

11

Zey



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ESTUDIO QUIMICO DE LAS HOJAS DE Tabebuia rosea PLANTA UTILIZADA EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIATURA EN LA CARRERA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO S U S T E N T A : MARIA ISABEL CARLOS BLANCAS

U N A M FES ZARAGOZA



SE FUNDÓ EN SU NUESTRA REVISIÓN

DIRECTOR: M. en C. ALEJANDRO RUIZ CANCINO

MEXICO, D. F.

NOVIEMBRE, 1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN LA FES ZARAGOZA CAMPUS II, UNAM,
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES L-314. BAJO LA DIRECCIÓN DEL:
M. EN C. ALEJANDRO RUIZ CANCINO.**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN EL XXXI CONGRESO NACIONAL DE
QUÍMICA, REALIZADO EN SEPTIEMBRE DE 1995 EN MAZATLÁN SINALOA, MÉXICO.**

Agradecimiento :

A la M. en C. Clara H. Ramos y Eduardo Iñigo Abrego del Instituto de Biología de la UNAM por la clasificación y recolección del material vegetal.

Al personal técnico - académico del Instituto de Química de la UNAM y en particular al Dr. Guillermo Delgado Lamas por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

En Memoria del M. en C. Alejandro Ruiz Cancino.

Quien ha dejado en todos la fuerte convicción de superación, para cada día ser mejores.

Gracias por su dedicación, orientación y disposición en todo momento.

INDICE

	Pag
1. INTRODUCCION.	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1. La familia <i>Bignoniaceae</i> .	3
2.1.1. El género <i>Tabebuia</i> .	4
2.1.2. Usos en la medicina tradicional.	6
2.2. Metabolitos secundarios.	7
2.2.1. Naftoquinonas.	12
2.2.2. Furanonaftoquinonas.	16
2.2.3. Terpenos.	18
2.2.4. Polifenoles.	23
2.2.5. Flavonoides.	26
2.3. <i>Artemia salina</i> .	28

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	29
4. OBJETIVO.	30
5. HIPOTESIS.	31
6. PARTE EXPERIMENTAL.	32
6.1. Recolección del material vegetal.	32
6.2. Extracción del material vegetal.	32
6.3. Aislamiento y purificación.	33
6.4. Bioensayo con <i>Artemia salina</i> .	35
6.4.1. Preparación de muestras.	35
6.4.2. Incubación de <i>Artemia salina</i> .	35
6.4.3. Determinación de actividad frente a <i>Artemia salina</i> .	35
7. MATERIAL.	36
8. RESULTADOS.	39
8.1. Extracto hexánico.	39
8.2. Extracto con acetato de etilo.	39

8.2.1. Acido oleanólico - ácido ursólico.	39
8.2.2. Acido β - acetil ursólico.	40
8.3. <i>Artemia salina</i> .	41
8.4. ESPECTROS.	42
Espectro 1 de IR del ácido oleanólico - ácido ursólico.	43
Espectro 2 de RMN- ¹ H del ácido oleanólico - ácido ursólico.	44
Espectro 3 de IR del ácido acetil β - ursólico.	45
Espectro 4 de RMN- ¹ H del ácido acetil β - ursólico.	46
Cromatograma de HPLC del ácido oleanólico - ácido ursólico.	47
Cromatograma de HPLC del ácido acetil oleanólico - ácido β - acetil ursólico.	48
9. DISCUSION DE RESULTADOS.	49
9.1. Extracto hexánico.	49
9.2. Extracto con acetato de etilo.	49
9.2.1. Acido oleanólico - Acido ursólico.	50
9.2.2. Acido β - acetil ursólico.	52

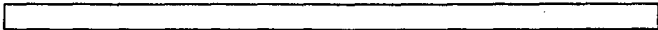
9.3. Bioensayo con <i>Artemia salina</i>.	53
10. CONCLUSIONES.	56
11. BIBLIOGRAFIA.	57

GLOSARIO.

Notaciones empleadas

Abreviaturas y símbolos.

RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.	
IR	Espectroscopia de Infrarrojo	cm ⁻¹
E.M	Espectrometría de Masas.	
cc.	Cromatografía de Columna a Presión Atmosférica.	
ccf.	Cromatografía de Capa Fina.	
ccv.	Cromatografía de Columna a Vacío.	
cpp.	Cromatografía en Placa preparativa.	
pf.	Punto de Fusión.	
δ	Desplazamiento Químico	ppm
J	Constante de acoplamiento	Hz
s	Singlete.	
t	Triplete.	
d	Doblete.	
dd	Doble de doble.	
Ω	Número de insaturaciones	
CDCl ₃	Cloroformo deuterado	
TMS	Tetra - metil - silano (referencia interna).	
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido.	



v	Número de onda	cm⁻¹
m/z	Relación masa / carga (z).	
M⁺	Ión molecular.	
*	Lectura de los datos de RMN-¹H.	
	δ (multiplicidad, integral, constante de acoplamiento)	

1. INTRODUCCION.

En México al igual que en otros países, ha permanecido el uso de las plantas medicinales a través de los siglos, donde el aprovechamiento de dichos recursos vegetales ha sido de acuerdo con las múltiples observaciones y numerosas experiencias acumuladas sobre este aspecto por grupos étnicos y sociales, enmarcadas dentro de las facilidades del ecosistema, el intercambio social, las enfermedades más comunes de la región y por la disponibilidad práctica del recurso. De esta manera las tradiciones han contribuido a la salud y bienestar de diferentes culturas.

Aunque no existen datos exactos que aseguren el valor y extensión del uso de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud, ha calculado que aproximadamente el 80% de la población del mundo hace uso en alguna medida de éstas, para resolver sus necesidades de atención primaria de salud, ya sea como único medio de curación o como medio alternativo [1], por lo que en los últimos años se ha buscado revalorar los recursos vegetales de nuestro país, que debido a la diversidad climática permite una gran riqueza herbolaria, donde incluyen a las plantas que se les atribuyen propiedades medicinales, con una gran variedad de familias, géneros y especies distribuidas en diferentes regiones. La investigación de los constituyentes químicos aislados de este tipo de plantas, así como la evaluación farmacológica de dichos compuestos representan una etapa difícil, por lo que es necesario formar equipos de investigación multidisciplinaria.[2].

Sin embargo se está logrando conjuntar la investigación por el interés que representan este tipo de estudios, que nos permita sustentar el uso de plantas medicinales, a través de los compuestos activos que la constituyen, y que contribuyan en la búsqueda de nuevas alternativas, que se conviertan en agentes terapéuticos más eficaces con espectro de acción más amplio, cuya única fuente de obtención más económica la constituyen las plantas, a pesar de que existen plantas medicinales que poseen constituyentes químicos activos, con rendimientos bajos [3], estos pueden ser utilizados como modelos para llevar a cabo su síntesis.

En relación con lo anterior es necesario el conocimiento integral de los constituyentes químicos así como su evaluación de la actividad de los recursos vegetales de nuestro país.

El presente trabajo describe los resultados obtenidos del análisis químico de las hojas de *Tabebuia rosea* planta utilizada en la medicina tradicional mexicana, cuya selección fue realizada con base en el conocimiento popular que de ella se tiene como un eficiente febrífugo antimicrobiano, antimalárico y para la clorosis, esperando contribuir de algún modo al conocimiento de plantas utilizadas con fines medicinales.

2. ANTECEDENTES.

2.1 La familia *Bignoniaceae*.

La familia *Bignoniaceae* consta de 120 géneros y 650 especies, de distribución tropical y subtropical especialmente en América. Se divide en tres tribus mayoritarias - *Tecomeae*, *Crecentieae* y *Bignoniaceae* -, y varias minoritarias (división basada en la morfología de sus frutos).[4-6]. Hasta el año de 1940 se tenía el conocimiento de que en América existían 16 géneros de esta familia entre los que se encuentran; *Amphitecna*, *Astianthus*, *Catalpa*, *Cotema*, *Crecentia*, *Jacaranda*, *Parentecoma*, y *Tecoma* entre otros, en años recientes se sabe que tan sólo en México existen 17 de los géneros que la constituyen.[7].

Bignoniaceae es una de las familias más importantes de las plantas leñosas, son generalmente árboles o arbustos, es la más importante familia de lianas¹ de América Central, raramente son plantas herbáceas. De las neotrópicas las principales especies son lianas pertenecientes a la tribu *Bignoniaceae*, mientras que *Tecomeae*, *Crecentieae* (excluyendo *Schlegelia*), son arboreascentes. Las *Bignoniáceas* al igual que otras plantas desarrollan mecanismos de defensa, en este caso las lianas producen secreciones dulces que atraen a las hormigas que a su vez les sirven de protección contra los herbívoros.[6-8].

Esta familia cuenta con especies forestales de gran valor económico por su madera, otras por su valor ornamental en parques y jardines. Los ejemplares sudamericanos que se conocen mejor en México son las " *Jacarandas* ", árboles de sombra caducifolios, cuya floración como ocurre con muchas *Bignoniáceas* precede al follaje. Además cuenta con especies de importancia por su uso en la medicina tradicional, a las que se les atribuyen propiedades terapéuticas, algunas de las cuales se muestran en la Tabla I.

¹ Bejucos, enredaderas, plantas trepadoras.

Tabla I. Propiedades terapéuticas atribuidas a Bignoniáceas.

Planta	Parte Estudiada	Propiedad Terapéutica	Referencia
		Antidiabética	[9]
<i>Tecoma stans</i> ²		Anticancerígeno	[10-13]
		Antifúngico	
		Antibacterial	[10]
<i>Tabebuia avellanaeae</i>	Corteza	Antiinflamatorio	[10,14]
		Diurético	[11,15]
		Astringente	[15]
		Astringente	
		Antireumático	[16]
<i>Tabebuia rosea</i>	Corteza	Antidiarreico	
		Antimalárico	
		Antibacterial	[17]
<i>Tabebuia chrysantha</i>	Corteza	Analgésico	
		Antiinflamatorio	[18]
<i>Tabebuia cassinoides</i>	Corteza	Antileucémico	[19,20]
		Anticancerígeno	[19,20]
<i>Tabebuia argentea</i>		Antihelmíntico	[21]

2.1.1 El género *Tabebuia*.

Uno de los géneros que forman parte de la familia *Bignoniaceae* es *Tabebuia*³ que pertenece a la tribu *Tecomeae* del cual se conocen menos de 100 especies en la región tropical de América; en el norte de México; desde Honduras hasta el Salvador y

² Planta con propiedades curativas dudosas. " Tronadora ". " Nixtamaxóchitl ". Florece en la Sierra de Guadalupe.

³ El nombre de *Tabebuia* se basa en el significado de las palabras " Hormiga " y " Arbol " y se refiere al fenómeno que se presenta en algunas especies de este género.

Panamá; sur de Venezuela; norte de Argentina; al oriente y al sur de las Indias.[5,22]. Algunas de las especies de este género clasificadas y colectadas¹ en México se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Especies del género *Tabebuia* clasificados y colectados en México.

Género y especie	Estado	Forma biológica	Tamaño
<i>Tabebuia palmari rose</i>	Michoacán	Arbol	8-10m
<i>Tabebuia chrisantha</i>	Jalisco	Arbol	18m
<i>Tabebuia pentaphylla</i>	Jalisco	Arbol	10m
<i>Tabebuia pentaphylla</i> <i>hemol.</i>	Oaxaca	_____	_____
<i>Tabebuia rosea</i>	Chiapas	_____	_____

Tabebuia rosea, especie vegetal objeto del presente estudio, fue colectada en el poblado de Shajul Chiapas México, se conoce también con el sinónimo de *Tabebuia pentaphylla* [5], recibe los nombres vulgares de maculiz, o maculiz prieto, en Tabasco; hok'ab, en Yucatán; palo de yugo, en Michoacán y Guerrero; roble blanco, en San Luis Potosí y Oaxaca; roble en San Luis Potosí y Guerrero; macuil o macuili, en Oaxaca; amapa en Sinaloa; matilishuate en Chiapas. En México se encuentra diversificada desde Tamaulipas a Sinaloa, en Veracruz, Oaxaca y Chiapas. Alcanza sus mayores desarrollos en Tabasco, Campeche y Chiapas.[22,23].

Es un árbol de madera industrial de hasta 20 metros de altura con hojas de 5 folíolos lanceados y elípticos y con grandes grupos de flores de color amarillo, rosado o

¹ Herbario Mexu del instituto de biología de la UNAM. Clasificadas por la M en C. Clara H. Ramos.

violáceo: el fruto parece una vaina de leguminosa y las semillas son aladas. Los árboles de esta especie pierden sus hojas de marzo-junio.

2.1.2 Usos en la medicina tradicional.

Dentro de la medicina tradicional mexicana se utiliza la infusión acuosa como febrífugo, antimicrobiano, y contra el paludismo o malaria, la cual es endémica de zonas tropicales. También el cocimiento de la raíz, es utilizada como agua de uso para la clorosis⁵. [23,24].

El tratamiento de la malaria se realiza con quinina, cloroquinina, pirimetamina, etc., sin embargo en los últimos años se buscan agentes terapéuticos más eficaces y de espectro de acción más amplio que los existentes, además de que ha surgido un problema, la aparición y constante incremento de la resistencia de *Plasmodium* a estos fármacos. Por esto es que se buscan nuevas alternativas para el tratamiento de la malaria, que se puedan aislar y caracterizar de las plantas de uso tradicional a las que se les atribuyen propiedades antimaláricas. Hace apenas algunos años se aisló la artemisinina a partir de *Artemisia annua*, planta endémica de China la cual es una sustancia eficaz contra la malaria, que inclusive ha demostrado tener mejor tratamiento quimioterapéutico que la cloroquinina. En este contexto tiene importancia *Tabebuia rosea* cuya infusión acuosa, se utiliza en Chiapas para el tratamiento de la malaria y que en estudios químicos previos de plantas de este género indican la presencia de metabolitos secundarios, como las naftoquinonas en las que se ha encontrado propiedades antimaláricas [25]. Una de las naftoquinonas a las que les ha evaluado sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatoria [26], antineoplásica y antimalárica es el lapachol, que presenta efectos antimaláricos en aves pero no en humanos, debido a los problemas de baja absorción oral, fijación de proteínas y desactivación por oxidación de la cadena terminal.

⁵ Anemia crónica caracterizada por hematies pálidos y disminución de los depósitos de hierro.

2.2 Metabolitos secundarios.

Estudios químicos previos sobre especies de la familia *Bignoniaceae* indican la presencia de una gran variedad de metabolitos secundarios⁶, entre los que se han encontrado: quinonas⁷, triterpenos⁸, compuestos iridoides⁹, polifenoles¹⁰, glicósidos¹¹, alcaloides¹² y flavonoides¹³. De las especies del género *Tabebuia* se han aislado y caracterizado: quinonas, flavonoides, β -sitosterol, lapachol, derivados del lapachol, iridoides, Glicósidos, derivados del ácido benzoico y ácido cinámico. En la Tabla III se indican los metabolitos más frecuentemente aislados y caracterizados de plantas pertenecientes a la familia *Bignoniaceae*, principalmente del género *Tabebuia*, algunos de los cuales se representan en el Esquema I.

Tabla III. Metabolitos secundarios más frecuentemente aislados de algunas Bignoniáceas, principalmente del género *Tabebuia*.

Compuestos aislados	Género y especie	Referencia
Quinonas	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[10,24,27,36]
	<i>Tabebuia chrysantha</i>	[18,28-29]
	<i>Tabebuia cassinoides</i>	[19]

⁶ Compuestos derivados de una serie de transformaciones, catalizadas enzimáticamente de un grupo reducido de metabolitos primarios.

⁷ Compuestos oxigenados que preceden de compuestos aromáticos.

⁸ Compuestos de 30 átomos de carbono, procedentes de la ciclización del escualeno.

⁹ Compuestos naturales monoterpénicos.

¹⁰ Compuestos con anillos benzoícos unidos al menos a un grupo hidroxilo libre o ligado a otra función; éter, éster o glicósido.

¹¹ Compuestos caracterizados por ser estructuras aldehídicas o cetónicas polihidroxiadas.

¹² Grupo muy heterogéneo de bases nitrogenadas, con acción fisiológica en los animales.

¹³ Generalmente sustancias naturales de 15 átomos de carbono, responsables de la pigmentación de diversas flores y frutos.

Continuación Tabla III

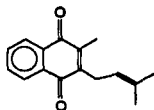
Compuesto aislado	Género y especie	Referencia
Furanonaftoquinonas (2)	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[10,12]
	<i>Tabebuia cassinoides</i>	[20]
	<i>Tabebuia chrysantha</i>	[28]
	<i>Tabebuia ochracea</i>	[33]
	<i>Tabebuia rosea</i>	[30]
Antroquinonas (3)	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[27-29]
	<i>Tecomella undulata</i>	[32]
Terpenos		
Iridoides (4)	<i>Tabebuia rosea</i>	[17]
	<i>Tecoma heptaphylla</i>	[38]
	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[15,37]
Triterpenos (5)	<i>Tabebuia rosea</i>	[16]
	<i>Tecomella undulata</i>	[32]
	<i>Jacaranda mimosaeifolia</i>	[39]

Continuación Tabla III

Compuesto aislado	Género y especie	Referencia
	<i>Tabebuia pentaphylla</i>	[39]
Triterpenos (5)	<i>Tabebuia argentic</i>	[21]
	<i>Tabebuia ochracea</i>	[40]
Polifenoles		
Derivados del ácido súcnico (6)	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[10,12]
	<i>Zeyhera digitalis</i>	[31]
Derivados del ácido cinámico (7)	<i>Tabebuia avellanadade</i>	[10,28]
	<i>Tabebuia cassinoides</i>	[20]
	<i>Tabebuia chrysantha</i>	[31]
	<i>Tabebuia rosea</i>	[16]
Flavonoides (8)	<i>Tabebuia rosea</i>	
	<i>Tabebuia heptaphylla</i>	[1]
	<i>Catalpa ovata</i>	
	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	
Acidos grasos (9)	<i>Tabebuia argentic</i>	[21]

Esquema 1 Metabolitos secundarios frecuentemente aislados de las Bignoniáceas.

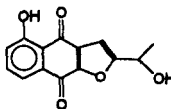
Naftoquinona



Lapachol

(1)

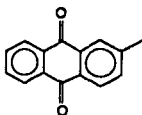
Furanonaftoquinona



Kigelonin

(2)

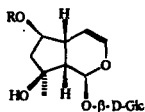
Antroquinona



Tectoquinona

(3)

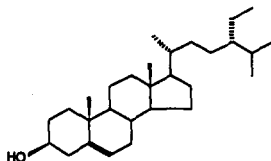
Íridoide



R = p-metoxibenzil
6-O-(p-metoxibenzil)-ajugol

(4)

Terpeno

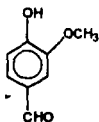


β -sitosterol

(5)

Continuacion Esquema I

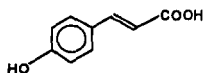
Derivado del ácido sikímico



Vanilina

(6)

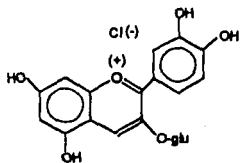
Derivado del ácido cinámico



Acido p-cumárico

(7)

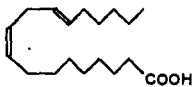
Flavonoide



Glicósido del 3-cloridol

(8)

Acido graso



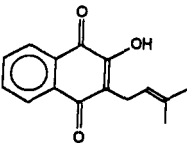
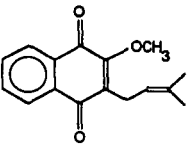
Acido linoleico

(9)

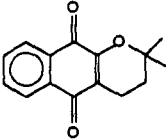
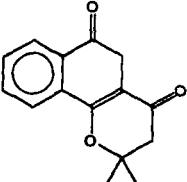
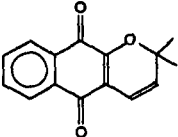
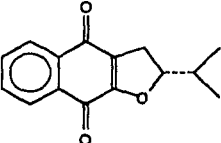
2.2.1 Naftoquinonas.

Se conocen cerca de 350 naftoquinonas naturales. Su distribución incluye mohos, líquenes y arácnidos. La coexistencia de naftoquinonas y antroquinonas no es rara, ya que se originan de un precursor común. Las naftoquinonas aisladas y caracterizadas de la familia *Bignoniaceae* principalmente del género *Tabebuia*, se esquematizan en la Tabla IV.

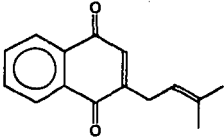
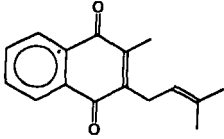
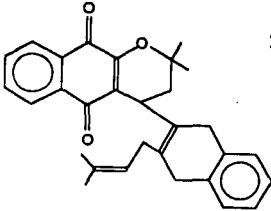
Tabla IV. Naftoquinonas aisladas y caracterizadas en plantas de la familia *Bignoniaceae*.

Compuesto	Género y especie	Referencia
	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[10,24,27,36]
	<i>Tabebuia chrysantha</i>	[18,27,28]
	<i>Tabebuia rosea</i>	[29,30,36]
 <p>Lapachol</p>	<i>Zeyhera digitalis</i>	[31,36]
	<i>Tecomella undulata</i>	[31,36]
	<i>Heterophragma adenophyllum</i>	[32]
	<i>Tabebuia ochracea</i>	[33]
	<i>Tabebuia cassinoides</i>	[19]
 <p>Lapacholmetiléter</p>	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[27]
	<i>Perotecoma peroba</i>	[28]

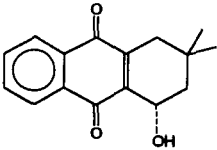
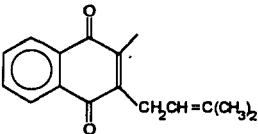
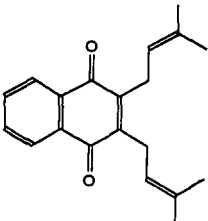
Continuación Tabla IV

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p data-bbox="236 412 327 433">α - lapachol</p>	<p data-bbox="477 278 614 299"><i>Tabebuia rosea</i></p> <p data-bbox="459 326 631 347"><i>Tabebuia guayacan</i></p> <p data-bbox="482 374 609 395"><i>Catalpa ovata</i></p>	<p data-bbox="757 278 790 299">[16]</p> <p data-bbox="741 326 806 347">[34,36]</p> <p data-bbox="757 374 790 395">[36]</p>
 <p data-bbox="228 694 320 714">β - lapachol</p>	<p data-bbox="451 495 643 515"><i>Tabebuia avellanadae</i></p> <p data-bbox="453 543 641 563"><i>Tabebuia chrysantha</i></p> <p data-bbox="459 591 635 611"><i>Paratecoma peroba</i></p> <p data-bbox="459 639 635 659"><i>Tabebuia guayacan</i></p>	<p data-bbox="757 495 790 515">[10]</p> <p data-bbox="757 543 790 563">[28]</p> <p data-bbox="757 591 790 611">[28]</p> <p data-bbox="741 639 806 659">[34,36]</p>
 <p data-bbox="197 923 379 943">Dehidro - α - lapachona</p>	<p data-bbox="451 786 643 806"><i>Tabebuia avellanadae</i></p> <p data-bbox="453 834 641 854"><i>Tabebuia chrysantha</i></p> <p data-bbox="456 882 638 902"><i>Zeyhera tuberculosa</i></p> <p data-bbox="477 930 617 950"><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p data-bbox="757 786 790 806">[10]</p> <p data-bbox="741 834 806 854">[18,28]</p> <p data-bbox="757 882 790 902">[36]</p> <p data-bbox="731 930 819 950">[16,29,36]</p>
 <p data-bbox="166 1156 417 1177">(R) - Dehidroiso - α - lapachona</p>	<p data-bbox="451 1053 643 1074"><i>Tabebuia avellanadae</i></p> <p data-bbox="477 1101 617 1122"><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p data-bbox="741 1053 806 1074">[10,36]</p> <p data-bbox="731 1101 819 1122">[16,30,36]</p>

Continuación Tabla IV

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p data-bbox="228 458 337 477">Deoxilapachol</p>	<p data-bbox="456 347 650 366"><i>Tabebuia avellanae</i></p>	<p data-bbox="752 347 816 366">[10,36]</p>
 <p data-bbox="225 703 339 723">Menaquinona I</p>	<p data-bbox="456 566 650 585"><i>Tabebuia avellanae</i></p>	<p data-bbox="752 566 816 585">[10,36]</p>
 <p data-bbox="231 1092 355 1111">Tecomaquinona I</p>	<p data-bbox="456 854 650 873"><i>Tabebuia pentaphylla</i></p> <p data-bbox="464 901 643 920"><i>Tecomella undulata</i></p>	<p data-bbox="752 854 816 873">[35,36]</p> <p data-bbox="764 901 803 920">[36]</p>

Continuación Tabla IV.

Compuesto	Género y especie	Referencia
	<p><i>Tabebuia avellanadae</i></p>	<p>[36]</p>
<p>4(S) hidroxil - α - lapachona</p>		
	<p><i>Catalpa ovata</i></p>	<p>[36]</p>
<p>2 metil - 3 - prenil - 1 - 4 naftoquinona</p>		
	<p><i>Tabebuia guayacan</i></p>	<p>[36]</p>
<p>2,3 - diprenil - 1-4 naftoquinona</p>		

2.2.2 FURANONAFTOQUINONAS.

Entre las naftoquinonas aisladas y caracterizadas de las Bignoniáceas se encuentran las que se derivan de la Nafto[2,3]furan-4,9-diona (figura I), Tabla V.

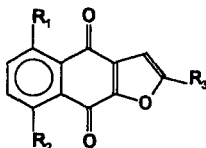


Figura I. Nafto(2,3)-Furan-4,9-diona

Tabla V. Furanonaftoquinonas aisladas y caracterizadas del género *Tabebuia*.

R ₁	R ₂	R ₃	Género y especie	Referencia
			<i>Tabebuia avellaneda</i>	[10,12]
CHOHCH ₃	H	H	<i>Tabebuia rosea</i>	[29]
			<i>Tabebuia chrysantha</i>	[29]
			<i>Tabebuia avellaneda</i>	[10,12]
			<i>Tabebuia rosea</i>	[29]
COCH ₃	H	H	<i>Tabebuia imperiginosa</i>	[10,29]
			<i>Tabebuia chrysantha</i>	[29]
			<i>Tabebuia ochracea</i>	[33]

Continuación Tabla V.

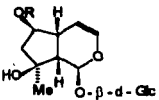
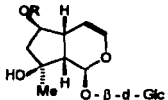
R1	R2	R3	Género y especie	Referencia
CH ₂ OH	H	H		
CH ₂ OH	H	OH		
			<i>Tabebuia avellanedae</i>	[10,12]
COCH ₃	H	OH		
COCH ₃	OH	H		

2.2.3. Terpenos

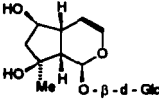
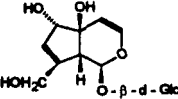
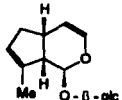
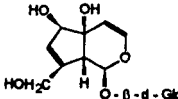
De los terpenos aislados y caracterizados de la familia *Bignoniaceae* se encuentran monoterpenos y triterpenos.

Los compuestos iridoides¹⁴ son productos naturales monoterpénicos que se encuentran en especies animales y vegetales frecuentemente unidos a glicósidos, caracterizados por un esqueleto bicíclico ciclopentapiránico. En la Tabla VI se esquematizan iridoides aislados de la familia *Bignoniaceae*, mientras que en la Tabla VIII se esquematizan triterpenos aislados de Bignoniáceas.

Tabla VI. Compuestos Iridooides aislados de Bignoniáceas.

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p>R = p - metoxibenzoil 6 - o - (p - metoxibenzoil) - ajugol</p>	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[15,37]
 <p>R = p - hidroxibenzoil 6 - o - (p - hidroxibenzoil) - ajugol</p>	<i>Tabebuia avellanadae</i>	[10,37]

¹⁴ El nombre Iridoide deriva del iridodial, iridomimecina y compuestos aislados de Iridomymex, un género de hormigas Australianas.

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p data-bbox="238 391 284 411">Ajugol</p>	<p data-bbox="440 349 637 377"><i>Tabebuia avellanadea</i></p>	<p data-bbox="751 349 813 377">[10,37]</p>
 <p data-bbox="191 617 357 637">6 - Epimonomelottalido</p>	<p data-bbox="450 541 626 569"><i>Tecoma heptaphylla</i></p>	<p data-bbox="761 541 802 569">[38]</p>
 <p data-bbox="181 857 367 878">6,10 - Bidideoxyaucubina</p>	<p data-bbox="450 734 626 761"><i>Tecoma heptaphylla</i></p>	<p data-bbox="751 734 813 761">[37,38]</p>
 <p data-bbox="202 1104 347 1125">5 - β -hidroxiaraxina</p>	<p data-bbox="450 953 626 980"><i>Tecoma heptaphylla</i></p>	<p data-bbox="751 953 813 980">[37,38]</p>

Continuación Tabla VI

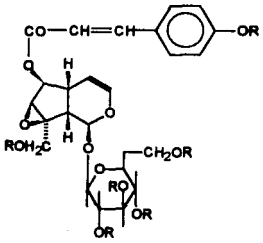
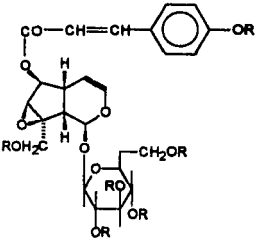
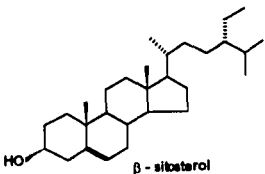
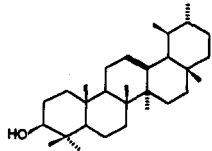
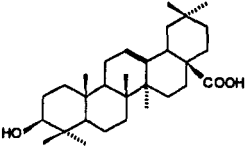
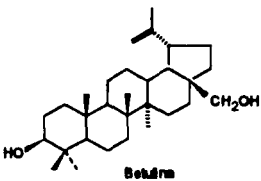
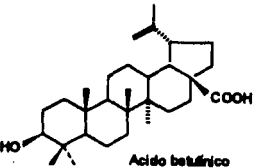
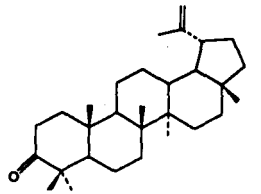
Compuesto	Género y especie	Referencia
	<p><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p>[17]</p>
<p>R = H 6-O-(p-cumarol) catapol</p>		
	<p><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p>[17]</p>
<p>R = OAc 6-O-(p-cumarol) catapol hexaacetato</p>		

Tabla VII. Triterpenos aislados de Bignoniáceas.

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p data-bbox="301 485 391 504">β - sitosterol</p>	<p data-bbox="484 312 619 332"><i>Tabebuia rosea</i></p> <p data-bbox="467 360 637 380"><i>Tabebuia ochracea</i></p> <p data-bbox="453 408 650 428"><i>Tabebuia pentaphylla</i></p> <p data-bbox="467 456 637 476"><i>Tabebuia argentea</i></p> <p data-bbox="443 504 660 524"><i>Jacaranda mimosaeifolia</i></p>	<p data-bbox="746 312 840 332">[16,17,39]</p> <p data-bbox="770 360 812 380">[40]</p> <p data-bbox="757 408 826 428">[41-44]</p> <p data-bbox="770 456 812 476">[45]</p> <p data-bbox="770 504 812 524">[40]</p>
 <p data-bbox="256 834 339 853">α - amirina</p>	<p data-bbox="453 701 650 720"><i>Tabebuia pentaphylla</i></p> <p data-bbox="467 749 637 768"><i>Tabebuia argentea</i></p>	<p data-bbox="770 701 812 720">[45]</p> <p data-bbox="770 749 812 768">[44]</p>
 <p data-bbox="272 1094 391 1114">Acido oleandrico</p>	<p data-bbox="443 991 660 1011"><i>Jacaranda mimosaeifolia</i></p> <p data-bbox="453 1039 650 1059"><i>Tabebuia pentaphylla</i></p>	<p data-bbox="770 991 812 1011">[40]</p> <p data-bbox="770 1039 812 1059">[44]</p>

Continuación Tabla VII

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p>Betulina</p>	<p><i>Tabebuia pentaphylla</i></p>	<p>[44]</p>
 <p>Acido betulinico</p>	<p><i>Tabebuia pentaphylla</i></p>	<p>[44]</p>
 <p>Lupenona</p>	<p><i>Jacaranda mimosaeifolia</i> <i>Tabebuia rosea</i></p>	<p>[40] [39]</p>

2.2.4 Polifenoles.

La diversidad estructural de los compuestos polifenólicos del género *Tabebuia* derivan del ácido cinámico, ácido sikímico, ácido benzoico y benzaldehído esquematizados en la Tabla VIII, IX y las figuras II y III.

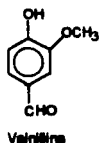
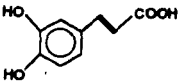
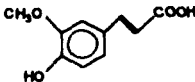
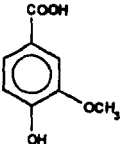


Figura II. Derivado del ácido sikímico aislado de Bignoníaceas.

Tabla VIII. Derivados del ácido cinámico aislados de Bignoníaceas

Compuesto aislado	Género y especie	Referencia
<p>Acido p - cumárico</p>	<i>Tabebuia avellanedae</i>	[10]

Continuación Tabla VIII.

Compuesto	Género y especie	Referencia
 <p data-bbox="253 418 367 439">Acido galico</p>	<p data-bbox="497 391 637 418"><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p data-bbox="792 391 828 418">[46]</p>
 <p data-bbox="284 720 398 740">Acido ferulico</p>	<p data-bbox="497 706 637 734"><i>Tabebuia rosea</i></p>	<p data-bbox="792 706 828 734">[46]</p>
 <p data-bbox="222 1097 341 1118">Acido vanillico</p>	<p data-bbox="466 994 668 1022"><i>Tabebuia avellanadae</i></p>	<p data-bbox="792 994 828 1022">[12]</p>

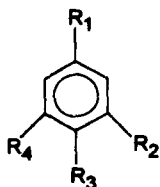


Figura III. Estructura de la cual derivan los ácidos benzoicos y benzaldehídos de la Tabla IX.

Tabla IX. Ácidos benzoicos y benzaldehídos aislados de Bignoniáceas.

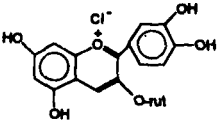
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Género y especie	Referencia
COOH	H	H	H		
COOH	OCH ₃	OH	H		
COOH	OCH ₃	OCH ₃	H		
				<i>Tabebuia avellanedae</i>	[12]
COOH	OCH ₃	OCH ₃	H		
COOH	H	OCH ₃	H		
CHO	H	OCH ₃	H		
CHO	OCH ₃	OCH ₃	H		
CHO	H	OCH ₃	H		

2.2.5 Flavonoides.

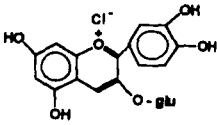
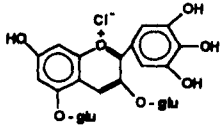
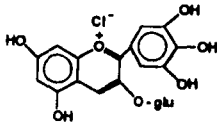
Entre los compuestos fenólicos aislados de Bignoniáceas se encuentran los flavonoides, que en su mayoría están en forma de glicósidos, estas sustancias son generalmente responsables de la coloración de numerosas flores y frutos.[47].

Todos los flavonoides que se conocen de las Bignoniáceas se han aislado de la parte floral, excepto 4'-5-dihidroxiisoflavona, que se aisló de la corteza de *Tabebuia rosea*. En esta familia se han encontrado flavonas y derivados antocianícos (Tabla X)

Tabla X. Flavonoides aislados de Bignoniáceas [4]

Compuesto aislado	Género y especie
 <p data-bbox="249 895 433 916">Rutósido del 3 - cloridinol</p>	<p data-bbox="632 690 788 710"><i>Campsis radicans</i></p> <p data-bbox="648 738 772 758"><i>Catalpa ovata</i></p> <p data-bbox="640 786 781 806"><i>Catalpa fargesii</i></p> <p data-bbox="636 834 785 854"><i>Catalpa speciosa</i></p> <p data-bbox="632 882 788 902"><i>Chilopsis linearis</i></p> <p data-bbox="640 930 781 950"><i>Delostoma lobii</i></p> <p data-bbox="612 978 809 998"><i>Tabebuia heterophylla</i></p>

Continuación Tabla X.

Compuesto aislados	Género y especie
 <p data-bbox="233 541 419 562">Glicósido del 3 - clastidol</p>	<p data-bbox="580 336 766 363"><i>Jacaranda acutifolia</i></p> <p data-bbox="585 384 761 411"><i>Jacaranda chelonja</i></p> <p data-bbox="564 432 782 459"><i>Jacaranda mimosaefolia</i></p> <p data-bbox="574 480 771 507"><i>Tabebuia chrysotricha</i></p> <p data-bbox="574 528 771 555"><i>Tabebuia heterophylla</i></p> <p data-bbox="564 576 782 603"><i>Tabebuia impetiginosa</i></p>
 <p data-bbox="222 788 409 809">Diglicósido 3,5 - delliridol</p>	<p data-bbox="585 651 761 679"><i>Jacaranda chelonja</i></p> <p data-bbox="564 699 782 727"><i>Jacaranda mimosaefolia</i></p> <p data-bbox="585 747 761 775"><i>Paulownia fargesii</i></p> <p data-bbox="574 795 771 823"><i>Jacaranda tomentosa</i></p>
 <p data-bbox="233 1070 419 1090">Glicósido del 3 - delliridol</p>	<p data-bbox="580 891 766 919"><i>Jacaranda acutifolia</i></p> <p data-bbox="585 939 761 967"><i>Jacaranda chelonja</i></p> <p data-bbox="564 987 782 1015"><i>Jacaranda mimosaefolia</i></p> <p data-bbox="585 1035 761 1063"><i>Paulownia fargesii</i></p> <p data-bbox="574 1083 771 1111"><i>Jacaranda tomentosa</i></p>

2.3. *Artemia salina*.

Muchos compuestos aislados y caracterizados se dan a conocer sin realizarles un ensayo biológico, lo que implica desconocer la posible actividad de estos, debido a que la búsqueda de actividades farmacológicas específicas de nuevos constituyentes químicos se deben realizar con ensayos demasiado costosos, por lo que frecuentemente se pasa por alto la investigación de las actividades farmacológicas o biológicas. Sin embargo en los últimos años se ha propuesto un método biológico, (*Artemia salina*) para realizar pruebas en productos naturales, este bioensayo es de bajo costo y sirve de guía a la investigación fitoquímica.

En dicho método se utiliza un pequetísimo crustáceo, - un camarón de mar, - *Artemia salina* -, utilizado como alimento de peces tropicales del cual se venden los huevecillos que se incuban durante 48 horas y generan una gran cantidad de larvas llamadas nauplii en las que se realiza el bioensayo, para determinar actividad e inclusive valores de LC_{50}^{15} en $\mu\text{g} / \text{ml}$. [48], con este bioensayo se ha determinado actividad en 41 Euforbiáceas.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Desde tiempos remotos el hombre ha mostrado un gran aprecio por las plantas y flores, desde entonces numerosas investigaciones se dedicaron a analizar y escribir sobre estas lo que ha permitido hacer uso de ellas en diferentes ámbitos como el de la salud, en donde se utilizan frecuentemente atribuyéndoles propiedades medicinales. En México existen alrededor de 200 plantas consideradas como las más importantes. De las 140 más conocidas el 78% se emplea en la atención de padecimientos digestivos, respiratorios y de la piel. De ahí la necesidad de conocer la(s) sustancia(s) responsable(s) de sus propiedades curativas - ya que muchas de ellas no cuentan con un estudio químico y farmacológico - a las que se les pruebe sus propiedades medicinales para que se conviertan en un recurso médico de mayor validez; por lo que en el presente trabajo, se realizará el estudio químico de las hojas de *Tabebuia rosea* (matilishuate), utilizada en Chiapas como un eficiente antimalárico, así como la evaluación preliminar de actividad frente *Artemia salina*, para coadyuvar en la búsqueda de nuevas alternativas que pueden convertirse en agentes terapéuticos más eficientes y con espectro de acción más amplio que los ya existentes.

4. OBJETIVOS

Objetivo general.

El presente estudio tiene como finalidad aislar, purificar, caracterizar e identificar por medio de técnicas convencionales de laboratorio de química orgánica; así como de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, la estructura molecular de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos hexánico y con acetato de etilo de las hojas de *Tabebuia rosea* (matilishuate). Asimismo realizar el estudio biológico preliminar de las sustancias puras y de los extractos crudos, para determinar la dosis letal media de las sustancias frente a *Artemia salina*. Los resultados obtenidos de este estudio se integraran al conocimiento que se tiene sobre el uso de esta planta medicinal.

Objetivos particulares

- Preparar del extracto hexánico y con acetato de etilo de las hojas de *Tabebuia rosea*.
- Caracterizar e identificar las sustancias puras por medio de las diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Así como sus propiedades físicas, además de las transformaciones químicas que permitan elucidar detalladamente la estructura molecular de cada una de ellas.
- Evaluar la posible actividad de los extractos crudos, así como de algunas fracciones obtenidas del desarrollo cromatográfico y de las sustancias puras aisladas frente *Artemia salina* para determinar la dosis letal media (LD₅₀).

5.0 HIPOTESIS.

Estudios químicos realizados a plantas pertenecientes al género *Tabebuia* indican la presencia de terpenos, flavonoides, polifenoles, iridoides y quinonas entre otros. Dentro de las cuales revisten gran importancia las naftoquinonas por poseer propiedades antimaláricas. Entonces por medio de técnicas convencionales de laboratorio se logrará aislar y purificar los metabolitos secundarios que presenten similitud y diferencias estructurales a los obtenidos en este género y familia, los que serán caracterizados por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, así como de sus propiedades físicas y transformaciones químicas.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Recolección del material vegetal.

La planta fue colectada en Shajul Chiapas, clasificada como *Tabebuia rosea* por la M.en C. Clara H. Ramos y Eduardo Iñigo Abrego.

6.2 Extracción del material vegetal.

3.02 kg de hojas previamente secadas a temperatura ambiente se sometieron a extracciones sólido-líquido con n-hexano, el disolvente de las extracciones se elimino por medio del rotavapor, de donde se obtuvieron 33.14 g de extracto crudo. Posteriormente y de manera similar se preparó el extracto crudo con acetato de etilo, a partir del material vegetal previamente desengrasado, obteniéndose 96.04 g del mismo.

Después de haber preparado cada uno de los extractos, 14.63 g de extracto hexánico, fue sometido a una decoloración con carbón activado, en una columna expofeaso para el caso, enseguida se trató con acetnitrilo para eliminar sustancias no polares (grasas), de dicha operación se obtuvo 1.06 g de residuo.

Por otra parte 96.04 g,del extracto crudo con acetato de etilo, se decoloró con carbón activado, para obtener 86.42 g.

6.3 Aislamiento y purificación.

Cada uno de los extractos obtenidos fueron separados en sus componentes químicos por métodos cromatográficos, - cromatografía en columna a presión atmosférica (cc), cromatografía en columna a vacío (ccv), cromatografía en placa preparativa (cpp), - cristalización fraccionada. Su caracterización e identificación se logró por medio de sus propiedades físicas, espectroscópicas y transformaciones químicas.

A lo largo de todos los procesos cromatográficos, así como en las reacciones realizadas, la composición de las fracciones obtenidas, la homogeneidad y pureza de las sustancias aisladas se determinaron por cromatografía de capa fina (ccf).

1.06 g del extracto hexánico decolorado y desengrasado fue fraccionado por ccv, el cual se absorbió previamente en 1.07 g de céliba y se depositó en una columna de vidrio con un diámetro de 1.2 cm y una altura de 18 cm, empacada con sílica gel para capa fina. La columna se comenzó a eluir con n-hexano, incrementando la polaridad gradualmente con mezcla de n-hexano - acetato de etilo, colectando fracciones de 15 ml cada una. El desarrollo cromatográfico se llevo al cabo por ccf.

De la misma manera se procedió a realizar la separación del extracto con acetato de etilo, para lo cual 84.42 g de extracto se adsorbió en 60 g de céliba, esta mezcla se aplicó en una columna de vidrio empacada con 615 g de sílica gel para capa fina. Las dimensiones de la columna, fueron 8.1 cm de diámetro y 20 cm de altura, la elución se inició con n-hexano, para continuar eluyendo con mezcla de n-hexano-acetato de etilo en polaridad creciente y terminar con una mezcla - acetato de etilo acetona (1:1) - de donde se obtuvieron 830 fracciones de 500 ml cada una.

El desarrollo cromatográfico se siguió por medio de ccf, utilizando diferentes sistemas de elución y como reveladores: luz ultravioleta, además de dos reveladores químicos constituidos por: una mezcla de ácido sulfúrico: ácido acético: agua en proporción 4: 80: 10, y una solución constituida por 22.2 ml de ácido sulfúrico concentrado, 12 g de sulfato cérico de amonio y 350 ml de hielo.

De las fracciones 299-830 obtenidas a partir de eluir la columna con n-hexano - acetato de etilo (90:10) se observó, mediante ccf, que dichas fracciones estaban constituidas por una mezcla compleja de sustancias por lo que se trataron de separar en aquellas fracciones más representativas. Así de las fracciones 329-339, obtenidas al eluir con n-hexano-acetato de etilo (90:10), se logró aislar por medio de cristalización fraccionada con éter isopropílico, un sólido de color blanco con punto de fusión de 261-264°C, soluble en etanol y propanol, parcialmente soluble en hexano, cloroformo, acetato de etilo y éter isopropílico.

Asimismo, en las fracciones 462-467 se aisló por cristalización fraccionada con éter isopropílico un sólido café, constituido por una mezcla de cuatro compuestos, - con respecto al cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución¹⁶ (HPLC) -, dos de ellos mayoritarios, de acuerdo a la ccf. Esto fue corroborado al realizar el ensayo analítico por HPLC, mediante una columna en fase normal de Lc - CN (sílica - cianometilpropilsilano), utilizando como fase móvil butanol y una mezcla de butanol - ciclohexano donde se lograron detectar a 262 nm dichos compuestos.

Por otro lado, en su espectro de infrarrojo de dicha mezcla se observa una banda en 3425 cm^{-1} [v, O-H], que indica la presencia de grupos hidroxilo, lo cual sugirió se realizara la reacción de acetilación. Para ello se hicieron reaccionar 250.9 mg de dicha mezcla con 2 ml de anhídrido acético en presencia de 0.5 ml de piridina con agitación constante a temperatura ambiente, el desarrollo de la reacción se siguió por ccf y después de 100 minutos se detuvo la reacción al adicionar 5 ml de agua; la recuperación del producto de reacción se logró al realizar cinco extracciones (líquido - líquido) con 3ml de cloroformo cada una. La fase orgánica se lavó con una solución de ácido clorhídrico al 10%, seguida de varios lavados con una solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente la fase orgánica se lavó con volúmenes pequeños de agua. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Después se concentró y se obtuvo 225.8mg (89.99%) de producto de reacción, el cual mostró estar constituido por dos compuestos mayoritarios por ccf, comprobándose mediante HPLC, para dicho análisis se empleó una columna en fase normal de Lc - CN y como fase móvil isopropanol. El producto de acetilación se trató de purificar por ccv, para lo cual el producto se absorbió en celita y se utilizó una columna de vidrio con 2.5 cm de diámetro y 11 cm de longitud, empacada con

¹⁶ Análisis llevado a cabo en Millipore, por Octavio Arrellin

304.7 mg de sílica gel para capa fina; la elución de la columna se inició con una mezcla n-hexano-acetato de etilo (98:2); obteniéndose de ésta manera un sólido cristalino blanco de punto de fusión de 256-258°C.

6.4 Bioensayo con *Artemia salina*.

El ensayo se realizó a los extractos hexánico, acetato de etilo, la mezcla de ácido oleanólico - ácido ursólico y el ácido β - acetil ursólico.

6.4.1 Preparación de las muestras.

La muestra se preparó pesando 20 mg de extracto el cual se disolvió totalmente, en 2 ml de acetato de etilo y se tomaron alícuotas de 500 μ l, 50 μ l y 5 μ l, respectivamente, cada muestra se dejó concentrar a temperatura ambiente; cabe señalar que cada una de los ensayos se realizó por triplicado.

6.4.2 Incubación de *Artemia salina*.

Se preparó agua de mar artificial, mezclando 38 g de sal marina comercial en un litro de agua, se colocaron en una pecera y se adicionaron 50 mg de huevecillos de *Artemia salina*, se incubaron durante 48 hr, después de las cuales se colectaron para el bioensayo.

6.4.3 Determinación de actividad frente *Artemia salina*.

Se depositaron diez larvas de *Artemia salina*, en cada dilución que contiene la muestra a evaluar, posteriormente se aforó con 5 ml de agua de mar artificial, se cubrieron los viales conteniendo 10, 100, 1000 ppm y se incubaron, durante 24 horas, después de este tiempo se contaron las larvas muertas con ayuda de una pipeta pasteur y un lente de aumento. El ensayo se realizó por triplicado en las mismas condiciones.

7. MATERIAL.

- . Columnas de vidrio de diferentes tamaños y diámetros (en función del extracto a separar).
- . Material de vidrio (pisetas, matraces Erlenmeyer, vasos de precipitado, kitsato de diferentes capacidades, embudo Büchner, etc).
- . Placas con agitación magnética y/o calentamiento.
- . Material básico de laboratorio de química orgánica.
- . Baño de agua.
- . Matraz bola (50, 100, 250, 500 ,1000ml).
- . Pisetas para cada disolvente.

Equipo.

- . Balanza Analítica mod. 1000 A.
- . Balanza semianalítica mod. E-400.
- . Balanza granataria Ohaus (de triple brazo). serie 700.
- . Aparato Fischer-Johns.
- . Espectrofotómetro de I.R Perkin - Elmer mod. 283 y 681.
- . Espectrofotómetro Nicolet FT IR mod. 5 Sx.
- . Espectrofotómetro de RMN varian VXR-3005.
- . Espectrómetro de Masas Hewlett Packard 5985 GC/Ms system 70 eV.

. Rotavapor Yamato re-47.

. Lámpara de luz UV (Listed INSA & MEAS 399-J).

.- Equipo necesario para destilación.

Sustancias.

. Cromatofolios de sílica gel con soporte de aluminio (20x20) 60 F₂₅₄

. Placas de vidrio para CCF sílica gel 60F₂₅₄ (20x29) de 2mm de espesor.

. Reveladores químicos específicos (ácido sulfúrico y sulfato cérico de amonio).

. Sílica gel 60 GF254 para capa fina.

. Sílica gel 60 PF254 para fines preparativos.

. Sílica gel PF254 con yeso.

. Disolventes (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, metanol, etc)
grado técnico.

. Disolventes (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol, éter etílico, éter
isopropílico, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, dimetilformamida) grado analítico.

. Carbón activado, tamaño de partícula aproximado de 1.5 µm.

. Anhídrido acético, grado reactivo analítico.

. Piridina (R.A).

. Acido clorhídrico, sulfúrico y acético (R.A).

. Hidróxido de sodio.

. Sulfato cérico de amonio.

. Sulfato de sodio.

Material para el bioensayo.

. Vasos de precipitado de 500 ml.

. Pipetas graduadas 2, 5 y 10 ml.

. Microjeringas 500, 50 y 5 μ l.

. Pipetas Pasteur.

. Viales de vidrio.

. Sustancias.

. Sal marina.

. Agua destilada.

.Equipo.

.Balanza analítica mod. 1000 A.

. Lámpara con filamento de Na (60 watts).

8. RESULTADOS.

8.1 Extracto hexánico.

Del fraccionamiento del extracto hexánico mediante cromatografía en columna a vacío, se obtuvieron fracciones de consistencia resinosa, - coloración naranja y aroma dulce - las que por medio de cromatografía de capa fina se manifestaron como la mezcla de más de tres constituyentes, los datos de infrarrojo y solubilidad de dicha mezcla se indican a continuación:

IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3161, 2925, 2853, 1736, 1462, 1377, 1249.

La mezcla fue soluble en hexano, cloroformo, acetona, y acetato de etilo a temperatura ambiente e insolubles en disolventes polares.

8.2 Extracto con acetato de etilo.

8.2.1 Acido oleanólico - Acido ursólico.

Estas sustancias se identificaron mezcladas, donde su separación no fue posible utilizando la metodología convencional. Enseguida se detallan sus propiedades físicas y espectroscópicas:

Sólido blanco, con un punto de fusión de 261-264°C ; parcialmente soluble en éter isopropílico, n - hexano, cloroformo, acetato de etilo a temperatura ambiente y soluble en etanol y propanol.

IR (Nujol) cm^{-1} (espectro 1, página 43): 3432, 2924, 2854, 1689, 1462, 1384, 1377, 1366, 1271, 1034.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 + DMSO-d_6)^{*} (espectro 2, página 44): δ 5.27 (H-12, *t*, $J = 1.5$ Hz, 1H), δ 3.21 (H-3, *dd*, $J = 12$ y 6 Hz, 1H), δ 2.82 (H-18, *dd*, $J = 1$ y 6 Hz, 1H), -oleanólico-, δ 2.24 (H-18, *d*, 1H), -ursólico- δ 1.08 (H-25, *s*, CH_3 , 3H), δ 1.2 (H-27, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.89 (H-24, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.94 (H-23, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.92 (H-29, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.78 (H-26, *s*, CH_3 , 3H).

EM (IE) % 456 (M^+ 5) 438 (59.3), 248 (100.0), 203 (39.8), 189 (12.7)
133 (22.8), 69 (15.2). 55 (16.1), 43 (14.4).

8.2.2 Acido β - acetil ursólico.

Sólido cristalino blanco, de *pf.* 256-258°C, insoluble en *n*-hexano, acetato de etilo, soluble en cloroformo, etanol, y propanol.

IR (CHCl_3) cm^{-1} (espectro 3, página 45): 2925, 1736, 1691, 1459, 1386, 1369, 1250, 1214, 1147, 1030 y 985.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) (espectro 4, página 46): δ 5.24 (H-12, *t*, 1H), δ 4.5 (H-3, *t*, 1H), δ 2.2 (H-18, *d*, $J = 5$ Hz, 1H), δ 2.04 (AcO, *s*, 3H), δ 1.07 (H-27, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.95 (H-25, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.85 (H-24, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.84 (H-23, *s*, CH_3 , 3H), δ 0.78 (H-26, *s*, CH_3 , 3H).

^{*} Desplazamiento químico δ (núcleo, multiplicidad, constante de acoplamiento (*J*), integral).

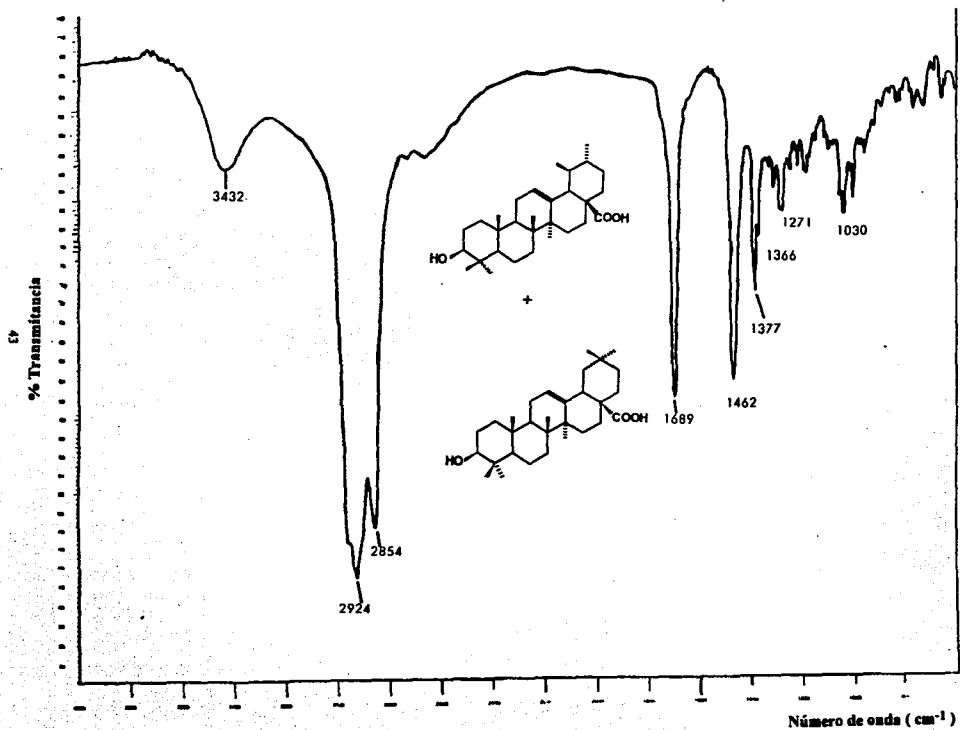
EM (IE) % 498 (M + 35) 438 (59.8), 300 (46.9), 248 (100.0), 219 (7.4),
203 (47.3), 190 (26.5), 133 (26.5), 119 (12.2), 69 (8.1).

8.3 *Artemia salina*.

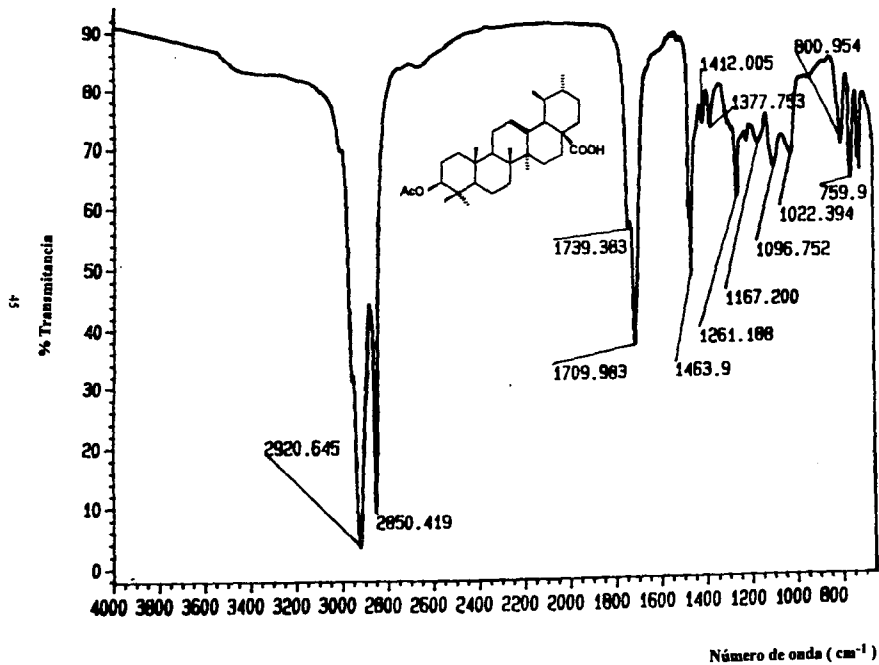
Las pruebas de actividad frente *Artemia salina* se llevaron a cabo por triplicado, con los compuestos indicados, de los cuales todas las muestras resultaron inactivas.

ESPECTROS

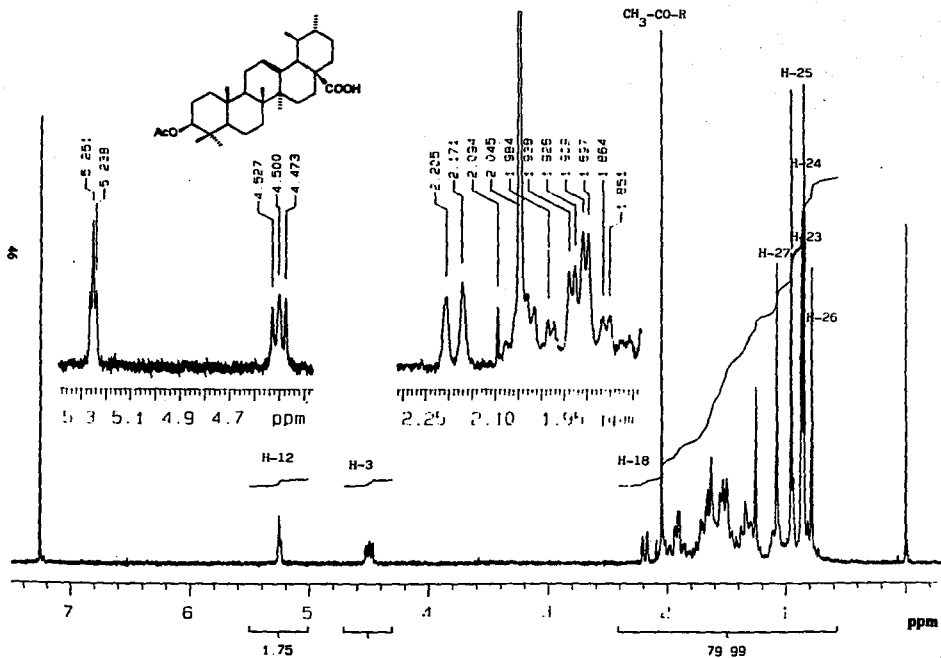
Espectro 1. IR (Nujol) Del ácido oleanólico - ácido ursólico.



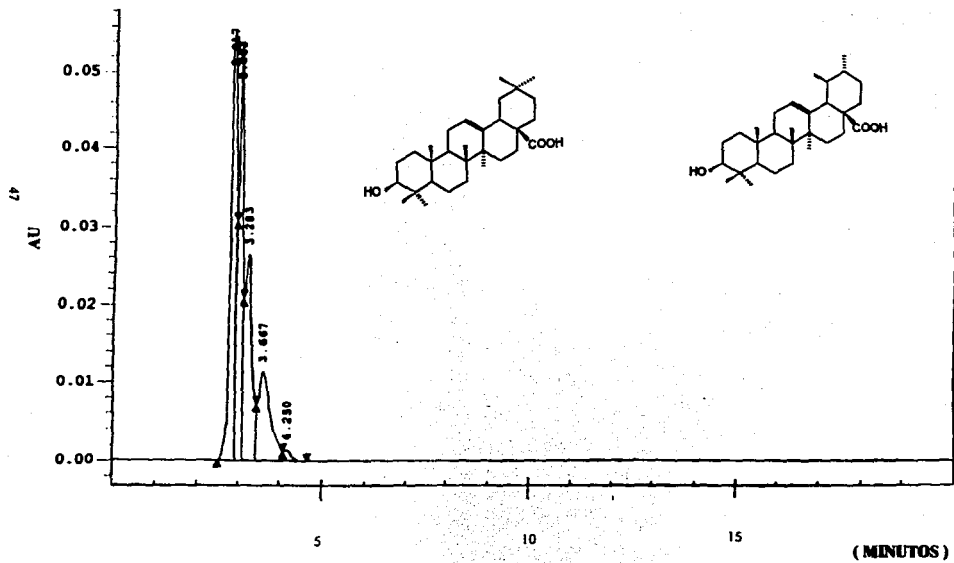
Espectro 3. IR (CHCl₃) Del ácido β - acetil ursólico.



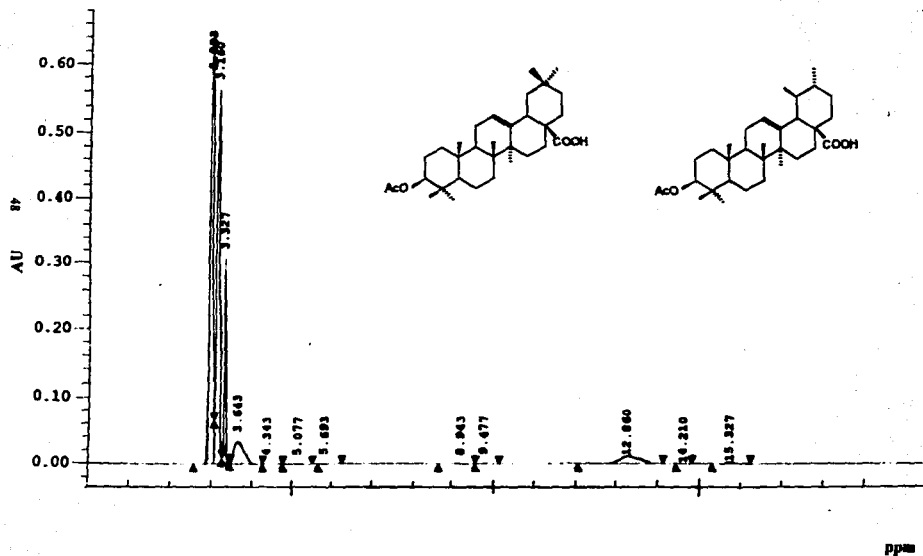
Espectro 4. RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS) Del ácido β - acetil ursólico.



Cromatograma de HPLC del ácido oleanólico - ácido urabólico.



Cromatograma de HPLC del ácido acetil oleanólico - ácido β - acetil ursólico.



9. DISCUSION DE RESULTADOS.

9.1 Extracto hexánico.

Las fracciones obtenidas en este extracto se encuentran constituidas por diversos compuestos en pequeñas proporciones y difícilmente separables por métodos convencionales de cromatografía, por lo que no se pudo identificar dichos compuestos; sin embargo la intensidad de la funcionalidad C-H mostrada en los espectros de infrarrojo, su bajo punto de fusión, solubilidad en disolventes no polares y consistencia física, indican que pueden tratarse de sustancias de baja polaridad - grasas o ceras -.

9.2 Extracto con acetato de etilo.

Del extracto con acetato de etilo se aisló por cristalización fraccionada, una mezcla constituida por dos compuestos mayoritarios; además del producto de reacción de acetilación de uno de los compuestos obtenidos por cromatografías sucesivas. Las sustancias fueron analizadas por espectroscopía de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de hidrógeno, espectrometría de masas y por comparación con los datos publicados en la literatura. Lo anterior permitió establecer la estructura molecular de los compuestos, los cuales corresponden a los triterpenos pentacíclicos derivados de la amirina.

Los compuestos que constituyen ésta mezcla pertenecen a las dos variantes estructurales de la amirina, la α -amirina, ursano (figura IV) y la β -amirina, olcanano (figura V)

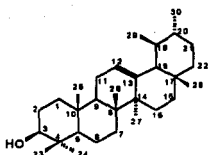


Figura IV

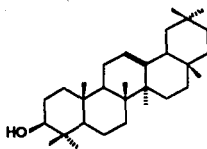


Figura V.

En la presente discusión se describen las propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas características de estos compuestos.

9.2.1. Acido oleanólico - ácido ursólico.

La mezcla de los ácidos de la α y β amirina (figura VI y VII), se han informado como constituyentes en varios géneros de *Salvia* [49-50] y *Cunila* [51] entre otras.

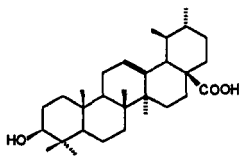


Figura VI

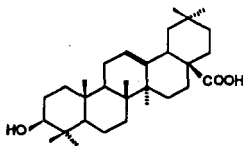


Figura VII

De los eluatos 200-800 obtenidos al eluir la columna con una mezcla de n-hexano-acetato de etilo (90:10), a acetato de etilo-acetona (50:50) se identificaron como constituyentes mayoritarios al ácido oleanólico y ácido ursólico, la proporción de cada uno de ellos en las diferentes fracciones varía al aumentar la polaridad de la mezcla de elución.

Dicha mezcla se aisló en forma de un sólido blanco de punto de fusión 261-264°C, que en el espectro de masas por impacto electrónico muestra un ión molecular a 456 m/z que le corresponde la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ ($\Omega=6$).

Su espectro de infrarrojo (espectro 1, página 43), muestra una banda de absorción en 3432 cm^{-1} característica del grupo hidroxilo ν (O-H), grupo que se comprobó al obtener el derivado acetilado, la presencia del ácido carboxílico fue confirmada por la amplitud de la banda correspondiente a la vibración ν (O-H) $3300\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ y por la banda en 1689 cm^{-1} que corresponde ν (C=O) y finalmente las bandas que corresponden a las uniones $C_{sp^3}\text{-H}$ en 2924 y 2853 cm^{-1} , esto confirma su alta solubilidad en disolventes polares.

Por otra parte en el espectro de RMN- ^1H (espectro 2, página 44) de esta mezcla se observa un triplete (*t*) δ 5.27 que integra para un hidrógeno vínico del C-12 de la estructura VI y VII. La señal doble de doble (*dd*) centrada en δ 3.21 con constante de acoplamiento 6 y 12 Hz, se atribuye al hidrógeno geminal al grupo hidroxilo en el carbono 3, que por la multiplicidad debe estar vecino a dos protones magnéticamente diferentes, el valor de la constante confirma la orientación β de este grupo funcional. El doble de doble (*dd*) que integra para un protón situado en δ 2.83 corresponde al hidrógeno del C-18 y la multiplicidad de esta señal permite proponer que la sustancia en discusión tiene como estructura base la del oleanano. En δ 2.24 aparece como un doble (*d*) que corresponde al hidrógeno del C-18 de la estructura base del ursano. En la zona de los metilos se observan seis singuletes (*s*), el de δ 1.2 corresponde al metilo C-27, el singulete que integra para tres hidrógenos en δ 1.08 corresponde al C-25, mientras que los singuletes de δ 0.98, 0.94, 0.92 y 0.78 corresponden a los metilos unidos a C-24, C-23, C-29 y C-26 respectivamente, las señales descritas anteriormente pertenecen al esqueleto del oleanano, mientras que el ursano presenta una señal para el metilo en C-19 que se ubica δ 0.94 y se encuentra oscurecida con otras señales de los metilos.

El espectro de masas de dicha mezcla presenta un patron de fragmentación característico de los triterpenos pentacíclicos Δ^{12} insaturados [52-55], los cuales se muestran en el esquema 2 y 3.

La fragmentación principal para el ión molecular **a** (m/z 456) sigue un mecanismo vía una reacción retro Diels-Alder para producir el fragmento **b** (m/z 208) y **c** (m/z 248), el cual corresponde al pico base del espectro por la pérdida del grupo COOH para producir **d** (m/z 203), la pérdida de 70 unidades de masa (C_5H_{10}) produce el fragmento **e** (m/z 133) y la pérdida de 14 unidades de masa (CH_2), genera un fragmento **f** (m/z 189).

La mezcla de ácido oleanólico y ácido ursólico como producto natural se encuentra documentada en la literatura, la separación de estos isómeros puede lograrse por métodos químicos [56].

9.2.2. Acido β -acetil ursólico.

Del producto de acetilación de la mezcla de ácido oleanólico - ácido ursólico se obtuvo el ácido β -acetil ursólico (figura VIII).

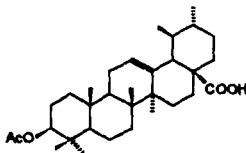


Figura VIII

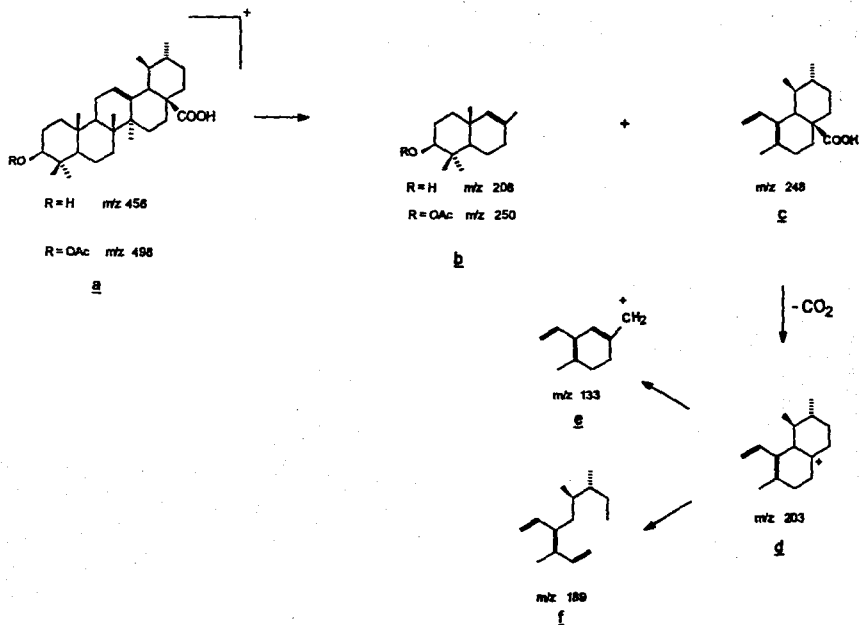
En el espectro de RMN- 1H (espectro 4, página 46) de este compuesto, se observa una señal en δ 5.24 como un triplete (*t*) que integra para un hidrógeno vínico, localizado en C-12, la señal doble (*d*) δ 2.2 corresponde al H-18 con una $J=5$ Hz que integra para un protón. La señal en δ 2.04 corresponde al metilo del acetato, mientras que a campo alto se

observan cinco singuletes (s) que integran para un total de 15 hidrógenos. Los dos metilos restantes presentan desplazamientos químicos similares y se encuentran oscurecidos.

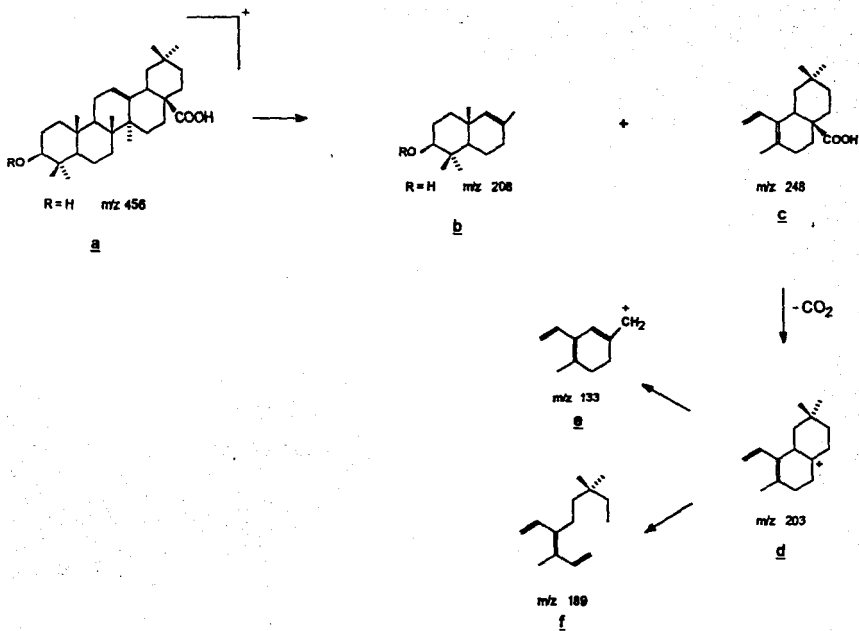
En el esquema 2, se representa el patrón de fragmentación característico de los derivados del ursano.

9.3 Bioensayo con *Artemia salina*.

De los resultados obtenidos de la evaluación del material químico de las hojas de *Tabebuia rosea* frente a *Artemia salina*, indican que dichas sustancias no poseen actividad frente a dicho organismo, sin embargo es posible que en otras partes de la planta e inclusive en extractos de polaridad mayor se encuentren los metabolitos mayoritarios responsables de la actividad biológica informada para dicha planta.



Esquema 2. Patrón de fragmentación para derivados ursólicos. [52-55]



Esquema 3. Patrón de fragmentación de derivados del oleanano. [52-55]

10. CONCLUSIONES.

Se realizó el estudio químico de los extractos hexánico y con acetato de etilo de las hojas de *Tabebuia rosea* (matilishuate); planta utilizada en la medicina tradicional mexicana como un eficiente febrífugo, antimicrobiano, antimalárico y para la clorosis.

El estudio químico del extracto con acetato de etilo, permitió aislar y caracterizar por métodos convencionales de laboratorio y técnicas espectroscópicas y espectrométricas una mezcla constituida por el ácido oleanólico y ácido ursólico.

Asimismo se obtuvo el producto de acetilación del ácido ursólico, a partir de dicha mezcla.

Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad biológica (LD₅₀) frente a *Artemia salina* de los extractos crudos - hexano, con acetato de etilo y de la mezcla de ácidos ursólico y oleanólico; así como el producto de acetilación de los mismos, permiten concluir a priori que las sustancias responsables de determinada actividad biológica no se encuentran presentes en los extractos estudiados. Por lo que se sugiere realizar el estudio biológico preliminar y el estudio químico de extractos obtenidos con disolventes de mayor polaridad. Asimismo se recomienda el estudio de otras partes vegetales de *Tabebuia rosea*. Ya que los objetivos de la fitoquímica de plantas medicinales esta orientada a aislar e identificar sustancias responsables de una acción farmacológica. El estudio farmacológico preliminar sirve como marco de referencia en la búsqueda de sustancias puras que reproduzcan el efecto inicial observado.

De lo anterior podemos decir que el objetivo general planteado para este proyecto fue alcanzado y sus resultados pueden integrarse a los informados en la literatura química, como una contribución al conocimiento de *Tabebuia rosea*, tanto a nivel de género como de especie y al conocimiento de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana.

11. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Rosales, V. E., Zamora, V. R., Silva, M. A., El estudio de las Plantas Medicinales en la Carrera de QFB en la ENEP. Zaragoza, Cuarto Coloquio de Medicina Tradicional Mexicana. "Un Saber en Integración". UNAM. México 70-76 (1990).
- 2.- Noriega, G. J. Estudio de RMN-¹³C en lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de Eudesmano y sus derivados, aislados de *Artemisa ludoviciana*. Tesis de Lic. en QFB. UNAM. FES Zaragoza. México 4-5 (1995).
- 3.- Dougall, K. D., Factors Affecting the Yields of Secondary Products in Plant Tissue Cultures. *Plant Cell and Tissue. Principles and Applications*. Columbus. USA 729-743 (1979).
- 4.- Scogin, R., Anthocyanins of the *Bignoniaceae*. *Bioch. Syst. Ecol.* 8, 273-276 (1980).
- 5.- Woodson, E. R., and Schery, W. R., Flora of Panama. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 60, 781-977 (1973).
- 6.- Gentry, H. A., Coevolutionary Patterns in Central American *Bignoniaceae*. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 61, 728-759 (1974).
- 7.- Rzedowski, G. A., Flora Fanerogámica de México. Instituto Nacional de Ciencias Biológicas. México 365 (1987).
- 8.- Record, J. S. and Hess, W., American timbers of Family *Bignoniaceae*. *Trop. Woods.* 63, 9-38 (1940).
- 9.- Sanchez, S. O., La Flora del Valle de México. 6ª ed. Ed Herrero. México 365-366 (1980).

- 10.- Wagner, H., Kreher, B., and Lotter, H. Structure determination of New isomeric Naphtho[2,3b]furan-4,9-diona from *Tabebuia avellanedae* by the Selective - INEPT Technique. *Helv. Chim. Act.* 72, 659-667 (1989).

- 11.- Fujimoto, Y., Eguchi, T., Murasaki, C., *et. al.*, Studies on the structure and stereochemistry of cytotoxic Furanonaphthoquinones from *Tabebuia impertiginosa*: 5-and 8 hidroxi-2-(1-hidroxietil)naphtho[2,3b]furan-4,9diones. *J. Chem. Perkin. Trans. I.* 2323-2327 (1991).

- 12.- Kreher, B., Lotter, H., Cordell, A. G., *et. al.*, New furanonaphthoquinones and other constituents of *Tabebuia avellanedae* and their immunodulating activities in vitro. *Planta Med.* 46, 562-563 (1988).

- 13 - Chem. Abst. 74 243, (1971).

- 14.- Chem. Abst. 72 240, (1970).

- 15.- Nakato, K., Murayama, K., Murasaki, Iridoides from *Tabebuia avellanedae*. *Phytochemistry.* 32, 371-373 (1993).

- 16.- Joshi, C. K., Praskas, L. and Sha, K. R., Chemical examination of the roots of *Tabebuia rosea* and heartwood of *Oroxylum indicum*. *Planta Med.* 31, 257-258 (1976).

- 17.- Compadre, M. C., Jáuregui, F. J., Nathan, J., Isolation of 6-O-(Para-cumaroyl)-catapol from *Tabebuia rosea*. *Planta Med.* 46, 42-44 (1982).

- 18.- Grazziotin, D. J., Schapoval, S., Chaves, G. C., *et. al.*, Phytochemistry and analgesic of *Tabebuia chrysotricha*. *Journal of Ethnopharmacology.* 36, 249-251 (1992).

- 19.- Rao, M. M. and Kingston, I., Plant Anticancer Agents XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. *J. Nat. Prod.* 45, 600-604 (1982).

- 20.- Rao, M. M., Isolation and structure elucidation of compounds from *Tabebuia cassinooides*. *J. Nat. Prod.* 42, 685-686 (1979).
- 21.- Daulatabad, D. C. and Hosamani. M.K., Vernolic Acid in *Tabebuia argentea* Seed oil : A moderate source of oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 68, 520-521 (1991).
- 22.- Standley, C., Williams, O. and Gibson, N., Flora de Guatemala. *Fieldiana : Botany* 24, Part X 153-155, 222-227 (1994).
- 23.- Martínez, M., Plantas Medicinales de México. 6ª edición. Editorial Botas. 449-450 (1959).
- 24.- Palacios, B. S. Investigación del efecto terapéutico del principio amargo de *Tabebuia rosea* sobre *Plasmodium berghoi roelii*. Tesis de Lic. en QFB. UNAM. Facultad de Química. México. 1-94 (1983).
- 25.- Carvalho, H. L. and Krettl, U. A., Antimalarial Chemotherapy with natural products and chemically, Defined Molecules. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 181-184 (1991)
- 26.- Rodrigues, D. E., Alves, D. F., Rodrigues, S. A. *et. al.*, Antinflammatory action of lapachol. *Journal Ethopharmacology.* 22, 239-241 (1990)
- 27.- Burnett, R. A. and Thomson, H. R., Naturally Occurring Quinones Part X The quinonoid constituents of *Tabebuia avellanadade* (*Bignoniaceae*) . *J. Chem. Soc. (C)*, 2100-2104 , (1967).
- 28.- Burnett, R. A. and Thomson, H. R., Naturally Quinones Part XII. Extractives from *Tabebuia chrysantha* Nichol and other *Bignoniaceae*. *J. Chem. Soc. (C)*, 850-853 (1968).
- 29.- Girard, M., Kindack, D., Dawson, A. *et. al.*, Napthoquinone constituents from *Tabebuia spp.* *J. Nat. Prod.* 51, 1023-1024 (1988).

**ESTA TESTS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- 30.- Joshi, C., Prakash, L. and Singh, P., Quinones and other constituents from *Tabebuia rosea*. *Phytochemistry* 12, 942-943 (1973).
- 31.- Silveira, C., Gottlieb, R., Oliveira, G. and Zeyherol. A., Dilignol from *Zeyhera Digitalis*. *Phytochemistry* 14, 1829-1830 (1975).
- 32.- Singh, T., Prakash, L. and Joshi, K. *Bignoniaceae* lapachol and other constituents from the *Bignoniaceae*. *Phytochemistry* 11, 1478 (1972).
- 33.- Zani, L., Deoliveira, B., Deoliveira, G., Furanonaphthoquinone from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry* 30, 2379-2381 (1991).
- 34.- Manners, D. G. and Jurd, L. A., New Napthoquinone from *Tabebuia guayacan*. *Phytochemistry* 15, 225-226 (1976).
- 35.- Sharma, K. P., Khanna, N. R., Rohatgi, K. B. *et al.* Tecomaquinone-III: A new Quinone from *Tabebuia pentaphylla*. *Phytochemistry* 27, 632-633 (1988).
- 36.- Thomson, H. R., Naturally occurring quinones III. Recent advances. 3rd ed., Chapman and Hall Ltd. New York. 125-344 (1987).
- 37.- Peter, J., Recent developments in the isolation and structure elucidation of naturally occurring iridoid compounds. *Planta Med.* 56, 1-13 (1990).
- 38.- Bianco, B., Passacantilli, P., Polidori, G. *et al.*, Isolation of 6-epimonomelittoside from *Tecoma heptaphylla* and its conversion of into monomelittoside. *Phytochemistry* 22, 1189-1191 (1983).
- 39.- Krishna, C.J., Singh, P., Singh, G. *et al.*, Crystalline components of roots of *Phyllarthron comorense* DC and of stem bark of *Tabebuia rosea* DC. *Indian. J. Chem. Sect. B*, 14B, 637-638 (1976).
- 40.- *Chem. Abst.* 94, 61749 (1981).

- 41.- *Chem. Abst.* 94, 80296 (1981).
- 42.- Prakas, L. and Singh, R., Chemical Examination of the leaves and stem heartwood of *Tabebuia pentaphylla* (Linn) Hemsl (*Bignoniaceae*). *J. Indian. Chem. Soc.* 58, 1122-1123 (1981).
- 43.- Rohatgi, B. K., Gupta, R. B., Khanna, R. N. *et. al.*, Quinones from *Tecoma pentaphylla*: Constitution of tecomaquinones I and II. *Indian. J. Chem. Sect. B.* 22B, 886-889 (1993).
- 44.- *Chem. Abst.* 110, 413 (1989).
- 45.- *Chem. Abst.* 105, 368 (1986).
- 46.- Ramachandra, N. and Gunasegaran, R., Chemical investigation of certain south Indian plants. *Indian Journal of Chemistry* 21B, 979-980 (1982).
- 47.- Bruneton, J. Elementos de fitoquímica y farmacognocia. Editorial Acribia, España 157-159, 163-275 y 335 (1991)
- 48.- Meyer, N. B., Ferrigni, R. N. Putnam.E. J. *et. al.*, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents . *Planta Med.* 45, 31-34 (1982).
- 49.- Ulubelen, A., Brieskorn, H. C., Pentacyclic Triterpenic Acids: Micromeric Acids from *Salvia horminum* *Phytochemistry* 14, 820-821 (1975).
- 50.- Delgado, G., Romo de Vivar, A., New Triterpenoids from *Salvia nicolsoniana*. *J. Nat. Prod.* 49, 225-230 (1986).
- 51.- Hernandez, S. J., Estudio fitoquímico de dos plantas medicinales mexicanas : *Cunila lythrifolia* y *Lepechinia caulesces* (*labiatae*). Tesis Lic. en QFB. UNAM Facultad de Química. México. 10-14 (1987).

- 52.- Butzikiewicz, H., Wilson J. and Djerassi, C., Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXII: Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3688-3699 (1963).
- 53.- Karlinner, A. and Djerassi, C., " Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbons. *J. Chem. Soc.* 31, 1945-1956 (1966).
- 54.- Torsch, B., Harrison, T., Djerassi, C. *et. al.*, Terpenoids. LIII. Demonstration of ring conformational changes in Triterpenes of the β -Amyrin class Isolated from *Stryphnodedron coriaceum*. *J. Chem. Soc.* 28, 2300-2394 (1963).
- 55.- Schamma, M., Glick, E., Mumma, O. R., The Nuclar Magnetic Resonance spectra of pentacyclic triterpenes. *J. Chem. Soc.* 27, 4512-4517 (1962).
- 56.- Lewis, G. K. and Tücker, J., The Separation of substituted olean-12-en-28-oic acids rom the corresponding urs-12-en-28-oic acid isomers. *Aust. J. Chem.*, 36, 2297-2305 (1983).
- 57.- Nathan, P. J. Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear. Editorial Limusa-Wiley. México (1970).
- 58.- Nakanishi, K., Infrared Absorption Spectroscopy. 2ª edition. Holden-Day. Inc San Francisco USA (1977).
- 59.- Romo de Vivar. Productos Naturales de la Flora Mexicana. Editorial Limusa. México 167-181 (1985).

- 52.- Butzikiewicz, J., Wilson and Djerassi. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXII: Pentacyclic Triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3688-3699 (1963).
- 53.- Karlinner, and Djerassi., " Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbons. *J. Chem. Soc.* **31**, 1945-1956 (1966).
- 54.- Torsch, B., Harrison, T., Djerassi, C., *et al.* Terpenoids. LIII. Demonstration of ring Conformational Changes in Triterpenes of the β -Amyrin Class Isolated from *Stryphnodedron coriaceum*. *J. Chem. Soc.* **28**, 2300-2394 (1963).
- 55.- Schamma, M., Glick, E., Mumma, O. R. The Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Pentacyclic Triterpenes. *J. Chem. Soc.* **27**, 4512-4517 (1962).
- 56.- Lewis, G. K., Tücker, J. The Separation of Substituted Olean-12-en-28-oic Acids from the Corresponding Urs-12-en-28-oic Acid Isomers. *Aust. J. Chem.*, **36**, 2297-2305, (1983)
- 57.- Nathan, P. J. Introducción a la resonancia magnética nuclear. editorial Limusa-Wilay. México 1970
- 58.- Nakanishi, K. Infrared Absorption Spectroscopy. 2ª edition. Holden-day. Inc San Francisco USA (1977).
- 59.- Romo de Vivar. Productos naturales de la flora mexicana. editorial Limusa. México 167-181 (1985).