

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**



Estudio Químico Preliminar de Raíz de *Lasianthaea aurea*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA:

ROSALBA CRUZ CORONA

ASESORES:

**DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS ROSA ELVA NORMA DEL RÍO
TORRES**

DOCTOR EN QUÍMICA MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

Morelia, Michoacán.

Diciembre, 2015.

Dedicatoria

A Dios

Por permitirme vivir, darme fuerzas cada día, y por rodear mi camino de hermosas personas.

A mis padres

Las personas más especiales e incondicionales en mi vida: Salvador Cruz Núñez y Rosa María Corona Zúñiga, por brindarme todo su amor y confianza, sus consejos, su apoyo desmedido y por hacer posible todas mis metas. Gracias.

A mi abuela

María Rosa Zúñiga Tinoco mi mejor maestra, por ser ese pilar en mi vida, por dedicarme sus oraciones y por brindarme sus consejos llenos de sabiduría. Gracias.

AGRADECIMIENTOS

A la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, mi asesora, una persona a la cual admiro y agradezco enormemente por brindarme todo el apoyo, su conocimiento y experiencia, por recibirme dentro de su grupo de trabajo y motivarme para continuar dentro de la investigación, pero sobre todo por su amistad y confianza.

Al D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, por su gran interés, ayuda y conocimiento brindado para hacer posible este proyecto.

Al comité tutorial: D.C. Juan Diego Hernández Hernández, D.Q. Gabriela Rodríguez García, D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja, D.C. Yliana López Castro y la D.C. Judit Araceli Aviña Verduzco por el apoyo en la revisión de este trabajo.

Al M.C. Armando Talavera Alemán por todo su apoyo, tiempo y conocimiento dedicado para la realización de esta tesis y por su amistad.

Al D.C. Pedro Joseph Nathan del departamento de Química del CINVESTAV, por su apoyo para la realización de esta tesis. Así como a todo el personal de apoyo M.C. Alvina Bucio Vásquez, Q.F.B. Angelina Hernández Barragán, Q.F.B. Verónica Reyes Olivares, Q.F.B. Yolanda Mora Pérez, Q.F.B. Elvia Celina Álvarez Cisneros, Q.F.B. Nadia Azucena Pérez Rojas.

Al Dr. Jerzy Rzedowski, del Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro, Mich., por la identificación de la planta.

Al Q.F.B. José Manuel Zaragoza Ríos y a la M.C. Concepción Armenta Salinas del IIQB-UMSNH por la determinación de los espectros de RMN a 400 MHz.

A mis hermanos: Guadalupe, Salvador, Daniel y Alberto, a mis tías: Salud, María José, Guadalupe, por ser parte importante en mi vida, por su preocupación y confianza. A mis compañeros y amigos de laboratorio: Sinuhé, Odessa, Yunuen, Martín, Lorena, Viridiana, Zuley, David e Iroel por su gran amistad.

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado. Con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

Índice

Índice

Índice

Índice

ÍNDICE

Abreviaturas símbolos y acrónimos -----	vii
Resumen -----	viii
Abstract -----	ix
1. Introducción -----	2
2. Antecedentes -----	8
2.1. Familia Asteraceae -----	8
2.2. Género <i>Lasianthaea</i> -----	9
2.3. <i>Lasianthaea aurea</i> -----	10
2.4. Estudios químicos reportados del género <i>Lasianthaea</i> -----	14
2.5. Diterpenos -----	16
2.6. Ácido kaurenoico y derivados de diferentes fuentes vegetales -----	17
2.7. Interés terapéutico de derivados de kaurenos -----	23
3. Justificación -----	26
4. Objetivos -----	28
4.1. Objetivo general -----	28
4.2. Objetivos específicos -----	28
5. Discusión de resultados -----	31
6. Conclusiones -----	46
7. Metodología experimental -----	48
7.1. Materia vegetal -----	48
7.2. Obtención de extractos -----	48
7.3. Espectroscopia y métodos físicos -----	48
7.4. Estudio químico -----	49
8. Bibliografía -----	53

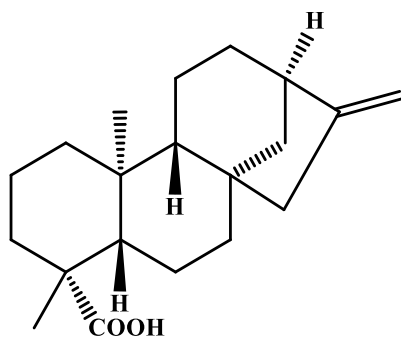
ABREVIATURAS SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico en ppm.
°C	Grados Celsius.
Ang	Angelato.
APT	Attached Proton Test.
Cin	Cinamato.
COSY	CORrelated SpectroscopY.
d	Señal doble.
da	Señal doble ancha.
dd	Señal doble de dobles.
dda	Señal doble de dobles ancha.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
<i>ent</i>	Enantiómero.
g	Gramos.
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo.
Glu	Glucosa.
g/mol	Gramos/mol.
HETCOR	HETeronuclear CORrelation.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
m	Señal múltiple.
mm	Milímetro.
mL	Mililitro.
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
L	Litro.
ppm	Partes por millón.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
s	Señal simple.
sa	Señal simple ancha.
Sen	Seneciato.
TMS	Tetrametilsilano.

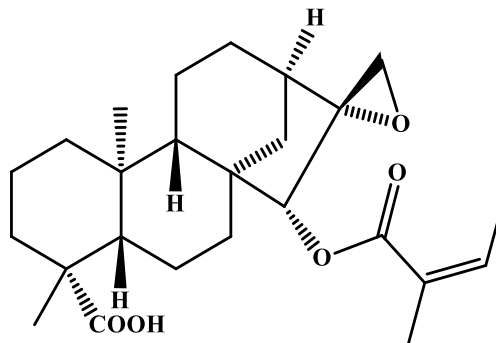
RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio fitoquímico preliminar del extracto hexánico de raíz de *Lasianthaea aurea*, una especie que no ha sido explorada químicamente, endémica de México, y se encuentra abundantemente en Michoacán, esta especie forma parte de la extensa familia de las Asteraceas, y pertenece al género *Lasianthaea*, del cual existen muy pocos artículos que hablen de su investigación.

Los compuestos mayoritarios aislados e identificados correspondieron a diterpenos de tipo kaureno: ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**) y ácido 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**14**). Caracterizados por sus datos de RMN.



6



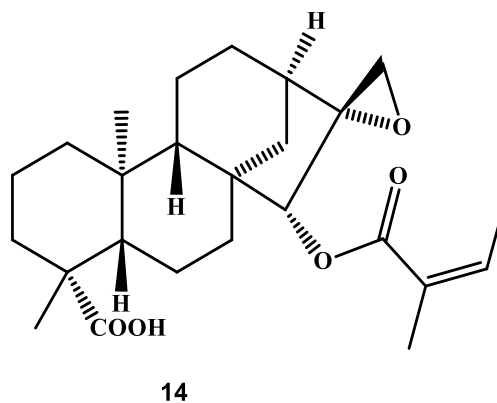
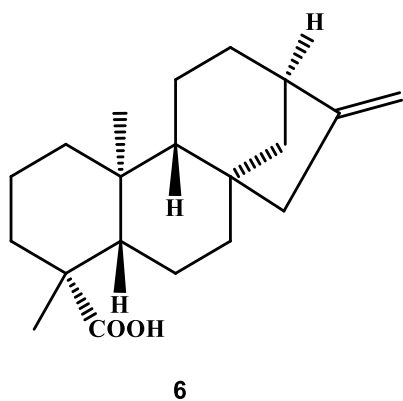
14

Palabras clave: *Lasianthaea aurea*, diterpeno, ácido *ent*-kaurenoico, Asteraceae, RMN.

ABSTRACT

In the present work, a preliminary phytochemical study of the hexanic extract from the roots of *Lasianthaea aurea* was carried out. This vegetal specie belongs to the Asteraceae family; it is considered an endemic plant from Mexico, growing abundantly in Michoacán State. Few species from this genus have been chemically studied; furthermore, from *L. aurea* no chemical study was described to date.

In this preliminary chemical study the isolation and identification of the majority metabolites was possible; two diterpene compounds with the *ent*-kaurene skeleton type were identified as *ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**6**) and 15- α -angeloyloxy-16 α ,17-epoxy-*ent*-kaur-16-en-19-oic acid (**14**). These compounds were characterized by its NMR data.



Keywords: *Lasianthaea aurea*, diterpene, *ent*-kaurenoic acid, Asteraceae, NMR.



Introducción

Introducción

Introducción

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

El conjunto de reacciones químicas que ocurren en los organismos vivos con intervención de enzimas específicas se conoce como metabolismo.¹ Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes esenciales para la vida celular y en la planta en general. Estos procesos constituyen en su conjunto, el metabolismo primario.

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas, ya que no intervienen en el metabolismo primario, pero les confiere unas claras ventajas selectivas, interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente como parte de la respuesta y defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, y se induce la síntesis y acumulación de estos compuestos de bajo peso molecular.²

Dentro del reino vegetal, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Es importante destacar que los productos naturales, tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica principalmente. Un gran número de estos productos naturales, ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades.³

Durante muchos años el valor adaptativo de la mayoría de los metabolitos secundarios fue desconocido. En principio, fueron considerados productos finales de procesos metabólicos, sin función específica, o directamente como productos de desecho

de las plantas. En general, fueron percibidos como insignificantes por los biólogos, por lo que históricamente han recibido poca atención por parte de los botánicos y muchas de las funciones aún son desconocidas.

El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX, que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria.

Dos grupos de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas son los fenoles y los terpenos. Sólo una tercera parte de especies conocidas contienen metabolitos basado en el nitrógeno, como alcaloides.⁴

FENOLES

El término de compuesto fenólico abarca una amplia gama de sustancias vegetales que poseen en común un anillo aromático y teniendo sustituyentes de uno o más grupos hidroxilo.

Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua, ya que se producen más frecuentemente combinados con azúcar como glicósidos y que se encuentran normalmente en la vacuola celular. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales se conocen varios miles de estructuras, los flavonoides forman el grupo más grande, pero existen en número considerable los fenoles monocíclicos simples, fenilpropanoides y quinonas fenólicas.

Varios grupos importantes de materiales poliméricos en las plantas (las ligninas, melaninas y taninos) son polifenólicos y ocasionalmente son encontradas en proteínas, alcaloides y entre los terpenos.

TERPENOS

Una enorme variedad de sustancias vegetales están cubiertos por la palabra “terpenoide”, un término usado para indicar que todas estas sustancias tienen un origen biosintético común. Por lo tanto, los terpenos están basados en la molécula de isopreno $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ y sus esqueletos de carbono se construye a partir de la unión de dos o más de estas unidades C_5 .

Son clasificados de acuerdo al número de unidades de isopreno que contengan, dos (C_{10}), tres (C_{15}), cuatro (C_{20}), cinco (C_{25}), seis (C_{30}) u ocho (C_{40}) de dichas unidades. Que van desde los componentes del aceite esencial, los volátiles, monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}), hasta los menos volátiles diterpenos (C_{20}), a los no volátiles como los sesterterpenos (C_{25}), triterpenos y esteroides (C_{30}) y pigmentos carotenoides (C_{40}).

Cada una de estas diversas clases de terpenos es de importancia en el crecimiento de las plantas y metabolismo.⁵

ALCALOIDES

Compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación.

Pueden considerarse estas cuatro clases de alcaloides como

- Alcaloides verdaderos
- Protoalcaloides

- Pseudoalcaloides
- Alcaloides imperfectos

Los alcaloides verdaderos cumplen estrictamente con las características de la definición de alcaloide. Los protoalcaloides son aminas simples con nitrógeno extracíclico, de carácter básico y son productos del metabolismo de los aminoácidos. Los pseudoalcaloides presentan algunas de las características de la definición de alcaloide, pero no son derivados de aminoácidos. Alcaloides imperfectos son derivados de bases púricas, no precipitan con los reactivos específicos para alcaloides.

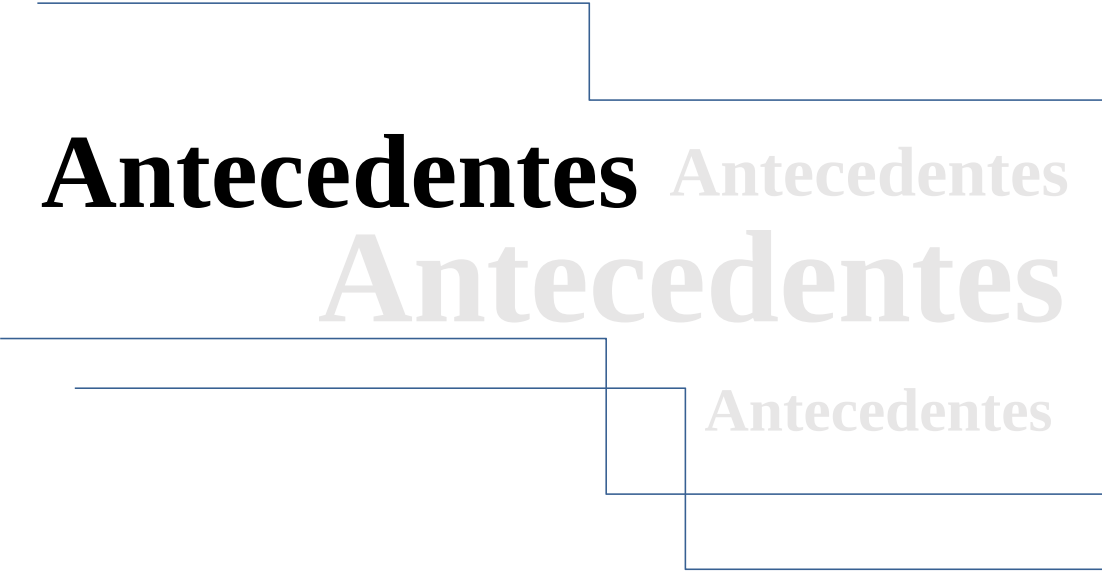
En cuanto a su estado natural, los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta, pueden encontrarse mayoritariamente en hojas (cocaína, nicotina, pilocarpina), en flores (escopolamina, atropina), en frutos (alcaloides del opio, peletiarina, coniina), en semilla (piperina, arecolina), en corteza (quinina, tubocurarina), en la raíz (emetina y cefalina).⁶

El estudio químico de los metabolitos secundarios y la clasificación de estos dentro de los tres grupos anteriormente mencionados, ha fortalecido las relaciones taxonómicas de las especies vegetales que se agrupan en las distintas familias. A esta relación se le denomina quimiotaxonomía.

Diversos autores ubican a México entre los países con la mayor riqueza florística, es quizá el país americano con el mayor nivel de endemismo registrado en su territorio.⁷

Entre las especies endémicas de México se encuentra *Lasianthaea aurea*, crece abundante en el Estado de Michoacán y se conoce como hierba del cangro o té de llano. Esta especie no cuenta con estudios químicos o biológicos previos.

En el presente trabajo se describe el estudio químico preliminar del extracto hexánico de raíces de *L. aurea* colectada en el estado de Michoacán.



Antecedentes Antecedentes Antecedentes

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae, constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta; su distribución es prácticamente cosmopolita y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats.

Si bien las asteráceas ya fueron reconocidas por Teofrasto hace unos 300 años a. C. La familia fue fundada con el nombre de Compositae por Giseke en 1792. El código internacional de nomenclatura botánica permite también el uso del nombre Asteraceae Dumortier, nombre asignado a la familia en 1822.^{8,9}

Asteraceae representa un grupo natural, con un número elevado de especies y amplia variación en cuanto a formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas. Sus miembros son fácilmente reconocidos por sus inflorescencias dispuestas en capítulos, sus flores gamopétalas y por lo general pentámeras, cáliz modificado en un vilano, estambres singenesios y el ovario ínfero bicarpelar que deriva en una cipsela.

La riqueza de la familia a nivel mundial se estima entre 1,500 y 1,700 géneros y entre 24,000 y 30,000 especies, con centros de diversificación importantes en la región del Mediterráneo en el Viejo Mundo, la región del Cabo en África, Australia, México y la Cordillera de los Andes en Sudamérica.

En el caso particular de México, mencionan la existencia de 361 géneros y 3,012 especies; es decir, la concentración más cuantiosa de este grupo de plantas de todos los países del mundo.⁹

Su diversidad puede atribuirse entre otras cosas a sus excelentes mecanismos de dispersión y a su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ecológicas, muchas veces viéndose favorecidas por la perturbación, por lo que no es raro verlas dominando los medios arvenses, ruderales o en ocasiones compitiendo con los cultivos como malezas.

Desde el punto de vista económico, tienen gran relevancia, ya que incluyen una gran variedad de usos como: plantas comestibles como la “lechuga” (*Lactuca sativa* L.) o la “alcachofa” (*Cynara scolymus* L.), ornamentales entre las que podemos citar a especies de los géneros: *Calendula*, *Chrysanthemum*, *Dahlia* de las que han sido seleccionadas numerosas variedades, las medicinales como: “manzanilla” (*Matricaria chamomilla* L.), “mercadela” (*Calendula officinalis* L.), “artemisa” (*Artemisia vulgaris* L.) y las especies cultivadas por sus semillas oleaginosas como el “girasol” (*Helianthus annuus* L.), y el “cártamo” (*Carthamus tinctorius* L.).¹⁰

2.2. Género *Lasianthaea*

Género de unas 12 especies distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta el sur de Venezuela, todas presentes en México y en su mayoría con el área restringida a los límites de nuestro País. Durante muchos años este grupo se consideraba como parte integral de *Zexmenia*, conjunto polifilético actualmente subdividido en varios géneros.¹¹

Especies del género *Lasianthaea*:¹²

1. *Lasianthaea aurea* (D. Don) K. M. Becker.
2. *Lasianthaea ceanothifolia* (Willdenow) K. M. Becker.
3. *Lasianthaea crocea* (A. Gray) K. M. Becker.
4. *Lasianthaea fruticosa* (Linnaeus) K. M. Becker.
5. *Lasianthaea helianthoides* de Candolle.
6. *Lasianthaea macrocephala* (Hooker & Arnott) K. M. Becker.

7. *Lasianthaea palmeri* (Greenman) K. M. Becker.
8. *Lasianthaea podocephala* (A. Gray) K. M. Becker.
9. *Lasianthaea rosei* (Greenman) McVaugh.
10. *Lasianthaea seemannii* (A. Gray) K. M. Becker.
11. *Lasianthaea squarrosa* (Greenman) K. M. Becker.
12. *Lasianthaea zinnioides* (Hemsley) K. M. Becker.

Son plantas herbáceas perennes, arbustivas o a veces arborescentes hasta de 7 m de alto; hojas todas opuestas o a veces algunas alternas o verticiladas, simples e indivisas, por lo común triplinervadas; cabezuelas heterógamas, solitarias o agrupadas en conjuntos umbeliformes o corimbiformes; involucro turbinado a hemisférico, sus brácteas dispuestas en 2 ó 3 series, de largo subigual a conspicuamente graduadas, receptáculo convexo a plano, provisto de páleas conduplicadas que rodean las flores del disco; flores liguladas fértiles, amarillas, anaranjadas o rojas; flores del disco hermafroditas, sus corolas pentámeras, tubulosas, amarillas a rojas, glabras, anteras apendiculadas en el ápice, auriculadas en la base, cafés a negruzcas, ramas del estilo filiformes; aquenios de las flores liguladas por lo general triquetros, los de las flores del disco comprimidos, biconvexos y a veces alados, vilano de 2 ó 3 aristas, a menudo acompañadas de varias escamitas cortas libres o unidas entre sí.¹¹

2.3. *Lasianthaea aurea* (D. Don) K. M. Becker

Año de identificación: 1976.¹³

Sinonimia:¹⁴

Wedelia aurea D. Don:

- *Zexmenia aurea* (D. Don) Benth. & Hook.
- *Verbesina aurea* (D. Don) DC.

- *Telesia aurea* (D. Don) Raf.

Nombres comunes registrados: Hierba del cangro, plunia, té de llano, árnica, peonía.



Figura 2.3.1. **A)** *Lasianthaea aurea*, **B)** Raíz de *Lasianthaea aurea*.

Lasianthaea aurea es una planta herbácea perenne hasta de 60 cm de alto, a partir de un conjunto de raíces tuberosas (figura 2.3.1).

Tallos a menudo varios, simples o ramificados, erectos o ascendentes, por lo general antrorsamente estrigosos, a veces hirsutos o vilosos.

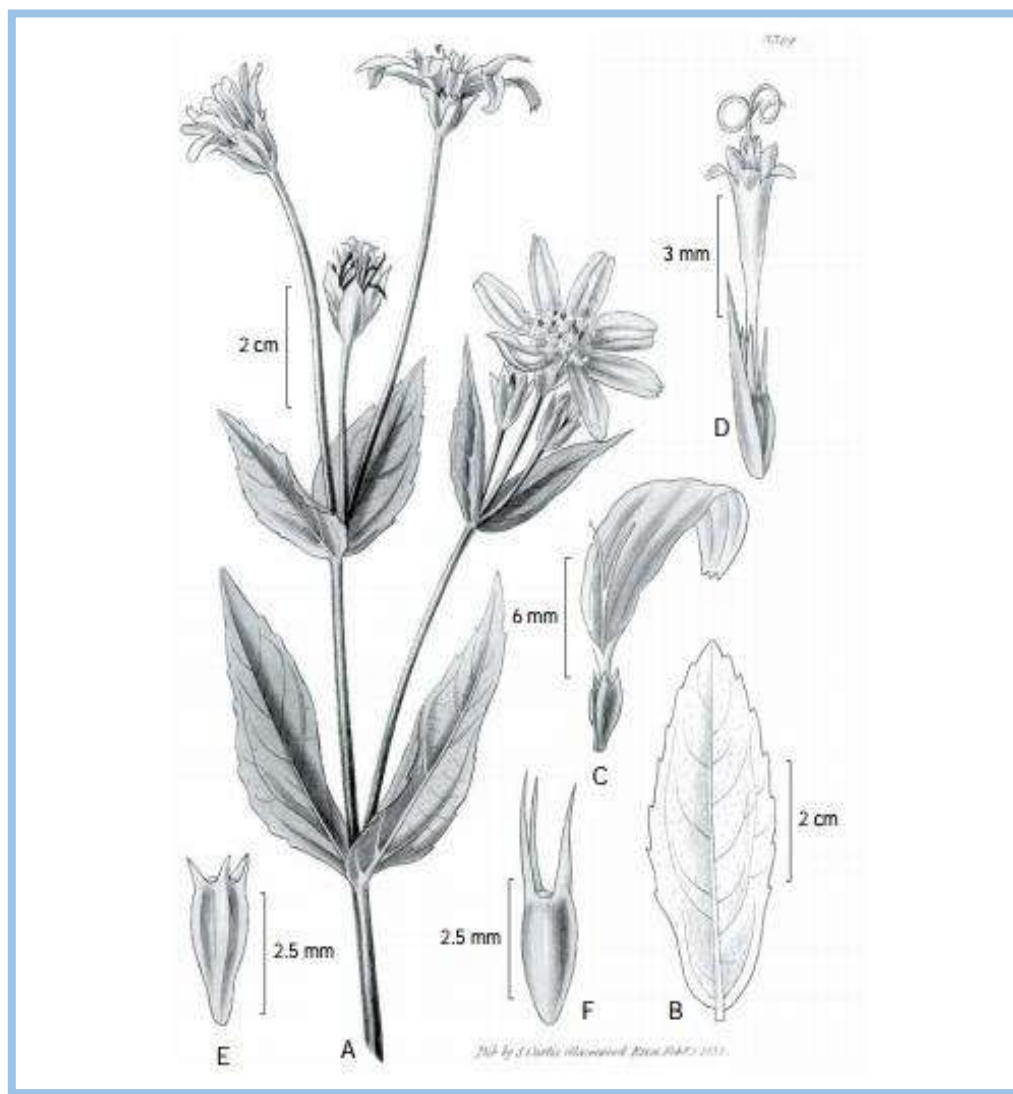
Hojas opuestas o a veces ternadas, sésiles o subsésiles, lámina lanceolada a elíptica, variando a veces a ovada, oblonga o linear, de 2 a 7.5 cm de largo, de 0.8 a 3 cm de ancho, aguda a obtusa en el ápice, subcordada a cuneada en la base, margen toscamente

serrado a denticulado, de textura membranácea o cartácea, triplinervada, estrigoso-hirsuta y rasposa en ambas caras; cabezuelas solitarias o agrupadas por pocas en el extremo del tallo, pedúnculos de 1 a 9 cm de largo, blanco-estrigosos; involucro anchamente campanulado a subhemisférico, sus brácteas dispuestas en 2 ó 3 series de largo casi igual, suborbiculares a lanceoladas u oblongas, de 5 a 8 mm de largo, las exteriores blanquecinas en la mitad inferior, verdes hacia el ápice, estrigosas a hirsutas por fuera, receptáculo convexo, páleas conduplicadas, puntiagudas, exsertas antes y después de la antesis, de 6 a 9 mm de largo.

Flores liguladas 6 a 11, sus láminas elípticas a oblongas, de 8 a 17 mm de largo, amarillas; flores del disco 20 a 40, sus corolas tubulosas, de 6 a 8 mm de largo, amarillas, glabras, anteras cafés, de 2 a 2.5 mm de largo, ramas del estilo con ápices subulados y pubérulos; aquenios de las flores liguladas triquetros, los de las flores del disco biconvexos, de 2.5 a 3.5 mm de largo, hispídulos a glabros, vilano de 2 a 3 aristas de 0.5 a 2.5 mm de largo, sin escamas.

Esta especie se ubica frecuente en pastizales secundarios y claros en medio de bosques de encino en el norte de Michoacán, más escaso en Guanajuato y Querétaro, en alturas que van desde 1750 a 2650 msnm.

Florece de julio a agosto principalmente, aunque se ha encontrado hasta el mes de octubre. Es una especie endémica del centro de México: Michoacán, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, México, D.F. Planta relativamente común y sin problemas de supervivencia (figura 2.3.2).



Lasianthaea aurea (D. Don) Becker. Tomado de Rzedowski.¹¹

- A. Rama con hojas y cabezuelas
- B. Hoja
- C. Flor periférica
- D. Flor del disco
- E. Aquenio de una flor periférica
- F. Aquenio de una flor del disco

Figura 2.3.2. Descripción de *Lasianthaea aurea*.

2.4. Estudios químicos reportados del género *Lasianthaea*

Lasianthaea fruticosa

De esta especie reportaron al lasidiol angelato (**1**), un sesquiterpeno con esqueleto de ducano (carotano) aislado del extracto de cloroformo de las hojas, la estructura que propusieron fue en base a la evidencia espectral (figura 2.4.1).¹⁵

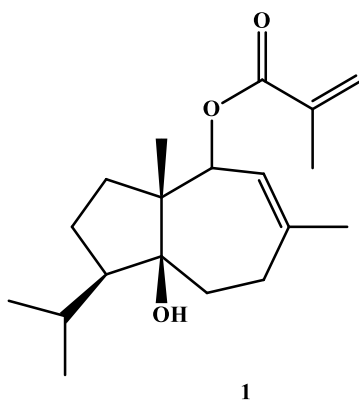


Figura 2.4.1. Lasidiol angelato de *Lasianthaea fruticosa*.

En un estudio posterior del extracto obtenido de una mezcla de metanol/éter etílico/éter de petróleo (1:2:1) que realizaron a las partes aéreas de *Lasianthaea fruticosa* reportaron la presencia de dos nuevos kaurenos denominados ácido 12 α -angeloiloxi-9,11-dehidro-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**2**) y ácido 12 α -senecioiloxi-9,11-dehidro-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**3**) (figura 2.4.2); cabe mencionar que los autores comentan que no detectaron la presencia del sesquiterpeno lasidiol angelato (**1**) previamente reportado.¹⁶

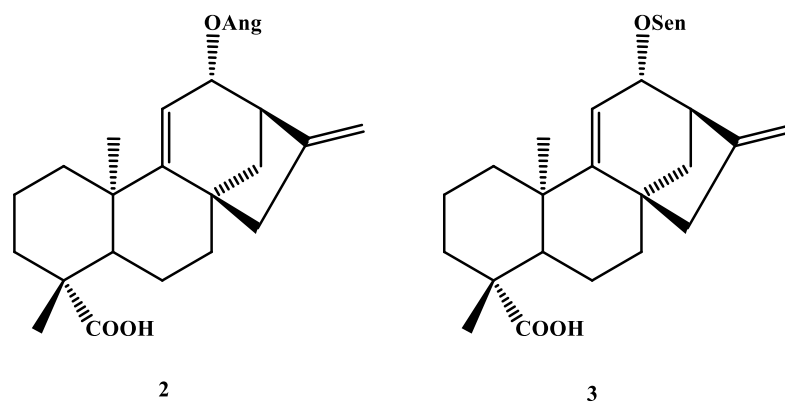


Figura 2.4.2. Kaurenos de *Lasianthaea fruticosa*.

Lasianthaea podocephala}

El derivado de bisabolenos aromático (*R*)-2-(1',5'-dimetilhex-4'-enil)-5-metilfenol (**4**), fue reportado para la especie *Lasianthaea podocephala*¹⁷, posteriormente se realizó un estudio para la determinación de la configuración absoluta, mediante su síntesis (figura 2.4.3).¹⁸

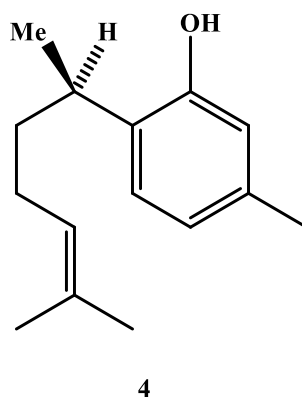


Figura 2.4.3. Fenol de *Lasianthaea podocephala*.

2.5. Diterpenos

Los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos de C_{20} procedentes del metabolismo del pirofosfato de $2E,6E,10E$ -geranilgeranilo (GGPP), en donde se puede tener a los kaurenos o los *ent*-kaurenos (figura 2.5.1).¹⁹

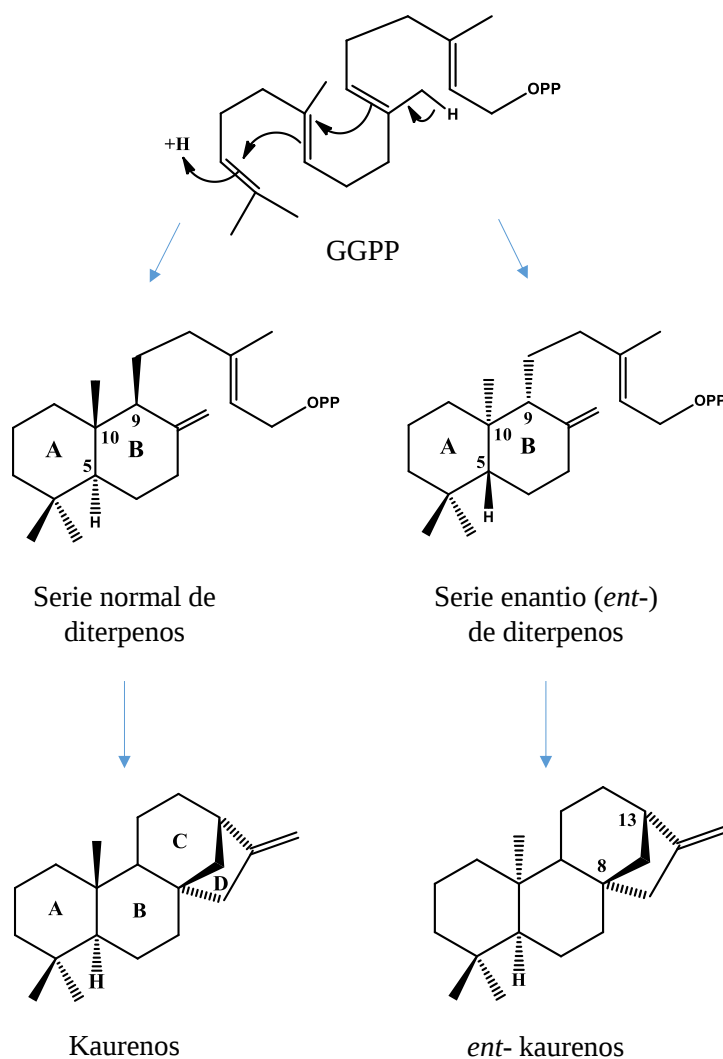


Figura 2.5.1. Ciclación del GGPP bajo catálisis ácida, que conduce a los diterpenos de la serie "NORMAL" y "ENANTIO" (*ent*-).²⁰

KAURENOS

Los kaurenos representan un grupo importante de diterpenos tetracíclicos y sus estructuras están constituidas por un perhidrofenantreno (anillo A, B y C) fusionados con un ciclopentano (anillo D) formando un puente de dos carbonos entre C-8 y C-13.

Las dos series enantioméricas difieren entre sí, en sus configuraciones invertidas de los carbonos C-5, C-9 y C-10. La serie "normal" son las estructuras cuya fusión entre anillos A y B se produce de la misma manera que en los esteroides, mientras que las estructuras de la serie "enantiomérica" (denotados como "ent-") son las imágenes especulares de los correspondientes a la serie normal.

Ácido kaurenoico, un diterpeno *ent*-kaurano posee un amplio espectro de actividades biológicas tales como antiinflamatorio, antibacteriano, antifúngico, entre otras propiedades, es relativamente abundante en algunas especies que pertenecen a los géneros *Wedelia*, *Mikania*, *Stevia*, *Annona* y *Xylopia*, lo que ha motivado su cuantificación en estas especies de plantas, que permite el uso de todos ellos como fuentes naturales de este diterpeno.²⁰

2.6. Ácido kaurenoico y derivados de diferentes fuentes vegetales

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteracea)

Las hojas contienen una serie de heterósidos formados a partir de un alcohol *ent*-kaurénico: steviol (steviosido, rabauidósidos, dulcósido). Puede representar hasta un 10% de la masa de la hoja. El steviósido (5) posee un poder edulcorante aproximado de 200 veces más elevado que el de la sacarosa (figura 2.6.1).²¹

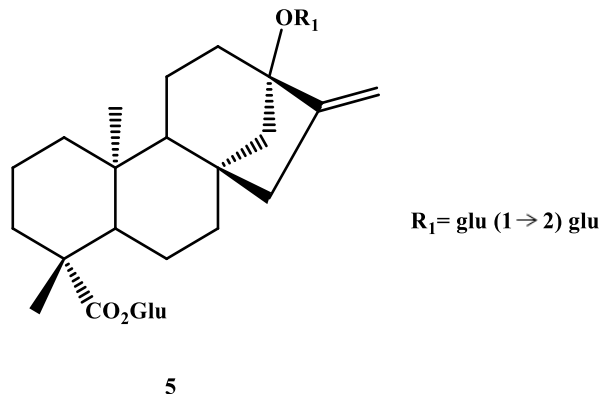


Figura 2.6.1. Steviósido de *Stevia rebaudiana*.

Smallanthus spp.

Del estudio de las cortezas de raíz de cuatro especies de *Smallanthus* (*S. sonchifolius*, *S. siegesbeckius*, *S. connatus*, y *S. macroscyphus*) que pertenecen al grupo de plantas conocidas comunmente como yacón, fueron identificados como diterpenos de tipo *ent*-kaureno (figura 2.6.2):

- Ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (6).
- *ent*-Kaur-16-en-19-al (7).
- Ácido 15- α -angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (8).
- Ácido 15- α -isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (9).
- Ácido 18-angeloiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (10).
- Ácido 18-isovaleroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (11).
- Ácido 18-senecioiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (12).
- Ácido 18-isobutiroiloxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (13).
- Ácido 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (14).
- Ácido grandiflorenico (15).

En todos los casos, el ácido kaurenoico (**6**) fue el principal componente. Los minoritarios identificados fueron el **7**, **14**, **15** y varios derivados esterificados en C-15 o C-18 del ácido kaurenoico: **8**, **9**, **10**, **11**, **12** y **13** (este último es reportado como nuevo). Los compuestos **14** y **15**, estuvieron presentes solo en *S. sonchifolius* y *S. siegesbeckius*.²²

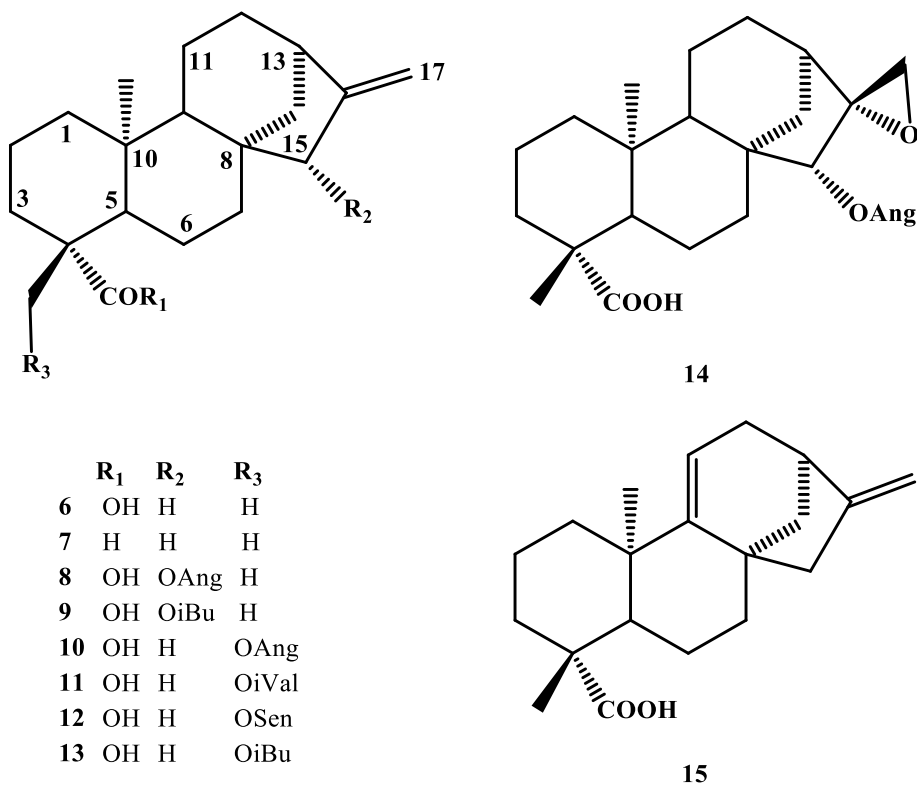


Figura 2.6.2. Diterpenos de tipo *ent*-kaureno de *Smallanthus spp.*

Chromolaena odorata

De los extractos orgánicos de las raíces de *Chromolaena odorata* aislaron los siguientes compuestos: ácido-15-angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**14**) y el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**).²³

Wedelia calendulacea

Del extracto cloroformico de *Wedelia calendulacea* aislaron tres diterpenos (figura 2.6.3): ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**), ácido 3 α -tigloiloxi-kaur-16-en-19-oico (**16**) y el ácido 3 α -angeloiloxi-kaur-16-en-19-oico (**17**).²⁴

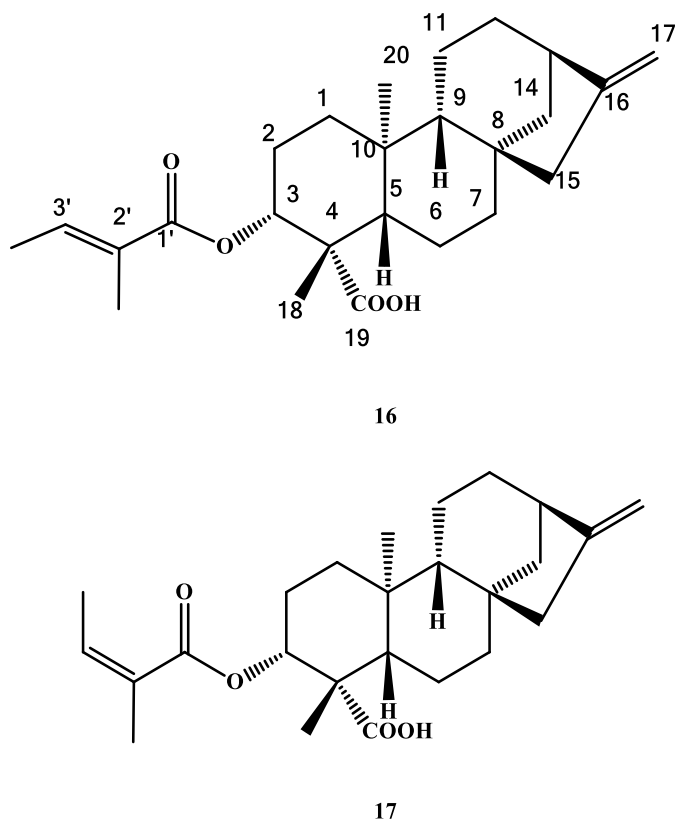
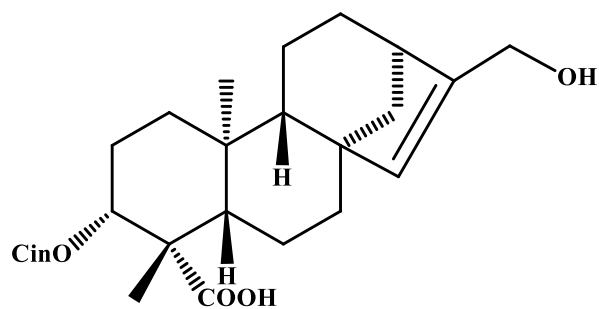


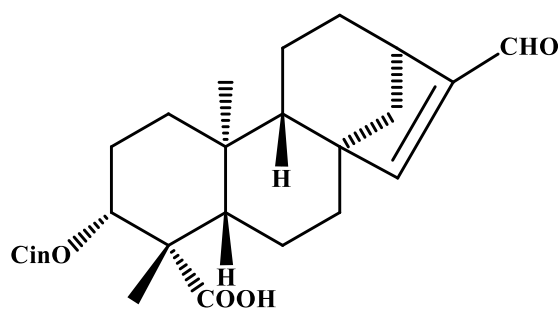
Figura 2.6.3. Diterpenos aislados de *Wedelia calendulacea*.

Wedelia trilobata

Dos diterpenos del tipo *ent*-isokaurenos (figura 2.6.4) fueron aislados de partes aéreas de *Wedelia trilobata*, Wedelidin A (**18**), Wedelidin B (**19**).²⁵



18



19

Figura 2.6.4. *ent*-isokaurenos aislados de *Wedelia trilobata*.

Annona vepretorum (Annonaceae)

Del extracto de éter de petróleo de tallo, reportaron al diterpeno (20) *ent*-3 β -hidroxi-kaur-16-en-19-al (figura 2.6.5).²⁶

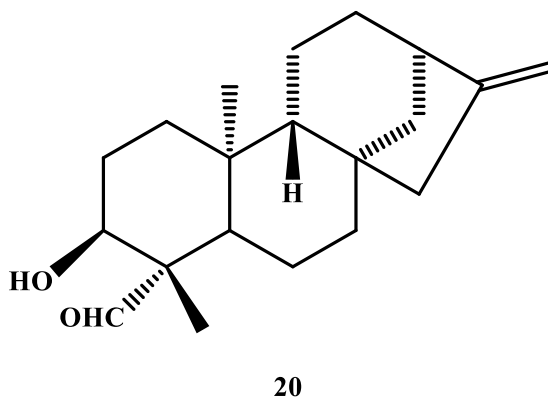


Figura 2.6.5. Diterpenos *ent*-kaureno de *Annona vepretorum*.

Wedelia paludosa

En una investigación de las partes aéreas de *Wedelia paludosa* describieron, por primera vez, el aislamiento del ácido isokaurenoico (*ent*-kaur-15-en-19-oico) (**21**) de esta especie (figura 2.6.6). Este compuesto ha sido encontrado en un escaso número de Annonaceae y especies de Asteraceae, incluyendo *Annona glabra*, *Smallanthus maculatus*, *Wedelia biflora*, y algunas especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae (Asteraceae, tribu Heliantheae), tales como *Espeletia semiglobulata*, *Coespeletia spicata* y *Libanothamus humbertii*.²⁷

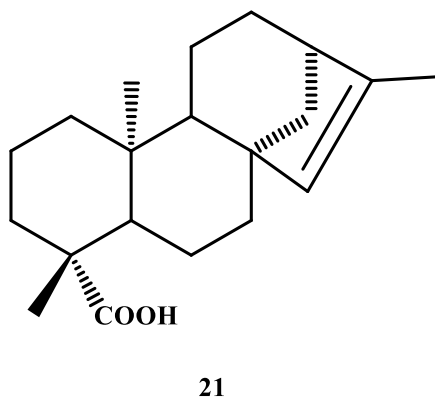


Figura 2.6.6. Ácido *iso*-kaurenoico de *Wedelia paludosa*.

Coespeletia moritziana

De las hojas de *Coespeletia moritziana* reportaron por primera vez al ácido *ent*-15 α -(3-metoxi-3-metil-butanoil)-kaur-16-en-19-oico (**22**), cuya estructura la determinaron mediante estudios espectroscópicos (figura 2.6.7).²⁸

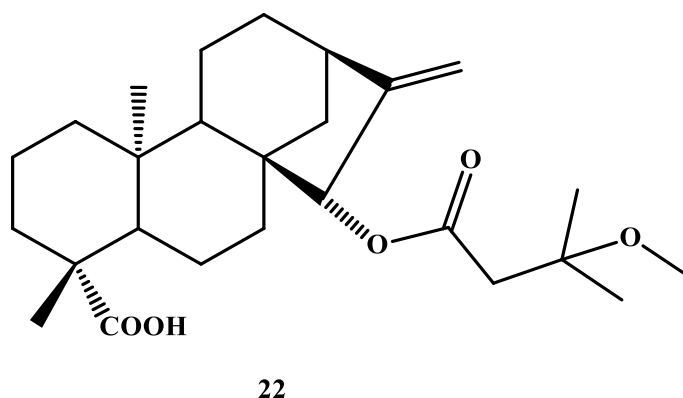


Figura 2.6.7. Ácido diterpénico de *Coespeletia moritziana*.

2.7. Interés terapéutico de derivados de kaurenos

El ácido kaurenoico (**6**) aislado de la raíz de *Chromolaena odorata* exhibió significativa acción inhibitoria α -glucosidasa y actividades antibacterianas contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.²³

Del ácido kaurenoico (**6**) aislado de *Wedelia calendulacea* reportaron importante actividad inhibitoria contra cepas bacterianas principalmente *Salmonella paratyphi* A, *S. typhi*, *Sarcina lutea*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*.²⁴

Montanoa tomentosa (zoapatle) es una planta de Centroamérica utilizada en México en la medicina tradicional para aliviar el trabajo del parto y para curar ciertos

trastornos femeninos. Recientemente, se ha informado que los extractos crudos de *M. tomentosa* poseen efecto afrodisíaco en las ratas macho. Las moléculas bioactivas son los diterpenos uterotónicos ácido kaurenoico (**6**) y ácido grandiflorénico (**15**), presentes en las hojas.²⁹

De los tallos de *Wedelia trilobata* (Asterácea) aislaron el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**) y los resultados obtenidos indicaron que este compuesto posee un potente efecto leishmanicida sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*.³⁰

El ácido kaurenoico (**6**) se sabe que presenta interesantes actividades biológicas, incluyendo a los antimicrobianos, citotóxico, antiinflamatorio y propiedades antiprotozoarias, *in vitro*, presentó actividad contra las formas tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, mostrando; sin embargo, la actividad lítica sobre los eritrocitos de la sangre, como un efecto secundario.³¹

La buena actividad antimalárica *in vitro* de derivados epóxidos *ent*-kaureno contra el W2 clon del *Plasmodium falciparum* (resistente a la cloroquina) indicaron que esta clase de productos naturales puede propiciar el desarrollo de nuevos medicamentos exitosos contra la malaria.³²

El ácido kaurenoico (**6**) aislado de *Aralia continentalis* mostró efectos antiinflamatorios, tanto *in vitro* como *in vivo*. El ácido kaurenoico podría ser un fármaco potencial para la medicación de trastornos inflamatorios tales como la colitis, la artritis reumatoide, el asma y la gastritis.³³ Este mismo compuesto aislado de la raíz de *Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae) posee citotoxicidad y efecto anticanceroso contra PANC-1 y HeLa líneas celulares humanas, mientras que el mecanismo específico de la actividad contra el cáncer es un punto de partida para futuras investigaciones.^{34z}



Justificación

Justificación

Justificación

Justificación

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas cuentan con gran diversidad de principios activos, gracias a su metabolismo secundario, es entonces que su estudio fitoquímico ha sido y será de gran importancia ya que la lucidez de los compuestos que sean identificados nos abrirá el camino hacia nuevas rutas de investigación, tomando en cuenta la aplicación que estos puedan poseer, convirtiéndolos en materia prima valiosa.

El género *Lasianthaea* ha sido muy poco explorado químicamente, y los pocos estudios que existen han sido reportados desde hace más de diez años. Y respecto a la especie *Lasianthaea aurea*, no existe ningún estudio químico, por lo cual es necesario iniciar su exploración fitoquímica.



Objetivos

Objetivos

Objetivos

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Realizar un estudio químico preliminar del extracto hexánico de raíz de *Lasianthaea aurea*.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener el extracto hexánico de raíz.
- Aislar e identificar los compuestos mayoritarios mediante métodos físicos y espectroscópicos.



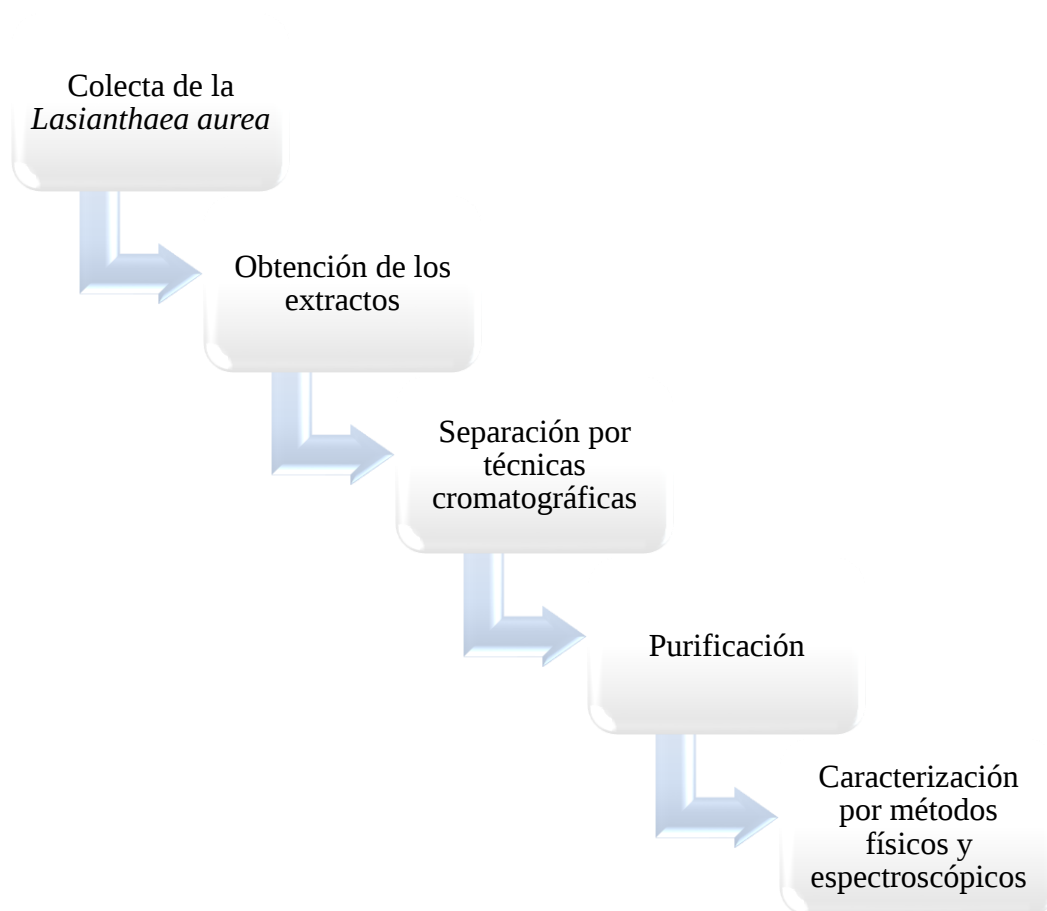
Discusión de resultados

Discusión de resultados

Discusión de resultados

Discusión de resultados

METODOLOGÍA GENERAL



5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se realizó la colecta de la especie vegetal *Lasianthaea aurea* en la carretera Tiripetio-Villa Madero, Michoacán; la planta colectada se dejó secar a la sombra; se tomó un lote de 405 gramos de raíz seca y triturada para después macerarla a temperatura ambiente durante tres días con 1.5 L hexanos como disolvente, pasado este tiempo, se filtró y se concentró en rotavapor; este procedimiento se realizó en tres ocasiones para la obtención de los tres extractos hexánicos los cuales tenían un aspecto similar a una miel con textura viscosa y color amarilla; obteniendo un peso total de 39 gramos del extracto.

De la primera extracción hexánica, se tomó una pequeña muestra para medir su espectro de RMN de ^1H (figura 5.1) para observar de manera preliminar la composición y abundancia de los compuestos presentes. El espectro permitió apreciar un conjunto de señales entre 7.2 y 6.3 ppm, señales que se pueden atribuir a protones aromáticos o vinílicos, entre 6.1 y 4.5 ppm se apreciaron señales de protones vinílicos, de 2.5 a 0.5 ppm sobresalen señales de protones alifáticos, por lo que se deduce la presencia de terpenos de manera abundante.

Para la separación de los compuestos observados, se colocaron 20 g del extracto hexánico en una columna cromatográfica de 4 cm de diámetro empacada hasta 12 cm de altura con gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de hexanos–acetato de etilo en orden ascendente de polaridad como eluente. La cromatografía en columna fue monitoreada por medio de cromatografía en capa fina utilizando el mismo sistema de disolventes.

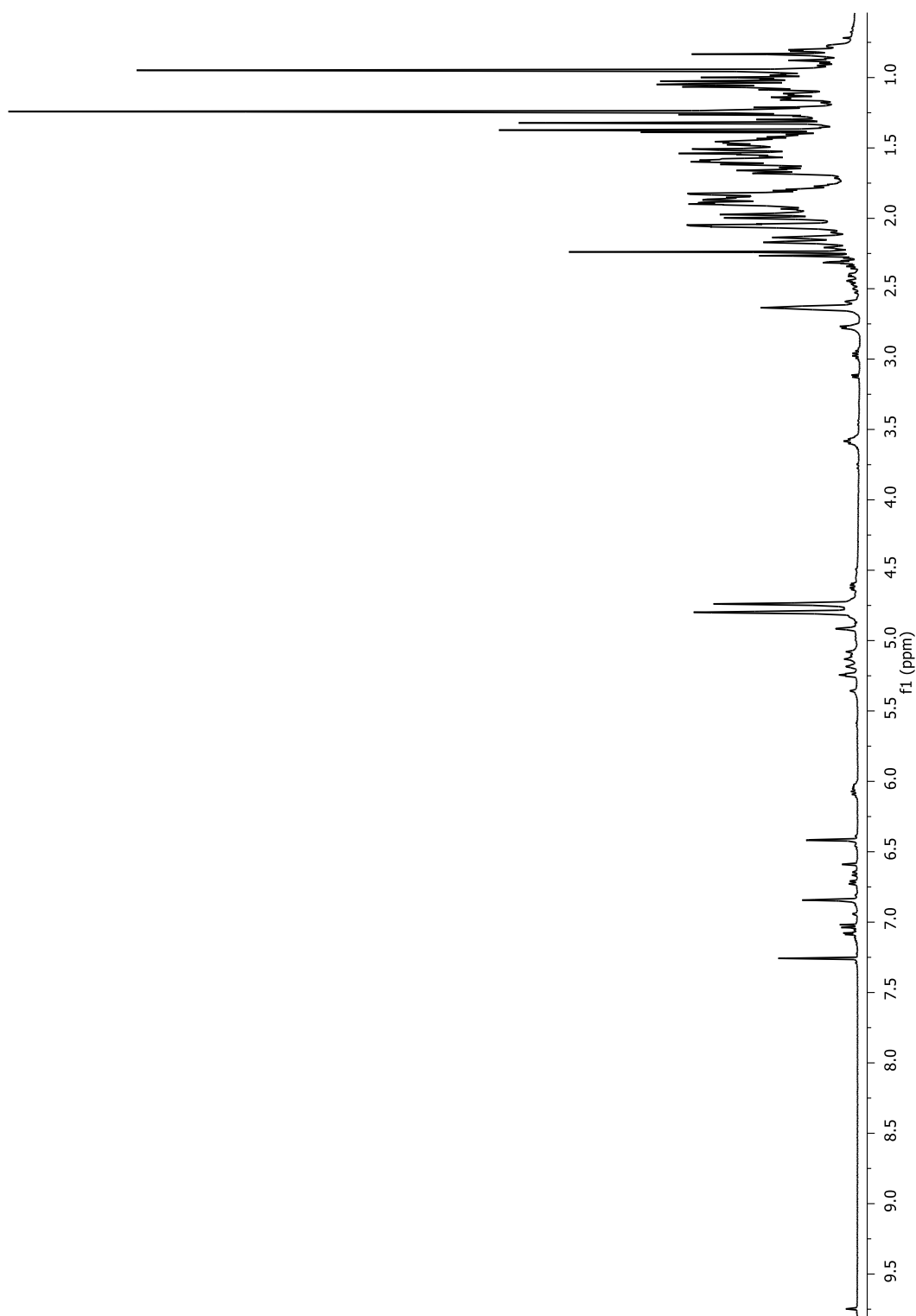


Figura 5.1. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico de raíz de *L. aurea*.

En la columna cromatográfica se observó la presencia de cristales blancos acompañados de un ligero color amarillo a partir de las fracciones (14-40), se juntaron con cloruro de metileno, se recrystalizaron y se observó un precipitado de color blanco, se lavaron con hexano frío, obteniendo como resultado cristales blancos, con punto de fusión de 175-177 °C y un rendimiento aproximado del 24%. Su espectro de RMN de ^1H (Figura 5.2) mostró dos señales simples características de hidrógenos vinílicos en δ 4.80 (H-17a) y δ 4.74 (H-17b) característicos de un doble enlace exocíclico; en δ 2.64 se encontró una señal triple ancha correspondiente al protón alílico H-13 con $J = 4.0$ Hz; por δ 2.16 se ubicó una señal doble ancha correspondiente al H-3a ($J = 14.6$ Hz); de 2.10 a 1.35 ppm se encontraron señales de protones alifáticos, adicionalmente se observaron señales simples de metilos terciarios CH₃-18 y CH₃-20 en δ 1.24 y δ 0.95, respectivamente.

En el espectro de RMN de ^{13}C (figura 5.3) se observaron 20 señales que son características de un diterpeno, destacaron principalmente algunas señales como en δ 184.77 (C-19) señal de carbonilo del ácido, en δ 155.83 para C-16 y en δ 102.98 del C-17, dos señales pertenecientes a carbonos sp^2 , en δ 57.04, δ 55.08 y δ 43.82 se observaron las señales de los carbonos metinos C-5, C-9 y C-13 respectivamente, , carbonos de grupos metilos se observaron en δ 28.94 asignados a C-18 y δ 15.56 al C-20, cuya multiplicidad fue corroborada por el experimento DEPT. De δ 50.0 a 15.0 se observó el resto de las señales de la estructura.

Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos fueron comparados con lo reportado como puede observarse en la tabla 5.1, en donde existe una buena concordancia con los datos reportados para el ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**).³⁰

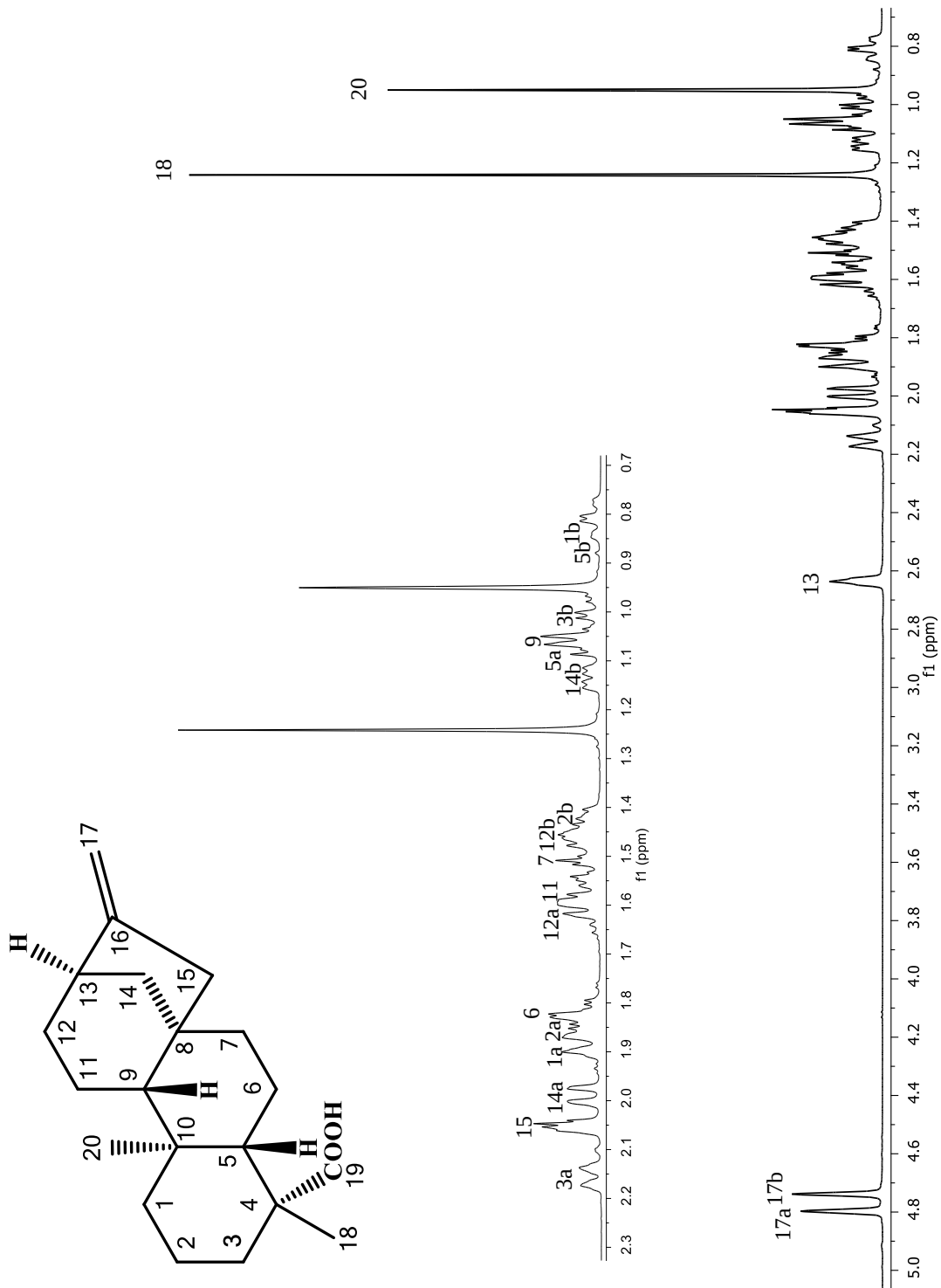


Figura 5.2. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (6).

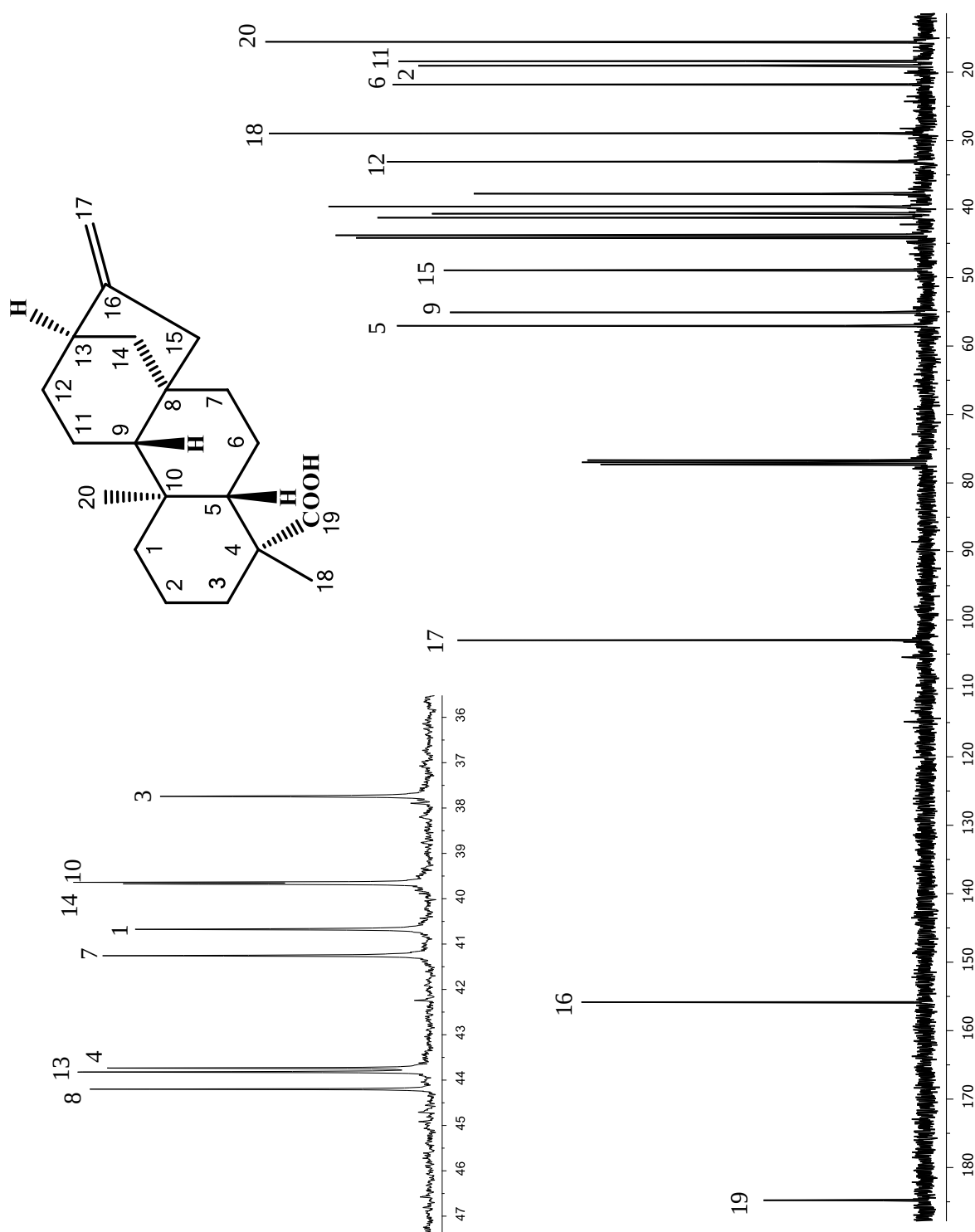


Figura 5.3. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido ent-kaur-16-en-19-oico (6).

Tabla 5.1. Desplazamientos de RMN de ^{13}C del ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**).

CARBONO	EXPERIMENTAL δ en ppm	LITERATURA δ en ppm³⁰
1	40.68	40.8
2	19.07	19.2
3	37.74	37.8
4	43.73	43.9
5	57.04	57.2
6	21.80	21.9
7	41.26	41.4
8	44.20	44.3
9	55.08	55.3
10	39.64	39.8
11	18.41	18.5
12	33.08	33.2
13	43.82	43.9
14	39.67	39.8
15	48.93	48.9
16	155.83	155.9
17	102.98	103.1
18	28.94	29.0
19	184.77	185.1
20	15.56	15.6

Continuando con la cromatografía de columna del extracto hexánico de raíz, en las fracciones eluidas con la polaridad 4:1 (hexanos-acetato de etilo) se observó la formación de cristales con forma de agujas en las fracciones 52-66, que se lavaron con un poco de hexano frío, obteniendo un rendimiento aproximado del 1.7 %.

Los cristales fueron analizados por Resonancia Magnética Nuclear. En el espectro de RMN de ^1H (figura 5.4.) se observó una señal cuádruple ancha en δ 6.04 correspondiente a protones vinílicos ($\text{H}-3' J = 7.2 \text{ Hz}$), en δ 4.79 una señal simple ancha base de éster asignada al H-15, en δ 3.11 y 2.76 se observan dos señales dobles que son características de protones base de epóxido H-17a y H-17b con una $J = 5.3 \text{ Hz}$ para cada una, en δ 2.18 apareció una señal doble ancha con $J = 12.9 \text{ Hz}$ correspondiente al H-3a, entre δ 1.90 y δ 2.00 se observaron las señales de los metilos vinílicos y de δ 2.30 a δ 0.80 se mostró el resto de las señales en la región alifática. La presencia de la señal cuádruple del hidrógeno vinílico y los metilos vinílicos indicaron la existencia de un grupo angelato.

En el espectro de RMN de ^{13}C (figura 5.5.) se observaron 25 señales que sugirieron la presencia de un diterpeno como esqueleto base, funcionalizado con un grupo angelato, donde destacaron las siguientes señales, en δ 184.12 (C-19) y δ 167.91 (C-1') aparecieron las señales características de un carbonilo de ácido y de un carbonilo de éster conjugado, en δ 137.37 (C-3') y δ 128.04 (C-2') se observaron señales de carbonos vinílicos del angelato, en δ 81.93 se encontró la señal de un carbono base del angelato asignado al C-15, en δ 66.36 y δ 49.65 aparecieron las señales de los carbonos cuaternario y metileno C-16 y C-17 respectivamente del anillo de epóxido.

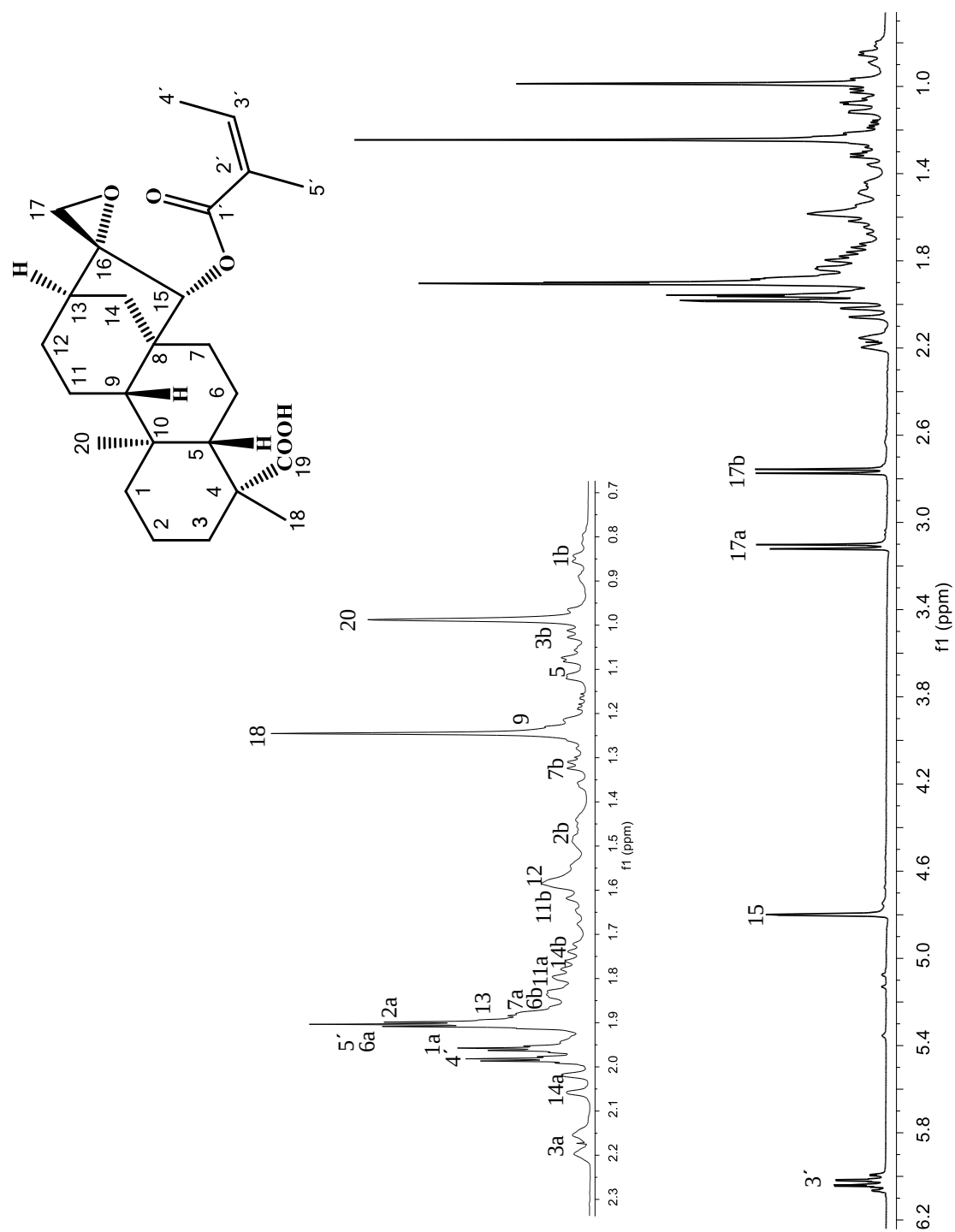


Figura 5.4. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del ácido 15- α -angeloliloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (**14**).

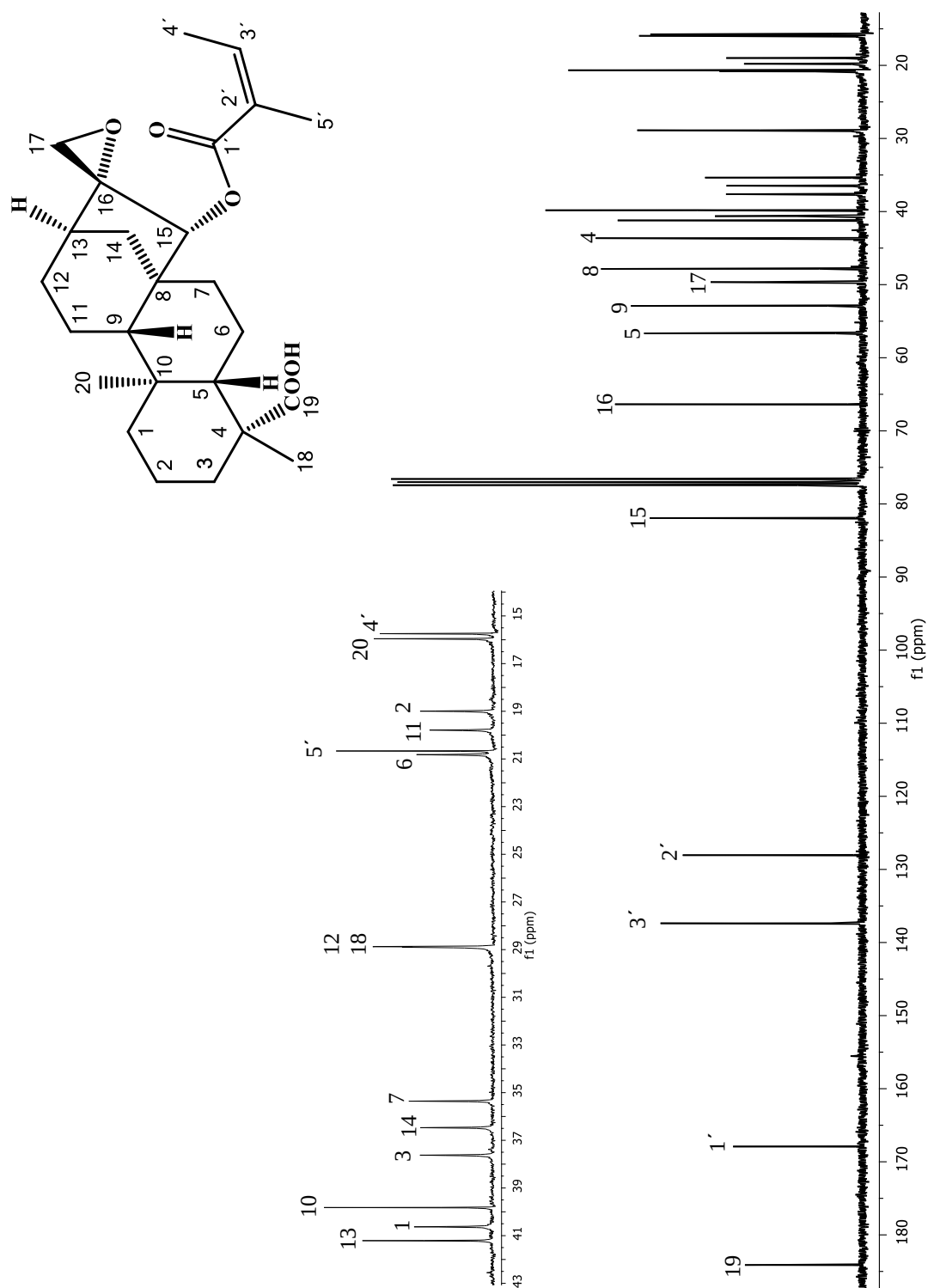


Figura 5.5. Espectro de RMN de ^{13}C a 75 MHz del ácido 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (14).

El resto de las señales se observaron entre δ 50.0-15.0. En el experimento DEPT se observó que las señales en δ 28.89, y 28.86 correspondían a un metileno (C-12) y a un metilo (C-18), respectivamente. De igual manera, la asignación inequívoca de estos dos carbonos pudo hacerse mediante el experimento APT, ya que se obtuvieron señales con fases invertidas para cada carbono.³⁵

En el experimento COSY (figura 5.6) se observó que la señal cuádruple ubicada en δ 6.01 correspondiente a H-3' de carbono vinílico del grupo angelato, correlacionó con la señal doble en δ 1.98 del grupo metilo del angelato la cual se asignó como H-4'. Se apreció un acoplamiento a larga distancia (en "W") entre la señal simple ancha en δ 4.79 base de éster (H-15) y el metileno en H-14. Además se demostró la correlación existente entre la señal doble en δ 3.11 del H-17a con la señal doble en δ 2.76 que pertenece a H-17b.

En el experimento HETCOR (figura 5.7) se observaron correlaciones del C-3' vinílico en δ 137.37 con la señal cuádruple del grupo angelato en δ 6.04 (H-3'), el C-15 base de éster en δ 81.93 que correlacionó con la señal simple ancha en δ 4.79 perteneciente al H-15, la señal del carbono base de epóxido en δ 49.65 (C-17) mostró correlaciones con los dos dobletes en δ 3.11 y δ 2.76 para H-17a y H-17b, respectivamente.

La asignación estructural del compuesto se realizó con ayuda de los experimentos COSY, HETCOR y HMBC. Al realizar una búsqueda en la literatura, para determinar si el diterpeno ya había sido reportado, se encontró que este compuesto es conocido como ácido peryménico o ácido 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (**14**) el cual ha sido aislado de diferentes géneros vegetales: *Smallanthus sp*²², *Chromoleana odorata*²³, *Polymnia sonchifolia*³⁶, *Perymenium ecuadoricum*³⁷ y *Smallanthus fruticosus*³⁸. La asignación del fragmento del grupo angelato fue corroborado con los datos de la literatura³⁹.

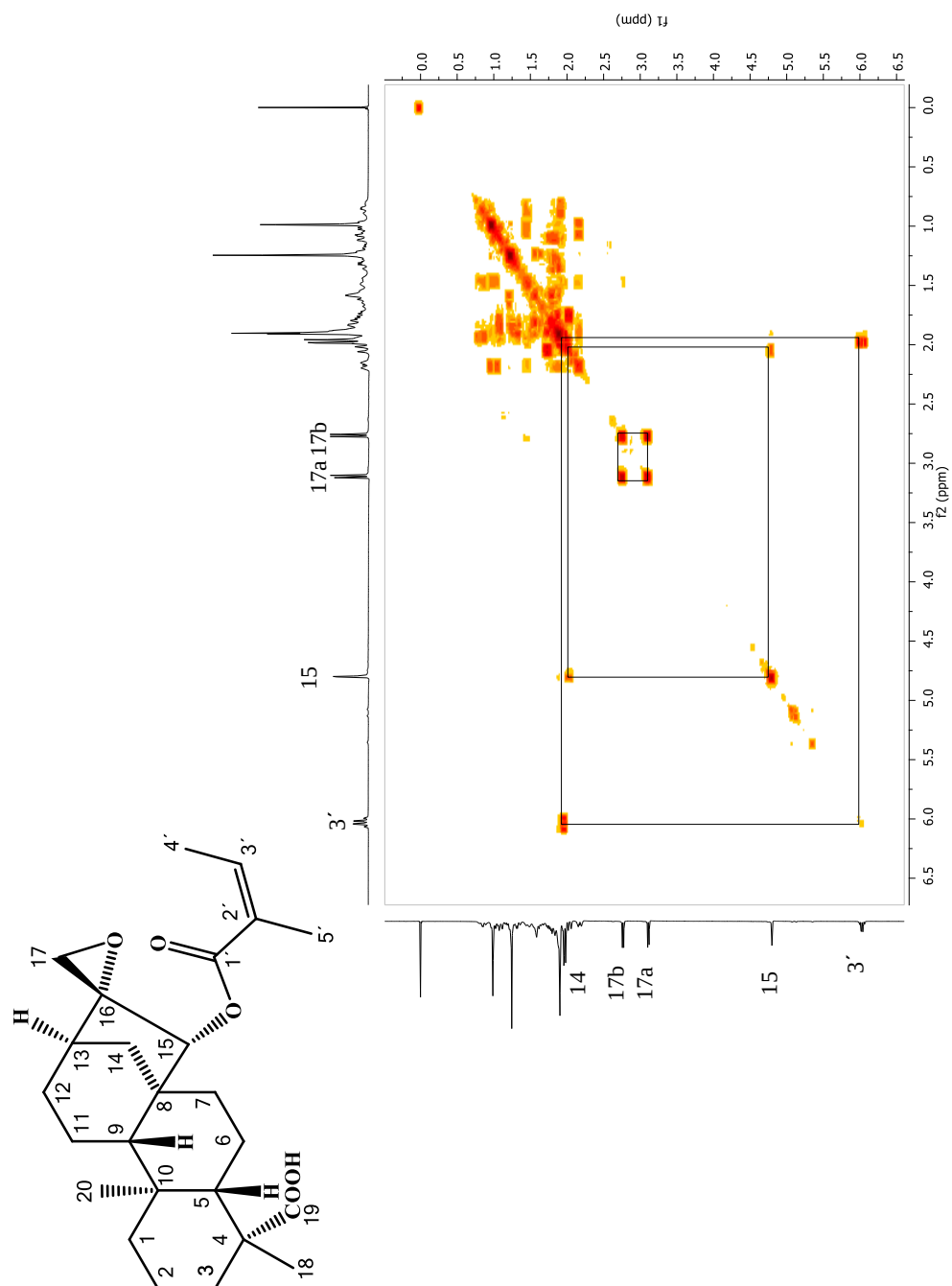


Figura 5.6. Experimento COSY del ácido 15- α -angeloloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (14).

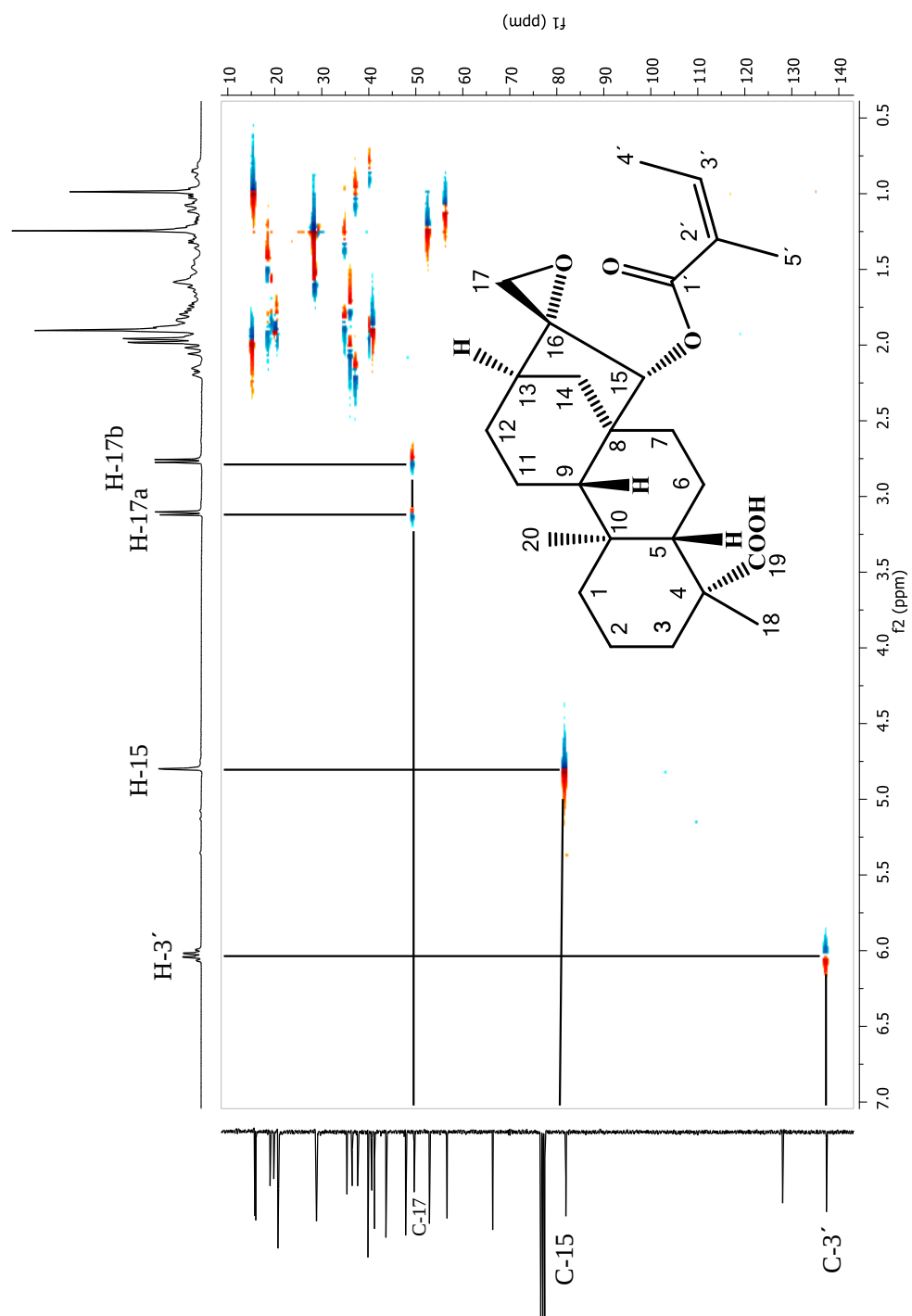
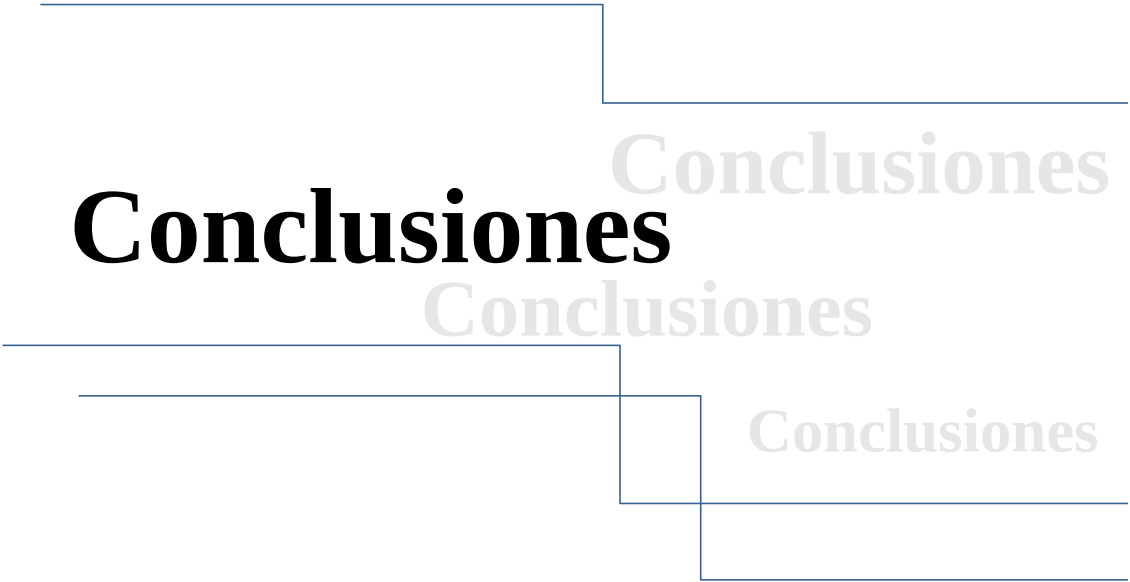


Figura 5.7. Experimento HETCOR del ácido 15- α -angeloloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (**14**).

Tabla 5.2. Datos de RMN de ^{13}C del ácido peryménico (**14**)

CARBONO	EXPERIMENTAL δ en ppm	LITERATURA δ en ppm (1992)³⁶	LITERATURA δ en ppm (2011)²³
1	40.61	40.6	41.2
2	18.98	19.8	28.9
3	37.60	36.5	37.7
4	43.63	43.6	43.6
5	56.65	56.7	56.7
6	20.81	20.8	19.0
7	35.35	37.7	35.4
8	47.83	47.9	47.9
9	52.88	52.9	52.9
10	39.80	39.8	39.8
11	19.78	19.0	19.8
12	28.89	35.4	20.8
13	41.19	41.2	41.2
14	36.46	35.4	36.5
15	81.93	82.0	81.9
16	66.36	66.4	66.3
17	49.65	49.7	49.6
18	28.86	28.9	28.8
19	184.12	183.8	182.3
20	15.94	15.8	15.7
1'	167.91	168	167.9
2'	128.04	128.1	128.1
3'	137.37	137.4	137.3
4'	15.73	16.0	15.9
5'	20.65	20.7	20.6

Se realizó una comparación de los datos experimentales obtenidos en RMN de ^{13}C y los de la literatura para el ácido peryménico (**14**), donde se observó que para el derivado **14** aislado de las hojas de *Polymnia sonchifolia*³⁶, los autores indican un traslape en 35.4 ppm, observándose además que la asignación de sus carbonos C-2, C-3, C-7, C-11, C-12 y C-14 pueden estar intercambiadas. Mientras que la comparación de los datos con el diterpeno **14** aislado de la raíz de *Chromoleana odorata*²², los autores coinciden en gran parte con los valores del desplazamiento químico en RMN de ^{13}C ; sin embargo, se observó una discrepancia en la asignación de sus carbonos C-2, C-6 y C-12 con respecto a la propuesta en el presente trabajo, la cual se propuso con base en un análisis minucioso del experimento HMBC, por lo que las asignaciones reportadas por ambos autores deben ser revisadas.



Conclusiones

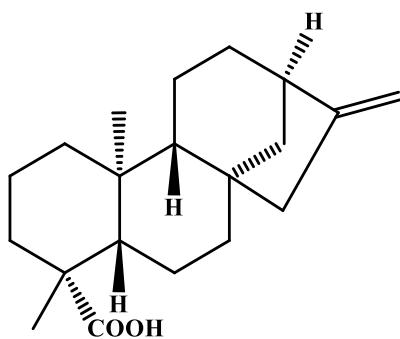
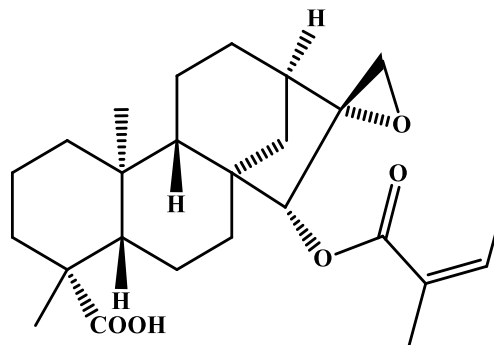
Conclusiones

Conclusiones

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Del estudio químico preliminar de los extractos hexánicos de raíz de *Lasianthaea aurea* se logró la separación e identificación de los compuestos de tipo diterpenos con esqueleto de kaureno, llamados *ent*-kaur-16-en-19-oico (**6**) y 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-*ent*-kaur-16-en-19-oico (**14**).

**6****14**

Estos compuestos fueron separados por técnicas cromatográficas, e identificados por resonancia magnética nuclear de 1D y 2D. El compuesto **6** se encontró como mayoritario en la raíz, y en menos proporción el compuesto **14**.

Cabe destacar que este es el primer estudio fitoquímico la especie *Lasianthaea aurea*.

La asignación inequívoca del espectro de RMN de ^{13}C del *ent*-kaureno **14** fue soportada por un análisis minucioso de RMN de 2D, y esta asignación resultó distinta para **14** obtenido de *Polymnia sonchifolia* y *Chromoleana odorata*. Los datos de estos reportes previos deben ser revisados.

Metodología experimental

Metodología
experimental

Metodología
experimental

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1. Materia vegetal

La colecta de la especie vegetal *Lasianthaea aurea*, se realizó el 29 de Julio del 2014 en el kilómetro 3 de la carretera Tiripetio-Villa Madero en Michoacán. Una muestra se preparó y se envió al Herbario del Instituto de Ecología A.C. en Pátzcuaro, Michoacán, México, para su identificación botánica por parte del D.C. Jerzy Rzedowski.

La planta colectada, se dejó secar a la sombra y extendida, para su posterior separación en sus distintas partes: flor, hoja, tallo y raíz.

7.2. Obtención de extractos

La raíz una vez seca y triturada (405 g), se maceró con 1.5 L de hexanos a temperatura ambiente por tres días, se filtró y se evaporó el disolvente en rotavapor, y se obtuvo el extracto, proceso que se realizó por tres ocasiones consecutivas con el mismo disolvente, obteniendo un total de extracto hexánico de 39 g color amarillo y textura viscosa con un rendimiento de 9.6%.

7.3. Espectroscopia y métodos físicos

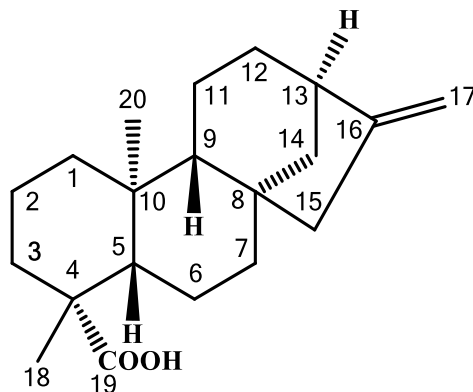
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz se midieron en un equipo Varian Mercury Plus 400, los espectros de RMN de ^1H a 300 MHz y ^{13}C a 75 MHz en equipo de Varian Mercury Plus 300, así como los espectros de correlación bi-dimensionales. Se utilizó como disolvente deuterocloroformo (CDCl_3)

para todos los casos y como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). Los espectros fueron procesados empleando el programa MestReNova.

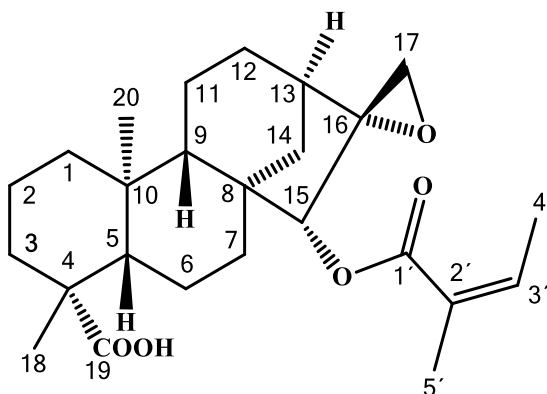
7.4. Estudio químico

La separación de los compuestos se realizó mediante columna cromatografica de vidrio con diámetro de 4 cm, utilizando gel de sílice de malla 230-400 marca Merck, con una altura de 12 cm como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de hexanos-acetato de etilo en orden de polaridad creciente, colectando fracciones de 10 mL. La cromatografía de columna fue monitoreada por la cromatografía en capa fina.

Ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (6)

Cristales blancos, punto de fusión: 175-177 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ 4.80 (1H, s, H-17a), 4.74 (1H, s, H-17b), 2.64 (1H, ta, $J = 4.0$ Hz, H-13), 2.16 (1H, da, $J = 14.6$ Hz, H-3a), 2.05 (2H, m, H-15), 1.99 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-14a), 1.90 (1H, m, H-1a), 1.86 (1H, m, H-2a), 1.82 (2H, m, H-6), 1.62 (1H, m, H-12a), 1.58 (2H, m, H-11), 1.51 (2H, m, H-7), 1.46 (1H, m, H-12b), 1.24 (3H, s, H-18), 1.13 (1H, dd, $J = 11.0, 4.6$ Hz, H-14b), 1.08 (1H, m, H-5a), 1.6 (1H, dda, $J = 10.6, 4.3$ Hz, H-9), 1.01 (1H, m, H-3b), 0.95 (3H, s, H-20), 0.88 (1H, m, H-5b), 0.81 (1H, td, $J = 13.3, 4.0$ Hz, H-1b).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 184.77 (C, C-19), 155.83 (C, C-16), 102.98 (CH_2 , C-17), 155.83 (CH, C-16), 55.08 (CH- C-9), 48.93 (CH_2 - C-15), 44.20 (C-C-8), 43.82 (CH, C13), 43.73 (C, C-4), 40.68 (CH_2 , C-1), 39.67 (CH_2 , C-14), 39.64 (C, C-10), 37.74 (CH_2 , C-3), 33.08 (CH_2 , C-12), 28.94 (CH_3 , C-18), 21.80 (CH_2 , C-6), 19.07 (CH_2 , C-2), 18.41 (CH_2 , C-11), 15.56 (CH_3 , C-20). EMIE m/z 302 $[\text{M}]^+$ (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$, 302 g/mol).

Ácido perymenico o 15- α -angeloiloxi-16 α ,17-epoxi-ent-kaur-16-en-19-oico (14)

Cristales transparentes, punto de fusión: 235-237 °C. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ 6.04 (1H, q, $J = 7.2$, H-3'), 4.79 (1H, sa, H-15), 3.11 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-17a), 2.76 (1H, d, $J = 5.3$ Hz, H-17b), 2.18 (1H, da, $J = 12.89$ Hz, H-3a), 2.04 (1H, m, H-14a), 1.97 (3H, dd, $J = 7.3, 1.5$ Hz, H-4'), 1.92 (1H, m, H-1a), 1.91 (2H, m, H-6), 1.91 (3H, m, H-5'), 1.89 (1H, m, H-2a), 1.88 (1H, m, H-13), 1.86 (1H, m, H-7a), 1.84 (1H, m, H-6b), 1.81 (1H, m, H-11a), 1.75 (1H, m, H-14b), 1.61 (1H, m, 11b), 1.57 (2H, m, H-12), 1.47 (1H, m, H-2b), 1.31 (1H, m, H-7b), 1.25 (3H, m, H-18), 1.23 (1H, m, H-9), 1.11 (1H, m, H-5), 0.99 (3H, m, H-20), 0.85 (1H, m, H-1b).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 184.12 (C, C-19), 167.91 (C, C-1'), 137.37 (CH, C-3'), 128.04 (C, C-2'), 81.93 (CH, C-15), 66.36 (C, C-16), 56.65 (CH, C-5), 52.88 (CH, C-9), 49.65 (CH_2 C-17), 47.83 (C, C-8), 43.63 (C, C-4), 41.19 (CH, C-13), 40.61 (CH_2 , C-1), 39.80 (C, C-10), 37.60 (CH_2 , C-3), 36.46 (CH_2 , C-14), 35.35 (CH_2 , C-7), 28.89 (CH_2 , C-12), 28.86 (CH_3 -C-18), 20.81 (CH_2 , C-6), 20.65 (CH_3 , C-5'), 19.78 (CH_2 ' C-11), 18.98 (CH_2 , C-2), 15.94 (CH_3 , C-20), 15.73 (CH_3 , C-4').



Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

1.Vallespí RM, Farrán MA, López C, Pérez M, Gutiérrez DS, (2013) Química Bioorgánica y Productos Naturales. Madrid: Universidad nacional de educación a distancia.

2.Sepúlveda G, Porta H, Rocha M, (2003) La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 355-363.

3.Ávalos A, Pérez E, (2009) Metabolismo secundario de plantas, *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2: 119-145.

4.Valares-Masa C, (2011) Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente, Tesis de Doctorado en Ciencias, Departamento de biología vegetal ecología y ciencias de la Tierra, Área de ecología, Universidad De Extremadura, Badajoz.

5.Harbone JB, (1998) *Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant analysis*, Third ed, Chapman & Hall.

6.Dewick PM, (2009) "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach", 3er Edición. Ed. Wiley, United Kingdom.

7.Villaseñor JL (2003) Diversidad y distribución de las *Magnoliophyta* de México, *Interciencia*, 28: 160-167.

8.Katinas L, Gutiérrez DG, Grossi MA, Crisci JV (2007) Panorama de la familia Asteracea (= compositae) en la República Argentina, *Boletín de la sociedad Argentina de Botánica*, 42: 113-129.

9. García CA, Sánchez A, Villaseñor JL, (2014) La familia Asteraceae en el parque Nacional los Mármoles, Hidalgo, México, *Acta Botánica Mexicana*, 106: 97-116.

10. Tapia Muñoz JL, (2010) *Herbario CICY centro de investigación científica de Yucatán*. Recuperado Octubre de 2015, de:
http://www.cicy.mx/SITIOS/desde_herbario/2010/diciembre/la-familia-asteraceae.

11. Rzedowski J, Calderón de Rzedowski G, Carrillo-Reyes P, (2011) Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, *INECOL*, 172: 1-100.

12. Libraries HU, (2013) *Harvard University*, obtenido de: Index of BotanicalSpecimens:
http://kiki.huh.harvard.edu/databases/taxon_search.php?mode=details&id=64738.

13. Libraries HU, (2013) *Harvard University*, obtenido de: Index of BotanicalSpecimens:
http://kiki.huh.harvard.edu/databases/taxon_search.php?mode=details&id=64753.

14. Libraries, HU, (2013) *Harvard University*, obtenido de: Index of Botanical Specimens:
http://ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=267866-2&back_page.

15. Wiemer DF, Ales DC, (1981) Lasidiol Angelate: Ant repellent sesquiterpenoid from *Lasiantheae fruticose*, *Journal of Organic Chemistry*, 46: 5449-5450.

16. Ahmed M, Jakupovic J, Castro V, (1991) Kaurene derivatives from *Lasianthea fruticosa*, revision of stereochemistry of related compounds, *Phytochemistry*, 30: 1712-1714.

17. Bohlmann F, Lonitz M, (1978) Neue sadaracopimaradien-derivate, sesquiterpene uns sesquiterpenlactone aus *Zexmenia*-Arten, *Chemische Berichte*, 111: 843.
18. Ghisalberti E, Jefferies P, Stuart A, (1979) The absolute configuration of a sesquiterpene enone from *Stevia purpurea* and a phenol from *Lasianthaea podocephala*, *Australian Journal of Chemistry*, 32: 1627-30.
19. Bruneton J, (2001) Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales, 2da edición, ACRIBA.
20. Anselmo P, Braga A, Batista R, (2007) Occurrence, biological activities and synthesis of kaurane diterpenes and their glycosides, *Molecules*, 13: 455-483.
21. Soto AE, Del Val S, (2002) Extracción de los principios edulcorantes de la *Stevia rebaudiana*, *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 20: 5-9.
22. Coll MV, Mercado MI, Grau A, Catalán C, (2010) *Ent*-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus* species (Heliantheae, Asteraceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 1042-1048.
23. Pascal W, Kamdem R, Ali Z, Anjum S, Begum A, Oluyemisi O, Khan S, Ngadjui B, Etoa X, Choudhary, (2011) Kaurane-type diterpenoids from *Chromoleana odorata*, their X-ray diffraction studies and potent α -glucosidase inhibition of 16-kuren-19-oic acid, *Fitoterapia*, 82: 642-646.
24. Mottakin AKM, Chowdhury R, Haider MS, Rahman KM, Hasan CM, Rashid MA, (2004) Cytotoxicity and antibacterial activity of extractives from *Wedelia calendulacea*, *Fitoterapia*, 75: 355-359.

25. Qiang Y, Du D-L, Chen Y-J, Gao K, (2011) *Ent*-kaurane diterpenes and further constituents from *Wedelia trilobata*, *Helvetica Chimica Acta*, 94: 817-823.
26. Dutra L, Bomfim L, Rocha S, Neper A, Soares M, Barison A, Costa E, Bezerra D (2014) *Ent*-kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24: 3315-3320.
27. Batista R, García P, Castro MA, del Corral JM, Feliciano A, de Oliveira A, (2010) Iso-kaurenoic acid from *Wedelia paludosa* D.C., *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 82: 823-831.
28. Peña A, Alarcón L, Usubillaga A, (2008) *Ent*-15 α -(3-methoxy-3-methylbutanoyl)-kaur-16-en-19-oic acid a new *ent*-kaurenic acid derivative isolated from *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd) Cuatrec. (Asteraceae), *Avances en Química*, 3: 95 - 97.
29. Villa-Ruano N, Betancourt-Jiménez MG, Lozoya-Gloria E, (2009) Biosynthesis of uterotonic diterpenes from *Montanoa tomentosa* (zoapatle), *Journal of Plant Physiology*, 166: 1961-1967.
30. Brito S, Crescente O, Fernández A, Coronado A, Rodríguez N, (2006) Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Biomédica*, 26: 180-187.
31. Vieira H, Takahashi J, de Oliveira A, Chiari E, Boaventura MA, (2002) Novel derivatives of kaurenoic acid: preparation and evaluation of their Trypanocidal Activity, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 13: 151-157.

32.Batista R, García P, Castro MA, del Corral JM, Speziali N, Varotti F, de Paula R, García-Fernández L, Francesch A, Feliciano A, Oliveira A, (2013) Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62: 168-176.

33.Joo R, Myoung E, Ah H, Sue J, Shik Y, (2011) Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages, *Phytomedicine*, 18: 677-682.

34.Okoye TC, Akah PA, Nworu CS, Ezike AC, (2014) Kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis* induces cytotoxic and antiproliferative effects against PANC-1 and HeLa cells, *European Journal of Medicinal Plants*, 4: 579-589.

35.Patt SL, Ruben D, Shoolery JN, (1982) *Journal of Magnetic Resonance*, 46: 535-539.

36.Kakuta H, Seki T, Hashidoko Y, Mizutani J, (1992) Ent-kaurenic acid its related compounds from glandular trichome exudate and leaf extracts of *Polymnia sonchifolia*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 1562-1564.

37.Bohlmann F, Zdero C, (1977) Eine neue diterpensäure aus *Perymenium ecuadoricum*, *Phytochemistry*, 16: 786-787.

38.Bohlmann F, Ziesche J, King RM, Robinson H, (1980) Neue melampolide aus *Smallanthus fruticosus*, *Phytochemistry*, 19: 973-974.

39.Joseph-Nathan P, Wesener JR, Günther H, (1984) A two-dimensional NMR study of angelic and tiglic acid, *Organic Magnetic Resonance*, 22: 190-191.