

72  
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE  
*Lasianthaea aurea*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

ASESORES: M. en C. J. GUILLERMO PENIERES CARRILLO  
M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
Estudio Fitoquímico de la raíz de Lasianthaes aurea.

que presenta la pasante: Claudia Velázquez González  
con número de cuenta: 8841839-9 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 1 de Abril de 1997.

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Ma. del Pilar Ramos Ramos</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Elizabeth Toriz García</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Guillermo Penieres Carrillo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Enrique Angeles Anguiano</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q. Mario A. Morales Delgado</u>	

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE: Q.F.B. Ma. DEL PILAR RAMOS RAMOS.**

**VOCAL: M. en C. ELIZABETH TORIZ GARCÍA.**

**SECRETARIO: M. en C. J. GUILLERMO PENIERES CARRILLO.**

**PRIMER SUPLENTE: M. en C. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO.**

**SEGUNDO SUPLENTE: Q. MARIO A. MORALES DELGADO.**

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**FES-CUAUTITLÁN-UNAM, EN COLABORACIÓN CON EL INSTITUTO DE QUÍMICA-UNAM**

**ASESORES:**

**M. en C. J. GUILLERMO PENIERES C.      M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL R.**

**SUSTENTANTE :**

**CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ**

**Esta tesis se llevó a cabo bajo la dirección del M. en C. J. Guillermo Penieres Carrillo de la FES-CUAUTITLAN (Lab. 121 Sección de Química Orgánica y Lab. de Virología Posgrado con la asesoría de la Dra. Susana Mendoza Elvira) y del M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez (L-3 Unidad de Plantas Medicinales) del Instituto de Química de la UNAM.**

## *Agradecimientos*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

*Al M en C. José Guillermo Penieres Carrillo por todo su apoyo, dedicación y paciencia mostrados en el desarrollo de este trabajo. " Gracias por todo maestro "*

*Al M en C. Balbomero Esquivel Rodríguez por su invaluable participación en la elaboración de este trabajo*

*A la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por las facilidades proporcionadas para hacer posible este trabajo*

*Al Dr. Cecilio Alvarez por su valiosa colaboración en el presente trabajo*

*A ese gran amigo que siempre ha estado conmigo cuando más lo he necesitado "gracias SEÑOR".*

*A mis padres: María González y Alfredo Velázquez por sus esfuerzos y dedicación para que este trabajo fuera llevado a cabo "Dios los conserve muchos años".*

*A mis hermanos: Davinia, José Alfredo y María Angélica, que este trabajo les sirva como un incentivo para seguir adelante y lograr todas las metas que se fijan en la vida.*

*A la familia García González por el invaluable apoyo que me han brindado.*

*A mis Abuelitos, Tío, Primos y sobrinitos.*

*A mis amigos: Julia A., Ibeth O., Guadalupe V., Beatriz A., Mireya M., Patricia V., Rosaura A., Raúl H., Eliseo T., Mario E., Ponciano B. y a toda la generación 18<sup>va</sup> de U.T.B. por haberme brindado su amistad y hacer mi época universitaria inolvidable.*

*A todos los integrantes del grupo Hanani por haber contribuido a una etapa muy importante en mi desarrollo personal.*

*A la sección de Química Orgánica y todos sus integrantes por su apoyo desinteresado.*

*A los integrantes del E-3 de la UTPM : Rosita, Rodolfo, Margarita, Katia y a la maestra Ana Adela.*

*A Alfonso S., Mireya J. y Minerva R. Del laboratorio de Virología de Posgrado por su apoyo incondicional.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a todos los maestros que contribuyeron a la formación académica recibida.*

*A todas aquellas personas que de alguna manera u otra hicieron posible la elaboración de este trabajo.*

# ÍNDICE

## RESUMEN

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- OBJETIVOS.....	5
3.- GENERALIDADES.....	6
3.1 METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS.....	6
3.2 TERPENOS.....	10
3.3 BIOGÉNESIS.....	13
3.4 DITERPENOS.....	15
3.4.1 distribución natural y papel biológico.....	19
3.5 DITERPENOS TETRACÍCLICOS.....	23
3.5.1 Relaciones biogenéticas.....	28
3.5.2 <i>Lesianthea sures</i> .....	31
3.7 ÁCIDO KAURENOICO Y ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO.....	34
4.- PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO (AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN).....	38
4.2 ESTUDIO BIOLÓGICO.....	41
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO.....	43
5.2 ESTUDIO BIOLÓGICO.....	47
6.- CONCLUSIONES.....	49
7.- REFERENCIAS.....	50
8.- APÉNDICE.....	57



## ÍNDICE DE ESTRUCTURAS

1. Isopreno (2-metil-1,3-butadieno).....	10
2. Geranil-linalool.....	11
3. Geranilgeraniol.....	11
4. Pirofosfato de geranilgeraniol.....	15
5. Atisano.....	18
6. Labdano.....	18
7. Clerodano.....	18
8. Kaurano.....	18
9. Beyerano.....	18
10. Pimarano.....	18
11. Cassano.....	18
12. Abietano.....	18
13. Totarano.....	18
14. Hibaano.....	18
15. Taxano.....	18
16. Traquilobano.....	18
17. Podocarpano.....	18
18. Giberelano.....	18
19. Ent-kaurano.....	18
20. Estachano.....	18
21. Portulal.....	22
22. Perrottetianal-A.....	22
23. Nagilactona B.....	22
24. Momilactona-A.....	22
25. Kauranol.....	22
26. Ferruginol.....	22
27. Dictiodial.....	22
28. Cueunicina.....	22
29. Diisocianoamflecteno.....	22
30. Ptilosarcona.....	22
31. Kaureno.....	24
32. (+) Kaureno.....	24
33. (-) Kaureno.....	24
34. (-) Filocladeno.....	24
35. Ácido Grandiflorénico.....	25
36. Excisanina.....	25
37. Rubescensina A y B.....	25
38. Ésteres de Oridonina.....	25
39. Oridonina.....	26
40. Ácido Xylóptico.....	26
41. Lasiokaurina.....	26
42. De Oridonina 14-Dodecanoato, 14-Tetradecanoato, 14-Hexadecanoato.....	26
43. Norkauranona.....	26
44. Rubescensiva-B.....	27
45. Ponicidina.....	27
46. I- Ácido 16,17-Dihidroxi-kauranóico, II- Ácido 17- Hidroxi-kauranóico.....	27
47. Carboxiatractilósido.....	27
48. Hidroxialdehído.....	28
49. Hidroxiácido.....	28
50. (-)-Kaur-16-en-19-al.....	28
51. Ácido (-)-Kaur-16-en-19-oico.....	28
52. Giberelinas C-19.....	29

53. Giberelinas C-20.....	29	54. Kaurenólido.....	30
		55. ácido Giberélico.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

Clasificación de los terpenos.....	12
Kaurenos con actividad biológica.....	25
Especies del género <i>Lasianthaea</i> .....	32
Plantas de las que han sido aislados el ácido Kaurenoico y el ácido Grandiflorénico .....	34
Correlación de los datos obtenidos contra los reportados de <sup>13</sup> C .....	45
Fragmentos estructurales obtenidos por EMIE.....	46
Resultados Biológicos.....	47

## RESUMEN

Del estudio fitoquímico de la raíz de *Lasianthaea aurea*, se aislaron dos metabolitos secundarios: el Ácido Kaurenóico (ácido kaur-16-en-19-oico) y el Ácido Grandiflorénico (ácido 9(11)-16-kauradienoico).

La identificación y caracterización de los metabolitos secundarios aislados, se llevó a cabo por técnicas espectroscópicas usuales (IR, E. Masas, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C).

Utilizando la técnica de sensidiscos o Kirby-Bauer, se realizó la prueba de actividad biológica a los compuestos aislados, sobre bacterias G(+) y G(-), encontrándose que dichos compuestos fueron biológicamente activos en algunos casos.

*INTRODUCTION*



## 1. INTRODUCCIÓN

El hombre, desde sus épocas más remotas, se ha cuestionado sobre el por qué de su existencia y la de todo aquello que lo rodea. El conocer por el saber es lo que lo ha motivado a descubrir cosas inimaginables; es esta curiosidad innata de todo ser humano, la que hace posible la realización de sueños que parecen ser imposibles.

Desde sus inicios, la vida del hombre ha estado íntimamente ligada a su medio ambiente, animales, minerales y en particular a los vegetales, los cuales le han proporcionado alimento, vestido, materiales de construcción, salud e incluso la muerte.<sup>1</sup>

Causa admiración como el hombre primitivo, aun sin saber qué compuestos contenía cada planta, sabía para qué podía utilizarse cada una. Desde los primeros tiempos, el hombre aprendió a distinguir entre aquellas plantas que eran venenosas y las que no lo eran, y así desarrolló el conocimiento de principios activos de origen natural, que fue transmitiendo, al principio, verbalmente y después de forma escrita, como en los papiros, tablas de barro cocido, pergaminos, hasta llegar a nuestros días a la edición de farmacopeas.<sup>1</sup> La adquisición de estos conocimientos significó años y años de trabajo. Él sabía que enfermedades podían tratarse con materiales provenientes de la naturaleza<sup>2</sup>, podía elegir plantas que su experiencia iba calificando como dotadas de virtudes terapéuticas y las preparaba o mezclaba para obtener los medicamentos que debían emplearse. Todos estos conocimientos generalmente fueron acumulados por determinados individuos: sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes los han transmitido de generación en generación, a determinados aprendices y a sus descendientes.<sup>3</sup>

El reino vegetal poseó muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal que están aún por descubrirse, y gran número de plantas son estudiadas constantemente respecto a su posible valor farmacológico.<sup>1</sup>

La pérdida de la cultura y los conocimientos desarrollados y acumulados durante cientos de años por los pueblos indígenas, así como la extinción de especies vegetales y animales y la destrucción constante de su habitat, pueden representar una pérdida de recursos cuyas consecuencias son impredecibles para nuestro futuro.<sup>4</sup>

Antes del año 1800, aproximadamente, se realizaron sólo ligeros progresos en el campo de la fitoquímica ( estudio químico de los vegetales). Los primeros interesados en este campo no llegaron a apreciar la extrema complejidad de las materias con las que ellos realizaban sus trabajos y carecieron casi por completo de las técnicas necesarias para conseguir un progreso auténtico.<sup>1</sup>

Entre los estudios que se realizaron destacan el aislamiento de la sacarosa por Margraff en 1747 y la obtención por Scheele, entre 1769 y 1786, de los ácidos láctico, cítrico, oxálico, málico, gálico y tartárico. En 1806, Sertuner obtiene el primer alcaloide: la morfina. Años después, Pelletier y Caventou separan de otras plantas medicinales la quinina, estricnina y otros alcaloides.

Lieby y Woehler en 1837, separan de la goma de benjuí el ácido benzoico y el benzaldehído. De las hojas de la dedalera se aisló, en 1828, la digitalina.<sup>2</sup>

Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América fueron transmitidos por los aborígenes a misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras, como las siguientes:

Gonzálo Fernández de Oviedo, *De la Natural Historia de las Indias e Islas y Tierra Firme del Mar Océano*, publicada en 1535.

José de Acosta publica en 1590 su *Historia natural y moral de las Indias*.

El protomédico del rey Felipe II, Don Francisco Hernández, escribe la *Historia Plantarum Novae Hispaniae*.

Fray Bernardino de Sahagún escribió a fines del siglo XVI su *Historia de las Cosas de la Nueva España*.

Cristóbal Acosta publicó el *Tratado de las drogas y medicinas de las indias orientales, con sus plantas dibujadas al vivo*.

En 1552 Martín de la Cruz escribe el *Códice Badiano*, traducido del náhuatl al latín por su maestro Juan Badiano, ambos indios xochimilcas.

Vicente Cervantes escribió a finales del siglo XVIII su *Lista de plantas oficinales que se hallan en el reino de México*.<sup>3</sup>

Como vemos, la investigación en el área de productos naturales ha sido de gran importancia, ya que con ésta se ha contribuido al estudio de las diferentes familias en que se divide la vegetación en México. En nuestros días, la investigación realizada en el área de productos naturales no se basa sólo en sus características morfológicas, sino que además se hace uso de la Quimiotaxonomía.

"Se define a la taxonomía química, quimiotaxonomía o sistemática química, como la rama de la ciencia que usa los caracteres químicos, en particular los llamados "metabolitos secundarios" (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.) de un conjunto de organismos, para determinar su posición en una clasificación jerarquizada evolutivamente de los seres vivos".<sup>3</sup>

Como se mencionó anteriormente, los principales componentes que se estudian en relación con la clasificación de las plantas, son los metabolitos secundarios (término primero introducido por Czapek), que tienen una frecuencia intermedia en cuanto a la distribución en el reino vegetal. Los caracteres químicos tienen sobre los morfológicos la ventaja de ser, por lo general, más precisos y fácilmente definidos; por otra parte, con excepción de los caracteres que son rápidamente detectables (pigmentos manifiestos, principios olorosos), raramente ha sido posible comprobar su existencia en miles de plantas como se ha hecho con muchos caracteres morfológicos.<sup>1</sup>

El rápido desarrollo de la química y la farmacología de los vegetales en los últimos años, ha despertado el interés por saber cuales son las sustancias contenidas en las plantas que son las responsables de la actividad biológica.

Así, una vez aislados, purificados e identificados los compuestos de una planta pueden utilizarse para realizar ensayos farmacológicos y saber a ciencia cierta qué compuesto es el que tiene la actividad farmacológica o bien qué actividad tiene cada metabolito.

Teniendo este conocimiento como antecedente, se pueden sintetizar moléculas con la misma estructura que el metabolito activo y así poder utilizar el compuesto sintetizado cuando exista dificultad alguna para el empleo de la planta (por ejemplo: temporada del año, o bien que el uso de la planta ocasione efectos colaterales debidos a los demás metabolitos existentes en ésta).

El espécimen estudiado en el presente trabajo fue *Lasianthaea aurea*, miembro de la tribu *Helianthaea*, subtribu *Verbesinae* de la familia *Asteraceae*<sup>2</sup>.



O B J E C T I V O S



## 2. OBJETIVOS

Con base en la importancia que reviste el estudio químico de los vegetales, en lo que se refiere a metabolitos secundarios, se plantearon los siguientes objetivos:

Contribuir al estudio fitoquímico de la flora nacional, respecto al espécimen *Lasianthaea aurea*

Caracterizar los metabolitos secundarios aislados de la raíz de *Lasianthaea aurea*, mediante técnicas espectroscópicas ( IR, RNM <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, EM-IE.)

Realizar pruebas de actividad biológica a los metabolitos aislados de la raíz de *Lasianthaea aurea*.

GENERALIDADES



### 3. GENERALIDADES

#### 3.1. METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS

Los compuestos orgánicos aislados de fuentes naturales forman un gran grupo conocido como productos naturales o metabolitos secundarios. El estudio del metabolismo implica una comprensión detallada de los procesos involucrados que comienzan con reacciones catalizadas por enzimas.

La síntesis realizada por las plantas es más complicada, porque empieza con materiales que son sustancias simples: agua,  $\text{CO}_2$ , Nitrógeno molecular y sales inorgánicas.

El proceso sintético primario de la naturaleza es la fotosíntesis, proceso por el cual las plantas verdes utilizan la energía del sol para la producción de compuestos orgánicos a partir de  $\text{CO}_2$ . Los productos iniciales de la fotosíntesis son los carbohidratos; además, alteraciones metabólicas dan lugar a la formación de una combinación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular y estructura simple, entre éstas están los azúcares simples, ácidos carboxílicos y aminoácidos de bajo peso molecular, por ejemplo Acetil Coenzima A, ácido Mevalónico, azúcares y nucleótidos. El medio energético involucrado en el metabolismo es la Coenzima ATP (Adenosintrifosfato), la cual sirve como liberador común de energía y como catalizador de diversas reacciones enzimáticas.

**Este intrincado camino de reacciones bioquímicas está referido al metabolismo primario. (las sustancias son formadas y entran a transformaciones que son descritas como proceso metabólico primario). Se empieza la síntesis por materiales específicos genéticamente controlados, reacciones enzimáticamente catalizadas, que forman**

componentes complejos que caracterizan el metabolismo secundario de las plantas.<sup>6</sup>

Los metabolitos secundarios, sin embargo, se distinguen más precisamente de los primarios por el siguiente criterio:

- Tienen una restringida distribución, siendo encontrados sólo en algunas plantas y microorganismos.
- Frecuentemente son característicos de un género o especie individual.
- Se forman mediante caminos especializados generados a partir de las vías metabólicas primarias.<sup>1</sup>

Los animales terrestres y marinos, las plantas, insectos y microorganismos producen un sinnúmero de compuestos en sus organismos con diversos propósitos. Estos incluyen el desarrollo mismo del organismo, su supervivencia diaria, autodefensa, simbiosis, atracción sexual, etc. Los metabolitos primarios, por contraste, tienen una amplia distribución en los organismos vivos y están íntimamente involucrados en los procesos esenciales para la vida.

Así, algunos aminoácidos, Acetil Coenzima A, ácido Mevalónico e intermediarios participan en la biosíntesis de los metabolitos secundarios, de ahí la importancia de tratar varios aspectos relacionados con su biosíntesis.

La diferenciación y especialización se enlazan con los mecanismos empleados por el organismo en sus transformaciones de materia y energía (metabolismo), por lo que éste experimenta algunas modificaciones, particularmente en la que se refiere a sustancias metabolizables, paso de organismos autotróficos a heterotróficos y elaboración de metabolitos secundarios. En el aspecto externo, las tendencias evolutivas

se manifiestan por diferencias morfológicas y fisiológicas notables en organismos muy distantes y sutiles

los muy próximos; ésto permite utilizar la información adquirida por los bioquímicos para explicar, en términos de consideraciones biogenéticas, la presencia de un mismo metabolito secundario en plantas pertenecientes a taxones diferentes (especies, géneros, tribus, etc.) o de metabolitos similares en la misma planta.<sup>3</sup>

También, es importante que al proponer la estructura o la estereoquímica de un metabolito secundario, se discuta su factibilidad en base a su biosíntesis, pues si no hay un mecanismo razonable, es probable que la estructura asignada sea incorrecta.

Las consideraciones biogenéticas han servido para plantear síntesis sencillas de las sustancias y, para ello, el diseño de nuevas moléculas que interfieran con determinado proceso metabólico, factores de crecimiento, desorganizadores de información genética, etc.<sup>3</sup>

La figura 1 muestra las relaciones biogenéticas que involucran la formación de metabolitos primarios y secundarios a partir de sustancias simples.<sup>3, 13</sup>

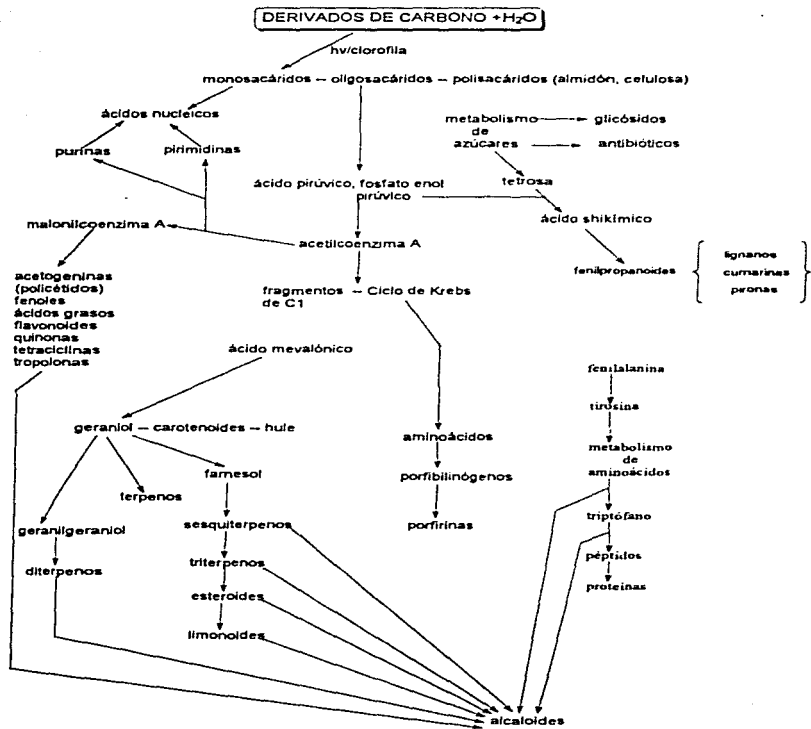


Figura 1

### 3.2. TERPENOS

Los compuestos terpénicos son uno de los grupos que se encuentran más ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo que su estudio químico se ha intensificado debido a la gran variedad de aplicaciones que se les han encontrado. Así, podemos mencionar su uso en procesos industriales tales como colorantes, fármacos, cosméticos, hormonas, perfumes, etc.<sup>2</sup>

Los terpenos están constituidos por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) Figura 2, las cuales se encuentran unidas de acuerdo a la "regla del isopreno" en uniones regulares (cabeza-cola), que generalmente se presentan en los monoterpenos y diterpenos o bien en uniones irregulares (cabeza-cabeza, cola-cola), las cuales son menos comunes, presentándose en la mayoría de los triterpenos y carotenos, de tal manera que la llamada "regla isoprénica" ha sido de gran ayuda en la elucidación de la estructura de los terpenos.<sup>3</sup>

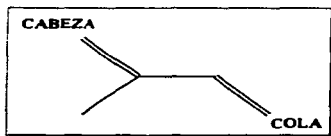


Figura 2



En la actualidad se sabe que los terpenos no se forman realmente en la naturaleza a partir del isopreno, y que es el ácido mevalónico el verdadero precursor de casi todas las clases de isoprenoides. Específicamente, el geranilgeranilo es el precursor de los diterpenos cíclicos, esto justifica la idea de Ruzicka acerca de su biogénesis. "L. Ruzicka (1953) propuso una racionalización de estructuras en términos de ciclización inicial de geranilgeraniol o geranil-linalool Figura 3 (regla biogénica del isopreno) empleando iones o radicales libres".<sup>7,8</sup>

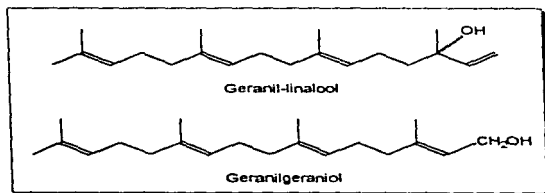


Figura 3

La regla biogénica del isopreno toma en cuenta el hecho de que el producto finalmente formado en la planta tiene su origen en un precursor isoprenoide regular, pero que pudo haber sufrido posteriormente alguna transformación de acuerdo al metabolismo secundario específico de la especie vegetal.

Los terpenos se clasifican en relación al número de unidades isoprénicas que contenga la molécula. Cada unidad terpénica está formada por "n" unidades de isopreno.

La tabla 1 muestra la clasificación de los terpenos atendiendo al número de unidades isoprénicas que contiene cada molécula<sup>10</sup>.

CLASE	No. DE ÁTOMOS DE CARBONO	No. DE UNIDADES DE ISOPRENO	FÓRMULA
HEMITERPENOS	5	1	$C_5H_8$
MONOTERPENOS	10	2	$C_{10}H_{16}$
SESQUITERPENOS	15	3	$C_{15}H_{24}$
DITERPENOS	20	4	$C_{20}H_{32}$
SESTETERPENOS	25	5	$C_{25}H_{40}$
TRITERPENOS	30	6	$C_{30}H_{48}$
TETRATERPENOS	40	8	$C_{40}H_{64}$
POLITERPENOS	$X_n$	$n$	$(C_5H_8)_n$

Tabla 1

### 3.2.1. BIOGÉNESIS

Desde 1956, el conocimiento acerca de la biosíntesis de los terpenos ha llegado a ser más y más definitivo. Está bien establecido que 2 moléculas de acetil-CoA, derivadas de carbohidratos, lípidos o catabolismo de proteínas, se condensan a acetoacetil-CoA. La condensación de acetoacetil CoA con otra molécula de acetil CoA en una reacción tipo aldol, da como resultado la  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA, la cual es reducida irreversiblemente con la intervención de NADPH (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducida) a ácido mevalónico. El bloque que construye casi todos los isoprenoides es la fosforilación del ácido mevalónico por ATP (Trifosfato de adenosilo), en 2 pasos enzimáticos que conduce a la formación de ácido mevalónico-5-pirofosfato; la reacción posterior de la enzima con ATP genera pirofosfato de isopentilo.

Después, la condensación de pirofosfato de geranilo y pirofosfato de isopentenoilo (IPP) conducen a pirofosfato de farnesilo y así, por esta secuencia de reacción, se genera pirofosfato de geranilgeranilo que representa el precursor acíclico de Ruzicka para la posterior elaboración de diterpenos cíclicos.<sup>30</sup>

La figura 4 muestra la ruta biogenética de la formación de pirofosfato de geranilgeranilo involucrado en la formación de diterpenos.

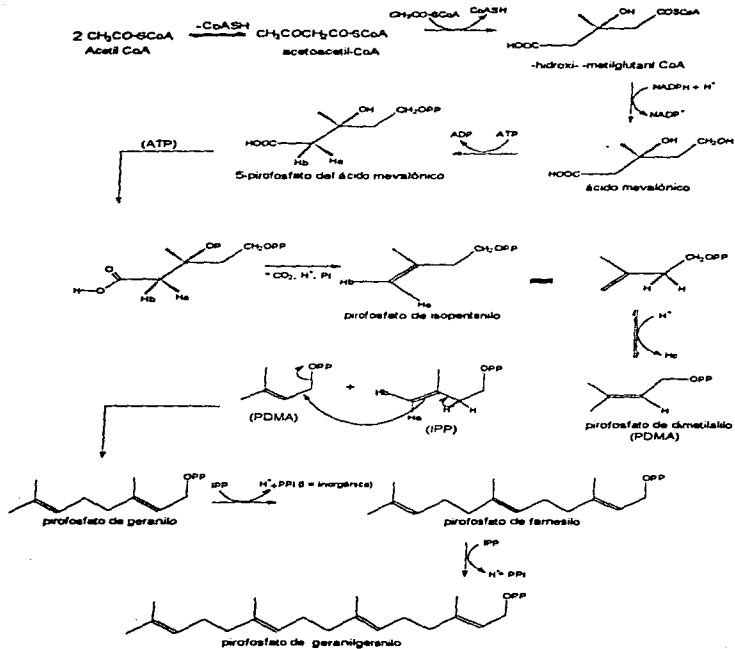


Figura 4

### 3.3. DITERPENOS

En la familia de los terpenos un grupo importante es el de los DITERPENOS, sustancias constituidas por un esqueleto de 20 carbonos derivados del pirofosfato de geranilgeranilo (Figura 5), los cuales son obtenidos principalmente de hongos y vegetales, incluyendo a las gomas y resinas de las plantas.<sup>11,61,62</sup>

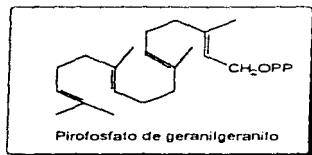


Figura 5

Los diterpenos constituyen un grupo de sustancias formadas por anillación del geranilgeraniol, lo que origina numerosos tipos de estructuras que son de gran interés, tanto por su comportamiento químico como por sus interesantes propiedades biológicas, entre las que destacan la actividad reguladora del crecimiento vegetal que tienen las giberelinas, la actividad antialimentaria para insectos que tienen algunos diterpenos entkaurénicos, las propiedades tóxicas de los diterpenos con esqueleto de taxano y la interesante actividad biológica de los diterpenos oxepínicos del zoapatle.<sup>12</sup>

La gran diversidad de esqueletos y la variabilidad de funciones, hacen posible la existencia de múltiples estructuras. Estudios recientes han elevado el número de los diterpenos de 650 en 1974, a más de 1000 en nuestros días.<sup>61</sup>

Existen 5 tipos principales de diterpenos que son los más importantes y los más comúnmente encontrados en la flora mexicana, en el sexto grupo se encuentran algunos diterpenos de tipo diferente a los que reportan.<sup>12</sup>

1. Giberelano
2. Labdano
3. Kaurano y ent-kaurano
4. Estachano
5. Clerodano
6. Otros

La clasificación de los diterpenos, atendiendo a las estructuras frecuentemente encontradas en la naturaleza, es la sig<sup>6</sup>:

## I DITERPENOS LINEALES

## II DITERPENOS MACROCÍCLICOS Y SUS PRODUCTOS DE CICLIZACIÓN

### 1.- Diterpenos bicíclicos

- a) serie manool
- b) serie ácido labdanolico
- c) transposición de labdanos

## **2.- Diterpenos tricíclicos**

a) pimarano

b) rearreglo de pimarano

c) abietano y rearreglo de abietanos

## **3.- Diterpenos tetracíclicos**

a) serie filocladeno -kaurano

b) giberelinas

## **4.- grayanotoxinas**

## **5.- trakilobano**

## **6.- atiserano y alcaloides relacionados**

Entre los esqueletos más comunes en diterpenos, están los siguientes (Fig. 6)<sup>12, 61</sup>.

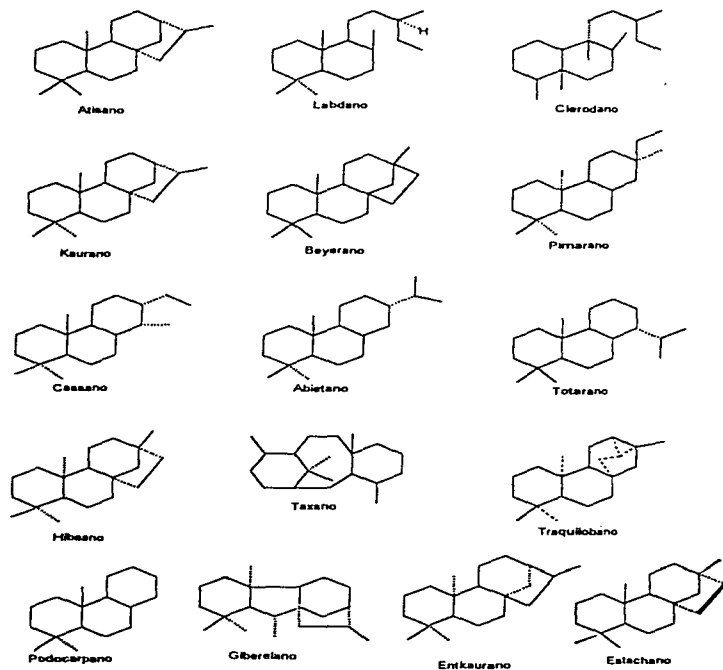


Figura 6



### 3.3.1. DISTRIBUCIÓN NATURAL DE DITERPENOS Y PAPEL BIOLÓGICO

Los diterpenos están distribuidos tanto en el reino vegetal como en el animal (terrestres y marinos), inclusive han sido aislados de fósiles.

En el reino vegetal, se distribuyen en varias familias en la parte aérea de las plantas. Desde las giberelinas, que están relacionadas muy de cerca con los ácidos diterpénicos y que están en las plantas como hormonas de crecimiento, puede esperarse que se distribuyan en más sitios, además de las plantas verdes, como es el caso de resinas de coníferas (*Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Taxodiaceae*, *Cupressaceae* y *Podocarpaceae*). Estas especies son especialmente ricas en diterpenos. Igualmente ricas son algunas resinas de *Angiospermas*, como son: la familia *Cistaceae*, *Leguminosae* y *Burseraceae*. Los diterpenos se distribuyen en la familia *Labiatae* y *Euphorbiaceae*. etc. También, son elaborados por un número de hongos, por ejemplo y *algae*.

En años recientes se ha observado la amplia distribución de diterpenos en animales marinos (coelenterates) del orden *Alcyonacea* (corales blandos, abanicos marinos). Se han descubierto también en esponjas, en ciertas especies de termitas (*Nasutitermes exitisosis*, *trinerutermes graciosus*), las abejas (*Bombus terrestris*) elaboran diterpenos como mensajeros químicos.

En la naturaleza, los diterpenos pueden estar libres y en estados combinados; los diterpenos que no son altamente funcionales están libres (los ácidos invariablemente están libres).

En años recientes se han encontrado más y más evidencias de que materiales biológicos exóticos, flora y fauna marina, tienden a producir metabolitos secundarios de esta naturaleza.

El papel biológico de los diterpenos en los organismos donde se encuentran, es parte de la cuestión general concerniente a los así llamados metabolitos secundarios. La antigua visión de estos compuestos era sólo metabólica y en algunas clases habían sido implicadas en el buen funcionamiento del organismo (particularmente cierto para terpenoides).

Es irreal esperar una única función para una clase de diterpenos, ya que estos un papel presentan estructuras variadas y una distribución restringida. Parece razonable asumir que una gran variedad de metabolitos secundarios es el resultado de varios posibles factores, como es la síntesis al azar por organismos y que llegan a ser provechosos para una cierta función fisiológica o una estrategia alternativa para desconectar o conectar la ruta metabólica. Temporalmente, pueden servir como defensas químicas contra predadores, parásitos, daño mecánico, interacciones ecológicas ( por ejemplo alelopatías), etc.

Sin embargo, nuestro conocimiento puede no estar lejos del verdadero estado de que la vasta mayoría de estos compuestos pueden ser esencialmente producidos por *stress* (evolución referida al continuo *stress* del medio ambiente).

Específicamente, en el área de diterpenos, se ha establecido un claro papel fisiológico para las giberelinas como reguladores endógenos del crecimiento de la planta. **Las giberelinas promueven la elongación celular, inducen partenocarpia e inducen nuevo**

RNA y síntesis protéica. Un número de diterpenos con una variedad de actividad biológica, puede ser esencial para el bienestar de los organismos que lo producen.

Se ha descrito un número de diterpenos con actividad reguladora de las plantas por ejemplo *portulal*, *perrotterianal-A* (inhibe la germinación de la cáscara), *Nagilactona-B* (inhibidor), *momilactona-A* (inhibidor de germinación). Compuestos relacionados muy de cerca con la *nagilactona-B* y la *momilactona-A*, muestran actividad inhibitoria del crecimiento de las plantas. Algunos derivados del Kaureno, como por ejemplo kaurenol, imitan la actividad de la giberelina; el ácido farbitico ha sido implicado en el control del contenido y actividad de giberelinas en plantas. <sup>29</sup>

Un número de diterpenos antibióticos han sido aislados de plantas aéreas, por ejemplo el ferruginol de la resina de *Podocarpus ferrugineus*, *Isoden trichocarpus*, que tienen, respectivamente, actividad antifúngica y antibacteriana; también, varios organismos marinos elaboran compuestos antibióticos, por ejemplo dietiodial de alga verde, cueunicina de una gorgonea, y diisocianoaminofilectona de la esponja, ptilosarcona de la pluma de mar, produce toxinas diterpénicas <sup>30</sup>.

Las siguientes estructuras corresponden a los diterpenos con actividad reguladora de las plantas y a los diterpenos que actúan como antibióticos (Figura 7).

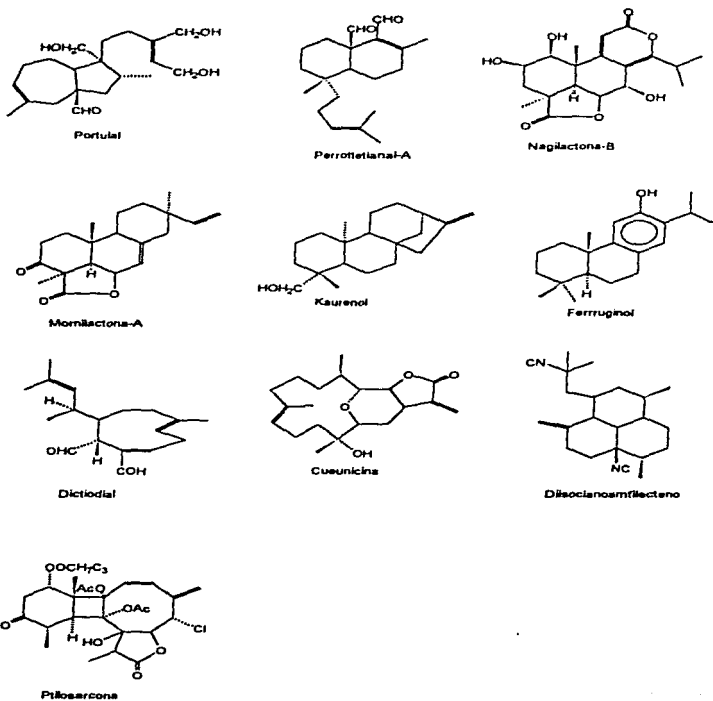


Figura 7

### 3.4. DITERPENOS TETRACÍCLICOS

Son compuestos que presentan cuatro anillos en su estructura base y contienen 20 átomos de Carbono. Se dividen en tres grupos principales que son:

- FILOCLADENO-KAURANO
- GIBERELINAS
- GRAYANOTOXINAS

De éstos, los del grupo filocadeno-kaureno, son los más distribuidos y por lo tanto los más conocidos, de ahí que han servido de apoyo para establecer el parentesco entre las familias, géneros y especies de diversas plantas con actividad biológica<sup>9</sup>.

Muchos compuestos con el esqueleto típico del kaureno fueron aislados cuando se investigaron las plantas infectadas por un hongo llamado Giberella fujikuroi, que tiene la particularidad de que la planta infectada crece más rápido que las normales.

El esqueleto del kaureno es importante entre los diterpenos, pues caracteriza a ciertos compuestos con actividad biológica.

Los Kaurenos poseen un esqueleto carbonado constituido por cuatro unidades terpénicas unidas regularmente, formando tres anillos de seis miembros y uno de cinco. En la Figura 8 se muestra la disposición y la numeración de estos anillos<sup>11</sup>.

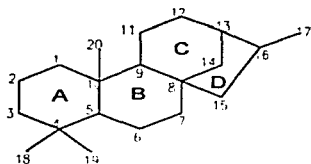
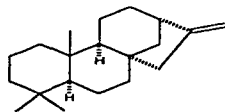
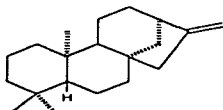


Figura 8

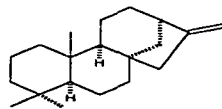
En la naturaleza, se han encontrado dos estructuras que son enantioméricas, el (+)kaureno y el (-) kaureno; cabe hacer notar que el (-) filocladeno es un diastereoisómero del (-) kaureno (Figura 9) cuya diferencia se encuentra en los centros asimétricos de los carbonos 5,9 y 10. <sup>26, 61</sup>



(+) Kaureno



(-) Kaureno



(-) Filocladeno

Figura 9

La Tabla 2 muestra algunos tipos de kaurenos de los cuales se encontró descrita actividad biológica.

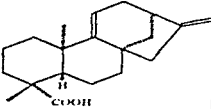
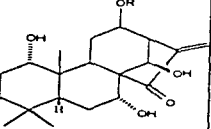
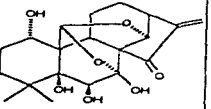
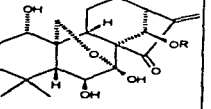
KAURENOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA	
<p>Ácido Grandiflorénico</p> 	Contractibilidad del útero <sup>14</sup>
<p>Excisanina</p>  <p>R = Acetilo</p>	Anticancerígeno <sup>15</sup>
<p>Rubescensina A y B</p> 	Agente antitumoral <sup>16</sup>
<p>Ésteres de oridonina</p>  <p>R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub> n = 2-14</p>	Actividad antitumoral <sup>17</sup>

Tabla 2. Kaurenos con actividad biológica (continuación)

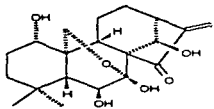
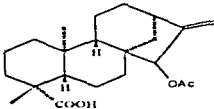
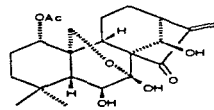
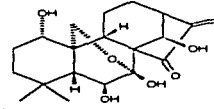
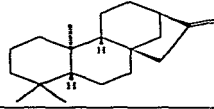
<p style="text-align: center;"><b>Oridonina</b></p> 	<p style="text-align: center;">Actividad antitumoral y antibacteriana<sup>20</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Acido Xylópico</b></p> 	<p style="text-align: center;">Actividad antimicrobiana<sup>21</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Lasiokaurina</b></p> 	<p style="text-align: center;">Agentes antitumorales<sup>20</sup></p>
<p style="text-align: center;">14-Dodecanoato 14-Tetradecanoato 14-Hexadecanoato de Oridonina</p> 	<p style="text-align: center;">Inhibidor de tumores<sup>22</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Norkauranona</b></p> 	<p style="text-align: center;">Inhibidor de tumores<sup>23</sup></p>



Tabla 2. Kaurenos con actividad biológica (continuación)

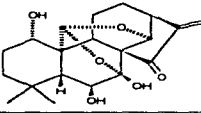
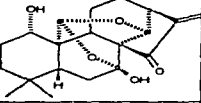
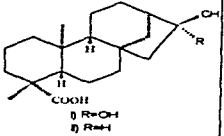
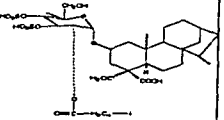
<p style="text-align: center;"><b>Rubescensiva-β</b></p> 	<p style="text-align: center;">Agente antitumoral<sup>24</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Ponicidina</b></p> 	<p style="text-align: center;">Agente antitumoral<sup>25</sup></p>
<p style="text-align: center;">I-Ácido 16,17-Dihidroxi kauranónico II-Ácido 17-Hidroxi- kauranónico</p>  <p style="text-align: center;">         I R=OH          II R=H     </p>	<p style="text-align: center;">Antihipertensivo<sup>18,19</sup> y antiinflamatorio<sup>26</sup></p>
<p style="text-align: center;"><b>Carboxiatractilósido</b></p> 	<p style="text-align: center;">Actividad hipoglucémica<sup>30</sup></p>

Tabla 2

### 3.4.1. RELACIONES BIOGENÉTICAS

Desde el punto de vista biogénético, el hidroxialdehído (1) y el hidroxiaácido (2), representan la forma hidratada de (-)-Kaur-16-en-19-al (3) y ácido(-)-Kaur-16-en-19-oico (4), respectivamente. El aislamiento de Kaureno, Kaurenol, Kaurenal y ácido Kaurenico en la misma planta soporta la teoría que involucra biogénicamente la transformación de Kaureno (5) en ácido Kaurenico y posteriormente en ácido giberélico (Figura 10) <sup>6, 36</sup>

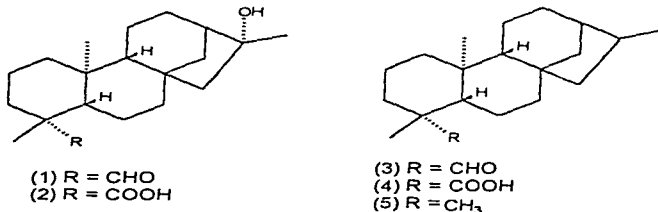


Figura 10

#### GIBERELINAS:

Las giberelinas son ácidos diterpénicos que regulan muchas fases del crecimiento de las plantas, son importantes factores de crecimiento y germinación de las plantas.

Kurosawa descubrió estas sustancias, en 1926, en el hongo *Gibberella fujikuroi*, posteriormente identificado como *Fusarium moniliforme*. De las giberelinas se conocen más de 50 diferentes, éstas se dividen en 2 grupos: aquellas cuyo esqueleto consta de 19 átomos de carbono y las que están formadas por 20 átomos de carbono (Figura 11).

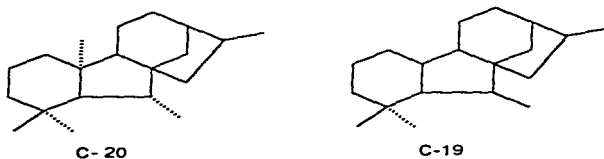


Figura 11

#### LA ACTIVIDAD DE LAS GIBERELINAS SE PUEDE DIVIDIR EN 3 NIVELES:

- a) **Nivel de planta total:** Las giberelinas son sustancias producidas por las plantas y que ayudan a su crecimiento.
- b) **Nivel celular:** El crecimiento entre nudos se logra principalmente por alargamiento de las células, aunque también tienen la propiedad de lograr la división celular.
- c) **Nivel molecular:** Provocan cambios en varios componentes de las células, especialmente en carbohidratos y enzimas.<sup>12</sup>

El ácido giberélico, es una sustancia importante que regula el crecimiento de las plantas, es el producto de alteración de un precursor diterpénico. Experimentos han mostrado que el hongo *Gibberella fujikuroi* es capaz de transformar (-) kaureno en ácido giberélico (Figura 12).

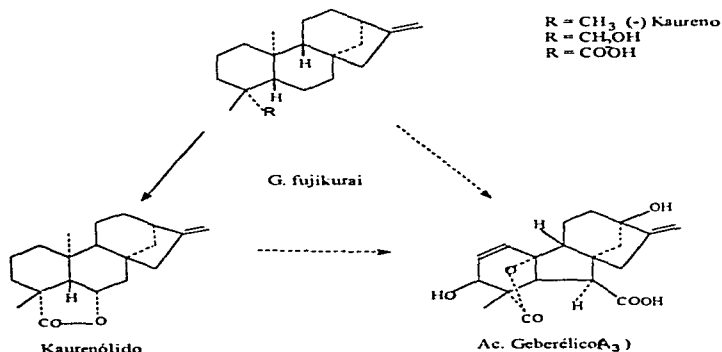


Figura 12

El ácido giberélico (u otro compuesto regulador del crecimiento), está esparcido - tal vez en forma universal- como constituyente de partes aéreas de las plantas y juega un papel como una de las "hormonas" de las plantas, que actúan controlando y regulando el crecimiento y desarrollo de las mismas<sup>6</sup>.

### 3.5. *Lasianthaea aurea*

*Lasianthaea D. C.* es un miembro de la tribu *Helianthaea* subtribu *Verbesinae* de la familia *Asteraceae*. Dentro de la subtribu, *Lasianthaea* es distinguida por una combinación de rayos o rayas opuestas. Miembros de *Lasianthaea* han sido a menudo confundidos con *Verbesina* y *Wedelia*, pero *Lasianthaea* es diferente.<sup>5</sup>

La *Lasianthaea aurea* es una planta herbácea perenne, erecta o ascendente, hasta de 40 (60) cm. de alto a partir de una base tuberosa; tallos estrigosos, hojas opuestas, las superiores alternas, ovaladas o elípticas, de 1-7 cm. de largo, de 0.3 a 3 cm. de ancho, agudas a obtusas en el ápice, aserradas a denticuladas en el margen, estrigoso-hirsutas en ambas caras; cabezuelas solitarias o agrupadas por pocas en el extremo del tallo, flores liguladas 6-11 (15)mm.

Se localiza desde Tepotzotlán y Joltzingo a Ecatepec y Villa A. Obregón Alt. 2350-2650 m. San Luis Potosí a Jalisco, Michoacán y México D. F., en pastizales, matorrales Xerófilos y claros en medio del encinar.<sup>27</sup>

La Tabla 3 muestra las especies en las cuales se divide el género *Lasianthaea*<sup>2</sup>

ESPECIES DE <i>Lasianthaea</i>	
<i>Lasianthaea</i>	VARIEDAD
<i>fruticosa</i>	<i>fruticosa</i> <i>michoacana</i> <i>fasciculata</i> <i>alamosana</i> <i>aggregata</i>
<i>macrocephala</i>	
<i>helianthoides</i>	<i>helianthoides</i> <i>nayaritense</i>
<i>crocea</i>	
<i>squarrosa</i>	
<i>ceanothifolia</i>	<i>ceanothifolia</i> <i>gracilis</i>
<i>seemannii</i>	<i>zinnioides</i>
<i>palmeri</i>	
<i>podocephala</i>	
<i>aurea</i>	

Tabla 3

Del género *Lasianthaea* se encontró descrito el estudio químico de *Lasianthaea fruticosa* (parte aérea) Figura 13, de la cual fueron aislados los siguientes compuestos <sup>26</sup>.

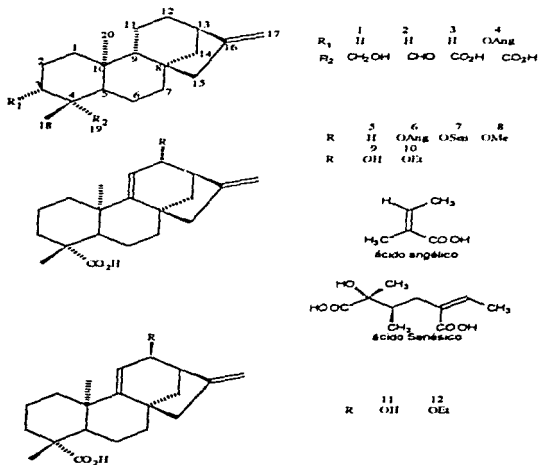


Figura 13

Para *Lasianthaea podocefala* se encontró descrito su uso como planta medicinal.

De la raíz de *Lasianthaea podocefala* se obtiene un té (infusión caliente), el cual al tomarse sirve para el tratamiento gastrointestinal, indigestión, dolor estomacal, gases, úlcera, e inclusive para el tratamiento del cáncer <sup>29</sup>.

### 3.6. ÁCIDO KAURENOICO Y ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO

El ácido Kaurenoico y el ácido Grandiflorénico (ver pag. 44) han sido aislados previamente de otros especímenes. La Tabla 4 muestra una pequeña revisión de plantas en las que han sido aislados estos metabolitos.

ÁCIDO KAURENOICO	ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO
<i>L. fruticosa (parte aérea)</i> <sup>28</sup>	<i>L. fruticosa (parte aérea)</i> <sup>28</sup>
<i>Espeletia grandiflora (resina)</i> <sup>36</sup>	<i>Espeletia grandiflora (resina)</i> <sup>36</sup>
<i>Mikania monagasensis</i> <sup>37</sup>	<i>Espeletia schultzei</i> <sup>35 43 46</sup>
<i>Mikania mongenansis</i> <sup>37</sup>	<i>Wedelia hispida (parte aérea y raíz)</i> <sup>42</sup>
<i>Tetrachyron orizabaensis</i> <sup>44</sup>	<i>Montanoa tomentosa</i> <sup>12</sup>
<i>Phebalium rude</i> <sup>25</sup>	<i>Viguiera insignis</i> <sup>12</sup>
<i>Ricinocarpus stylosus</i> <sup>41</sup>	<i>Wedelia calycina</i> <sup>44</sup>
<i>Heliantus occidentalis</i> <sup>44</sup>	
<i>Heliantus debilis</i> <sup>44</sup>	
<i>Heliantus annuus</i> <sup>44</sup>	
<i>Heliantus ciliaris</i> <sup>44</sup>	
<i>Heliantus niveus</i> <sup>28</sup>	
<i>Montanoa tomentosa</i> <sup>12</sup>	
<i>Viguiera insignis</i> <sup>12</sup>	
<i>Wedelia calycina</i> <sup>44</sup>	
<i>Xilopia aethiopica</i> <sup>15</sup>	
<i>Mikania obtusata</i> <sup>38 (P. aérea)</sup>	
<i>Wedelia hispida</i> <sup>42</sup>	

Tabla 4

Datos de actividad biológica para el ácido kaurenoico

Se observó actividad inhibitoria en el crecimiento de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*<sup>37</sup>, se demostró también que es activo en algunas pruebas



biológicas para giberelinas, Ellinger *et al* reportaron actividad inhibitoria del crecimiento larvario de la polilla del girasol (*Homosoma electellum*)<sup>44</sup>. Recientemente, se ha encontrado una potente actividad sobre (*Trypanosoma cruzi*). El diterpeno ácido ent-Kaur-16-en-19-oico fue identificado como el componente trypanocida del extracto etanólico de *Mikania obtusata*, D.C. (Asteraceae), sobre el trypomastigote sanguíneo de *trypanozoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas. (*Trypanosomiasis americana*)<sup>30</sup>

EXPERIMENTAL

PART I



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIAL Y APARATOS UTILIZADOS

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Mel-Temp II y no están corregidos.

Las cromatografías en columna se realizaron con sílica gel 60: mallas 70-230 y 230-400 ASTM.

Las cromatografías en capa fina se realizaron en cromatofolios Alugram sil G/UV 254 y fueron reveladas con una solución de  $\text{CeSO}_4$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.2N al 1%.

El espectro de Infrarrojo fue obtenido en un aparato Nicolet SSX.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en un equipo Varian Gemini y VXR, respectivamente.

El espectro de masas fue obtenido en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985B GC/MS System con la técnica de impacto electrónico.

Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están reportados en ppm (utilizando TMS como referencia) Los patrones de acoplamiento son: s=señal simple, d=señal doble, t=señal triple, c= señal cuarteto.

## DIAGRAMA EXPERIMENTAL

### RECOLECCIÓN

Sierra Tarahumara  
(Chihuahua)  
Agosto 1992

### IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN

Instituto de Biología  
Biólogo Francisco Ramos  
(UNAM)

### SECADO Y MACERADO

(Raíz)

### AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Cromatografía en columna, capa fina y  
preparativa

### IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

IR, EMIE, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C.

### PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Método Kirby-Bauer.

#### 4.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

El espécimen estudiado corresponde a *Lasianthaea aurea* (*Compositae*). Fue recolectado en el Km. 40 de la carretera Creel-Basihuare en la Sierra Tarahumara, Chihuahua, México en agosto de 1992. Su clasificación se realizó en el Instituto de Biología (UNAM) por el Biólogo Francisco Ramos.

El ejemplar estudiado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a realizar pruebas de extracción para elegir el disolvente adecuado. Estas pruebas se realizaron tanto a la parte aérea, como a la raíz, ambas por separado. Los disolventes utilizados fueron n-hexano, acetato de etilo y etanol. De dichas pruebas se observó una mayor extracción con acetato de etilo para la raíz .

Se colocaron 130.3 g. de raíz en un matraz redondo al cual se le agregó acetato de etilo al 100 % para realizar la extracción. (se dejó reposar durante tres días a temperatura ambiente). Posteriormente se filtró para separar el extracto del macerado, el filtrado fue concentrado en un rotavapor a presión reducida, obteniéndose un extracto semisólido de color café ámbar (aproximadamente 8g.).

El extracto obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria, el sistema utilizado como fase móvil fue Hexano-Acetato de etilo (80:20). De esta cromatografía se obtuvo

principalmente un compuesto oleoso de color amarillo, y otras fracciones oleosas de color ámbar .

Posteriormente, se realizó otra cromatografía en columna, usando el sistema n-hexano-acetato de etilo (80-20), como fase móvil. De ésta se obtuvieron diferentes fracciones semisólidas cuya coloración abarcaba del amarillo al ámbar.

A la fracción II de la segunda columna (aproximadamente 1g.) se le realizó una cromatografía preparativa obteniéndose aparentemente un solo compuesto, el cual se caracterizó estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas. (se le realizó IR, RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN y E. Masas.).

IR(cm<sup>-1</sup>): (Espectro 1) 3600-3200cm<sup>-1</sup>, 1691.54cm<sup>-1</sup>, 1656.74cm<sup>-1</sup>, 1577.43cm<sup>-1</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, ppm): (Espectro 3) 5.243 ppm (t), 4.916 ppm (d), 4.798 (d), 1.4 ppm, 2.8 ppm señal múltiple, 1.242 (s), 1.026 (s), 0.948 (s).

Compuesto I RMN <sup>13</sup>C ( 75 Mhz) C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O dada en ppm (δ) (Espectros 6 y 7): 41.23, 20.10, 38.21, 44.18, 57.00, 21.76, 40.67, 44.18, 55.07, 38.77, 18.41, 33.08, 43.80, 39.66, 48.92, 155.8, 102.95, 28.92, 184.3, 15.54.

Compuesto II RMN <sup>13</sup>C (75 Mhz) Acetona dada en ppm (Espectros 6 y 7): 41.23, 19.05, 37.84, 43.80, 46.50, 20.10, 29.63, 42.24, 155.88, 38.77, 114.86, 37.75, 41.23, 44.89, 50.27, 158.56, 105.44, 28.22, 183.00, 23.57.

EMIE (70eV) (espectro 8): m/z(% ab. rel.) 302 (49), 285 (98), 300(41).

A los cristales mezclados con el compuesto oleoso se les realizó una cromatografía en columna utilizando un sistema n-hexano-acetona como fase móvil y sílica gel malla 230-400 como fase estacionaria.

De esta cromatografía se obtuvieron cristales amarillos y fracciones oleosas. Los cristales fueron lavados con acetona obteniéndose cristales blancos (hojuelas con tonos brillantes). Se tomó una muestra de estos cristales y se obtuvo su espectro de IR, siendo este igual al anterior (espectro 1).

Mediante ccf se observó que los cristales revelaban dos compuestos con un Rf muy cercano, los cuales no podían ser separados por métodos cromatográficos comunes.

Dado que por IR se detectó la presencia de un grupo ácido carboxílico, se decidió realizar una reacción de metilación con diazometano.

**Reacción de metilación:** mezclar 150ml de éter y 45ml de KOH(40%) con 15g. de nitrosometilurea en un embudo de separación, posteriormente separar la solución etérea (amarilla), agregar dicha solución a la muestra, dejar evaporar, el producto seco disolverlo con acetato de etilo después lavar con solución saturada de NaCl, secar con NaSO<sub>4</sub> anhidro y por último filtrar <sup>32</sup>.

Al realizar una ccf al producto metilado se observaron nuevamente los dos compuestos con un Rf muy cercano por lo que la metilación no logró

separarlos. El producto metilado no pudo ser recristalizado por lo que se le realizó la RMN  $^1\text{H}$  en forma oleosa.

La fracción 5 fue la más abundante en cuanto a cristales, por lo que a éstos se les realizó RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^1\text{H}$ , E.Masas.

Posteriormente, se procedió a la dilucidación de la estructura de los compuestos, utilizando los datos espectroscópicos obtenidos.

## 4.2. ESTUDIO BIOLÓGICO

Se probó la actividad antimicrobiana de la mezcla de compuestos aislados de la raíz de *Lasianthaea aurea*, para ello se utilizó la técnica de placa o Kirby-Bauer. Esta prueba se basa en la difusión del posible antibiótico contenido en un disco de papel filtro, se utilizó para la prueba agar Müeller-Hinton, las placas se prepararon en 2 etapas, la capa base consta de 20ml. de agar Müeller-Hinton, cada caja se dejó solidificar sobre una superficie lisa y nivelada. La segunda capa fue distribuida uniformemente en la superficie de la primera capa base. Se adicionaron nuevamente 5ml. de agar Müeller Hinton, el cual fue inoculado previamente con el microorganismo prueba; una vez solidificado, se colocaron los **sensidiscos** presionándolos ligeramente contra el agar, todas las placas se



hicieron por triplicado, se incubaron a 37°C por 24h. Transcurrida la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición.

Se prepararon los discos de papel filtro con soluciones de los posibles antimicrobianos, además de un control negativo con disolventes y un control positivo, se utilizó glicerol como co-solvente. (Todas las pruebas se corrieron contra blanco de glicerol).

Los microorganismos utilizados para la realización de las pruebas fueron los siguientes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis*, *Actinobacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tphi*, *Pasteurella multocida tipo A y D*, *Haemophyllus parasus* y *Bordetella brunchiseptica*.

D I S C U S S I O N

V

R E S U L T A D O S



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La necesidad de contar con nuevos productos que nos permitan tener alternativas terapéuticas (no sólo de compuestos provenientes de síntesis, sino también obtenidos de la naturaleza), nos lleva al descubrimiento de moléculas nuevas, de las cuales se busca tengan aplicación terapéutica, así mismo conocer el contenido de metabolitos secundarios en plantas empleadas con algún fin curativo en diferentes regiones de nuestro país y del mundo.

### 5.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

Del extracto obtenido de la raíz de *Lasianthaea aurea* con Acetato de etilo se obtuvieron cristales blancos (60mg.), con fórmula molecular calculada  $C_{20}H_{30}O_2$  y punto de fusión 177-180 °C (reportado 178-180°C) y  $C_{20}H_{28}O_2$  con punto de fusión 150-155°C (reportado 158-160°C).

Contando con el auxilio de las técnicas espectroscópicas anteriores, se determinó que :

Los metabolitos secundarios aislados de la raíz de *Lasianthaea aurea*, son dos DITERPENOS TETRACÍCLICOS DE TIPO KAURANO. Conocidos como: ácido kaur-16-en-19-olco (ácido kauranoico), ácido 9(11),-16-kauradienoico (ácido grandiflorénico) Figura 14.

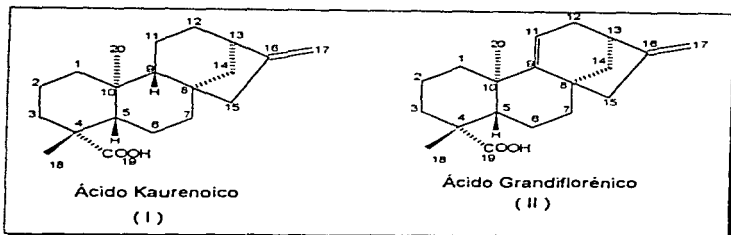


Figura 14

En IR ( espectro 1 ) se observa una ancha e intensa que se extiende desde 3600  $\text{cm}^{-1}$  hasta aproximadamente 3200  $\text{cm}^{-1}$  , característica de un enlace OH de ácido carboxílico. En 1691.54 y 1656.74  $\text{cm}^{-1}$  se observan dos bandas que se atribuyen a la presencia de dos grupos carbonilo.

En RMN  $^1\text{H}$  (espectro 3) se observa una señal triple centrada en 5.24 ppm asignada al hidrógeno vinílico en posición 11 del ácido grandiflorónico acoplada a los hidrógenos de C-12, dos señales dobles centradas en 4.91 ppm y en 4.79 ppm, asignadas a los hidrógenos del C-17 de los ácidos aislados. Además se observan tres señales simples desplazadas en 1.24, 1.03, 0.958 ppm, el primer singulete presenta dos veces la intensidad de las dos últimas, esto sugiere que esta señal debe corresponder a los hidrógenos del carbono 18, de las otras dos señales la que aparece a campos bajos se propone que sea la de los hidrógenos del metilo unido al C-10 del ácido grandiflorónico y la de campo alto al del metilo en carbono 10 del ácido kaurenoico. Esta asignación se hace debido al efecto de desprotección que se manifiesta por parte de la insaturación

C=C entre carbono 9 y carbono 11 sobre este metilo, se observan señales multiples que van desde 1.4 hasta 2.8 ppm asignadas a los hidrógenos del esqueleto del Kaureno.

En  $^{13}\text{C}$  (espectros 6 y 7) se correlacionaron los datos obtenidos experimentalmente en este trabajo con los reportados tanto para el ácido Kaurenoico como para el ácido Grandiflorénico<sup>33, 34, 35</sup>, observándose una gran semejanza en los desplazamientos (tabla 5).

ÁCIDO KAURENOICO			ÁCIDO GRANDIFLORENICO	
Carbono	Valor Reportado	Valor Obtenido	Valores Obtenidos	Valores Reportados
1	41.10	41.23	40.75	41.23
2	19.80	20.10	20.13	19.05
3	38.6	38.21	38.21	37.84
4	43.80	44.18	44.74	43.80
5	57.1	57.00	46.61	46.50
6	22.50	21.79	18.44	20.10
7	41.5	40.67	29.61	29.63
8	44.4	44.18	42.26	42.24
9	55.2	55.07	155.93	155.88
10	39.9	38.77	38.80	38.77
11	18.6	18.41	114.89	114.86
12	33.3	33.08	37.91	37.75
13	44.2	43.80	41.23	41.23
14	39.9	39.66	44.94	44.89
15	49.2	48.92	50.29	50.27
16	155.7	155.8	158.49	158.56
17	103.5	102.95	105.49	105.44
18	29.3	28.92	28.23	28.22
19	179.9	184.3	184.72	183.00
20	16.00	15.54	23.57	23.57

Tabla 5

Por EMIE (espectro 8) se observa un fragmento con  $m/z$  de 302 que corresponde al ion molecular y peso molecular de una de las estructuras propuestas (ácidos Kaurenico) y un fragmento en  $m/z$  de 285 correspondiente al pico base. El pico con  $m/z$  de 300 corresponde al ion molecular y peso molecular de la segunda estructura propuesta (ácido Grandiflorénico).

En la Tabla 6 se muestran los principales fragmentos de las estructuras de los compuestos aislados.

ÁCIDO KAURENICO		ÁCIDO GRANDIFLORÉNICO	
$m/z$	(%) abundancia relativa	$m/z$	(%) abundancia relativa
302 M <sup>+</sup>	49	300 M <sup>+</sup>	41
287 (M-CH <sub>3</sub> )	34	285 (M-CH <sub>3</sub> )	98*
259 (M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	47	257 (M-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )	18
257 (M-CHO <sub>2</sub> )	18	255 (M-CHO <sub>2</sub> )	17
256 (M-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	13	254 (M-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3
243 (M-C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> )	25	241-(M-C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> )	27
		239 (M-15-49)	43

Tabla 6

La identificación de los metabolitos secundarios aislados tuvo un grado de dificultad mayor que una identificación común, ya que en este caso los metabolitos se encontraban mezclados, por consiguiente, observando sus estructuras se puede ver que

se trata de compuestos muy similares (casi idénticos), la única diferencia estructural entre ambos es la doble ligadura existente entre el C-9 y el C-10. Estos compuestos no pudieron ser separados por métodos cromatográficos comunes, ni por reacciones químicas (metilación).

## 5.2. ESTUDIO BIOLÓGICO.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos durante la prueba de actividad biológica realizada a los metabolitos secundarios aislados de la raíz de *Lasianthaea aurea* Ácido Kaurenico y Ácido Grandiflorénico.

MICROORGANISMOS	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
<i>Actinobacillus</i>	-----
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	8
<i>Escherichia coli</i>	19
<i>Haemophilus parasuis</i>	-----
<i>Pasteurella multocida "D"</i>	9
<i>Salmonella tify</i>	-----
<i>Staphylococcus aureus</i>	12
<i>Streptococcus fecalis</i>	-----

Tabla 4

Con respecto al estudio de actividad biológica los resultados que en este estudio se obtuvieron, son nuevos ya que no se encontraron anteriormente reportados en la literatura. Se encontró que de los microorganismos utilizados para dicha prueba (Tabla 6), solamente algunos de ellos presentaron susceptibilidad a la acción de los metabolitos secundarios con los que fueron enfrentados.

La susceptibilidad mostrada por los microorganismos se presentó en forma diferente: mientras que *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* tipo "D" fueron resistentes, el *Staphilococcus aureus* fue medianamente sensible, mientras que *Escherichia coli* fue la más sensible. estos resultados se obtuvieron basándose en los halos de inhibición presentados por cada microorganismo.



*EONELLUS JONES*

*E*

## CONCLUSIONES

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Se lograron aislar los metabolitos secundarios más abundantes de la raíz de *Lasianthaea aurea*.

Se logró determinar mediante técnicas espectroscópicas la estructura de dos metabolitos secundarios aislados. (Ácido Kaurenoico y Ácido Grandiflorénico).

Se aportó al acervo químico de la flora nacional, una investigación fitoquímica para este espécimen ya que no se ha reportado estudio químico alguno

Se contribuyó al estudio biológico de este espécimen, en lo que se refiere a la actividad microbiológica mostrada por los metabolitos secundarios aislados.

Aunque el objetivo del trabajo no fue el de estudiar el comportamiento de extracto obtenido a nivel bioquímico, sin embargo con los datos obtenidos, sería de gran importancia continuar la investigación a este nivel y poder ubicar al compuesto (I) como un " antibiótico".

*R  
E  
F  
E  
R  
E  
N  
C  
E  
S*



## REFERENCIAS

1. Trease G.E., Evans W.C. "Farmacognosia". 1ª Ed. CIA-Editorial Continental, México, D.F., (1984). Pp.3-5.
2. Helman J. "Farmacotecnia Teórica y Práctica". Tomo 1. CIA Editorial Continental, México, D.F., 1982. Pp 35-37.
3. Domínguez X.A. "Métodos de Investigación Fitoquímica". Edit. Limusa, México D.F., (1988). Pp 15-17, 45-57, 61.
4. Memorias del XXII Simposium Internacional de Química de Productos Naturales. "La Investigación Fitoquímica y el Bienestar Humano". *Rev. Lat. de Química*. (1996). Vol. 24:2. Mayo 6-7.
5. Kenneth M. Becker. "A Monograph of the Genus *Lasiantha* (Asteraceae)" *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 31 (2). Pp. 1-64.
6. Geissman T.A., Crout D. "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism". Freeman, Cooper & Company. (1979). Pp 306,307.
7. Sukh Dev, Renuka Misra, CRC "Handbook of Terpenoids Vol II". CRC press, INC. (1986). Pp 140,141.
8. Wingrove A., Caret R., "Química Orgánica". HARLA. México D.F., 1984. Pp 399-401.
9. Harold J. N. "Biogenesis of Natural Compounds". Bernfeld. 1963. 641.
10. Torres M. "Contribución Fitoquímica de la raíz de *Salvia reptans jacq.* Estudio Microbiológico de sus Metabolitos Secundarios". Tesis de Licenciatura. FES-C, UNAM. **1995.**

11. Hanson J.R. "The Tetracyclic Diterpenes". 1<sup>st</sup> Edition. Wheaton & Co. (1968). Pp. 1-7, 114-121.
12. Romo de Vivar A. "Productos Naturales de la Flora Mexicana". 1<sup>a</sup>. Edición. Edit. LIMUSA. México D.F., (1985). Pp. 26-31, 139-149.
13. Pineda M. "Estudio Fitoquímico de la *Veronia mexicana*". Tesis de Licenciatura. FES-C. UNAM. 1995.
14. Lozoya X., Enriquez R.G. "Contraception". (1983). 27, 267.
15. Ming G., Yong Fa M., Zhong-Xing Z., An-Min M., Hong-Guang L., "Study on the Killing Effect of Rubescensin A and B on Human Liver Cancer Cell Line BEL-7402". *Yao hsehtung pao* 1981. 16(5), 6-9. Chem. Abstrs. 96. 15029x. (1982).
16. Fujita E., Nagao Y., Kohno T., Matsuda M., Ozaki M., "Antitumor Activity of Acylated Oridonin". *Chem. Pharm. Bull.* 1981. 29 (11), 3208-3213.
17. Jae-Hoon K., Jae-Chun Y., Il-Moo C., Jong-Heun L., Joong-Soo K. "Antihypertensive Activities of Diterpenoid (16,17-dihydroxy-16 $\beta$ -(-)-kaurane-19-oic acid) from *Siegesbeckia pubescens* Against Okamoto Spontaneously Hypertensive rats". *Soul Taehakkyo Saengyak yonguso Opjukjip*. 1980. 19. 73-7. Chem. Abstrs. 95. 161939q (1981).
18. Koo Dong H., Jae Hoon K., Sea Jong O., "Chemistry and Pharmacology of Diterpenoids of *Siegesbeckia pubescens*". Terpenoids, *Proc. Symp* . 1974. 17-31. Chem. Abstrs. 84. 130259m.(1976)).
19. Fujita E., Nagao Y., Kaneko K., Nakazawa S., Kuroda H. "The Antitumor and Antibacterial Activity of *Isodon japonicus* Diterpenoids". *Chem. Pharm. Bull.* 1976. 24 (9). 2118-2127.
20. Boakye-Yladosm K., Fiagbe N.I., Agim J., "Antimicrobial Properties of some West African Medicinal Plants. IV. Antimicrobial Activity of Xilopic Acid and Ather Constituents of the Fruits of

- Xilopia aethiopica* (Annonaceae)". *Lloydia*. 1977. 40(6). 543-5. Chem. Abstrs. 89. 110432s. (1978)).
21. Fujita E. "Tumor Inhibitory *Rabdosia* Diterpenes". *Proc. Asian Symp. Med. Plants Spices 4<sup>th</sup>* 1980. 1. 245-9. Chem. abstrs.. 95. 204196q (1981)).
  22. Chang-Tan-Lin, K'o Hueh Tung Pao. 1980. 25 (22), 1051-4.
  23. Han-Dong S., Zhong-Wen L., Chon-Qiu Q., Jin-Hua C., Quig-Zhi Z. "Studies on the Chemical Constituents of Antitumor Plant *Rabdosia rubescens* (Hemsl) Hara." *Yun-nan Chih Wu Yen Chiu*. 1981. 3(1), 95-100. Chem. Abstrs. 95. 121032g (1981).
  24. Han Koo Dong. Haksurwon Nonmunjip Cha'yon Kwahak P'yon. 1973. 12. 171-83.
  25. Tokkyo Koho K. "New Anti-tumor Phyllostachin". *Taiho Pharmaceutical Co* 1983. 52. 237 Chem. Abstrs. 99. 85395z. (1983).
  26. Hanson J.R. "Terpenoids and Steroids" Vol 1. Cap 3. 141 *specialist Periodical reports*. The Chemical Society. (1971).
  27. Rzedowsky. "Flora Fanerogama del Valle de México". 1ª Edición IPN. Vol.II. (1985).
  28. Ahmed M., Jakupovic J., Castro V., "Kaurene Derivatives from *Lasianthea fruticosa*. Revision of Stereochemistry of Related Compounds". *phytochemistry*. (1991). 30 5. 1712-1714.
  29. Bye R. "Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants". *Economic Botany*. (1986). 40.1. Pp. 103-124. By The New York Botanical Garden.
  30. Sukh Dev Ranukamira "Diterpenoids Vol. IV". CRC Handbook of Terpenoids. Sukh Dev Editor. (1986). Pp 13-19, 20-41.
  31. Serebryakov E.P., Simolina A.V., Kucherov V.F. "New Metabolites OF *Fusarium moniliforme* Shield". *Tetrahedron*. (1970). 26. 5215-5223.

32. "Organic Syntheses Collected. Vol.II. Pp 165-167.
33. Yamasaki K., Kohda H., Kobayashi T., Kasai R., Tanaka O. "Structures of Stevia Diterpene-Glucosides: Application of  $^{13}\text{C}$  NMR." *Tetrahedron Letters*. (1976). No. 13. 1005-1008.
34. Enriquez R., Escobar L., Lozoya X., "Total Assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Spectra of Kauradien-19(11),16-oic acid With the Aid of Heteronuclear Correlated 2D Spectra Optimized for Geminal and Vicinal  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  Coupling Constants: or What to do When "Inadequate" is Impossible". *Can. J. Chem.* (1984). 62. 2421-2425.
35. Piozzi F. Passannanti S., Marino M., Sprio V., "Structure of Grandiflorenic Acid". *Can. J. Chem.* (1972). 50. 109-112.
36. Piozzi F., Passannanti S., Paternostro M. "Kauranoid Diterpenes in *Espeletia grandiflora*". *Phytochemistry*. (1971). 10. 1164-1166.
37. Mathur S.B., Garcia P., Marcano C., Mora-Arellano V. "Terpenoids of *Mikania Monagasensis* and Their Biological Activities". *Rev. Lat. de Química*. (1975). 6. 206-205.
38. Alves, T. MA, Chaves, P.P.G. Santos L., Nagem T., Murta S. Ceravolo I. Romanha A. Zani C. "A Diterpene from *Mikania obtusata* Active on *Trypanosoma cruzi*". *Planta Médica*. (1995). 61. 85-86.
39. Hasan C., Healey T., Waterman P. "Kolavane and Kaurane Diterpenes from the Stem Bark of *Xilopia aethiopica*". *Phytochemistry*. 1982. 21(6). 1365-1368.
40. Bohlman F., Ngo, Le Van. "Neven Kaurensaure-derivative aus *Wedelia*-Arten". *Phytochemistry*. 1977. 16. 576-851.
41. Henrick C.A., Jefferies P.R. "The Chemistry of the *Euphorbiaceae* (The Diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* diels)". *Aust. J. Chem.* 1964. 17. 915-933.

42. Herz W., Kulanthaivel P. "Ent-kauranes and 10 $\alpha$ -methyl-eudesman-8 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -olides from *Wedelia calycina* and *Wedelia hispida*". *Phytochemistry*. (1984). 23, 2271-2275
43. Brieskorn C., Pöhlmann E. "Diterpene Vom Kaurantyp aus der Composite *Espeletia schultii* (Wedd)". *Tetrahedron Letters*. (1968). No. 54. 5661-5664.
44. Ohno N., Mabry T., Zabet V., Watson W. "Tetrachyrin, a New Rearranged Kaurenoid Lactone, and Diterpene acids from *Tetrachyron Orizabaensis* and *Helianthus debilis*". *Phytochemistry*. (1979). 18, 1687-1789.
45. Cannon J., Chow P., Jefferies P., Meehan G., "Isolation of (-)-Kaur-16-en-19-oic acid and 15 $\beta$ -Hydroxy-(-)-Kaur-16-en-19-oic acid from *Phebalium rude* Bartl". *Aust. J. Chem.* (1966). 19, 861-7.
46. Heinz C., Pöhlmann E. "Kauradien-(9(11),16)-Säure-(19) und 15 $\alpha$ -Acetoxy-Kauren-(16)-säure-(19)". *Chem. Ber.* (1969). 102, 2621-2628.
47. Mathur S.B., Cenis M., "Terpenes of *Mikania mongenensis*". *Phytochemistry*. (1973). 12, 226-227.
48. Ohno N., Mabry T. "Sesquiterpene Lactones and Diterpene Carboxylic acids in *Helianthus niveus* Subspecies *Canescens*". *Phytochemistry*. (1980). 19, 609-614.
49. Zechmeister L., "The Use of <sup>13</sup>C NRM Spectroscopy in Natural Products Chemistry", *Progress in the Chemistry of Organic natural products Der Chemic Organischer Natur Stoffe*. (1979). 36, 55-81.
50. Sukh Dev Ranukamitra. "Terpenoids and Steroids" Vol. II. CRC Handbook of Terpenoids. (1986). Pp 140-149.

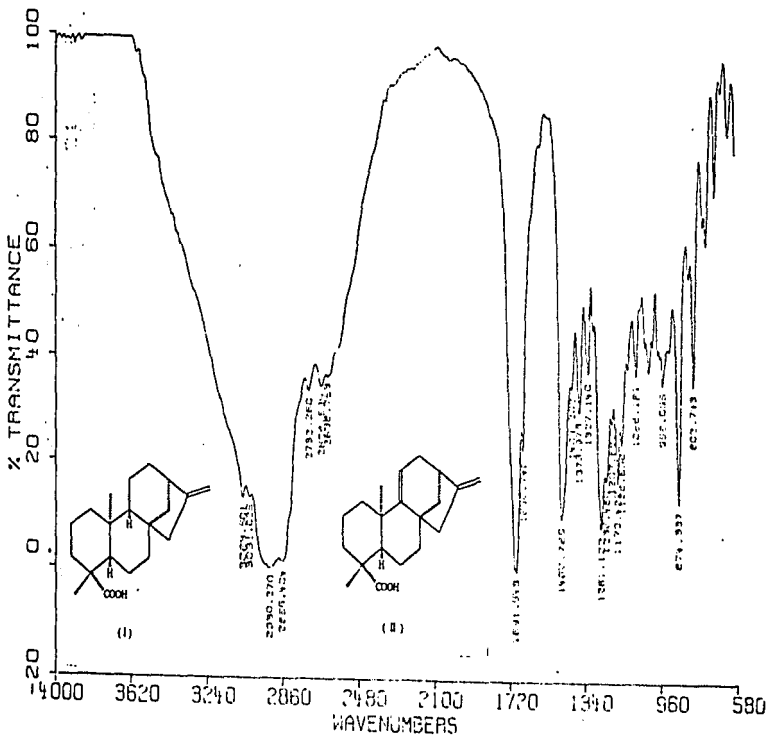


51. Beale M.H. "The Biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> Terpenoid Compounds", *Natural Product Reports. A Journal of Current Developments in Bio-Organic Chemistry*. (1990) 7. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.
52. Silverstein R.M., Clayton G. Morrill T.C." *Spectrometric Identification of Organic Compounds*". Fifth Edition. John Wiley & Sons. INC Singapore. (1991). Pp 267,-285.
53. Hawker et al. "Elementos de Microbiologia General". Introducción a la biología de los microorganismos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza. Pp 49,50.
54. Raymond, E.K. and Donald F.O. "Enciclopedia de Tecnología Química". 15. 129. UTEHA. (1965).
55. Newman A.A. "Chemistry of Terpens and Terpenoids" Academic. Press. NY.(1972). 194.
56. Taiho pharmaceutical Co. LTD Jpn Koka, Tokyo Koho Jp 1981. 57. 167-938.
57. Kim Jae-Hoon, Soul Tachakkyo Yonguso. Opjukjip. 1980. 19. 73-77.
58. Bombardelli Ezio. *Inverni Della Beffa S. P. A.* 1971. 12. 457-71.
59. "The Merck Index". 12<sup>th</sup> Edition. Merck & Co. INC 1996 Pp 109,1452.
60. *Natural Product Reports. A Journal of Current Developments in Bio-organic Chemistry* Vol. 7. 1990. Pp25-39.
61. Nakarishi R., Goto T., Tôs; Natur S., Nozoes S. "Natural Products Chemistry ". Vol. 1. Academic Press INC. (1974). Pp 186-188.

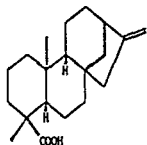
APPENDICE



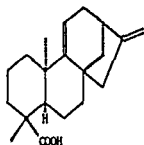
DR. ALVAREZ CUT PELICULA 4/30/54 RPM



ESPECTRO 1

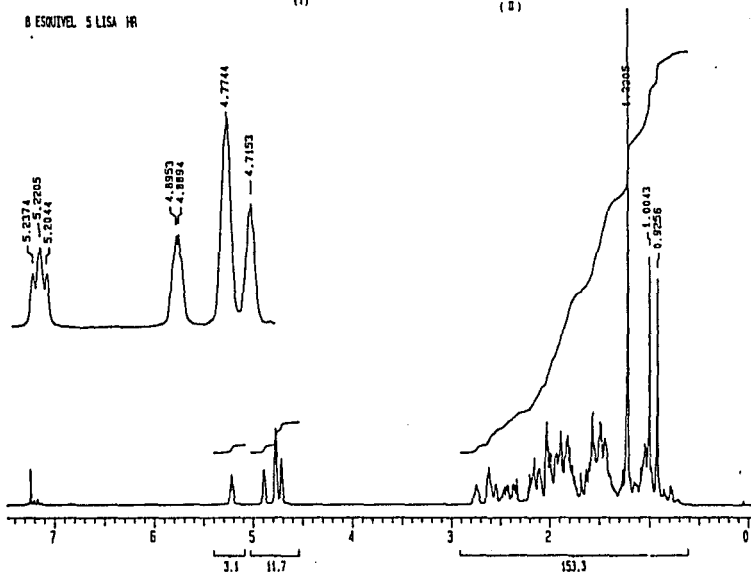


(I)



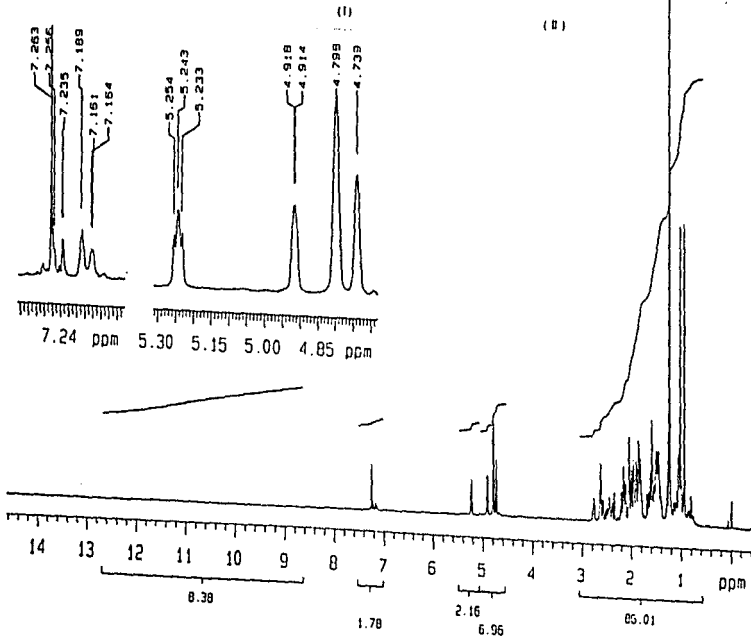
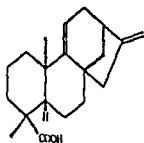
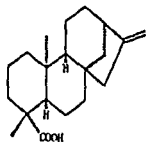
(II)

B ESCUTVEL S LISA PR



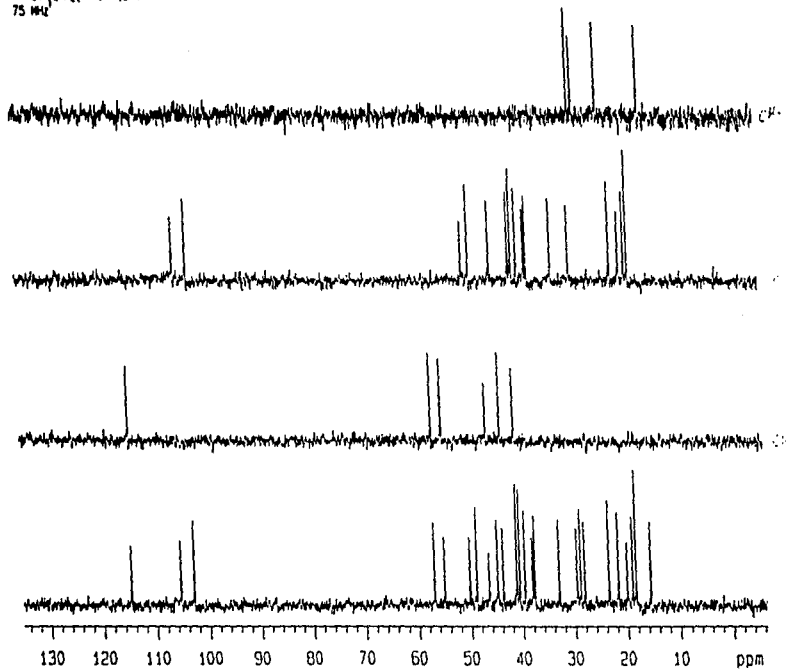
ESPECTRO 2

U.M.A.M. Instituto de Quimica ICH  
B. Esquivel 5-LISA  
300 MHz



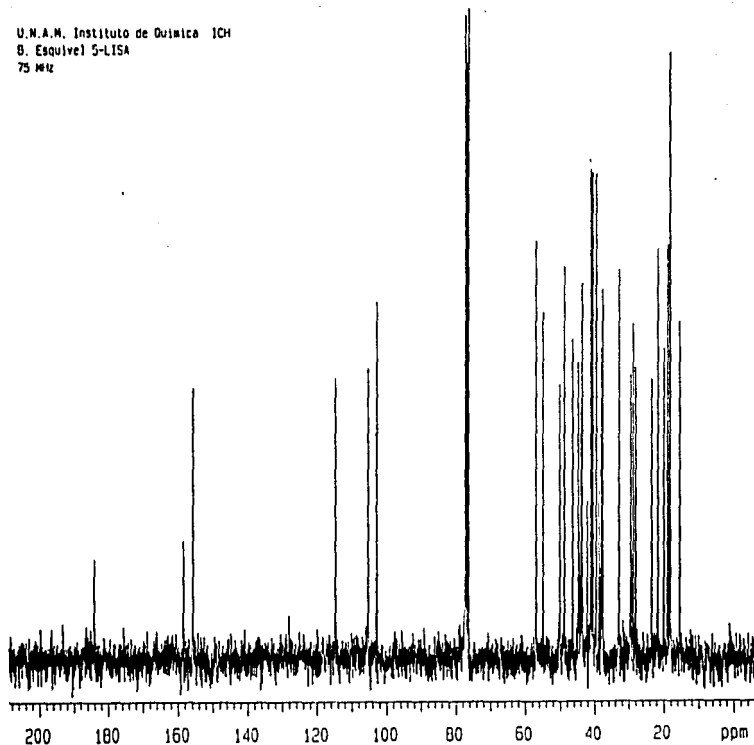
ESPECTRO 3

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH  
B. Esquivel S-45A  
75 Mc



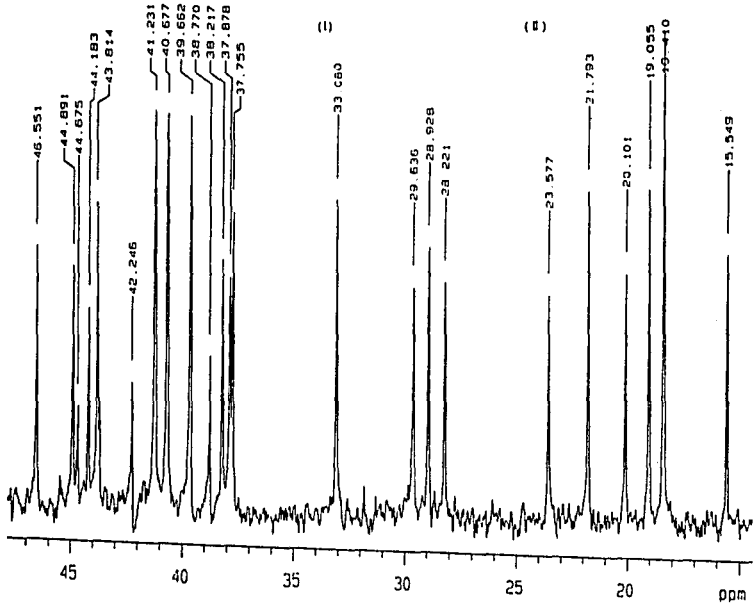
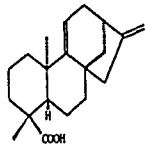
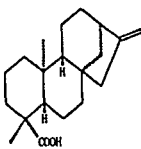
ESPECTRO 4

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH  
B. Esquivel S-LISA  
75 MHz



ESPECTRO 5

U.N.A.M. Instituto de Quimica IDI  
 B. Esquivel S-LISA  
 75 MHz



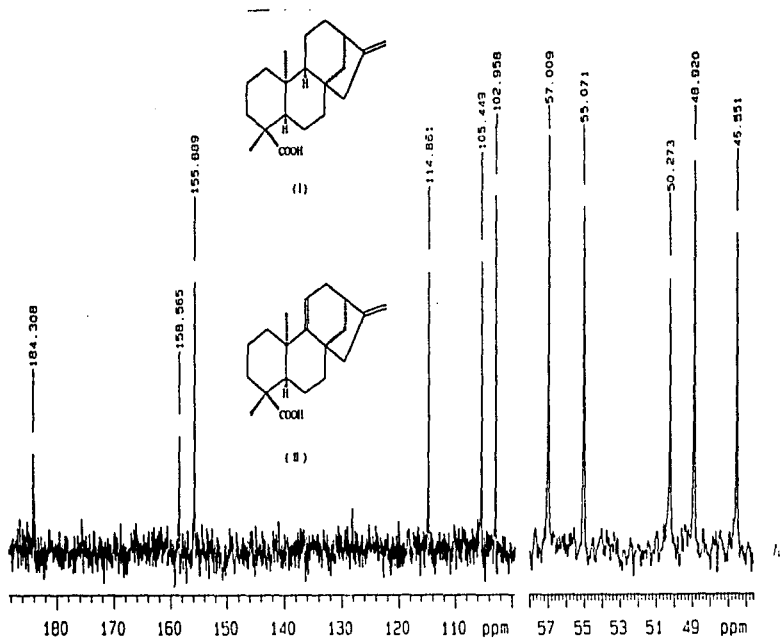
ESPECTRO 6



U.N.A.M. Instituto de Química ICI

B. Esquivel S-LISA

75 Mcz



ESPECTRO 7

( Mass Spectrum )

Date : 05-Dec-95 13:24

Sample :

Note : Dr-Baldomero-Esquivel-RD305

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Regular (MS-Library)

RT : 0.85 min Scan# : (17,28)

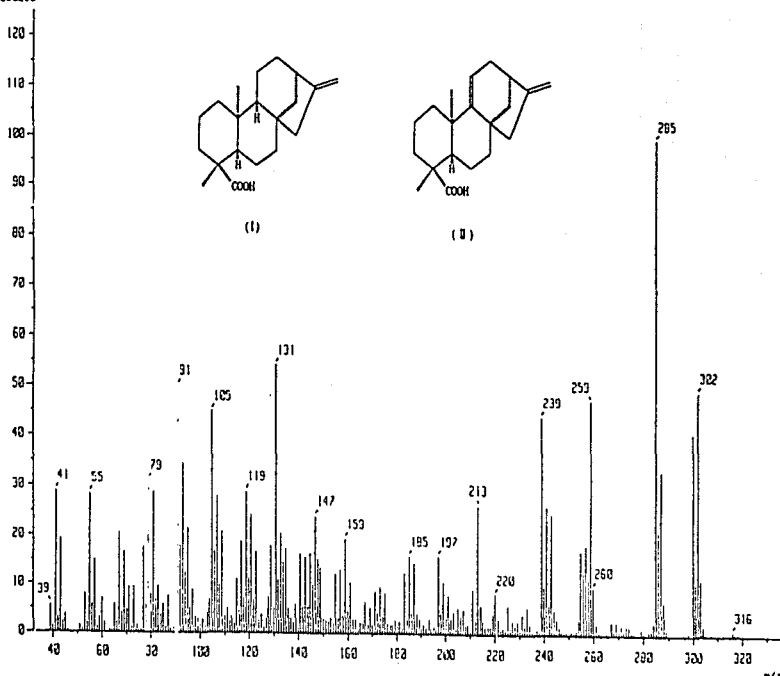
Temp : 33.1 deg.C

BP : m/z 285.0000 Int. : 331.01

Output m/z range : 33.0000 to 335.6398

Cut Level : 0.00 %

6260260



SPECTRO 8

m/z