



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ESTUDIO QUIMICO DE DOS ESPECIES (imbricatus
y epaleaceus) DEL GENERO Otopappus Y DETERMINA-
CION DE LA ESTEREOQUIMICA DE LA
OTOIMBRICATINA B.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
AGUSTIN LOPEZ PEREZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

-----CONTENIDO-----

	páginas.
INTRODUCCION.	1
GENERALIDADES.	5
PARTE EXPERIMENTAL.	21
RESULTADOS OBTENIDOS Y ANALISIS.	29
CONCLUSIONES.	50
SECCION DE ESPECTROS.	
BIBLIOGRAFIA.	52

INTRODUCCION.

Los antiguos habitantes de México acumularon una gran cantidad de información, acerca del medio que los rodeaba. El conocimiento sobre plantas era específicamente notable, las habían clasificado sistemáticamente y muchas habían sido usadas para su alimentación, tales como; el maíz, el frijol, etc. Se conocían además las propiedades medicinales y estimulantes de una gran cantidad de plantas silvestres.

Durante la época colonial se continuó con el uso de plantas autóctonas con propiedades medicinales, estimulantes, alimenticias y de uso industrial. También se desarrolló la industria de la grana o cochinilla, para la extracción de un colorante rojo, usado en la tñia de telas, dicho colorante fué denominado ácido carmínico. (1)

En la época actual se han realizado estudios de gran importancia, entre los que destacan los siguientes:

- a) La década de 1940 se enfocó al estudio de los esteroides.
- b) La década de 1950 se enfocó al estudio de los triterpenos.
- c) Desde 1960 hasta la fecha se han hecho estudios sobre lactonas sesquiterpénicas.
- d) Desde 1965 hasta la fecha se han hecho estudios sobre sesterpenos.

En la década de 1940 el descubrimiento y la utilización de los esteroides contenidos en el barbasco, colocaron a México como el primer productor mundial de hormonas sexuales y de otros productos farmacéuticos. (1)(2)

En 1960 se inició el estudio de lactonas sesquiterpénicas en el Instituto de Química de la UNAM, aislando 69 nuevos compuestos hasta 1975, determinando su estructura por espectroscopía. Estos estudios fueron realizados durante los siguientes periodos:

1. El primer periodo cubre los estudios realizados de 1960 a 1970, obteniéndose la elucidación de la estructura de 35 nuevas lactonas sesquiterpénicas que son:
 - a) 22 Pseudoguaianólidas.
 - b) 12 Guaianólidas.
 - c) 1 Eudesmanólida.
2. El segundo periodo cubre los estudios de 1970 a 1975, los cuales fueron enfocados a dos tipos de lactonas sesquiterpénicas como son:
 - a) Germacranólidas.
 - b) Eudesmanólidas.

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios típicos de las plantas pertenecientes a la familia de las compuestas, las cuales en algunos casos son caracte-

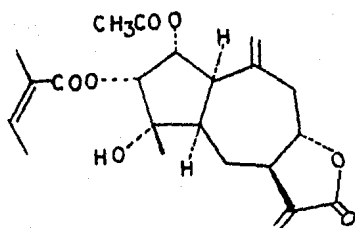
rísticas de algunos géneros, tribus y especies. Sin embargo pocos sesquiterpenos se han aislado de otras familias de plantas, como la Umbeliferae y la Magnoliaceae. (3)

Hasta la fecha se han aislado un gran número de lactonas sesquiterpénicas y se ha descubierto en ellas, varias propiedades biológicas importantes, como son: actividad inhibitoria del crecimiento vegetal, actividad citotóxica ó antitumoral "in vitro", actividad dermatítica y actividad bactericida.

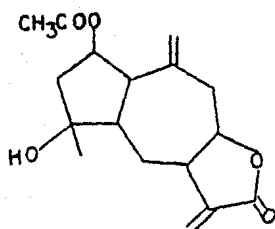
Las plantas que son estudiadas en este trabajo de investigación, fueron clasificadas en el Instituto de Biología de la UNAM, por el profesor José Luis Villaseñor Ríos como Otopappus imbricatus y Otopappus epaleaceus.

Hasta la fecha se ha informado que existen 15 especies del género Otopappus, las cuales se encuentran distribuidas en México y centroamérica (5). De estas 15 especies sólo se ha estudiado la imbricatus, recolectada en el poblado de Yucunduchi Puebla de la cual se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de guaiano, denominadas otoimbricatina A y otoimbricatina B. (2)(6)(7) (Esquema No. 1)

Esquema No.1



OTOIMBRICATINA A



OTOIMBRICATINA B

GENERALIDADES.

La familia de las compuestas, es una de las más grandes y estudiadas, consta de más de 1,000 géneros y 15,000 especies. Esta familia se encuentra dividida en 14 tribus que son: (8)

- | | |
|-----------------|------------------|
| 1. Veroniae. | 8. Senecioneae. |
| 2. Eupatoreae | 9. Tageteae. |
| 3. Astereae. | 10. Artoteae. |
| 4. Inuleae. | 11. Calenduleae. |
| 5. Heliantheae. | 12. Cynareae. |
| 6. Helenieae. | 13. Mutiseae. |
| 7. Anthemidae. | 14. Lactuceae. |

Cada una de las tribus se dividen en subtribus y estas a su vez en grupos de la siguiente manera:

1. Melampodiinae (Grupos I y II).
2. Zinninae B. EH.
3. Ecliptinae Less (Grupos I y II).
4. Verbesinae (Grupos I y II).
5. Helianthinae Dumort. (Grupos I y II).
6. Gaillardinae Less.
7. Coreopsidinae Less (Grupos del I al VII).
8. Fitchiinae Carlquist.

9. Bahiinae Rydb.
10. Madiinae.
11. Galinsoginae B & H.
12. Neurolaeniinae.
13. Engelmanniinae Stuessy.
14. Ambrossinae Less.
15. Millariinae B & H (Grupos I, II y III).

Las dos plantas estudiadas en este trabajo son; Otopappus imbricatus y Otopappus epaleaceus, pertenecen a la familia de las compuestas, a la tribu Heliantheae y al grupo II de la subtribu Verbesinae. (5)(8) Estas plantas fueron recolectadas de la siguiente forma.

- a) Otopappus imbricatus recolectado el 7 de agosto de 1984 en el poblado de Yucunduchi (Puebla).
- b) Otopappus imbricatus recolectado el 7 de agosto de 1984 en el Km 129 de la carretera de Izúcar de Matamoros a Acatlán Puebla.
- c) Otopappus imbricatus recolectado el 8 de agosto de 1984 a un kilometro después de Yucunduchi, en dirección a Oaxaca.
- d) Otopappus epaleaceus recolectado el 29 de noviembre de 1984 en Cuernavaca Morelos.

e) Otopappus epaleaceus recolectado el 29 de agosto de 1985, a 7 Km después del río Amacúzac (Morelos), en dirección de México a Acapulco.

En 1873 Benthán fué el primero en describir al género Otopappus, del cual se encuentran 15 especies distribuidas en México y centroamérica, como son: (5)

1. O. scaber: Guatemala y México (Campeche y Chiapas).
2. O. mexicanus: México (Guerrero).
3. O. verbesinoides: Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y México (Chiapas y Oaxaca).
4. O. koelzii: México (Colima, Jalisco y Michoacán).
5. O. epaleaceus: México (Guerrero, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla).
6. O. tequilanus: México (Guerrero, Jalisco, Michoacán, Mayarit y Sinaloa).
7. O. acuminatus: México (Jalisco).
8. O. robustus: México (Veracruz).
9. O. microcephalus: México (Colima, Guerrero y Jalisco).
10. O. imbricatus: México (Guerrero, México, Morelos y Puebla).
11. O. curviflorus: Belice, Guatemala, Honduras y México (Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Campeche).

12. *O. brevipes*: El Salvador, Guatemala, Honduras y Mé-
xico (Chiapas).
13. *O. hirsutus*: Jamaica.
14. *O. guatemalensis*: Guatemala y México (Campeche y Yu-
catán).
15. *O. syncephalus*: Se encuentra en los límites de Gua-
temala con Belice.

De las 15 especies del género Otopappus, hasta la fecha sólo se ha estudiado la imbricatus, recolectada en Yucunduchi Puebla, de la cual se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas denominadas otoimbricatina A y otoimbricatina B. En este estudio sólo se determinó la estereoquímica relativa de la otoimbricatina A, mediante la técnica de difracción de rayos "x" y la estructura plana de la otoimbricatina B, mediante la interpretación de espectroscopía; resonancia magnética nuclear protónica, infrarrojo y masas. (2)(5)(7)

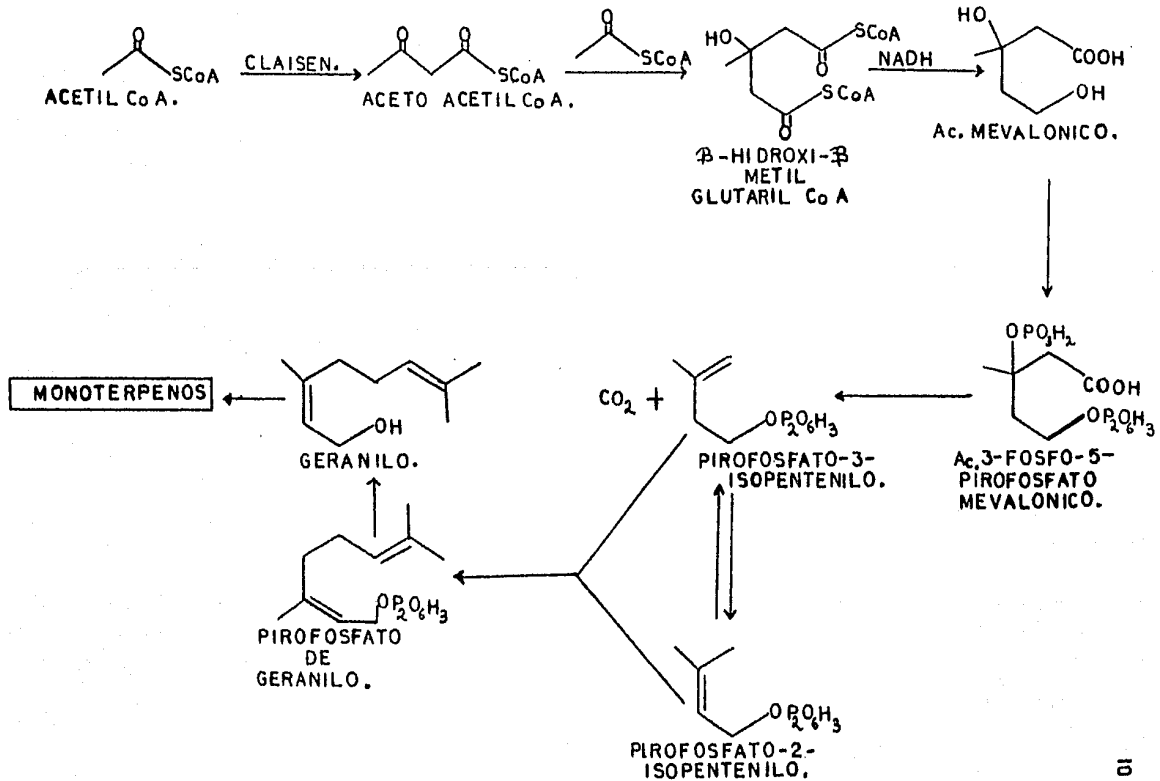
En los estudios químicos realizados a las plantas Otopappus imbricatus y Otopappus epaleaceus de este trabajo de investigación, se aislaron compuestos denominados lactonas sesquiterpénicas y triterpenos pentacíclicos. Por medio de la regla biogenética propuesta por Ruzica (9), que consiste en la condensación cabeza-cola de unidades de isopreno, para dar como resultado los diferentes tipos de terpe-

noides (Tabla No 1), se trata de explicar la biogénesis de dichos compuestos.

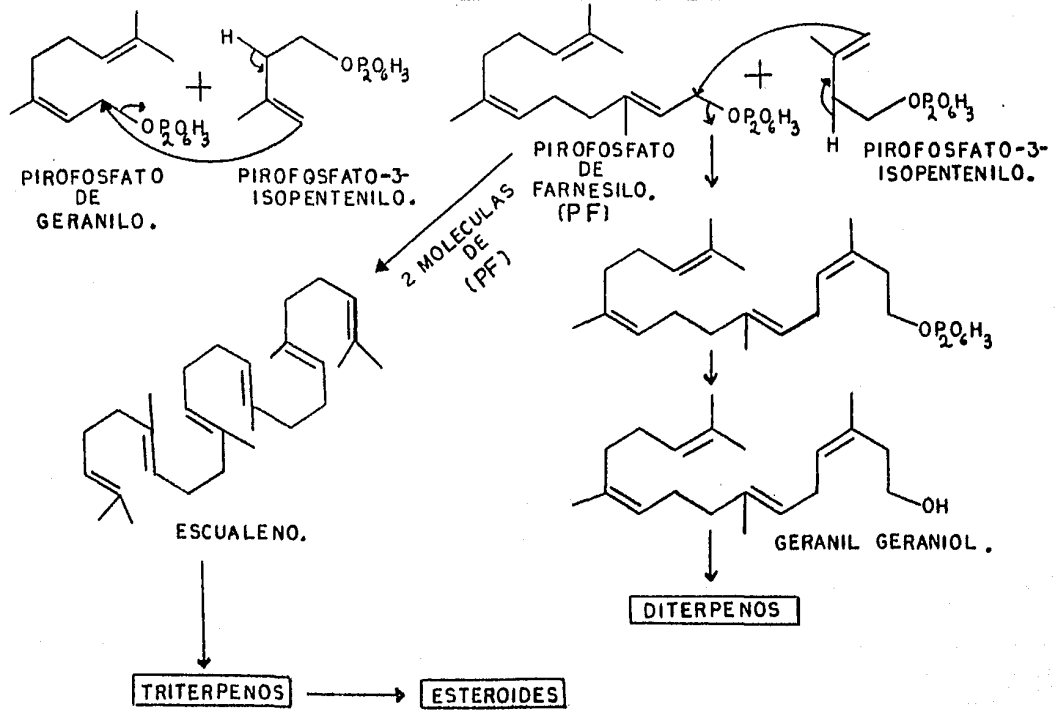
TABLA No 1.

TERPENOIDES	NUMERO DE CARBONOS.	UNIDADES DE ISOPRENO.
1. Monoterpenos.	10	2
2. Sesquiterpenos.	15	3
3. Diterpenos.	20	4
4. Sesteterpenos.	25	5
5. Triterpenos.	30	6

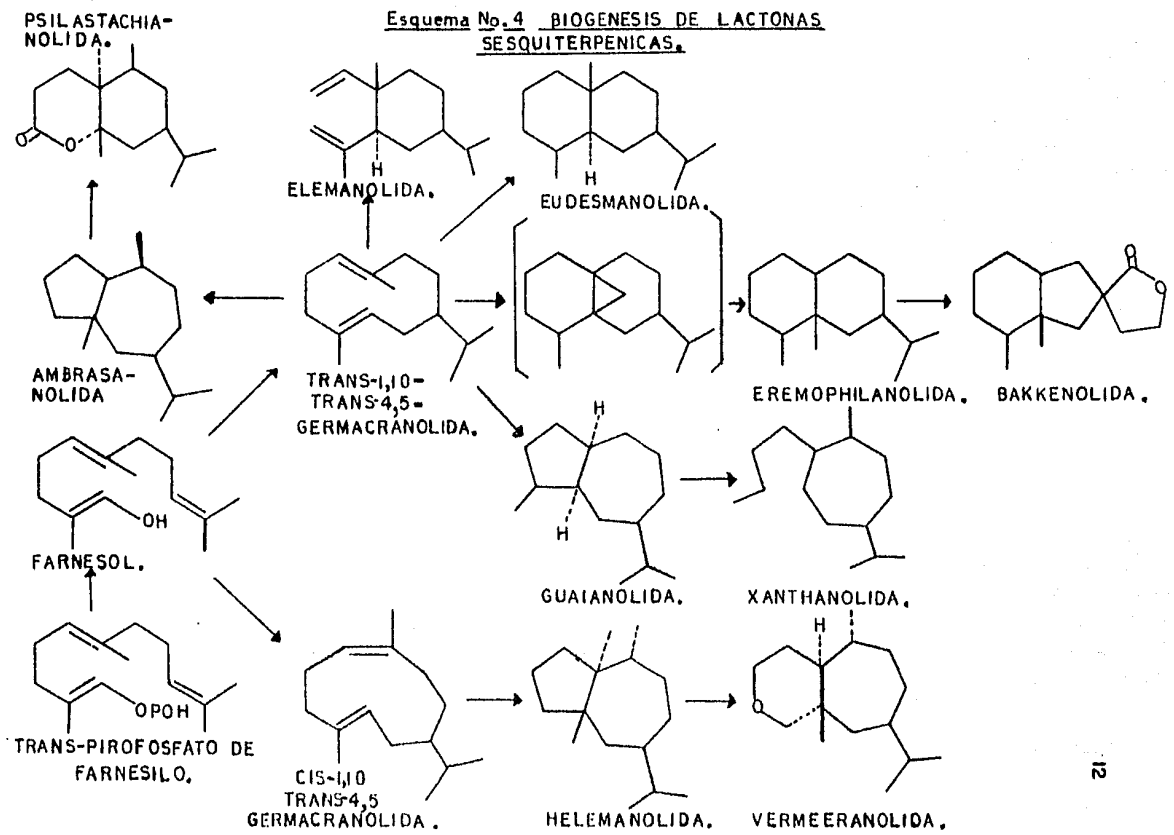
Esquema No. 2 BIOGENESIS DE MONOTERPENOS.



Esqema No. 3 BIÓGENESIS DE DITERPENOS Y TRITERPENOS.



Esquema No. 4 BIÓGENESIS DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS.



RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE LACTONAS SESQUITERPENICAS.

Conociendo las estructuras correctas de las lactonas sesquiterpénicas y habiéndose descubierto entre ellas propiedades biológicas tan importantes, hizo posible que varios investigadores en diversas partes del mundo, se interesaran en dichas sustancias, pues hasta 1974 se conocían alrededor de 600 lactonas sesquiterpénicas y en la actualidad se conocen más de 1,000 diferentes productos naturales de este tipo. (2)

Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos que presentan propiedades biológicas importantes como son:

- a) Citotóxica ó inhibición tumoral.
 - b) Dermatitis de contacto en humanos.
 - c) Inhibición del crecimiento microbiano.
 - d) Inhibición del crecimiento de plantas.
- a) PROPIEDAD CITOTOXICA E INHIBICION TUMORAL.

En investigaciones médicas, sobre la actividad citotóxica e inhibición tumoral de lactonas sesquiterpénicas realizadas por Kupchan y otros investigadores, establecieron que las sustancias biológicamente activas son; alfa-metileno-gama-lactonas, con algunos grupos funcionales como époxi dos, ester no saturado y cetonas.

El Dr. Taboada y otros investigadores realizaron en 1980 una investigación médica sobre la actividad citotóxica e inhibición tumoral de lactonas sesquiterpénicas, aisladas

en México por investigadores del Instituto de Química de la UNAM, informó que algunos de estos compuestos presentaban actividad biológica. Este estudio fué realizado "in vitro" utilizando dos diferentes líneas celulares de cultivo que son las siguientes:

- a) Células fibroblastoides L-929 provenientes de tejido alveolar murino.
- b) Células epiteliales HEp-2, derivadas de carcinoma laríngeo humano.

Y 10 lactonas sesquiterpénicas (Esquema No. 5), de las cuales sólo 8 de estos compuestos mostraron diferente comportamiento en las dos líneas celulares. Como se observa en la tabla No 2. (4)(10)

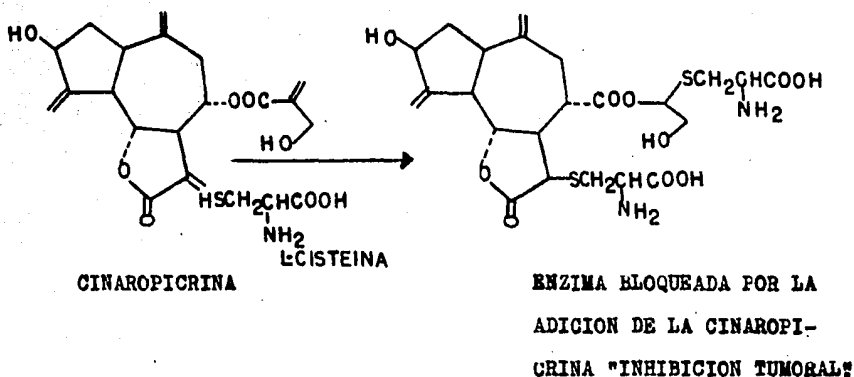
De acuerdo con el protocolo 12 de la revista Cancer Chemotherapy Reports, la DE-50 para extractos de plantas debe ser menor de 30 microgramos/ml, para que se considere como agente potencial anticancerígeno. (4) De todas las lactonas sesquiterpénicas estudiadas, solo 6 fueron capaces de tener actividad anticancerígena para las células L-929 y cinco de ellas para las células HEp-2.

*
DE-50. Dosis de fármaco necesaria para producir una determinada intensidad de efecto, en el 50% de una población.

TABLA No 2.

COMPUESTO.	ED-50 (μ g/ml)	
	L-929	HEp-2
1. Viguiestenina.	5.5	5.6
2. Desacetil Viguiestenina.	15.0	75.0
3. Zerbrevina A.	1.0	12.0
4. Zerbrevina B.	1.0	7.5
5. Zerbrevina C.	55.0	35.0
6. Budleina A.	1.0	31.0
7. Calaxina.	1.0	1.0
8. Orizabina.	4.0	1.0
9. Conchosina A.	66.0	15.0
10. Cinaropicrina.	18.61	32.0

El mecanismo de acción de la actividad citotóxica e inhibición tumoral de lactonas sesquiterpénicas, es debido principalmente a la adición de grupos sulfhidrilos provenientes de enzimas (fosfofructoquinasa, L-cisteína), a un metileno exocíclico conjugado con un grupo carbonilo de lactona o de cetona, esta adición es de tipo Michael, como se muestra en el siguiente esquema.



b) DERMATITIS DE CONTACTO EN HUMANOS.

Michael y otros investigadores han demostrado que algunas lactonas sesquiterpénicas, obtenidas de plantas pertenecientes a la familia de las compuestas, causan alergia al contacto con ellas. Hasta 1977 se ha informado, que 52 de estos compuestos aislados de los géneros; *Ambrosia*, *Parthenium*, *Gaillardia* y *Xanthium*, clínicamente han causado fuertes alergias. (10)

c) INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO MICROBIANO.

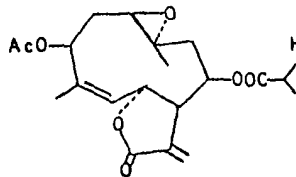
Recientes investigaciones de Mathur sobre terpenoides de *Mikania monagasensis*, mostraron que germacranólidas, dihidrogermacranólidas y diterpenos, fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Candida alb-*

cans. (10)(11) (Esquema No 6)

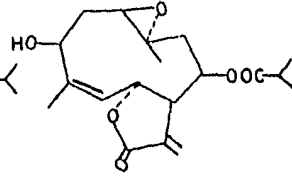
d) INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS.

La vernolapina es un compuesto perteneciente a las lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de elemanólida, obtenida de Vernonia hymenolepsis. Este compuesto mostró inhibición del crecimiento de plantas de trigo, aún cuando estas ya habían sido tratadas con una hormona vegetal conocida como, ácido-3-indol-acético (auxina). (10) (Esquema No. 7)

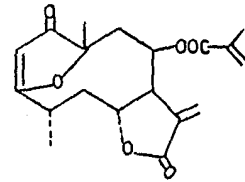
Esquema No 5.



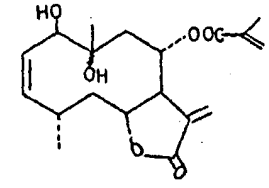
VIGUIESTENINA



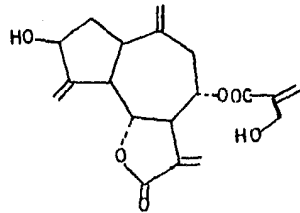
DESACETIL VIGUIESTENINA



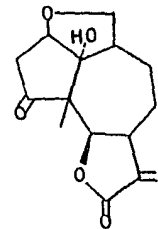
ZEXBREVINA A



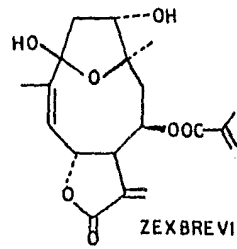
ZEXBREVINA C



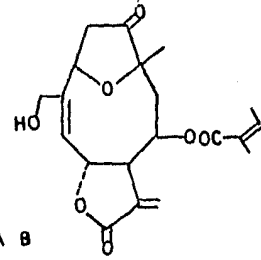
CINAROPICRINA



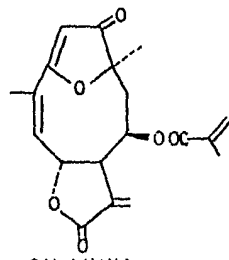
CONCHOSINA A



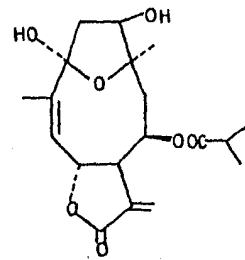
ZEXBREVINA B



BUDLEINA A

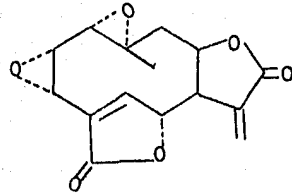


CALAXINA

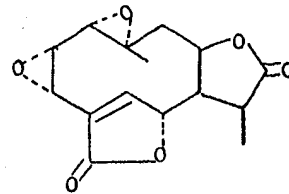


ORIZABINA

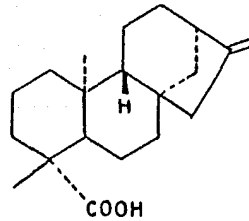
Esquema No 6.



MIKANOLIDA (MK).

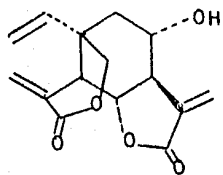


DIHIDRO MIKANOLIDA (DMK).

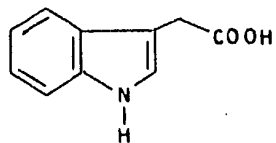


Ac. 16,19-EN-KAURENOICO (KA).

Esquema No.7



VERNOLEPINA.



Ac-3-INDOL-ACETICO.

PARTE EXPERIMENTAL.**I. Otopappus imbricatus.****1. EXTRACTO DE LA PLANTA. Otopappus imbricatus (Yucunduchi Puebla).**

1.7 Kg de flores y hojas de la planta Otopappus imbricatus recolectada en el poblado de Yucunduchi (Puebla) el 7 de agosto de 1984. Fueron extraídos con diclorometano durante 20 días hasta agotamiento, a temperatura ambiente.

2. EXTRACTO DE LA PLANTA. Otopappus imbricatus (Km 129

I. Matamoros a Acatlán Puebla).

1.5 Kg de flores y hojas de la planta Otopappus imbricatus recolectada en el Km 129 de la carretera de Izúcar de Matamoros a Acatlán Puebla, el 7 de agosto de 1984. Fueron extraídos con diclorometano durante 15 días a temperatura ambiente, hasta agotamiento.

3. EXTRACTO DE LA PLANTA. Otopappus imbricatus (1 Km después de Yucunduchi).

650g de flores y hojas de la planta Otopappus imbricatus recolectada a 1 Km después de Yucunduchi (Puebla) rumbo a Oaxaca, el 8 de agosto de 1984. Fueron extraídos con diclorometano durante 15 días hasta agotamiento, a temperatura ambiente.

4. COMPARACION DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS CON ESTANDARES DE OTOIMBRICATINA A Y B.

Se tomaron muestras de 20mg de cada uno de los extractos obtenidos, comparando los compuestos presentes con estandares de otoimbricatina A y B por cromatografía capa fina, eluyendo la placa una sola vez, con diclorometano-acetona (95-5)%, revelando la placa con sulfato cérico y calor.

5. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO Otopappus imbricatus (Yucunduchi).

Los 58.8g de extracto de la planta Otopappus imbricatus del poblado de Yucunduchi (Puebla). Fueron sometidos a cromatografía en columna, usando como adsorbente 1.0 Kg de gel de sílice 60 (35-70 mesh). Posteriormente se recogieron fracciones de diclorometano-acetona, en cantidades crecientes en polaridad de éste último.

6. AISLAMIENTO DE OTOIMBRICATINA B Y COMPARACION CON UN ESTANDAR.

Se reunieron las fracciones de diclorometano-acetona (85-15)%, obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de la planta Otopappus imbricatus de Yucunduchi Puebla, se tomó una muestra de 20mg del producto reunido y se comparó por placa de cromatografía capa fina (CCF)*, con un estandar de otoimbricatina B. La placa fué eluida una sóla

* CCF. La placa fué revelada con sulfato cérico y calor.

véz en diclorometano-acetona (95-5)%, revelando la placa con sulfato cérico y calor.

7. PURIFICACION DE OTOIMBRICATINA B.

Se purificaron 100mg del aceite obtenido de las fracciones de diclorometano-acetona (95-5)%, de la cromatografía en columna, por placa preparativa de gel de sílice F254 (20X20 cm, 1mm de espesor) y se prosiguió a determinar resonancia magnética nuclear protónica y placa de CCF comparativa con un estandar de otoimbricatina B.

8. REACCIONES QUIMICAS EFECTUADAS A LA OTOIMBRICATINA B.

a) HIDROGENACION DE LA OTOIMBRICATINA B.

En un matraz de hidrogenación se puso 200mg de otoimbricatina B, la cual fué disuelta en metanol, se adicionó a la reacción lentamente y con agitación 15mg de PtO_2 (15)% y posteriormente el matraz de reacción fué adaptado al aparato de hidrogenación, permaneciendo la reacción con hidrógeno, a temperatura ambiente y a la presión atmosférica de 760mm de Hg, durante 24 horas.

b) SAPONIFICACION DEL PRODUCTO DE HIDROGENACION DE OTOIMBRICATINA B.

Se pesaron 20mg del producto de hidrogenación de otoimbricatina B, la cual fué disuelta en metanol, se agregó a la reacción 20mg de K_2CO_3 en solución acuosa, dejando la reacción en agitación durante 48 horas, a temperatura am

biente. Posteriormente se adicionó a la reacción HCl al 10% hasta $\text{pH} = 1$ (cierre de la lactona insaturada), se dejó la reacción agitando durante 24 horas, se neutralizó y se evaporó el metanol presente, finalmente se extrajo con 10 porciones de 10ml c/u de diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad.

c) REDUCCION DE OTOIMBRICATINA B CON NaBH_4 EN METANOL.

Se pesaron 100mg de otoimbricatina B, la cual fue disuelta en 40ml de metanol, se agregó a la reacción 100mg de NaBH_4 en solución alcohólica (metanol) y se dejó agitando a reflujo durante 1 hora (la reacción fue controlada por cromatografía capa fina). Posteriormente se acidificó la reacción a $\text{pH} = 1$ dejando en agitación de 20-30 minutos, se neutralizó con NaOH al 5% (exceso de ácido) y se evaporó el metanol presente, finalmente se extrajo con 10 porciones de 10ml c/u de diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró a sequedad.

d) REDUCCION DE OTOIMBRICATINA B CON NaBH_4 EN ISOPROPANOL.

Se pesaron 200mg de otoimbricatina B, la cual fue disuelta en 50ml de alcohol isopropílico, se agregó a la reacción 200mg de NaBH_4 en solución alcohólica/agua (alcohol iso

propílico-agua), dejando en agitación la reacción y a reflujó durante 3 horas (la reacción es controlada por cromatografía capa fina), posteriormente se neutralizó con HCl al 5% y el alcohol isopropílico se evaporó, finalmente se extrajo con 10 porciones de 10ml c/u de diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad.

e) REDUCCION DE OTOIMBRICATINA B CON NaBH_4 EN ISOPROPANOL.

Se pesaron 2.0g de otoimbricatina B la cual fué disuelta con 50ml de isopropanol, se agregó a la reacción 2.0g de NaBH_4 (disuelta en 25ml de isopropanol y 10ml de agua) lentamente y con agitación. Posteriormente la reacción se puso a calentamiento a 60°C durante 72 horas, se neutralizó con HCl al 5% y se evaporó el isopropanol presente, finalmente se extrajo con 6 porciones de 20ml c/u de diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad.

9. AISLAMIENTO DE OTOIMBRICALINA A Y COMPARACION CON UN ESTANDAR.

Se reunieron las fracciones de diclorometano-acetona (95-5) obtenidas de la cromatografía en columna del extracto de la planta Qtopappus imbricatus de Yucunduchi (Puebla). Se tomó una muestra de 20mg del producto reunido de

las fracciones, comparando por placa de cromatografía capa fina (CCF) con un estandar de otoimbricatina A. La placa fue eluida una sola vez con diclorometano-acetona (95-5)% , revelando la placa con sulfato cérico y calor.

10. REDUCCION DE OTOIMBRICATINA A CON NaBH_4

EN METANOL.

Se pesaron 300mg de otoimbricatina A, la cual fue disuelta en 50ml de metanol, se agregó a la reacción 300mg de NaBH_4 en solución alcohólica (metanol), se dejó agitando a temperatura de reflujo durante 1.5 horas (la reacción fue controlada por cromatografía capa fina). Se neutralizó la reacción con HCl 5% y se evaporó el metanol presente, posteriormente se extrajo con 10 porciones de 10ml c/u de diclorometano, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad.

II. Otopappus epaleaceus.

1. EXTRACTO DE LA PLANTA. Otopappus epaleaceus de Cuernavaca Morelos.

230g de flores y hojas de la planta Otopappus epaleaceus recolectada en Cuernavaca (Morelos), el 29 de noviembre de 1984. Fueron extraídos con diclorometano a temperatura ambiente durante 30 días hasta agotamiento.

2. EXTRACTO DE LA PLANTA. Otopappus epaleaceus del río Amacuzac Morelos.

1.180 Kg de flores y hojas de la planta Otopappus epaleaceus recolectada a 7 Km después del río Amacuzac Morelos, en dirección de la carretera México-Acapulco, el 29 de agosto de 1985. Fueron extraídos con hexano durante 15 minutos a temperatura ambiente y con diclorometano durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO DE Otopappus epaleaceus DE GUERNAVACA MORELOS.

Los 9.8g de extracto de la planta Otopappus epaleaceus de Cuernavaca Morelos, fueron sometidos a cromatografía en columna, usando como adsorbente 270g de gel de sílice 60 (35-70 mesh). Posteriormente se recogieron fracciones de hexano-diclorometano y diclorometano-acetona, en cantidades crecientes en polaridad de éste último.

4. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DEL EXTRACTO HEXANICO DE
Otopappus epaleaceus DEL RIO AMACUZAC MORELOS.

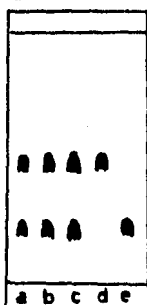
Los 9.0g de extracto hexánico de la planta Otopappus epaleaceus del río Amacuzac Morelos, fueron sometidos a cromatografía en columna, usando como adsorbente 300g de gel de sílice 60 (35-70 mesh). Posteriormente se recogieron fracciones de hexano-diclorometano en cantidades crecientes en polaridad de éste último.

RESULTADOS OBTENIDOS Y ANALISIS.

I. Otopappus imbricatus.

En la cromatografía capa fina de los extractos de las plantas recolectadas en 3 lugares diferentes, se observa la presencia de los compuestos otoimbricatina A y B en cantidades abundantes. (Figura No. 1) La destilación al vacío de los extractos de las plantas Otopappus imbricatus recolectadas en; Yucunduchi (Puebla), Km 129 de la carretera de Izúcar de Matamoros a Acatlán Puebla y 1 Km después de Yucunduchi (Puebla) dieron: 58.8g, 80.7g y 37.0g de extracto de diclorometano respectivamente.

Figura No 1

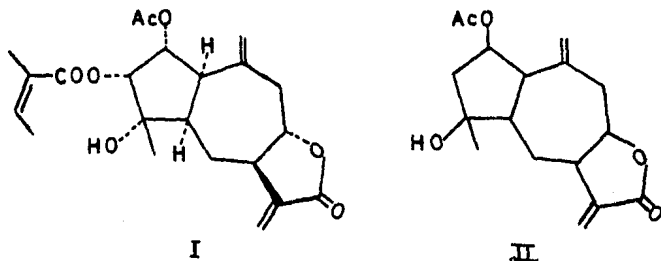


SISTEMA DE ELUCION DICLOROMETANO-ACETONA (95-5)%

- a) Extracto de Yucunduchi (Puebla).
- b) Extracto del Km 129 de I. de Matamoros a Acatlán.
- c) Extracto de 1 Km después de Yucunduchi. dirección Oaxaca.
- d) Estandar de otoimbricatina A. $R_f = 0.6$
- e) Estandar de otoimbricatina B. $R_f = 0.285$

SISTEMA DE REVELADO: sulfato cérico y calor.

Los 58.8g de extracto de la planta *O. imbricatus* de Yucunduchi (Puebla), fueron sometidos a cromatografía en columna. Al reunir las fracciones de diclorometano-acetona (95-5)%, se aisló un sólido que peso 2.5g el cual por cromatografía capa fina se identificó con otoimbricatina A (I) y al reunir las fracciones de diclorometano-acetona (85-15)%, se aisló un aceite que pesó 13.5g el cual por cromatografía capa fina se identificó como otoimbricatina B (II).



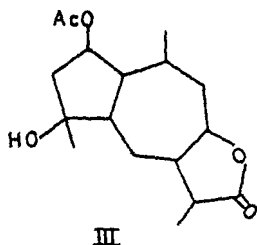
Se decidió trabajar primero con la otoimbricatina B, debido a que el objetivo principal de este trabajo fué: Preparar un derivado cristalino apropiado de dicho compuesto, para que mediante la técnica de difracción de rayos "x" se pudiera determinar su estereoquímica relativa.

Se procedió a purificar 100mg de otoimbricatina B por placa preparativa de gel de sílice F₂₅₄, identificando a dicho compuesto por espectroscopía mediante; resonancia

magnética nuclear protónica (RMN¹H), (espectro No. 1). En dicho espectro se observan señales en; 6.18ppm (J=4Hz) y 5.49 ppm (J=4Hz) aparecen dos dobletes que corresponden a los hidrógenos (protones) 13b y 13a del metileno exocíclico conjugado con ϵ -lactona respectivamente, en 5.25ppm (J=8Hz) aparece un cuarteto que corresponde al protón 2 base del acetato, esta señal esta sobrepuesta con un singulete ancho en 5.1ppm que corresponde a los protones 14a y 14b del metileno exocíclico sobre carbono 10, en 2.04ppm aparece un singulete que corresponde al metilo del acetato, en 1.24ppm aparece un singulete que corresponde al metilo cuaternario sobre carbono 4 y en 3.90ppm aparece una señal d,d,d (J=6Hz, 9Hz, 9Hz) que corresponde al protón 8 base de la lactona insaturada.

Se procedió a hidrogenar la otoimbricatina B, poniendo a reaccionar 200mg de dicho compuesto con 15% de PtO₂ en metanol. Se obtuvieron 160mg de un aceite, separando por placa preparativa de gel de sílice F₂₅₄ la mancha principal, obteniendo 25mg de un aceite que resultó ser la 11,13-10,14-tetrahidro-otoimbricatina B (III), la cual fué identificada por espectroscopía mediante RMN¹H (espectro No. 2). En dicho espectro se observan señales en; 5.0ppm (J=8Hz) aparece un cuarteto que corresponde al protón 2 base del acetato, en 4.125ppm aparece una señal d,d,d (J=6Hz, 9Hz, 9Hz) que correge

ponde al protón δ base de la lactona saturada, en 2.075ppm aparece un singulete que corresponde al metilo del acetato y en 1.27ppm aparece un singulete que corresponde al metilo cuaternario sobre carbono 4. Al comparar los espectros 1 y 2 las señales que desaparecen son; los dobletes de los protones 13b y 13a del metileno exocíclico conjugado con α -lactona y el singulete ancho del metileno exocíclico sobre carbono 10, en su lugar aparecen las señales siguientes; en 1.25ppm ($J=7\text{Hz}$) un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 11 y en 1.075ppm ($J=7\text{Hz}$) un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 10.



Siguiendo el la búsqueda de un derivado cristalino apropiado de la otoimbricatina B, se prosiguió a saponificar la 11,13-10,14-tetrahidro-otoimbricatina B, haciendo reaccionar 20mg de dicho compuesto con 20mg de K_2CO_3 en metanol/agua, obteniendo finalmente 20mg de un producto cris-

talino con punto de fusión (194-195)^o C, este producto se identificó como la desacetil-11,13-10,14-tetrahidro-otoimbricatina B (IV), por espectroscopía mediante RMN¹H, infrarrojo (IR) y masas (EM).

En el espectro de IR (espectro No 3), se observa una banda en 3272cm^{-1} que corresponde a OH, en 1774cm^{-1} una banda que corresponde a α -lactona saturada. En el espectro de RMN¹H (espectro No.4), se observan las siguientes señales; en 4.0ppm aparece una señal d,d,d (J=6Hz, 9Hz, 9Hz) que corresponde al protón 8 base de la α -lactona saturada, en 1.2 ppm (J=7Hz) aparece un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 11, en 1.04ppm (J=7Hz) aparece un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 10 y en 1.14ppm aparece un singulete que corresponde al metilo sobre carbono 4. Comparando el espectro 4 con el 2 se observa que; la señal del protón 2 base del acetato se desplaza y la señal del metilo del acetato desaparece. En el espectro de masas (espectro No 5), se observan dos pérdidas de agua; fragmentos m/z 250 y m/z 232, y un fragmento m/z 235 por pérdida de (H₂O + CH₃) a partir del ión molecular M⁺268 que no se observa, para una fórmula condensada C₁₅ H₂₄ O₄.

A la desacetil-11,13-10,14-tetrahidro-otoimbricatina B, se le hicieron pruebas de cristalización para obtener cristales apropiados y así poder determinar mediante di

fracción de rayos "x" la estereoquímica relativa de la otombricatina B. (tabla No 3).

TABLA No. 3.

**SOLVENTES USADOS EN LA
CRISTALIZACION DEL COM-
PUESTO IV.**

TIPO DE CRISTAL OBTENIDO DEL COMPUESTO IV.

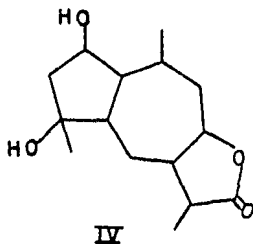
a) Acetona-Eter isopropílico (80-20).		Agujas delgadas grandes
b) Diclorometano (DCM)	100	Agujas delgadas grandes
c) Acetona (AC)	100	Agujas pequeñas.
d) AC-Agua	(80-20)	Polvo blanco amorfo.
e) AC- Benceno	(80-20)	Agujas pequeñas.
f) Acetato etilo-hexano	(80-20)	Agujas grandes anchas.
g) Etanol-agua	(80-20)	Agujas pequeñas.
h) DCM-Eter isopropílico	(80-20)	Agujas pequeñas.
i) Etanol-Eter isopropílico	(50-50)	Agujas pequeñas.
j) DCM-Benceno	(70-30)	Agujas pequeñas.
k) Acetona-Etanol	(50-50)	Polvo blanco amorfo.
l) Acetato etilo-DCM	(80-20)	Agujas grandes en forma de plumas.

Los cristales obtenidos con los disolventes b, f y l fueron enviados al departamento de difracción de rayos "x", obteniendo lo siguiente:

- a) Los cristales no difractaron la luz.
- b) Los cristales grandes eran asociaciones de pequeños

cristales.

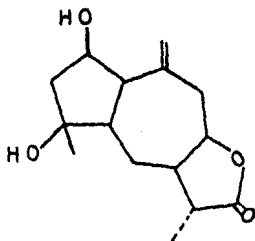
c) Los cristales no estaban bien formados.



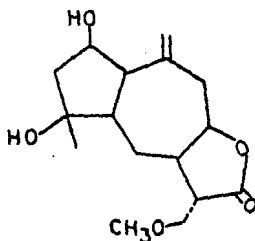
Posteriormente se hicieron reaccionar 100mg de otoimbricatina B con 100mg de NaBH_4 en metanol, obteniendo de la reacción 50mg de un aceite el cual se identificó como una mezcla de la desacetil-11,13-dihidro-otoimbricatina B (V) y la desacetil-13-metoxi-11,13-dihidro-otoimbricatina B (VI), por espectroscopía mediante RMN¹H e IR.

En el espectro de IR (espectro No 6), se observan bandas en 3603cm^{-1} y 3483cm^{-1} que corresponden a OH, en 1776cm^{-1} que corresponde a la σ -lactona saturada y en 1638cm^{-1} que corresponde a dobles enlaces. Con las señales del espectro de RMN¹H (espectro No 7) se identificó la mezcla de los compuestos V y VI, debido a que aparecen en 3.36ppm un singlete que corresponde al metilo del metoxilo unido a carbono 13 por adición tipo Michael y en 1.20ppm ($J=7\text{Hz}$) un doblete que

corresponde al metilo sobre carbono 11. Comparando este espectro con el número 2 se observa un desplazamiento de la señal que corresponde al protón 2 base del acetato y desaparecen las señales que corresponden al metilo del acetato y de los protones 13a y 13b del metileno exocíclico conjugado con α -lactona, por lo que los compuestos obtenidos también fuerón saponificados.



V



VI

Con el objeto de preparar el compuesto V puro, se hicieron reaccionar 200mg de otoimbricatina B con 200mg de NaBH_4 en isopropanol, obteniendo 50mg de un aceite el cual por cromatografía capa fina mostraba 2 manchas, que fueron separadas por placa preparativa F254, obteniendo los compuestos siguientes; la 11,13-dihidro-otoimbricatina B (VII) en forma de aceite y la desacetil-11,13-dihidro-otoimbricatina B (VIII) cristales en forma de agujas con punto de fusión $(120-122)^\circ\text{C}$. Ambos compuestos fueron identificados por

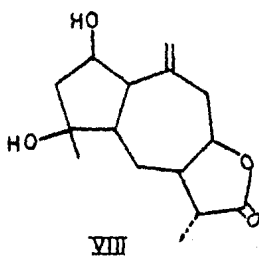
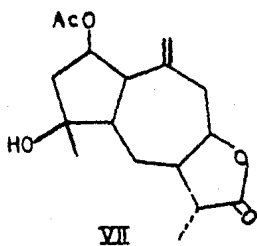
espectroscopía mediante RMN'H, IR y masas.

ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS DE LA 11,13-dihidro-
otoimbricatina B.

En el espectro de IR (espectro No 8) se observa una banda en 3590cm^{-1} que corresponde a OH, en 1765cm^{-1} una banda que corresponde a σ -lactona saturada, en 1725cm^{-1} una banda que corresponde al acetato y en 1635cm^{-1} una banda que corresponde a dobles enlaces. En el espectro de RMN'H (espectro No 9) se observan las siguientes señales; en 5.25ppm (J=8Hz) aparece un cuarteto que corresponde al protón 2 base del acetato, en 5.07ppm aparece un singulete ancho que corresponde a los protones del metileno exocíclico sobre carbono 10, en 3.80ppm aparece un d,d,d (J=6Hz,9Hz,9Hz) que corresponde al protón 8 base de la σ -lactona saturada, en 2.0 ppm aparece un singulete que corresponde al metilo del acetato, 1.22ppm (J=7Hz) aparece un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 11 y en 1.20ppm aparece un singulete que corresponde al metilo cuaternario sobre carbono 4. En el espectro de masas (espectro No 10) se observa el fragmento m/z 43 picó base correspondiente al ión acetonio $\text{CH}_3\text{-C}=\overset{+}{\text{O}}$, el fragmento m/z 248 por pérdida de ácido acético (CH_3COOH) a partir del ión molecular M^+ 308 que no se observa, para una fórmula condensada $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5$.

ANÁLISIS DE LOS ESPÉCTROS DE LA desacetil-11.13-
dihidro-otoimbricatina B.

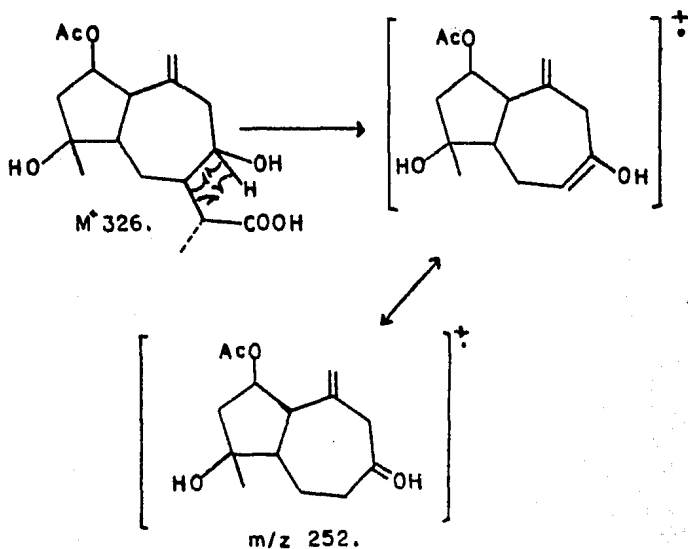
En el espectro de IR (espectro No 11) se observa una banda en 3590cm^{-1} que corresponde a OH, en 1768cm^{-1} una banda que corresponde a σ -lactona saturada y 1635cm^{-1} una banda que corresponde a dobles enlaces. En el espectro de RMN¹H (espectro No 12) se observan las siguientes señales; en 5.02 ppm y en 5.12ppm dos singuletes anchos que corresponden a los protones 14b y 14a respectivamente, del metileno exocíclico sobre carbono 10, en 4.37ppm aparece una señal d, d, d. ($J=6\text{Hz}, 9\text{Hz}, 9\text{Hz}$) que corresponde al protón 8 base de la lactona saturada, en 1.27ppm aparece un singulete que corresponde al metilo cuaternario sobre carbono 4 y en 1.25ppm ($J=7\text{Hz}$) aparece un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 11. En el espectro de masas (espectro No 13) se observan dos pérdidas de agua para los fragmentos m/z 248 y m/z 230, y un fragmento m/z 233 por pérdida de $(\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3)$, a partir del ión molecular $M^+ 266$ que no se observa, para una fórmula condensada $\text{C}_{15} \text{H}_{22} \text{O}_4$.



Nuevamente se realizó la reducción de la otoimbricatina B, cambiando las condiciones de reacción. Se pusieron a reaccionar 2.0g de otoimbricatina B con 2.0g de NaBH_4 en isopropanol a temperatura constante de 60°C durante 72 horas, obteniendo 600mg de un aceite el cual fué purificado por cromatografía en columna, usando como adsorbente 12g de gel de sílice 60 (35-70mesh). De las fracciones obtenidas se aislaron 140mg de un aceite, el cual se identificó como ácido guaian-2-acetoxi-4,8-dihidroxi-10,14-en-12-oico (IX), por espectroscopía mediante RMN¹H, IR y masas.

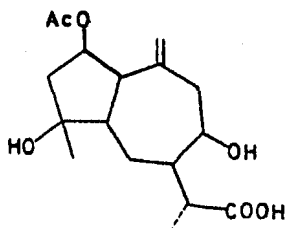
En el espectro de IR (espectro No 14) se observan; una banda en 3250cm^{-1} que corresponde a los OH presentes, principalmente al OH del ácido orgánico, en 1720cm^{-1} una banda ancha que corresponde a dos señales sobrepuestas; para carbonilo del ácido orgánico y acetato, en 1640cm^{-1} una banda que corresponde a dobles enlaces. En el espectro de RMN¹H (espectro No 15) se observan las siguientes señales; en 5.20ppm ($J=8\text{Hz}$) aparece un cuarteto no muy claro que corresponde al protón 2 base del acetato, en 4.95ppm aparece un singulete ancho que corresponde al metileno exocíclico sobre carbono 10, los protones de los OH presentes en la molécula aparecen en 2.27ppm, esta señal desaparece al agregar D_2O , en 2.0ppm aparece un singulete que corresponde al metilo del acetato sobre carbono 2, en 1.27ppm aparece un singulete que corres

ponde al metilo cuaternario sobre carbono 4 y en 0.80ppm ($J=7\text{Hz}$) aparece un doblete que corresponde al metilo sobre carbono 11. En el espectro de masas (espectro No 16) se observa un fragmento m/z 252 por pérdida de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$, apartir del ión molecular M^+ 326 que no se observa, como se muestra en el siguiente esquema.



También se observa el fragmento m/z 234 por pérdida de agua y el fragmento m/z 219 por pérdida de $(\text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3)$ apartir del ión formado por el fragmento m/z 252, para una

fórmula condensada $C_{17} H_{26} O_6$.

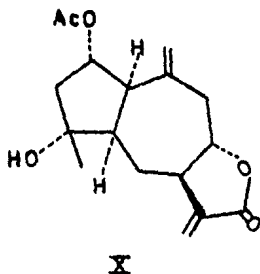


IX

Ninguno de los derivados preparados de la otoimbricatina B (II), presentó propiedades apropiadas para determinar la estereoquímica de dicho compuesto, mediante difracción de rayos "x". Comparando el espectro de RMN¹H de la otoimbricatina B (espectro No 1) con el espectro de RMN¹H de la otoimbricatina A (espectro No 17), la señal d,d,d ($J=6\text{Hz}$, 9Hz , 9Hz) del protón 8 base de la lactona insaturada es la misma, por lo que la δ -lactona está cerrada en carbono 8.

La estructura y la estereoquímica relativa de la otoimbricatina A (I), fué propuesta mediante espectroscopía y difracción de rayos "x", la estructura de la otoimbricatina B (II), fué propuesta por espectroscopía y reacciones químicas. Tomando en cuenta que ambos compuestos fueron aislados de la misma planta y suponiendo que fueron sintetizados por la misma ruta biogénica, se propone que la estereoquí

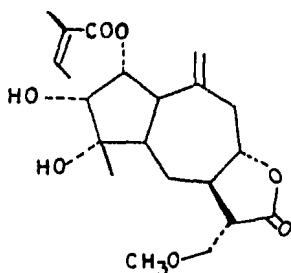
nica de la otoimbricatina B, es la misma que en la otoimbricatina A, como se muestra en la estructura (X).



Con el objetivo de ver si el NaBH_4 también reduce a los ésteres de la otoimbricatina A (I), se procedió a realizar la reducción de dicho compuesto, haciéndolo reaccionar con NaBH_4 en metanol-agua, obteniendo 60mg de un aceite el cual fué purificado por placa preparativa de gel de sílice F_{254} , identificando al compuesto por espectroscopía mediante RMN¹H, IR y masas como guaian-2-angeloiloxi-3,4-dihidroxi-13-metoxi-10,14-en-8 α -12-olida. (XI)

En el espectro de IR (espectro No 18) se observa una banda en 3450cm^{-1} que corresponde a los OH, en 1770cm^{-1} una banda que corresponde a σ -lactona saturada, en 1705cm^{-1} una banda que corresponde al angelato y en 1635cm^{-1} una banda que corresponde a dobles enlaces. En el espectro de RMN¹H (espectro No 19) se observan las siguientes señales; en 6.10ppm

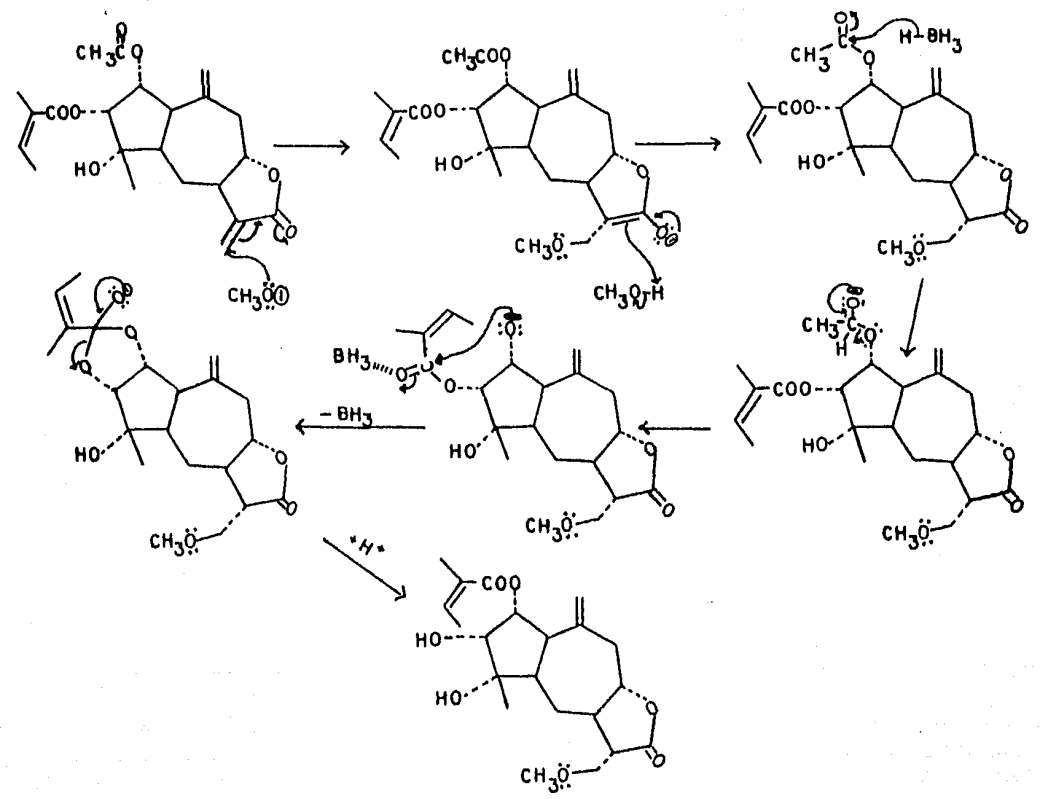
($J=7\text{Hz}$) que corresponde al protón vinílico del angelato, en 5.42ppm aparece una señal d,d ($J=4\text{Hz}$, 8Hz) que corresponde al protón 2 base del angelato, en 5.12ppm aparece un singulete ancho que corresponde al metileno exocíclico sobre el carbono 10, en 4.37ppm ($J=4\text{Hz}$) aparece un dobleta que corresponde al protón 3 base del alcohol, en 3.67ppm ($J=4\text{Hz}$) aparece la señal que corresponde a los protones del metileno sobre carbono 11, en 3.36ppm aparece un singulete que corresponde al metilo del metoxilo sobre carbono 13, en 1.95 ppm se observan sobrepuestas las señales que corresponden a los metilos vinílicos del angelato y en 1.15ppm aparece un singulete que corresponde al metilo cuaternario sobre carbono 4. En el espectro de masas (espectro No 20) se observa la pérdida del ión angelonio m/z 83 (100%) y la pérdida del ácido angelico como fragmento m/z 294, a partir del ión molecular M^+ 394 que no se observa, para una fórmula condensada $C_{21} H_{30} O_7$.



XI

En la reducción de la otoimbricatina A, se propone que el NaBH_4 reduce el ester del acetato a el alcohol correspondiente, provocando una trans-esterificación en la molécula y así obtener la guaian-2-angeloiloxi-3,4-dihidroxi-13-metoxi-10,14-en-8 α -12-clida, por lo que se propone el siguiente mecanismo de reacción. (Esquema No 8)

Esquema No. 8.



II. Otopappus epaleaceus

En la cromatografía capa fina de los extractos de las plantas recolectadas en dos lugares diferentes, se observa que la composición metabólica no es constante. (Figura No 2) La destilación al vacío de los extractos de las plantas Otopappus epaleaceus recolectadas en; Cuernavaca (Morelos) y 7Km después del río Amacuzac (Morelos) dieron; 9.8g de extracto de diclorometano y (9.0g de extracto hexánico, 10.0g de extracto de diclorometano) respectivamente.

Figura No 2



SISTEMA DE ELUCION DICLOROMETANO-ACETONA (95-5)%

- a) Extracto de Otopappus epaleaceus de Cuernavaca (Morelos).
- b) Extracto de Otopappus epaleaceus de 7Km después del río Amacuzac (Morelos).

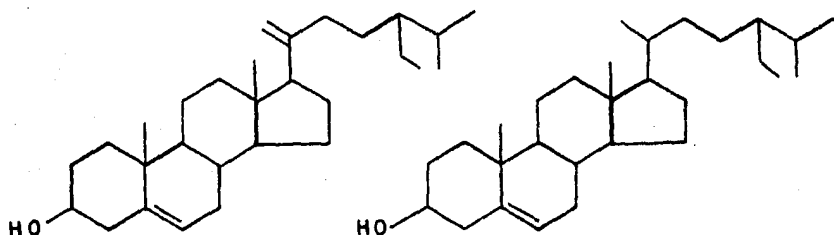
Los 9.8g del extracto de diclorometano de la planta Otopappus epaleaceus de Cuernavaca (Morelos), fueron sometidos a cromatografía en columna. Al reunir las fracciones de diclorometano-acetona (95-5)%, se aisló un aceite que

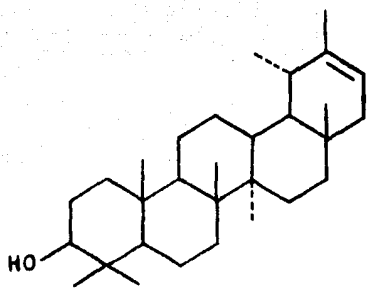
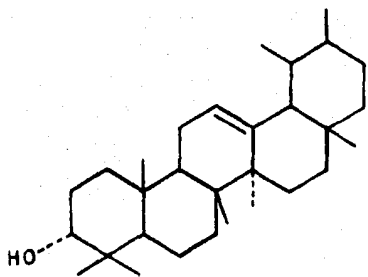
pesó 1.3g el cual se purificó por placa preparativa de gel de sílice F254, obteniéndose finalmente 30mg de un producto sólido con punto de fusión (132-134)°C, al cual se le detejminó espectroscopía; RMN'H, IR y masas.

En el espectro de IR (espectro No 21), se observa una banda a 3605cm^{-1} que corresponde a OH, en 1765cm^{-1} una banda que corresponde a σ -lactona y en 1655cm^{-1} una banda que corresponde a dobles enlaces. En el espectro de RMN'H (espectro No 22), las señales no son muy claras por lo que no es posible proponer una estructura correcta. En el espectro de masas (espectro No 23), sólo se observa un fragmento m/z 246 debido a la pérdida de ácido acético, apartir del ión molecular M^+306 . Con los datos de los tres espectros sólo se piensa que el compuesto pudiera ser una lactona sesquiterpénica.

Los 9.0g de extracto hexanico de la planta Otopappus epaleaceus del río Amacuzac (Morelos), fueron sometidos a cromatografía en columna. Al reunir las fracciones de hexano-diclorometano (60-40)%, se aislaron 250mg de un sólido, el cual se purificó por placa preparativa de gel de sílice F254, con punto de fusión (138-139)°C. Este compuesto sólido se identificó como una mezcla de triterpénos pentacíclicos, β -sitosterol y 20,21-dihidro- β -sitosterol (XII), por espectroscopía mediante RMN'H, IR y masas. (espectros 24,25

y 26 respectivamente). Al reunir las fracciones de hexano-diclorometano (80-20)%, se aislarón 360mg de un sólido el cual se purificó por placa preparativa F₂₅₄, con punto de fusión (213-214)°C. Este producto se identificó como α -tara xasterol (XIII), por espectroscopía mediante RMN¹H, IR y masas (espectros 27, 28 y 29 respectivamente). Al reunir las fracciones de hexano-diclorometano (70-30)%, se aisló 1.0g de un sólido el cual se purificó por placa preparativa de gel de sílice F₂₅₄, con punto de fusión (177-178)°C. Este compuesto se identificó como α -amirina (XIV), por espectroscopía mediante RMN¹H, IR y masas (espectros 30, 31 y 32 respectivamente). Los tres triterpénos pentacíclicos aislados de esta planta ya se encuentran reportados en la literatura (referencias 12, 13 y 14).



**XIII****XIV**

CONCLUSIONES.

En el estudio comparativo de la planta Otopappus imbricatus recolectada en tres lugares diferentes, se llegó a la conclusión de que la época y el lugar de recolección, no afecta la composición metabólica de dicha planta, por lo que se considera importante para su clasificación quimiota-xonómica.

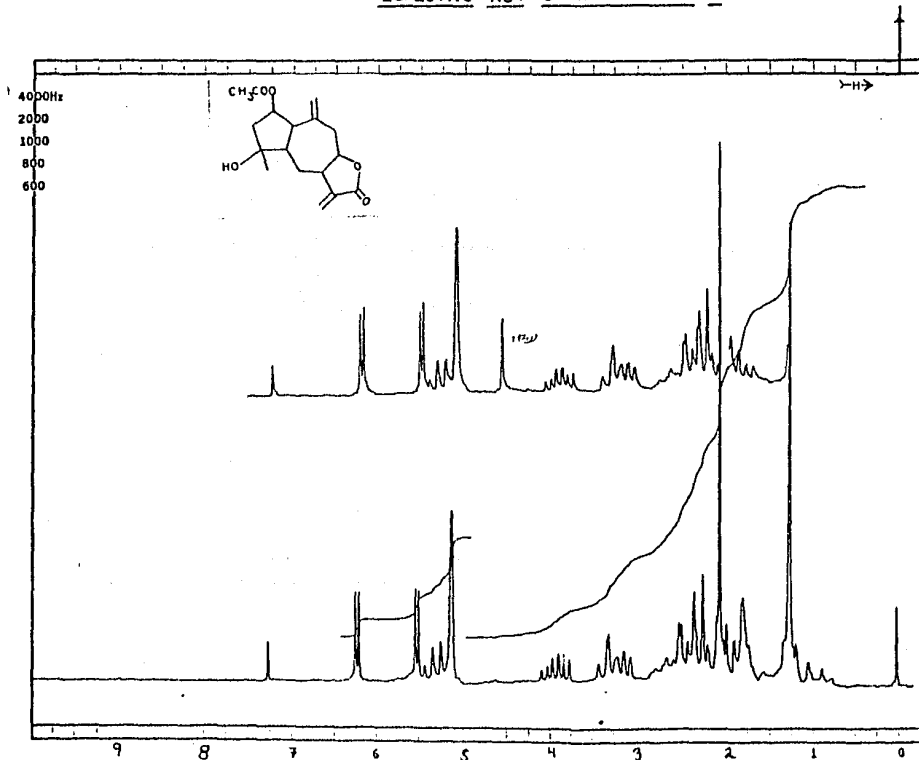
En el estudio comparativo de la planta Otopappus apaleacens recolectada en dos lugares diferentes, se llegó a la conclusión de que la época y el lugar de recolección, si afectan la composición metabólica de esta planta.

También se prepararon varios derivados de la otoimbricatina B, para determinar la estereoquímica relativa de dicho compuesto. De todos los derivados preparados, solo la desacetil-11,13-10,14-tetrahidro-otoimbricatina-B presentó propiedades cristalinas, que no fueron las adecuadas para determinar la estereoquímica relativa de la otoimbricatina B, mediante la técnica de difracción de rayos "x". Se propone que la estereoquímica de la otoimbricatina B sea la misma que la de la otoimbricatina A, por ser aislados ambos compuestos de la misma planta.

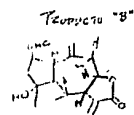
En la reducción de la otoimbricatina A y la otoimbricatina B con NaBH_4 , se llegó a la conclusión de que los

esteres de tipo acetato son reducidos al alcohol correspondiente, indicando que esta reaccion es poco frecuente, ademas de reducir al metileno exociclico conjugado con δ -lactona.

ESPECTRO No 1 OTOIMBRICATINA B



FT-80A SPECTRUM NO. 5241
 OPERATOR TR DATE 6-21-88
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE OTOIMBRICATINA B



LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL _____
 SPIN RATE _____ rps. TEMP. °C _____
 INSERT _____ mm

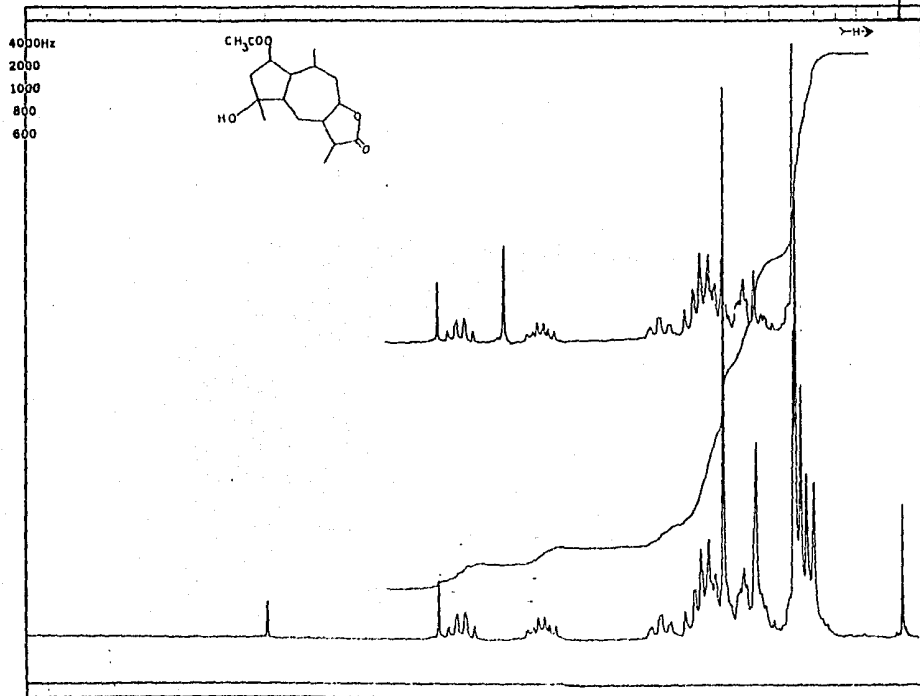
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 1500 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec.
 PULSE DELAY (PD) _____ sec.
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) 80 Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

**ESPECTRO No 2 1113-10J4-TETRAHIDRO-
OTOIMBRICATINA B**



FT-80A SPECTRUM NO. _____
 OPERATOR _____ DATE _____
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE _____

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL _____
 SPIN RATE _____ rps. TEMP. _____ °C
 INSERT _____ mm

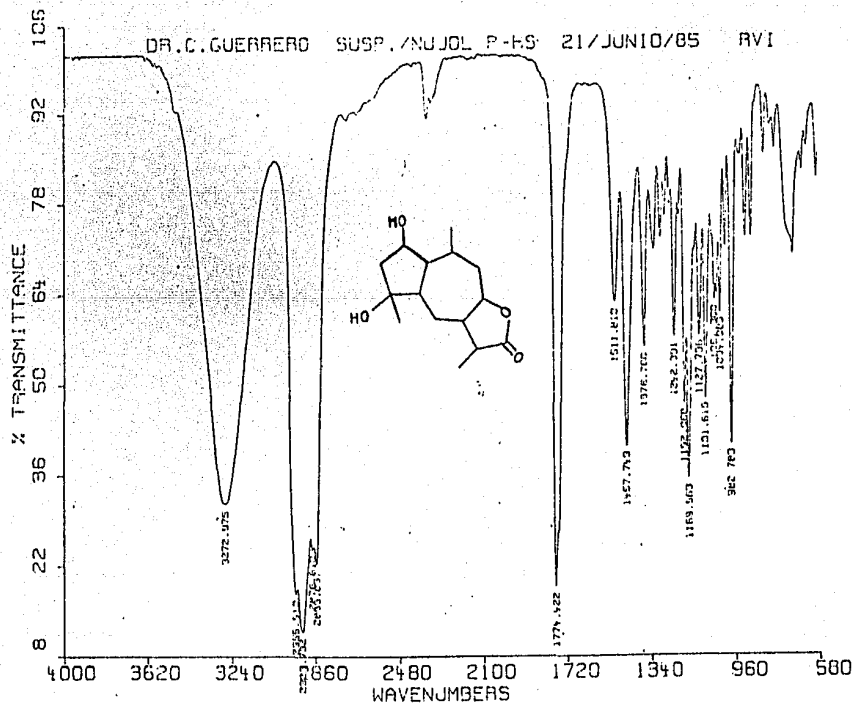
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec.
 PULSE DELAY (PD) _____ sec.
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

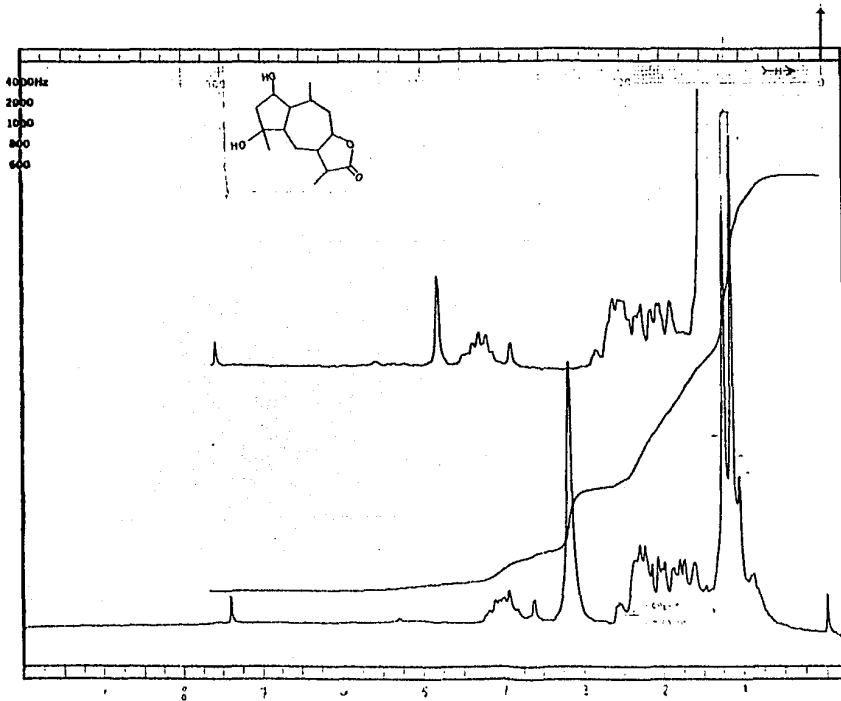
DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

ESPECTRO N° 3 DESACETIL-11,13-10,14-
TETRAHIDRO-OTOIMBRICATINA B



ESPECTRO No4 DESACETIL-143-10,14-
TETRAHIDRO-OTOIMBRICATINA B



FT-80A SPECTRUM NO. 5827
 OPERATOR RL DATE 12-1-76
 NUCLEUS 1H FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE GRUEPES 50

P-113

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL 1.000 - PH80
 SPIN RATE _____ RPM TEMP °C _____
 INSERT _____ min

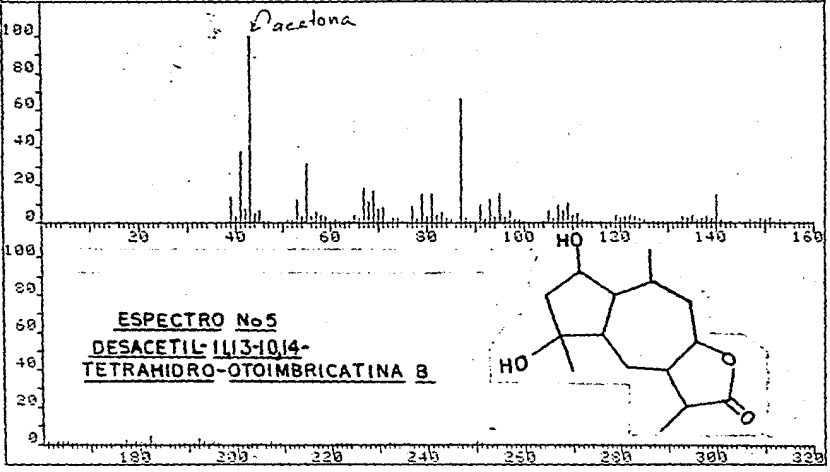
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 12.00 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) 30
 ACQUISITION TIME (AT) 2 sec
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec
 PULSE DELAY (PD) _____ sec
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

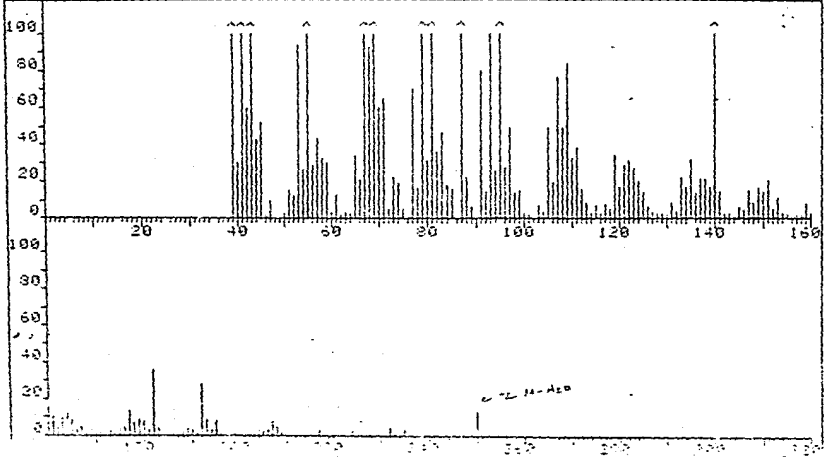
DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SEL) _____ sec
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) 600 Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) 1.000

FRN 5264	SPECTRUM 38	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.1, 100.0	87.2, 66.3	41.1, 37.7 55.2, 31.7
LAST 4: 236.3, .2	250.4, 1.6	251.4, .2 314.4, .1
		PAGE 1 Y = 1.00

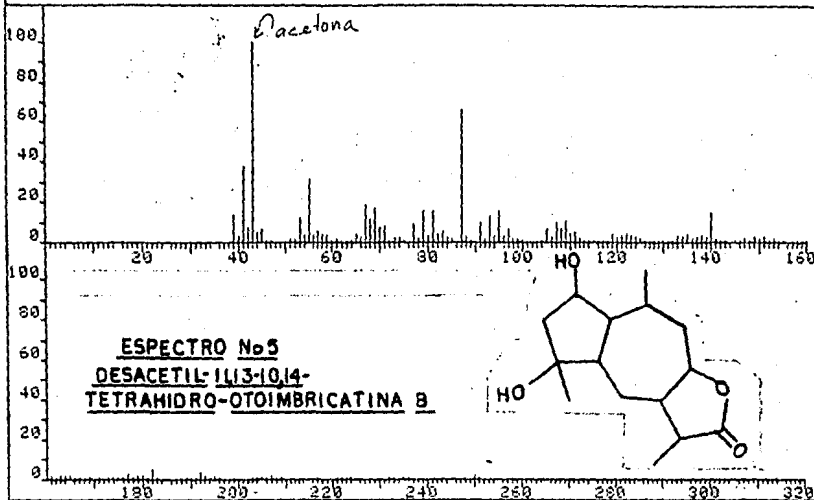


D. C. Gro. pm=332 P-45 CF=194-5°C

FRN 5264	SPECTRUM 38	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.1, 100.0	87.2, 66.3	41.1, 37.7 55.2, 31.7
LAST 4: 236.3, .2	250.4, 1.6	251.4, .2 314.4, .1
		PAGE 1 Y = 8.00

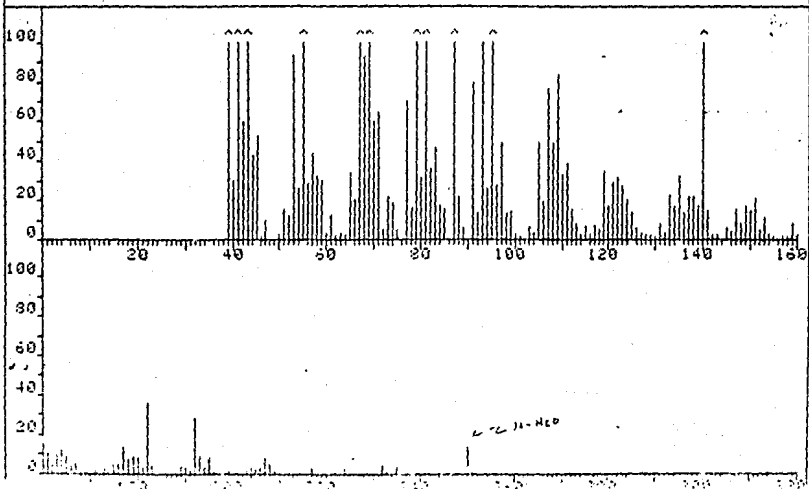


FRN 5264	SPECTRUM 88	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.1, 100.0	87.2, 66.3	41.1, 37.7 55.2, 31.7
LAST 4: 236.3, .2	250.4, 1.6	251.4, .2 314.4, .1
		PAGE 1 Y = 1.00

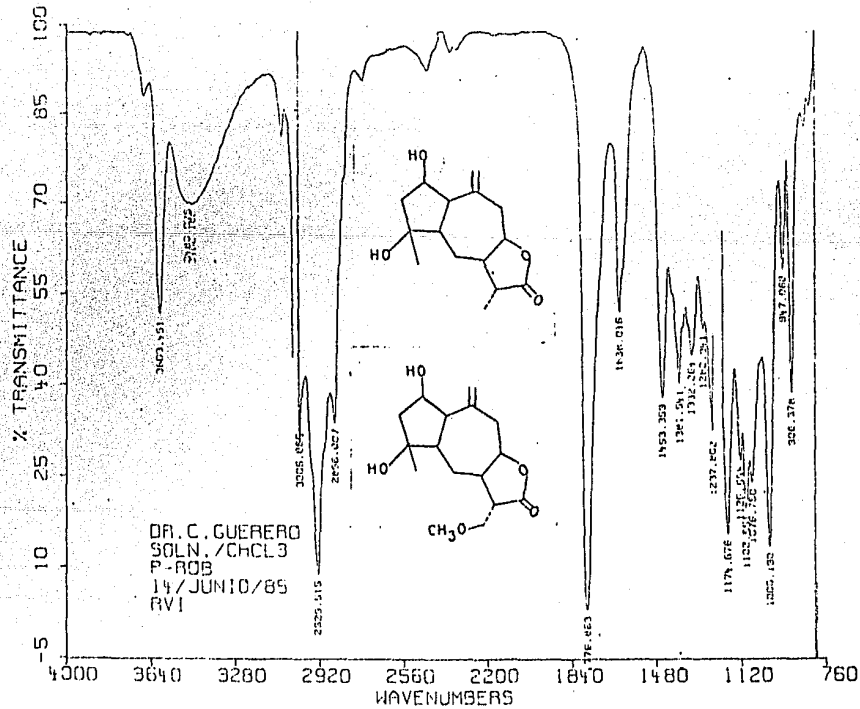


D. C. Bro. pm=332 P-45 ff=194-50

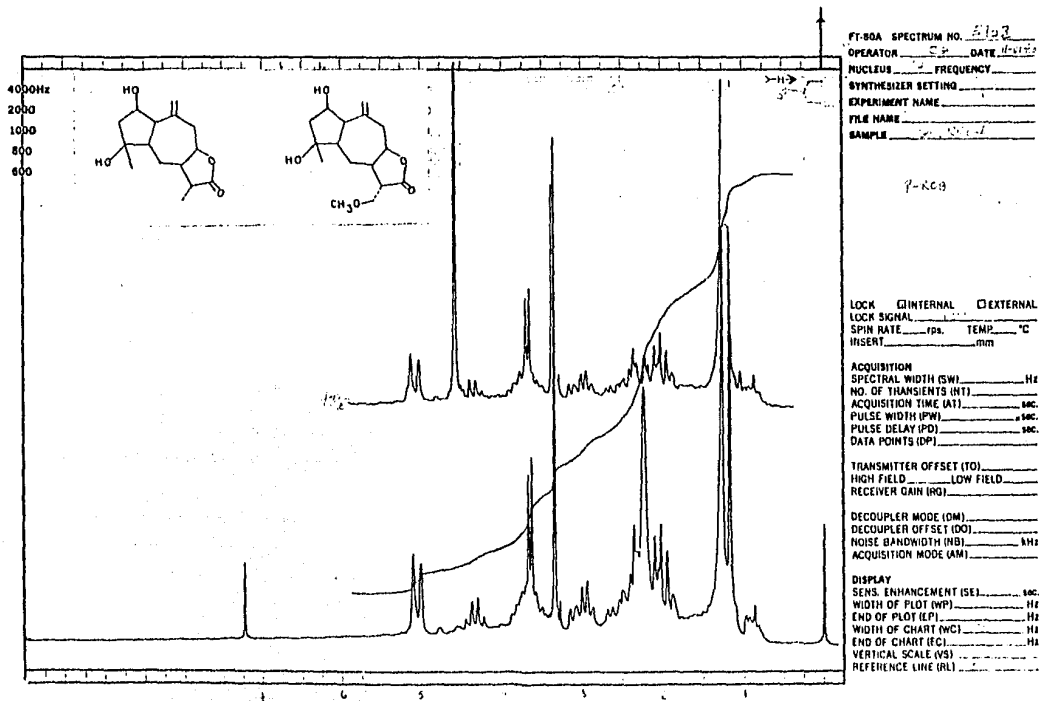
FRN 5264	SPECTRUM 88	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.1, 100.0	87.2, 66.3	41.1, 37.7 55.2, 31.7
LAST 4: 236.3, .2	250.4, 1.6	251.4, .2 314.4, .1
		PAGE 1 Y = 8.00



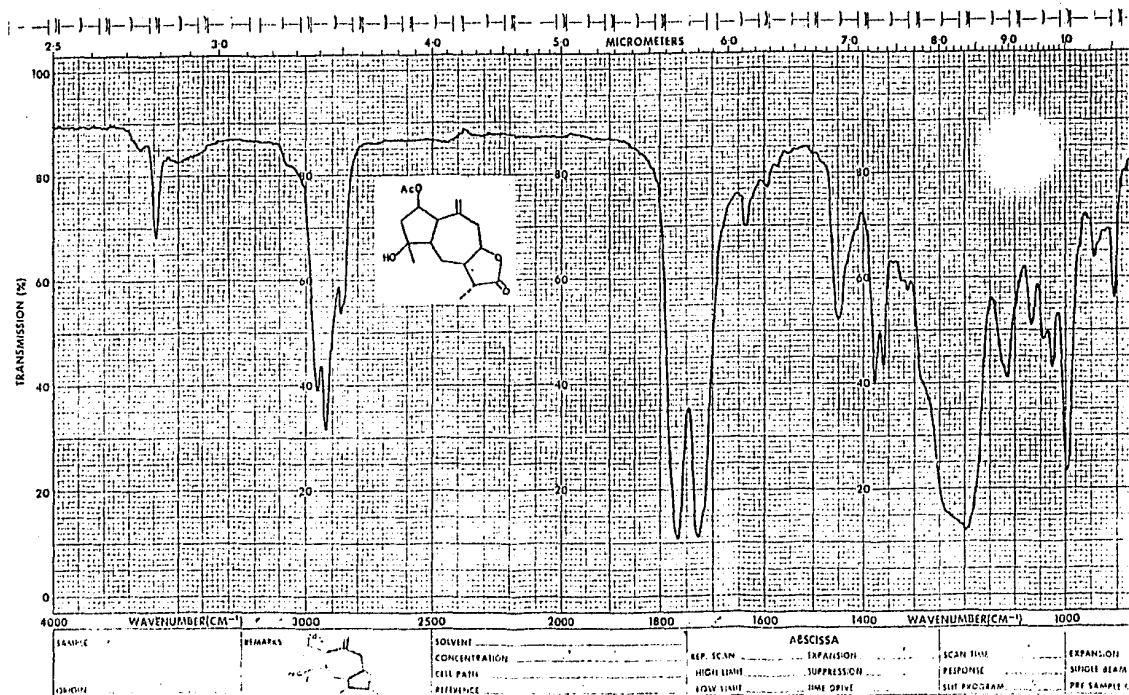
**ESPECTRO N°6 DESACETIL-1,1,3-DIHIRO-O-TOIMBRICATINA B
Y LA DESACETIL-1,3-METOXI-1,1,3-DIHIRO-O-TOIMBRICATINA B**



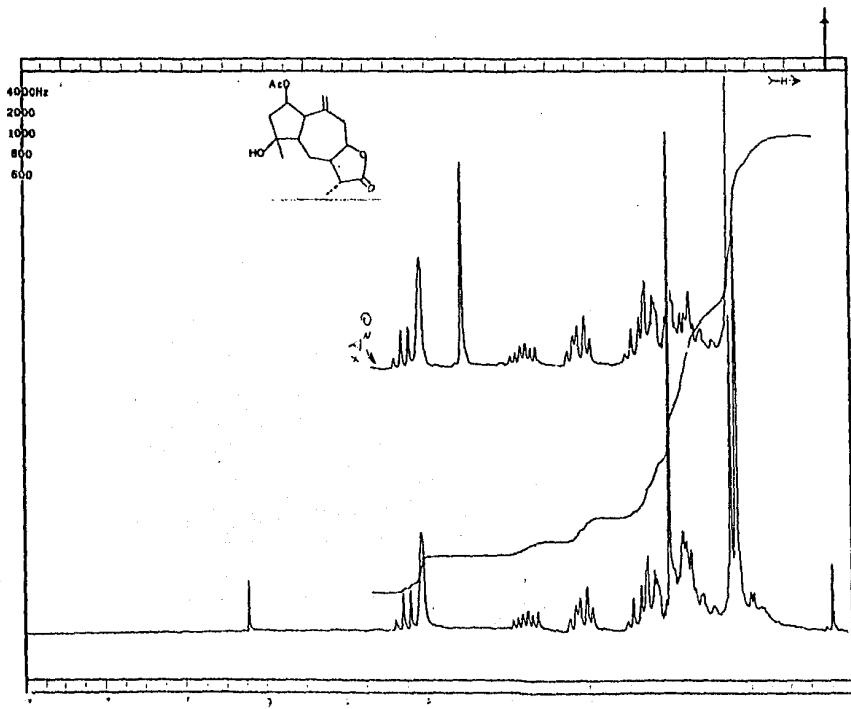
ESPECTRO No.7 DESACETIL-11,13-DIHIDRO-OTOIMBRICATINA B
Y LA DESACE TIL-13-METOXI-11,13-DIHIDRO-O TOIMBRICATINA B



ESPECTRO No 8 11,13-DIHDRO-
OTOIMBRICATINA 8



ESPECTRO No9 - 11,13-DIHIDRO-
OTOIMBRICATINA B



FT-80A SPECTRUM NO. 628
 OPERATOR TC DATE 6/18/85
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE C. GUERRERO

P-SISP-B

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL 2.100
 SPIN RATE _____ cps. TEMP. _____ °C
 INSERT _____ mm

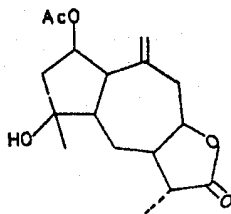
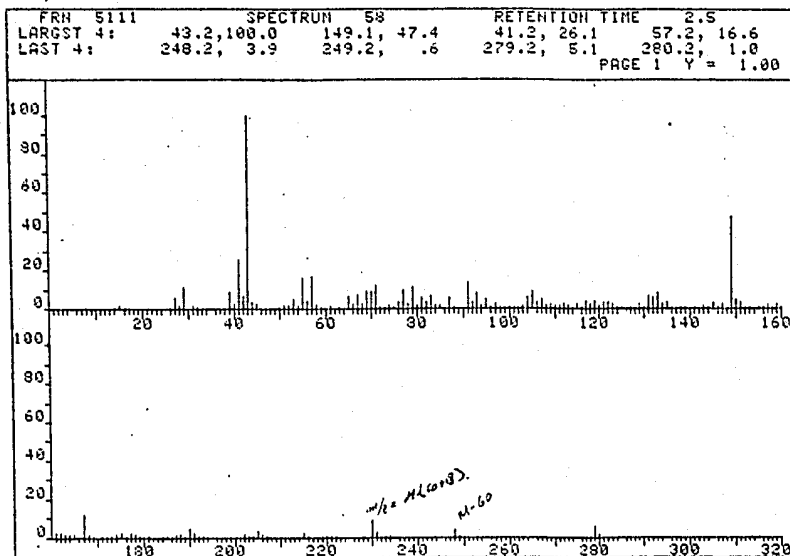
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 1200 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) 17 sec.
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec.
 PULSE DELAY (PD) _____ sec.
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

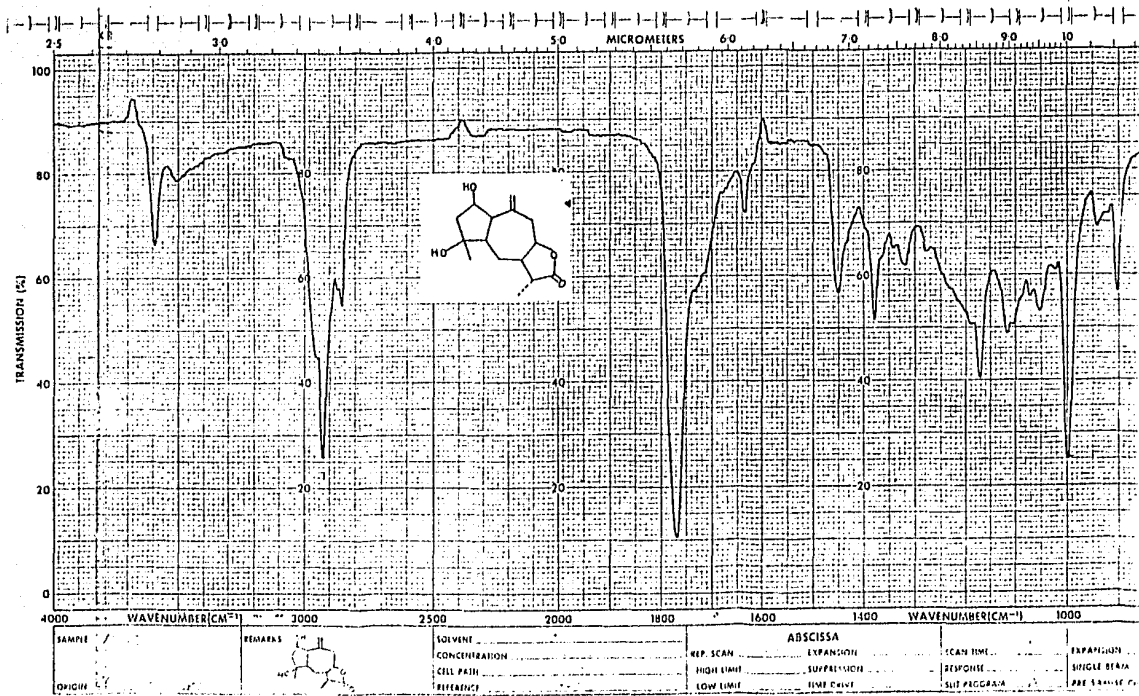
DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) 100 Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) 12.5

12.11.12: P-51SP-13

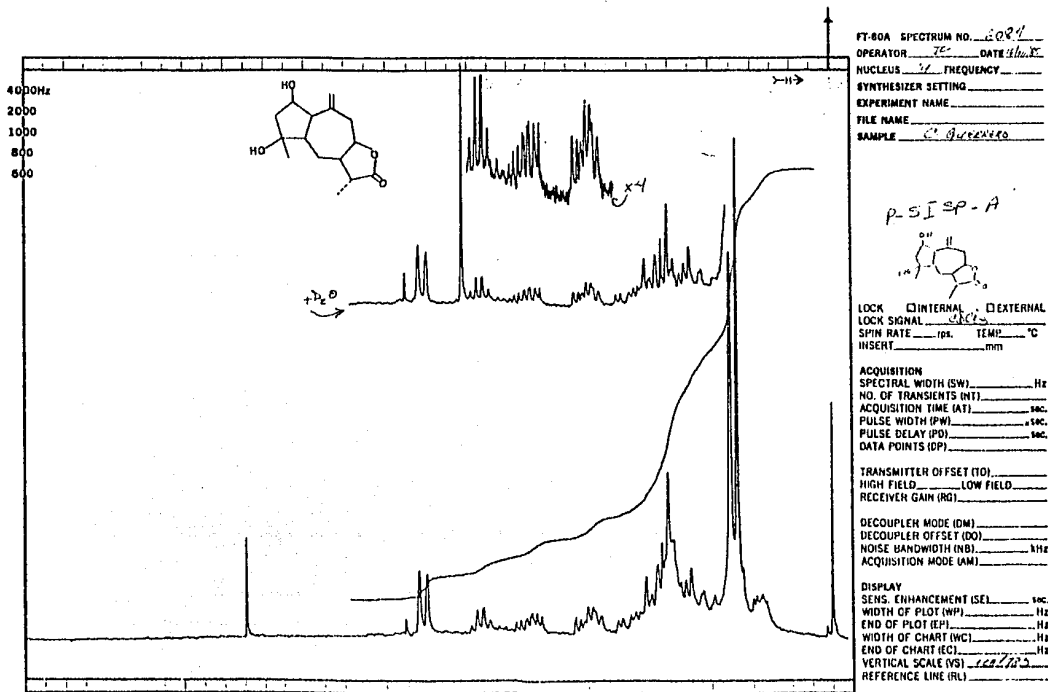


ESPECTRO No 10 11,13-DIHIDRO-
OTOIMBRICATINA B

ESPECTRO No 11 DESACETIL-1113-
DIHIDRO-O TOIMBRICATINA B

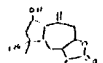


**EPECTRO No 12 DESACETIL-1113-
DIHIDRO-O TOIMBRICATINA B**



FT-80A SPECTRUM NO. 1024
 OPERATOR TC DATE 11/13/82
 NUCLEUS 13C FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE C. G. G. G. G.

p. S. I. 2P-A



LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL LOCK
 SPIN RATE _____ rpm. TEMP. _____ °C
 INSERT _____ mm

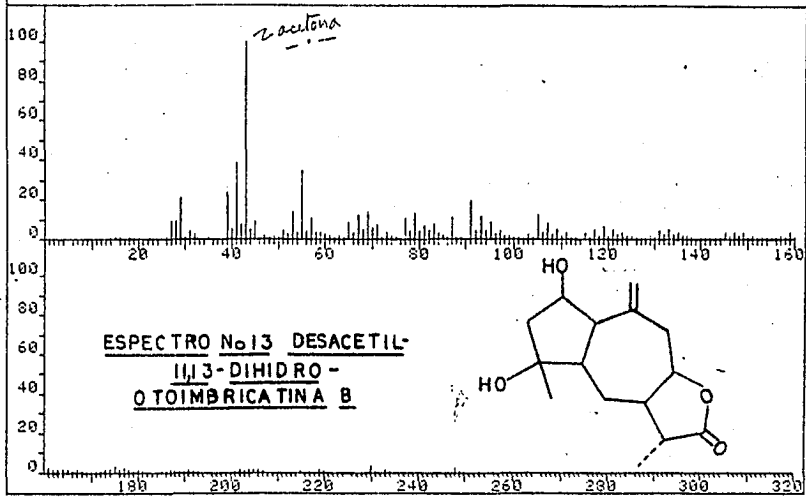
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec.
 PULSE DELAY (PD) _____ sec.
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

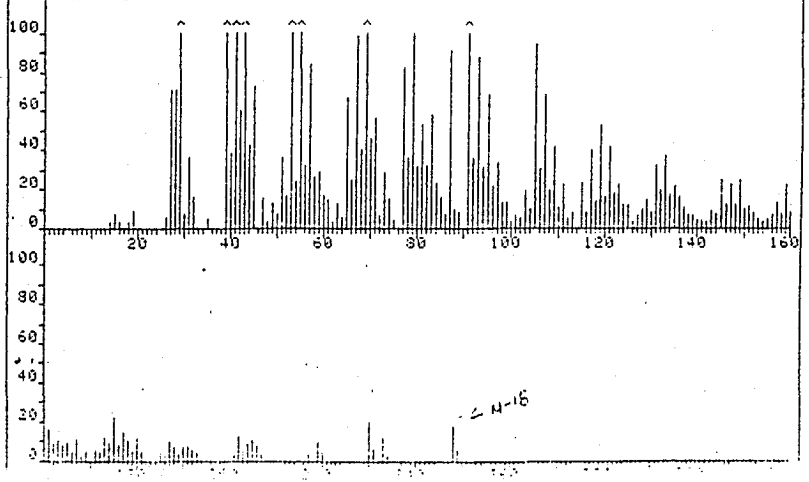
DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SEL) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) sec/100
 REFERENCE LINE (RL) _____

FRN 5110	SPECTRUM 87	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.2, 100.0	41.2, 39.0	55.1, 34.6 39.2, 23.4
LAST 4: 233.2, 1.5	234.2, .4	248.2, 2.2 249.1, .6
PAGE 1 Y = 1.00		

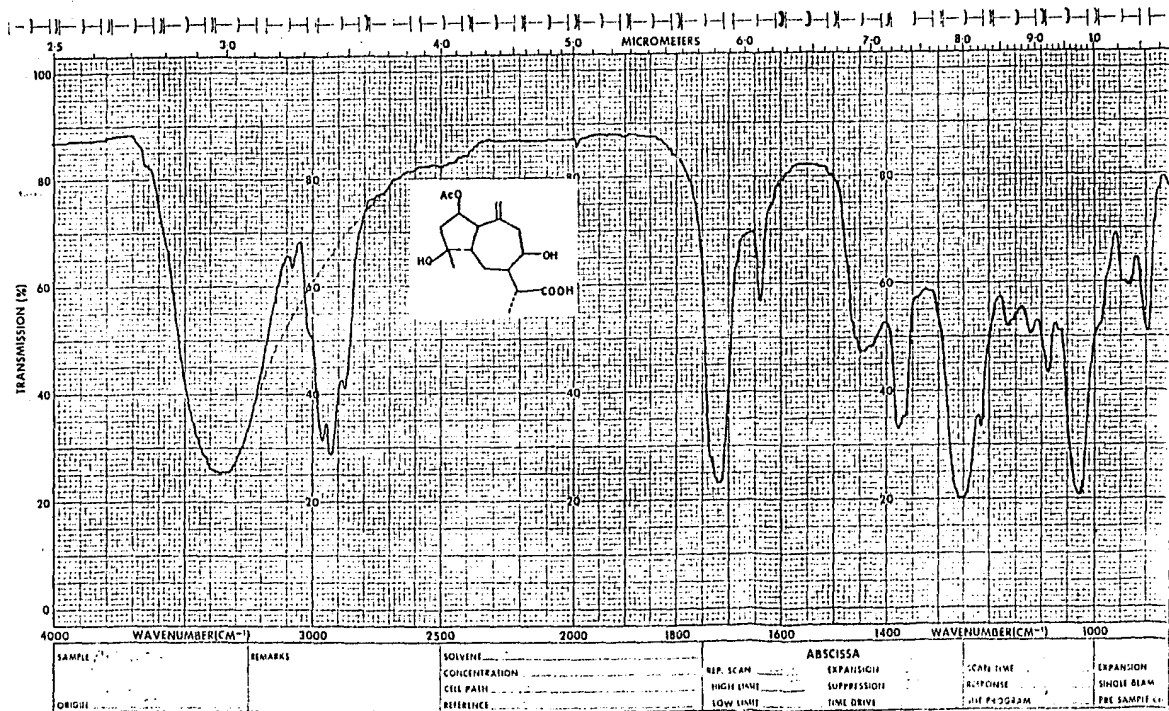


17-11-75 9-3157-A C.6032220

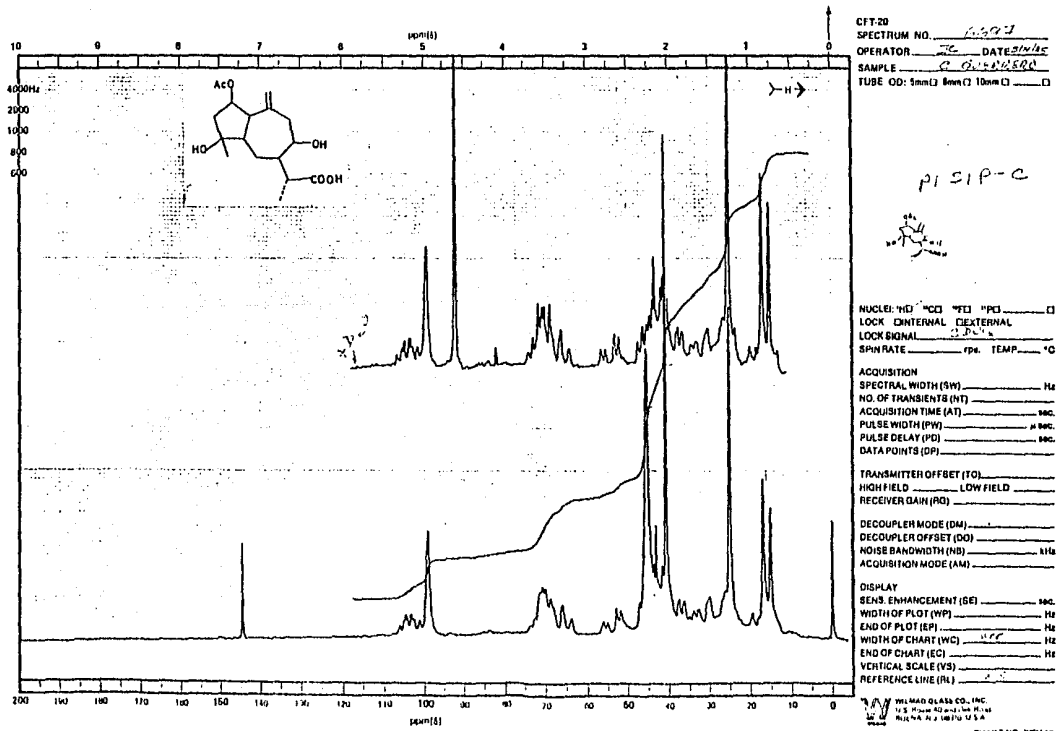
FRN 5110	SPECTRUM 87	RETENTION TIME 3.6
LARGST 4: 43.2, 100.0	41.2, 39.0	55.1, 34.6 39.2, 23.4
LAST 4: 233.2, 1.5	234.2, .4	248.2, 2.2 249.1, .6
PAGE 1 Y = 8.00		



ESPECTRO No 14 Ac GUAIAN-2-ACETOXI-4,8-
DIHIDROXI-10,14-EN-12-OICO.



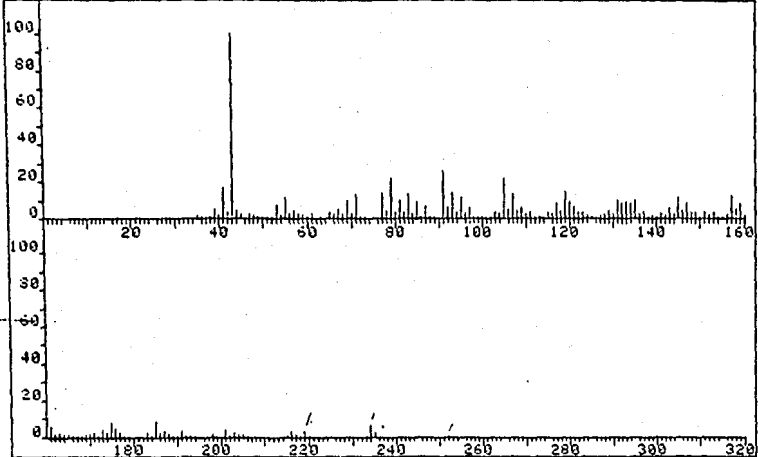
**ESPECTRO No 15 AcGUAIAN-2-ACETOXI-
4,8-DIHIIDROXI-10,14-EN-12-OICO.**



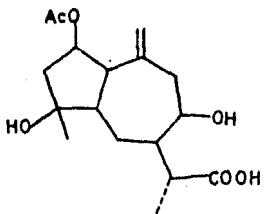
CFT 20
SPECTRUM NO. 1597
OPERATOR Te DATE 2/14/68
SAMPLE Acguaian
TUBE OD: 5mm (L) 8mm (C) 10mm ()

NUCLEI: ¹H ¹³C ¹⁹F ³¹P
LOCK: INTERNAL EXTERNAL
LOCK SIGNAL: PL
SPIN RATE: _____ rpm. TEMP.: _____ °C
ACQUISITION
SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.
PULSE WIDTH (PW) _____ μ sec.
PULSE DELAY (PD) _____ sec.
DATA POINTS (DP) _____
TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
RECEIVER GAIN (RG) _____
DECOUPLER MODE (DM) _____
DECOUPLER OFFSET (DO) _____
NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
ACQUISITION MODE (AM) _____
DISPLAY
SENS ENHANCEMENT (SE) _____ sec.
WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
END OF PLOT (EP) _____ Hz
WIDTH OF CHART (WC) 1.75 Hz
END OF CHART (EC) _____ Hz
VERTICAL SCALE (VS) _____
REFERENCE LINE (RL) _____

FRN 5028	SPECTRUM 54	RETENTION TIME 2.9
LARGST 4: 43.2, 100.0	91.2, 26.1	79.2, 21.9 105.3, 21.6
LAST 4: 233.4, .5	234.3, 6.3	235.3, 1.7 252.5, .6
PAGE 1 Y = 1.00		

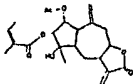
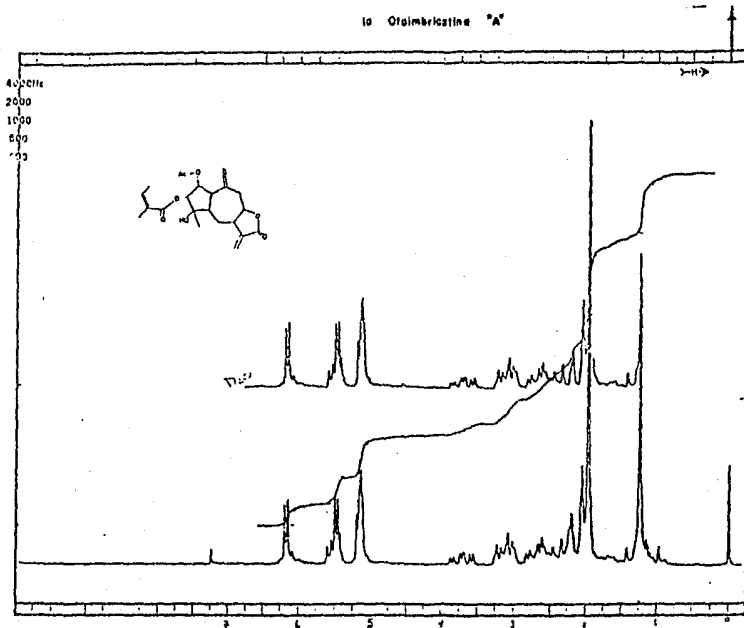


Dr. C. Gro. PLSIC-C 8m-324



ESPECTRO No 16 Ac-GUAIAN-2-ACE TOXI-
4,8-DIHI DROXI-10,14-EN-12-DICO.

ESPECTRO No. 17
 Espectro de RMN ¹H de
 10 Oflimbricitina "A"



FT-80A SPECTRUM NO. 17
 OPERATOR RS DATE 1/2/82
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE C. Oflimbricitina

SINGULAR
Prod. de 10 Oflimbricitina
25.000
Primo de resolução

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL 100%
 SPIN RATE 10 Hz
 INSERT mm

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 10.000 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec
 PULSE DELAY (PD) _____ sec
 DATA POINTS (DP) _____

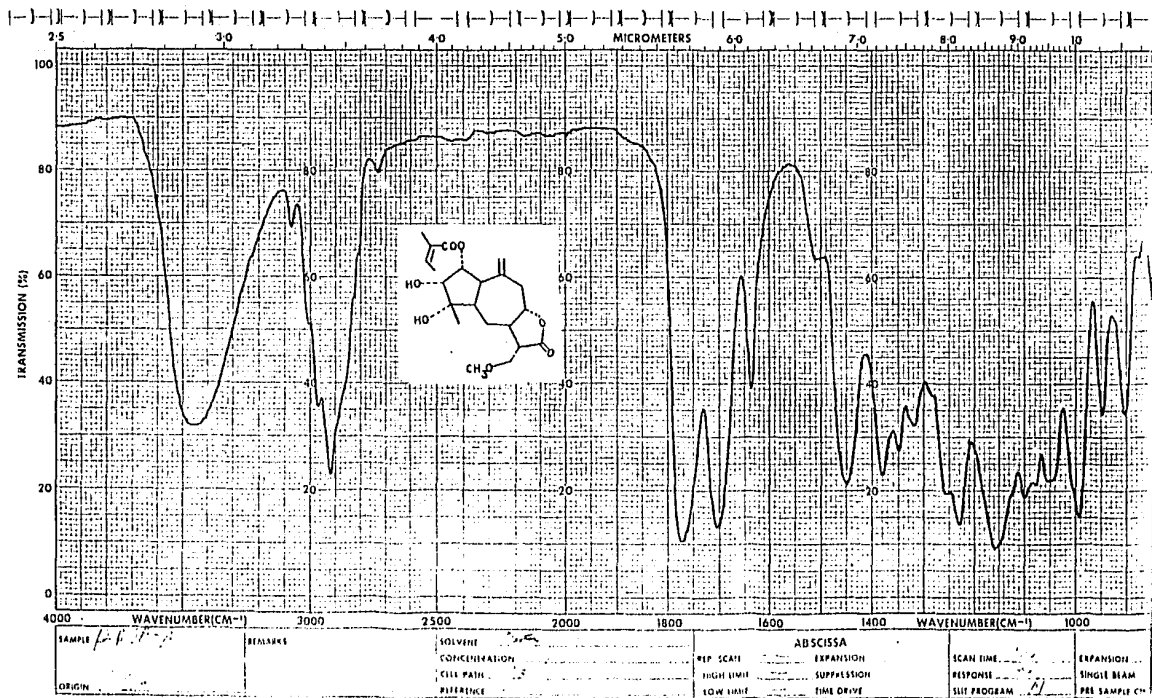
TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ Hz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

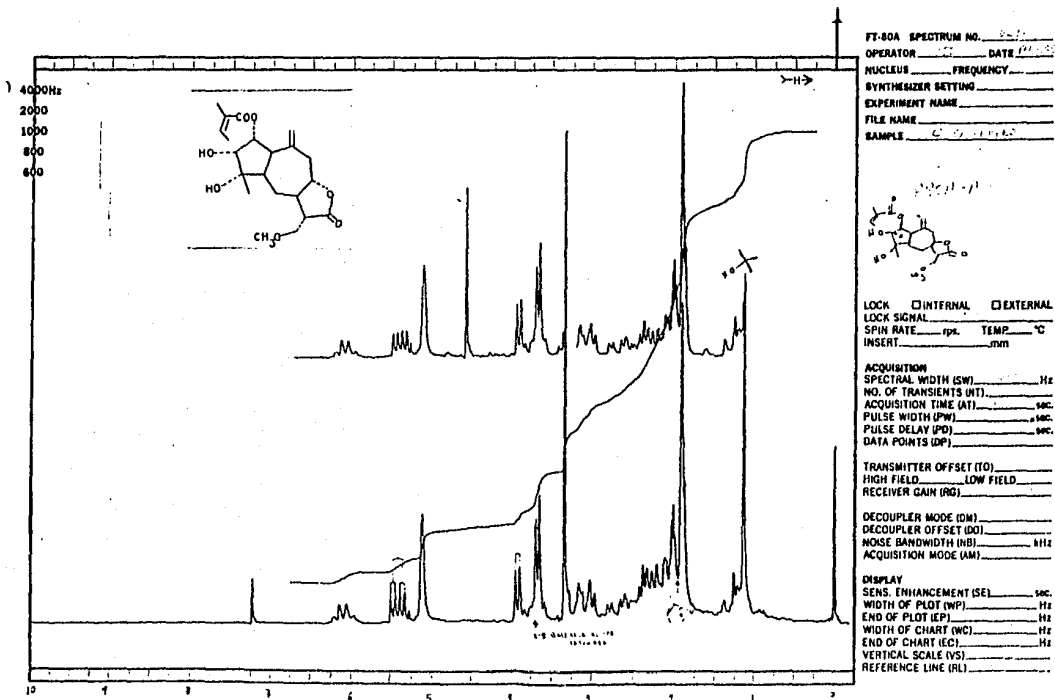
DISPLAY
 SEND ENHANCEMENT (SE) _____ sec
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____



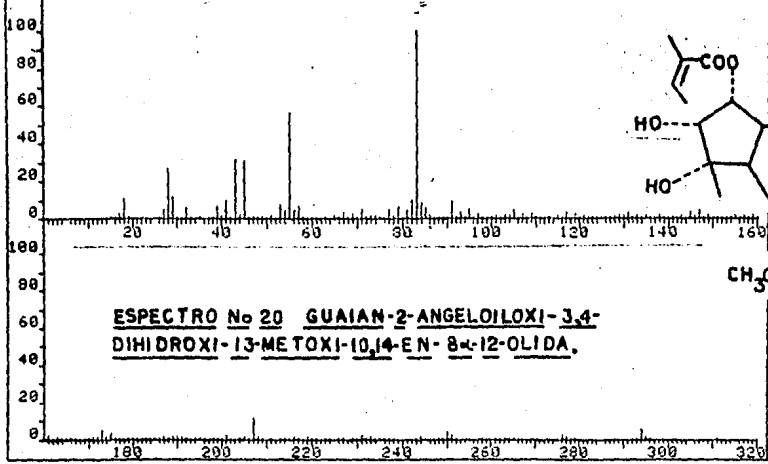
**ESPECTRO No 18 GUAIAN-2-ANGELOILOXI-
3,4-DIHIDROXI-1,3-METOXI-10,14-EN-8- α -12-OLIDA.**



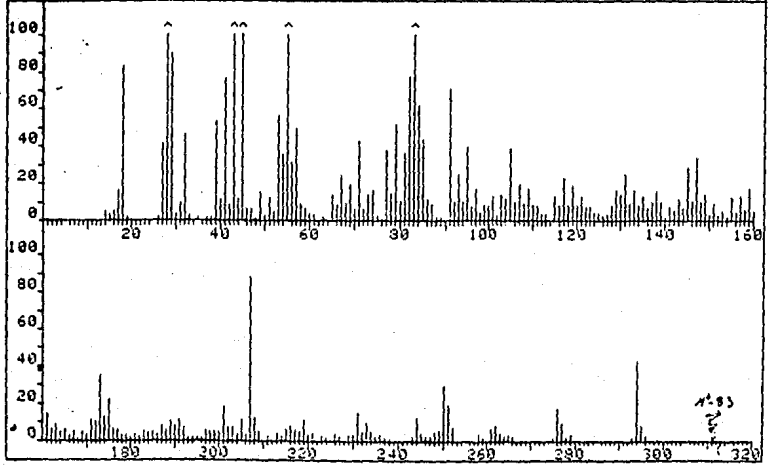
ESPECTRO No 19 GUAIAN-2-ANGELOILOXI-3,4-
DIHIDROXI-13-METOXI-10,14-EN-8-OLIDA



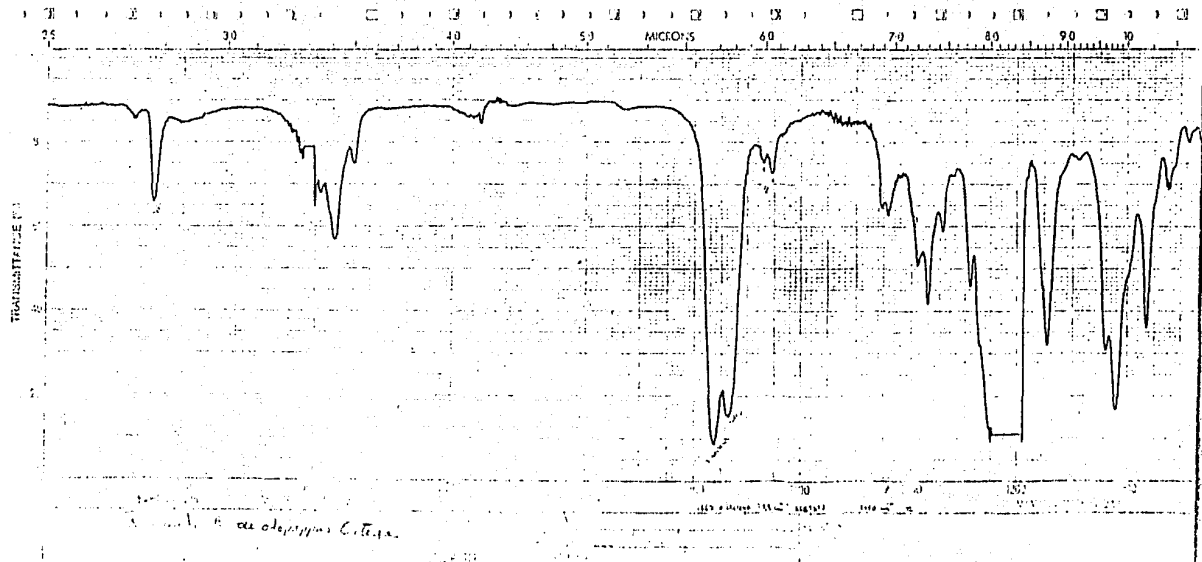
FRN 5166	SPECTRUM 106	RETENTION TIME 4.4
LARGST 4: 83.2, 100.0	55.2, 56.3	43.1, 31.4 45.1, 30.4
LAST 4: 311.2, .2	333.2, .2	334.3, .3 376.3, .4
		PAGE 1 Y = 1.00



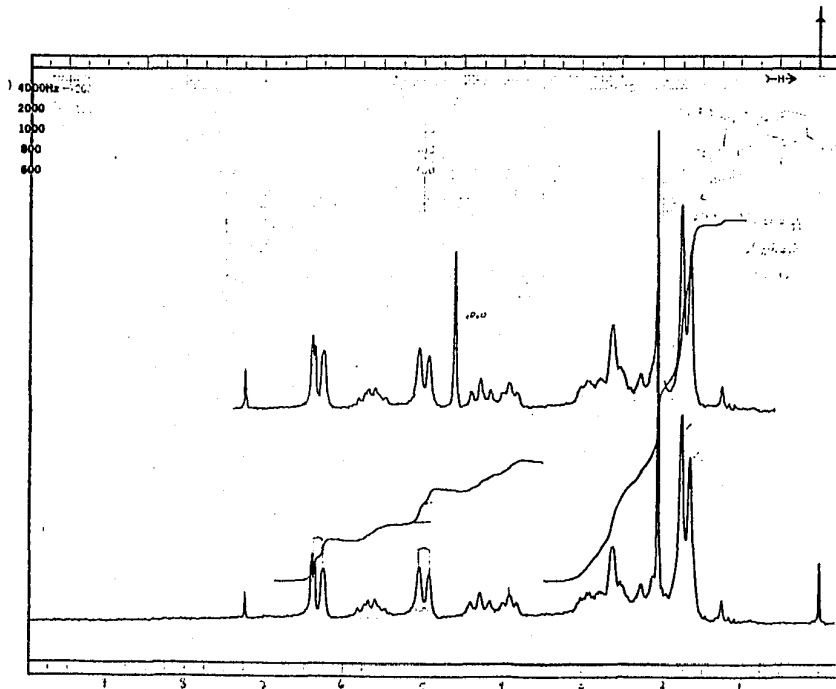
FRN 5166	SPECTRUM 106	RETENTION TIME 4.4
LARGST 4: 83.2, 100.0	55.2, 56.3	43.1, 31.4 45.1, 30.4
LAST 4: 311.2, .2	333.2, .2	334.3, .3 376.3, .4
		PAGE 1 Y = 8.00



ESPECTRO N° 21.



ESPECTRO No 22



FT-80A SPECTRUM NO. 9205
 OPERATOR Ez DATE 12-1-92
 NUCLEUS _____ FREQUENCY _____
 SYNTHESIZER SETTING _____
 EXPERIMENT NAME _____
 FILE NAME _____
 SAMPLE C. G. 120

Part 1
Original data

LOCK INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL CP1
 SPIN RATE _____ rpm TEMP. _____ °C
 INSERT _____ mm

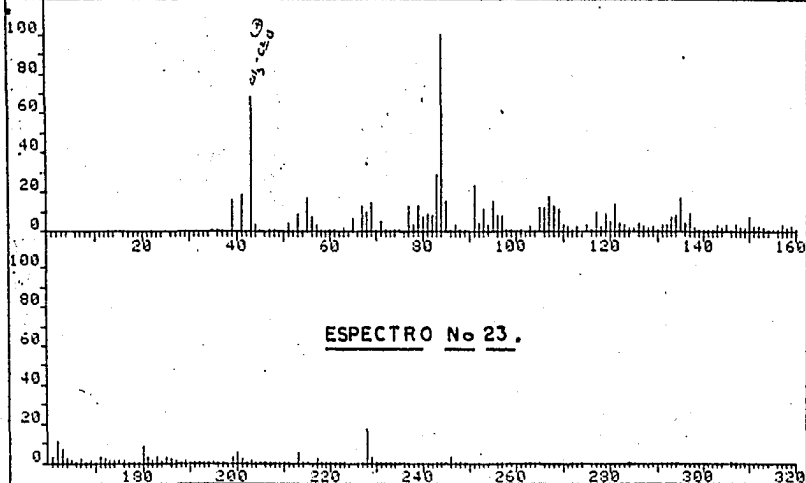
ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) 100 Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec.
 PULSE DELAY (PD) _____ sec.
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

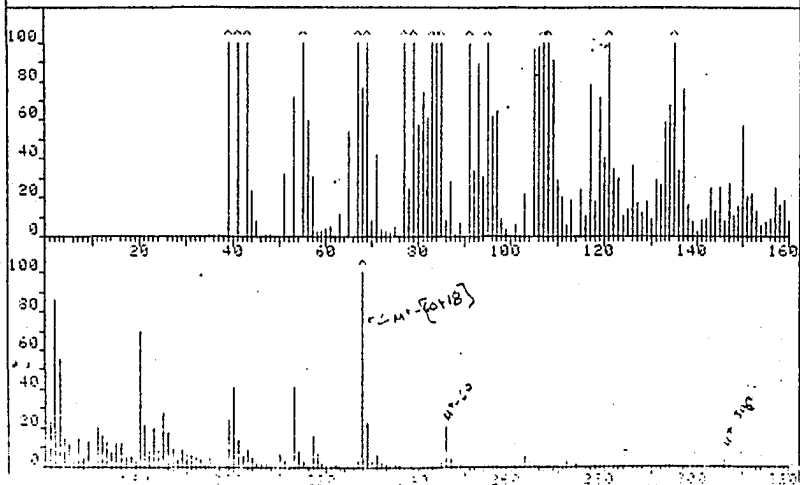
DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SEL) _____ sec.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) 200 Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

FRN 5107	SPECTRUM 60	RETENTION TIME 2.5
LARGST 4: 84.1, 100.0	42.0, 68.4	83.1, 29.1 91.1, 23.4
LAST 4: 369.4, .1	404.1, .1	446.3, .5 447.2, .2
PAGE 1 Y = 1.00		

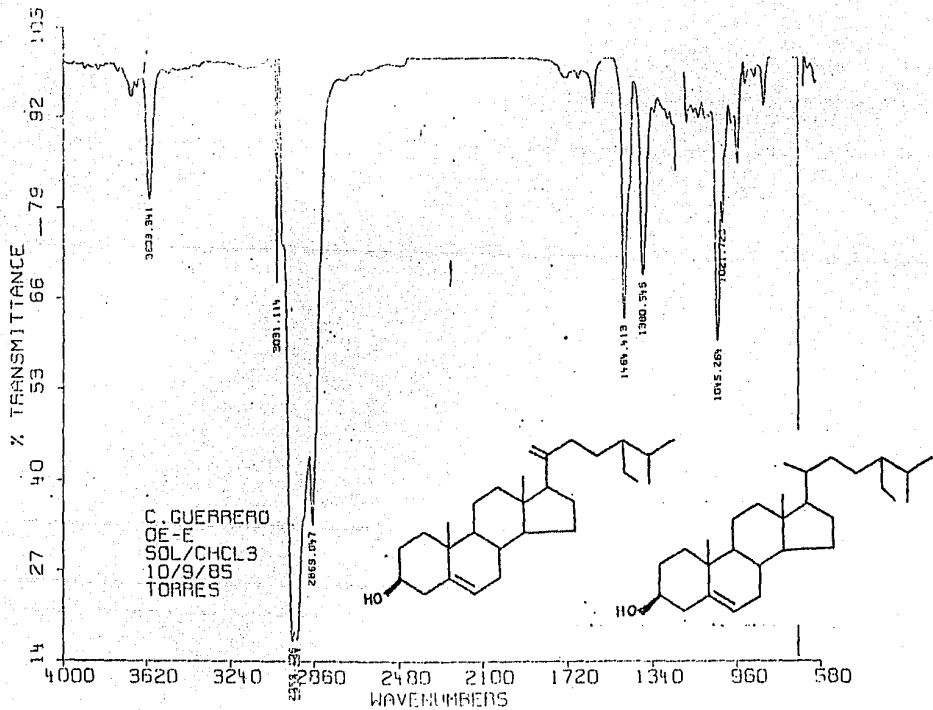


Dr. Carlos Gro Pnd. A. Pf= 132-4°C
de Otopappus imbricatus. arceca

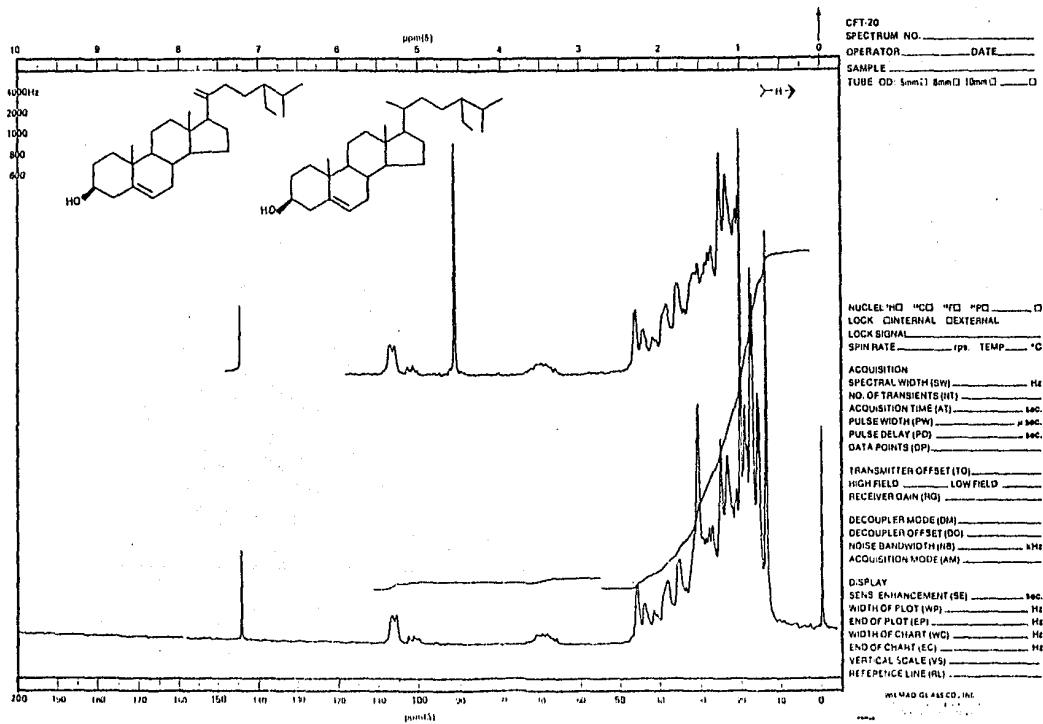
FRN 5107	SPECTRUM 60	RETENTION TIME 2.5
LARGST 4: 84.1, 100.0	42.0, 68.4	83.1, 29.1 91.1, 23.4
LAST 4: 369.4, .1	404.1, .1	446.3, .5 447.2, .2
PAGE 1 Y = 3.00		

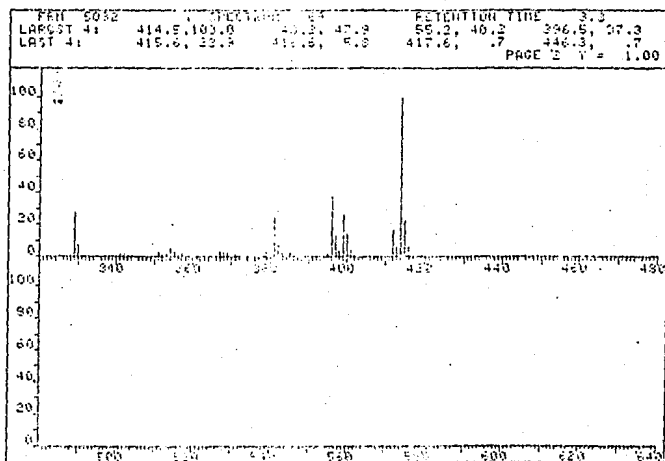
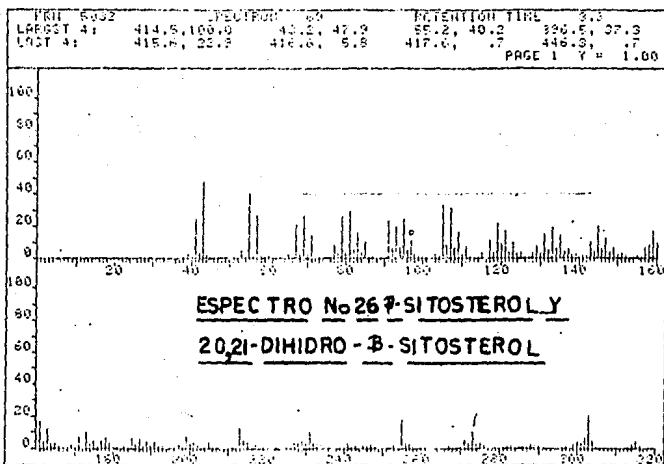
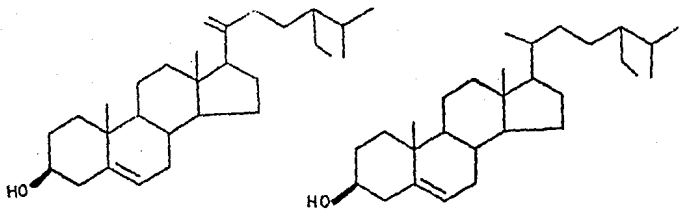


ESPECTRO No 24. β -SITOSTEROL Y
20,21-DIHIDRO- β -SITOSTEROL.



ESPECTRO No 25 β -SITOSTEROL Y
20,21-DIHI DRO- β - SITOSTEROL .





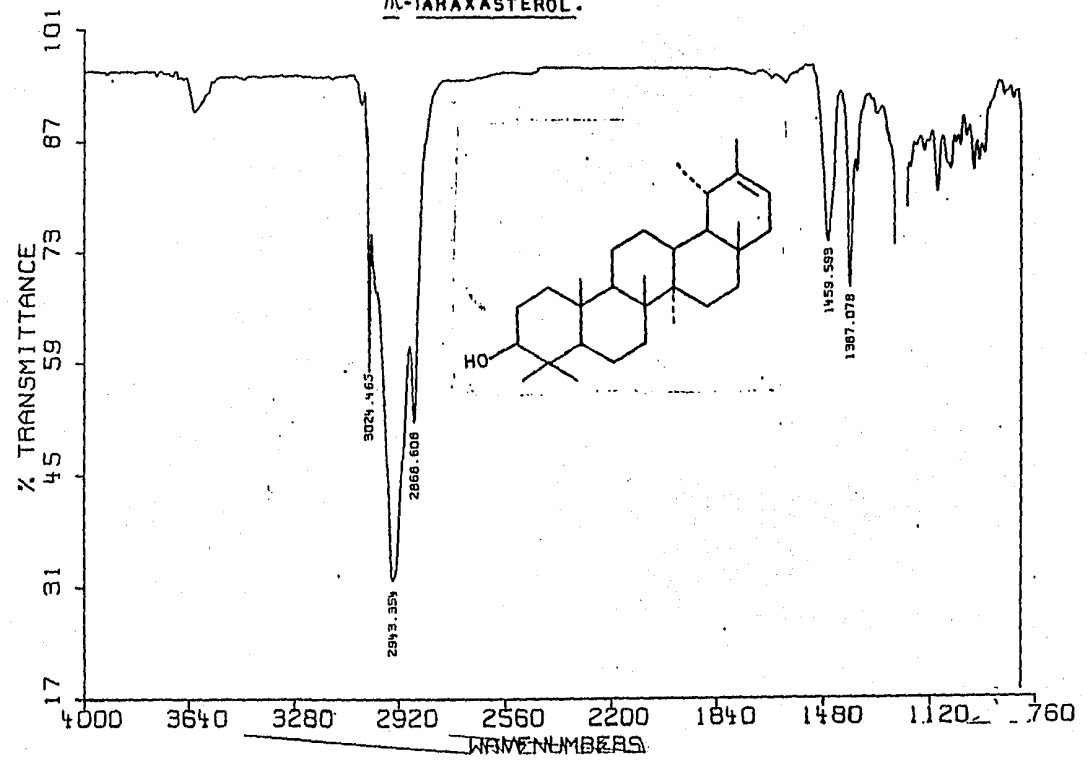
Dr. C. G. O.E.E. H=83.9°C

DR. C. GUERRERO SOLN./CHCL3 OE-BA 11/SEPT/85 RVI

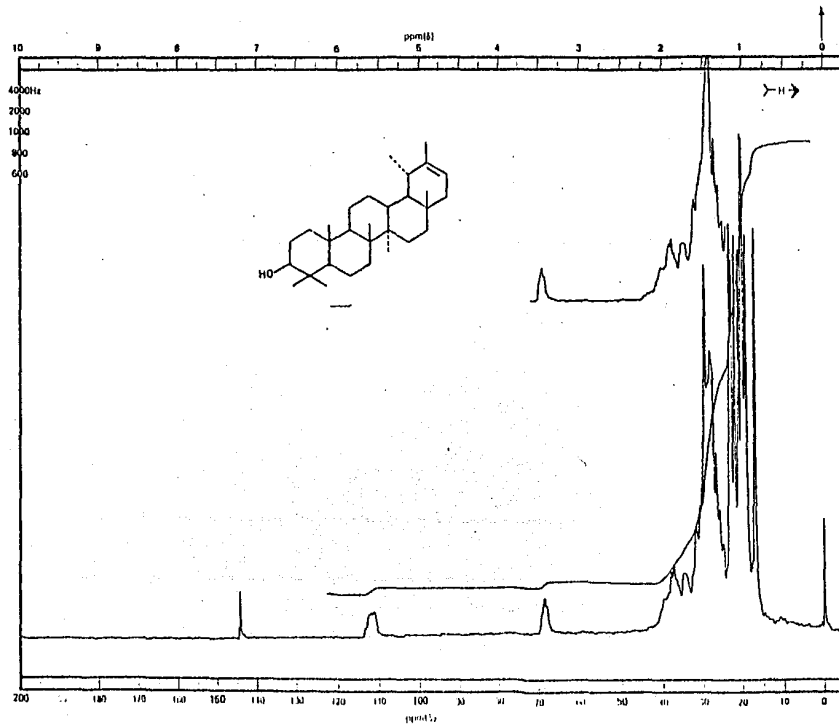
X= 3621

ESPECTRO No 27

Δ-TARAXASTEROL.



ESPECTRO No 28
TARAXASTEROL.



CFT 20
 SPECTRUM NO. _____
 OPERATOR _____ DATE _____
 SAMPLE _____
 TUBE OD: 5cm 8cm 10cm

NUCLEI: ¹H ¹³C ¹⁹F ³¹P

LOCK INTERNAL EXTERNAL

LOCK SIGNAL _____

SPIN RATE _____ rpm. TEMP. _____ °C

ACQUISITION

SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz

NO. OF TRANSIENTS (NT) _____

ACQUISITION TIME (AT) _____ sec.

PULSE WIDTH (PW) _____ μ sec.

PULSE DELAY (PD) _____ sec.

DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (FO) _____

HIGH FIELD LOW FIELD

RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____

DECOUPLER OFFSET (DO) _____

NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz

ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY

SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ sec.

WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz

END OF PLOT (EP) _____ Hz

WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz

END OF CHART (EC) _____ Hz

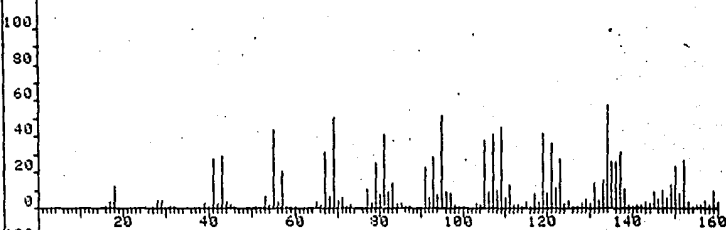
VERTICAL SCALE (VS) _____

REFERENCE LINE (RL) _____

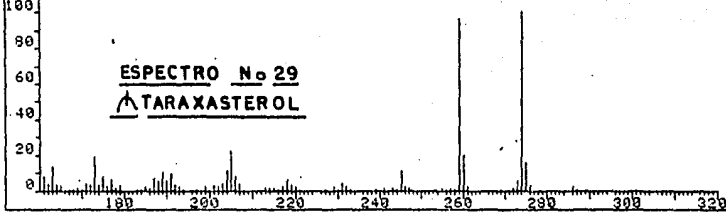
PERKINELMER CO., INC.

CHART 50 10CV 20

FRN 5061	SPECTRUM 66	RETENTION TIME 2.8
LARGST 4: 274.4, 100.0	259.4, 95.7	134.3, 56.9
LAST 4: 427.6, 4.8	428.6, 1.2	446.3, 1.4
		95.2, 51.6
		447.3, 5
		PAGE 1 Y = 1.00

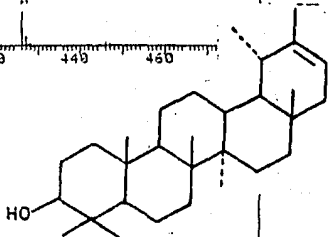
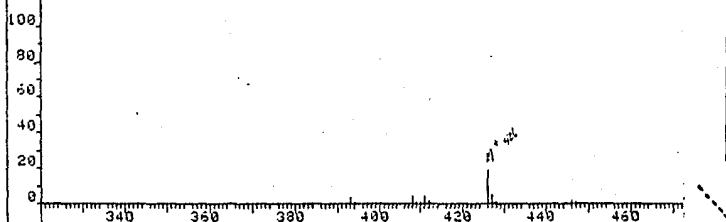


ESPECTRO No 29
TARAXASTEROL



FRN 5061	SPECTRUM 66	RETENTION TIME 2.8
----------	-------------	--------------------

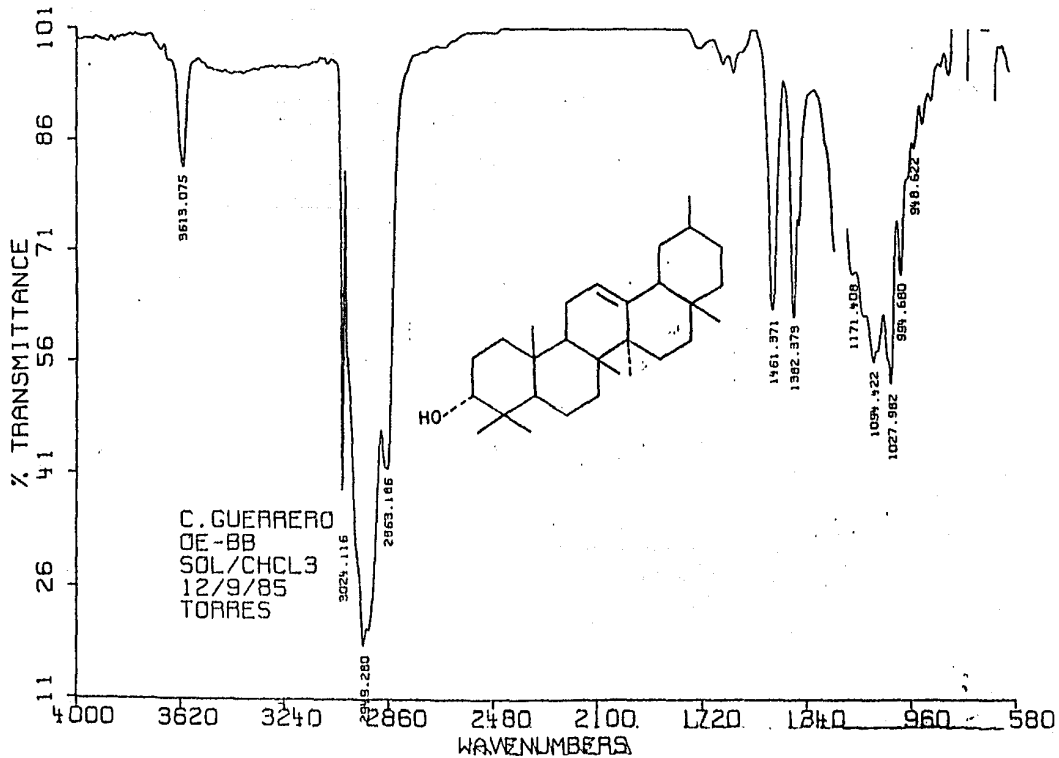
LARGST 4: 274.4, 100.0	259.4, 95.7	134.3, 56.9	95.2, 51.6
LAST 4: 427.6, 4.8	428.6, 1.2	446.3, 1.4	447.3, 5
			PAGE 2 Y = 1.00



taraxasterol 06-20

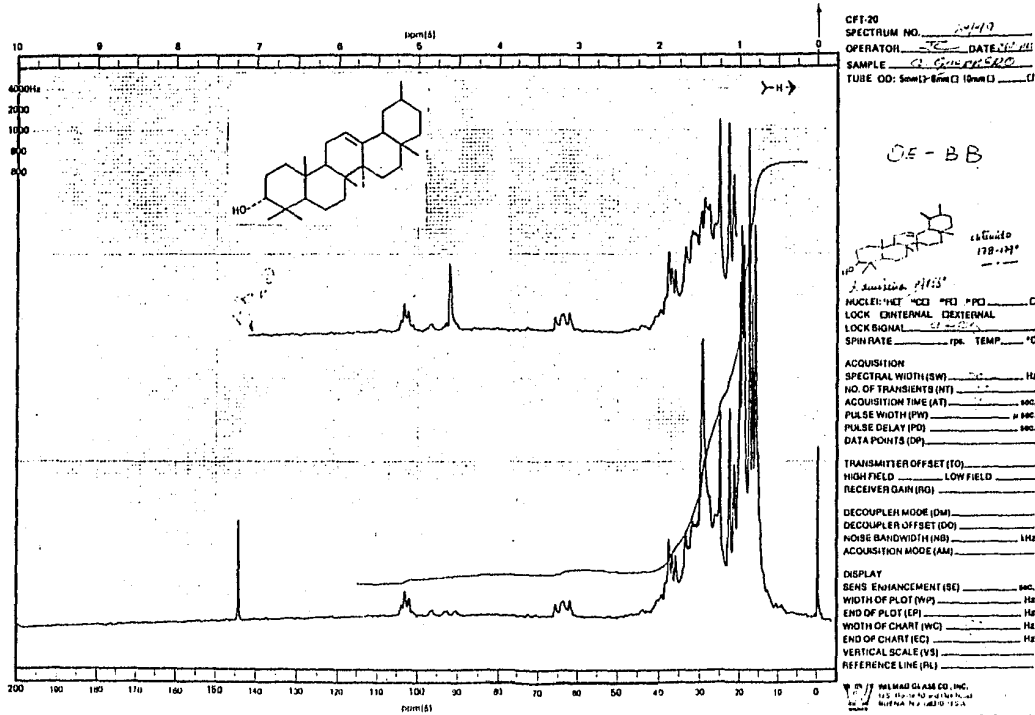
ESPECTRO No 30.

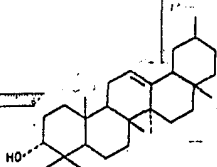
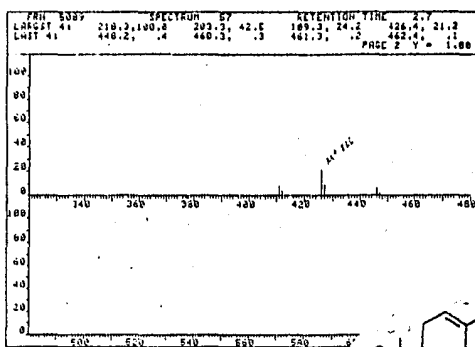
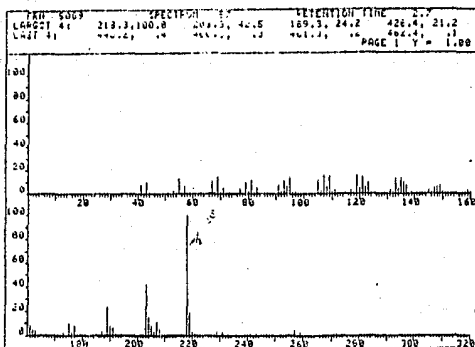
α-AMIRINA.



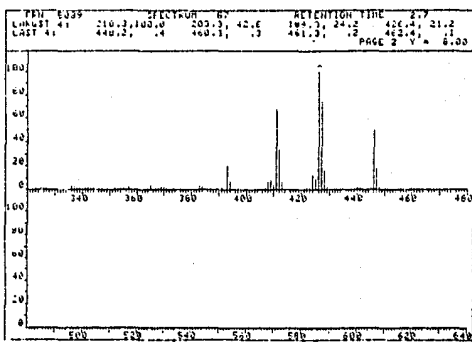
ESPECTRO No 31.

α -AMIRI.7A

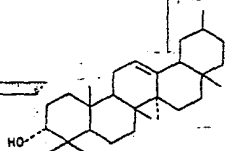
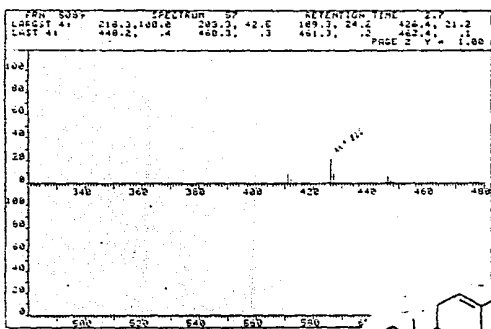
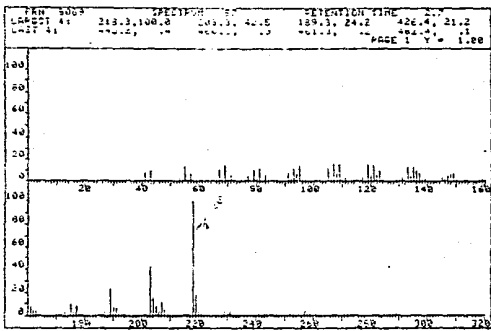




D. C. G. Pf = 177-9°C DE - BR Note. 446 = 8.04g - 2

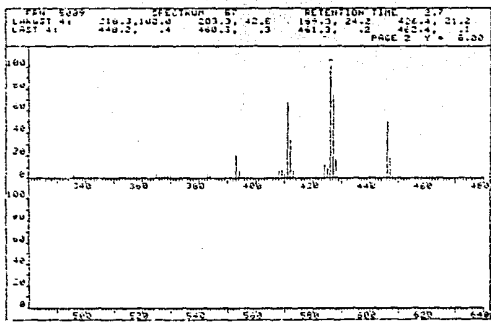


ESPECTRO No 32
α-AMIRINA.



D. C. G. Pf. 177-9c OE-88 Not. 246 = Background

ESPECTRO No 32
de AMIRINA.



BIBLIOGRAFIA.

1. Romo de Vivar, A., *Ciencia*, 32, 165-189, (1981).
2. Quevedo, J. F., "Estudio Químico de Otopappus prin-
glei", tesis para obtener el título de Químico Far-
macéutico Biólogo, FES - Cuautitlán Méx., (1984).
3. Romo de Vivar, A., "Sesquiterpena lactones in Compo-
sitae", *Rev., Latinoamer, Quím.*, 8, 63-74, (1977).
4. Téllez, M. J., Taboada, J., Gonzalez, M., "Citotóxicidad de algunas lactonas sesquiterpénicas in vitro",
Arch., Invest., Méd., México, (11), 435, (1980).
5. Harnán, R. L., Stuessy, T. F., "Sistematic Botany", 8,
185-210, (1983).
6. Guerrero, C., Quevedo, F., Toscano, A., "Otoimbricatina
nas A y B dos guaianolidas nuevas aisladas de Otopa-
ppus imbricatus", *Rev., Latinoamer, Quím.*, 16-1,
30-32, (1985).
7. Soriano, G., Toscano, A., Guerrero, C., "Structure of
(1 H, 5 H, 7 H, 8 H)-2,3-Dihydro-4-hidroxy-Guai-10
(14), 11(13)-dien 8, 12-olide-2-acetate-3-angelate, a
Sesquiterpéne Lactone", *Act., Cryst., Section C*, (en
prensa).
8. Heywood, V. H., Herbone, J. B., "The Biology and Che-
mistry of the Compositae", Academic, Press, N. Y.,
Vol. 1 y 11, (1977).

9. Ruzica, "History of the isopropene rule", Proc., Chem., Soc., 341-360, (1959).
10. Rodríguez, E., "Sesquiterpéne Lactones : Chemotaxonomy, Biological Activity and Isolation", Rev., Latinoamer, Quím., 8, 56-62, (1977).
11. Mathur, S. B., Tello, G. P., Fermin, C. M., "Terpenoides of Mikania monagasensis and their biological activities", Rev., Latinoamer, Quím., 6, 201, (1975).
12. Allan, G. G., Fayer, M. B., Spring, F. S., Stevenson, R., "Triterpenoides", Journal, Chem., Society, 456, (1956).
13. Beton, J. L., Bowers, A., Halsall, T. G., "The chemistry of the triterpenoides and related compounds", Journal, Chem., Society, 1905, (1954).
14. Dutta, C. P., Lala, P. K., "Taraxasterol and its derivatives from Cirsium arvense", Phytochemistry, 2267-2269, (1972).