

302927⁴ 250



UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO
ESCUELA QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
(Incorporada a la U.N.A.M.)

**ACTIVIDAD BIOLOGICA Y TRANSPOSICIONES
DE LAS GLAUCOLIDAS D Y E**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

DORA SILVIA RAMIREZ PONCE

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

| | |
|----------------------------|----|
| I. INTRODUCCION | 3 |
| II. GENERALIDADES | 5 |
| III. PARTE EXPERIMENTAL | 18 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSION | 25 |
| V. CONCLUSIONES | 36 |
| VI. ESPECTROS | 37 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 51 |

I. INTRODUCCION

Dentro del Reino vegetal, la familia de las compuestas es una de las mas numerosas ya que está constituida de aproximadamente 20,000 especies las cuales taxonómicamente se han dividido en trece tribus para su estudio (Tabla 1)¹.

Dentro de estas tribus se encuentra la *Vernonieae* que esta constituida por aproximadamente 50 géneros, de los cuales el más importante, por su abundancia es el género *Vernonia*. Este género posee una gran habilidad sintética, ya que algunas variedades pertenecientes a este género elaboran una gran variedad de metabolitos secundarios¹, aunque sólo las lactonas sesquiterpénicas y compuestos flavonoides se han utilizado para fines quimiotaxonómicos. Así se ha postulado que las lactonas sesquiterpénicas llamadas glaucólidas e hirsutinólidas sean los quimiomarcadores por excelencia del género *Vernonia*².

Uno de los aspectos de nuestro estudio sistemático del género *Vernonia* se ha realizado³ en base al comportamiento que muestran las glaucólidas cuando se agitan en presencia de sílice y metanol a temperatura ambiente⁴, ya que producen artefactos con esqueletos de hirsutinólidas y cadinanólidas.

Debido a que las transformaciones de la glaucólida A se han realizado en condiciones similares a las usadas normalmente en el aislamiento y purificación de este tipo de moléculas, es necesario replantear la quimiotaxonomía del género *Vernonia*.

Así mismo, el aislamiento y estudio de las lactonas sesquiterpénicas se ha incrementado debido a la actividad biológica que presentan varias de ellas. La mayoría de estos compuestos presentan como mayor característica estructural una γ -lactona- α,β insaturada, que según estudios realizados esta asociada con la actividad antitumoral, antimicrobiana, citotóxicas y fitotóxica¹.

Tabla 1

Tribu

| |
|--------------------|
| <i>Eupatorieae</i> |
| <i>Vernonieae</i> |
| <i>Astareae</i> |
| <i>Inuleae</i> |
| <i>Heliantheae</i> |
| <i>Helenieae</i> |
| <i>Tageteae</i> |
| <i>Senecioneae</i> |
| <i>Anthemideae</i> |
| <i>Cynareae</i> |
| <i>Mutiseae</i> |
| <i>Cichorieae</i> |

Debido a lo antes mencionado el estudio de este tipo de compuestos adquiere cada día mayor importancia por lo que los objetivos del presente trabajo son los de aislar los posibles compuestos que se obtengan al agitar una solución metanólica de las glaucólidas D y E en presencia de sílice a temperatura ambiente y conocer su afinidad a los receptores de los tumores de mama estrogeno dependientes.

II. GENERALIDADES

Como se mencionó en la Introducción, las lactonas sesquiterpénicas son de los metabolitos secundarios más útiles en la clasificación de plantas de la familia de las compuestas.

A su vez las lactonas sesquiterpénicas se clasifican en base a sus esqueletos carbocíclicos en: germacranólidas, guaianólidas, pseudoguaianólidas, eudesmanólidas, eremophilanólidas y xanthanólidas entre otras. En la figura 1 se muestran las relaciones biogenéticas entre los diferentes esqueletos hidrocarbonados de las lactonas sesquiterpénicas.

En la figura 2 se esquematiza la biogénesis del esqueleto de las germacranólidas a partir del pirofosfato de trans-trans farnesilo (1) el cual se cicla para producir el intermediario trans-trans germacradieno (2), el cual, por modificaciones de oxidación enzimática produce las germacranólidas representadas por su compuesto más simple, la costunólida (3).

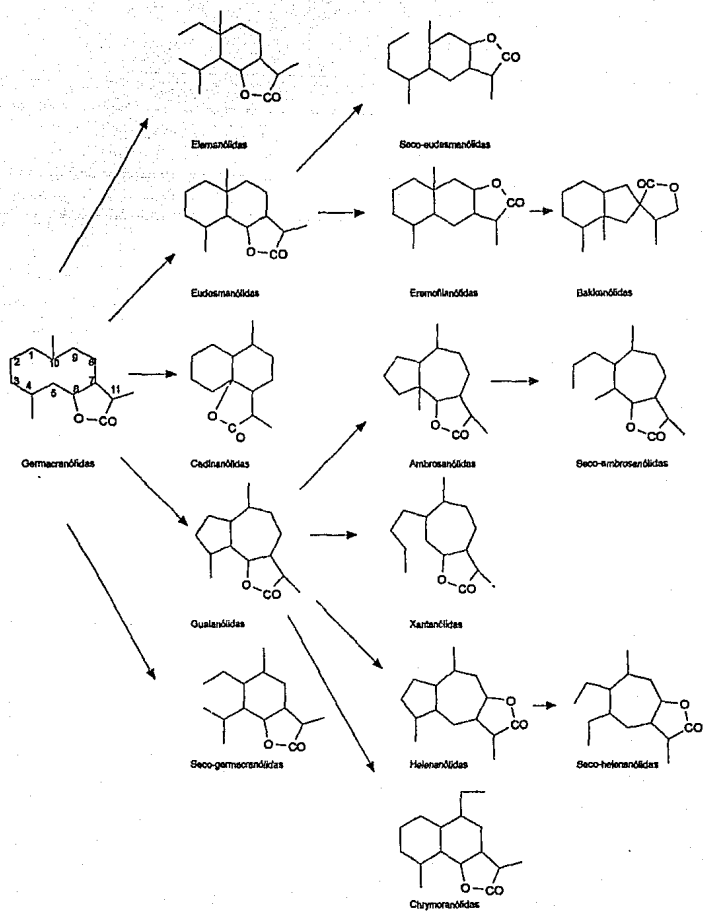


Figura 1. Relaciones biogénicas entre las diferentes estructuras de las lactonas sesquiterpénicas.

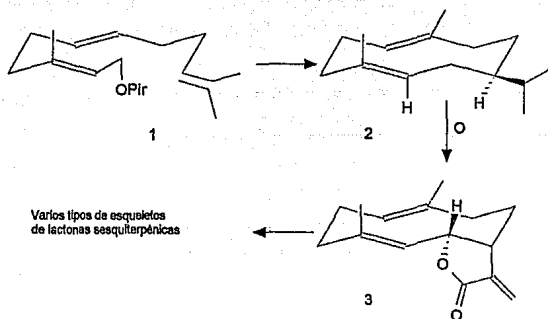


Figura 2. Biogénesis del esqueleto de la germacranólida.

Las germacranólidas están consideradas como pertenecientes al primer nivel biogénico de lactonas sesquiterpénicas las cuales se forman por la ciclización del farnesol, de ellas se conocen cerca de 200 compuestos diferentes⁵. Las germacranólidas se clasifican en cuatro diferentes tipos de anillos hidrocarbonados, así tenemos los siguientes:

1. Germacranólidas. Ambas dobles ligaduras trans (4).
2. Heliangólidas. Doble ligadura C-1 trans (6) y C-4 cis (5).
3. Melampólidas. Doble ligadura C-1 cis (6) y C-4 trans (6).
4. Lactonas. cis cis (7).

Estos cuatro tipos de anillos hidrocarbonados se muestran en la figura 3.

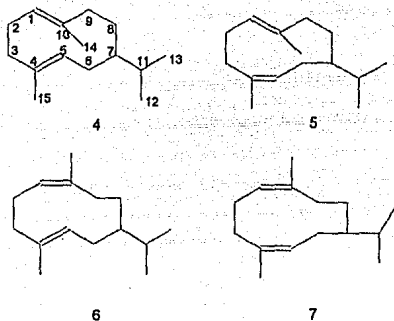


Figura 3. Grupos en los que se subdividen las germacranólidas

Biogénesis del anillo de la lactona.⁶

Se han sugerido dos posibles rutas biogénicas para la formación del anillo de la lactona. Los diversos esquemas de la formación de la γ -lactona α,β -insaturada del tipo mostrado en la figura 4 han sido discutidos por Geissman⁷ y Herz⁸.

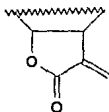


Figura 4.

Los pasos involucrados en la biogénesis de la costunólida (3) y la inunólida (14), se muestran en la figura 5. En el proceso se requieren modificaciones oxidativas en C₁₂ y C₆ o C₈ respectivamente.

Un intermediario hipotético en la ruta de 2 a las lactonas 3 y 14 es el germacraneno A (8), un hidrocarburo que se produce naturalmente en el que todos los carbonos no olefinicos son activados allicamente por hidroxilación excepto C₈. La introducción de una función oxigenada puede proceder vía un intermediario epóxido 9, ó involucrar el hidroperóxido 10. Es de significado biogénético que los dos procesos difieran en la posición del grupo OH recientemente introducido. La hidroxilación vía el intermediario 10 ocurre en C₁₂ bajo retención del doble enlace C₁₁-C₁₃ mientras un doble enlace C₁₁-C₁₂ deberá encontrarse en 11 obtenido a partir del epóxido 9. Modificaciones oxidativas adicionales de 11 vía el aldehído 12, ácido 13 e hidroxilaciones en C₆ o C₈ deberán dar después de la lactonización, la costunólida 3 ó la inunólida 14 respectivamente.

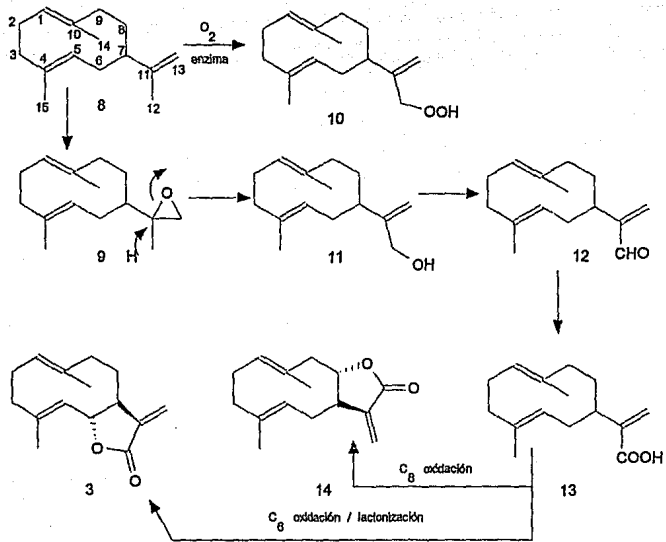


Figura 5. Biogénesis del anillo de la lactona.

Biogénesis del anillo de la lactona vía furanosesquiterpenos.^{6,9-11}

Las lactonas sesquiterpénicas del tipo 16, son derivados de furanosesquiterpenos (15) por autooxidación, sugiriendo que las lactonas son también biogénicamente derivados del anillo furano como muestra la figura 6.

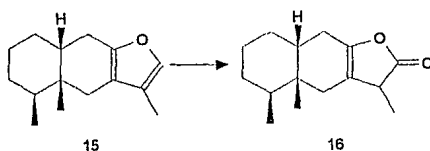


Figura 6. Biogénesis del anillo de la lactona vía furanosesquiterpenos.

Transformaciones de la glaucólida A.

Se ha publicado que la glaucólida A produce artefactos con esqueletos de hirsutinólidas y cadinanólidas cuando se le somete a agitación en presencia de sílice y metanol⁴ (fig. 7). Estas condiciones son muy similares a las utilizadas normalmente en el aislamiento y purificación de este tipo de metabolitos secundarios. El mecanismo propuesto para la formación de estos metabolitos es mediante la figura 8¹².

Este resultado demuestra la necesidad de modificar la quimiotaxonomía del género *Vernonia*, ya que fundamentalmente esta basada en la presencia o ausencia de las glaucólidas, hirsutinólidas y cadinanólidas en las diferentes especies estudiadas¹³⁻¹⁶.

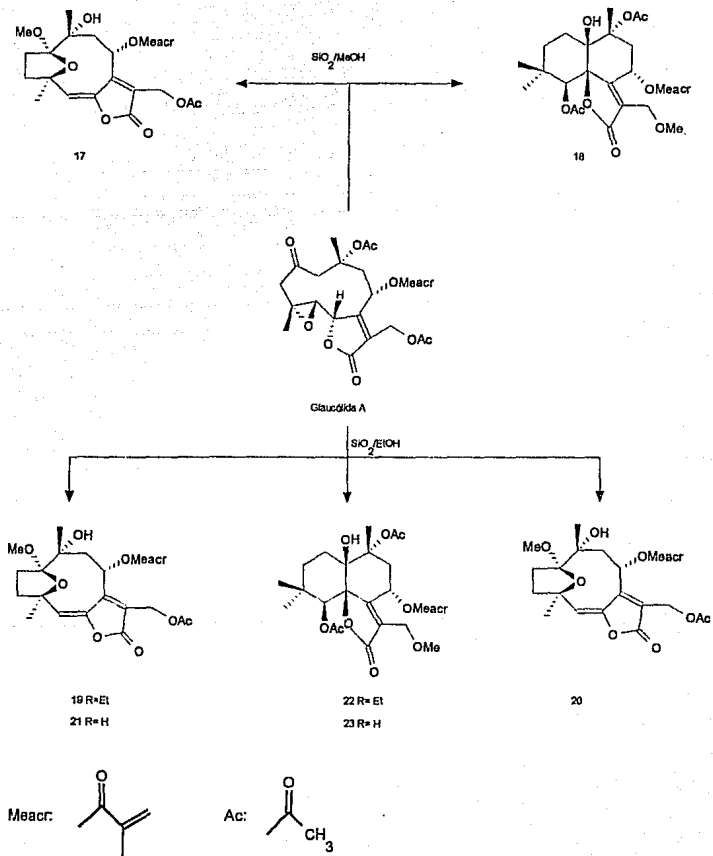


Figura 7. Transformación de la glaucólida A en Hirsutinólidas y Cadinanólidas.

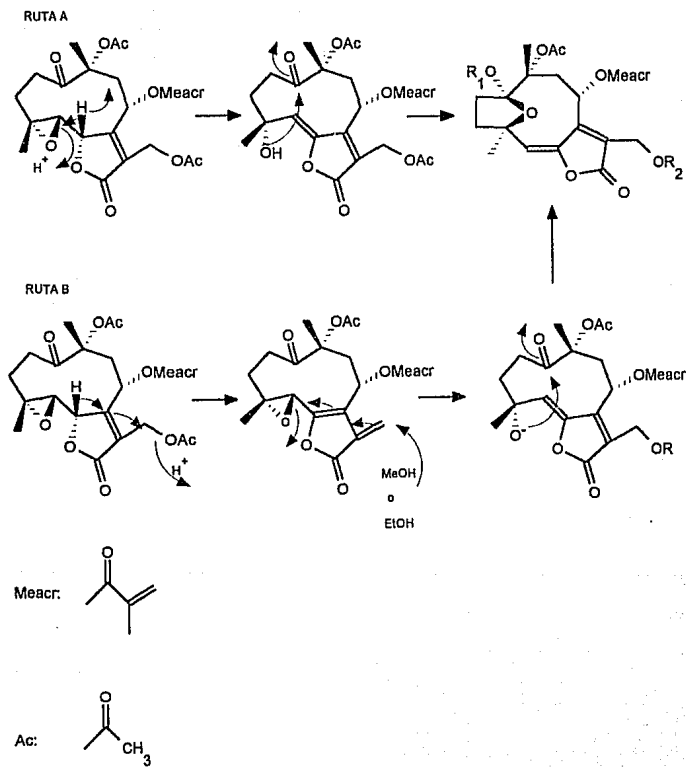
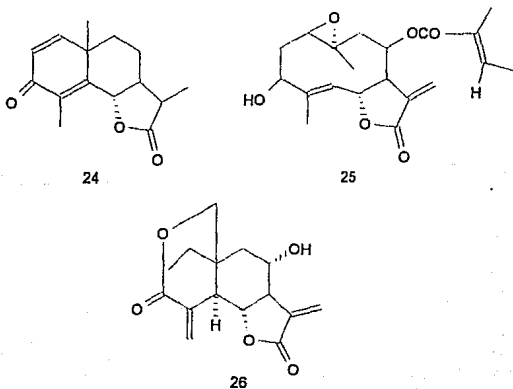


Figura 8.

Actividad biológica de lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas destacan entre los sesquiterpenos por sus propiedades químicas y biológicas¹⁷.

Como ejemplo de estas propiedades biológicas se encuentra la antihelmíntica¹⁸ de la santonina (24), la actividad reguladora del crecimiento vegetal de la heliangina (25)¹⁹ y la inhibidora de tumores cancerosos que posee la vernolepina (26)²⁰. Esta característica ha provocado que el estudio y aislamiento de este tipo de compuestos aumente considerablemente en los últimos años.



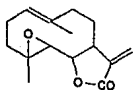
Tanaka y su grupo²¹ demostraron que para que estas sustancias tengan actividad, es necesario que exista una lactona α,β -no saturada en su molécula, ya que, cuando ésta se satura por hidrogenación, la actividad desaparece.

La actividad antineoplásica que muestran los extractos de plantas han recibido una atención considerable, particularmente en la última década²²⁻²⁴.

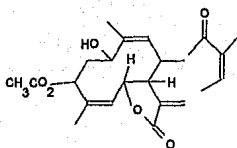
En una revisión (1969) de agentes antineoplásicos de plantas, se evaluaron más de 50 sesquiterpenos por su potencial inhibidor de crecimiento a través de numerosos modelos de tumores²³.

En todos los sesquiterpenos citotóxicos se encontró una función lactónica, todos fueron α β -insaturados y el enlace α -etilénico en todos los casos fue exocíclico. En un estudio posterior de la relación estructura-actividad en las lactonas sesquiterpénicas se observó que la presencia del doble enlace exocíclico $C_{11}-C_{13}$ conjugado a la γ -lactona, fue esencial para la citotoxicidad. La figura 9 muestra algunas lactonas sesquiterpénicas que exhiben actividad antitumoral. Según diversos investigadores¹, las estructuras y reactividades de esas lactonas puede ser asociada con la alquilación selectiva de grupos nucleofílicos en enzimas que controlan la división celular.

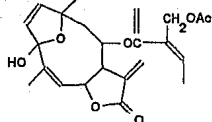
Germacranólidas



Parthenólida

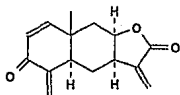


Eupacurín

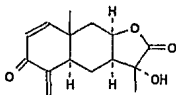


Liatrín

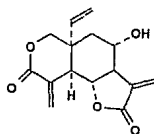
Eudesmanólidas



Encetína

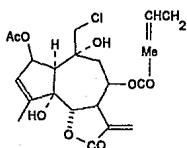


Farinosína

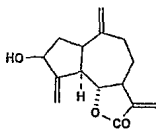


Vemolepína

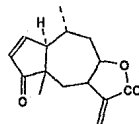
Guzanólidas



Acetato de oupaclorína

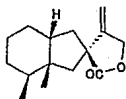


Zakuzanína C



Aromaticína

Bakkanólidas



Bakkanólida-A

Figura 9.

Panorama quimiotaxonómico del género *Vernonia*.

El significado taxonómico del grado de distribución de las lactonas sesquiterpénicas en la tribu *Vernonieae* y especialmente en la subtribu *Vernoniinae*, ha sido discutido por varios autores²⁵, y esta distribución se ha usado para delimitar las subtribus de la *Vernonieae*. Así, lactonas del tipo furano heliangólidas han sido aisladas de las subtribus *Centratherum*, *Eremanthus*, *Lychnophora*, *Piptolepis*, *Proteopsis* y *Vanillosmopsis*. La distribución de otros furano heliangólidas ha sido utilizada para definir la subtribu *Lychnophorinae*.

Por otro lado, se ha postulado como quimiomarcadores por excelencia del género *Vernonia* a las lactonas del tipo glaucólidas e hirsutinólidas. Sin embargo erroncamente se postuló que las hirsutinólidas aisladas de los géneros *Chresta* y *Piptocarpha* eran estereoisómeros de las hirsutinólidas aisladas del género *Vernonia*. Esta proposición fue anulada por revisiones posteriores, ya que tanto el género *Vernonia* como los géneros *Chresta* y *Piptocarpha* producen el mismo tipo de isómeros.

Del estudio fitoquímico del género *Vernonia* hasta 1991 se publicó el siguiente resultado: 26 germacranólidas, 168 glaucólidas e hirsutinólidas, 14 clemenólidas, 36 guaianólidas, 2 eudesmanólidas y 2 bourbonólidas¹².

Estos resultados están señalando que efectivamente las glaucólidas e hirsutinólidas son los quimiomarcadores por excelencia del género *Vernonia*.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo IR se determinaron en un espectrómetro Perkin-Elmer Mod.

337.

Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN ^1H y carbono RMN ^{13}C fueron determinados en un espectrómetro Varian XL-300. Los desplazamientos químicos están dados en ppm utilizando como tetrametilsilano como referencia interna. Las constantes de acoplamiento están dadas en Hz. La multiplicidad de las señales se expresa como sigue: s singulete, d doblete, dbr doblete ancho, t triplete, c cuarteto y dd como doble de doble.

Los espectros de masas EM fueron determinados en un espectrómetro Hewlett-Packard 59858 con sistema acoplado GC MS.

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo utilizando Silicagel 60 Merck 70-230 Mesh ASTM como soporte.

La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se monitoreó utilizando cromatoplasmas de Silica-gel 254 usando como reveladores: luz ultravioleta y solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

Los ensayos de actividad biológica se realizaron en el Hospital "Dr. Luis Castelazo Ayala", del IMSS, por el I.B. Leobardo Calzada S.

Aislamiento de las glaucólidas D (27) y E (28).

La *Vernonia liatroides* D:C fue recolectada en Valsequillo, Puebla, el mes de noviembre de 1989.

La parte aérea seca de la planta, 236 g, fue extraída primeramente con hexano, posteriormente con acetato de etilo y por último con metanol a temperatura ambiente. Cada uno de los extractos se concentró a presión reducida. Durante el proceso de concentración del extracto de acetato de etilo se precipitó un sólido amorfo, el cual fue purificado por recristalizaciones sucesivas de hexano-acetato de etilo, obteniéndose 5.4 g de glaucólida D (27), identificada por comparación espectroscópica con muestra auténtica¹⁵. El extracto de acetato de etilo restante, fue sometido a un proceso de separación mediante una columna cromatográfica empacada con sílice y utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1), lográndose aislar 0.9 g de la glaucólida E (28), identificada por comparación con muestra auténtica¹⁵.

La glaucólida D (27), tiene un punto de fusión de 183-185°C, con Rf 0.6 (hexano-acetato de etilo 1:2), y tiene los siguientes datos espectroscópicos:

IR CHCl_3 ν máx: 3000, 1770 (carbonilo de γ -lactona), 1738 (carbonilo de ester), 1230 y 840 cm^{-1} .

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 5.56 (H-2,ddd,J=7,10,12,1H), 5.15 (H-1,bdr,J=10,1H), 5.02 (H-8,d,J=11,1H), 5.02 (H-13,d,J=13,1H), 4.86 (H-13',d,J=13,1H), 4.75 (H-6,d,J=9,1H), 3.00 (H-9,dd,J=11,13,1H), 2.60 (H-9',d,J=13,1H), 2.58 (H-3,dd,J=7,10,1H), 2.47 (H-5,d,J=9,1H), 2.07 (OCOCH_3 ,s), 2.01 (H-14,s,3H), 1.35 (H-15,s,3H), 1.30 (H-3',dd,J=10,1H) (Espectro 1). Cartas de correlación heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 75.4(300 MHz) CDCl_3 16.80(1.35), 17.40(1.54), 17.55(2.01), 20.80(2.01), 21.00(2.07), 42.45(1.25 y 2.58), 45.85(2.60 y 3.01), 53.40(2.80 y 3.10), 56.35(4.86 y 5.02), 66.27(2.45), 68.27(5.56), 70.22(5.02), 82.04(4.75), 127.50(5.15) (Espectro 3). EMm/z % : 464(0.1), 404(0.4), 362(12), 57(21), 43(100).

La glaucólida E(28), tiene un punto de fusión de 145-146°C con Rf 0.7 (hexano-acetato de etilo 1:2), y presenta los siguientes datos espectroscópicos:

IR CHCl_3 ν máx: 3000, 1770 (carbonilo de γ -lactona), 1738 (carbonilo de éster), 1230 y 840 cm^{-1} .

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 5.60 (H-2,ddd,J=7,10,11,1H), 5.17 (H-1,d,J=10,1H), 5.01 (H-8,d,J=10,1H), 5.00 (H-13,d sist. AB,J=12,1H), 4.85 (H-6,d,J=9,1H y H-13',d,sist. AB,J=10,1H), 3.10 (H-9,dd,J=10,12,1H), 2.67 (H-9',d,J=12,1H), 2.60 (H-3,dd,J=7,12,1H), 2.50 (H-5,d,J=9,1H), 2.03 (H-14,s,1H), 1.40 (H-15,s,3H), 2.01 (OCOCH₃,s).(Espectro 4). Cartas de correlación heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ 75.4(300 MHz) CDCl_3 17.30(1.40), 17.65(2.01), 17.84(1.95), 20.76(2.03), 21.04(2.08), 42.49(1.30 y 2.60), 45.80(2.67 y 3.10), 53.40(2.80 y 3.10), 56.18(4.85 y 5.00), 66.38(2.50), 68.31(5.60), 69.57(5.01), 82.20(4.85), 127.16(5.17), 127.37(5.68 y 6.12) (Espectro 6). EMm/z %: 363(0.4), 303(0.5), 43(100).

Reacción de la glaucólida D (27) con Sílica-gel.

Una solución metanólica de 27 (1000 mg) en presencia de Sílica-gel (10 g) se agitó durante 72 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose un aceite amarillo (800 mg), el cual fue separado en una columna cromatográfica empacada con sílica-gel y eluida con hexano-acetato de etilo (1:1) lográndose aislar 2 productos. El producto más polar se obtuvo como un aceite incoloro (101 mg) con Rf 0.32 (acetato de etilo-hexano 2:1), cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

IR CHCl_3 ν máx: 3562 (OH), 1765 (carbonilo de γ -lactona), 1734 (carbonilo de éster) y 1630 cm^{-1} .

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 5.56 (H-2,ddd,J=7,10,11,1H), 5.20 (H-13 y H13',s,J=13,2H), 5.10 (H-1,d,J=10,1H), 4.66 (H-6,d,J=9,1H), 4.31 (H-8,dd,J=1,10,1H), 2.84 (H-9,dd,J=10,13,1H), 2.63 (H-9',d,J=13,1H), 2.56 (H-3,dd,J=7,12,1H), 2.47 (H-5,d,J=9,1H), 2.12 (OCOCH₃,s,3H), 2.01 (OCOCH₃,s,3H), 1.98 (H-14,s,s,3H), 1.35 (H-15,s,3H), 1.25(H3',dd,J=10.3,1H). (Espectro 7). Mm/z % : 380(0.5), 84(10), 109(11), 43(100). Este producto fue designado como 8-desacilglucólida D (29).

Del segundo producto aislado se obtuvieron 15 mg de un aceite incoloro con Rf 0.45 (acetato de etilo-hexano 2:1) con los siguientes datos espectroscópicos:

IR CHCl_3 ν máx: 3689 (OH), 1751 (carbonilo de γ -lactona), 1751 (carbonilo de éster) y 839 cm^{-1}

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 5.59 (H-2,ddd,J=7,1H), 5.15 (H-1,brd,J=10,1H), 4.81(H-6,d,J=9,1H), 4.97 (H-8,dd,J=1,10,1H), 4.55 (H-13 y H-13',sist. AB,J=12.3), 2.85 (H-9,dd,J=10,13,1H), 2.66 (H-9',d,J=13,1H), 2.56 (H-3,dd,J=7,12,1H), 2.47 (H-5,J=9,1H), 1.90 (H-14,s,3H), 1.37 (H-15,s,3H), 1.25 (H-3',dd,J=9,1H). (Espectro 9). EMm/z % : 380(0.5), 84(10), 109(11), 43(100). Este producto fue designado como 8-acetoiloxi-13-hidroxiglucólida D (30).

Reacción de la glucólida D (27) con borohidruro de sodio¹².

A una solución de 27, (508 mg), en THF (25 ml), se le adicionó borohidruro de sodio (37.4 mg) con agitación continua durante 1 hora, después de este tiempo se adicionaron 10 ml de agua a la mezcla de reacción, extrayendo la fase orgánica con tres porciones de 10 ml de acetato de etilo cada una. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida. La mezcla de reacción se separó en una columna cromatográfica empacada con sílica-gel, eluida con acetato de etilo-hexano (2:1) De la cual se logró aislar 29 (64.1 mg) y 30 (10 mg).

Reacción de la 8-desacilglaucólida D (29) con Reactivo de Jones²⁶.

A una solución acetónica (5 ml) de 29 (30 mg) se agregaron 8 gotas del reactivo de "Jones" hasta que la coloración (naranja) de la solución es permanente. Terminada la reacción se virtió en agua (15 ml), se agitó y posteriormente se extrajo con 3 porciones de 30 ml de éter etílico, después de destilar el éter, se obtienen 28 mg de un producto cristalino 30, de punto de fusión 185-190°C con Rf 0.7 (acetato de etilo-hexano 2:1) y los siguientes datos espectroscópicos:

IR CHCl_3 ν max: 1774 (carbonilo de γ -lactona), 1735 (carbonilo de éster), 1696 (cetona), 1234 y 841 cm^{-1} .

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 5.56 (H-2,m,1H), 5.32 (H-1,d,J=6.6,1H), 5.00 (H-13,d,J=13.8,1H), 4.92 (H-6 y H-13',d), 3.78 (H-9,d,J=10.5,1H), 3.18 (H-9',d,J=10.2,1H), 2.60 (H-13,dd,J=7), 2.58 (H-5,d,J=6.6,1H), 2.04 y 2.10 (OCOCH_3 ,s,3H), 1.97 (H-14,s,3H), 1.13 (H-15,s,3H), 1.25 (H-3',dd,J=10,1H). (Espectro 11). EM/mz % : 350(1.1), 319(0.4), 290(0.7).

Reacción de la 8-desacilglaucólida D (29) con MnO_2 ^{27,28}.

Se disolvió 29 (50 mg) en CH_2Cl_2 (3ml) y se añadió MnO_2 (500 mg). La mezcla fue agitada vigorosamente a temperatura ambiente por 5 horas y diluida con acetona caliente. El material insoluble sedimentó y la capa orgánica se filtró para concentrarla posteriormente a presión reducida. El producto obtenido fue separado en una columna cromatográfica empacada con sílica-gel y eluida con acetato de etilo-hexano (1:1), obteniéndose el compuesto 31.

Reacción de la glaucólida D (27) con ácido metacloro perbenzónico¹⁶.

Se disolvió 27 (100 mg) en CH_2Cl_2 (5 ml) a esta solución se le añadió MCPBA (50 mg). La mezcla formada se sometió a reflujo durante 16 horas; transcurrido este tiempo, se agregó agua y la fase orgánica fue extraída con acetato de etilo: se lavó con una solución de NaHCO_3 hasta pH neutro y por último, se lavó con agua. El producto de reacción se secó con Na_2SO_4 anhidro y concentró a presión reducida, obteniéndose un sólido que fue separado en una columna cromatográfica empacada con sílica-gel y eluida con acetato de etilo-hexano (1:1), lográndose aislar 32 (50 mg), con punto de fusión 124-128°C, Rf 0.55 (AcOEt-Hex 2:1) cuyos datos espectroscópicos son los siguientes:

IR CHCl_3 ν máx: 3000, 1770 (carbonilo de γ -lactona), 1741 (carbonilo de éster), 1233 y 839 cm^{-1} .

RMN ^1H 300 MHz CDCl_3 ppm: 1.40 (H-3',dd,1H), 2.62 (H-5,d,J=8,1H), 2.71 (H-3,dd,1H) 2.73 (H-9',d,J=6,1H), 2.8 (H-9,dd,1H), 2.81 (H-1,d,J=3,1H), 4.82 (H-13',d,J=13,1H), 4.89 (H-8,d,J=9,1H), 4.96 (H-13,d,J=13,1H), 5.22 (H-6,d,J=9,1H), 2.08 y 2.10 (OCOCH_3 ,s), 2.03 (H-14,s,3H), 1.55 (H-15,s), 2.83 y 3.10 (Epomeacr,d,J=6).(Espectro 13).EMm/z % : 109(8.3), 95(24.5), 57(25.5), 43(100).

Reacción de la glaucólida E (28) con borohidruro de sodio¹³.

Una solución de 28 (307 mg) en THF (20 ml) y NaBH_4 (26.1 mg), fue agitada a temperatura ambiente durante 1.25 horas, transcurrido este tiempo se adicionaron 15 ml de agua y la fase orgánica se extrajo con 3 porciones de 10 ml de acetato de etilo cada una, secándose con sulfato de sodio anhidro y concentrándose a presión reducida. La mezcla obtenida se separó

Una solución de **28** (307 mg) en THF (20 ml) y NaBH₄ (26.1 mg), fue agitada a temperatura ambiente durante 1.25 horas, transcurrido este tiempo se adicionaron 15 ml de agua y la fase orgánica se extrajo con 3 porciones de 10 ml de acetato de etilo cada una, secandose con sulfato de sodio anhidro y concentrandose a presión reducida. La mezcla obtenida se separó utilizando una columna cromatográfica empacada con sílica-gel y eluida con acetato de etilo-hexano (1:1),obteniendose 108 mg y 26.9 mg de **29** y **30** respectivamente.

Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

El análisis HPLC de los compuestos **27**, **28**, **29** y **30** se realizó utilizando un cromatógrafo Waters Delta Prep 4000 equipado con un inyector Rheodyne 7010 así como un detector UV modelo 484, La detección se llevó a cabo a 215 nm. La columna utilizada presenta las siguientes características μ Bondapak C-18 (3.9 x 300 mm), con una tamaño de poro de 10 μ m. La elución se llevó a cabo utilizando el sistema gradiente de acetonitrilo-agua siguiente: 0 min (90-10), 20 min (75-25), 27 min (60-40).

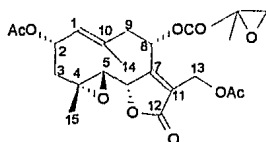
Los tiempos de retención resultantes son los siguientes: **27** (3.5), **28** (4.3), **29** (5.9) y **30** (11.7).

Transformación de **29** en **30** con Sílica-gel.

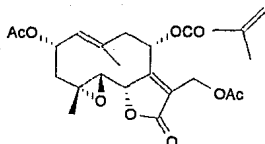
Una solución metanólica (MeOH HPLC) de **29** (3 mg) en sílica-gel (136.6 mg), se colocó bajo agitación continua y temperatura ambiente durante 5 horas, transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y posteriormente se analizó mediante HPLC, eluida con el sistema gradiente descrito en el párrafo anterior, observandose en el cromatograma dos picos con tiempos de retención 5.97 y 11.76 que corresponden a los compuestos **29** y **30** respectivamente.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Las glaucólidas D (27) y E (28) fueron aisladas de la *Vernonia liatroides* e identificadas por comparación con muestras auténticas¹⁵.



Glaucólida D (27)



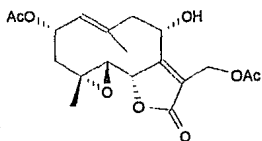
Glaucólida E (28)

En base a los antecedentes mostrados por la glaucólida A, la glaucólida D (27) fue sometida a condiciones similares a las utilizadas en el aislamiento y purificación de este tipo de compuestos.

La reacción de la glaucólida D (27) con sílica-gel, produjo dos compuestos.

El componente más polar 29, es un aceite incoloro con peso molecular de 380 determinado por espectrometría de masas y que está de acuerdo para un compuesto de fórmula $C_{19}H_{24}O_8$. La presencia de los grupos acetato se establece por la señal en m/z 43 ($C_2H_3O^+$, 100%) del espectro de masas, por las señales en 2.01 ppm (3H,s) y 2.12 ppm (3H,s) del espectro de RMN 1H característica de un metilo de acetato y por la presencia de las señales para carbonilo a 170.33 ppm y 171.24 ppm en RMN ^{13}C , donde los grupos metilo aparecen a 20.90 ppm y 21.04 ppm. El protón unido al átomo de carbono que está formando el anillo

lactónico (H-6) se encontró a 4.66 ppm como un doblete indicando su interacción con el protón H-5 el cual se localiza a 2.48 ppm como un doblete. Por otro lado el protón unido al átomo de carbono que esta unido al ester metacrilico (H-8) se encuentra a 4.34 ppm como un doblete lo que indica que solamente esta interaccionando con un solo proton de la posición C-9. Estos datos espectroscópicos corresponden a la 8-desacilglaucólida D (29), publicados en la literatura (Tabla 2), aislada como "producto natural" de la *Vernonia uniflora*²⁹.



8-desacilglaucólida D (29)

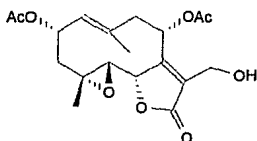
Tabla 2

| H | Vernonia uniflora | 8-desacilglaucólida D (29) |
|-----|-------------------|----------------------------|
| 1 | 5.12 | 5.10 |
| 2 | 5.56 | 5.56 |
| 3 | 2.56 | 2.56 |
| 3' | 1.28 | 1.25 |
| 5 | 2.48 | 2.47 |
| 6 | 4.66 | 4.66 |
| 8 | 4.34 | 4.31 |
| 9 | 2.84 | 2.84 |
| 9' | 2.64 | 2.63 |
| 13 | 5.24 | 5.20 |
| 13' | 5.03 | 5.20 |
| 14 | 1.37 | 1.35 |
| 15 | 2.03 | 1.98 |
| OAc | 2.04 | 2.01 |
| | 2.14 | 2.12 |

El componente menos polar 30, es un aceite incoloro con peso molecular de 380 y formula condensada $C_{19}H_{24}O_8$. La presencia de los grupos acetato se establece por la señal en m/z 43 ($C_2H_3O^+$, 100%) del espectro de masas, así como por las señales características en 2.03 ppm (3H,s) y 2.10 ppm (3H,s) del espectro de RMN 1H (Espectro 9) y por la presencia de las señales en RMN ^{13}C , (Espectro 10) para los átomos de carbonilo a 169.73 ppm (s) y 170.31 ppm (s) donde los grupos metilo aparecen a 20.73 ppm y 21.03 ppm.

El espectro de IR presenta una banda a 3689 cm^{-1} atribuida al grupo OH, mientras que el carbonilo de la γ -lactona y el carbonilo del éster se encuentran en 1751 cm^{-1} . En el espectro de RMN 1H a 300 MHz (Espectro 9) de 30 se observan H-6 y H-8 como una señal doble a 4.81 ppm y una señal doble de doble a 4.79 ppm respectivamente (Tabla 2). La comparación de los espectros de RMN 1H de 29 y 30 permite observar un desplazamiento hacia campo bajo de H-6 y H-8 en 30 con respecto a 29. Esto indica que se esterificó la posición C-8 en 30, mientras que en 29 esta posición esta ocupada por un grupo OH. Fenómeno contrario se observa en los desplazamientos de los protones H-13 y H-13' ya que en 29 se ubican a campo bajo con respecto a 30. Lo que indica que en la posición C-13 se ubica un grupo OH (Tabla 2).

El análisis anterior, establece la estructura 30 para el compuesto descrito como 8-acetoiloxi-13-hidroxiglaucólida D.



8-acetoiloxi-13-hidroxiglaucólida D (30)

De la reacción de la glaucólida D (27) con borohidruro de sodio (NaBH_4) se obtuvieron dos compuestos.

Los datos físicos y espectroscópicos de IR y RMN ^1H (Espectro 7) del compuesto más polar, son idénticos con aquellos descritos para el compuesto 8-desacilglaucólida D (29).

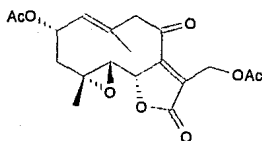
El componente menos polar presenta los datos físicos y espectroscópicos de IR y RMN ^1H (Espectro 9) descritos para 8-acetoiloxi-13-hidroxiglaucólida D (30).

De la reacción de 8-desacilglaucólida D (29) con Reactivo de Jones se obtuvo un producto 31, con punto de fusión 185-190 °C, el cual tiene un peso molecular de 378, obtenido por espectrometría de masas y que está de acuerdo para un compuesto de fórmula condensada $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_8$.

El espectro de IR de esta sustancia muestra una banda en 1774 cm^{-1} y otra en 1735 cm^{-1} correspondientes a un carbonilo de γ -lactona y carbonilo de ester respectivamente, además de la señal en 1696 cm^{-1} que corresponde a una cetona.

El espectro de RMN ^1H (Espectro 11) presenta una señal en 4.92 ppm asignada a los protones H-6 y H-13'. Dos señales dobles en 3.78 (1H, J=10 Hz) y en 3.18 (1H, J=10.2 Hz) formando un sistema AB y que corresponden a los protones H-9 y H-9'. Los datos anteriores y la ausencia de la señal del protón H-8, indican la oxidación del grupo OH en la posición C-8. Esto se comprueba tanto al observar en el espectro de RMN ^{13}C , (Espectro 12), una señal en 193.71 ppm que corresponde a una cetona así como en el espectro de masas donde se observa una señal a m/z 350 (CO^+ , 1.1%) que corresponde a la pérdida de CO a partir del ión molecular ($\text{M}-28$)⁺.

Una evidencia adicional para la estructura del compuesto **31** fue obtenida cuando el compuesto **29** reaccionó con dióxido de manganeso (MnO_2)^{24,25}, ya que al comparar los espectros de IR, RMN ^1H y RMN ^{13}C del producto de reacción con los del compuesto **31** se observó que se trata de la misma estructura.



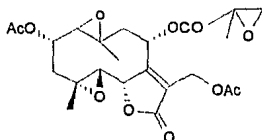
8-desacil-8-cetoglucólida D (**31**)

La reacción de la glaucólida D (**27**) con ácido metacloro perbenzóico (MCPBA) produjo un compuesto con punto de fusión 124-128 °C, el cual tiene un peso molecular de 480, obtenido por espectrometría de masas y está de acuerdo para un compuesto de fórmula condensada $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$.

El espectro de IR presenta en 1770 cm^{-1} una banda característica para el carbonilo de lactona y en 1741 cm^{-1} una banda que corresponde a carbonilo de éster.

En el espectro de RMN ^1H (Espectro 13) se observa una señal doble en 2.81 ppm asignada al protón H-1 que se encuentra desplazada hacia campo bajo con respecto a la señal de H-1 (5.15 brd) en la glaucólida D, se observa una señal múltiple en 5.03 ppm que corresponde al protón 2 desplazada hacia campo alto y una señal doble en 5.22 ppm asignada al protón 6

desplazada hacia campo bajo. En el espectro de RMN ^{13}C (Espectro 14) se observan las señales de C-1 (57.36 ppm) y C-10 (67.12 ppm) desplazadas hacia campo alto, estos datos indican la desaparición de la doble ligadura y la formación del epóxido en C-1 y C-10. El análisis anterior establece la estructura 32 para el compuesto descrito como epóxido de glaucólida D.



Epóxido de glaucólida D (32)

Tabla 2. Datos de RMN ^1H de los compuestos 27-32.

| Proton | Compuestos | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| H-1 | 5.15 brd (10) | 5.17 brd (10) | 5.10 brd (10) | 5.15 brd (10) | 5.30 brd (10) | 2.82 d (3) |
| H-2 | 5.56 ddd (7,10,12) | 5.60 ddd (7,10,11) | 5.56 ddd (7,10,11) | 5.59 ddd (7,10,11) | 5.56 ddd (7,10, 11) | 5.03 m |
| H ₂ -3 | 2.58 dd (7, 10) | 2.60 dd (7, 12) | 2.56 dd (7, 12) | 2.56 dd (7, 12) | 2.60 dd (7,10) | 2.71 dd |
| | 1.25 dd (10, 13) | 1.30 dd (11, 13) | | | 1.28 dd (7, 10) | 1.40 dd |
| H-5 | 2.45 d (9) | 2.50 d (9) | 2.47 d (9) | 2.47 d (9) | 2.56 d (9) | 2.62 d (8) |
| H-6 | 4.75 d (9) | 4.85 d (9) | 4.66 d (9) | 4.81 d (9) | 4.992 d (9) | 5.22 d (9) |
| H-8 | 5.02 d (11) | 5.01 d (10) | 4.31 dd (1, 10) | 4.97 dd (1, 10) | | 4.89 d (9) |
| H ₂ -9 | 3.00 dd (11, 13) | 3.10 dd (10, 12) | 2.84 dd (10, 13) | 2.85 dd (10, 13) | 3.76 d (10) | 2.80 dd |
| | 2.60 d (13) | 2.67 d (12) | 2.63 d (13) | 2.66 d (13) | 3.16 d (10) | 2.73 d (6) |
| H ₂ -13 | 5.02 d (13) | 5.00 d (12) | 5.03 d (13) | 4.55 s | 5.02 d (13) | 4.96 d (13) |
| | 4.86 d (13) | 4.85 d (12) | 5.20 d (13) | 4.55 s | 4.88 d (13) | 4.82 d (13) |
| H-14 | 2.01 s | 2.01 s | 1.98 s | 1.90 s | 1.98 s | 2.08 s |
| H-15 | 1.35 s | 1.40 s | 1.35 s | 1.37 s | 1.13 s | 1.55 s |
| MeAc | | 5.68 s | | | | |
| | | 1.95 s | | | | |
| Epome acr | 2.80 d (6) | | | | | 2.83 d (7) |
| | 3.10 d (6) | | | | | 3.10 d (6) |
| OAc | 1.54 s | | | | | 1.62 s |
| | 2.01 s | 2.03 s | 2.01 s | 2.03 s | 2.04 s | 2.08 s |
| | 2.07 s | 2.08 s | 2.12 s | 2.10 s | 2.10 s | 2.10 s |

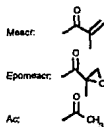
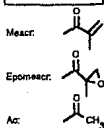


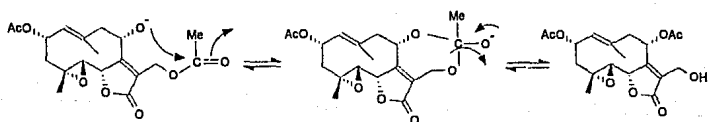
Tabla 3. Datos de RMN ^{13}C de los compounds 27-32.

| Carbon | Compuestos | | | | | |
|----------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 |
| C-1 | 127.50 | 127.16 | 127.94 | 127.01 | 128.32 | 57.36 |
| C-2 | 68.27 | 68.31 | 68.38 | 68.24 | 68.33 | 62.61 |
| C-3 | 42.45 | 42.49 | 42.32 | 42.44 | 42.54 | 42.26 |
| C-4 | 59.57 | 59.65 | 60.05 | 59.53 | 59.93 | 58.71 |
| C-5 | 66.27 | 66.38 | 66.11 | 65.71 | 65.56 | 64.90 |
| C-6 | 82.04 | 82.20 | 82.14 | 82.40 | 81.42 | 81.48 |
| C-7 | 162.40 | 164.14 | 167.40 | 160.92 | 158.07 | 161.28 |
| C-8 | 70.22 | 69.57 | 69.15 | 69.20 | 193.71 | 67.31 |
| C-9 | 45.85 | 45.80 | 49.55 | 45.95 | 54.44 | 45.39 |
| C-10 | 133.57 | 134.03 | 134.35 | 133.89 | 130.66 | 67.12 |
| C-11 | 129.40 | 128.45 | 126.54 | 131.91 | 129.10 | 129.27 |
| C-12 | 170.22 | 170.23 | 170.82 | 170.31 | 170.14 | 170.13 |
| C-13 | 56.35 | 56.18 | 56.94 | 55.71 | 57.64 | 56.01 |
| C-14 | 17.55 | 17.65 | 17.61 | 17.60 | 17.07 | 17.83 |
| C-15 | 16.80 | 17.97 | 17.87 | 17.95 | 17.65 | 17.93 |
| MeAcr | | 127.43 | | | | |
| | | 135.10 | | | | |
| | | 166.00 | | | | |
| Epomeacr | 17.40 | | | | | 17.07 |
| | 53.02 | | | | | 53.07 |
| | 53.40 | | | | | 53.30 |
| | 170.00 | | | | | 169.97 |
| OAc | 20.80 | 20.76 | 20.90 | 20.73 | 20.33 | 20.77 |
| | 21.00 | 21.04 | 21.04 | 21.03 | 21.03 | 20.92 |
| | 170.21 | 170.31 | 170.33 | 169.73 | 168.88 | 170.13 |
| | 170.32 | 170.43 | 171.24 | 170.31 | 169.35 | 170.15 |



Al reaccionar la 8-desacilglaucólida D (29), con Silicagel, se obtiene un compuesto que presenta el mismo tiempo de retención del mostrado por la 8-acetoiloxi-13-hidroxi-glaucólida D (30) en el análisis HPLC.

Estos resultados y la existencia de 29 y 30 como productos de reacción de la glaucólida D (27), tanto con sílice, como con borohidruro de sodio (NaBH_4), indican la posibilidad de que estos compuestos esten en equilibrio mediante un intermediario cíclico de 7 miembros como se indica en la siguiente figura :



Resultados de la Actividad Biológica de las glaucólidas A y D.

Algunos tipos de cáncer de mama humano son hormona-dependiente debido a que su crecimiento depende de un continuo abastecimiento de hormonas sexuales^{30,31}.

La administración de sustancias que alteran el contenido normal puede en algunos pacientes inducir a una regresión de la enfermedad³⁰. Entre los compuestos más utilizados para esta terapia hormonal se encuentran los andrógenos, estrógenos y antagonistas de estrógenos como el tamixifen³².

La determinación del contenido de receptores de estradiol o progesterona en biopsias de tumores de cáncer mamario es un procedimiento común como indicación de una respuesta probable en los pacientes a una terapia endócrina.

Un procedimiento para la determinación de receptores se realiza de la siguiente forma; el citosol que proviene del tumor se divide en tres partes iguales, la primera se utiliza como blanco, la segunda parte se incuba durante 30 minutos con ³H estradiol y la tercera parte se incuba primero con estradiol sin marcar y después con ³H estradiol.

Si existe una diferencia en cuentas por minuto (cmp) entre la primera y la segunda parte indican que el tumor es hormono dependiente. Por otro lado, la segunda y tercera parte fijan el 100 % y 0 % de unión y el ³H estradiol a las células tumorales.

El grado de unión de las glaucólidas a los receptores de la célula fue estimado por el porcentaje de inhibición de la incorporación de ³H estradiol al citosol obtenido de tumores estrógeno dependientes el cual antes de la determinación de receptores fueron incubados durante 30 minutos con las glaucólidas. La glaucólida A presentó un 26 % de inhibición mientras que la glaucólida D mostró un 60% de la inhibición. Mayor grado de actividad se logró cuando las glaucólidas se incubaron durante 3 horas ya que la inhibición fue de 79 y 80 % para las glaucólidas A y D respectivamente.

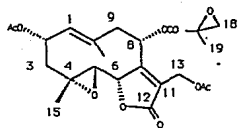
V. CONCLUSIONES

1. La glaucólida D reacciona de manera diferente a la glaucólida A en presencia de sílice, produciendo la 8-desacilglaucólida D (29) y 8-acetoiloxi-13-hidroxiglaucólida D (30) que son artefactos producidos en los procesos de aislamiento de la glaucólida D y no productos naturales como han sido considerados.
2. La glaucólida E (28) no sufre transformación alguna cuando en solución metanólica se agitó continuamente durante más de 72 horas en presencia de sílice, esta diferencia en reactividad que muestran las glaucólidas D (27) y E (28) frente a la sílice, es exclusivamente debida al éster en C-8.
3. Tanto las glaucólidas D (27) y E (28) reaccionan con borohidruro de sodio para producir 8-desacilglaucólida D (29) y 8-acetoiloxi-13-hidroxiglaucólida D (30).
4. Las glaucólidas A y D presentan cierto grado de afinidad en los receptores de las células tumorales de mama.
5. No se justifica el utilizar las sustancias obtenidas mediante transposiciones catalizadas por Sílica gel como marcadores quimiotaxonómicos del género *Vernonia*.

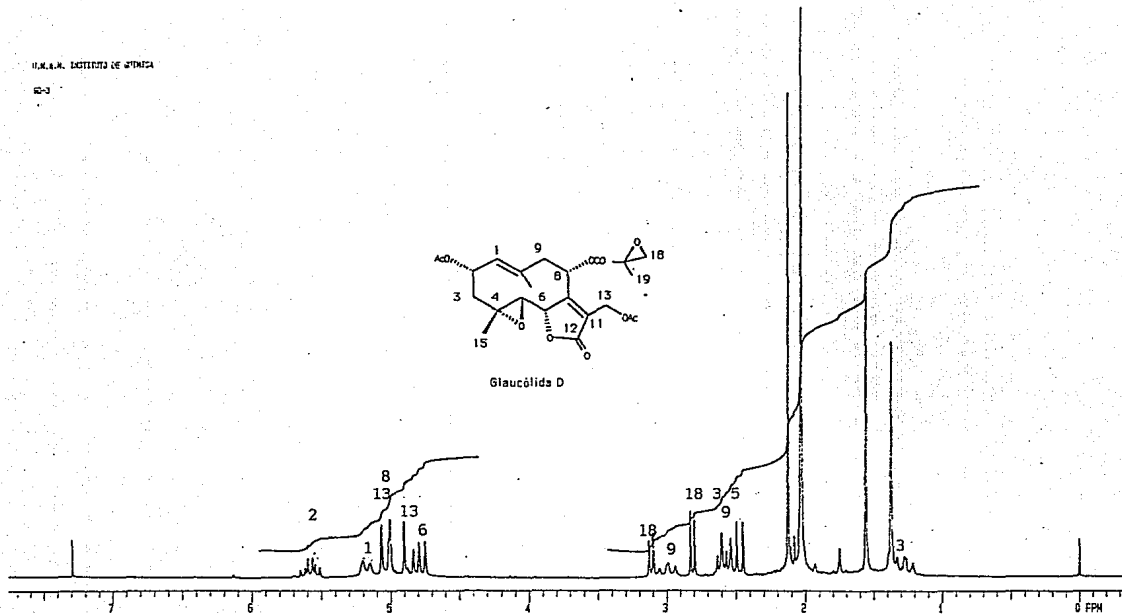
Espectro 1

I.N.S.I.C. INSTITUTO DE QUÍMICA

8-3



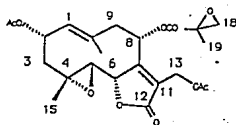
Glaucólida D



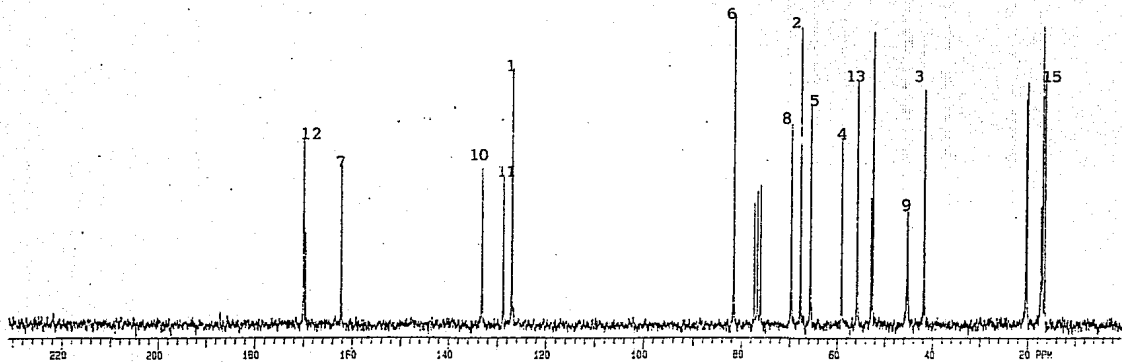
Espectro 2

4. NÚMERO DE ICH

3. N.º DE INSTITUTO DE QUÍMICA



Glaucolid D



Espectro 3

M. MARTINEZ, ED. 101
 J.M.A.M. INSTITUTO DE QUÍMICA

F1 (PPM)

7

6

5

4

3

2

1

0

160

140

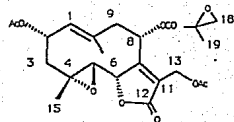
100

80

F2 (PPM)

20

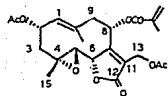
0



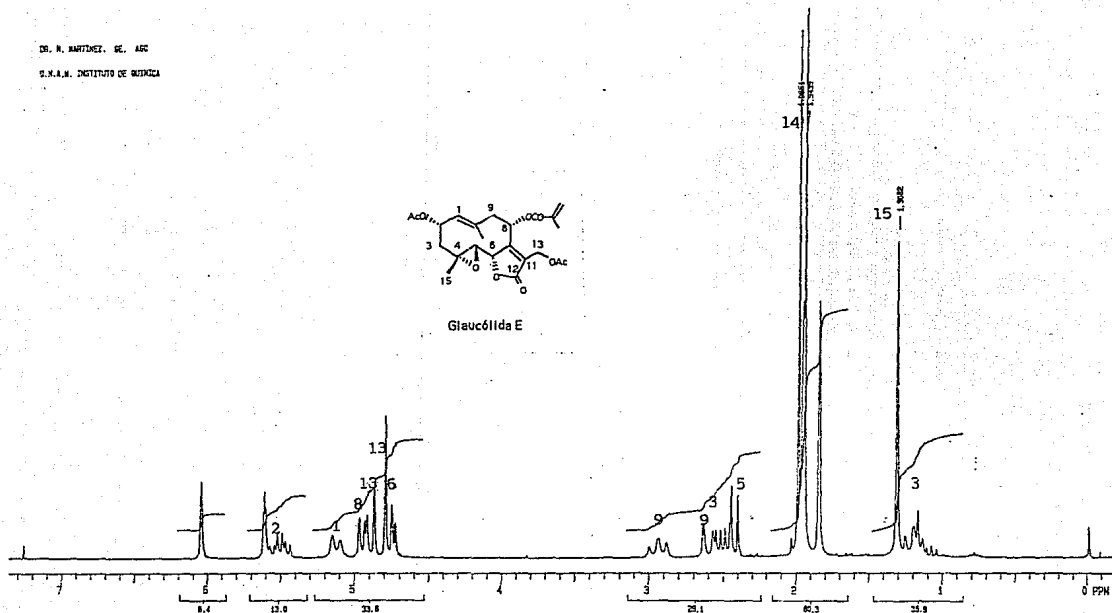
Giucólida D

Espectro 4

DR. N. MARTÍNEZ DE AGO
 S.N.A.M. INSTITUTO DE QUÍMICA



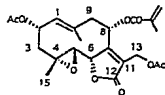
Glucólida E



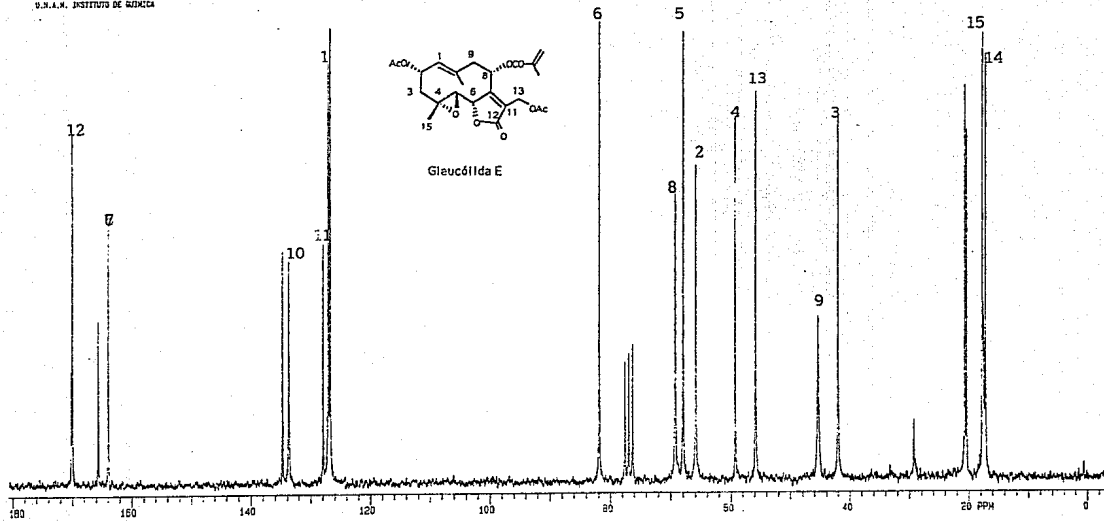
Espectro 5

DR. M. MARTÍNEZ, SE. AIC

U.N.A.M. INSTITUTO DE QUÍMICA



Glucólida E



Espectro 6

DR. N. MARTINEZ, DE. IAC
 U.N.A.M. INSTITUTO DE QUÍMICA

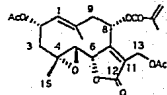
F1 (PPH)

6.0
 5.5
 5.0
 4.5
 4.0
 3.5
 3.0
 2.5
 2.0
 1.5
 1.0
 0.5

130 120 110 100 90 80

F2 (PPH)

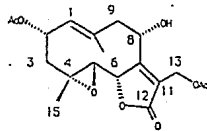
60 50 40 30 20



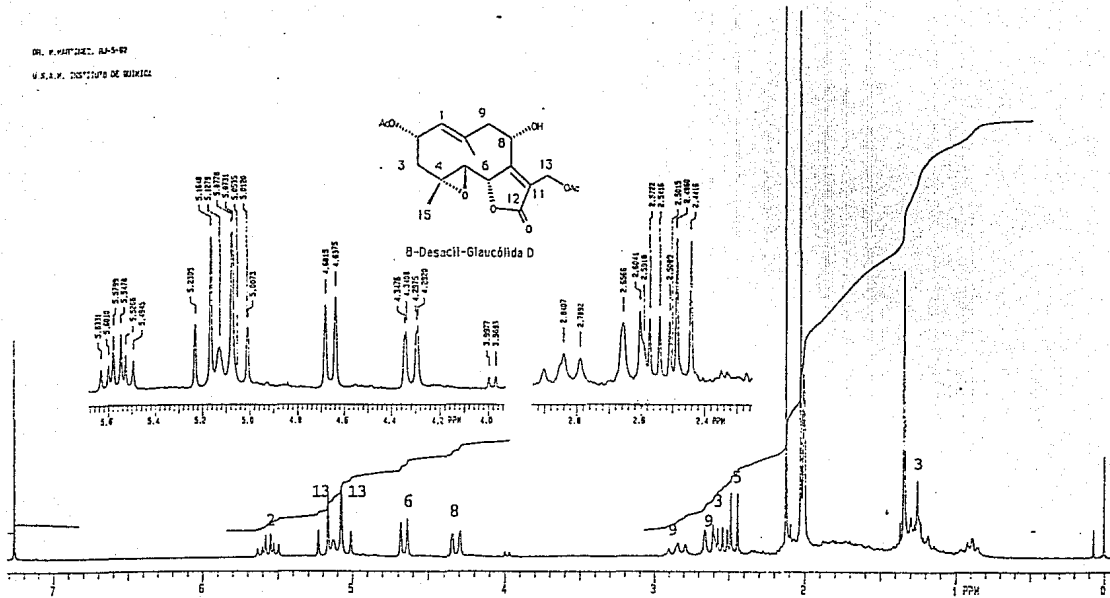
Glucólida E

Espectro 7

DR. F. MARTINEZ, RA-5-67
 U.S.N.M. INSTITUTO DE QUIMICA



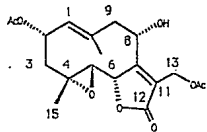
8-Desacil-Glucofida D



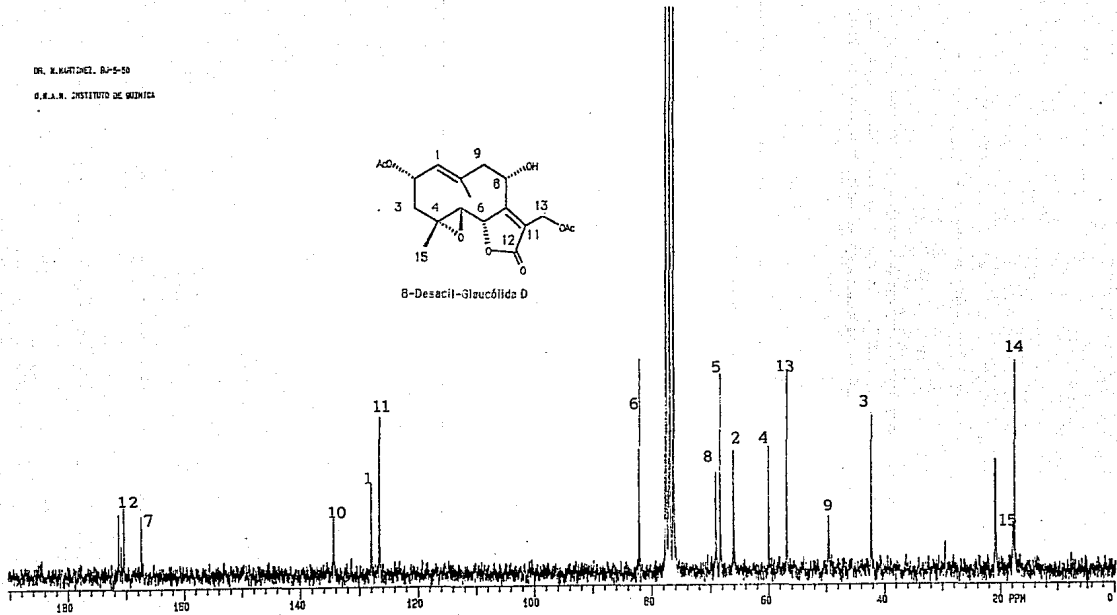
Espectro 8

DR. E. KATZCHEL. AP-5-50

C.N.A.N. INSTITUTO DE QUÍMICA



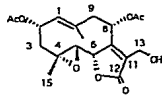
8-Desacil-Glaucólida D



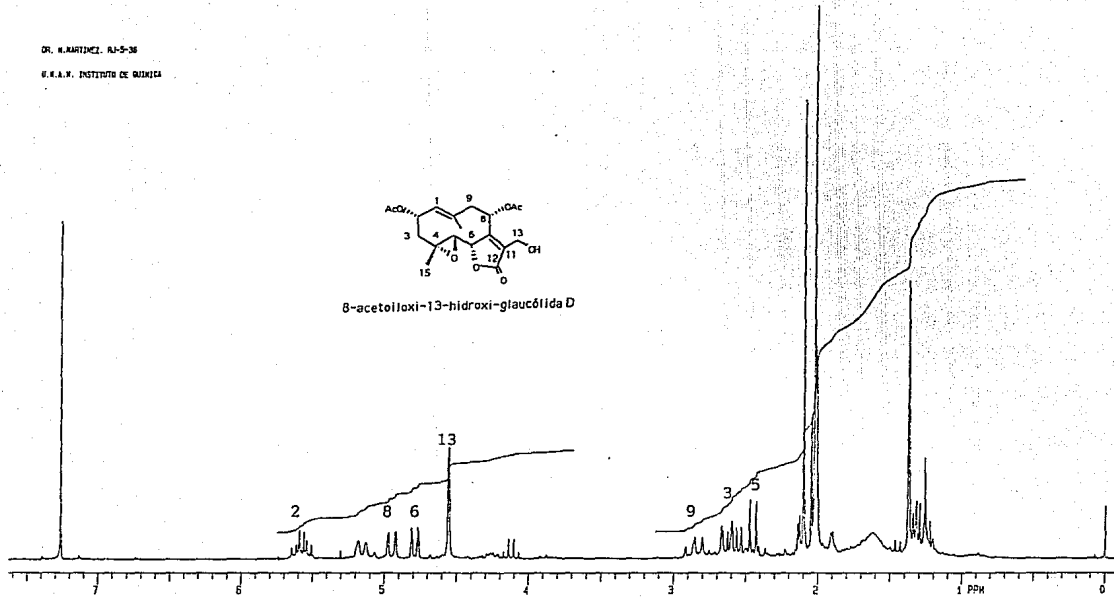
Espectro 9

DR. W. MARTINEZ. RA-5-36

U.S.A.M. INSTITUTO DE QUIMICA



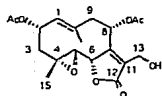
8-acetoloxi-13-hidroxi-glucólida D



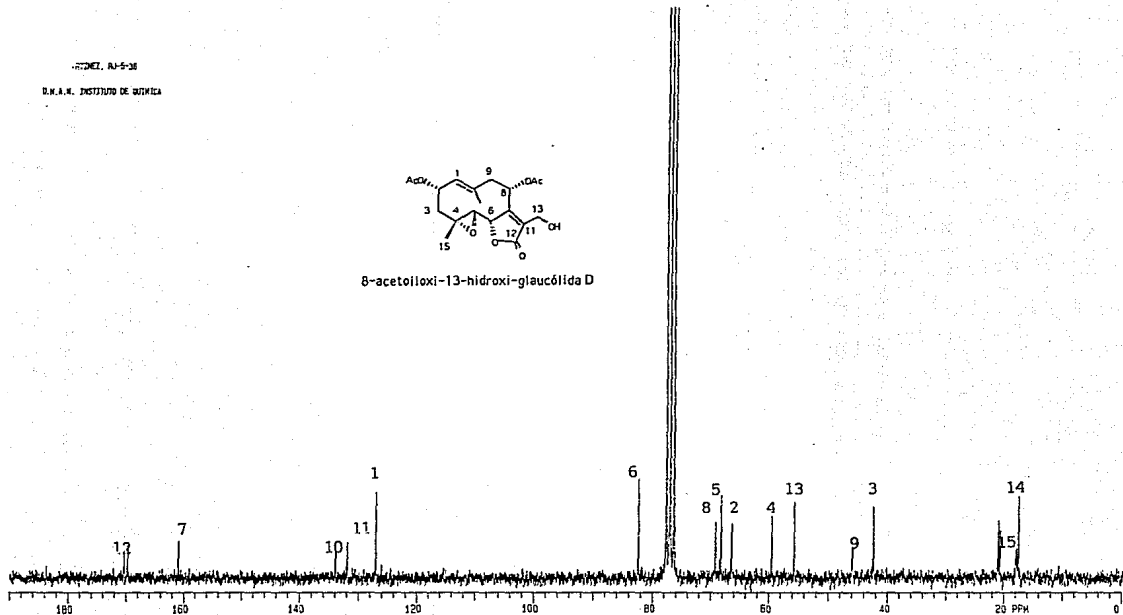
Espectro 10

RDZEL RJ-5-36

D.M.A.N. INSTITUTO DE QUÍMICA



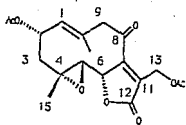
8-acetoxy-13-hidroxi-glaucólida D



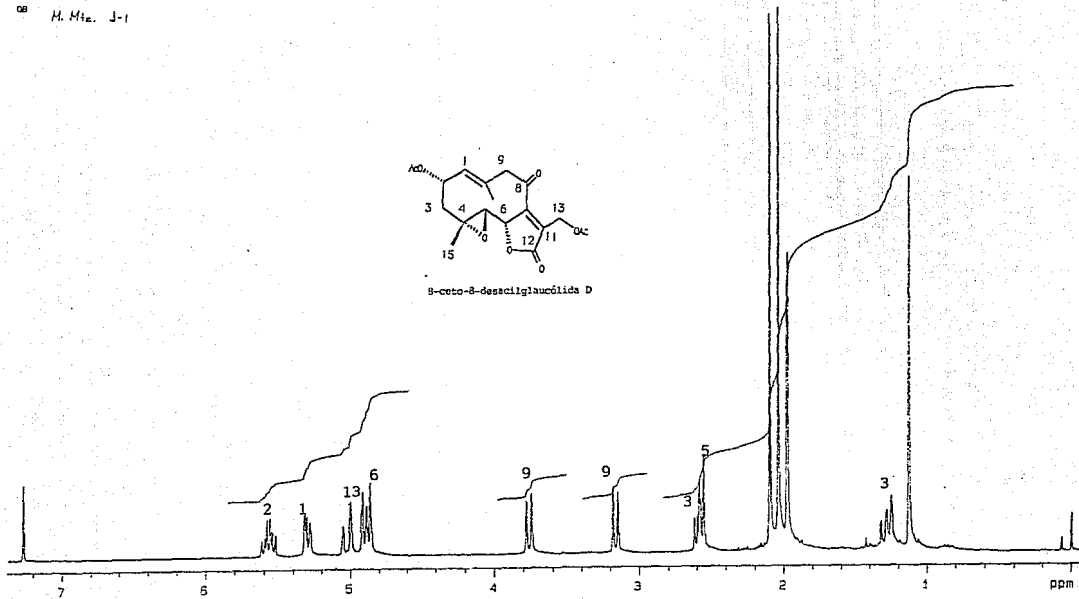
Espectro 11

U.N.A.N. Instituto de Química

08 H. Mire J-1

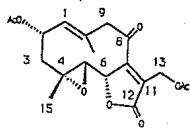


8-aceto-8-desacetylglaucolide D

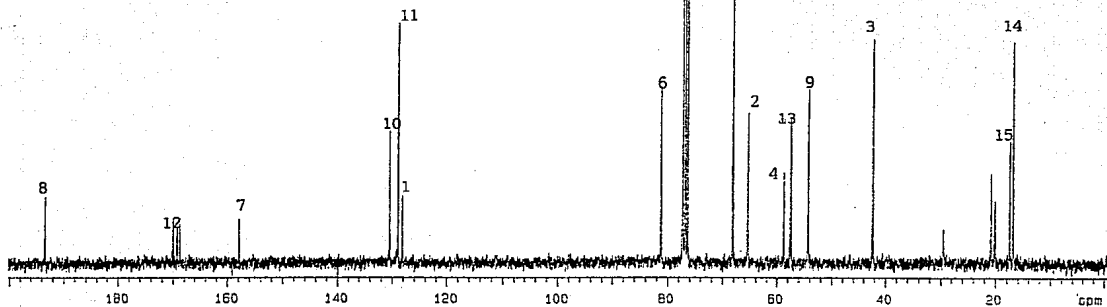


Espectro 12

U.N.A.M. Instituto de Químico
M. Mtz. J-1
CBS

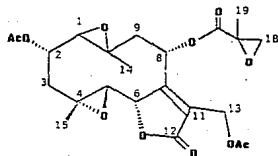


8-aceto-8-desacetylglaucolide D

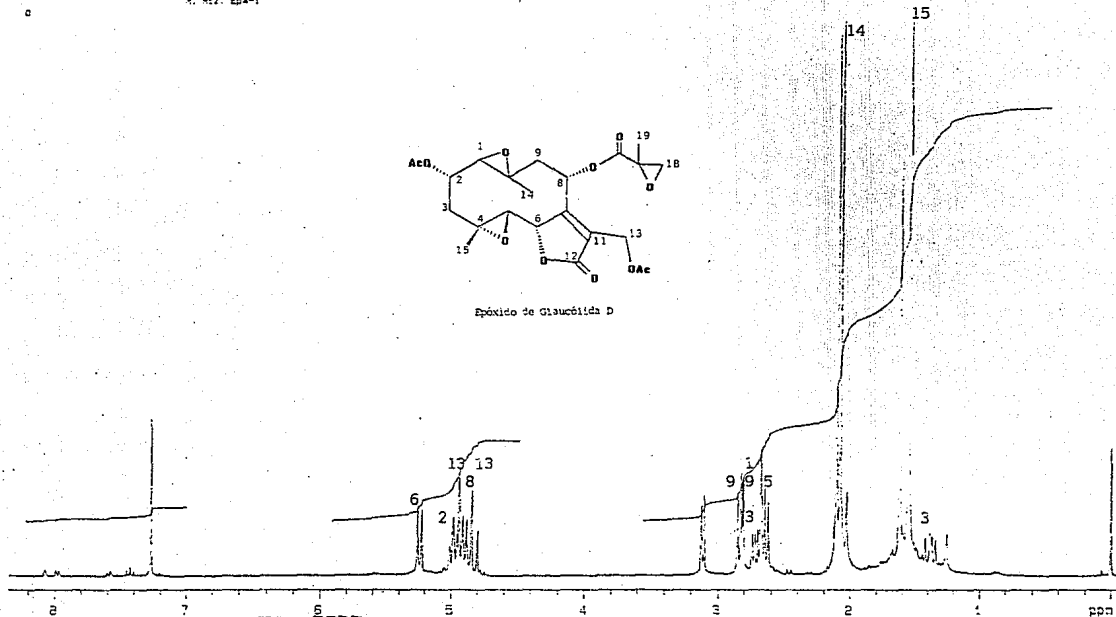


Espectro 13

M.R.A.N. Instituto de Química
M. MZ. Epa-1



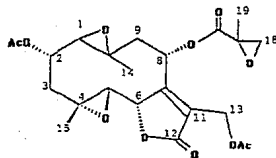
Epóxido de Glaucólida D



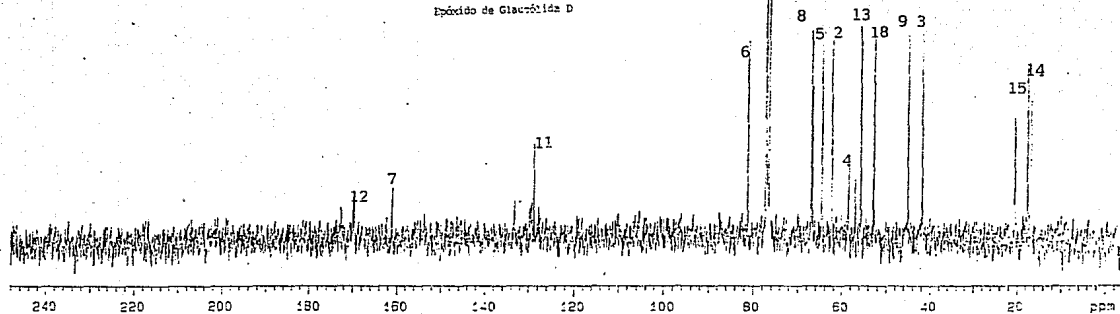
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Espectro 14

I.N.A.M. Instituto de Química
M. H. 2. Ep4-1



Epóxido de Glucósido D



VII. BIBLIOGRAFIA

1. E. Rodríguez, G.H.N. Towers and F.C. Mitchell. *Phytochemistry*, **15**,1573-1580(1976).
2. F.C. Seaman, "Sesquiterpene Lactones as taxonomic characters". *Bot. Rev.*; **48**,121(1982).
3. M. Martínez and P. Joseph-Nathan. III Chemical Congress of North America June (1988), Toronto Canadá.
4. M. Martínez; A. Sánchez F; G. López and P. Joseph-Nathan. *Z. Naturforsch*; **41 C**,1119 (1986).
5. A. Romo de Vivar. Productos naturales de la flora mexicana; (1985). Ed. Limusa.
6. N.H. Fischer, E.J. Olivier y H.D. Fischer. *The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones*.(70803).
7. Geissman, T.A. "Recent Advances in Phytochemistry". **6**, Academic Press. N.Y.(1973).
8. Geissman, T.A. and D.H. Crout. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. Freeman Cooper and Co. (1969).
9. K. Takida. *Pure and Applied Chemistry*. **21**,2(1970).
10. The Chemistry of natural products. Sixth International Symposium on the chemistry of natural products (1969).
11. K.Naya, R. Kanazawa and M. Sawada. *Bull. Chem. Soc. Japan*. **48**,3220(1975).
12. Martínez V.M. Implicaciones Quimiotaxonómicas de las Transformaciones de Glaucolíidas en Hirsutinólidas y Cadinanolíidas *Tesis de Doctorado*, CINVESTAV, I.P.N.(1992).
13. F. Bohlman, P.K. Mahanta y H. Robinson, *Phytochemistry*, **18**,289(1979).
14. F. Bohlman, C. Zdero, R.M. King y H. Robinson, *Phytochemistry*, **18**,987(1979).
15. E. Maldonado, R. Martínez y M. Martínez. *Rev. Latinoamer. Quím.* **11**,58(1980).
16. M. Berkouski, T.J. Mabry, T.W. Adams, H.W. Watson y S.B. Jones, *Rev. Latinoamer. Quím.*,**7**,111(1976).

17. J. Romo y A. Romo de Vivar. *Progress in the chemistry of organic natural products*. 25,90(1967).
18. T. Nakabayashi. *J. Pharm. Soc. Japan*, 74, 895-8(1954).
19. H. Marimo, Y. Sanno y H. Oshio. *Tetrahedron*, 22,3173(1966).
20. S.M. Kupchan, R.J. Hemingway, D. Warner y A. Karim. *J. Org. Chem*, 3903(1969).
21. Y. Iino, A. Tanaka y K. Yamashita. *Agr. Bio. Chem*, 36,2505(1972).
22. C.H. Smith, J. Larner, A.M. Thomas and S.M. Kupchan. *Biochim. Biophys. Acta* 276,94(1972).
23. J.L. Hartwell and B.J. Abbott. *Advan. Pharmacol. Chemoter.* 7,117(1969).
24. K.M. Lee, T. Ibuka, H.C. Huang and D.L. Harris. *J. Pharm. Sci.* 64,1077(1975).
25. T.J. Mabry, Z. Abdel-Baset y W.G. Padolina. *Bio. Synt. and Eco.* 2,185(1975).
26. K. Bowden, I. M. Heilbron, E.R.H. Jones y B.C.L. Weedon. *J. Chem. Soc.* 148,39(1946).
27. S. Torii, T. Inokuchi and H. Ogawa. *J. Org. Chem.* 44,3412-3414(1979).
28. J. Attenburrow. A.F.B. Cameron, J.H. Chapman, R.M. Evans, B.A. Hems, A.B.A. Jansen and T.J. Walker. *Chem. Soc.* 1094(1952).
29. F. Bohlmann and C. Zdero. *Rev Latinoamer. Quím.* 19/2 63-65(1988).
30. E.V. Jensen. *Cáncer*. 46,2759(1980).
31. M. Medina, L. Calzada, E. Lostaunau, R. Torres y A. Zárate. *Arch. Invest. Med.* 18,235(1987).
32. J. Rouesse, M. Tubiana y H.A. Filleul. H.A. (1988) en "*Handbook of Chemoteraphy and clinical Oncology*" (J.P. Droz, E. Cvitkovic, J.P. Armand and S. Khoury eds.) pp.238-245, F.I.S.S., Paris.