños menores de 15 años. En México existen alrededor de 80 mil personas con este padecimiento.⁷⁷

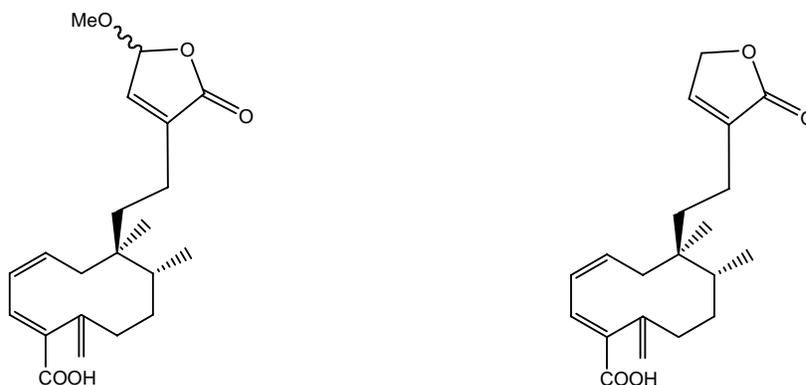
Los productos naturales han resultado ser una fuente importante de agentes citotóxicos contra esta enfermedad, siendo reportados al año numerosas aplicaciones que abarcan los diferentes tipos de leucemia. De esta forma, se han aislado recientemente un gran número de diterpenos con variados arreglos estructurales,⁷⁸⁻⁸¹ siendo estos, un grupo de compuestos con gran futuro en el desarrollo de un tratamiento más adecuado para la leucemia.

Otra de las moléculas que resultó ser activa en el rastreo primario de citotoxicidad fue el diterpeno ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estricico (**39**),⁵⁹ alcanzando un valor de 100 % de inhibición y un valor de IC₅₀ de 35.82 ± 0.80 µg/mL en la línea cancerosa de pulmón (SKLU-1). En la línea cancerosa de sistema nervioso central, este compuesto alcanzó un porcentaje de inhibición del 84.08 % pero su IC₅₀ fue mucho menor, con 15.05 ± 2.2 µg/mL. El patrón anterior también se observó para las líneas cancerosas de leucemia (K562) y de colon (HCT-15) (Tabla 3).

Al comparar los valores obtenidos anteriormente para el ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estricico (**39**)⁵⁹ con el ácido 15-desoxipúlico (**40**),^{63a-b} de estructura similar; se observa que este último sufrió un descenso considerable de actividad en el

rastreo citotóxico primario (Tabla 2), lo que es atribuible a la ausencia del grupo metoxilo en la estructura (**40**), única diferencia entre ambas moléculas.

Lo anterior, permitió establecer una relación de estructura-actividad entre ambas moléculas, concluyendo que la presencia del grupo metoxilo en el ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (**39**) contribuye en la actividad mostrada.



Ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (**39**)

Ácido 15-desoxipúlico (**40**)

Pulmon (SKLU-1) 100 % de inhibición

IC₅₀ 35.82 ± 0.80 µg/mL

61.27 % de inhibición

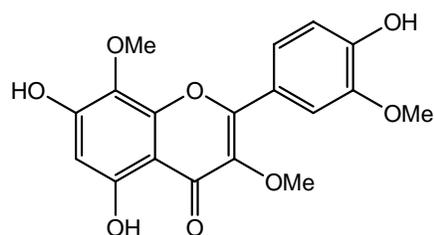
IC₅₀ No evaluado

Figura 4. Actividad biológica de las lactonas diterpénicas (**39**) y (**40**)

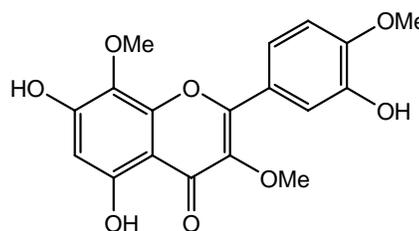
Los anteriores resultados, abren una puerta interesante hacia posibles modificaciones estructurales que permitan determinar que grupo presente en la molécula, como el lactónico o el anillo de 10 miembros, brindan la mayor contribución a los valores de actividad citotóxica (Tabla 2 y 3).

Otros compuestos interesantes en donde se logró observar una relación de estructura-actividad fue en las flavonas isoméricas 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (**41**)⁶⁸ y 5,7,3-trihidroxi-3.8.4'-trimetoxi-flavona (**42**).⁶⁹

Al comparar los resultados de la flavona (**41**) con la flavona isomérica (**42**), se observó que esta última presenta valores de porcentaje de inhibición similares para todas las líneas, excepto para la línea de pulmón, en donde la flavona (**42**) alcanzó un valor del 100 % de actividad inhibitoria y un IC₅₀ de 16.40 ± 1.3 µg/mL. Comparando los valores de actividad de la flavona (**42**) (100 % de inhibición, 16.40 ± 1.3 µg/mL) con el valor de 75.24 % e IC₅₀ de 26.95 ± 2.1 µg/mL de (**41**), se observa que existe una diferencia significativa entre los valores de IC₅₀ y que son atribuidos a la posición de los sustituyentes en el anillo B de la flavona.



(41)



(42)

Pulmón (SKLU-1) 75.54 % de inhibición
IC₅₀ 26.95 ± 2.1 µg/mL

100 % de inhibición
IC₅₀ 16.40 ± 1.3 µg/mL

Lo anterior, podría significar que la posición *para* del grupo metoxilo y *meta* de el hidroxilo en el anillo B de la flavona (**42**), es importante en la actividad citotóxica preeliminar mostrada en la línea cancerosa de pulmón (SKLU-1).

Esto es un resultado interesante, ya que posibles transformaciones sobre los grupos en los anillos A y C de la flavona puedan generar sistemas mas activos en esta línea celular.

Estos resultados son congruentes con las actividades citotóxicas *in vitro* mostradas por flavonoides como la apigenina, luteolina, genisteina y quercetina, entre otros. Los cuales han sido objeto de recientes estudios de estructura actividad, llegando a ser productos de importancia farmacológica.⁸²

Rastreo primario de actividad antiinflamatoria

El extracto hexánico, el acetónico y los compuestos **(36)**, **(1a)**, **(37-40)** fueron sometidos a un rastreo primario de actividad antitinflamatoria utilizando el modelo de edema inducido por TPA,⁴⁰ encontrando valores no muy altos (Tabla 4). El ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico **(38)** fue el compuesto con mayor porcentaje de inhibición alcanzando un valor de 67.24 %.

Actividad antibacteriana

Fue determinada la actividad antibacteriana cualitativa de los derivados de ácido quínico **(30a)**, **(30b)** y **(30c)** aislados del extracto metanólico, sobre la bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae* y las bacterias Gram-Positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, empleando el método de difusión de Agar o de Kirby-Baüer⁴¹ (Tabla 5).

En este, se encontró que los derivados de ácido quínico presentan actividad solo en bacterias Gram-positivas y no en Gram-negativas, siendo consistente con lo reportado para este tipo de compuestos.⁸³ Fue cuantificada la actividad antibacteriana del ácido clorogénico **(30a)**, encontrando valores bajos de actividad (Tabla 6).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, la cual vive en las membranas nasales, en las mucosas y la piel. Esta puede causar forunculosis, celulitis, neumonía, supuración de heridas e intoxicación alimentaría.

S. epidermidis suele hallarse por abscesos ocasionados por cortes pequeños y otras heridas de la piel. Suelen causar infecciones de acceso vascular y en el tracto urinario femenino.⁸⁴

Es interesante determinar que moléculas como los derivados de ácido quínico confieren propiedades antibacterianas al género *Laennecia* y *Conyza*, lo que concuerda con la utilización en medicina tradicional Mexicana de emplastes de

este tipo de plantas, en diferentes padecimientos cutáneos y en heridas superficiales, entre otras.¹

Bioensayo con hongos

Los extractos hexánico, acetónico y metanólico, al igual que los compuestos **(30a)**, **(30b)** y **(30c)** fueron evaluados frente a diferentes hongos fitopatógenos (*Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Rhizoctonia solanii*, *Trichopyton mentagrophytes*), resultando ser inactivos.

CONCLUSIONES

Laennecia schiedeana es la segunda especie estudiada fitoquímicamente del género *Laennecia* y la primera estudiada en México.

En el presente trabajo se lograron aislar e identificar de la parte aérea 14 compuestos, los cuales ya han sido reportados previamente en la literatura.

Cabe destacar que todos los metabolitos aislados a excepción del ácido centipédico (**1a**), se reportan por primera vez en el género *Laennecia*.

La lactona diterpénica conizaleucólida A (**37**) presentó una actividad citotóxica considerable en la línea cancerosa K562 (leucemia) con 84.77 % de actividad inhibitoria preliminar y un valor de IC₅₀ de 21.53 ± 4.1, siendo este el primer reporte de este tipo de estructura con actividad citotóxica en esta línea celular.

Se pudo establecer una relación de estructura-actividad entre los diterpenos (**39**) y (**40**), observando que la ausencia del grupo metoxilo en la posición 15, afecta notablemente la actividad citotóxica preliminar del compuesto (**40**) con respecto a la de (**39**), siendo esto mas notorio en la línea cancerosa de pulmón (SKLU-1).

Se aísla por primera vez de un recurso vegetal (*L. schiedeana*) la flavona (**42**), la cual solo había sido reportada como un producto sintético.

También se logró establecer una relación de estructura-actividad entre las flavonas isoméricas (**41**) y (**42**), determinando que la posición *para* del grupo metoxilo y *meta* del hidroxilo en el anillo B de la flavona, es importante en la actividad citotóxica mostrada por la flavona (**42**).

Los derivados de ácido quínico (**30a-b**) mostraron tener actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*), siendo más activo el ácido clorogénico (**30a**) (Tabla 6) y en congruencia con los usos dados a especies de este género o cercanos como *Conyza* (simonillo), en el tratamiento de diferentes padecimientos cutáneos en medicina tradicional Mexicana.

Los compuestos aislados en *Laennecia schiedeana* guardan similitud estructural con los reportados en el género *Conyza* y la única especie estudiada de *Laennecia*, además de otros géneros de la subtribu Astereae como *Grangea*, *Centipeda* y *Pulicaria*, encontrando cercano parentesco entre las mismas.

BIBLIOGRAFIA

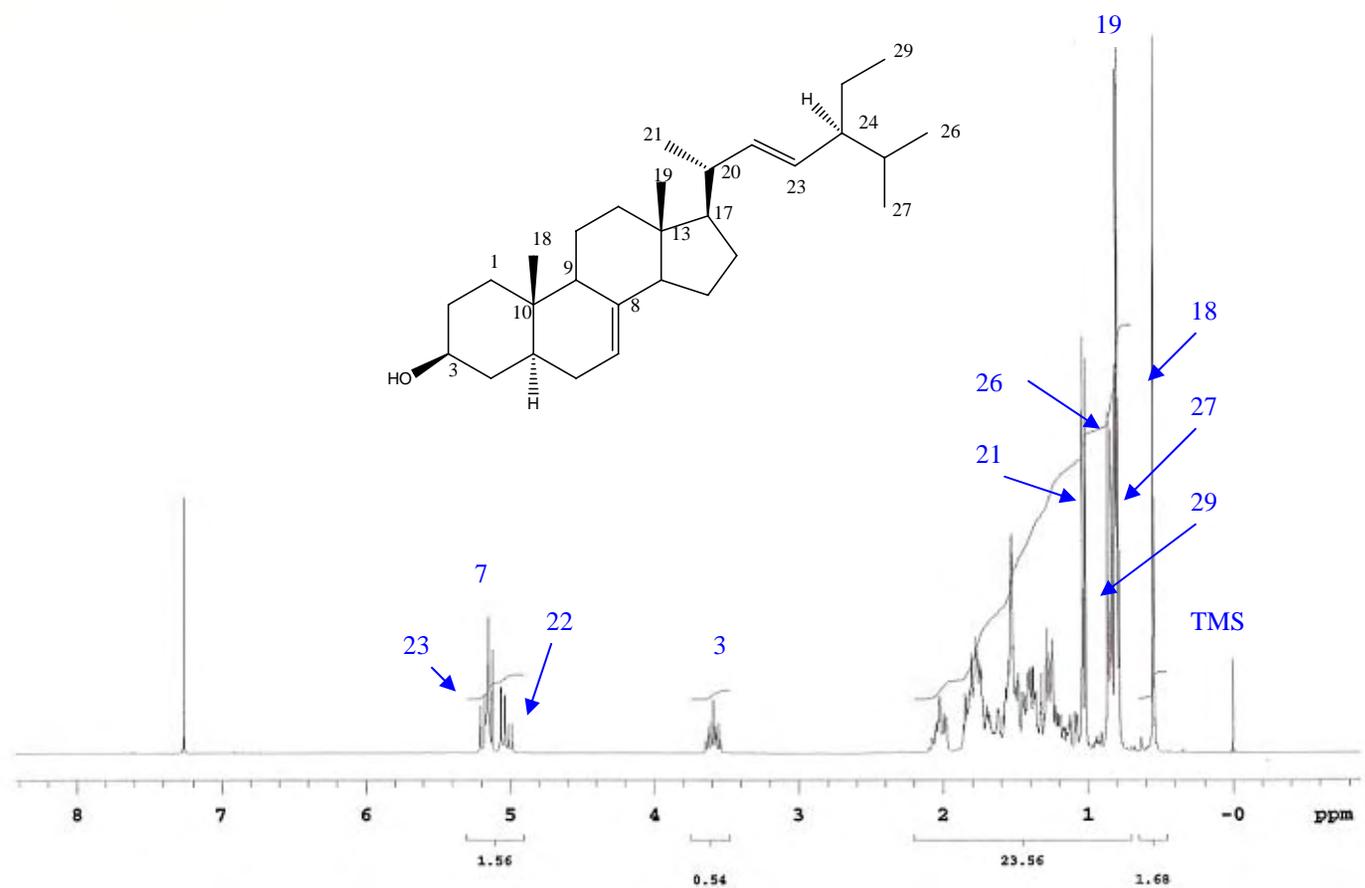
1. Martínez, M. *Plantas Medicinales de México*. 4 ed. Ediciones Botas. México. **1959**.
2. Cuevas, B. *Las Plantas Medicinales de Yucatán*. Mérida, **1913**.
3. Heinrich, M.; Robles, M.; West, J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, 38, 539-565.
4. Nesom, G. L. *Phytologia*. **1990**, 68, 205-228.
5. Tonn, C. A.; Simirgiotis, M.; Favier, L. *Phytochemistry*. **2000**, 55, 721-726.
6. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. An overture to the *Compositae*. The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI. Academic Press, **1977**, 2-20.
7. Villaseñor, J. L. La familia Asteraceae en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **1993**, Vol. Esp. (XLIV), 117-124.
8. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. The chemistry of the *Compositae*. The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI. Academic Press, **1977**, 283-335.
9. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. Sesquiterpene lactones in the *Compositae*. The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI. Academic Press, **1977**, 337-357.
10. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. Astereae-Systematic review. The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI. Academic Press, **1977**, 540-565.
11. Noyes, R. D.; Rieseberg, L. H. *Amer. J. Bot.* **1999**, 86, 398-412.
12. Nesom, G. L. *Phytologia*. **1994**, 76, 193-274.
13. Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. Astereae-Chemical review. The Biology and Chemistry of the *Compositae* VI. Academic Press, **1977**, 567-576.
14. Zardini, E. M. *Darwiniana*. **1981**, 23, 159-169.
15. Bohlmann, F.; Mungai, G. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 2247-2252.
16. Jolad, S. D.; Timmermann, B.; Hoffmann, J.; Bates, R.; Camou, F. *Phytochemistry*. **1988**, 27, 1211-1212.
17. Bohlmann, F.; Wegner, P. *Phytochemistry*. **1982**, 21, 1693-1695.

18. Mungai, G. M.; Zdero, C.; Bohlmann, F. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 575-581
19. Mungai, G. M.; Zdero, C.; Bohlmann, F. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 3167-3172.
20. Pandey, U.; Singhal, A.; Watanabe, K.; Kulanthaivel, P. *Phytochemistry*. **1984**, 23, 391-397.
21. Bohlmann, F.; Grenz, M. *Phytochemistry*. **1972**, 105, 3123-3125.
22. Torrenegra, R.; Robles, J.; Waibel, R. *Phytochemistry*. **1994**, 35, 195-199.
23. Ahmed, A. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 611-612.
24. Urzua, A.; Mendoza, L. *Phytochemistry*. **1995**, 39, 1489-1491.
25. Bohlmann, F.; Jakupovic J. *Phytochemistry*. **1979**, 18, 1367-1370.
26. Yanfang, S.; Jiansheng, L.; De'an, G.; Jing, L.; Hongzhu, G.; Junhua, Z. *Zhongcaoyao*. **2001**, 32, 496-497.
27. Calzada, F.; Cedillo-Rivera, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 671-673.
28. Fusco, M.; De Ruiz, R.; Ruiz, S. O. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **1999**, 18, 295-298.
29. Nabil, H. E.; El-Khrisy, E.; Khadiga, M. A.; Mabry, T. *Revista Latinoamericana de Quimica*. **1991**, 22, 89-90.
30. Tandon, S.; Rastogi, R. P. *Phytochemistry*. **1977**, 16, 1455-6.
31. Laurin, P.; Klich, M.; Dupis-Hamelin, C.; Mauvais, P.; Lassaigue, P.; Bonnefoy, A.; Musicki, B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2079.
32. Pillai, S. P.; Menon, S.R.; Mitscher, L.A.; Pillai, C. A.; Shankel, D. A. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 1358.
33. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Ogawa, K.; Sugiura, M.; Yano, M.; Yoshizawa, Y. *Anticancer Res.* **2001**, 21, 917.
34. Kirkiacharian, S.; Tuy, D. T.; Sicsic, S.; Bakchinian, R.; Kurkjian, R.; Tonnaire, T. *Farmaco*. **2002**, 57, 703.
35. Metwally, M. A. *Boll. Chim. Farm.* **1996**, 135, 223-224.
36. Su, Y.; Koike, K.; Nikaido, T.; Liu, J.; Zheng, J.; Guo, D. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1593-1599.
37. Yang, C.; He, Z.; Li, X.; Zheng, Q.; He, C.; Yang, J.; Morita, T. *Phytochemistry*, **1989**, 28, 3131-3134.
38. Mukhtar, N.; Iqbal, K.; Malik, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, 50, 1558-1560.

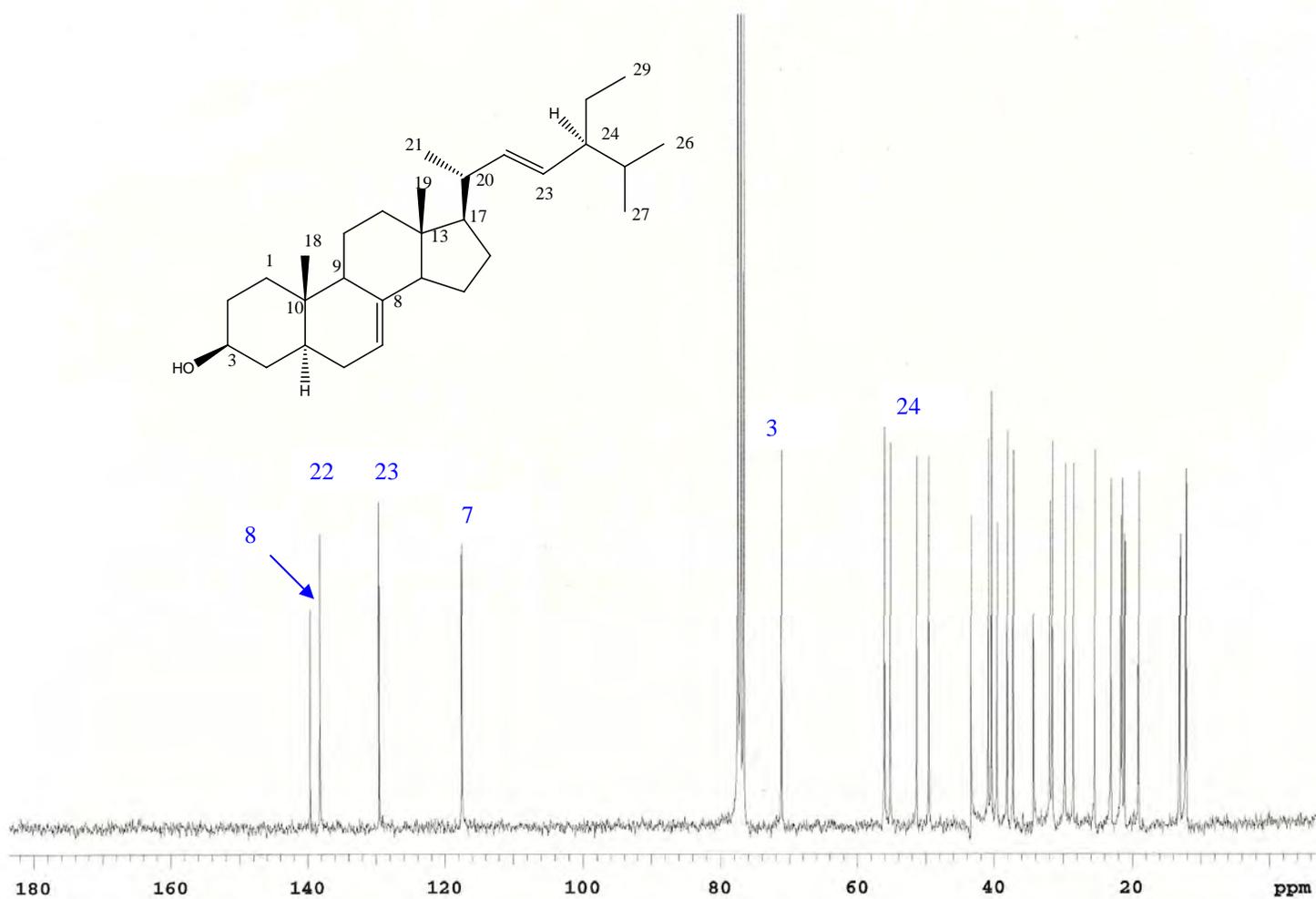
39. Cifuentes, D.; Simirgiotis, M.; Favier, S.; Rotelli, A.; Pelzer, L. *Phytoter. Res.* **2001**, 15, 529-531.
40. Oviedo Chavez I. Obtención de agentes antiinflamatorios y citotóxicos a partir de modificaciones químicas a los ácidos Masticadeiónico y 3-Epimasticadienónico. Tesis Doctorado. Instituto de Química. UNAM. México D.F. **2006**.
41. Hernández Delgado C. Z. Etnobotánica y actividad antimicrobiana de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Zapotitlan de las Salinas, Puebla. Tesis Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México, D.F. **2004**.
42. Gonzalez, A. G.; Bermejo, J.; Mediavilla, M.; Toledo, F. J. *Rev. latinoamer. Quim.* **1984**, 15, 107-110.
43. Akihisa, T.; Thakur, S.; Rosenstein, F. *Lipids.* **1986**, 21, 39-47.
44. Itho, T.; Kikuchi, Y.; Tamura, T.; Matsumoto, T. *Phytochemistry.* **1981**, 20, 761-4.
45. Sucrow, W.; Slopianka, M.; Kircher, H. *Phytochemistry.* **1976**, 15, 1533-35.
46. Rubinstein, I.; Goad, J.; Clague, A.; Mulheirn, L. *Phytochemistry.* **1976**, 15, 195-200.
47. Villaseñor, I.; Domingo, A. *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* **2000**, 20, 99-105.
48. Bergmann, W.; McTigue, F. *J. Org Chem.* **1948**, 13, 738-741.
49. Bergmann, W.; Feeney, R. *J. Org Chem.* **1950**, 15, 812-814.
50. Mata, R.; Rojas, A.; Acevedo, L. *Planta Médica.* **1997**, 63, 31-35.
51. Dominguez, X.; Quintero, G.; Butruille, D. *Phytochemistry.* **1972**, 11, 1855-6.
52. Liping, X.; Dean, G.; Jiansheng, Z. *Heterocycles.* **1998**, 23, 293-295.
53. Wei Dong, X.; Xue, G.; Zhong, J. *Archives of pharmaceutical Research.* **2007**, 30, 547-551.
54. Jeon, G.; Park, M.; Yoon, D.; Shin, C.; Sin, H.; Um, S. *Experimental and Molecular Medicine.* **2005**, 37, 111-120.
55. Seung, J.; Kang, K.; Min, C.; Kyu, M. *Planta Medica.* **2004**, 70, 736-739.

56. Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon, W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra, S.A. 1988, I-5 - I-265.
57. Bohlmann, F.; Mahanta, P. *Phytochemistry*. **1979**, 18, 1067-1068.
58. Singh, P.; Krishna, V.; Pareek, R. B. *J. Indian Chem. Soc.* **1998**, 75, 552-558.
59. Jakupovic, J.; Singh, P.; Jain, S. *Phytochemistry*. **1988**, 27, 1537-1539.
60. Bohlmann, F.; Fritz, U. *Phytochemistry*. **1978**, 17, 1769-1772.
61. Geis, W.; Buschauer, B.; Becker, H. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 643-649.
62. Liu, Q.; Yang, J.; Lu.; Zheng, Q.; Mao, L. *Chinese chemical letters*. **2005**, 16, 921-924.
63. **a)** Muhammad, I.; El-Feraly, F.; Mossa, J. *Phytochemistry*. **1992**, 31, 4245-4248. **b)** Sinhg, P.; Sharma, M.; Joshi, K.; Bohlmann, F. *Phytochemistry*. **1985**, 24, 190-192.
64. Inhuma, M.; Matsuura, S.; Kusuda, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, 28, 708-716.
65. Tanaka, T.; Inhuma, M.; Mizuno, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34, 1667-1671.
66. Markham, K.; Stanley, R.; Geiger, H.; Mabry, T.; *Tetrahedron*. **1978**, 34, 1389-1397.
67. Roitman. J.; James, L. *Phytochemistry*. **1985**, 24, 835-848.
68. Ghisalberti, E.; Jefferies, P.; Stacey, C. *Aust. J. Chem.* **1967**, 20, 1049-1053.
69. Horie, T. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **1969**, 42, 2701-2704.
70. Hughes, R. J.; Croley, T.R.; Metcalfe, C. D.; March, R. E. *Internacional Journal of Mass Spectrometric*. **2001**, 210-211, 371-385.
71. Makham, K. R.; Ternai, B. *Tetrahedron*, **1976**, 32, 2607-2612.
72. Bader, G.; Tuja, D.; Wray, V.; Hiller, K. *Planta medica*. **1993**, 59, 284-285.
73. Basnet, P.; Matsushige, K.; Hase, K.; Kadota, S.; Namba, T. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, 19, 1479-1484.
74. Timmermann, B.; Hoffmann, J.; Jolad, S.; Schram, K.; Klenck, R.; Bates, R. *J. Nat. Prod.* **1982**, 46, 365-367.
75. Hung, T.; Na, M.; Thuong, P.; Su, N.; Sok, D.; Song, K.; Seong, Y.; Bae, K. *Journal of Ethnopharmacology*. **2006**, 108, 188-192.

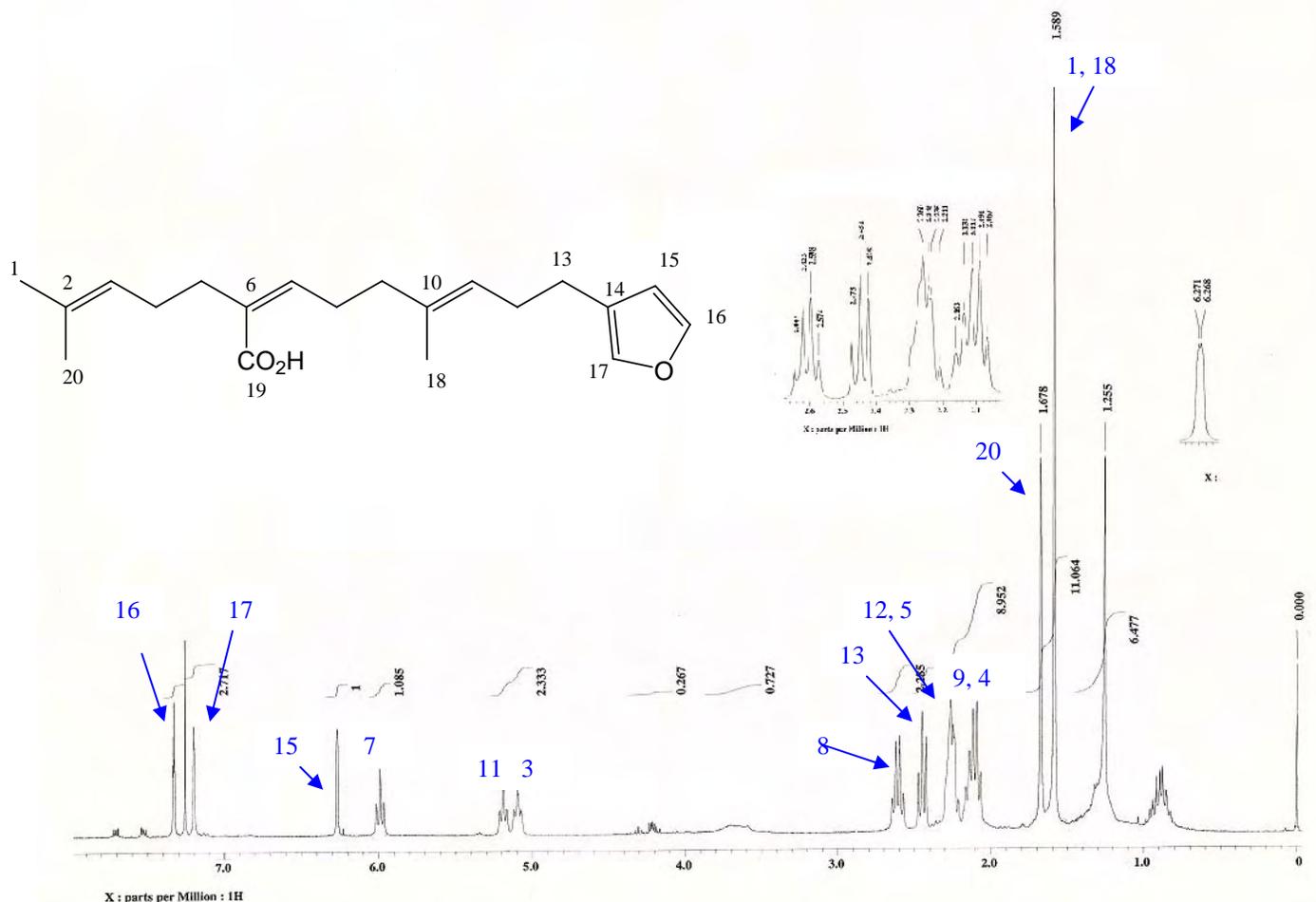
76. Haslam, E. Shiquimic acid. *Metabolism and Metabolites*. Ed. Jhon Wiley and Sons. Chichester, **1993**.
77. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/leukemiaadultacute.html>. **2008**
78. Yu, Z.; Liang, Y.; Xiao, H.; Shan, Y.; Dong, B.; Huang, R. *Int. J. Cancer*. **2007**, 121, 2084-2094.
79. Alonso, R. *Pharmaceutical chemistry Journal*. **2006**, 40, 476-479.
80. Xian, L.; Weillie, X.; Jianxin, P.; Lili, B.; Yunheng, S.; Zhiying, W; Shenghong, L.; Handong, S. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 1336-1340.
81. Freire, A.; Da Silva, P.; Aoyama, H.; Haun, M.; Duran, N.; Ferreira, C. *Planta Medica*. **2003**, 69, 67-69.
82. Boik, J. *Natural Compounds in Cancer Therapy*. 1st ed. Ed. Silvine Farnell. USA. **2001**.
83. Agnol, D.; Ferraz, A.; Bernardi, P.; Albring, D.; Nör, D. *Phytomedicine*. **2003**, 10, 511-516.
84. <http://dermnetnz.org/bacterial/pdf/staphyloccalskininfections-dermnetnz.pdf>. **2007**.



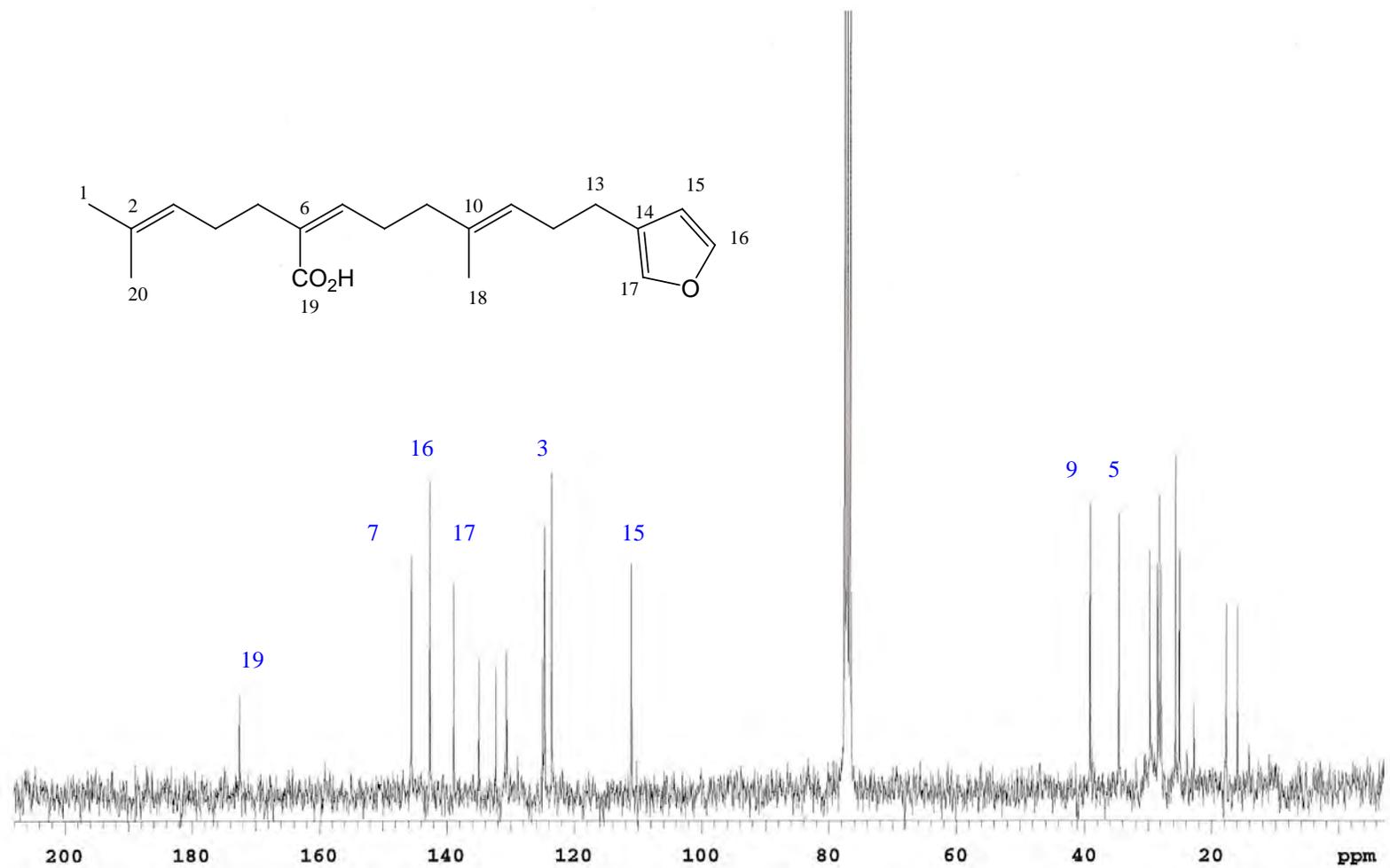
ESPECTRO 1. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de espinasterol (**36**)



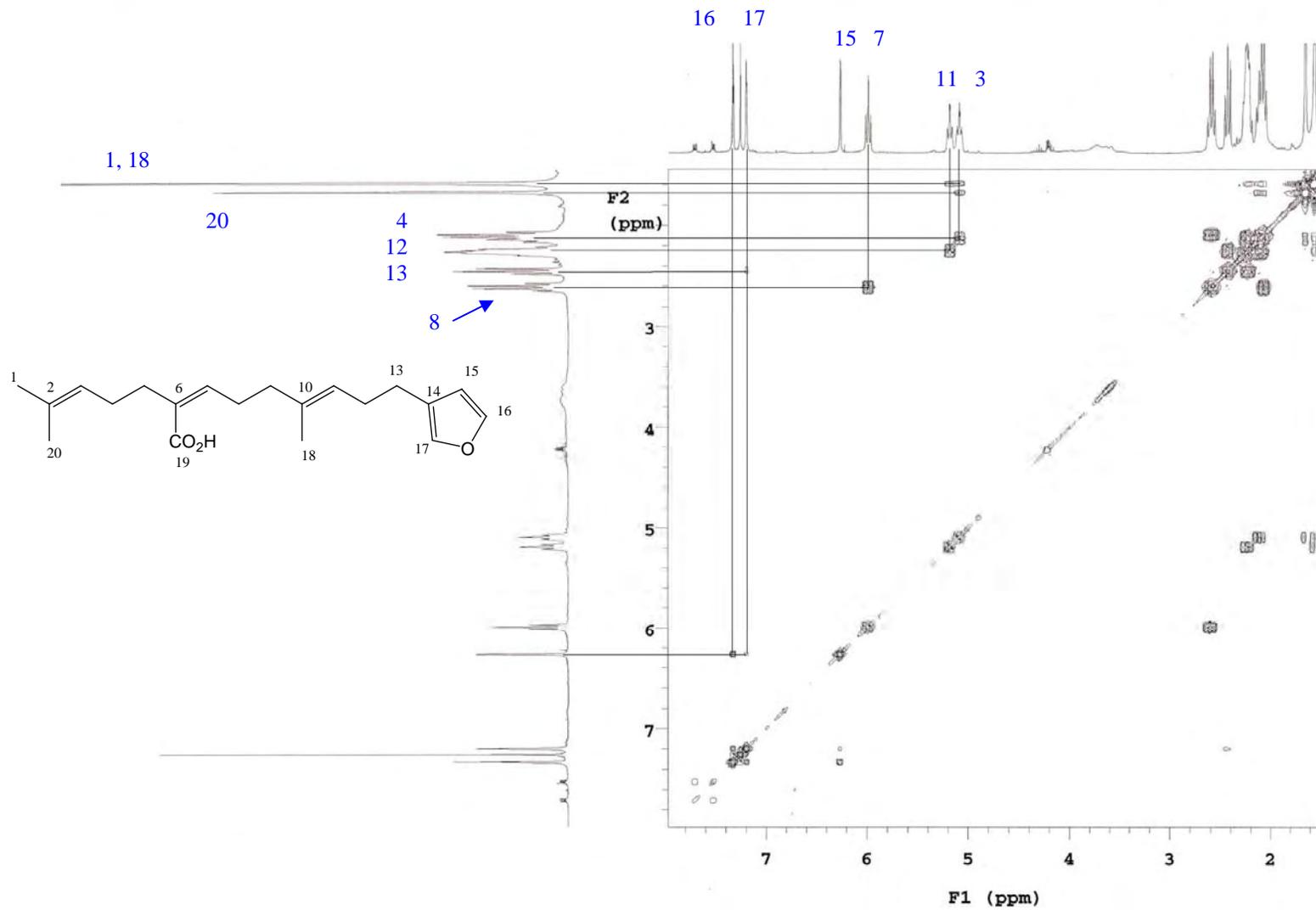
ESPECTRO 2. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de espirosterol (**36**)



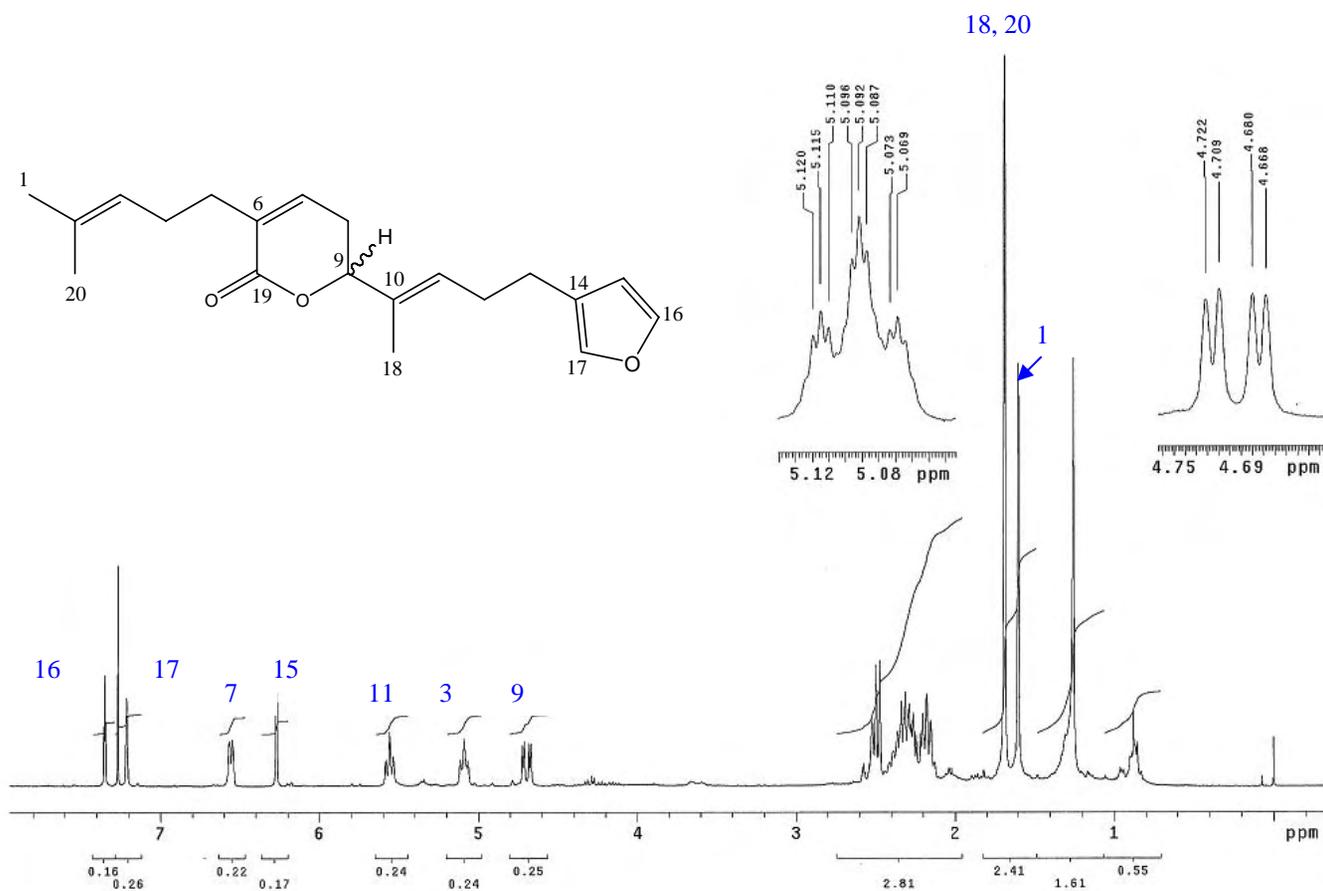
ESPECTRO 3. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido centipédico (1a)



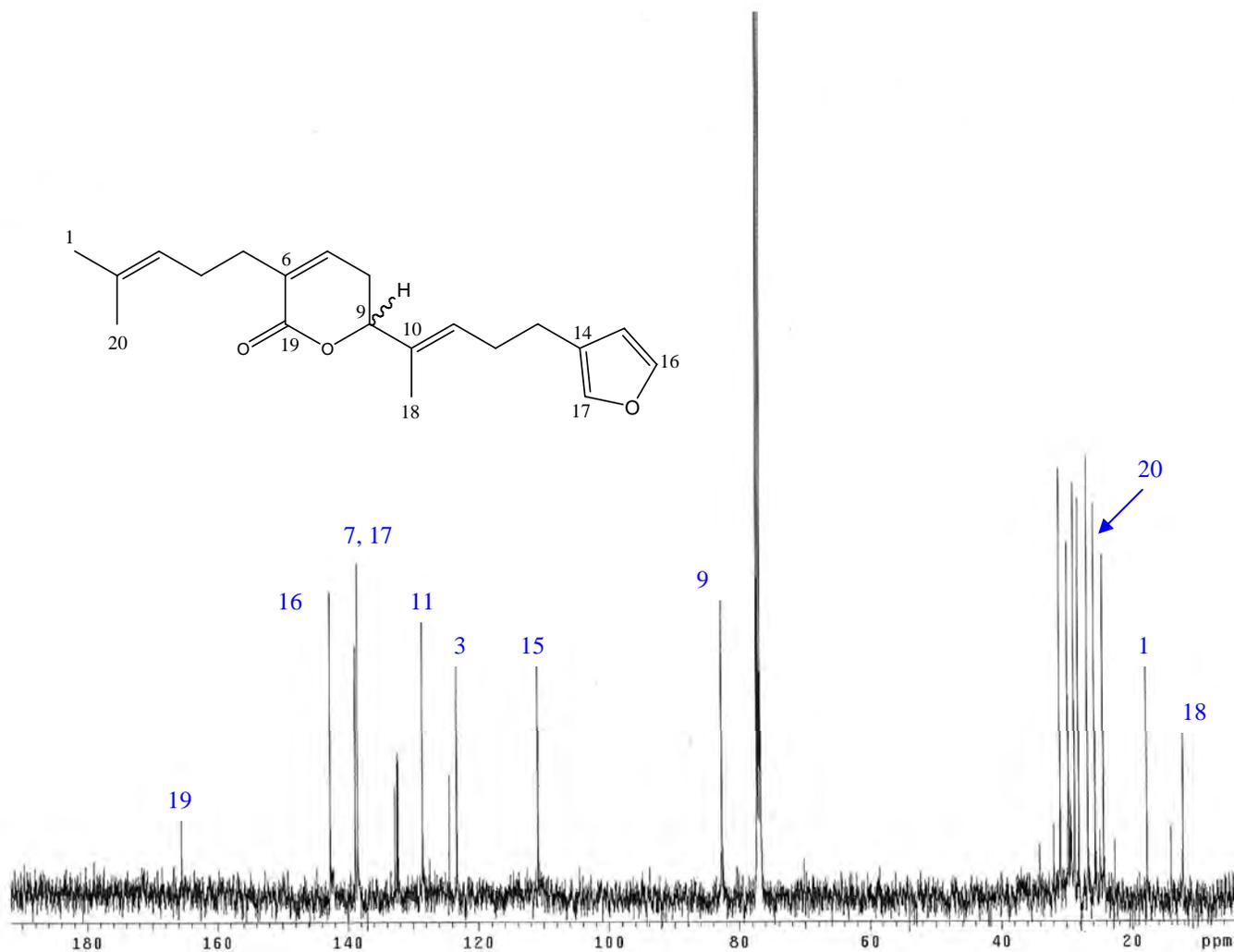
ESPECTRO 4. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del ácido centipédico (**1a**)



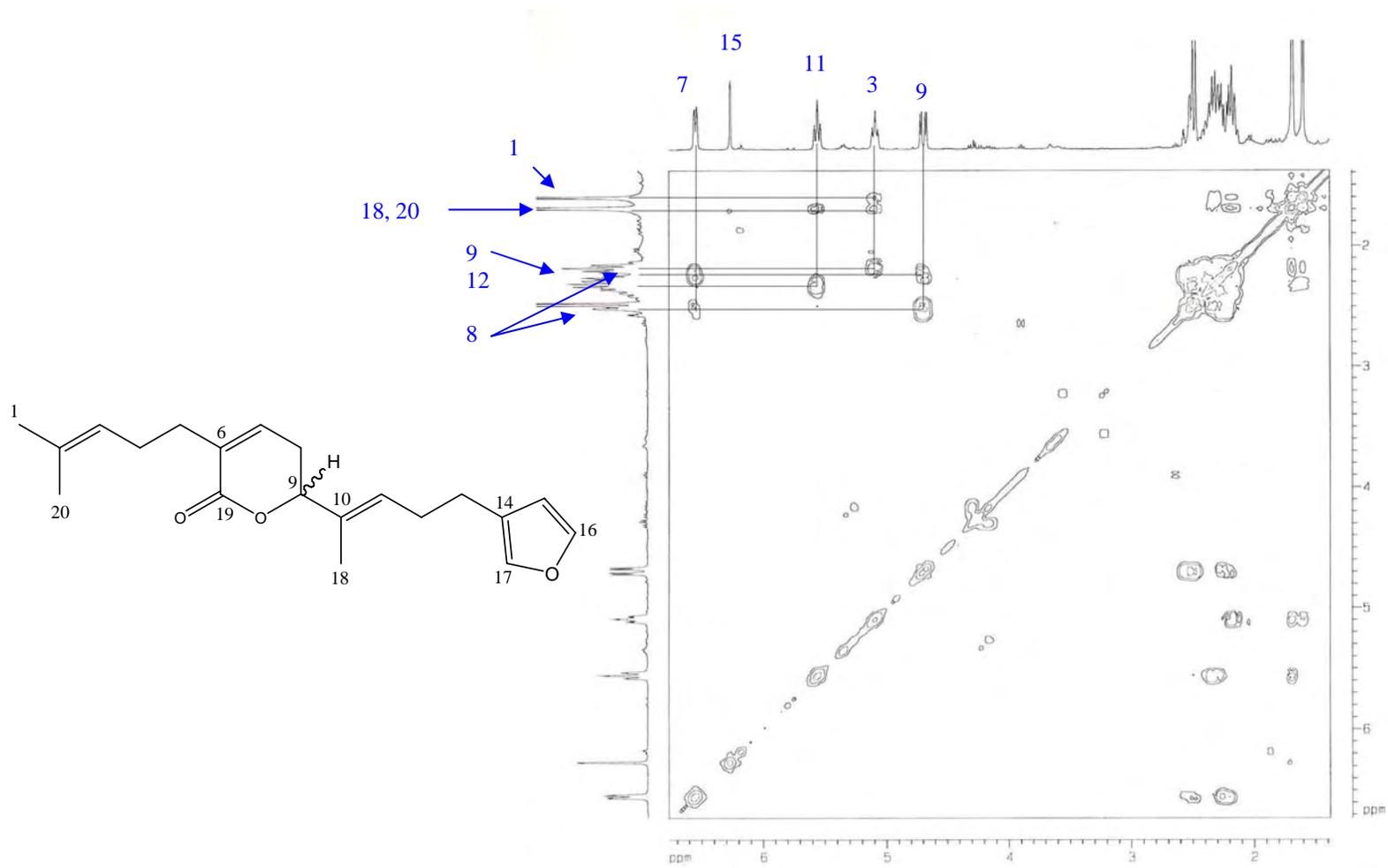
ESPECTRO 5. Experimento COSY del ácido centipédico (1a)



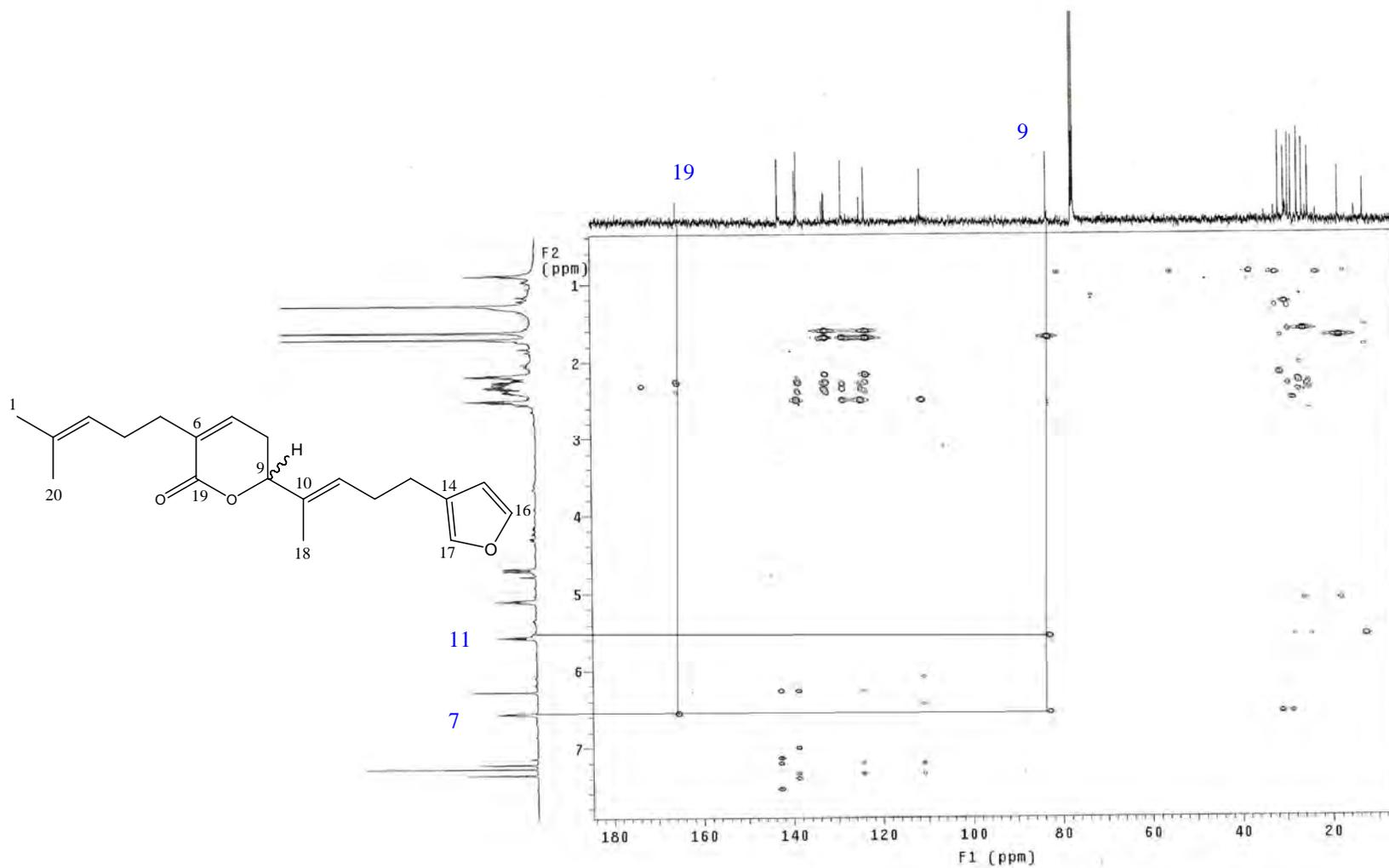
ESPECTRO 6. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) de conizaleucólida A (37)



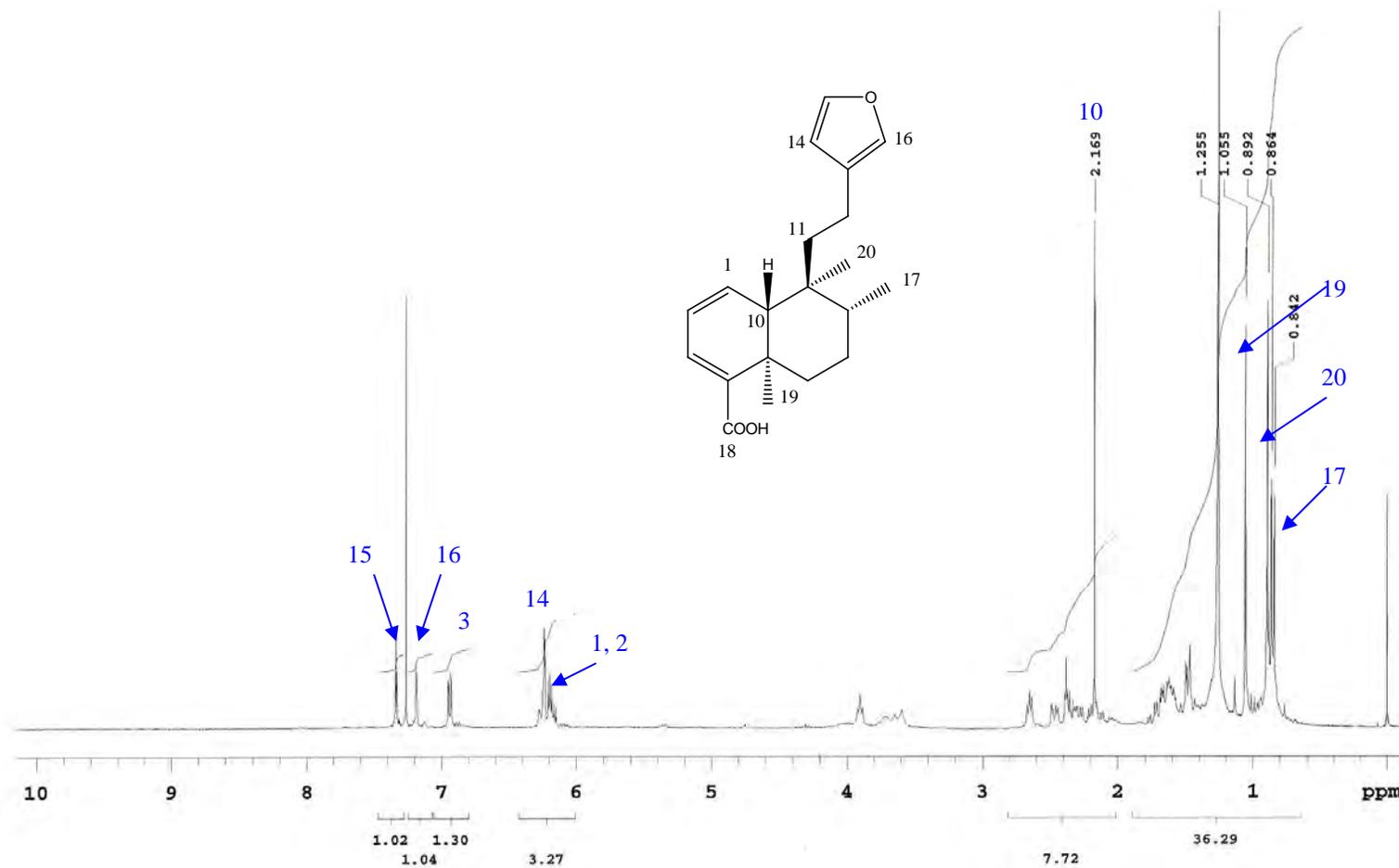
ESPECTRO 7. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de conizaleucólida A (37)



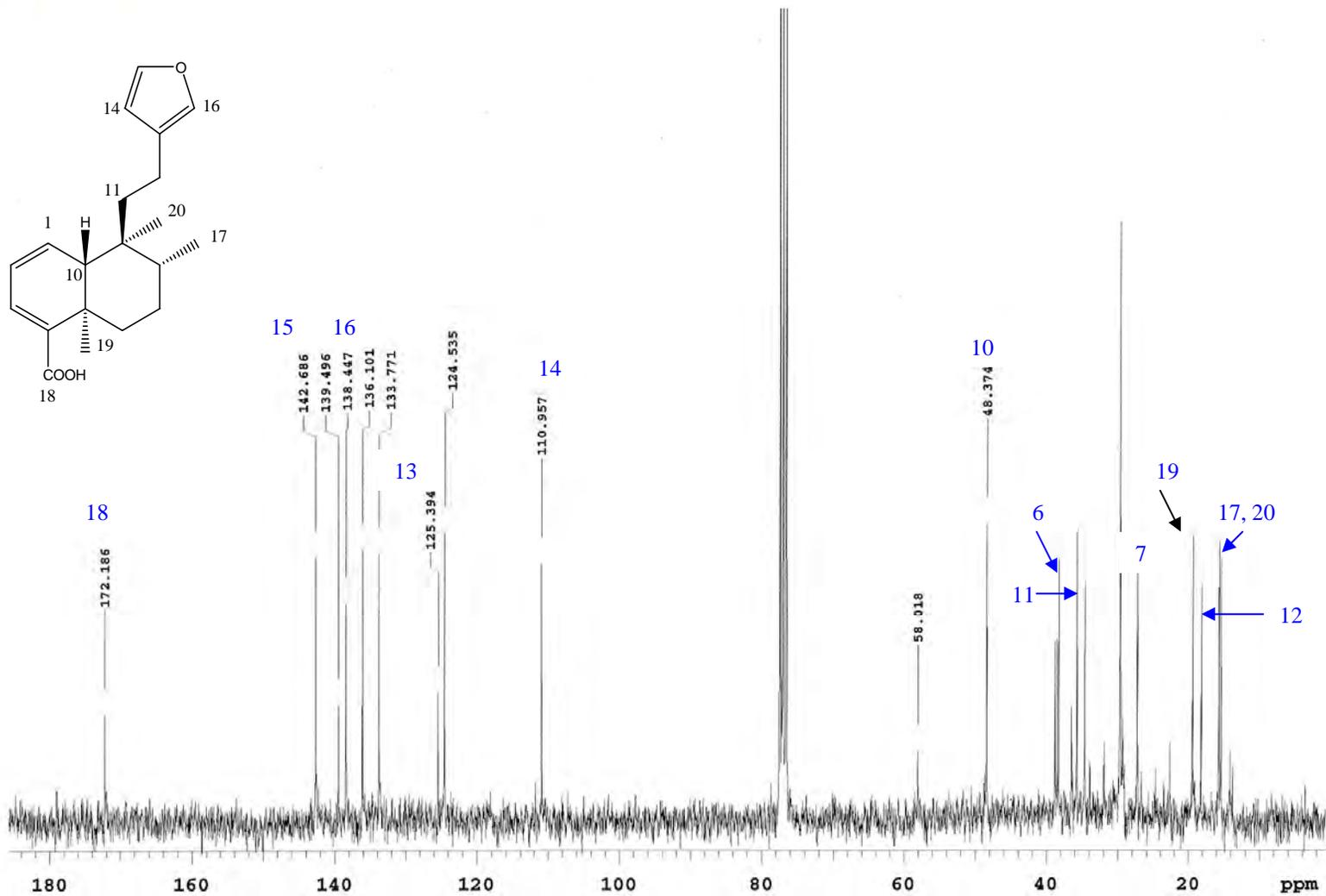
ESPECTRO 8. Experimento COSY de conizaleucólida A (**37**)



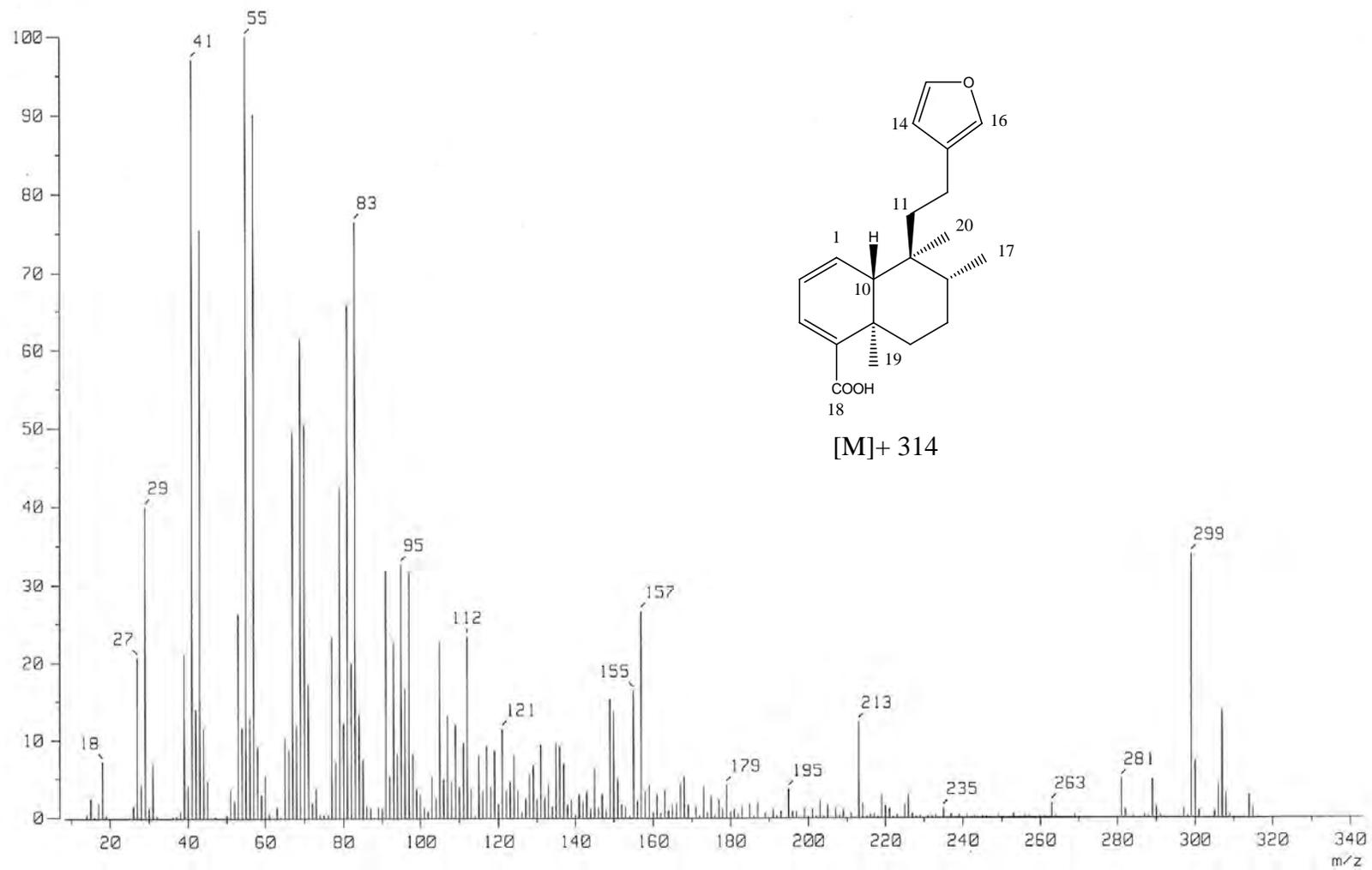
ESPECTRO 9. Experimento HMBC de conizaleucólida A (37)



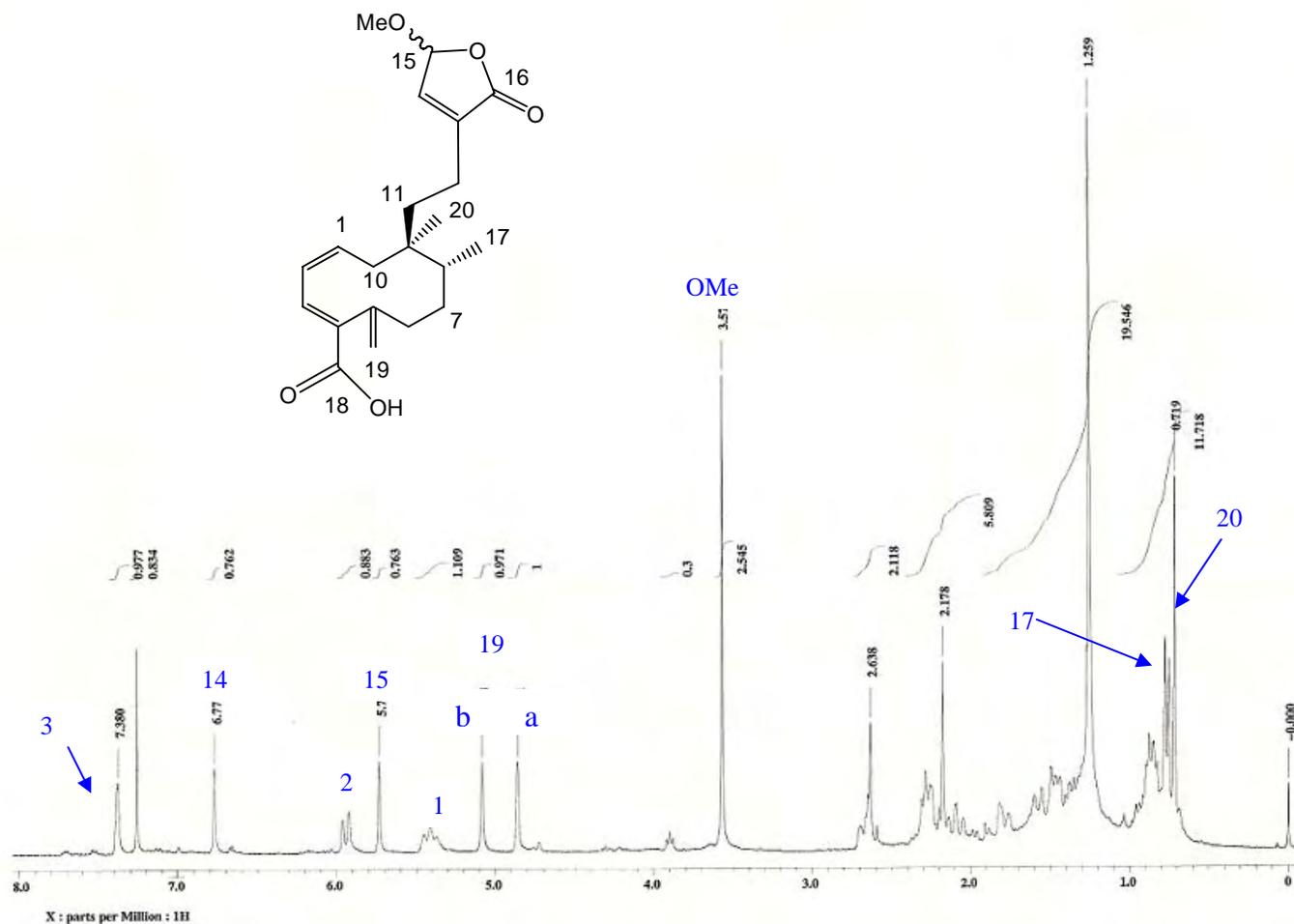
ESPECTRO 10. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)



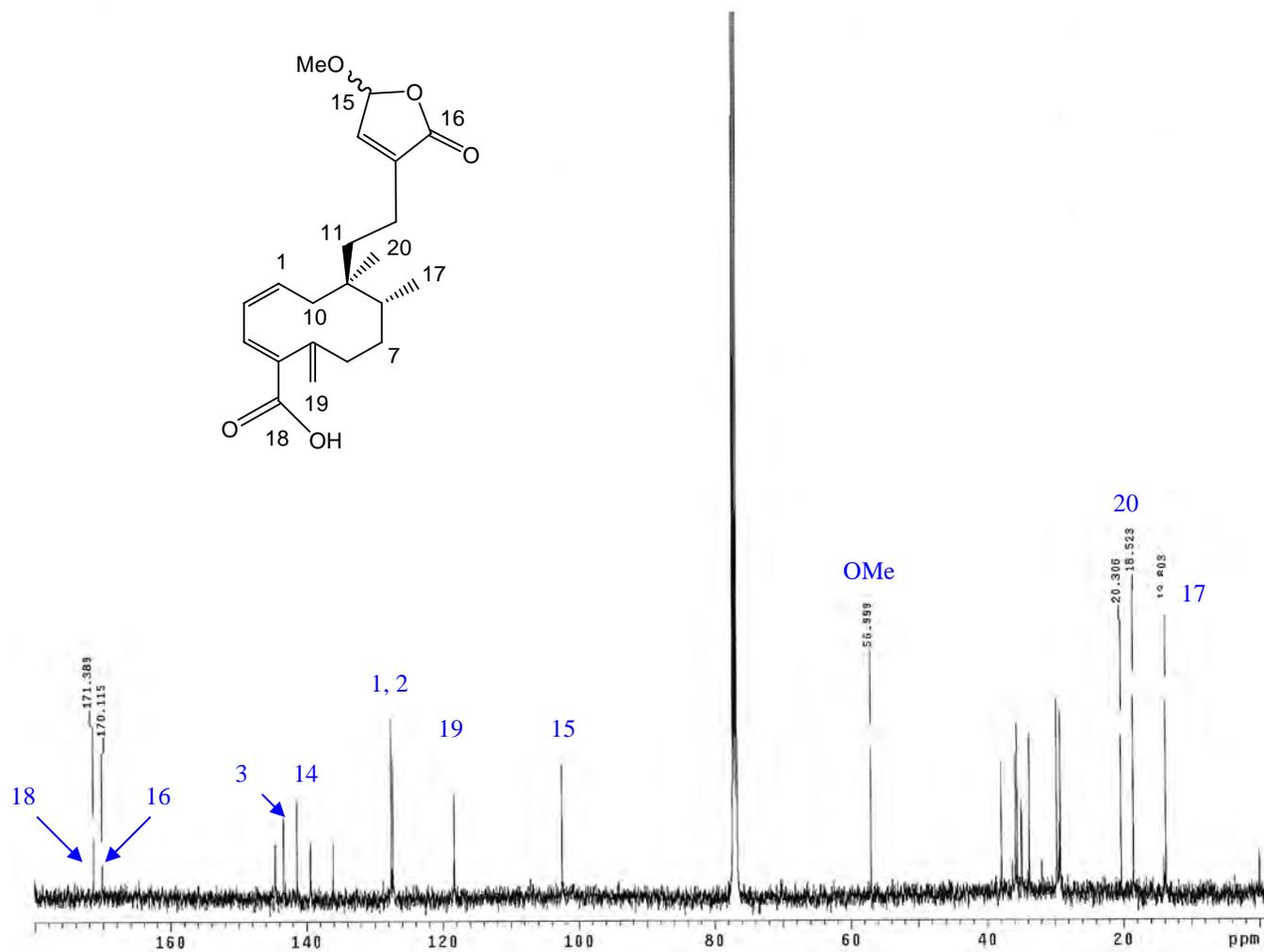
ESPECTRO 11. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)



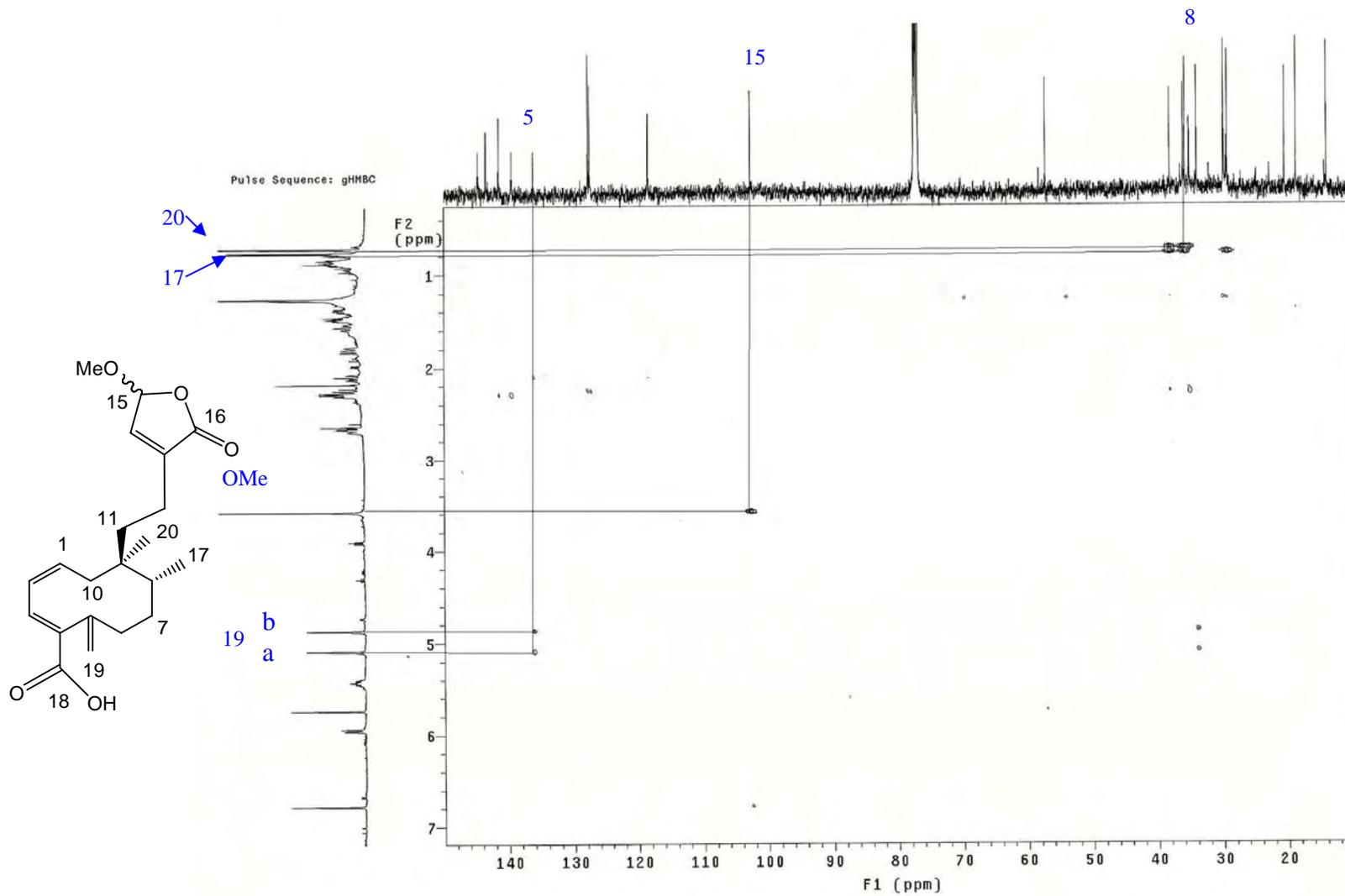
ESPECTRO 12. MASAS del ácido 5(S)-8(R)-9(R)-10(S)-nidoresédico (38)



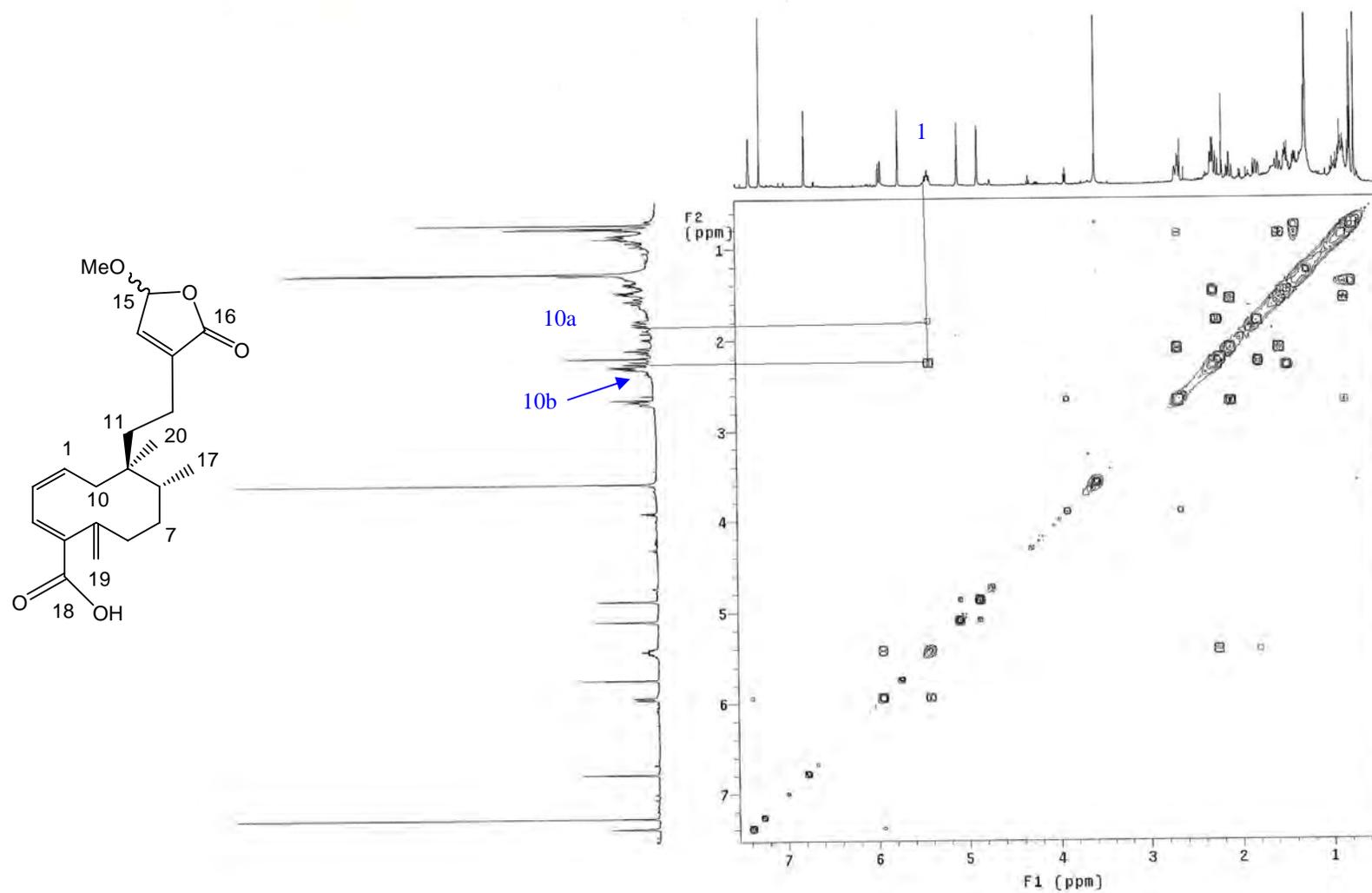
ESPECTRO 13. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



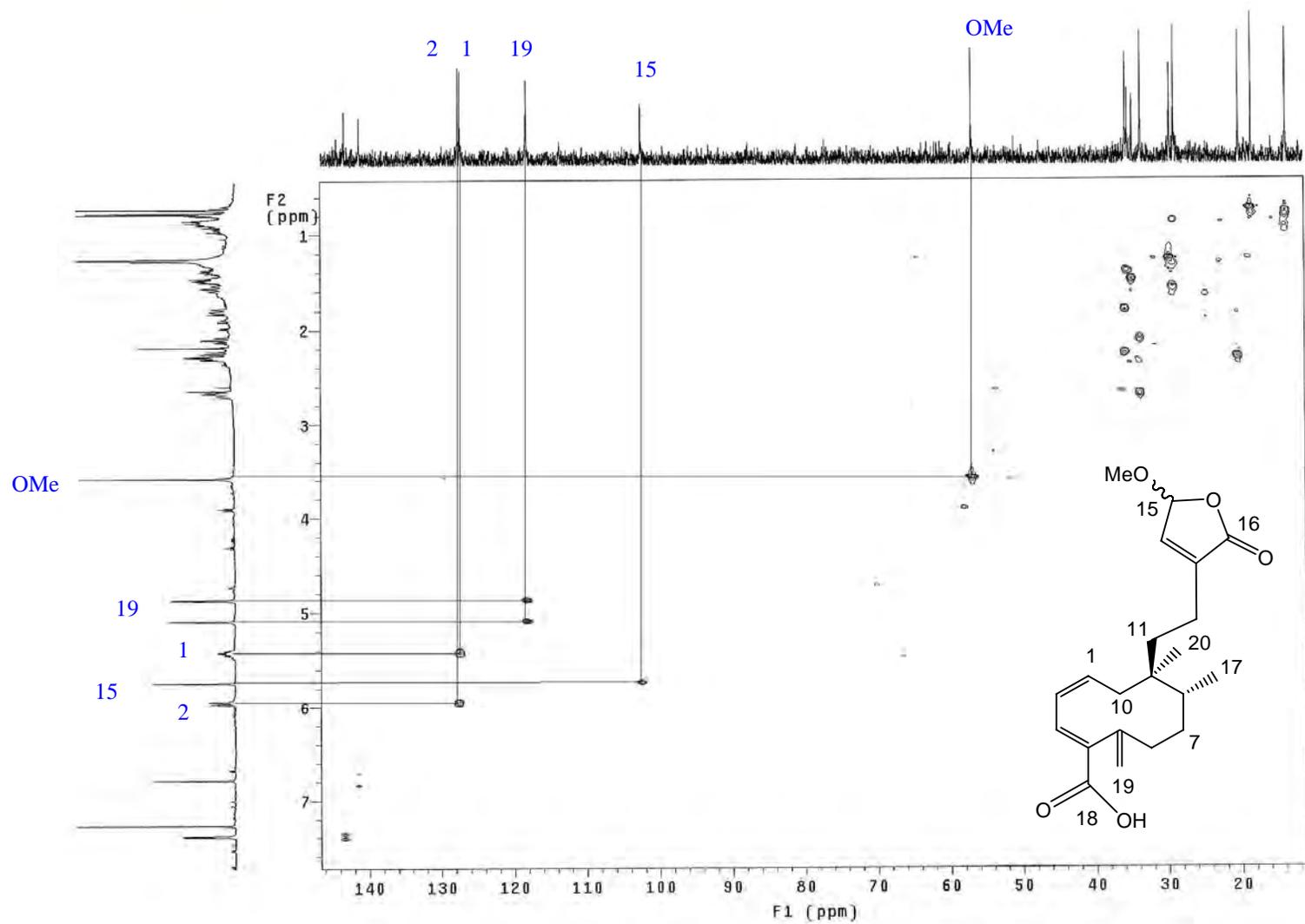
ESPECTRO 14. RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



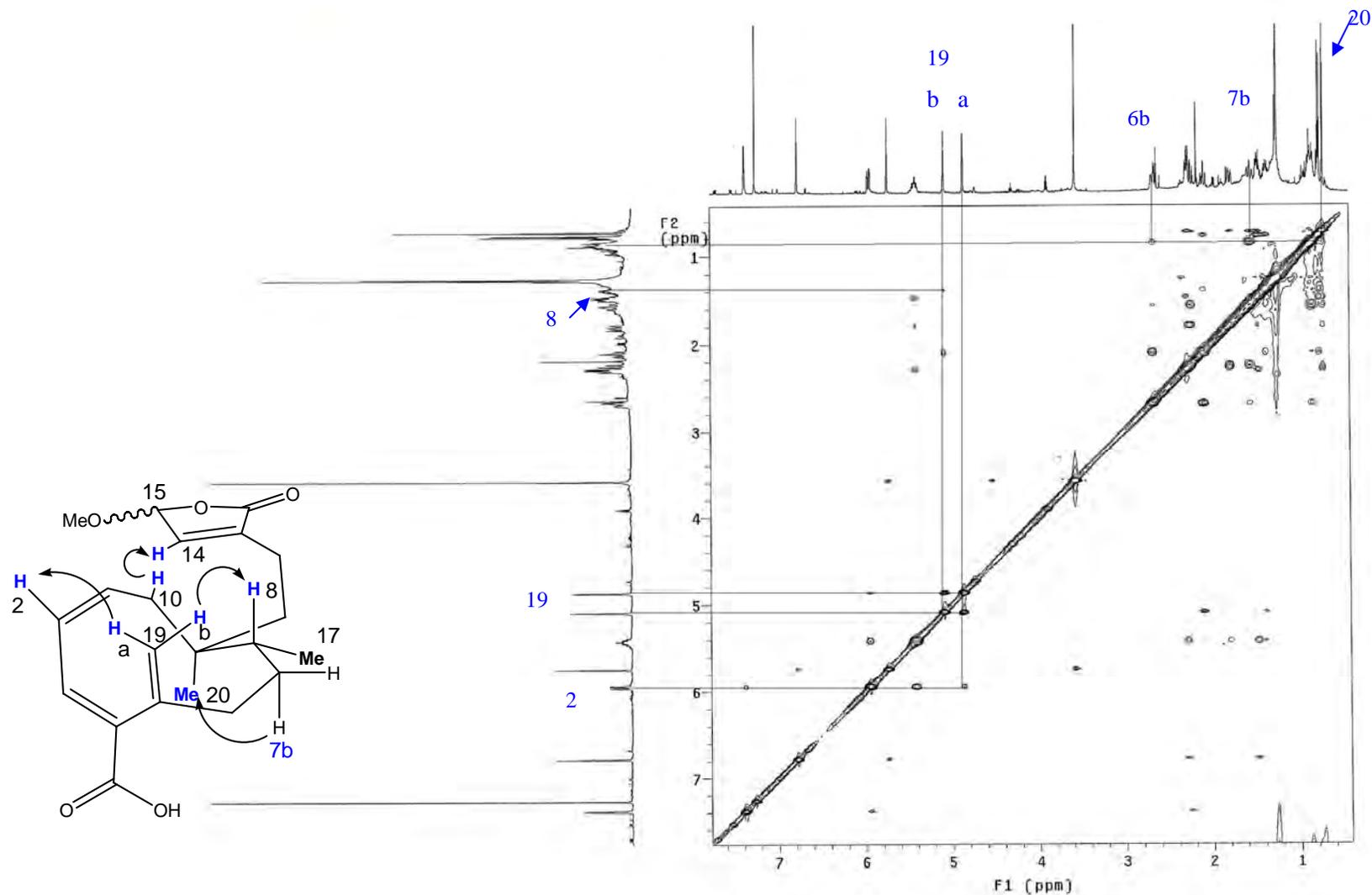
ESPECTRO 15. Experimento HMBC del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



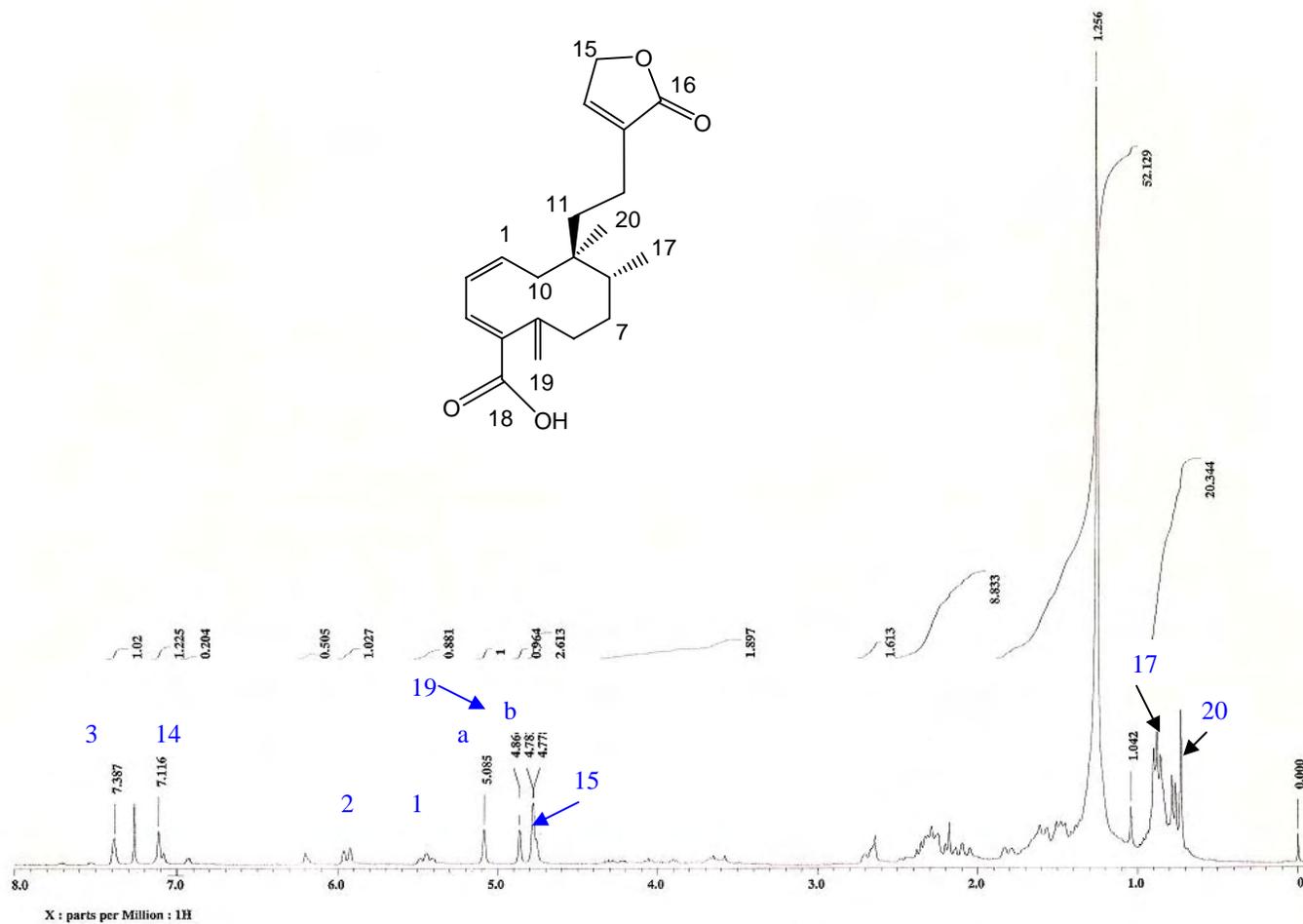
ESPECTRO 16. Experimento COSY del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



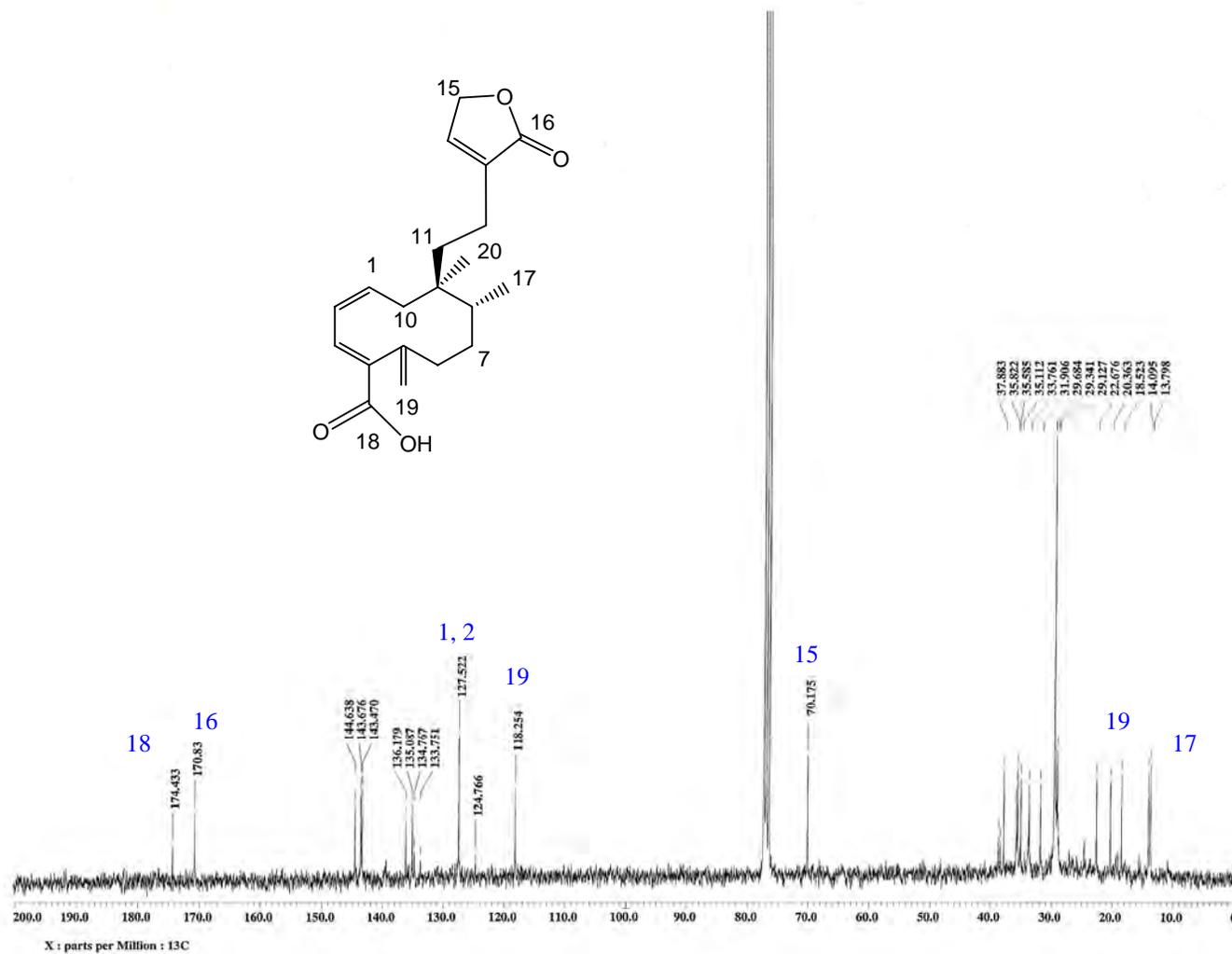
ESPECTRO 17. Experimento HSQC del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



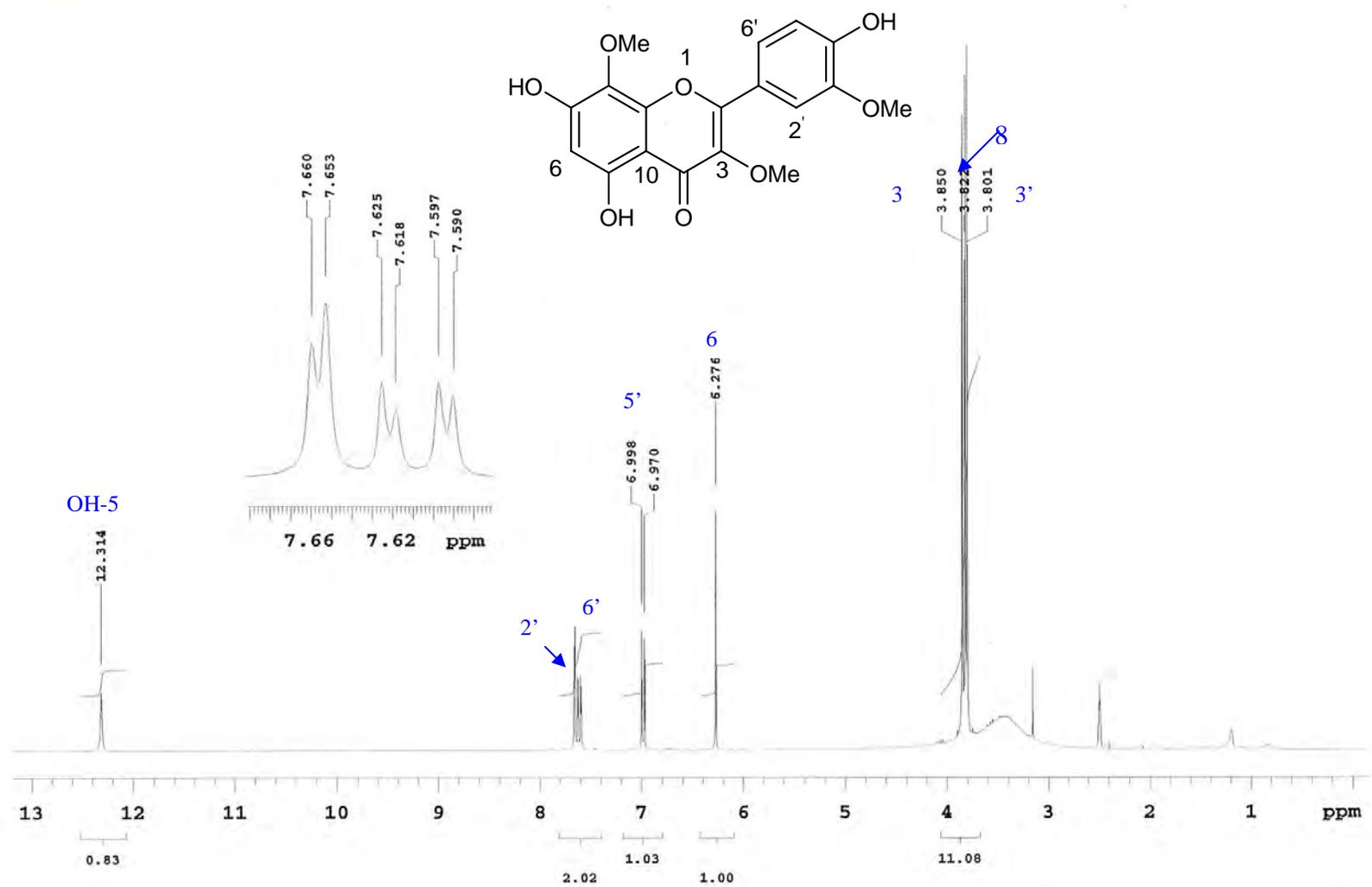
ESPECTRO 18. Experimento NOESY del ácido 15-metoxi-16-oxo-15,16*H*-estríctico (39)



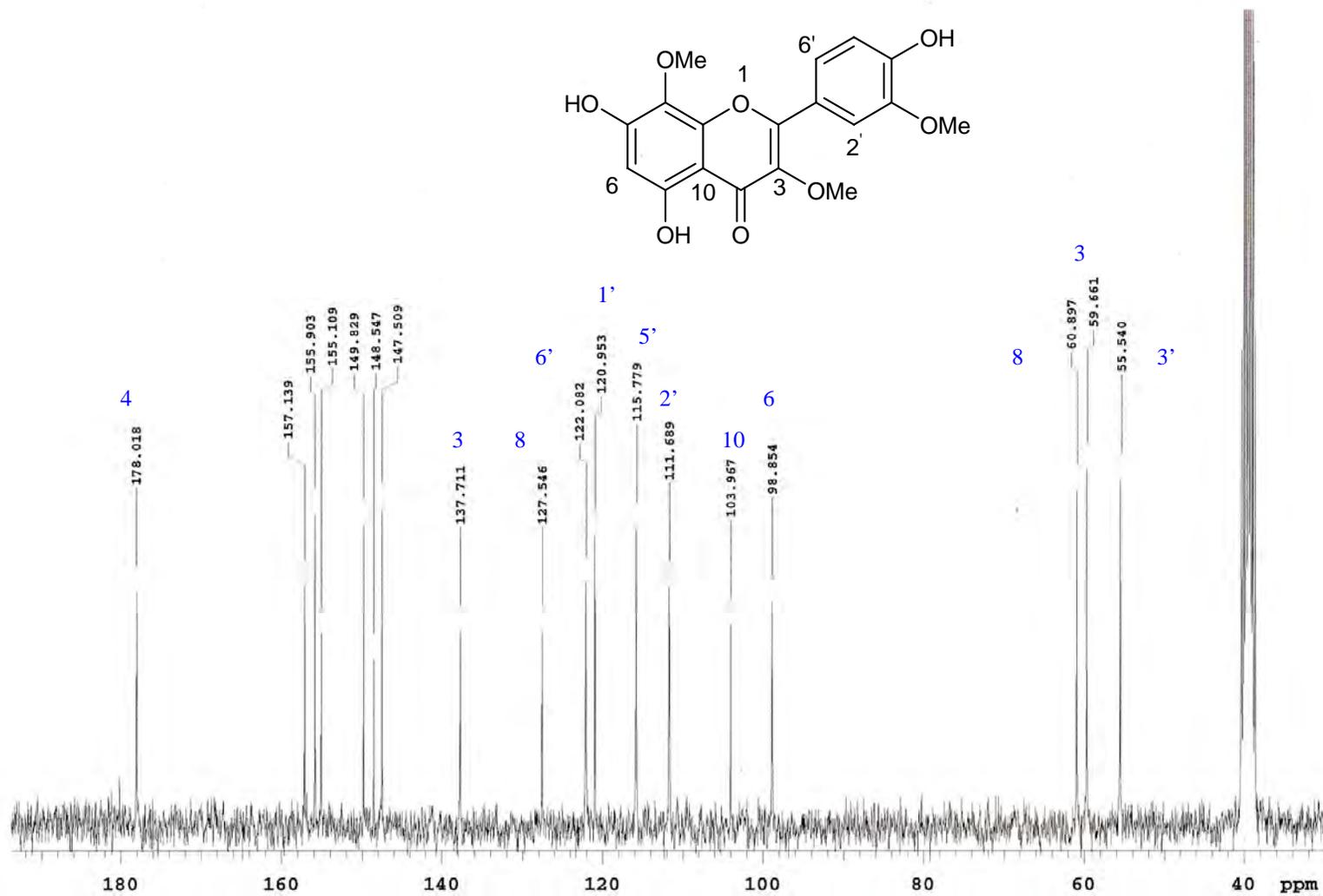
ESPECTRO 19. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) del ácido 15-desoxipúlico (40)



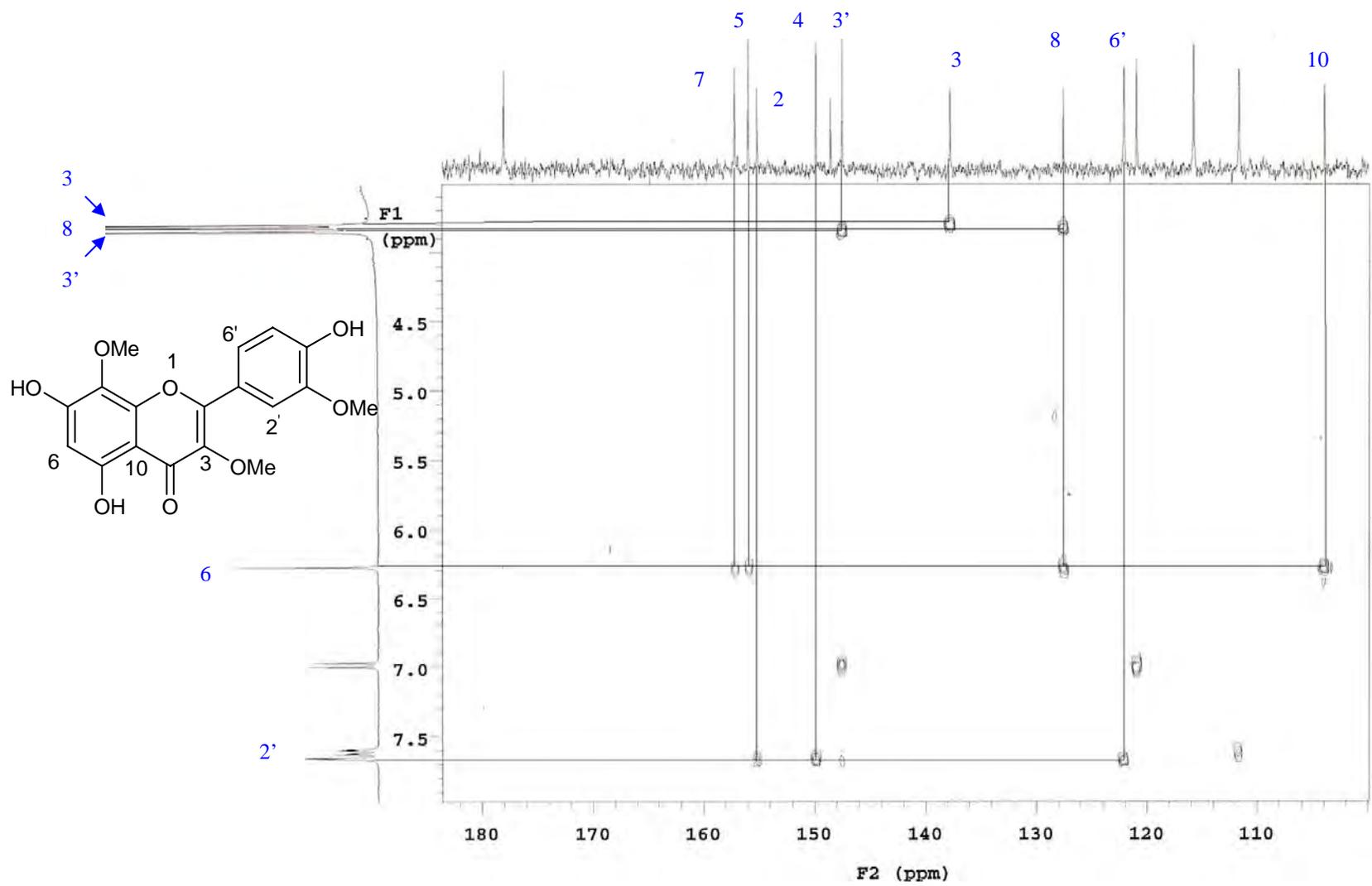
ESPECTRO 20. RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) del ácido 15-desoxipúlico (40)



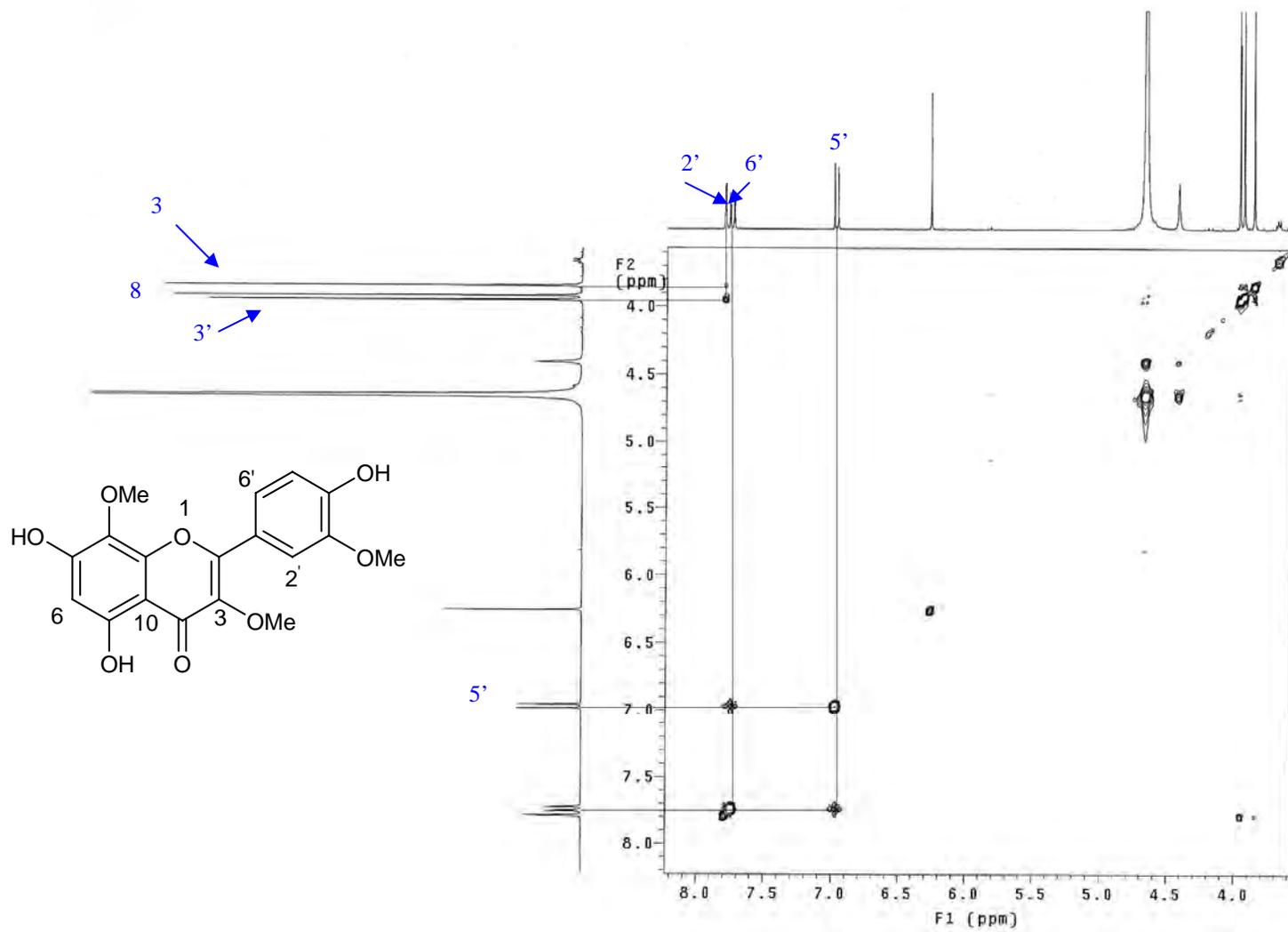
ESPECTRO 21. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) de 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)



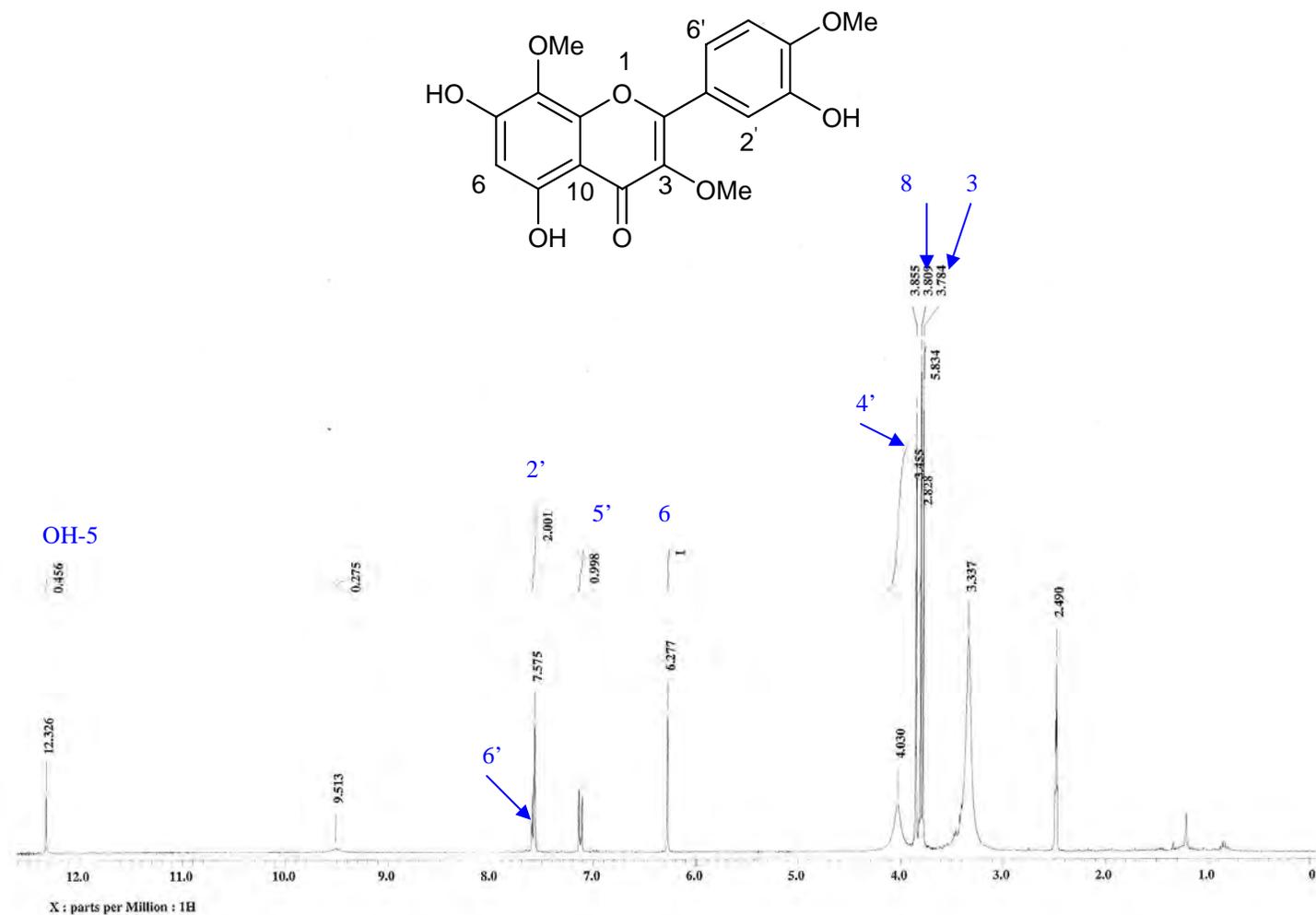
ESPECTRO 22. RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) de 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)



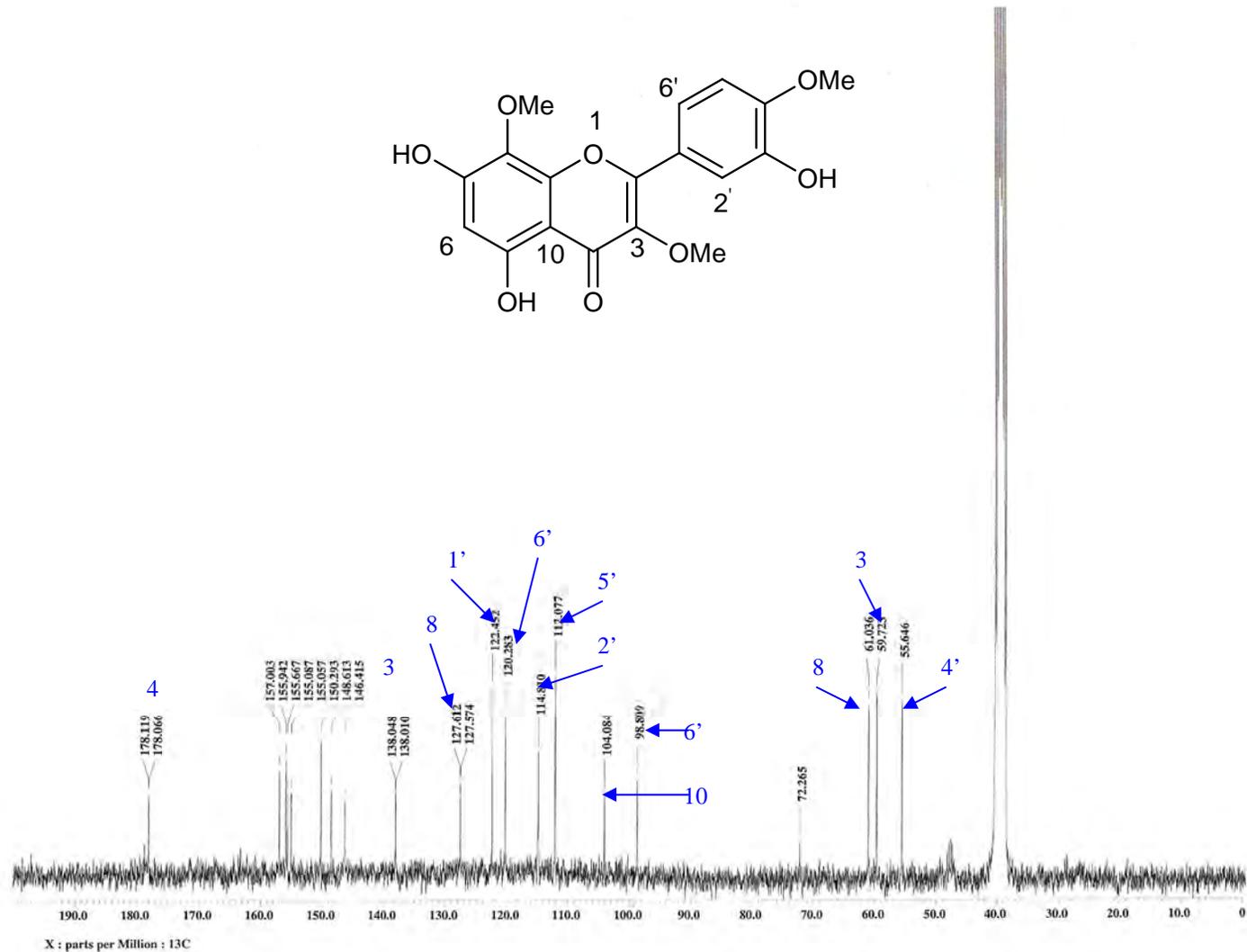
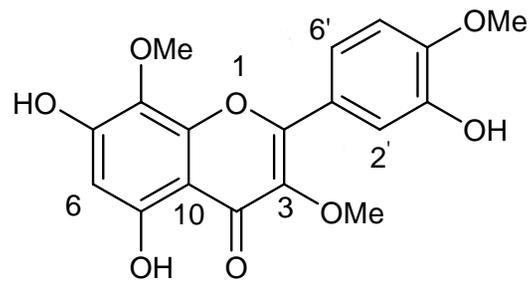
ESPECTRO 23. Experimento FLOCK de 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)



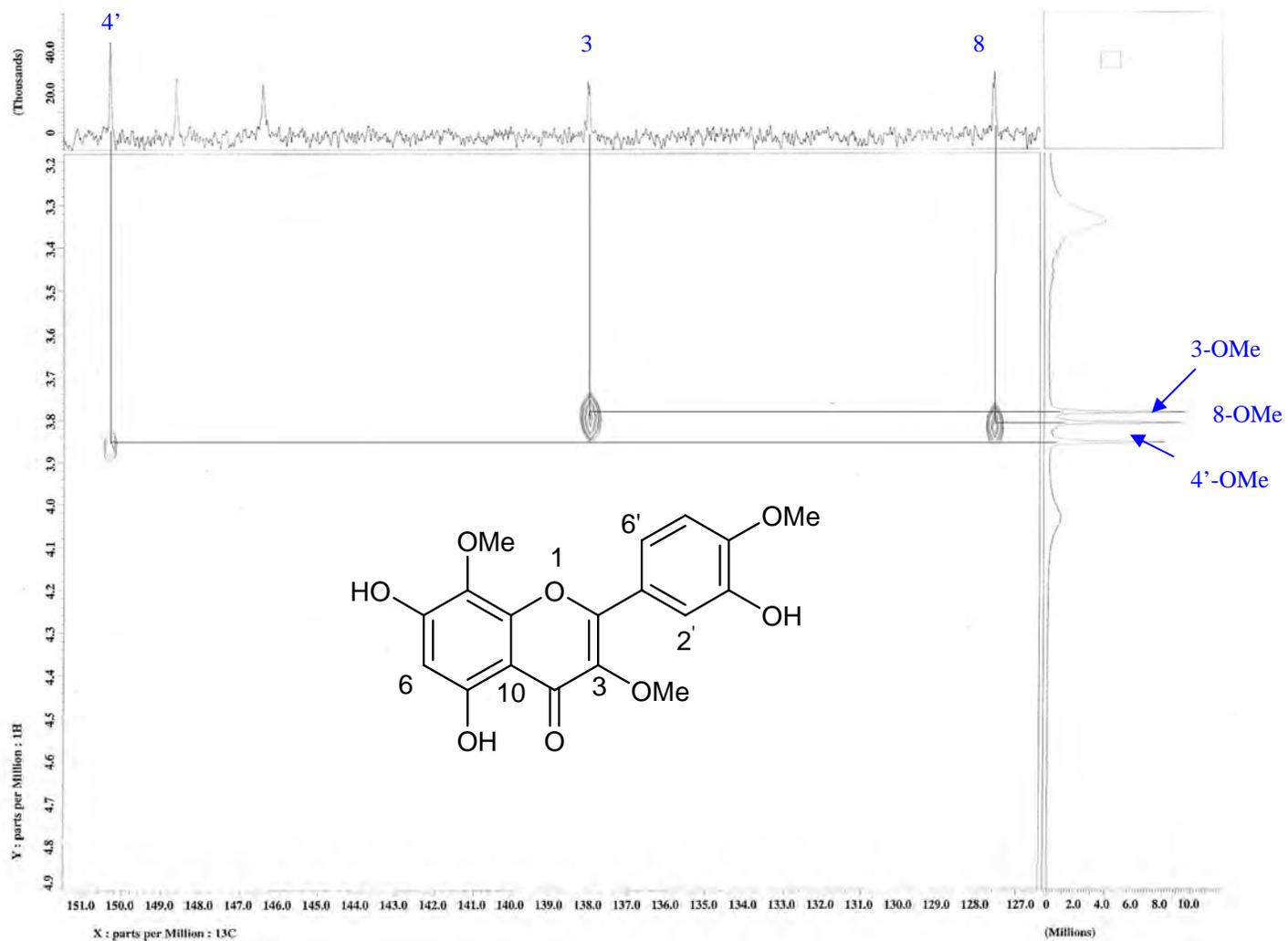
ESPECTRO 24. Experimento NOESY de 5,7,4'-trihidroxi-3,8,3'-trimetoxi-flavona (41)



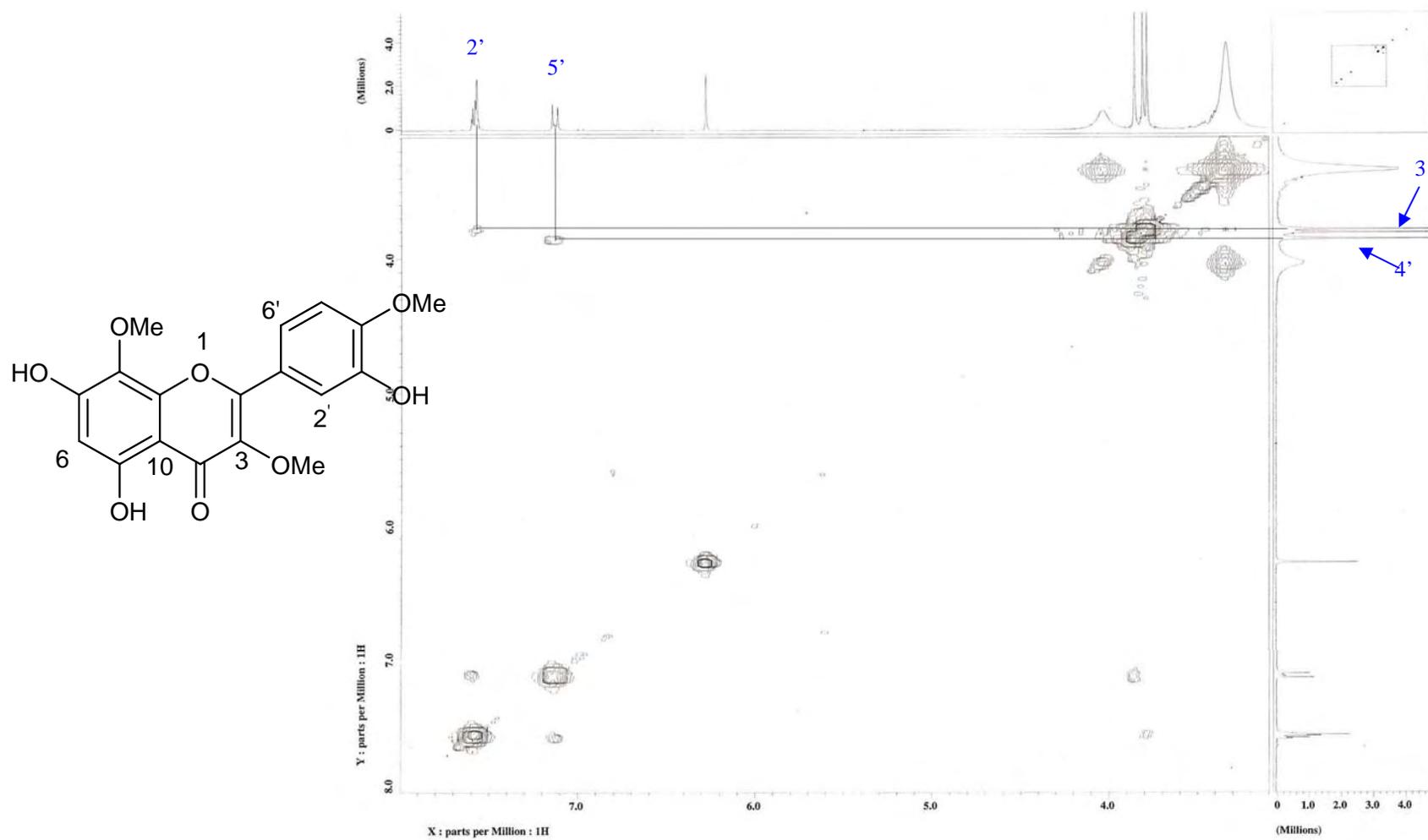
ESPECTRO 25. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, TMS) de 5,7,3'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)



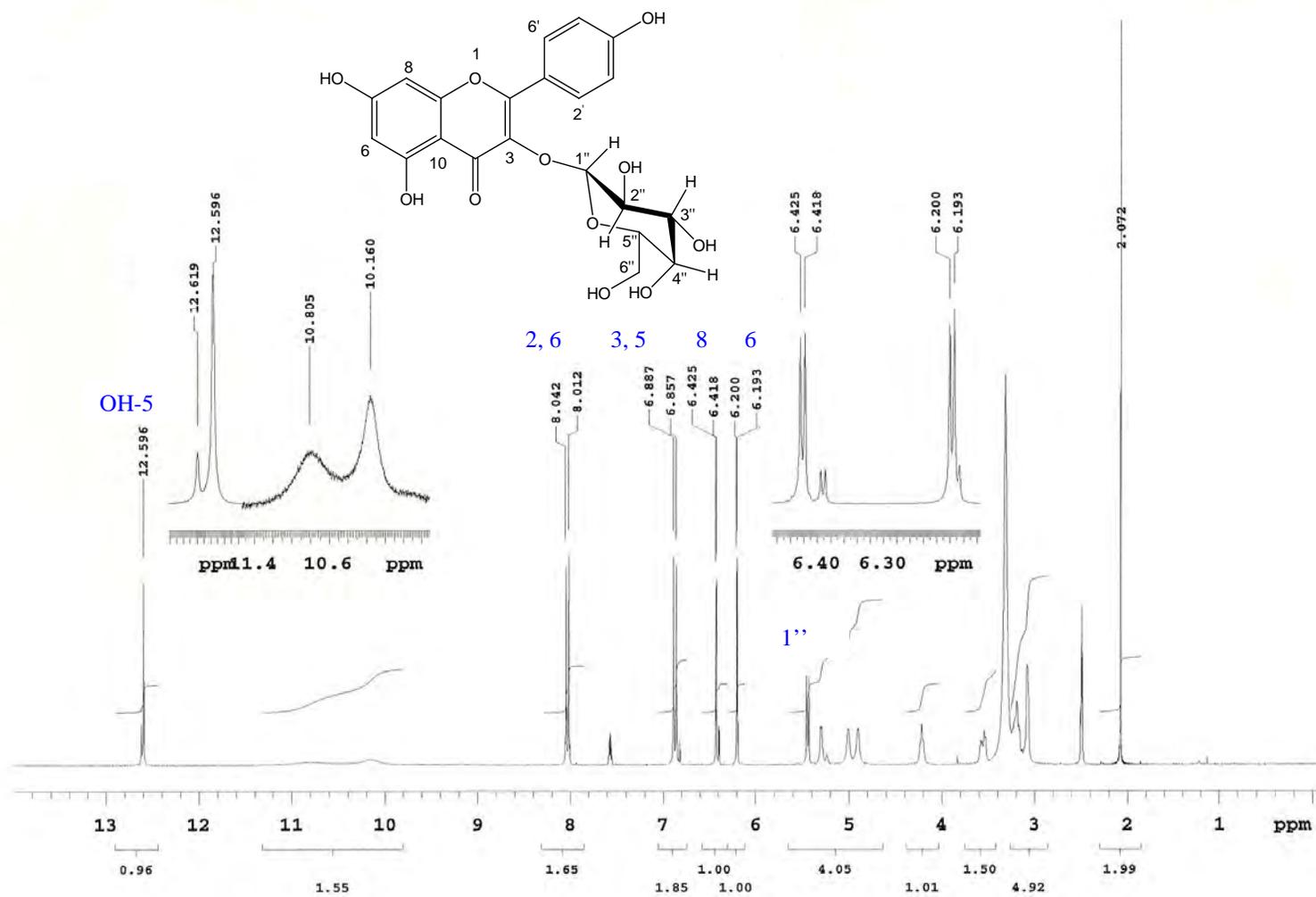
ESPECTRO 26. RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) de 5,7,3',4'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)



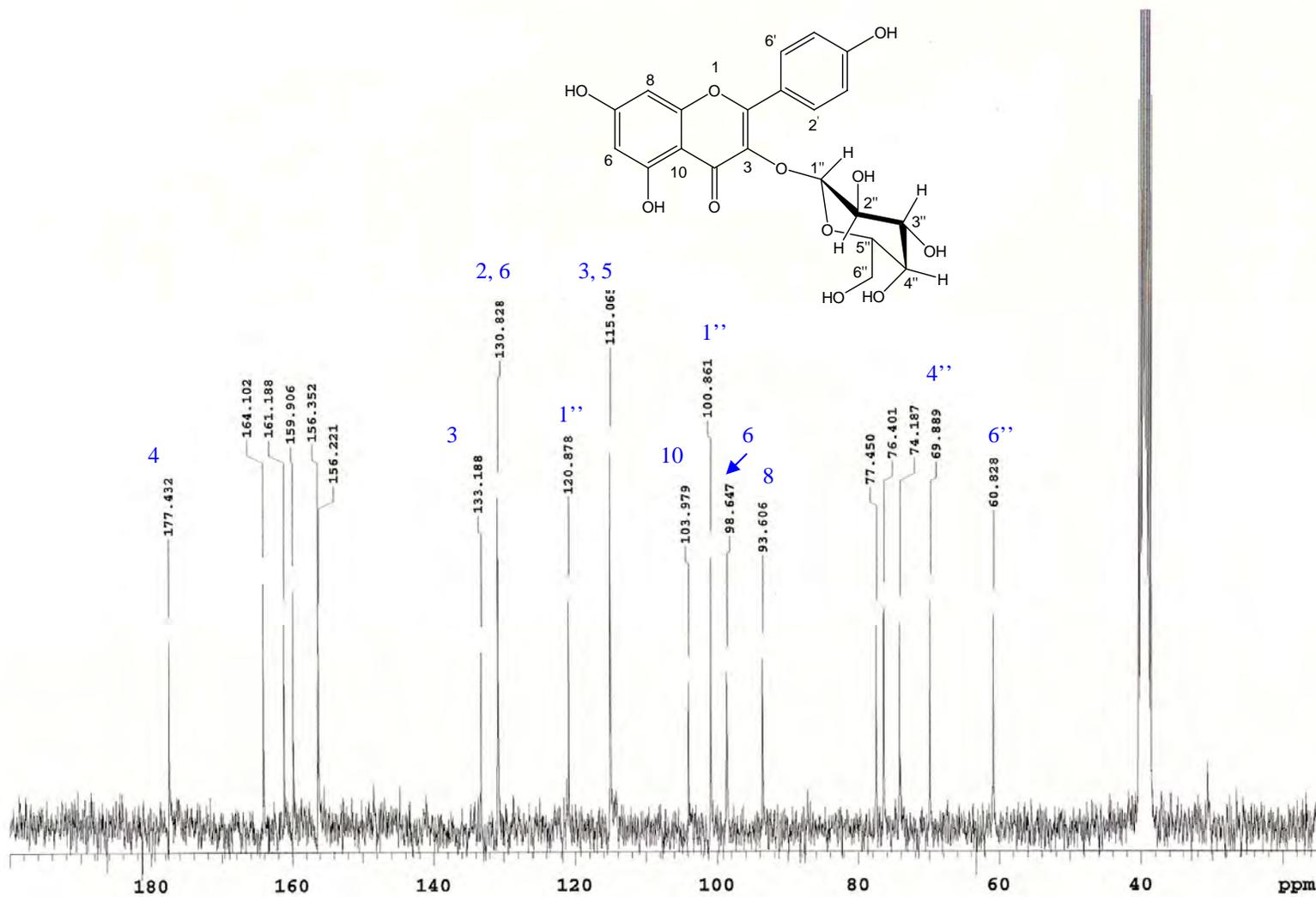
ESPECTRO 27. Experimento COLOC de 5,7,3'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)



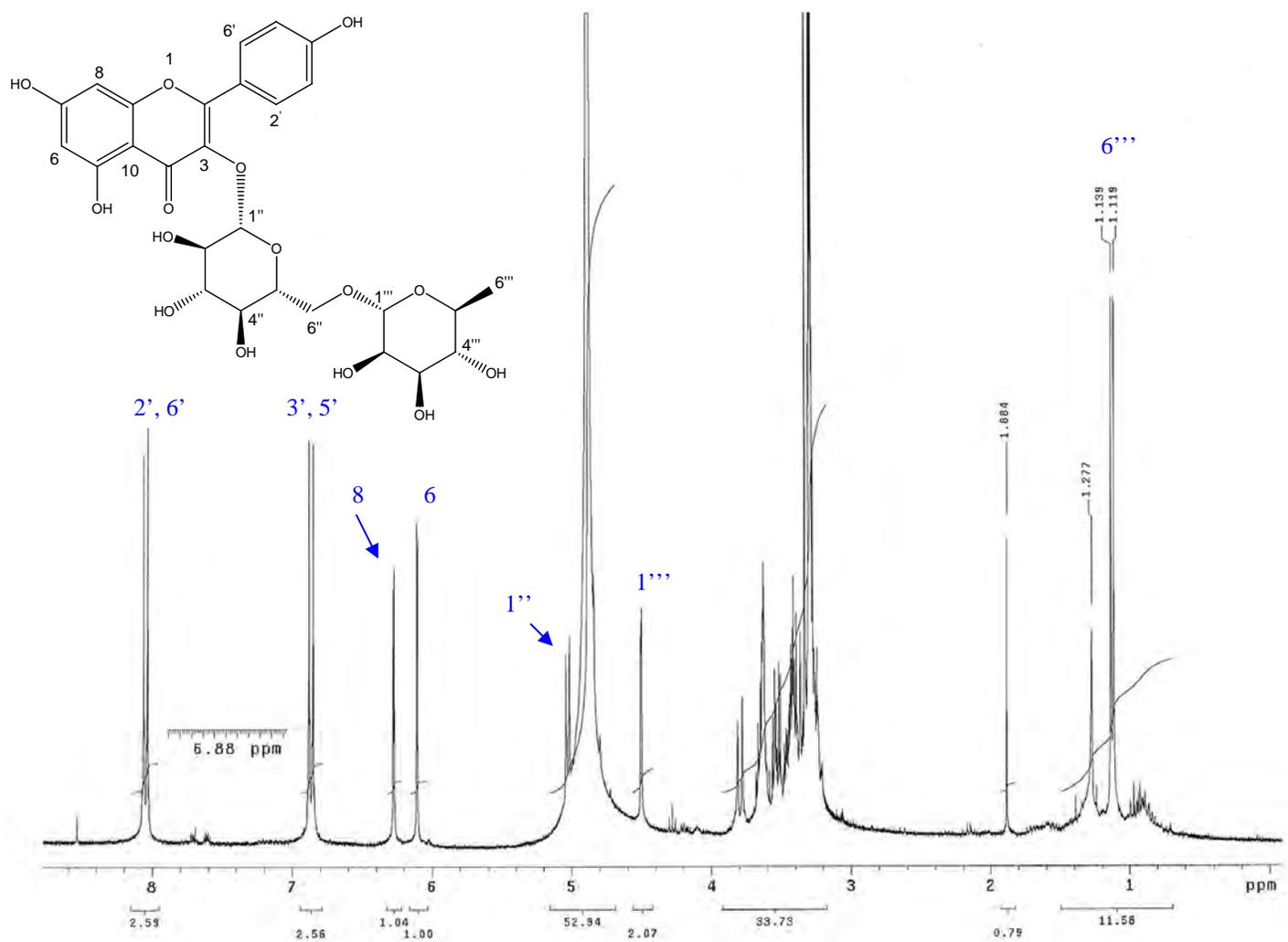
ESPECTRO 28. Experimento NOESY de 5,7,3'-trihidroxi-3,8,4'-trimetoxi-flavona (42)



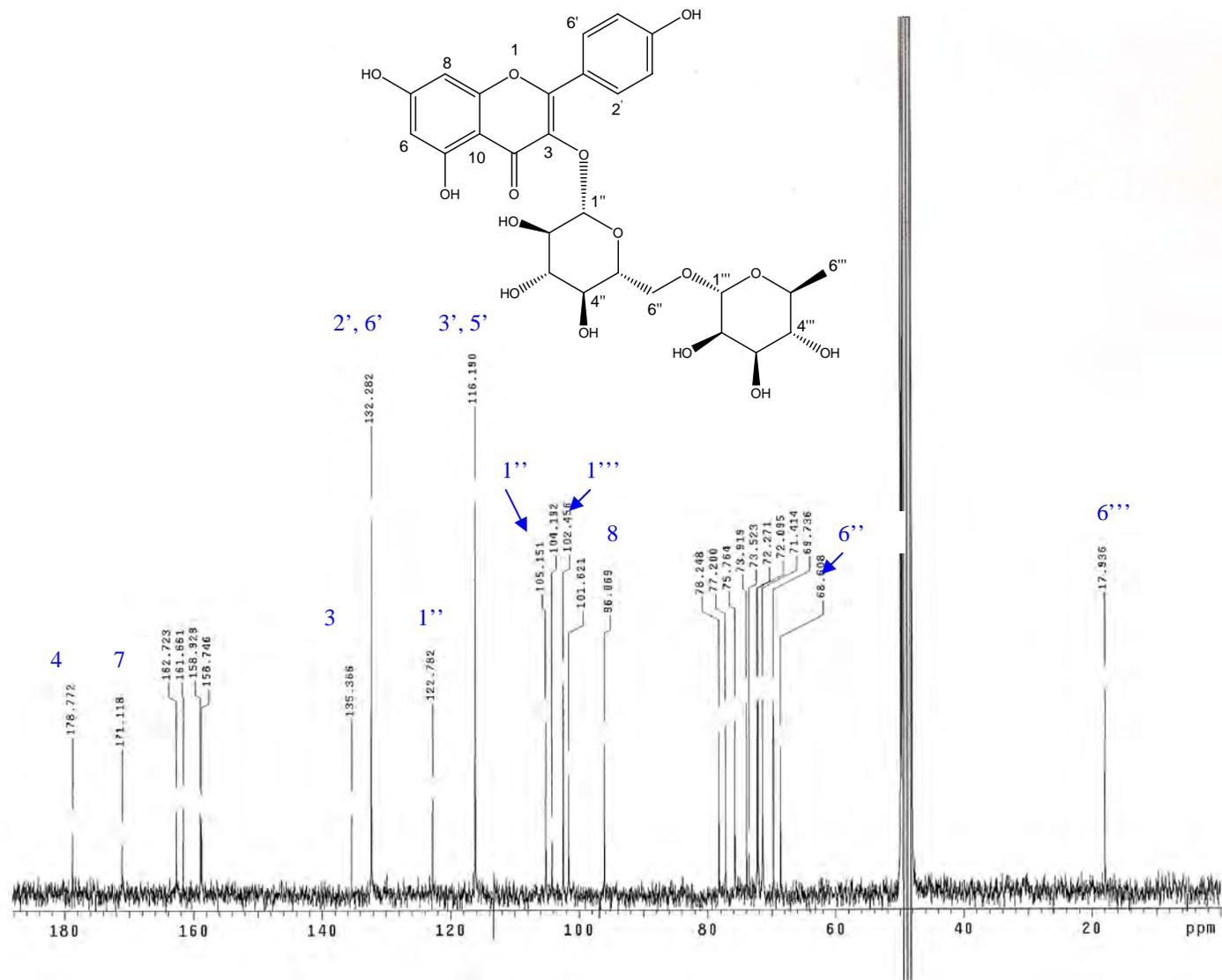
ESPECTRO 29. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) de astragalina (19)



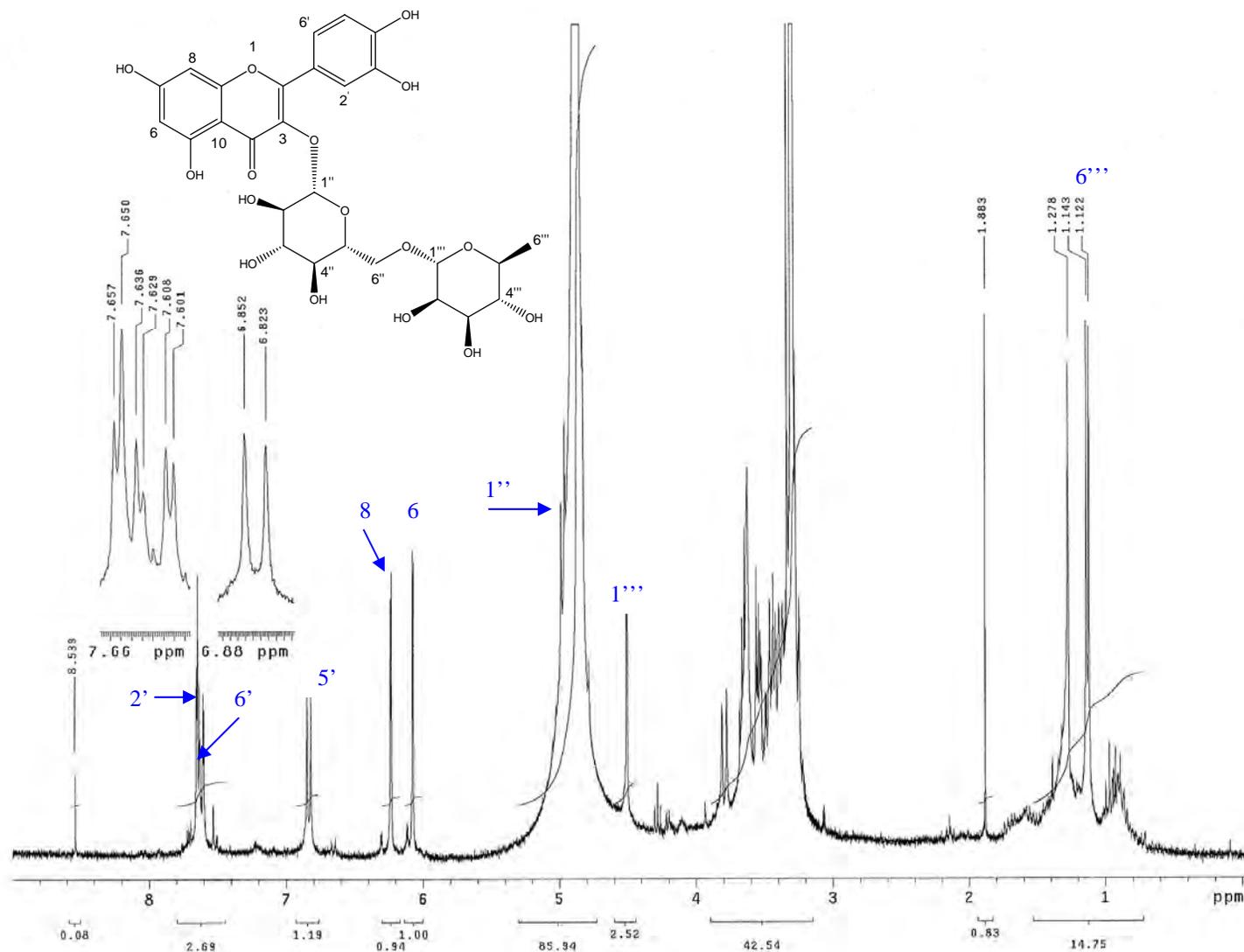
ESPECTRO 30. RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) de astragalina (19)



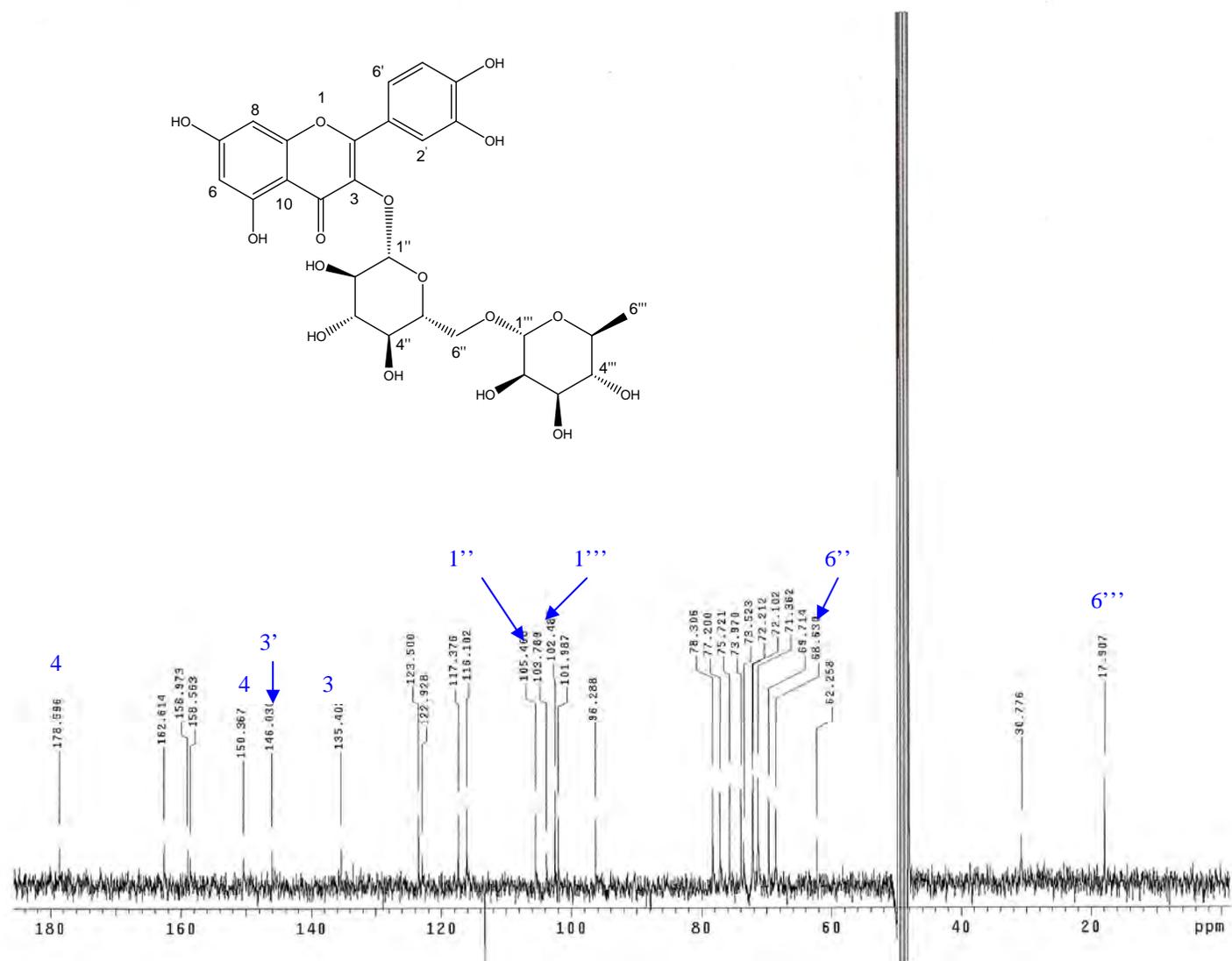
ESPECTRO 31. RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆, TMS) de nicotiflorina (20)



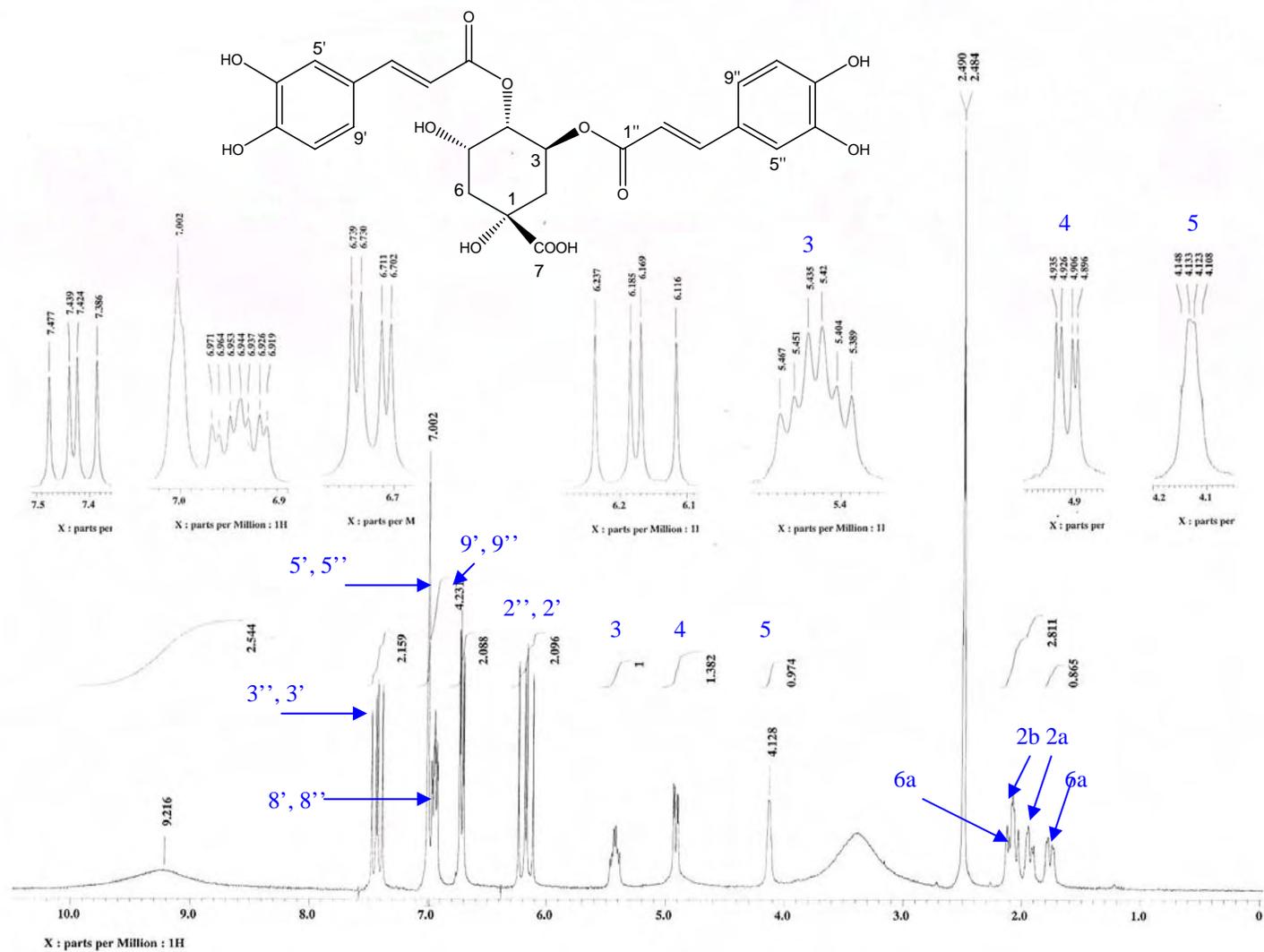
ESPECTRO 32. RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) de nicotiflorina (20)



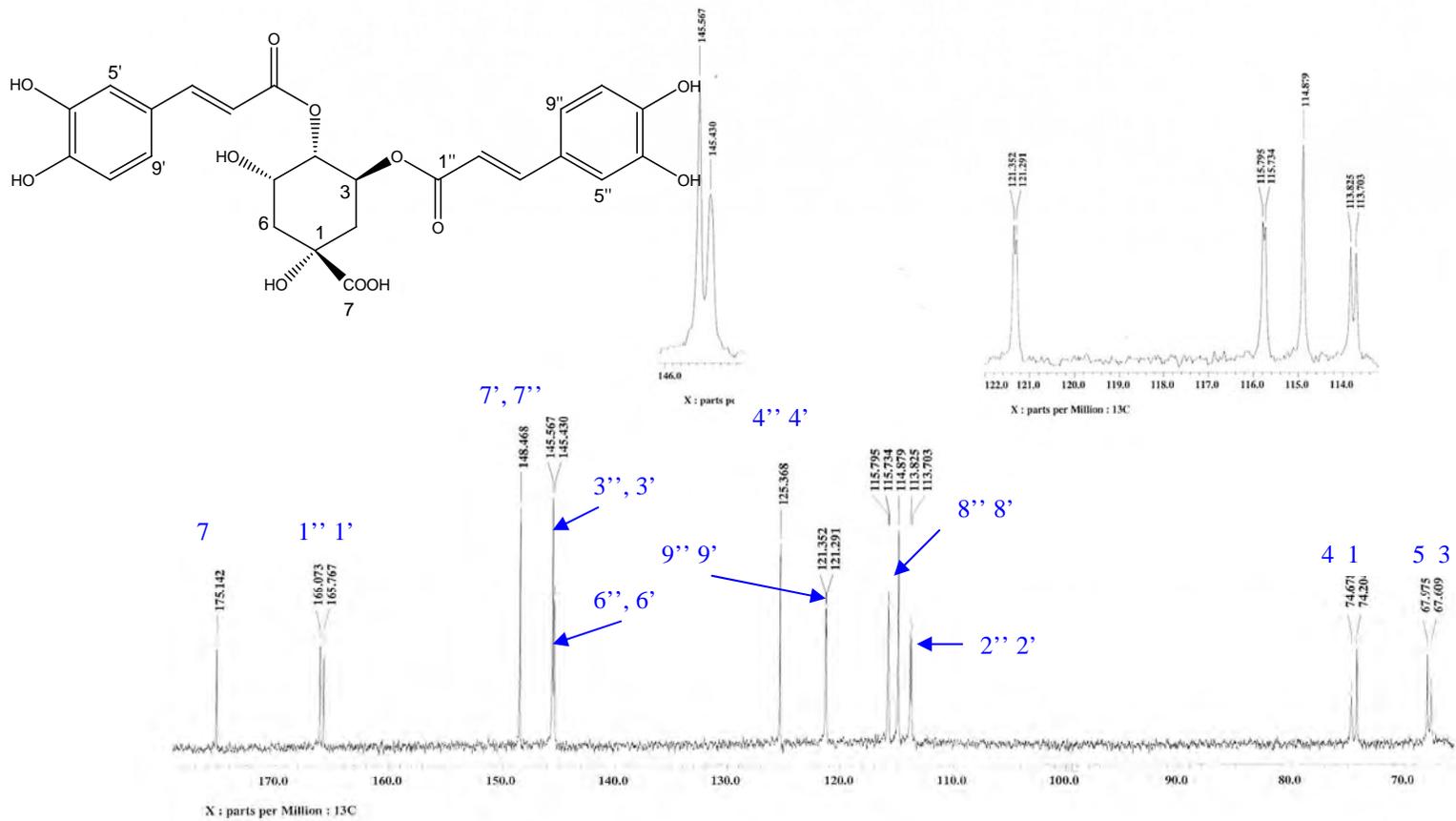
ESPECTRO 33. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) de rutina (16)



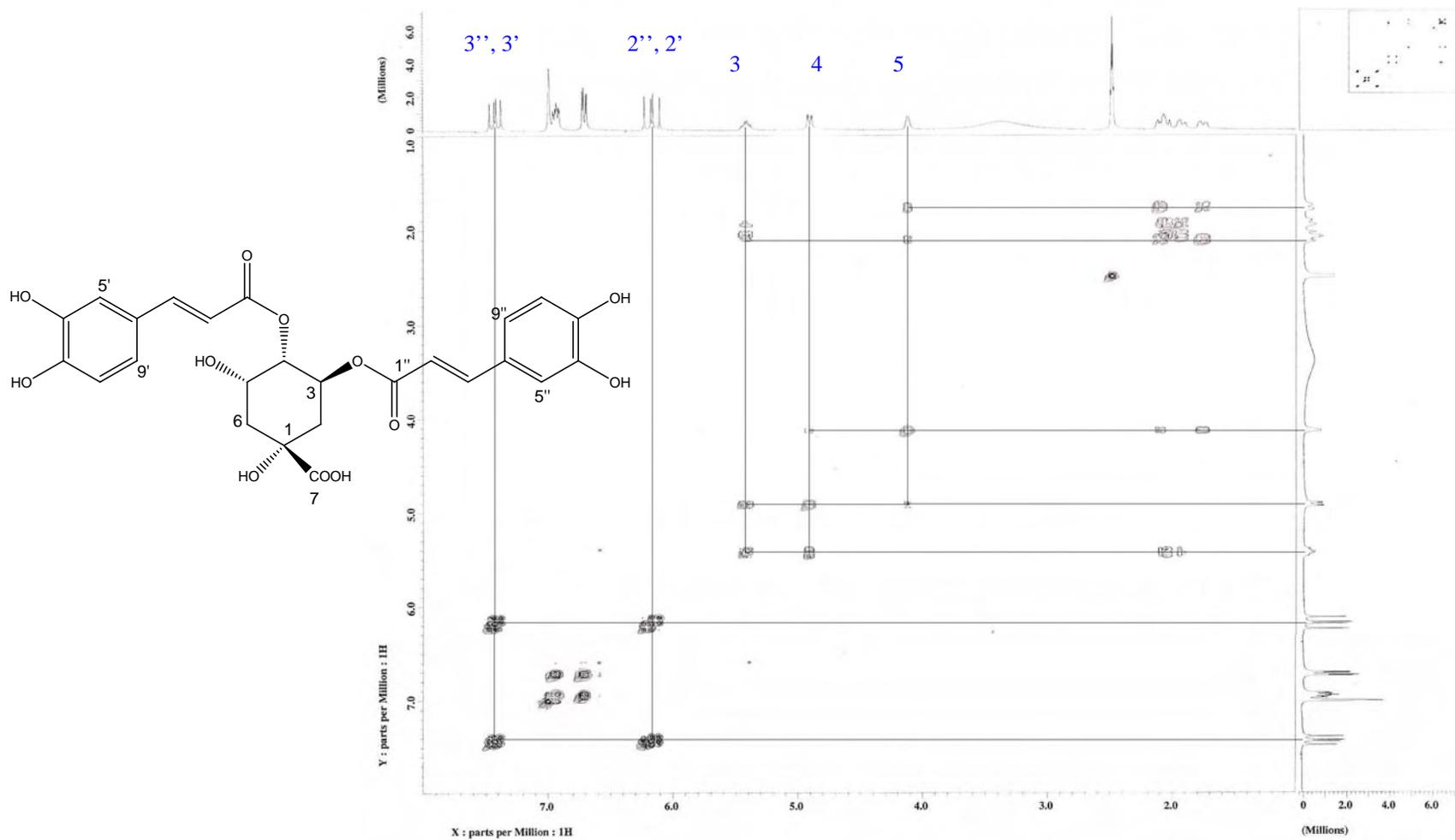
ESPECTRO 34. RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) de rutina (16)



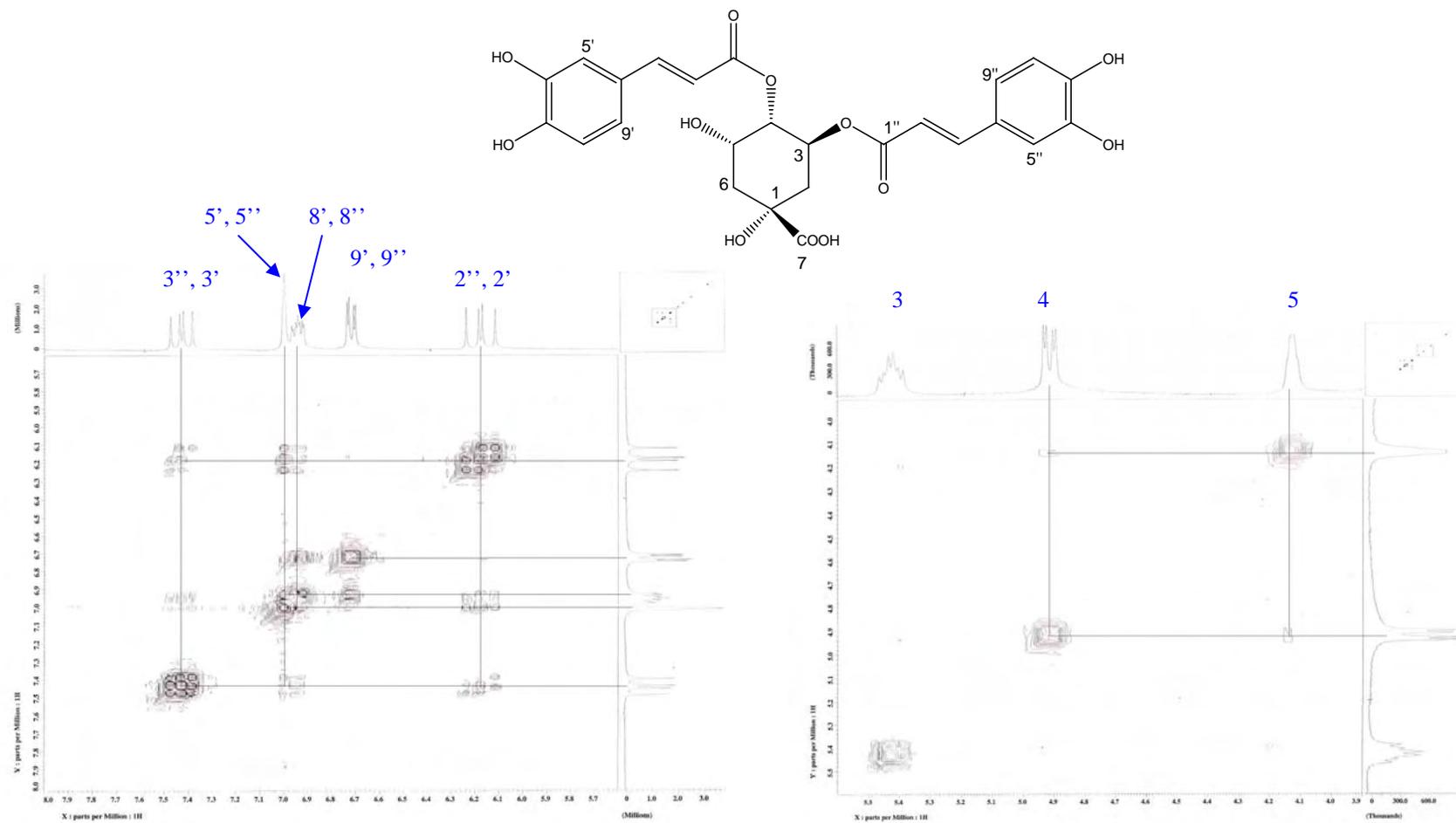
ESPECTRO 35. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) del ácido 3,4-dicafeil-quinico (30b)



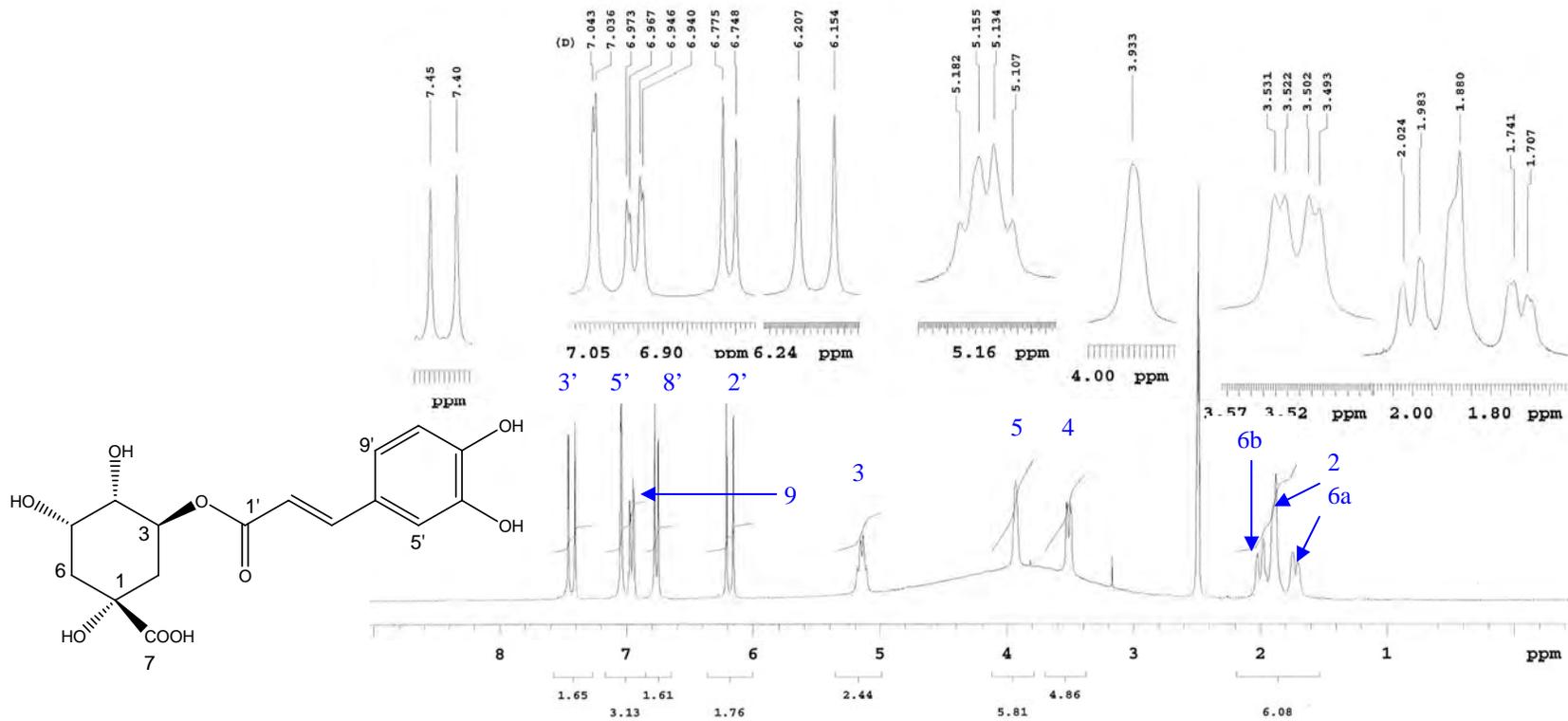
ESPECTRO 36. RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) del ácido 3,4-dicafeil-quínico (30b)



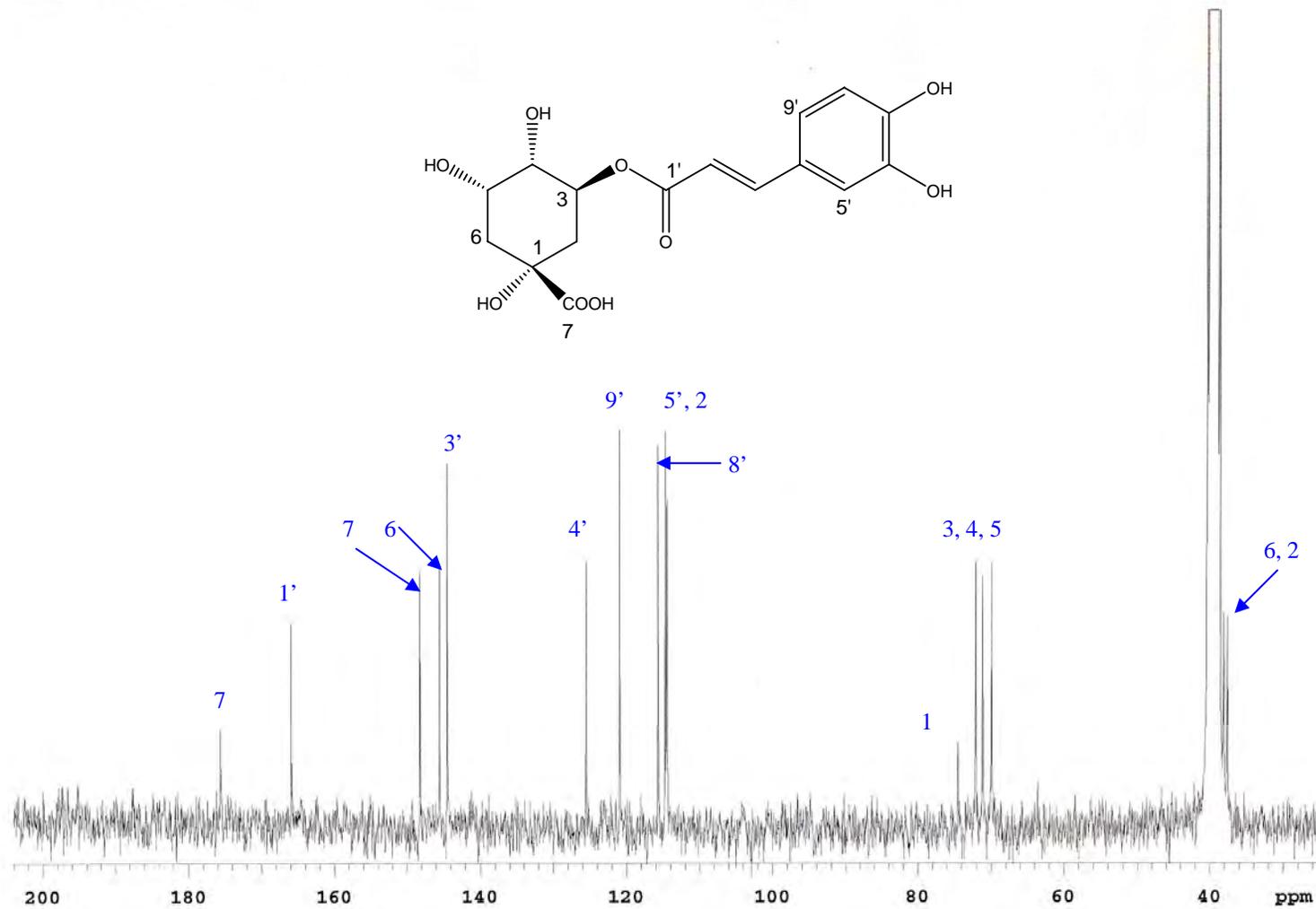
ESPECTRO 37. Experimento COSY del ácido 3,4-dicafeil-quinico (30b)



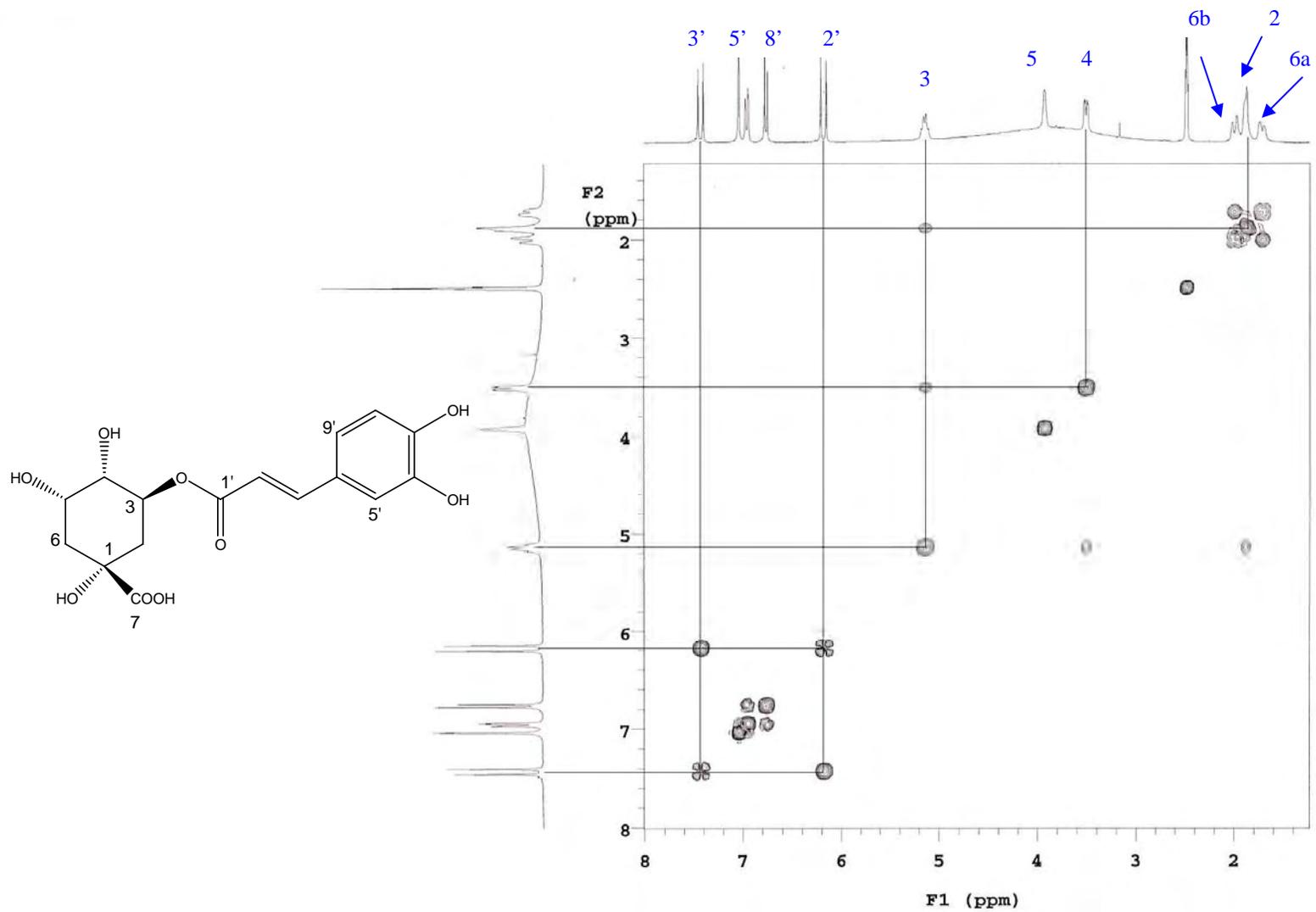
ESPECTRO 38. Experimento NOESY del ácido 3,4-dicafeil-quinico (30b)



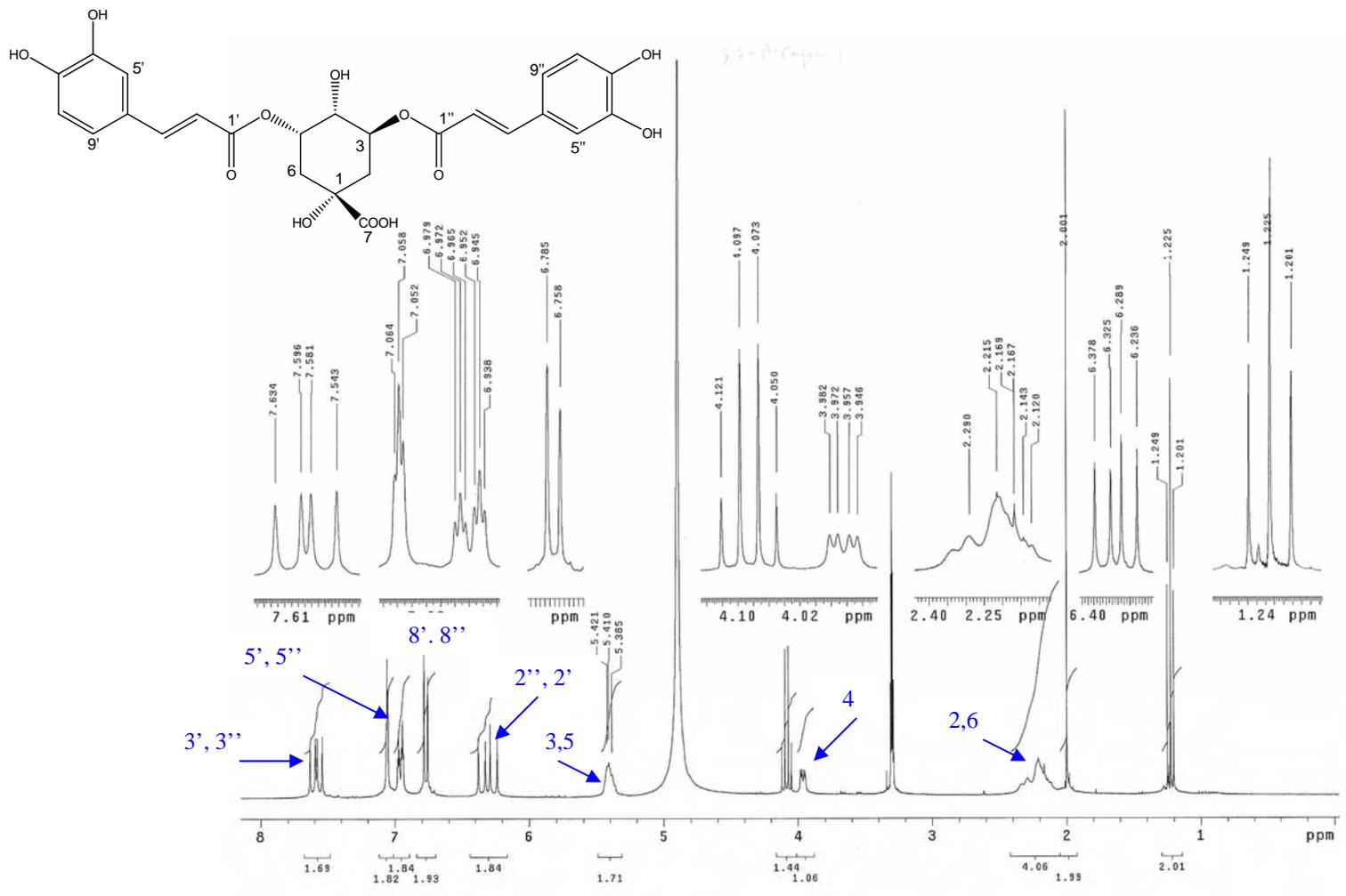
ESPECTRO 39. RMN- ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, TMS) del ácido clorogénico (30a)



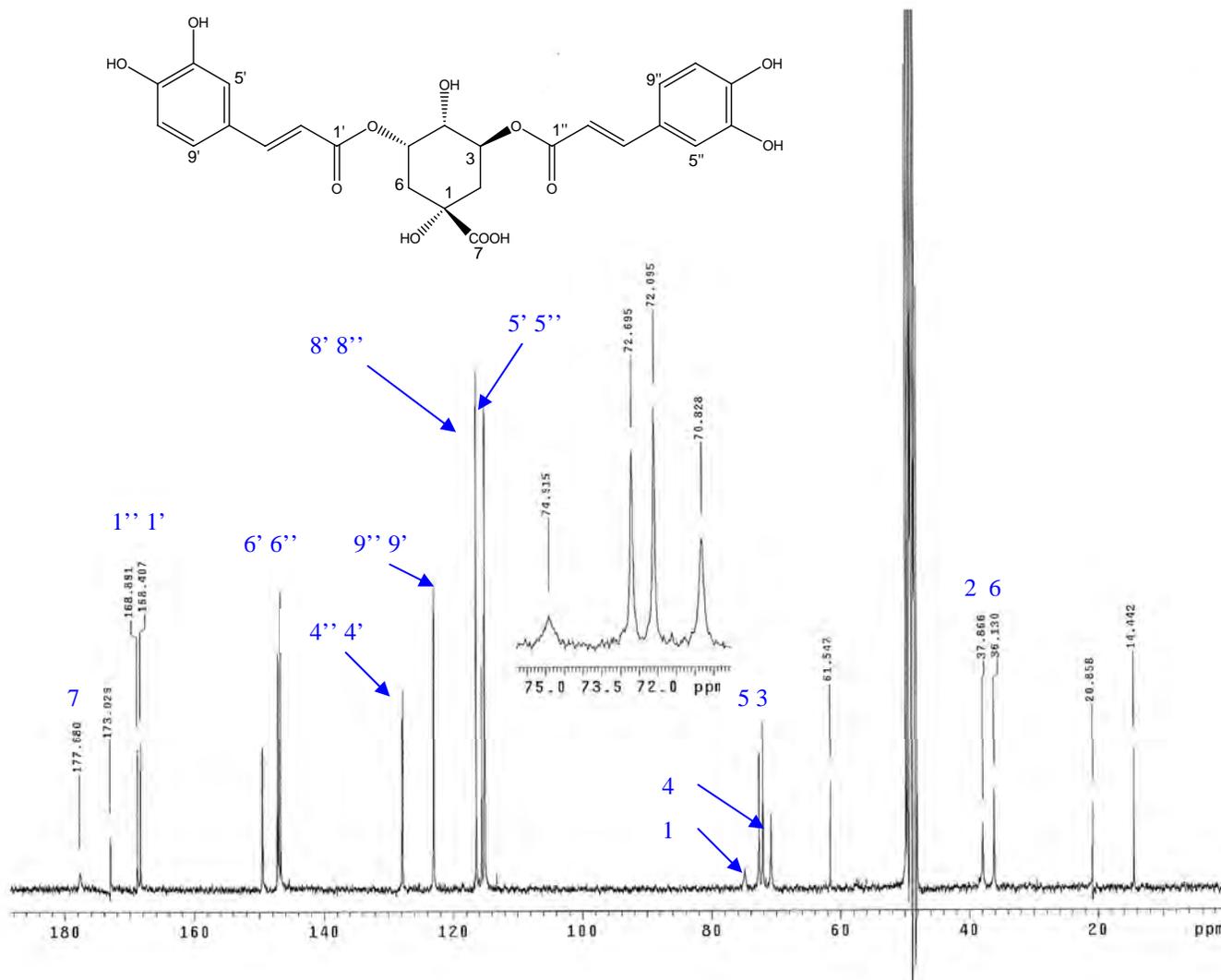
ESPECTRO 40. RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) del ácido clorogénico (30a)



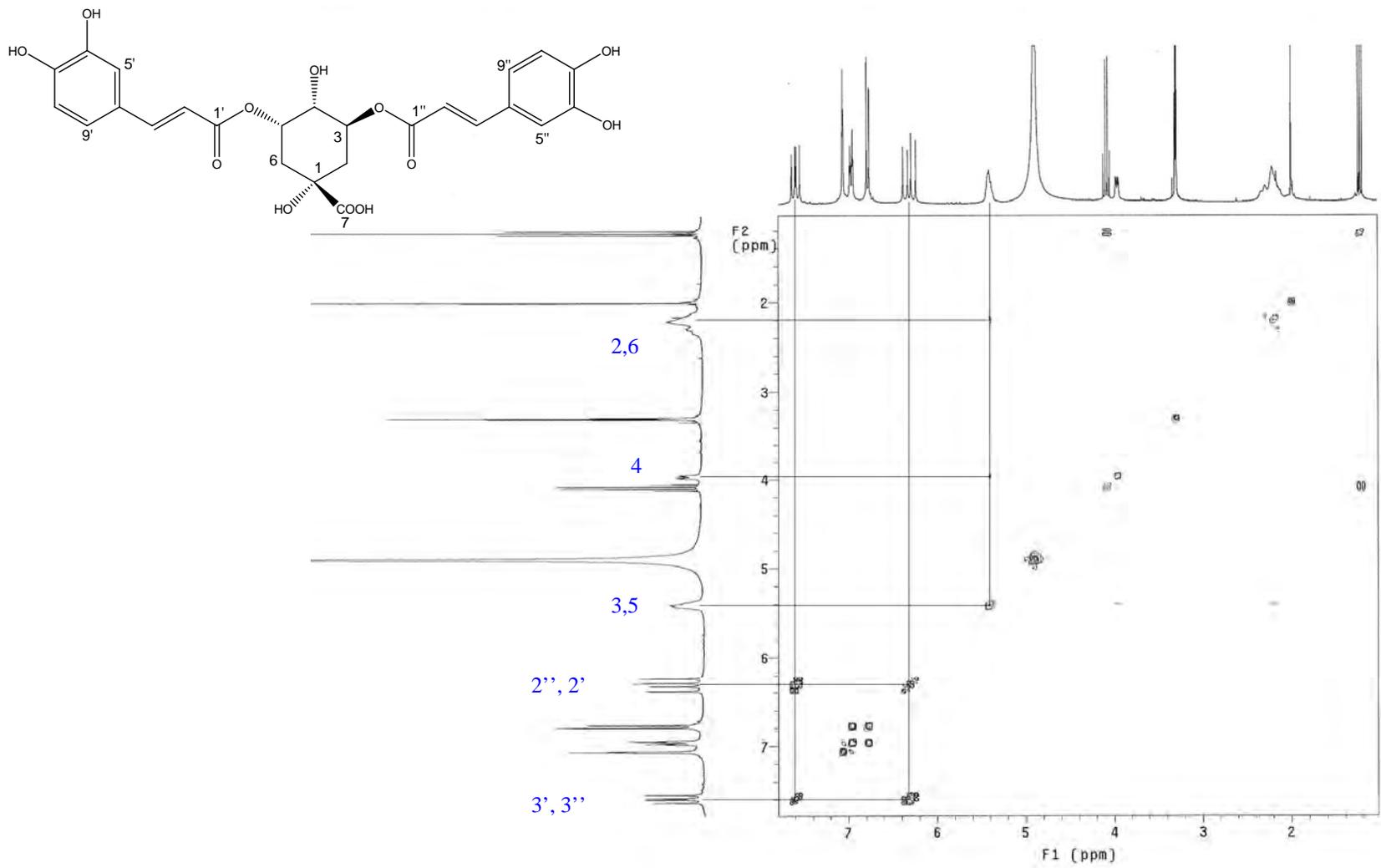
ESPECTRO 41. Experimento COSY del ácido clorogénico (30a)



ESPECTRO 42. RMN- ^1H (300 MHz, CD_3OD , TMS) del ácido 3,5-dicafeil-quinico (30c)



ESPECTRO 43. RMN- ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) del ácido 3,5-dicafeil-quinico (30c)



ESPECTRO 44. Experimento COSY del ácido 3,5-dicafeil-quinico (30c)